



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorziata: Seconda Università degli Studi di Napoli

Dipartimento di Medicina Sperimentale della Facoltà di Medicina e Chirurgia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biologia e Medicina della Rigenerazione

INDIRIZZO: Endocrinologia Comparata

CICLO XX

STUDIO DEL RUOLO DEI PROTONCOGENI E CANNABINOIDI NEI MECCANISMI  
DI RILASCIO ED ACQUISIZIONE DELLA MOTILITA' DEGLI SPERMATOZOI NEI  
VERTEBRATI.

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Riccardo Pierantoni

**Dottoranda:** Giovanna Cacciola

31 gennaio 2008

## INDICE

<b>CAPITOLO 1</b>	
Summary	p.2
Riassunto	p.4
I.1 Introduzione	p.6
<b>CAPITOLO 2</b>	
II.1 Introduzione	p.10
II.2 Materiali e metodi	p.13
II.3 Risultati	p.18
II.4 Discussione	p.53
<b>CAPITOLO 3</b>	
III.1 Introduzione	p.56
III.2 Materiali e metodi	p.59
III.3 Risultati	p.65
III.4 Discussione	p.85
<b>CAPITOLO 4</b>	
IV.1 Introduzione	p.88
IV.2 Materiali e metodi	p.91
IV.3 Risultati	p.96
IV.4 Discussione	p.118
<b>CAPITOLO 5</b>	
V.1 Introduzione	p.121
V.2 Materiali e metodi	p.123
V.3 Risultati	p.124
V.4 Discussione	p.127
<b>CONCLUSIONI</b>	p.128
<b>APPENDICE</b>	p.130
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	p.152

## SUMMARY

*Rana esculenta* is a seasonal breeder, characterized by a period of resumption of spermatogonial proliferation (late winter- early spring), a well defined period of mating (March- April) and a post-reproductive period (Rastogi *et al.*, 1972). This animal model, particularly suitable to study the role of molecules related to testicular physiology (Pierantoni *et al.*, 2002), was used to analyze protooncogenes (Cobellis *et al.*, 2002; Cobellis *et al.*, 2003) and endocannabinoid activity.

Besides the demonstration of Fra1 presence in a non-mammalian vertebrate gonad, we report, for the first time in a vertebrate, experimental evidence showing that the expression of Fra1 is related to peritubular myoid cells (PMCs). We confirm the effect of hypophysis omogenate (PD) on sperm release (Minucci *et al.*, 1989) and demonstrate that PD increases Fra1 signal through recruitment of new PMCs expressing Fra1. Recruitment happens really when PMCs propel SPZ toward tubules and ducts, thus suggesting a new role for Fra1 in the control of sperm release from the tubular compartment. Sperm release includes two events: spermiation and sperm transport; both contribute to the sperm output from the testis. In vertebrates, few data are available on the signals responsible for sperm release.

We demonstrate that hypophysis and estrogens together regulate sperm release, mainly affecting spermiation. We also show, for the first time in a vertebrate, that estrogens trigger Fra1 activity in PMCs and simultaneously influence sperm release. In particular, impairment of estrogen activity by ICI 182-780 reduces sperm release, PD induced, mainly affecting spermiation. Animal, in fact, treated with PD+ICI present low number of spermiated tubules and cloacal spermatozoa (SPZ). Finally we show that in cloaca endocannabinoids control percentage of motile SPZ by sperm motility inhibition.

We suppose that they could keep the SPZ motility quiescent until mating, when sperm release dilute endocannabinoids and induces sperm motility acquisition through CNR1 activity impairment. Linear dilution of cloacal fluid, in fact, enhances the percentage of motile SPZ, demonstrating that cloacal fluid substances control the percentage of motile SPZ depending on their concentrations. Treatment of SPZ with increasing concentrations of

SR141716A unequivocally confers this control to endocannabinoids through CNR1 activation.

The analysis of CNR1 Knock out male mice demonstrates that, in absence of CNR1, SPZ acquire motility precociously. In the epididymus of wild type (WT) mice, in fact, we find higher percentage of motile SPZ in *cauda* than in *caput*. In CNR1KO mice, instead, the percentage of motile SPZ in caput is dramatically increased, clearly demonstrating that, in absence of CNR1 signalling, SPZ precociously acquire motility.

## RIASSUNTO

L'anfibio anuro, *Rana esculenta* è un riproduttore stagionale con una spermatogenesi ciclica. Nel tardo inverno-inizio primavera avviene la moltiplicazione degli SPGI, poi la spermatogenesi si organizza in cisti (cluster di cellule germinali funzionalmente sincronizzate ed avvolte da una singola cellula del Sertoli) e progredisce fino in autunno arricchendo mensilmente il testicolo di cellule germinali ad uno stesso stadio di differenziamento (da SPGII a SPZ) (Rastogi 1976). Nel periodo marzo- aprile, dopo la stasi invernale, gli animali si accoppiano, rilasciando gli spermatozoi nell'ambiente acquatico (Rastogi *et al.*, 1972). Questo modello animale, particolarmente adatto allo studio della fisiologia testicolare (Pierantoni *et al.*, 2002), è stato usato per analizzare il ruolo dei protoncogeni (Cobellis *et al.*, 2002; Cobellis *et al.*, 2003) e degli endocannabinoidi nella riproduzione maschile.

Oltre a dimostrare la presenza di Fra1 nella gonade di un vertebrato non mammifero, noi riportiamo l'espressione di Fra1 nelle cellule peritubulari midiali (PMC). Noi confermiamo l'effetto dell'omogenato d'ipofisi (PD) sul rilascio degli spermatozoi (SPZ) (Minucci *et al.*, 1989) e dimostriamo che il trattamento con PD incrementa l'espressione di Fra1, aumentando il numero di PMC immunopositive per Fra1. Poiché le PMC sono cellule contrattili e sono capaci di spingere gli SPZ dai tubuli verso i dotti, noi suggeriamo un nuovo ruolo per Fra1 nel controllo del rilascio degli SPZ dal compartimento tubulare.

Il rilascio degli SPZ comprende due eventi: spermiazione e trasposto degli SPZ. Nei vertebrati i segnali responsabili del rilascio degli SPZ non sono ben chiari.

Noi dimostriamo che l'ipofisi e gli estrogeni regolano insieme il rilascio degli SPZ, influenzando soprattutto la spermiazione. Noi mostriamo anche, per la prima volta in un vertebrato, che gli estrogeni attivano Fra1 nelle PMC e influenzano simultaneamente il rilascio degli SPZ. In particolare, la ridotta attività estrogenica, mediante trattamento con ICI 172-780, riduce il rilascio degli SPZ, influenzando soprattutto la spermiazione. Gli animali, infatti, trattati con Pd+ICI mostrano un basso numero di tubuli spermianti e SPZ in cloaca. Infine, mostriamo che gli endocannabinoidi in cloaca controllano la percentuale di SPZ motili mediante inibizione della loro motilità. Noi supponiamo che essi mantengano la motilità degli SPZ quiescente fino all'accoppiamento, quando il rilascio degli SPZ diluisce gli endocannabinoidi ed induce l'acquisizione della motilità degli SPZ attraverso una

ridotta attività di CNR1. La diluizione lineare del fluido cloacale, infatti, aumenta la percentuale di SPZ motili, dimostrando che gli endocannabinoidi del fluido cloacale controllano la percentuale di SPZ motili in base alla loro concentrazione. Il trattamento degli SPZ con concentrazioni crescenti di SR141716A conferma che tale controllo è mediato dall'attivazione di CNR1.

Basandoci su questi risultati, abbiamo ipotizzato che l'epididimo eserciti un ruolo centrale nell'indurre la motilità degli SPZ attraverso l'inibizione del controllo negativo degli endocannabinoidi. Nell'epididimo di topi CD1, noi troviamo una maggiore percentuale di SPZ motili nella coda rispetto alla testa. Nei topi CNR1KO, invece, la percentuale di SPZ motili nella testa incrementa significativamente, dimostrando che, in assenza del segnale inibitorio di CNR1, gli SPZ acquisiscono precocemente motilità.

### **I.1. Introduzione.**

La spermatogenesi è un processo molto conservato tra i Vertebrati, in cui spermatogoni (SPG) differenziati si modificano in spermatociti primi (SPCI) in pre-leptotene, per ottenere alla fine della seconda divisione meiotica spermatidi (SPT) rotondi (rSPT), cellule aploidi che, si differenziano, mediante la spermiogenesi, in spermatidi allungati (eSPT), anche detti SPT maturi. Le cellule germinali sono supportate fisicamente e funzionalmente dalle cellule del Sertoli, le quali, mediante attività paracrina, regolano la progressione delle cellule germinali da SPG a SPT maturi, ed alla fine della spermiogenesi, si contraggono e facilitano il rilascio degli spermatidi maturi (spermiazione) nel lume del tubulo seminifero (Abrescia 1998).

Nei dotti, ulteriori trasformazioni inducono la formazione degli spermatozoi (SPZ), cellule polari altamente specializzate di forma allungata e dotate di flagello (Rosati 1993).

In tutti i Vertebrati, il testicolo è organizzato in due compartimenti: interstiziale e germinale.

Negli anfibi anuri, il tessuto interstiziale è formato da cellule di Leydig, che producono testosterone, fibroblasti, mastociti, vasi sanguigni e dotti efferenti, mentre il compartimento germinale è costituito da una massa di tubuli seminiferi convoluti con un epitelio germinativo permanente. I tubuli seminiferi sono circondati dalle cellule peritubulari mioidi, che, durante la spermiazione, si contraggono ed impongono al tubulo seminifero un movimento peristaltico, capace di spingere gli SPZ, attraverso i tubuli ed i dotti efferenti fino al dotto esterno. Da qui gli SPZ giungono in cloaca e poi nell'ambiente acquatico (Fig.1).

L'epitelio germinativo è costituito da cisti, che arricchiscono il testicolo di specifiche cellule spermatogenetiche in base al periodo dell'anno (Figura 2).

L'anfibia anuro, *Rana esculenta*, infatti, è un riproduttore stagionale con una spermatogenesi ciclica. Nel tardo inverno-inizio primavera avviene la moltiplicazione degli SPGI, poi la spermatogenesi si organizza in cisti (cluster di cellule germinali funzionalmente sincronizzate ed avvolte da una singola cellula del Sertoli) e progredisce fino in autunno arricchendo mensilmente il testicolo di cellule germinali ad uno stesso stadio di differenziamento (da SPGII a SPZ) (Rastogi 1976). Nel periodo marzo- aprile, dopo la stasi

invernale, gli animali si accoppiano, rilasciando gli spermatozoi nell'ambiente acquatico (Rastogi *et al.*, 1972).

Data la complessità del sistema riproduttivo maschile nei Vertebrati ed i numerosi fattori coinvolti nella sua fisiologia (Bhattacharyya AK *et al.*, 2003), abbiamo studiato la riproduzione in *R. esculenta* ed in particolare il ruolo svolto da molecole di segnalazione locale (estrogeni ed endocannabinoidi), durante la formazione (spermatogenesi e spermioistogenesi), il rilascio (spermiazione e trasporto) e l'acquisizione della motilità degli SPZ.





**Attività di Fra1 nel testicolo dell'anfibio *Rana esculenta*: un nuovo ruolo nel trasporto degli spermatozoi.**

In uno studio precedente, utilizzando un anticorpo policlonale, che riconosceva tutti i membri della famiglia Fos, abbiamo individuato una proteina nucleare di 43KDa nel testicolo di *Rana esculenta*, che abbiamo ipotizzato essere Fra1. Con un anticorpo anti Fra1, che non cross-reagisce con gli altri membri della famiglia Fos, abbiamo studiato l'espressione, la localizzazione e l'attività di Fra1 nel testicolo di *R. esculenta* durante il ciclo riproduttivo annuale. L'analisi di Western Blot conferma che la proteina nucleare di 43KDa è Fra1. L'immunoistochimica mostra la presenza di Fra1 nelle cellule peritubulari mioidi, nei dotti efferenti e nei vasi sanguigni. I nostri dati riportano, per la prima volta in un vertebrato, che l'espressione di Fra1 nelle cellule peritubulari mioidi è associata con il trasporto degli spermatozoi dal compartimento tubulare ai dotti efferenti.

Cobellis *et al.*, *Biology of Reproduction* 72, 1101-1108 (2005). DOI: 10.1196

## II.1 Introduzione

Fra1 appartiene alla famiglia delle proteine Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 e Fra2), che eterodimerizzano con i membri della famiglia Jun (c-Jun, Jun B e Jun D) in modo da formare il complesso trascrizionale AP-1. Tale complesso, a sua volta, lega sequenze consenso sul DNA (Karin *et al.*, 1997). AP-1 è coinvolto in molti processi cellulari, come lo sviluppo, il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi, la trasformazione oncogenica e la risposta ad agenti genotossici (Karin *et al.*, 1997) (Angel *et al.*, 1991). I complessi AP-1, finora conosciuti, hanno affinità di legame simili per il DNA (Cohen *et al.*, 1989), ma attività biologiche diverse in base alle subunità AP-1 (Angel *et al.*, 1991; Karin 1995; Karin *et al.*, 1997). Studi *in vitro* suggeriscono che i vari dimeri AP-1 possono agire come attivatori trascrizionali tessuto specifici e/o segnale specifici (Fleischmann *et al.*, 2000).

Fra1 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare di cellule normali (Kovary *et al.*, 1992) e tumorali (Bergers *et al.*, 1995; Vallone *et al.*, 1997). Inoltre, Fra1 e Fra2 sono altamente espressi durante il ciclo cellulare in G1, quando c-Fos e Fos B sono assenti (Kovary *et al.*, 1992; Gruda *et al.*, 1994), suggerendo che Fra1 e Fra2 svolgono un ruolo importante nella crescita cellulare. L'eliminazione specifica del gene Fra1 causa letalità embrionale precoce, dovuta ad una ridotta vascolarizzazione della placenta (Schreiber *et al.*, 2000). Di conseguenza, gli altri monomeri del complesso AP-1, nonostante siano presenti, non riescono a compensare la mancanza di Fra1.

La regolazione dell'attività di AP-1 avviene o attraverso un'aumentata espressione delle specifiche unità monomeriche di AP-1 o mediante la fosforilazione di subunità AP-1 preesistenti e/o neosintetizzate (Karin *et al.*, 1995; Karin *et al.*, 1997; Leppa *et al.*, 1999). Nel testicolo di *Rana esculenta*, la fosforilazione di c-Fos è coinvolta nella sua traslocazione nucleare e nella proliferazione spermatogoniale (Cobellis *et al.*, 2002; Pierantoni *et al.*, 2002; Cobellis *et al.*, 2003). Inoltre Fra1 subisce modifiche post-traduzionali, che ne incrementano il peso molecolare da 36 a 46KDa o più (Gruda *et al.*, 1994).

Nei fibroblasti in coltura, Fra1 presenta una localizzazione citoplasmatica e nucleare (Cohen *et al.*, 1989; Roux *et al.*, 1990), osservata tuttavia anche *in vivo* in numerosi modelli animali, quali anfibi (Cobellis *et al.*, 2003; Pierantoni *et al.* 2003), rettili (Chieffi *et al.*,

1997) e mammiferi (Xavier *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2003; Rusovici *et al.*, 2003). In dettaglio, Fra1 è stato localizzato nel nucleo di cellule testicolari di volpe (Cohen *et al.*, 2003) ed ovariche di maiale (Rusovici *et al.*, 2003).

In topo e ratto, Fra1 è presente negli spermatogoni (Kierszenbaum 1994), mentre nella volpe rossa, *Vulpes vulpes*, si localizza a livello perinucleare negli spermatogoni e a livello nucleare negli spermatociti e spermatidi rotondi ed allungati (Cohen *et al.*, 1993).

Nel testicolo di *R. esculenta*, utilizzando un anticorpo capace di riconoscere tutti i membri della famiglia Fos, abbiamo descritto una proteina di 43KDa, ipotizzata essere Fra1 (Cobellis *et al.*, 2002; Cobellis *et al.*, 2003).

La *R. esculenta* è un riproduttore stagionale, caratterizzato da un periodo di ripresa della proliferazione spermatogoniale (gennaio-febbraio), un periodo ben specifico per l'accoppiamento (marzo-aprile) ed infine una fase postriproduttiva (Rastogi *et al.*, 1972). Mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico per Fra1, abbiamo 1) confermato l'identità dell'antigene di 43KDa della famiglia Fos; 2) caratterizzato la sua espressione e localizzazione e 3) descritto un possibile ruolo nella riproduzione maschile, legato al trasporto degli spermatozoi (SPZ) dal compartimento tubulare al dotto esterno.

## **II.2 Materiali e metodi**

### ***Animali.***

Mensilmente, per due anni consecutivi, maschi di *Rana esculenta* (n=15) sono stati catturati in uno stagno vicino Napoli, anestetizzati con MS222 (Sigma –Aldrich Corp., St Louis, MO) e sacrificati. I testicoli sono stati espianati e immediatamente processati per immunocitochimica (n=6), o congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  per essere poi sottoposti ad estrazione di proteine nucleari. Gli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* sono stati eseguiti durante il secondo anno di campionamento. Le rane per i trattamenti *in vivo* sono state alloggiate in taniche di plastica (50x25x17 cm) con cibo (vermi) ed acqua *ad libitum*. Come controllo positivo sono state eseguite estrazioni anche da testicoli di ratto, opportunamente mantenuti in stabulario.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Ministero Italiano della Sanità.

### ***Estrazione di proteine nucleari.***

I testicoli sono stati omogeneizzati usando un pestello di tipo B in 7 volumi di un tampone ipotonico (A) [ 10mM Hepes (pH 7.9), 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM KCl, 12% glicerolo, 0.1mM EGTA, 0.5mM ditioneitolato (DTT) e 0.5mM spermidina] in presenza di inibitori di proteasi [4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  di leupeptina, aprotinina, pepstatina A, chimostatina, fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), e 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  di N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil chetone (TPCK) ].

Dopo centrifugazione a 800x g, il surnatante è stato rimosso.

I pellet nucleari sono stati lavati 3 volte nel tampone ipotonico (A) ed infine risospesi in 1.2 volumi (1.2ml/mg di pellet) di un tampone ipertonico[10mM Hepes (pH 7.9), 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 420mM NaCl, 15% glicerolo, 0.1mM EGTA, 0.5mM DTT, e 2mM spermidina] in presenza di inibitori di proteasi. I campioni sono stati agitati a  $4^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti ed infine centrifugati a 10000x g per 30 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . I surnatanti, contenenti le proteine nucleari, sono stati raccolti e collezionati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Le concentrazioni proteiche degli estratti citosolici e nucleari sono state determinate sfruttando il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### ***Analisi di Western Blot.***

Le proteine (30µg/campione) sono state separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti, (SDS), su gel di poliacrilammide al 10%. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato tagliato a livello della proteina marker di 100KDa (marker Precision Prestained, Biorad Hercules, CA), e la parte alta è stata colorata con il Coomassie Brilliant Blue (Sigma Chemical Co, St Louis, USA), mentre la parte inferiore è stata trasferita su filtro di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia Biotech, UK) a 280mA per 2.5h a 4°C. Dopo il trasferimento i filtri sono stati trattati per 2.5h con una soluzione di bloccaggio: TBS [10mM di Tris-HCl (pH 7.6), 150mM di NaCl] contenente 5% (w/v) di latte scremato in polvere e 0.25% Tween 20 per limitare le interazioni aspecifiche, e incubati, a 4°C in agitazione, con l'anticorpo primario (anti Fra1 R-20, sc-605 diluito 1:1000; anti c-Jun N sc-45 diluito 1:500; entrambi forniti da Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) diluito in tampone fosfato PBS [80mM di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM di NaCl], a cui è stato aggiunto un 3% di latte scremato in polvere. Dopo 18h, i filtri sono stati lavati per tre volte in TBS- 0.25% Tween20 ed un'unica volta in solo TBS ed incubati con immunoglobuline coniugate con perossidasi di rafano (Dako Corp., Denmark) diluite 1:1000 in TBS-1%NSS (siero suino normale) per 1h a temperatura ambiente. I filtri sono stati ulteriormente lavati e gli immunocomplessi evidenziati mediante ECL (enhanced chemiluminescence) secondo le istruzioni della casa di produzione (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

La specificità delle reazioni è stata dimostrata preassorbendo l'anticorpo con una quantità in eccesso ( $10^{-6}$  M), rispetto allo stesso, dell'antigene specifico (Fra1 peptide: sc-605P; c-Jun peptide: sc-45P; entrambi forniti da Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) per 18h a 4°C in agitazione.

### ***Analisi di immunoistochimica.***

I testicoli di rana, non appena prelevati dall'animale, sono stati fissati in Bouin, disidratati in etanolo, chiarificati in xilene ed inclusi in paraffina. Le sezioni (5µm), sparaffinate, sono state trattate per 20 minuti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per inibire le perossidasi endogene e successivamente incubate, in camera umida a 4°C per 14h, con l'anticorpo primario (anti Fra1), diluito 1:50 in PBS 0.01M a pH 7.1 contenente 1%NSS (Dako Corp., Denmark) e 2% BSA. Le sezioni,

lavate in PBS-0.1% Triton, sono state trattate con il Vectastatin ABC system Universal Quick kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) secondo i suggerimenti della casa produttrice. Gli immunocomplessi sono stati rivelati usando la 3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloride (Sigma, St Louis, MO, USA) e 3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50mM di Tris-HCl a pH 7.6.

La specificità dell'immunoreazione è stata dimostrata incubando le sezioni con l'anticorpo anti Fra1, preassorbito precedentemente per 18h a 4°C con un eccesso (10<sup>-6</sup> M) di antigene (sc-605P; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany).

### ***Specificità dell'anticorpo anti Fra1.***

L'anticorpo anti Fra1 (R20; sc-605; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) è un anticorpo policlonale specifico per l'antigene Fra1 di ratto, topo e uomo e non riconosce gli altri membri della famiglia Fos (c-Fos, FosB e Fra2).

Poiché il testicolo di ratto esprime Fra1, lo abbiamo usato come controllo positivo. Come controllo di specificità del segnale, l'anticorpo primario è stato preassorbito con una quantità in eccesso (10<sup>-6</sup> M) del peptide specifico (sc-605P, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany)

L'immunoprecipitazione è stata eseguita su 500 µg di estratto proteico nucleare (concentrato 3.7 µg/µl), rappresentativo di un intero ciclo riproduttivo, diluiti nel tampone di lisi [50mM di Tris/HCl pH 7.6, 4mM di EDTA, 1% Triton x100] arricchito dagli inibitori di proteasi. Poi 2µg di anticorpo anti Fra1 sono stati incubati con (campione positivo) e senza (campione negativo) l'estratto nucleare a 4°C in agitazione. Dopo 1h, 20 µl di una sospensione di immunoglobuline appesantite con agarosio (proteine G PLUS-agarose; sc-2002, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) sono state aggiunte, per poi riporre nuovamente il tutto a 4°C in agitazione. Dopo circa 18h, gli immunoprecipitati, sedimentati in seguito a centrifugazione a 1000xg per 5 minuti a 4°C, sono stati lavati per 4 volte con il tampone di lisi. Infine il pellet, risospeso in 40µl di LB (Loading Buffer) 1X, è stato bollito per 5 minuti e caricato su gel di poliacrilammide al 9% in SDS per essere analizzato mediante Western blot con 3 diversi anticorpi: 1) anti Fra1 (R20; sc-605; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany); 2) anti pan-Fos (sc-

253-G; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany); 3) anti c-Jun (N-sc-45-G; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany).

***Trattamenti in vivo ed in vitro con omogenato d'ipofisi.***

Sette animali (controllo) sono stati trattati con 100 µl di Krebs (KRB, soluzione fisiologica per anfibi) a pH 7.4, mentre altri sette sono stati trattati con un terzo di omogenato di ipofisi (PD = pars distalis) in 100 µl di Krebs. Poiché PD induce spermiazione negli anfibi, la qualità del nostro omogenato è stata testata verificando la presenza di SPZ nella cloaca. Le iniezioni sono state eseguite per due settimane a giorni alterni nel sacco dorsale dell'animale. Dopo 2h dal trattamento, le rane sono state anestetizzate con MS222 (Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO) e sacrificate. I testicoli (n=12) sono stati prelevati e fissati per essere analizzati mediante la colorazione con ematossilina-eosina e immunisto chimica o congelati per essere analizzati mediante Western blot.

Negli esperimenti *in vitro*, il controllo (10 testicoli) ed il gruppo trattato con PD (10 testicoli) sono stati incubati in 10 ml di KRB per 1h a 22°C, rispettivamente, senza e con omogenato d'ipofisi (1/6 d'ipofisi per ogni testicolo). Terminato il trattamento, i testicoli sono stati processati per la preparazione di proteine nucleari e analizzate mediante Western Blot.

***Presentazione dei dati e analisi statistica.***

L'analisi densitometrica del segnale di Fra1 e della quantità di proteine caricate è stata eseguita sfruttando il GELDOC1,00-UV system (BIORAD, Hercules, CA). L'espressione di Fra1 è stata corretta in funzione del contenuto di proteine caricate, valutato dopo colorazione con brilliant blue di Coomassie. I valori sono espressi come unità di densità ottica (OD).

Le PMC che esprimevano Fra1 sono state contate nei testicoli di animali trattati *in vivo* con KRB (controllo) o omogenato d'ipofisi (PD). L'analisi è stata eseguita su sezioni di animali diversi, ed in particolare sono state analizzate tre sezioni per testicolo, scelte a caso. I valori sono stati riportati come PMC immunopositive per Fra1/ totale dei tubuli / sezione x 100.

I test "t" di Student ed ANOVA seguito dal test di Duncan per il confronto tra gruppi multipli sono stati eseguiti per valutare la significatività delle differenze apprezzate. I dati,

provenienti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono stati espressi come la media  $\pm$  s.e.m.

### **II.3 Risultati**

#### ***Controllo della specificità dell'anticorpo anti Fra1.***

L'anticorpo policlonale anti Fra1 è stato testato mediante analisi di Western blot su estratti nucleari da testicoli di ratto (controllo positivo) e di *Rana esculenta* (Fig.1). L'anticorpo riconosce un antigene nucleare di 43 KDa in entrambi gli estratti proteici. La specificità del segnale è stata verificata saturando il sito antigenico (epitopo) dell'anticorpo con un eccesso di peptide.

Gli esperimenti di immunoprecipitazione, analizzati mediante Western Blot, mostrano che l' anticorpo anti-Fra1 immunoprecipita una proteina di 43KDa, riconosciuta dall' anticorpo anti-Fra1 (Fig.2A) e anti pan-Fos (Fig.2B). Viceversa l'anticorpo anti pan-Fos immunoprecipita una proteina di 43KDa riconosciuta dall'anticorpo anti Fra1 (Fig.2C). L'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Fra1 dimostra anche la coprecipitazione di una proteina riconosciuta dall'anticorpo anti c-Jun (Fig.2D). La specificità dell'antigene c-Jun è stata testata preassorbendo l'anticorpo con il peptide specifico (Fig.2D).

La coimmunoprecipitazione di c-Jun con una proteina di 43 KDa conferma la presenza di un complesso AP-1, avallando, di conseguenza, l'identità dell'antigene di nostro interesse come Fra1, giacché esso forma dimeri AP-1 con c-Jun. Tuttavia, nonostante i nostri dati suggeriscano fortemente che l'identità della proteina di 43KDa sia Fra1, non possiamo escludere la possibilità di crossreazioni con altri membri della famiglia Fos (ad es: FosB e Fra2).



**Figura1:** Le proteine nucleari di testicolo di ratto e *R.esculenta* sono state analizzate mediante Western Blot con l'anticorpo anti Fra1. L'univocità della reazione antigene-anticorpo è stata dimostrata mediante preassorbimento con peptide specifico. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.





**Figura 2:** Esperimento di immunoprecipitazione eseguito con gli anticorpi anti-Fra1 e pan-Fos, incubati con (+) e senza (-) le proteine nucleari, estratte da testicoli di *R. esculenta*, collezionate durante l'intero ciclo riproduttivo annuale. Gli immunoprecipitati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti Fra1 (**A**, **B**), anti pan-Fos (**C**) e c-Jun (**D**). Le proteine ad alto peso molecolare (in **A**, **B** e **C**) rappresentano l'anticorpo denaturato. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

### ***Espressione di Fra1 durante il ciclo riproduttivo annuale nei testicoli di rana.***

Proteine nucleari estratte da testicoli di *R. esculenta*, mensilmente collezionati, sono state analizzate mediante Western blot con anticorpo specifico per studiare la presenza di Fra1. La figura 3 rivela una banda di 43 KDa, sempre presente da gennaio a dicembre. L'analisi quantitativa dei risultati dimostra che l'espressione di questa proteina è maggiore nel periodo marzo-ottobre, se paragonata agli altri mesi ( $P < 0.05$ ) (Fig.3B). L'immunoistochimica mostra una marcatura limitata ai dotti efferenti, vasi sanguigni (Fig. 4A) e cellule peritubulari mioidi (Fig. 4B), mentre le cellule germinali sono negative. La specificità del segnale è stata dimostrata incubando le sezioni con l'anticorpo precedentemente preassorbito con il peptide specifico (Fig. 4C).

A livello dei dotti efferenti (Fig. 5A), l'immunopositività interessa le cellule muscolari lisce (DMSC) e le cellule epiteliali (DEC), il cui citoplasma è punteggiato da segnali localizzati intorno al nucleo, che invece solo raramente presenta un'immunomarcatura per Fra1. Nei vasi sanguigni (Fig. 5B), l'antigene di nostro interesse si localizza nelle cellule endoteliali (VEC) e muscolari lisce (VMSC); nelle prime il segnale si localizza soprattutto nel citoplasma e raramente nel nucleo. Infine una nitida immunomarcatura è stata evidenziata nelle cellule peritubulari mioidi (Fig. 6), limitata ai mesi di marzo- aprile (Fig. 6A), dato che nel mese di dicembre (Fig. 6B) non si osservano cellule chiaramente immunopositive.

I testicoli di ratto sono stati utilizzati come controllo positivo dell'immunoreazione. L'immunoistochimica localizza l'antigene Fra1 nelle cellule peritubulari mioidi e nei vasi sanguigni (Fig.7A). Nelle cellule endoteliali, il segnale è presente soprattutto nel citoplasma e raramente nel nucleo; mentre le VMSC sono immunopositive a livello citoplasmatico e nucleare ed i due compartimenti sono caratterizzati da una marcatura con caratteristiche identiche a quella dei campioni di rana (Fig. 7A1).

La specificità del segnale è stata testata mediante l'uso dell'anticorpo preassorbito (Fig.7B).



**Figura 3:** Analisi di Western blot su proteine nucleari estratte da testicoli di *R. esculenta* collezionati durante il ciclo riproduttivo annuale. **(A)** Profilo della proteina Fra1 di 43 KDa negli estratti nucleari; **(B)** Analisi quantitativa densitometrica del segnale nucleare di Fra1. L'intensità dei segnali nucleari è stata corretta sulla base del contenuto di proteine caricato, valutato in seguito a colorazione con Coomassie brilliant blue.

I valori sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media  $\pm$ s.e.m. a vs b  $p<0.05$ ; a vs c  $p<0.01$ ; a vs c  $p<0.01$ .







**Figura 4:** (A) Immunolocalizzazione della proteina Fra1 nei dotti efferenti (ED), vasi sanguigni (BV) e cellule peritubulari mioidi (PMC) dei testicoli di *R. esculenta*. (B) Controllo negativo dell'immunoreazione ottenuto usando l'anticorpo anti Fra1 preassorbito. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 5:** L'analisi di immunistoichimica, eseguita su sezioni testicolari di *R. esculenta*, mostra la presenza della proteina Fra1: **(A)** nelle cellule epiteliali (DEC) e muscolari lisce (DMSC) dei dotti efferenti; **(B)** nelle cellule endoteliali (VEC) e muscolari lisce (VMSC) dei vasi sanguigni.



**Figura 6:** Immunolocalizzazione della proteina Fra1 in testicoli di *R.esculenta*, prelevati da animali di dicembre (A) e del periodo marzo-aprile (B). PMC, cellule peritubulari mioidi. ED, dotti efferenti.







**Figura 7:** Analisi di immunistochemica, eseguita su sezioni testicolari di ratto, mostrandone il segnale di Fra1 al livello delle cellule peritubulari mioidi e delle cellule endoteliali **(A)**. L'uso dell'anticorpo preassorbito dimostra la specificità del segnale **(B)**.

### ***Trattamenti con omogenato d'ipofisi.***

Per confermare i cambiamenti morfologici testicolari indotti dalle iniezioni di omogenato di ipofisi (Minucci *et al.*, 1989), i testicoli di rane trattate con e senza PD sono stati, innanzitutto, sottoposti ad analisi istologica.

Le sezioni testicolari di animali non trattati mostrano tubuli con molti spermatidi maturi, mentre i dotti efferenti privi di SPZ presentano un lume quasi assente (Fig.8A).

Il trattamento con PD arricchisce il lume dei tubuli di SPZ (Fig.8B) ed allarga il lume dei dotti efferenti (Fig.8C). Poi gli SPZ, in seguito allo svuotamento dei tubuli seminiferi (Fig.D-E), si riversano nel dotto esterno (Fig.8F) e da qui successivamente nella cloaca.

**Esperimento *in vivo*:** Testicoli di rane di controllo e trattate con PD esprimono la proteina di 43KDa (Fig.9A). L'analisi densitometrica dei segnali, corretta in base al contenuto di proteine caricate, ha mostrato un incremento significativo del segnale nucleare di 43 KDa nel gruppo di animali trattati con PD ( $P<0.05$ ) rispetto al controllo (Fig. 9B).

L'immunoistochimica su sezioni di controllo mostra che l'antigene Fra1 è localizzato nelle cellule epiteliali dei dotti efferenti, e, random, nelle cellule peritubulari mioidi (Fig.10A). Negli animali trattati con PD, si osserva un maggior numero di PMC immunopositive per Fra1 (Fig.10B). Tale incremento è statisticamente significativo rispetto ai controlli ( $P<0.01$ ) (Fig.11).

**Esperimento *in vitro*:** i testicoli sono stati incubati per 1h a 22°C in KRB (controllo) o in KRB in presenza di PD, ed in seguito sottoposti ad estrazione di proteine nucleari.

L'antigene nucleare è stato rilevato mediante Western blot in entrambi i gruppi sperimentali (Fig.12A). L'analisi densitometrica mostra un incremento del segnale di 43 KDa nei campioni nucleari ( $P<0.05$ ) in seguito al trattamento con PD (Fig. 12B).







**Figura 8:** Colorazione con ematossilina-eosina di sezioni testicolari da maschi di *R. esculenta* trattati con KRB  $\pm$  PD. In animali di controllo, i tubuli sono pieni di spermatidi maturi (mSPT) e i dotti efferenti presentano un lume ristretto o assente (**A**). In animali trattati con PD, i tubuli sono pieni di SPZ liberi (**B**), il lume dei dotti efferenti si allarga (**C**), gli SPZ appaiono nei dotti efferenti (**D**), i tubuli, di conseguenza, si svuotano di SPZ (**E**), che poi confluiscono nel dotto esterno (**F**).



**Figura 9:** Analisi di Western blot eseguita su proteine nucleari estratte da testicoli di animali (*R. esculenta*) trattati *in vivo* con PD. Presenza del segnale di 43 KDa nei campioni nucleari (A). Analisi densitometrica del segnale nucleare di Fra1 corretta sulla base del contenuto proteico caricato, valutato dopo colorazione del gel con Coomassie brilliant blue (B).

I valori sono riportati in unità di densità ottica (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti separati. I dati sono espressi come la media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.01$





**Figura 10:** Immunolocalizzazione della proteina Fra1 nei testicoli di *R. esculenta*, trattate con KRB  $\pm$  PD. Nel gruppo di controllo, Fra1 si localizza nelle cellule epiteliali dei dotti efferenti e raramente nelle cellule peritubulari mioidi (**A**). Negli animali trattati con PD, la presenza di Fra1 è evidente nelle cellule epiteliali dei dotti efferenti e nelle cellule peritubulari mioidi (**B**). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. ED, dotti efferenti; PMC, cellule peritubulari mioidi.



**Figura 11:** Numero di cellule peritubulari mioidi che esprimono Fra1 nei testicoli di animali, *R. esculenta*, di controllo o trattati con PD. I valori in grafico rappresentano il numero di cellule peritubulari mioidi immunopositive per Fra1/totale dei tubuli/sezione moltiplicato per 100.

I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

I dati sono espressi come la media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.01$ .



**Figura 12:** Analisi di Western blot eseguita su proteine nucleari estratte da testicoli di *R. esculenta*, trattati *in vitro* con KRB  $\pm$  PD. L'antigene Fra1 è espresso negli estratti nucleari di entrambi i gruppi (A). L'analisi densitometrica del segnale di Fra1 è stato corretto in base al contenuto di proteine caricate (B).

I valori sono riportati in unità di densità ottica (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono espressi come la media  $\pm$ s.e.m. a vs b  $p < 0.01$ .

## II.4 *Discussione*

In uno studio precedente (Cobellis *et al.*, 2002), utilizzando un anticorpo policlonale anti c-Fos (sc-253-G, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany) che riconosce tutti i membri della famiglia Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra-2), è stata individuata una proteina di 43KDa nei testicoli di *Rana esculenta*. Noi, usando un anticorpo anti Fra1 (R-20, sc-605, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany), abbiamo indagato sull'identità del segnale di 43KDa. Inizialmente abbiamo testato la specificità dell'anticorpo anti- Fra1 in rana. Il testicolo di ratto, in quanto esprime Fra1 (Fleischmann *et al.*, 2000), è stato utilizzato come controllo positivo.

Poichè Fra1 è un membro del complesso trascrizionale AP-1, abbiamo studiato l'espressione di Fra1 negli estratti nucleari.

L'analisi per Western blot rivela un segnale di 43 KDa negli estratti nucleari di testicoli di ratto e di rana, *Rana esculenta*. La specificità dell'immunocomplesso è stata dimostrata mediante preassorbimento dell'anticorpo con un eccesso dell'antigene specifico ( $10^{-6}$  M).

L'identità dell'antigene di 43KDa è stata studiata anche mediante esperimenti di immunoprecipitazione con vari anticorpi. Inoltre Fra1 è un membro del complesso di regolazione della trascrizione AP-1, ed un test di attività rappresenta un'ulteriore conferma della sua identità, quindi la coimmunoprecipitazione della proteina di 43 KDa con c-Jun (Cohen *et al.*, 1989) suggerisce che essa corrisponde a Fra1, un componente del complesso AP-1. Per comprendere la funzione di Fra1 nei testicoli di *R. esculenta*, ne abbiamo studiato l'espressione e la localizzazione durante il ciclo riproduttivo annuale. Mediante Western blot abbiamo mostrato la presenza di una proteina nucleare di 43 KDa da gennaio fino a dicembre e l'analisi quantitativa densitometrica ne ha evidenziato una maggiore espressione nel periodo marzo-ottobre. L'immunoistochimica localizza Fra1 nei dotti efferenti e nei vasi sanguigni durante tutto l'anno, mentre l'immunomarcatura nelle PMC è ristretta al periodo marzo-aprile. Di conseguenza, la maggiore espressione della proteina Fra1, in questo periodo, è dovuta soprattutto alle PMC. Nei dotti efferenti è il citoplasma a presentarsi immunopositivo, mentre nei vasi sanguigni, sia di rana sia di ratto, il segnale è organizzato in piccoli spot citoplasmatici nell'area perinucleare. La presenza di Fra1 nel

citoplasma è già stata riportata nei fibroblasti (Cohen *et al.*, 1989), gonadi (Rusovici *et al.*, 2003) e vasi sanguigni (Cohen *et al.*, 1993) di mammifero.

Fra1 è stato individuato anche nelle cellule epiteliali, endoteliali, peritubulari e muscolari lisce, ma la morfologia allungata di questi tipi cellulari ostacola una nitida distinzione tra compartimento nucleare e citosolico.

Nelle cellule epiteliali dei dotti efferenti, Fra1 si presenta con segnali punteggiati nel citoplasma, e più precisamente in posizione perinucleare, suggerendo la possibilità che la proteina sia localizzata a livello perinucleare per la traslocazione. Però la scarsa immunoreattività nucleare nelle cellule epiteliali propone che Fra1, una volta nel nucleo, sia esportato e rapidamente degradato.

Per quanto riguarda le PMC in *R. esculenta*, Fra1 è espresso in queste cellule soltanto in alcuni mesi (marzo-aprile) del ciclo riproduttivo annuale. Nei mammiferi, è noto che, subito dopo la spermiiazione, le PMC si contraggono in modo ritmico, infatti la loro principale azione biologica consiste nel generare impulsi responsabili del trasporto degli SPZ dai tubuli seminiferi verso la *rete testis* ed i dotti efferenti (Hargrove *et al.*, 1977). Poiché subito dopo la spermiiazione, gli SPZ non sono dotati di motilità (Eddy *et al.*, 1996), si pensa che questo trasporto sia favorito dalla contrazione dei tubuli, indotta dalle PMC (Ellis *et al.*, 1981). Sulla base di queste conoscenze, dato che l'immunopositività per Fra1 nelle PMC è limitata al periodo marzo-aprile, quando notoriamente questi animali si accoppiano, abbiamo ipotizzato una relazione tra l'espressione di Fra1 ed il trasporto degli SPZ attraverso i tubuli. Di conseguenza abbiamo indotto spermiiazione e abbiamo seguito il trasporto degli SPZ e l'espressione di Fra1. Nel nostro modello sperimentale, la spermiiazione è indotta dall'iniezione di gonadotropine. Abbiamo, quindi, eseguito trattamenti *in vivo* con omogenato d'ipofisi, e, tramite indagine istologica, abbiamo verificato il trasporto degli SPZ dai tubuli ai dotti efferenti. Simultaneamente, abbiamo dimostrato che il trattamento incrementa l'espressione di Fra1 ed, in particolare, aumenta il numero di PMC immunopositive per Fra1, avallando, per la prima volta in un vertebrato, la stretta relazione tra l'espressione di Fra1 e l'attività delle cellule peritubulari mioidi. Tale relazione potrebbe essere la conseguenza di interazioni autocrine/paracrine, che avvengono nel testicolo. Pmods, ad esempio, un fattore prodotto dalle cellule peritubulari, è in grado di modulare la funzionalità delle cellule del Sertoli.

La presenza di Fra1 nei vasi sanguigni è in accordo con precedenti risultati ottenuti nel maiale (Rusovici *et al.*, 2003) e nel ratto (Farzaneh-Far *et al.*, 2001). L'analisi comparativa tra rana e ratto mostra una localizzazione intracellulare di Fra1 simile nelle cellule endoteliali e muscolari lisce dei vasi, suggerendo che la funzione di Fra1, probabilmente legata alla regolazione del flusso sanguigno e del tono vasale, sia conservata nella scala evolutiva.

Nelle cellule muscolari lisce dei dotti efferenti Fra1 potrebbe essere richiesta per mantenere il tono del dotto attraverso l'attivazione di parziali contrazioni.

Per concludere, la scelta del nostro modello sperimentale (*Rana esculenta*) si è dimostrata appropriata al fine di studiare l'attività di Fra1 a livello testicolare.

Oltre alla dimostrazione di Fra1 nelle gonadi di un vertebrato non mammifero, per la prima volta in un vertebrato, abbiamo relazionato l'attività di Fra1 alle PMC, nonché confermato gli effetti di PD sulla spermiazione e dimostrato che il trattamento con PD incrementa il numero di PMC che esprimono Fra1.

Di conseguenza, i nostri dati indicano che Fra1 è coinvolto nel trasporto degli SPZ, dai tubuli ai dotti efferenti, che avviene in seguito alla contrazione delle PMC.

**Regolazione da parte degli estrogeni del tratto riproduttivo maschile nell'anfibio, *Rana esculenta*: ruolo nell'attivazione di Fra1 nelle cellule peritubulari mioidi e nel rilascio degli spermatozoi.**

Gli estrogeni ambientali ed endogeni influenzano la riproduzione maschile nei Vertebrati con effetti positivi e negativi. Poiché gli anfibi sono un buon modello per lo studio della spermatogenesi, abbiamo utilizzato la *Rana esculenta* per studiare il coinvolgimento degli estrogeni nel rilascio degli spermatozoi. I nostri risultati mostrano che gli ormoni ipofisari incrementano il numero di cellule peritubulari mioidi (PMC) che esprimono Fra1 ed inducono, nel testicolo, cambiamenti morfologici, che favoriscono il rilascio degli spermatozoi (SPZ). Tali effetti sono contrastati dall'antagonista del recettore degli estrogeni, ICI182780. Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* dimostrano che il 17 $\beta$ -Estradiolo agisce direttamente sul testicolo per attivare Fra1 nelle PMC. Inoltre, la ridotta attività degli estrogeni riduce in modo significativo il distacco degli spermatozoi dalle cellule del Sertoli (spermiazione). In conclusione, gli estrogeni svolgono un ruolo importante nel rilascio degli spermatozoi.

*Cobellis et al.*, General and Comparative Endocrinology, (2007). DOI: 10.1096.

### III.1 Introduzione

La spermatogenesi è un processo in cui cellule germinali immature (spermatogoni, SPG) si differenziano in spermatidi (SPT). Questo processo avviene nei tubuli seminiferi del testicolo a livello delle cellule somatiche del Sertoli e dipende da fattori paracrini e autocrini. Con la spermiostogenesi, gli SPT subiscono la loro maturazione finale per diventare spermatozoi (SPZ), che sono rilasciati dalle cellule del Sertoli nel lume dei tubuli, attraverso un processo chiamato spermiiazione (Hess *et al.*, 1997). Le cellule peritubulari mioidi (PMC), che circondano i tubuli seminiferi, spingono gli SPZ verso i dotti mediante un'attività contrattile ritmica (trasporto degli SPZ) (Hargrove *et al.*, 1977; Ellis *et al.*, 1981; Maekawa *et al.*, 1996). Spermiiazione e trasporto sono definiti con il termine collettivo di rilascio degli spermatozoi, sulla cui regolazione si sa molto poco.

E' noto che gli androgeni sono importanti per la riproduzione maschile, mentre il ruolo degli estrogeni non è stato ancora ben chiarito (Hess *et al.*, 1997). Studi recenti hanno dimostrato, inequivocabilmente, che nei vertebrati, gli estrogeni ed i recettori degli estrogeni, sintetizzati nel testicolo, regolano la fisiologia dell'apparato riproduttivo maschile e la fertilità, (Hess *et al.*, 1997) (O'Donnell *et al.*, 2001)). Inoltre, i topi maschi Knock out per il recettore  $\alpha$  degli estrogeni ( $\alpha$ ERKO) sono sterili (Eddy *et al.*, 1996), (Robertson *et al.*, 2001), con un ridotto numero di spermatozoi nel fluido seminale ed alterata funzionalità spermatica (Eddy *et al.*, 1996).

Negli anfibi, gli estrogeni regolano l'attività testicolare (Cobellis *et al.*, 2003): inducono la proliferazione spermatogoniale attraverso c-Fos (Cobellis *et al.*, 1999; Cobellis *et al.*, 2002; Cobellis *et al.*, 2003) ed inducono l'espressione di Fra1 (Cobellis *et al.*, 2002). Fra1 e c-Fos appartengono alla famiglia di proteine Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 e Fra2), che eterodimerizzano con i membri della famiglia Jun (c-Jun, Jun B e Jun D) in modo da formare il complesso trascrizionale AP-1 (Karin *et al.*, 1997). Recentemente, abbiamo riportato un'elevata espressione di Fra1 nelle cellule peritubulari mioidi (PMC) di *Rana esculenta* nel periodo marzo-aprile, quando si ha l'accoppiamento (Cobellis *et al.*, 2005).

Le PMC sono cellule contrattili e secernono componenti della matrice extracellulare e fattori di crescita, alcuni dei quali regolano le cellule del Sertoli in modo paracrino (Maekawa *et al.*, 1996). Nonostante la morfologia e la biochimica delle PMC siano state

ben caratterizzate (Tung *et al.*, 1990; Galdieri *et al.*, 1998), non è ben noto il ruolo svolto dalle PMC nel trasporto degli spermatozoi (Tripiciano *et al.*, 1996; Tripiciano *et al.*, 1999). Utilizzando l'anfibio, *R. esculenta*, abbiamo precedentemente mostrato che gli ormoni ipofisari regolano il rilascio degli spermatozoi (Minucci *et al.*, 1989; Cobellis *et al.*, 2005) ed incrementano il numero di PMC immunopositive per Fra1 (Cobellis *et al.*, 2005). Scopo di questo studio è capire come le gonadotropine attivino l'espressione di Fra1 nelle PMC, supponendo che gli estrogeni medino la comunicazione tra ipofisi e compartimento peritubulare. Molte evidenze sostengono la nostra ipotesi: 1) nei mammiferi, l'FSH regola la produzione di estrogeni (Cobellis *et al.*, 2003); 2) in *R. esculenta* FSH ed estrogeni incrementano nel periodo marzo-aprile, quando si osserva il rilascio degli spermatozoi nell'ambiente acquatico e l'espressione di Fra1 nelle PMC (Polzonetti-Magni *et al.*, 1998; Cobellis *et al.*, 2005); 3) la stimolazione con gonadotropine induce il rilascio degli SPZ (Pierantoni *et al.*, 2002) ed incrementa il numero di PMC immunopositive per Fra1 (Cobellis *et al.*, 2005).

I nostri risultati suggeriscono che: 1) l'ipofisi induce l'espressione di Fra1 nel testicolo; 2) gli estrogeni regolano l'espressione di Fra1 nelle PMC, indotta dalle gonadotropine e 3) gli estrogeni sono coinvolti nel rilascio degli SPZ.

In conclusione, noi evidenziamo un nuovo ruolo fisiologico degli estrogeni nella fertilità maschile (O'Donnell *et al.*, 2001).

### **III.2 Materiali e metodi**

#### ***Animali***

Maschi di *Rana esculenta* sono stati catturati nel periodo marzo-aprile in uno stagno vicino Napoli, anestetizzati con MS222 (Sigma –Aldrich Corp., St Louis, MO) e sacrificati. I testicoli sono stati espianati e immediatamente processati per immunostochimica, o congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  per essere poi sottoposti ad estrazione di proteine nucleari. Le rane per i trattamenti *in vivo* sono state alloggiare in taniche di plastica (50x25x17 cm) con cibo (vermi) ed acqua *ad libitum*. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Ministero Italiano della Sanità.

#### ***Trattamenti con 17 $\beta$ -Estradiolo (E<sub>2</sub>).***

Tutte le dosi utilizzate per i trattamenti *in vivo* ed *in vitro* sono state scelte in base ad esperimenti precedenti di dose risposta (Pierantoni *et al.*, 1996).

*Esperimenti in vivo: iniezioni multiple.* Trenta animali sono stati divisi in tre gruppi sperimentali da 10 animali ciascuno: 1) rane di controllo trattate con 100 $\mu\text{l}$  di soluzione fisiologica per anfibi (KRB pH 7.6); 2) rane trattate con 100 $\mu\text{l}$  di KRB contenente  $10^{-5}\text{M}$  E<sub>2</sub>; 3) rane trattate con 100 $\mu\text{l}$  di KRB contenente  $10^{-5}\text{M}$  E<sub>2</sub> in combinazione con l'antagonista degli estrogeni ICI182-780, iniettato un'ora prima dell' E<sub>2</sub> alla concentrazione di  $10^{-4}\text{M}$ . Le iniezioni sono state eseguite per due settimane a giorni alterni nel sacco dorsale dell'animale. Dopo 2h dall'ultima iniezione, le rane, anestetizzate con MS222 (Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO), sono state sacrificate ed i testicoli prelevati. L'ICI182-780 è stato scelto, perché antagonizza entrambi i recettori  $\alpha$  e  $\beta$  degli estrogeni e manca di effetti agonistici (Stygar *et al.* 2003). Le iniezioni multiple con  $10^{-5}\text{M}$  E<sub>2</sub> sono state eseguite in modo da ottenere un trattamento cronico.

In tre sezioni random per testicolo sono state contate le PMC che esprimono Fra1. I valori sono stati riportati come PMC immunopositive per Fra1/ totale dei tubuli / sezione x 100.

*Esperimenti in vivo: singola iniezione.* Trenta animali sono stati divisi in tre gruppi sperimentali da 10 animali ciascuno: 1) rane di controllo trattate con 100 $\mu\text{l}$  di soluzione fisiologica per anfibi (KRB pH 7.6); 2) rane trattate con 100 $\mu\text{l}$  di KRB contenente  $10^{-4}\text{M}$  E<sub>2</sub>; 3) rane trattate con 100 $\mu\text{l}$  di KRB contenente  $10^{-5}\text{M}$  E<sub>2</sub>. L'iniezione con  $10^{-4}\text{M}$  E<sub>2</sub> sono state eseguite in modo da ottenere un trattamento acuto.

*Trattamenti in vitro.* I testicoli di 15 animali sono stati rimossi, lavati e, poi, incubati in 10 ml di KRB per 1h a 22°C (n=10, gruppo di controllo) oppure con 10<sup>-6</sup>M E<sub>2</sub> da solo (n=10) o in combinazione con 10<sup>-5</sup>M ICI. I trattamenti *in vitro* stati eseguiti a dosi più basse rispetto a quelli *in vivo*, vista la diretta esposizione del tessuto all'ormone. Terminati i trattamenti, i testicoli sono stati processati per la preparazione di proteine nucleari e analizzate mediante Western Blot.

### ***Trattamenti in vivo con omogenato d'ipofisi.***

Quaranta ipofisi (*pars distalis*, PD) sono state collezionate da maschi di *R. esculenta* e poi delicatamente omogeneizzate in KRB a pH 7.6. La qualità del nostro omogenato è stata testata verificando la presenza di SPZ nella cloaca. Un terzo di ipofisi in 100µl è stato iniettato nel sacco dorsale degli animali, a giorni alterni, per due settimane, per indurre spermiiazione.

Quindici animali catturati nel mese di marzo sono stati divisi in tre gruppi sperimentali e trattati a giorni alterni, per due settimane, come segue:

- 100µl di KRB (gruppo di controllo);
- un terzo di PD in 100µl di KRB (gruppo trattato con PD);
- un terzo di PD in 100µl di KRB in combinazione con 100µl di ICI 182-780 10<sup>-5</sup> M (gruppo trattato con PD + ICI).

L'ICI 182-780 è stato iniettato quarantacinque minuti prima di PD.

Gli animali sono stati anestetizzati e sacrificati due ore dopo l'ultima iniezione. I testicoli sono stati prelevati e immediatamente processati per immunistoichimica (in numero di tre per ogni gruppo) e per l'estrazione di proteine nucleari (in numero di sette per ogni gruppo).

In un secondo trattamento nove animali, catturati nel mese di marzo, sono stati divisi in tre gruppi sperimentali e trattati, con una singola iniezione, secondo lo schema precedente.

Le dosi per le iniezioni singole e multiple sono state scelte in base alle curve di dose-risposta, eseguite in esperimenti precedenti (Fasano 1991).

### ***Valutazione del rilascio degli spermatozoi.***

Gli SPZ di rana, prelevati dalla cloaca, sono stati filtrati e contati, utilizzando un microscopio ottico ed un emocitometro. Il numero di SPZ è stato utilizzato per valutare l'efficienza del rilascio degli stessi dalla cloaca. I testicoli (n=10/gruppo) sono stati rimossi, fissati e trattati istologicamente in modo da permettere la colorazione con ematossilina-eosina. Nove sezioni random per testicolo degli animali trattati *in vivo*, sono state analizzate per valutare i cambiamenti morfologici legati al rilascio degli SPZ, ed il numero di tubuli con e senza SPZ. In dettaglio, in ciascuna sezione sono state valutate: 1) la percentuale di tubuli senza SPZ (tubuli vuoti), come indice del trasporto degli SPZ (numero dei tubuli vuoti / totale / sezione x100); 2) la percentuale di tubuli con SPZ luminali staccati dalle cellule del Sertoli (tubuli spermatici) come indice della spermiazione (numero dei tubuli spermatici / totale / sezione x100); 3) percentuale dei tubuli con SPZ attaccati alle cellule del Sertoli (tubuli pieni) come indice dell'assenza di spermiazione (numero dei tubuli pieni / totale / sezione x100).

Questa analisi è stata eseguita per separare la spermiazione dal trasporto degli spermatozoi, in modo da valutarne singolarmente i contributi relativi al rilascio degli SPZ.

#### ***Estrazione di proteine nucleari.***

I testicoli (n=6) sono stati omogeneizzati usando un pestello di tipo B in 7 volumi di un tampone ipotonico (A) [ 10mM Hepes (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 12% glicerolo, 0.1mM EGTA, 0.5mM ditiotreitolo (DTT) e 0.5mM spermidina] in presenza di inibitori di proteasi [4µg/ml di leupeptina, aprotinina, pepstatina A, chimostatina, fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), e 5µg/ml di N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometil chetone (TPCK) ].

Dopo centrifugazione a 800x g, il surnatante è stato rimosso.

I pellet nucleari sono stati lavati 3 volte nel tampone ipotonico (A) ed infine risospesi in 1.2 volumi (1.2ml/mg di pellet) di un tampone ipertonico[10mM di Hepes (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 420mM NaCl, 15% glicerolo, 0.1mM EGTA, 0.5mM DTT, e 2mM spermidina] in presenza di inibitori di proteasi. I campioni sono stati agitati a 4°C per 30 minuti ed infine centrifugati a 10000x g per 30 minuti a 4°C. I surnatanti, contenenti le proteine nucleari, sono stati raccolti e collezionati a -80°C.

Le concentrazioni proteiche degli estratti nucleari sono state determinate sfruttando il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry *et al.* 1951)

#### ***Analisi di Western Blot.***

Le proteine (30µg/campione) sono state separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti, (SDS), su gel di poliacrilammide al 10% e successivamente trasferite su filtro di PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, UK) a 280mA per 2.5h a 4°C. Dopo il trasferimento, i filtri sono stati trattati per 2.5h con una soluzione di bloccaggio: TBS [10mM di Tris-HCl (pH 7.6), 150mM di NaCl] contenente 5% (w/v) di latte scremato in polvere e 0.25% Tween 20 per limitare le interazioni aspecifiche ed incubati, a 4°C in agitazione, con l'anticorpo primario (anti Fra1 R-20, sc-605, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) diluito 1:1000 in PBS (80mM di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM di NaCl), a cui è stato aggiunto un 3% di latte scremato in polvere. Dopo 18h, i filtri sono stati lavati per tre volte con TBS- 0.25% Tween20 ed un'unica volta in solo TBS, ed incubati con immunoglobuline coniugate con perossidasi di rafano (Dako Corp., Denmark) diluite 1:1000 in TBS-1%NSS (siero suino normale) per 1h a temperatura ambiente. I filtri sono stati ulteriormente lavati e gli immunocomplessi evidenziati mediante ECL (enhanced chemiluminescence) secondo le istruzioni della casa produttrice (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

La specificità delle immunoreazioni è stata dimostrata preassorbendo l'anticorpo con una quantità in eccesso (10<sup>-6</sup> M) dell'antigene specifico (Fra1 peptide: sc-605P, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) per 18h a 4°C in agitazione.

Le membrane, trattate a 60°C per 30 minuti con una soluzione strippante (100mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS and 62.5mM Tris/HCl, pH 7.6) sono state reincubate con un anticorpo primario anti MAPK1 (sc-154, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) diluito 1:500 nella soluzione di bloccaggio, in modo da quantizzare il contenuto proteico caricato

#### ***Analisi di immunoistochimica.***

I testicoli di rana, non appena prelevati dall'animale, sono stati fissati in Bouin, disidratati in etanolo, chiarificati in xilene ed inclusi in paraffina. Le sezioni (5µm), sparaffinate, sono

state trattate per 20 minuti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per inibire le perossidasi endogene e successivamente incubate, in camera umida a 4°C per 14h, con l'anticorpo primario (anti Fra1), diluito 1:50 in PBS 0.01M a pH 7.1 contenente 1%NSS (Dako Corp., Denmark) e 2% BSA. Le sezioni, lavate in PBS-0.1% Triton, sono state trattate con il Vectastatin ABC system Universal Quick kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) secondo i suggerimenti della casa produttrice. Gli immunocomplessi sono stati rivelati usando la 3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloride (Sigma, St Louis, MO, USA) e 3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50mM di Tris-HCl a pH 7.6.

La specificità dell'immunoreazione è stata dimostrata incubando le sezioni con l'anticorpo anti-Fra1, preassorbito precedentemente per 18h a 4°C con un eccesso (10<sup>-6</sup> M) di antigene (sc-605P; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany).

#### ***Specificità dell'anticorpo anti Fra1.***

L'anticorpo anti Fra1 (R20; sc-605; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) è un policlonale specifico per Fra1 di ratto, topo e uomo, e non riconosce gli altri membri della famiglia Fos (c-Fos, FosB e Fra2). Anche l'anticorpo anti MAPK1 è un policlonale (sc-154, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany).

Inoltre la specificità dell'anticorpo anti-Fra1 è stata precedentemente testata mediante esperimenti di immunoprecipitazione e coimmunoprecipitazione con altri membri della famiglia Fos (Cobellis *et al.*, 2005).

#### ***Presentazione dei dati e statistiche.***

L'analisi densitometrica del segnale di Fra1 e della quantità di proteine caricate è stata eseguita sfruttando il GELDOC1,00-UV system (BIORAD, Hercules, CA). L'espressione di Fra1 è stata corretta in funzione del contenuto di proteine caricate, valutato in base all'espressione di MAPK1. I valori sono espressi come unità di densità ottica (OD). La forma non fosforilata di MAPK1 è stata scelta come controllo nella normalizzazione proteica, in quanto la sua espressione non è influenzata dagli estrogeni (Bonapace 1996).

I test "t" di Student ed ANOVA seguito dal test di Duncan per il confronto tra gruppi multipli sono stati eseguiti per valutare la significatività delle differenze apprezzate. I dati,

provenienti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono stati espressi come la media  $\pm$  s.e.m.

## RISULTATI

### *Trattamento in vivo con 17 $\beta$ -estradiolo*

I testicoli degli animali trattati *in vivo* con E<sub>2</sub> ed E<sub>2</sub> + ICI 182-780 sono stati analizzati mediante Western blot con un anticorpo specifico per Fra1. I risultati mostrano una banda di 43 KDa nucleare (Fig. 1A). La specificità dell'immunoreazione è stata confermata mediante preassorbimento dell'anticorpo con un eccesso di peptide specifico (Fig. 1B). L'analisi densitometrica dei segnali, corretta in base al contenuto proteico caricato, valutato con un anticorpo anti MAPK1, (Fig. 1C), mostra un significativo aumento di Fra1 nei testicoli di animali trattati con estradiolo rispetto al gruppo di controllo (p<0.05). L'antagonista ICI 182-780 contrasta tale effetto (p<0.01).

L'analisi di immunistochemica conferma la presenza dell'antigene Fra-1 nel testicolo a livello dei dotti efferenti (Fig. 2A), dei vasi sanguigni e delle PMC (Cobellis *et al.*, 2005). La specificità dell'immunocomplesso è confermata dal preassorbimento dell'anticorpo con l'antigene corrispondente (Fig. 2B). Il trattamento con E<sub>2</sub> induce un incremento del numero di PMC immunopositive per Fra1 (P<0.01) (Fig. 2C). L'ICI 182-780 contrasta questo effetto (P<0.01).



**Figura 1:** Espressione di Fra1 e MAPK1 (**A**) negli estratti proteici da animali trattati *in vivo* con iniezioni multiple di E<sub>2</sub>± ICI. La specificità della reazione è stata testata preassorbendo l'anticorpo con il peptide specifico (**B**). I valori sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media ±s.e.m. a vs b p<0.05; b vs c p<0.01.



**Figura 2:** Numero di PMC che esprimono Fra1 nei testicoli di animali trattati *in vivo* con iniezioni multiple di E<sub>2</sub>±ICI. I valori in grafico rappresentano il numero di PMC immunopositive per Fra1/totale dei tubuli/sezione moltiplicato per 100. I riquadri mostrano (A) le PMC immunopositive per Fra1 e (B) il controllo negativo della reazione.

I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

I dati sono espressi come la media ± s.e.m. a vs b p<0.01; b vs c p<0.05; a vs c p<0.05.

### ***Trattamento in vitro con 17 $\beta$ -estradiolo***

Frammenti di testicolo sono stati incubati per un'ora con E<sub>2</sub>  $\pm$  ICI 182-780 e gli effetti del trattamento sono mostrati in figura 3. L'analisi di Western blot mostra che tutti i gruppi sperimentali esprimono Fra1 (Fig. 3A). Inoltre, l'analisi densitometrica dei segnali dimostra che il trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo incrementa significativamente il segnale di Fra1 rispetto al controllo (p<0.01). L'ICI 182-780 contrasta l'effetto dell'estradiolo (P<0.01).



**Figura 3:** Espressione di Fra1(A) e MAPK1 (B) negli estratti proteici da animali trattati *in vivo* con E<sub>2</sub>± ICI. I valori Fra1/MAPK1 (C) sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media ±s.e.m. a vs b p<0.01; b vs c p<0.01. ED: dotted efferenti.

### ***Trattamenti in vivo con omogenato di ipofisi.***

Gli animali sono stati trattati per due settimane, a giorni alterni, con PD da solo o in combinazione con l'antagonista degli estrogeni: ICI 182-780.

L'analisi di Western blot rivela la presenza di Fra-1 in tutti i gruppi sperimentali (Fig. 4A).

L'analisi densitometrica dei segnali dimostra che l'espressione di Fra-1 è maggiore nei testicoli di animali trattati con PD rispetto agli altri gruppi sperimentali ( $P < 0.01$ ), indicando che PD incrementa l'espressione di Fra-1 .

L'antagonista ICI 182-780 contrasta l'effetto indotto da PD ( $P < 0.01$ ).



**Figura 4:** Espressione di Fra1(A) e MAPK1 (B) negli estratti proteici da animali trattati *in vivo* con PD± ICI. I valori Fra1/MAPK1 (C) sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media ±s.e.m. a vs b p<0.01.

### ***Analisi del trattamento PD/E<sub>2</sub> sul rilascio degli spermatozoi e sull'espressione di Fra1 .***

Gli animali trattati con una singola iniezione di E<sub>2</sub> o PD ± ICI sono stati analizzati per valutare l'efficienza del rilascio degli SPZ, mediante la conta degli SPZ e analisi istologica. Il numero di SPZ (Fig. 5A) è basso nel gruppo di controllo e nel trattato con E<sub>2</sub>, mentre è alto in animali trattati con omogenato d'ipofisi . Rispetto ai controlli, il trattamento con E<sub>2</sub> non altera il numero di SPZ raccolti dalla cloaca, mentre l'ICI contrasta di 2.5 volte l'effetto di PD (P<0.01). Mediante colorazioni istologiche, sono stati analizzati i cambiamenti morfologici associati al rilascio degli SPZ (Fig. 6). In sezioni testicolari di animali di controllo (Fig. 6A) e trattati con E<sub>2</sub> (Fig. 6B) non si osserva spermiazione; al contrario, dotti efferenti allargati e SPZ nei lumi tubulari sono evidenti in sezioni testicolari di animali trattati con PD ± ICI (Fig. 6C-D).

Poichè la spermiazione ed il trasporto degli SPZ contribuiscono entrambi al rilascio degli SPZ, per discriminare i due eventi, sezioni testicolari di animali trattati con PD ± ICI sono state analizzate per valutare il numero di tubuli vuoti, spermiami e con SPZ ancorati alle cellule del Sertoli (pieni) come indici, rispettivamente, di trasporto degli SPZ, spermiazione e assenza di spermiazione (Fig. 7). Negli animali trattati con PD si osserva un numero significativamente (P<0.01) maggiore di tubuli vuoti e spermiami rispetto ai controlli. L'ICI contrasta significativamente tale effetto (P<0.01). Tuttavia, il trattamento con PD influenza più la spermiazione che il trasporto, infatti la percentuale di tubuli spermiami è 65.87%, mentre quella dei tubuli vuoti è 7.05%. Inoltre il trattamento con ICI contrasta soprattutto la spermiazione, dal momento che la percentuale di tubuli pieni negli animali trattati con PD± ICI ( 52.31%) è significativamente più alta rispetto al gruppo trattato con PD (9.22%).

L'analisi di Western blot evidenzia Fra1 in proteine nucleari estratte da tutti i gruppi sperimentali (Fig. 8A). L'analisi densitometrica dei segnali, corretta in base al contenuto proteico caricato, valutato con un anticorpo anti MAPK1 (Fig. 8B), mostra un significativo aumento di Fra1 nel testicolo di animali trattati con PD rispetto al gruppo di controllo (P<0.01). L'antagonista ICI 182-780 contrasta significativamente tale effetto (P<0.01).



**Figura 5:** Numero di SPZ raccolti dalla cloaca di animali trattati con una singola iniezione di E<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>M) o PD±ICI. I risultati sono rappresentativi di 10 animali (analizzati separatamente)/ gruppo. I dati sono riportati come la media ± s.e.m. a vs b p<0.01; b vs c p<0.01.



**Figura 6:** Sezioni testicolari di animali trattati con una singola iniezione di KRB (**A**), E<sub>2</sub> [10<sup>-5</sup>M] (**B**), PD (**C**) e PD+ICI (**D**) colorate con ematossilina/eosina. I cambiamenti morfologici correlati al rilascio degli SPZ (distacco degli SPZ dalle cellule del Sertoli e allargamento dei dotti efferenti) sono evidenti solo nei pannelli C e D. I risultati sono rappresentativi di 5 animali (analizzati separatamente)/gruppo. ED: dotti efferenti.



**Figura 7:** Sezioni testicolari di animali trattati con una singola iniezione di veicolo o di PD±ICI: analisi della percentuale di tubuli vuoti (A), spermatici (B) e pieni (C). I risultati sono rappresentativi di 5 animali (analizzati separatamente)/ gruppo. I dati sono espressi come la media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p<0.01$ ; b vs c  $p<0.01$ .



**Figura 8:** Espressione di Fra1 e MAPK1 (**A**) nel testicolo di animali trattati *in vivo* con una singola iniezione di PD± ICI. I valori sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti (**B**). I dati sono riportati come la media ±s.e.m. a vs b p<0.01; b vs c p<0.01.

### III.4 *Discussione*

In accordo con recenti osservazioni sull'importante ruolo degli estrogeni nella fertilità maschile, i nostri dati mostrano, per la prima volta in un vertebrato, che l'estradiolo attiva Fra1 nelle PMC.

Le PMC sono cellule muscolari lisce che, contraendosi impongono al tubulo un movimento peristaltico che trasporta gli SPZ dai tubuli fino ai dotti (Maekawa *et al.*, 1996). Gli SPZ, infatti, rilasciati dalle cellule del Sertoli, sono cellule immotili, trasportate passivamente dai tubuli verso i dotti.

In *R. esculenta* è stato dimostrato che il trattamento con omogenato di ipofisi incrementa significativamente il numero di cellule peritubulari mioidi che esprime Fra1 e che durante il ciclo riproduttivo annuale l'espressione di Fra1 a livello delle PMC incrementa in primavera, in concomitanza con l'accoppiamento, associando Fra1 al trasporto degli SPZ (Cobellis *et al.*, 2005).

Studi precedenti hanno mostrato che gli estrogeni incrementano l'espressione di Fra1 nel testicolo di rana (Cobellis *et al.*, 2002). A partire da questi risultati, abbiamo ipotizzato che l'ipofisi regoli l'espressione di Fra1 nelle PMC attraverso gli estrogeni.

Animali trattati *in vivo* ed *in vitro* con 17 $\beta$ -estradiolo confermano che il testicolo esprime Fra-1 e che tale espressione è regolata dal trattamento. L'analisi effettuata mediante Western blot dimostra, infatti, che gli estrogeni incrementano l'espressione di Fra1 rispetto ai controlli. L'incremento, è nettamente contrastato dall'antagonista degli estrogeni ICI182-780, suggerendo che l'effetto è mediato da recettore.

È importante notare che il trattamento con ICI riduce l'espressione di Fra1 al di sotto del valore di controllo, indicando un ulteriore effetto dell'E2 sul testicolo *in toto*. L'immunoistochimica conferma che la proteina è localizzata a livello dei dotti (cellule epiteliali e muscolari), dei vasi (cellule endoteliali e muscolari) e delle PMC (Cobellis *et al.*, 2005). La conta delle PMC che esprimono Fra1 dimostra che gli estrogeni aumentano il numero di PMC immunopositive.

Per dimostrare che l'effetto degli estrogeni sul testicolo è diretto e non mediato dall'ipofisi, l'espressione di Fra1 è stata analizzata in frammenti di testicolo incubati *in vitro* in presenza di 17 $\beta$ -estradiolo  $\pm$  ICI.

L'analisi mediante Western blot dimostra che gli estrogeni, attraverso un meccanismo mediato dal proprio recettore, inducono l'espressione di Fra1 agendo direttamente sul testicolo. L'ipofisi, dunque, potrebbe controllare l'espressione di Fra1 nelle PMC, regolando i livelli testicolari di estrogeni.

Per testare questa ipotesi, abbiamo indotto l'espressione testicolare di Fra1, mediante trattamento con iniezioni multiple di PD  $\pm$  ICI. Dal momento che l'analisi di Western blot dimostra che l'omogenato d'ipofisi incrementa l'espressione di Fra1 rispetto ai controlli e che tale effetto è nettamente contrastato dall'antagonista degli estrogeni ICI182-780, noi suggeriamo che l'ipofisi controlli l'espressione di Fra1 nelle PMC attraverso gli estrogeni.

Tuttavia poiché gli animali trattati con PD, modificano, in modo significativo, la loro morfologia testicolare per permettere il rilascio degli SPZ nell'ambiente esterno, noi abbiamo ipotizzato un ulteriore coinvolgimento degli estrogeni nel controllo del rilascio degli SPZ.

L'anfibio, *R. esculenta*, è un riproduttore stagionale, la cui spermatogenesi avviene in cisti, formate da cellule del Sertoli, che avvolgono cellule germinali ad uno stesso stadio differenziativo (Cobellis *et al.*, 2003). Durante il ciclo riproduttivo annuale, il testicolo si popola mensilmente di cellule germinali ad uno stadio spermatogenetico tipico (Pierantoni *et al.*, 2002). Poiché i tubuli a marzo sono costituiti prevalentemente da SPG in proliferazione e SPZ, noi abbiamo trattato gli animali, catturati in questo mese, con una singola iniezione di E<sub>2</sub> o PD  $\pm$  ICI per studiare il ruolo degli estrogeni nel rilascio degli SPZ. La singola iniezione permette di evitare la progressione della spermatogenesi e l'ulteriore produzione di SPZ.

Abbiamo valutato l'efficienza del trasporto degli SPZ, contando gli SPZ nella cloaca. Il trattamento con E<sub>2</sub>, analizzato mediante colorazione istologica, non influenza la morfologia testicolare. Il numero di SPZ, invece, raccolti dalla cloaca di animali trattati con PD + ICI è significativamente minore, rispetto agli animali trattati con PD da solo, suggerendo che l'ICI interferisce con il rilascio degli SPZ indotto da PD. La spermiazione e il trasporto contribuiscono entrambi al rilascio degli SPZ dalla cloaca all'ambiente acquatico. Per discriminare l'evento bersaglio dell'ICI, abbiamo analizzato sezioni testicolari di animali trattati *in vivo* con PD  $\pm$  ICI, ed in particolare abbiamo valutato il numero di tubuli vuoti, spermati e pieni, come indici, rispettivamente, del trasporto degli SPZ, della spermiazione

e dell' assenza di spermiazione. Il trattamento con PD influenza la spermiazione ed il trasporto e l'ICI contrasta significativamente tali effetti. Tuttavia, nelle sezioni testicolari di animali trattati con PD, il numero di tubuli spemiati è maggiore di quello dei tubuli vuoti, mostrando che il trattamento con omogenato d'ipofisi influenza la spermiazione più che il trasporto. L'ICI contrasta la spermiazione indotta da PD, dal momento che gli animali trattati con PD + ICI mostrano un'alta percentuale di tubuli pieni rispetto al gruppo trattato con PD, suggerendo che il ridotto numero di SPZ cloacali è dovuto ad una minore spermiazione.

La relazione tra rilascio degli SPZ ed estrogeni è stata già descritta nei topi  $\alpha$ ERKO (Knock out per il recettore  $\alpha$  degli estrogeni), i quali hanno un basso numero di SPZ nel fluido seminale, molto probabilmente associato ad una mancata attività estrogenica sul trasporto degli SPZ (Eddy *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1997; O'Donnell *et al.*, 2001).

In conclusione abbiamo dimostrato, per la prima volta in un vertebrato, che gli estrogeni attivano la proteina Fra1 nelle PMC, promuovendone l'attività contrattile, ed inducono il rilascio degli SPZ. Il trattamento con ICI, infatti, riduce il rilascio degli SPZ, influenzando soprattutto la spermiazione. Infine, i nostri dati possono aiutare a comprendere l'influenza esercitata dagli interferenti endocrini ambientali sulla riproduzione maschile.

**IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NEL TESTICOLO DI ANFIBI E  
RODITORI: IL RECETTORE DEI CANNABINIDI DI TIPO 1 E ATTIVITA`  
DELL' IDROLASI DELLE AMIDI DI ACIDI GRASSI NELLE CELLULE  
GERMINALI MASCHILI.**

N-arachidonoiletanolamide (anandamide [AEA]), principale endocannabinoido descritto finora nel testicolo, esercita i suoi effetti attraverso l'attivazione di recettori per i cannabinoidi (CNR) accoppiati a proteine G di membrana. Tuttavia il ruolo dell'anandamide nella riproduzione maschile non è ancora ben noto. In questo articolo, noi dimostriamo la presenza del sistema endocannabinoido, costituito dal recettore di cannabinoidi di tipo (CNR1) e l'idrolasi delle amidi di acidi grassi (FAAH), nel testicolo dell'anfibio, *Rana esculenta*, a livello del compartimento tubulare. Durante il ciclo riproduttivo annuale, l'espressione di entrambe le proteine incrementa a settembre, in concomitanza con l'abbondante presenza di spermatidi (SPT) nei tubuli seminiferi. L'immunoistochimica conferma la presenza di entrambe le proteine negli SPT allungati e spermatozoi (SPZ). Inoltre, in rana l'attivazione di CNR1 riduce la motilità degli spermatozoi, come già osservato nei mammiferi, suggerendo un ruolo filogeneticamente conservato degli endocannabinoidi nell'inibizione della motilità degli spermatozoi.

*Cobellis et al.*, *Biology of Reproduction* 75(1), 82-89 (2006). DOI: 10.1095

## IV.1 Introduzione

I cannabinoidi endogeni sono una classe emergente di mediatori lipidici, identificati nel cervello (Devane *et al.*, 1992), in diversi tessuti periferici, nel liquido seminale, nel fluido follicolare e nel latte materno (Schuel *et al.* 2002). Tra i principali endocannabinoidi (esteri, ammidi ed eteri di acidi grassi polinsaturi a lunga catena), troviamo l' N-arachidonoiletanolamina (anandamide, AEA), descritto nel testicolo (Sugiura *et al.* 1996) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Hillard e Jarrahian 2003). Entrambi agiscono mediante l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G (CNR), localizzati sulla membrana di cellule bersaglio (Lutz 2002). Gli effetti sono simili a quelli del THC,  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo, il principio attivo isolato dalla *Cannabis sativa* (Mechoulam e Hanus 2000): da qui il nome di endocannabinoidi. Gli effetti dell'anandamide mediati da CNR1 dipendono dalla sua concentrazione nello spazio extracellulare, controllata da un ipotetico trasportatore di membrana, AMT, e dall'idrolasi delle amidi di acidi grassi (FAAH), che agiscono rispettivamente sull'uptake ed idrolisi dell'AEA. Gli endocannabinoidi, i loro enzimi di sintesi ed i recettori, insieme con l'AMT e FAAH, costituiscono il "sistema endocannabinoide" (Beltramo *et al.* 1997; Hillard *et al.* 1997; Di Marzo V 1999; Pertwee e Ross 2002).

I CNR noti sono due: CNR1 (Matsuda *et al.* 1990) e CNR2 (Munro *et al.*, 1993); del primo si conoscono due varianti di splicing (CNR1A e CNR1B) (Shire *et al.* 1995; Ryberg *et al.* 2005). CNR1 è stato localizzato per la prima volta nel cervello, ma è espresso in diversi tessuti: testicolo, placenta, linfociti, nervi periferici, utero, cellule endoteliali e muscolari, occhio, milza, leucociti (Howlett *et al.* 2002). Oggi è noto che gli effetti dei cannabinoidi interessano non solo il sistema nervoso centrale ma anche quello riproduttivo (Maccarrone *et al.* 2002; Brown e Dobs 2002). Nelle femmine di ratto, infatti, essi inibiscono l'ovulazione (Reich *et al.* 1982), mentre nel topo è stato dimostrato che alti livelli di AEA impediscono l'impianto della blastocisti (Schmid *et al.* 1997). Nei maschi i cannabinoidi inibiscono la spermatogenesi, riducono il peso degli organi riproduttivi, la motilità e vitalità degli SPZ, ed infine diminuiscono i livelli plasmatici di testosterone portando all'impotenza (Kolodny *et al.* 1974). CNR1 è stato localizzato nelle cellule di

Leydig murine (Wenger *et al.* 2001), mentre nell'uomo è stato recentemente dimostrato negli SPZ (Rossato *et al.* 2005), suggerendo che le cellule germinali sintetizzano CNR1.

Per comprendere il ruolo del sistema endocannabinoide nella fisiologia delle cellule germinali, noi abbiamo utilizzato l'anfibio anuro, *Rana esculenta*, come modello animale per studiare l'espressione e la localizzazione delle proteine CNR1 e FAAH nel testicolo durante il ciclo riproduttivo annuale. La *Rana esculenta* è un riproduttore stagionale con una peculiare organizzazione della gonade maschile, in cui le cellule germinali nello stesso stadio differenziativo sono racchiuse in cisti delimitate dalle cellule del Sertoli (Rastogi and Chieffi 1972). Questa caratteristica morfologia del testicolo, insieme alla ciclicità dell'attività spermatogenetica, rende la rana un valido modello animale per lo studio della spermatogenesi (Pierantoni *et al.* 2002; Cobellis *et al.* 2003).

Recentemente, ortologi di CNR1 e FAAH sono stati evidenziati nel testicolo e nell'ovario dell'invertebrato, *Ciona intestinalis* (Matias *et al.* 2005). Inoltre, la presenza di CNR1 nel testicolo (Wenger *et al.* 2001) e SPZ di mammifero (Rossato *et al.* 2005), (Maccarrone *et al.* 2005) conferma il legame tra sistema endocannabinoide e riproduzione. L'anandamide, infatti, regola la reazione acrosomale negli SPZ di riccio di mare (Schuel and Burkman 2005) e la capacitazione (iperattivazione e capacità di subire la reazione acrosomale con la zona pellucida dell'ovocita) negli SPZ suini (Maccarrone *et al.* 2005) ed la motilità negli SPZ umani (Rossato *et al.* 2005). Inoltre gli SPZ suini sono in grado di sintetizzare AEA ed esprimono il recettore dei vanilloidi (TRPV1), CNR1, FAAH e CNR2. Finora, FAAH, infatti, nel sistema riproduttivo maschile, era stato mostrato soltanto nelle cellule del Sertoli immature murine (Maccarrone *et al.* 2003). In questo articolo, noi abbiamo studiato: 1) l'espressione comparativa di CNR1 e FAAH negli SPZ di rana, ratto e topo; 2) l'attività di CNR1 e FAAH negli SPZ di rana; e 3) la localizzazione di FAAH e CNR1 nel testicolo di *R. esculenta* durante la spermatogenesi.

In conclusione noi mostriamo che le proteine CNR1 e FAAH sono presenti nel compartimento germinale del testicolo di rana e negli SPZ isolati. Inoltre l'analisi comparativa, eseguita su rana, ratto e topo, suggerisce che il sistema endocannabinoide, altamente conservato nella scala evolutiva, possa regolare la funzionalità degli SPZ.

## **IV.2 Materiali e metodi**

### ***Animali***

Maschi di *R. esculenta* (n=36) sono stati mensilmente (eccetto nei mesi di agosto ed ottobre) catturati vicino Napoli e divisi in tre gruppi. Ciascun gruppo (n=12) è stato analizzato separatamente. Gli animali sono stati sacrificati dopo anestesia con MS222 (Sigma-Aldrich Corp., St.Louis, MO). I testicoli sono stati prelevati e immediatamente analizzati per un'analisi di istologia (n=4), di immunoistochimica (n=6) o congelati a -80°C per procedere con l'estrazione di proteine (n=14).

Come controlli positivi per l'espressione di FAAH e CNR1 sono stati usati ratti Sprague-Dawley e topi CD1 (Charles River Laboratories, Lecco).

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Ministero Italiano della Sanità.

### ***Materiali***

Sono stati utilizzati i seguenti materiali: ioduro di propidio, inibitori di proteasi e anandamide (AEA), forniti dalla Sigma-Aldrich Corp. (Milano). L' N-(4-idrossifenil) arachidonilamide (AM404), un analogo dell'AEA che potenzia l'attività dell'AEA endogeno, inibendo FAAH, è stato fornito della Cayman Chemical (Michigan, USA). L'antagonista selettivo di CNR1, SR141716A, è stato prodotto da Sanofi Research (Montpellier, Francia).

### ***Estrazione di proteine da tessuto***

I tessuti (cervello di ratto, testicoli di topo e rana) sono stati omogeneizzati in buffer di lisi [Hepes 25mM (pH 7.9), EDTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM] in presenza di inibitori di proteasi [4µg/ml di leupeptina, aprotinina, pepstatina A, chimostatina e 5 µg/ml di N- $\alpha$ -ptosil-L-lisina clorometil chetone (TPCK)]. Dopo centrifugazione a 800x g per 15 minuti, il soprannatante è stato rimosso e il pellet è stato riomogeneizzato con lo stesso buffer di lisi. La concentrazione proteica dei due soprannatanti ottenuti è stata determinata secondo il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry *et al.* 1951).

### ***Western Blot***

Le proteine sono state separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 10% e trasferite su un filtro di PVDF (Amersham Pharmacia Biotech) a 280mA per 2.5h a 4°C. Avvenuto il trasferimento, i filtri sono stati trattati per 3h con una soluzione di bloccaggio per limitare le interazioni aspecifiche: TBS [Tris-HCl 10mM (pH 7.6), NaCl 150mM] contenente 5% di latte scremato in polvere e 0.25% di Tween20. I filtri sono stati poi incubati a 4°C in agitazione con l'anticorpo primario (anti-CNR o anti-FAAH diluito 1:1000, anti-MAPK1 diluito 1:500) in tampone fosfato PBS [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 100mM] a cui è stato aggiunto il 3% di latte scremato in polvere. Dopo 18h, i filtri sono stati lavati per tre volte con TBS-0.25 Tween20, un'unica volta in solo TBS e poi incubati con immunoglobuline coniugate con perossidasi di rafano (Dako Corp., Denmark) diluite 1:1000 in TBS-1% NSS (siero suino normale) per 1h a temperatura ambiente. I filtri sono stati ulteriormente lavati e gli immunocomplessi evidenziati mediante ECL (enhanced chemiluminescence) secondo le istruzioni della casa produttrice (Amersham Pharmacia Biotech).

La specificità delle reazioni è stata dimostrata pre-adsorbendo l'anticorpo con una quantità in eccesso dell'antigene specifico (2µg) per 18h a 4°C in agitazione.

Le membrane, strippate a 60°C per 30 minuti in un buffer di strippaggio [2-mercaptoetanololo 100mM, SDS 2% e Tris-HCl 62.5 mM (pH 7.6)] sono state incubate con un anticorpo anti-MAPK1 (sc-154; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) per quantizzare il contenuto proteico caricato.

### ***Immunoistochimica***

I testicoli di rana, non appena prelevati dall'animale, sono stati fissati in paraformaldeide 4% in un tampone fosfato (PB) 0.1 M pH 7.4, crioprotetti, immersi in Killik medio (Bio-Optica, Milano) e congelati in isopentano. Le sezioni (dallo spessore di 12 µm), ottenute al criostato, sono state montate su dei vetrini ricoperti di 3-aminopropil-trietossisilan (TESPA) e conservate a -20°C fino all'uso.

Per analizzare la distribuzione degli antigeni CNR1 e FAAH, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario (diluizione 1:800 in PBS 0.01 M, contenente 10.1% Triton-X 100) in camera umida a 4°C per 14h. Le sezioni poi sono state lavate in PBS-0.1% Triton.

L'immuoreattività è stata rilevata mediante il sistema del complesso biotina-avidina (ABC) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB (3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloride) come substrato/cromogeno.

La specificità dell'immunoreazione è stata dimostrata incubando le sezioni con l'anticorpo precedentemente pre-adsorbito, per 18h a 4°C in agitazione, con un eccesso dell'antigene corrispondente (2µg).

Le sezioni sono state osservate al microscopio (Zeiss Axioskop) e in seguito fotografate.

### ***Trattamenti e raccolta degli spermatozoi di rana***

Per indurre la spermiazione, maschi di rana (n=6) sono stati trattati con omogenato di ipofisi (Minucci *et al.*, 1989; Cobellis *et al.*, 2005). Gli SPZ sono stati raccolti nel loro fluido cloacale, filtrati per escludere un'eventuale contaminazione da altri tipi di cellule ed, in seguito, analizzati al microscopio.

### ***Trattamento con AEA.***

Campioni di SPZ freschi sono stati diluiti 1:5 in una soluzione fisiologica per anfibi (KRB), divisi in quattro aliquote e trattati come segue:

- 1ml controllo;
- 1ml trattato con AEA [1 µM];
- 1 ml trattato con AEA [1 µM] in combinazione con SR141716A [10 µM], un antagonista selettivo di CNR1;
- 1 ml trattato solo con SR141716A [10 µM].

Dopo un'incubazione di 15 minuti, è stata valutata la vitalità e la motilità degli SPZ.

In seguito, i campioni di SPZ trattati con AEA sono stati centrifugati (1000x g), lavati per tre volte con KRB per rimuovere l'AEA e ulteriormente analizzati per valutare la vitalità e la motilità degli SPZ.

### ***Trattamento con AM404.***

Campioni di SPZ freschi sono stati incubati con o senza AM404 [1 µM], un inibitore di FAAH, per 15 minuti. Dopo il trattamento è stata valutata la vitalità e la motilità degli SPZ.

### ***Diluizione del liquido della cloaca.***

Abbiamo valutato gli effetti della diluizione del liquido della cloaca sulla motilità degli SPZ. Un campione di SPZ freschi è stato diviso in aliquote e diluito 1:5 e 1:50 con KRB; un campione non diluito è stato usato come gruppo di controllo. Tutti i campioni sono stati analizzati per valutare la motilità degli SPZ.

#### ***Trattamento con SR141716A***

Campioni di SPZ freschi sono stati incubati in presenza o in assenza di un antagonista selettivo di CNR1, SR141716A (Rinaldi-Carmona 1994), a differenti concentrazioni (1.0, 5.0, 10  $\mu$ M) per 15 minuti. Dopo il trattamento è stata valutata la motilità degli SPZ.

#### ***Valutazione della vitalità e della motilità degli spermatozoi di rana***

La vitalità degli SPZ è stata valutata mediante ioduro di propidio e analisi al citofluorimetro ed espressa come percentuale degli SPZ vivi su totali.

La motilità degli SPZ è stata valutata al microscopio (ingrandimento 20X) mediante emocitometro ed è stata espressa come percentuale di SPZ motili su totali.

#### ***Estrazione di proteine da spermatozoi di ratto e topo***

Gli SPZ di ratto e topo sono stati raccolti in un tampone salino fosfato (PBS) pH 7.4, frammentando l'epididimo. I campioni di SPZ sono stati filtrati, esaminati al microscopio per escludere eventuali contaminazioni da altri tipi cellulari e centrifugati a 1000x g per 15 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto, contenente le cellule di interesse, è stato lisato mediante un tampone con triplo detergente [PBS (pH 7.4) contenente 0.02% sodio azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodio deossicolato, 4  $\mu$ g/ml di leupeptina, aprotinina, pepstatina A e chimostatina, 5  $\mu$ g/ml di TPCK] e in seguito le cellule sono state sonicate per tre volte a 25mW. La concentrazione delle proteine è stata valutata con il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1955).

#### ***Anticorpi***

E' stato usato un anticorpo policlonale diretto contro l'estremità N-terminale (primi 77 residui amminoacidici) dell'antigene CNR1 di ratto. La specificità dell'anticorpo è stata già ampiamente confermata in altre specie (Twitchell *et al.*, 1997; Hsieh *et al.* 1999; Hajos *et*

*al.* 2000; Salio *et al.* 2002) e in questo caso ulteriormente accertata tramite una preincubazione con una quantità in eccesso (2 µg) del peptide corrispondente, in modo da saturare il sito antigenico (epitopo) dell'anticorpo.

Gli anticorpi anti-FAAH (Alexis Biochemicals, Lausen, Svizzera) e anti-MAPK1 (Santa Cruz Biotechnology) sono commercialmente disponibili. La specificità dell'immunoreattività di FAAH è stata verificata usando testicoli di topo come controllo positivo (Maccarrone *et al.*, 2003) e mediante una preincubazione con una quantità in eccesso (2 µg) del peptide corrispondente.

### ***Presentazioni dei dati e statistiche***

L'analisi densitometrica dei segnali ottenuti con il Western Blot è stata eseguita sfruttando il GELDOC1,00-UV system (BIORAD, Hercules, CA). L'espressione di CNR1 e FAAH è stata corretta in funzione del contenuto invariabile di MAPK1. I valori sono espressi come unità di densità ottica (OD).

I test "t" di Student ed ANOVA seguita dal test di Duncan per il confronto tra gruppi multipli sono stati eseguiti per valutare la significatività delle differenze. I dati, provenienti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono stati espressi come la media ± s.e.m.

### IV.3 Risultati

#### *Analisi del sistema endocannabinoide nel testicolo di rana*

La presenza di CNR1 è stata analizzata nei testicoli di *R. esculenta* raccolti durante il ciclo riproduttivo annuale, usando come controllo positivo il cervello di ratto. L'analisi di Western blot mostra la presenza di una banda di 66 KDa (Fig. 1A) in proteine da testicoli di rana e cervello di ratto. L'uso di un anticorpo preassorbito conferma la specificità della reazione in entrambi gli estratti (Fig. 1B).

L'analisi di Western blot di lisati testicolari, raccolti mensilmente durante il ciclo riproduttivo, mostra la presenza della banda di 66 KDa durante tutto l'anno con significative variazioni stagionali (Fig. 2A). L'analisi densitometrica dei segnali dimostra un significativo aumento di CNR1 a settembre ( $P < 0.05$ ) rispetto agli altri mesi (Fig. 2B). Essendo ben note le caratteristiche stagionali del testicolo di rana (Rastogi 1976), è possibile conoscere lo stadio spermatogenetico che appare a settembre (stadi post-meiotici), quando l'espressione di CNR1 aumenta (Fig. 2C).

L'espressione di FAAH è stata analizzata mediante Western blot. Dal momento che FAAH è presente nel testicolo di *Ciona intestinalis* (Matias 2005), negli SPZ suini (Maccarrone *et al.*, 2005) e nelle cellule del Sertoli di topo (Maccarrone *et al.*, 2003), abbiamo scelto come controllo positivo il testicolo di topo.

L'analisi comparativa, effettuata su testicoli di rana e di topo, mostra la presenza di un singolo segnale dal peso molecolare di 55 KDa (Fig. 3A). L'assenza dell'immunocomplesso, dopo preassorbimento, dimostra la specificità dell'immunoreazione (Fig. 3B).

Per valutare quantitativamente l'espressione di FAAH durante il ciclo riproduttivo annuale, i testicoli di rana sono stati lisati per ottenere estratti proteici. L'analisi di Western blot mostra un segnale di 55 KDa (Fig. 4A) significativamente più espresso nel periodo settembre-febbraio ( $P < 0.05$ ) rispetto agli altri mesi (Fig. 4B).

Per confermare i risultati precedenti, abbiamo valutato la presenza di CNR1 e FAAH mediante analisi di immunoistochimica su testicoli raccolti durante la fase mitotica, meiotica e postmeiotica del ciclo riproduttivo annuale. La colorazione con ematossilina-

eosina conferma che i testicoli, nel periodo di settembre-ottobre, sono ricchi di cellule germinali postmeiotiche che si stanno differenziando in SPZ (Fig. 5A). L'immunohistochimica dimostra una forte e chiara immunopositività per CNR1 (Fig. 5B) e FAAH (Fig. 5C) in queste cellule. Durante gli altri periodi dell'anno, e in particolare durante le fasi mitotiche (spermatogoni) e postmitotiche (spermatociti) (Fig. 5, D-I), si osserva una debole immunopositività di CNR1 in spermatogoni (Fig. 5E) e spermatociti (Fig. 5H) e di FAAH negli SPZ (Fig. 5F) e spermatociti (Fig. 5I). Nessuna immunopositività è stata rilevata nel compartimento interstiziale.

La specificità del segnale è stata confermata mediante l'uso di anticorpi preassorbiti (Fig. 5, L e M).



**Figura 1:** 40  $\mu$ g di proteine estratte da cervello di ratto e testicolo di *R. esculenta* sono stati analizzati mediante Western blot usando un anticorpo anti-CNR1 N-terminale (**A**). La specificità della reazione antigene-anticorpo è stata dimostrata mediante preassorbimento con peptide specifico (**B**). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 2:** proteine estratte da testicoli di *R. esculenta* analizzati mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-CNR1 N-terminale. Espressione di CNR1 e MAPK1 durante il ciclo riproduttivo annuale (**A**). I livelli di CNR1 sono stati quantizzati con un'analisi densitometrica del segnale CNR1/MAPK1 (**B**). I valori sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.05$ .

La colorazione con ematossilina-eosina (**C**) mostra le varie fasi della spermatogenesi. Nel periodo febbraio-marzo riprende la spermatogenesi e gli spermatogoni (SPG) proliferano (**1**). Da aprile, i tubuli si arricchiscono in cisti di spermatogoni secondari e spermatociti (SPC) primari e secondari (**2**). A settembre, appaiono gli spermatidi (SPT) allungati (**3**). Il cerchio indica gli spermatogoni in metafase.



**Figura 3:** 20µg di proteine estratte da testicolo di topo e di *R. esculenta* sono stati analizzati mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-FAAH (**A**). La specificità della reazione antigene-anticorpo è stata dimostrata mediante preassorbimento con peptide specifico (**B**). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 4:** proteine estratte da testicoli di *R. esculenta* analizzati mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-FAAH. Espressione di FAAH (**A**) e MAPK1 (**B**) durante il ciclo riproduttivo annuale. I livelli di FAAH sono stati valutati quantitativamente mediante analisi densitometrica del segnale FAAH/MAPK1. I valori sono espressi in unità di densità ottiche (OD) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. I dati sono riportati come la media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.05$



**Figura 5:** Sezioni di testicoli di animali, *R. esculenta*, catturati a settembre (**A-C**), marzo (**D-F**) e giugno (**G-I**) analizzati mediante colorazione con ematossilina-eosina (**A, D, G**), immunohistochimica per CNR1 (**B, E, H**) o per FAAH (**C, F, I**). I controlli negativi dell'immunoreazione (**L, M**) sono stati condotti su sezioni scelte casualmente durante il ciclo riproduttivo annuale. Le stelle indicano il compartimento interstiziale. I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

### ***Effetti degli endocannabinoidi sulla vitalità e motilità degli spermatozoi di rana***

L'analisi degli effetti dell'AEA sulla percentuale di vitalità e motilità degli SPZ è stata effettuata attraverso trattamenti *in vitro* (Fig. 6).

Abbiamo osservato che l'AEA [1  $\mu$ M] riduce fortemente il numero di SPZ motili ( $p < 0.01$ ) rispetto al gruppo di controllo (Fig. 6A). Tale effetto inibitorio è contrastato da [10  $\mu$ M] SR141716A (Fig. 6B). Un lieve incremento del numero di SPZ motili, rispetto ai controlli è stato osservato nei campioni trattati solo con SR171416A ( $P < 0.05$ ). Infine, la percentuale di SPZ motili è stata ristabilita ai valori di controllo rimuovendo l'AEA con i lavaggi (Fig. 6B). Il controllo della vitalità indica che l'assenza di motilità non è dovuta a morte cellulare (Fig. 6A).

Poiché l'AEA è presente nel liquido seminale umano (Schuel *et al.*, 2002), attraverso un approccio indiretto abbiamo valutato la presenza degli endocannabinoidi nel fluido cloacale. Incubando, infatti, campioni di SPZ freschi in presenza o in assenza dell'inibitore di FAAH (AM404), abbiamo osservato che, similmente all'AEA, gli SPZ trattati con AM404 conservano la loro vitalità, ma riducono significativamente la loro motilità ( $P < 0.01$ ) (Fig. 7). Inoltre, diluizioni crescenti del liquido della cloaca inducono un significativo aumento lineare della percentuale di SPZ motili rispetto al gruppo di controllo ( $P < 0.01$ ) (Fig. 8A). Infine l'antagonista selettivo di CNR1, SR141716A, incubato a differenti concentrazioni (1, 5 e 10  $\mu$ M), determina un aumento significativo, proporzionalmente alla concentrazione aggiunta, della percentuale di SPZ motili ( $P < 0.01$ ) (Fig. 8B).



**Figura 6:** Effetti dell'AEA sulla vitalità e motilità degli SPZ di rana. Gli SPZ, raccolti nel fluido cloacale, sono stati diluiti (1:5) in KRB ed incubati in assenza o in presenza di AEA  $\pm$  SR141716A. I valori relativi alla vitalità e alla motilità sono riportati in **(A)** e **(B)**. I dati sono stati riportati come percentuale di SPZ vitali o motili/ totali ed espressi come media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p<0.01$ ; a vs c  $p<0.05$ ; b vs d  $p<0.01$ .



**Figura 7:** Effetti dell'AM404 sulla motilità degli SPZ di *R. esculenta*. Gli SPZ sono stati incubati nel fluido cloacale con AM404. I dati sono stati riportati come percentuale di SPZ vitali o motili/ totali ed espressi come media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.01$ .



**Figura 8:** Effetti della diluizione del fluido cloacale (**A**) e dell'antagonista selettivo di CNR1, SR141716A (**B**). Dopo valutazione della motilità degli SPZ, i dati sono stati riportati come percentuale degli SPZ motili/ totali ed espressi come media  $\pm$  s.e.m. a vs b  $p < 0.01$ ; a vs c  $p < 0.01$ ; b vs c  $p < 0.01$ .

***Analisi del sistema degli endocannabinoidi negli spermatozoi di rana e roditori.***

Il sistema endocannabinoide è stato studiato in SPZ isolati. L'analisi comparativa è stata effettuata su SPZ di rana, topo e ratto raccolti dalla cloaca o dall'epididimo. La figura 9 mostra la presenza di CNR1 (Fig. 9A) e FAAH (Fig. 9B) in tutti gli estratti proteici. In particolare sono stati osservati due segnali di CNR1, uno di 63 e l'altro di 66 kDa. L'assenza di immunoreattività con gli anticorpi preassorbiti indica la specificità dei segnali (Fig. 9C e 9D).



**Figura 9:** Analisi di Western blot su SPZ di *R. esculenta*, topo e ratto utilizzando anticorpi anti-CNR1 N-terminale (**A**) e anti-FAAH (**B**). La specificità delle reazioni antigene-anticorpo è stata dimostrata mediante preassorbimento con peptidi specifici (**C**, **D**). I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

#### IV.4 *Discussione*

Studi precedenti suggeriscono che il sistema endocannabinoide agisce nel tratto riproduttivo maschile. Il testicolo di ratto è in grado di sintetizzare l'AEA (Sugiura *et al.* 1996), il principale endocannabinoide, presente anche nel fluido seminale umano (Schuel *et al.* 2002). Nel topo, CNR1 è espresso nelle cellule di Leydig (Wenger *et al.* 2001) e nelle cellule germinali da SPG a SPZ (Gye *et al.*, 2005), e negli SPZ umani (Rossato *et al.* 2005), suini (Maccarrone *et al.* 2005). L'espressione e l'attività di FAAH sono state valutate nelle cellule immature del Sertoli e negli SPZ suini, suggerendo che, oltre a CNR1, anche FAAH potrebbe essere sintetizzato dalle cellule germinali durante la spermatogenesi.

Per comprendere il ruolo esercitato dal sistema endocannabinoide nella fisiologia del testicolo, abbiamo analizzato l'espressione e la localizzazione di CNR1 e FAAH durante il ciclo riproduttivo annuale di *R. esculenta*.

L'analisi comparativa, eseguita su rana, topo e ratto, dimostra la presenza di CNR1 e FAAH in SPZ di mammiferi e non (Rossato *et al.* 2005; Maccarrone *et al.* 2005; Schuel e Burkman 2005). Inoltre, i nostri risultati mostrano che: 1) il sistema endocannabinoide è presente negli SPZ di specie distanti nella scala evolutiva; 2) il fluido cloacale contiene endocannabinoidi; 3) il sistema endocannabinoide regola la motilità degli SPZ di rana.

Durante il ciclo riproduttivo annuale, l'analisi di Western blot mostra la presenza di CNR1 da gennaio a dicembre. L'analisi quantitativa dei segnali rivela un significativo aumento dell'espressione di CNR1 a settembre rispetto agli altri mesi. Gli studi di RT-PCR confermano, nel testicolo di rana, un alto livello di mRNA per CNR1 nel mese di settembre (Meccariello *et al.* 2006). Data la progressione degli stadi della spermatogenesi in *R. esculenta*, abbiamo associato l'aumentata espressione di CNR1 alla presenza di spermatidi, i quali risultano chiaramente immunopositivi per CNR1. Negli altri mesi, invece, una debole immunolocalizzazione di CNR1 negli spermatogoni e spermatociti conferma la bassa espressione di CNR1 ottenuta mediante Western blot.

La localizzazione di CNR1 nelle cellule germinali conferma i risultati ottenuti nel topo (Gye *et al.*, 2005), mentre la sua assenza nel compartimento interstiziale potrebbe suggerire una differenza filogenetica tra le due specie.

Il profilo di espressione di FAAH rispecchia parzialmente quello di CNR1. L'immunoistochimica mostra chiaramente la presenza di FAAH negli spermatidi allungati e negli SPZ, sebbene una debole immunopositività è stata rilevata anche negli spermatociti. I nostri risultati, dunque, mostrano, per la prima volta, la presenza di FAAH in cellule germinali diverse dagli SPZ (Maccarrone *et al.* 2005). L'alta espressione di FAAH durante il periodo settembre-febbraio suggerisce, indirettamente, un basso livello di endocannabinoidi intratesticolari in questi mesi. Dal momento che nei topi la somministrazione cronica di cannabinoidi danneggia gli spermatidi in maturazione e gli SPZ, alterandone soprattutto la morfologia (Patra e Wadsworth 1990; Patra and Wadsworth 1991), l'aumento di FAAH nel periodo settembre-febbraio potrebbe diminuire i livelli testicolari di endocannabinoidi in modo da proteggere gli spermatidi in via di maturazione e gli SPZ. La dimostrazione che CNR1 e FAAH sono presenti a livello degli SPZ di rana, topo e ratto conferma recenti risultati ottenuti nel maiale (Maccarrone *et al.* 2005). Nella rana, poi, abbiamo dimostrato che il trattamento con AEA riduce la motilità degli SPZ. Tale effetto, oltre ad essere contrastato dall'antagonista selettivo di CNR1, SR141716A, è anche annullato dai lavaggi, dimostrando che l'AEA, attraverso CNR1, riduce la percentuale di SPZ motili, senza dar segni di tossicità o arrecare danni irreversibili e morte cellulare. Effetti tossici dell'AEA sono stati descritti negli SPZ umani a [10  $\mu$ M] (Rossato *et al.* 2005), mentre nei nostri trattamenti abbiamo utilizzato AEA [1  $\mu$ M].

Per rilevare l'esistenza degli endocannabinoidi nel fluido cloacale è stato utilizzato un metodo indiretto. I nostri risultati dimostrano che il trattamento con AM404 (un inibitore di FAAH) riduce la motilità degli SPZ, indicando così la presenza degli endocannabinoidi nel fluido della cloaca. Di conseguenza, gli endocannabinoidi, nel fluido cloacale, potrebbero ridurre la percentuale di SPZ motili fino alla loro diluizione nell'ambiente acquatico durante l'accoppiamento. La diluizione lineare del fluido della cloaca determina, infatti, un aumento del numero di SPZ motili, dimostrando che sostanze contenute nel liquido della cloaca possono controllare, in base alla loro concentrazione, la percentuale di SPZ motili. I trattamenti effettuati a varie dosi di SR141716A, l'antagonista selettivo di CNR1, evidenziano un aumento del numero di SPZ motili, confermando il controllo svolto dagli endocannabinoidi sulle cellule germinali attraverso l'attivazione di CNR1. L'origine degli

endocannabinoidi nel fluido cloacale non è nota, tuttavia gli SPZ suini sono capaci di sintetizzare AEA per regolare la propria funzionalità (Maccarrone *et al.* 2005).

In conclusione, i nostri risultati mostrano la presenza di CNR1 e FAAH nelle cellule germinali e negli SPZ isolati di *R. esculenta* e l'analisi comparativa per CNR1 e FAAH, su SPZ di rana, topo e ratto, estende tali risultati ad altri vertebrati. In particolare nella rana, il sistema degli endocannabinoidi sembra essere associato alla motilità degli SPZ.

I nostri dati, quindi, supportano il ruolo svolto dagli endocannabinoidi nel controllo della fertilità maschile, e, di conseguenza, lo studio sulle azioni degli endocannabinoidi potrebbe aprire nuove prospettive per lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici relativi al trattamento della sterilità maschile.

## **IL CONTROLLO DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLA MOTILITA' DEGLI SPERMATOZOI: IL RUOLO DELL'EPIDIDIMO.**

Gli endocannabinoidi sono i ligandi endogeni di recettori di membrana (CNR1 e CNR2), accoppiati a proteine G. Essi mimano alcuni degli effetti svolti dal  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC), il principio attivo della *Cannabis sativa*. L' N-arachidonoiletanolamide (anandamide [AEA]), è il principale endocannabinoide descritto finora nel testicolo e nel fluido seminale umano. Tuttavia il ruolo dell'AEA nella riproduzione maschile non è ancora ben noto. Noi abbiamo studiato il ruolo fisiologico degli endocannabinoidi nel tratto riproduttivo maschile, ed usando topi CD1 e Knock out per il recettore CNR1 (CNR1KO) abbiamo mostrato che gli endocannabinoidi, attraverso CNR1, agiscono nell'epididimo riducendo la percentuale di spermatozoi (SPZ) motili. In particolare, mentre nei topi CD1 (ceppo selvatico), la percentuale di SPZ motili (misurata nella testa e nella coda dell'epididimo) è significativamente più bassa nella testa rispetto alla coda, nei topi CNR1KO, invece, la percentuale di SPZ motili è alta già nella testa dell'epididimo.

*Ricci et al.*, General and Comparative Endocrinology 153: 320-322 (2007). DOI: 10.1016.

## V.1 Introduzione

Gli endocannabinoidi sono acidi grassi insaturi, capaci di legare i recettori dei cannabinoidi (CNR): CNR1 e CNR2 (Matsuda *et al.* 1990; Munro *et al.*, 1993), recettori di membrana accoppiati a proteine G. L'N-arachidonoiletanolamide (anandamide, AEA) è il primo endocannabinoide isolato dal cervello (Devane *et al.* 1992), e successivamente anche nel testicolo di topo (Wenger *et al.* 2001; Gye *et al.*, 2005) e nel fluido seminale umano (Schuel *et al.* 2002). Recentemente, altri endocannabinoidi sono stati isolati: il 2-Arachidonoiglicerolo (2-AG), il 2-Arachidonoilgliceroletere (2-AGE) e la virodamina (O-AEA) (Porter *et al.* 2002). I livelli di endocannabinoidi sono controllati da un trasportatore di membrana, caratterizzato finora solo farmacologicamente, AMT (Anandamide Membrane Transporter), e da enzimi idrolitici (Pagotto *et al.* 2006). Gli endocannabinoidi sono prodotti da precursori fosfolipidici di membrana in risposta ad agenti depolarizzanti, ormoni e neurotrasmettitori (Van der Stelt e Di Marzo 2005). L'AEA è idrolizzata da FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) (Cravatt e Lichtman 2003), mentre il principale enzima coinvolto nella degradazione del 2-AG è la MAGL (Monoacyl Glycerol Lipase) (Basavarajappa 2007). Gli endocannabinoidi e i loro recettori, insieme con l'AMT e gli enzimi di biosintesi e degradazione costituiscono il sistema endocannabinoide (Beltramo *et al.* 1997; Hillard *et al.* 1997; Di Marzo 1999). L'AEA, attraverso i CNR, mima alcuni degli effetti del  $\Delta^9$ -Tetraidrocannabinolo (THC), il principio attivo isolato dalla *Cannabis sativa* (Pertwee e Ross 2002). I CNR sono presenti in numerosi tessuti. Gli endocannabinoidi esercitano i loro effetti nel sistema nervoso centrale, ma anche nell'apparato riproduttivo maschile (Maccarrone *et al.* 2002; Brown e Dobs 2002). Nei maschi i cannabinoidi inibiscono la spermatogenesi, riducono il peso degli organi riproduttivi, la motilità e vitalità degli SPZ (Kolodny *et al.* 1974). Inoltre, gli endocannabinoidi regolano la produzione di testosterone delle cellule di Leydig *in vivo* ed *in vitro* (Dalterio *et al.*, 1983), causano impotenza nei ratti maschi (Murphy *et al.* 1994), e nell'uomo riducono la percentuale di SPZ motili attraverso l'attivazione di CNR1 (Rossato *et al.* 2005). Per approfondire il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella regolazione della motilità degli SPZ, abbiamo valutato le percentuali di SPZ motili nella testa e nella coda dell'epididimo da topi CD1 (ceppo selvatico) e knock out per CNR1 (CNR1KO).

## **V.2 Materiali e metodi**

### ***Animali e raccolta degli spermatozoi.***

I topi CD1 wild type (WT) e Knock out per CNR1 (CNR1KO) sono stati forniti dalla Charles River (Charles River Laboratories, Lecco, Italia) e stabulati in ambienti a temperatura costante, con un regime controllato di ore di luce (12L:12B), cibo ed acqua *ad libitum*.

Gli animali (n=5 CD1; n=5 CNR1KO) sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale con uretano, gli epididimi rimossi, tagliati in *caput* e *cauda* e posti in PBS. Per la raccolta degli SPZ, gli epididimi sono stati frammentati in PBS e successivamente filtrati. Gli SPZ recuperati sono stati sottoposti ad analisi di motilità e vitalità. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Ministero della Sanità.

### ***Valutazione della motilità e vitalità in SPZ da topi WT e CNR1KO.***

La vitalità è stata valutata con ioduro di propidio al citofluorimetro. La motilità è stata invece valutata al microscopio ottico usando l'emocitometro. I valori rappresentano la percentuale di SPZ motili su vivi.

### ***Presentazioni dei dati e statistiche***

I test "t" di Student ed ANOVA seguiti dal test di Duncan per il confronto tra gruppi multipli sono stati eseguiti per valutare la significatività delle differenze. I dati, provenienti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono stati espressi come la media  $\pm$  s.e.m.

### **V.3 Risultati**

La percentuale di SPZ motili/vivi è stata misurata nella testa (*caput*) e nella coda (*cauda*) dell'epididimo di topi WT e CNR1KO (Fig. 1). Come atteso, nei topi WT, la percentuale di SPZ motili è significativamente maggiore (  $P < 0.01$ ) nella coda ( $93\% \pm 5$ ) rispetto alla testa ( $18.5\% \pm 3$ ) dell'epididimo. Nei topi CNR1KO, invece, la percentuale di SPZ motili nella testa ( $51.8\% \pm 6$ ) è significativamente più alta ( $P < 0.01$ ) rispetto ai topi WT; mentre nella coda, gli SPZ mostrano una percentuale di motilità simile alla testa.



**Figura 1:** Numero di SPZ motili in caput e cauda dell'epididimo di topi WT e CNR1KO. I valori sono riportati come percentuale degli SPZ motili/vivi e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. a vs b  $p < 0.01$ ; b vs c  $p < 0.01$ ; a vs c  $p < 0.05$ .

#### **V.4 *Discussione***

Recenti studi mostrano che l'AEA riduce la motilità degli SPZ nell'uomo e che tale effetto è contrastato dall'antagonista specifico di CNR1, SR141716A (Rossato *et al.* 2005). Nell'anfibio anuro, *Rana esculenta*, abbiamo confermato gli effetti dell'AEA e dell'SR141716A sulla motilità degli SPZ, suggerendo che il ruolo degli endocannabinoidi sia conservato nella scala evolutiva. Inoltre nella rana, attraverso un'analisi indiretta, abbiamo valutato la presenza di endocannabinoidi nel fluido cloacale: la diluizione, infatti, del fluido cloacale incrementa significativamente la percentuale di SPZ motili, e lo stesso effetto è osservato dopo trattamento con SR141716A a dosi crescenti (Cobellis *et al.* 2006). Sulla base di tali risultati, abbiamo ipotizzato che anche l'epididimo possa regolare la motilità degli SPZ attraverso il sistema endocannabinoide.

Di conseguenza, abbiamo confrontato la percentuale di SPZ motili nella testa rispetto alla coda dell'epididimo. Nei mammiferi, dopo la spermiiazione, gli SPZ, durante il transito epididimale, acquisiscono la motilità (Cooper 1998). I nostri risultati, infatti, in topi WT confermano l'incremento di motilità degli SPZ dalla testa alla coda dell'epididimo. Nei topi CNR1KO, invece, l'incrementata percentuale di SPZ motili nella testa suggerisce che, in assenza di CNR1, gli SPZ acquisiscono precocemente la motilità.

In conclusione, i nostri risultati mostrano che il sistema endocannabinoide nell'epididimo regola la motilità degli SPZ: in particolare, l'assenza di CNR1 incrementa la motilità degli SPZ nella testa dell'epididimo.

## CONCLUSIONI

I nostri dati dimostrano che estrogeni ed endocannabinoidi agiscono sul tratto riproduttivo maschile e regolano la produzione ed il rilascio di SPZ maturi. In particolare, mostrano, nel testicolo di *R. esculenta*, la presenza di CNR1 e FAAH negli SPT durante la fase di allungamento e negli SPZ isolati di rana, ratto e topo, suggerendo il coinvolgimento del sistema endocannabinoide durante la spermiogenesi.

In *R. esculenta*, il rilascio di SPZ nell'ambiente acquatico è regolato dall'ipofisi. Noi confermiamo che l'ipofisi regola la spermiiazione e dimostriamo che gli estrogeni coadiuvano l'ipofisi in questa attività. Rispetto al gruppo degli animali trattati con PD, infatti, le rane trattate con PD + ICI mostrano una ridotta percentuale di tubuli spermiati rispetto al gruppo trattato con solo PD e un ridotto numero di SPZ in cloaca. Probabilmente l'effetto sulla spermiiazione è mediato dall'attività di Fra1 nelle PMC, in quanto: 1) durante il ciclo riproduttivo annuale Fra1 compare nelle PMC nel periodo in cui avviene la spermiiazione, 2) il trattamento con PD induce cambiamenti morfologici nel testicolo che confermano l'effetto di PD sulla spermiiazione e simultaneamente incrementa il numero di PMC immunopositive per Fra1, 3) anche il trattamento con E<sub>2</sub> incrementa il numero di PMC che esprimono Fra1, 4) l'ICI contrasta l'effetto di PD sia sulla spermiiazione sia sull'espressione di Fra1. Inoltre i nostri risultati dimostrano che in cloaca, mentre il numero degli SPZ è regolato dall'ipofisi, il numero di SPZ motili è regolato dalla concentrazione degli endocannabinoidi.

La diluizione lineare del fluido della cloaca ed il trattamento con SR141716A a dosi crescenti incrementa, infatti, la percentuale di SPZ motili, dimostrando che gli endocannabinoidi, *via* CNR1, controllano la percentuale di spermatozoi motili.

Poichè nei mammiferi gli SPZ acquisiscono progressivamente motilità durante il transito epididimale (Cooper 1998), abbiamo analizzato il numero di SPZ motili nella testa e nella coda dell'epididimo in topi CD1 e CNR1KO. Nei topi CD1, i nostri risultati confermano l'incremento di motilità degli SPZ dalla testa alla coda dell'epididimo. Nei topi CNR1KO, invece, l'aumentata percentuale di SPZ motili nella testa suggerisce che, in assenza di CB1, gli spermatozoi acquisiscono precocemente la motilità.

## **APPENDICE**

## **LA RAPIDA DESENSIBILIZZAZIONE DEL RECETTORE CNR1 MODULA L' ATTIVAZIONE DI ERK1/2.**

I meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo e mantenimento della tolleranza fisiologica ai cannabinoidi, finora noti, sono l'internalizzazione di CNR1 e il disaccoppiamento del recettore dalla trasduzione del segnale. Per determinare i contributi relativi di entrambi i processi nel signaling di CNR1 durante la stimolazione sostenuta del recettore, abbiamo valutato i parametri che influenzano l'attivazione di MAPK (ERK1/2) in cellule HEK293, che esprimono stabilmente il recettore CNR1. Il trattamento con un potente agonista di CNR1, CP55,940, attiva ERK1/2 in modo transiente. Inoltre per determinare se l'internalizzazione o la desensibilizzazione del recettore CNR1 influenzano l'attivazione transiente di ERK1/2, abbiamo valutato la fosforilazione di MAPK in cellule HEK293, che esprimono una forma mutata del recettore CNR1, incapace di desensibilizzare (S426/430A CNR1). In queste cellule l'attivazione di MAPK era significativamente prolungata rispetto alle cellule esprimenti la forma classica del recettore, e contrastata dal trattamento con SR141716A.

In conclusione, questo studio suggerisce che l'attivazione transiente di ERK1/2 sia dovuta alla desensibilizzazione piuttosto che all'internalizzazione del recettore CNR1.

## INTRODUZIONE

La maggior parte degli effetti dei cannabinoidi sul Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono mediati dal recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CNR1). Questo recettore inibisce i canali del calcio a dipendenza di voltaggio e l'adenilato ciclasi ed attiva i canali del potassio (Howlett *et al.* 2002; Mackie and Hille 1992; Mackie *et al.* 1995). Studi *in vitro* hanno dimostrato che i cannabinoidi attivano anche ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) appartenenti alla superfamiglia di MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Bouaboula *et al.* 1995). Il trattamento acuto con THC (il principio attivo della *Cannabis sativa*), infatti, incrementa l'attivazione di ERK1/2, mediata da CNR1, nello striato dorsale, nel nucleo *accumbens* e nell'ippocampo (Valjent *et al.*, 2001; Derkinderen *et al.*, 2003), mentre il trattamento cronico attiva, *in vivo*, ERK1/2 nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo (Rubino *et al.*, 2004).

La somministrazione cronica di cannabinoidi riduce la risposta effettrice (tolleranza), associata a cambiamenti nel numero e/o funzione del recettore CNR1 (Bass e Martin 2000; Breivogel *et al.*, 2003; Sim-Selley 2003; Fernandez-Ruiz *et al.*, 2005). Una spiegazione molecolare alla tolleranza è il distacco delle proteine G dal recettore associato (GPCR), o desensibilizzazione, causata dalla fosforilazione del recettore da parte delle GRK (G-protein Receptor Kinase), seguita dal legame della  $\beta$ -arrestina (Martin, Sim-Selley, e Selley 2004). L'interazione fisica della  $\beta$ -arrestina con il recettore fosforilato riduce l'affinità del GPCR con le proteine G effettrici attraverso un meccanismo di ingombro sterico.

Per il recettore CNR1, la tolleranza è spiegata mediante desensibilizzazione o downregolazione (internalizzazione o ridotta sintesi del recettore) (Luttrell e Lefkowitz 2002). Studi su ovociti di *Xenopus laevis* evidenziano che la desensibilizzazione di CNR1, dipendente da GRK3 e  $\beta$ -arrestina2, è mediata dalla fosforilazione di due residui serinici (S426, S430) all'estremità carbossi terminale del recettore (Jin *et al.* 1999). L'internalizzazione di CNR1 è un'endocitosi clatrina-dipendente, la cui regolazione non è ancora ben nota (Hsieh *et al.* 1999; Leterrier *et al.* 2004).

In questo studio abbiamo usato cellule HEK293 stabilmente transfettate con CNR1 per comprendere i contributi relativi della desensibilizzazione ed internalizzazione del recettore

CNR1 alla fosforilazione di ERK1/2. Noi concludiamo che la desensibilizzazione influenza soprattutto l'attivazione di ERK1/2.

## MATERIALI E METODI

### *Reagenti e farmaci*

CP55,940 ((-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol) e SR141716A (4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichloro-phenyl)-4-mety1-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide sono stati forniti dall'Istituto Nazionale delle droghe di abuso.

Concanavalina A è stata invece, fornita da Vector Laboratories (Burlingame, CA).

### *Generazione del costrutto mutante del recettore CNR1*

Il recettore CNR1 mutato (S426/430A) è stato realizzato usando il metodo Quick Change PCR (Stratagene, La Jolle, CA) per sostituire, mediante mutazioni puntiformi, le alanine ai residui serinici. Il recettore CNR1 di ratto, con l'aggiunta all' N-terminale dell'epitopo HA (emoagglutinina) (Auvinen *et al.* 2003) è stato introdotto in un vettore plasmidico (pcDNA3.0) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### *Colture cellulari e transfezioni*

Le cellule HEK293 sono state cresciute in DMEM, contenente il 10% FBS (Fetale Bovine Serum) e penicillina/streptomina (Gibco, Carlsbad, CA) a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. La transfezione è stata eseguita in piastre da 35mm di diametro con 2µg del plasmide appropriato e Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguendo le istruzioni della casa fornitrice. Le linee cellulari stabili sono state ottenute dopo selezione con Geneticina (G418; Invitrogen, Carlsbad, CA). Nelle colonie resistenti al G418, è stata valutata l'espressione di CNR1 mediante immunolocalizzazione con un anticorpo primario (Covance, Berkeley, CA), diretto verso l'estremità ammino terminale dell'epitopo HA, ed un anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). I cloni che esprimevano alti livelli di CNR1 sono stati selezionati ed utilizzati per i successivi esperimenti.

### *Saggio quantitativo di internalizzazione*

Le cellule HEK293, stabilmente transfettate con il recettore CNR1 di ratto, sono state cresciute in piastre rivestite di poli-D-lisina fino alla confluenza del 90% in DMEM contenente il 10% FBS e penicillina/streptomina (Gibco, Carlsbad, CA) a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Prima del trattamento farmacologico, le piastre sono state lavate in Buffer Salino Hepes (HBS: 130mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM MgCl<sub>2</sub> e 10mM Hepes, pH 7.5), contenente 1mg/ml di BSA(Albumina di Siero Bovino). Il trattamento farmacologico è stato eseguito a 37°C in HBS/BSA. Dopo gli specifici trattamenti, le piastre sono state poste in ghiaccio e fissate per 30 minuti in 4% PFA a temperatura ambiente. L'integrità delle membrane plasmatiche è stata valutata, dopo la fissazione, usando anticorpi diretti verso le estremità N- e C-terminale del recettore CNR1 (con e senza l'aggiunta di detergenti). La paraformaldeide non causa permeabilizzazione delle membrane (dati non mostrati). Dopo la fissazione, le cellule sono state lavate per 30 minuti PBS (137mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl, pH 7.4) (in assenza di detergenti per evitare la permeabilizzazione delle membrane) e bloccate per 90 minuti in Li-COR Odyssey Blocking Buffer<sup>®</sup> (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE) a temperatura ambiente con agitazione lenta. Dopo il bloccaggio, le cellule sono state incubate ON a 4°C con un anticorpo monoclonale anti HA (1:100; Covance, Berkeley, CA). Dopo 16 ore, le cellule sono state lavate per 30 minuti in Tris-Buffered Saline, contenente 0.05% Tween 20 (TBST: 137mM NaCl, 10mM Tris, 0.05% Tween20, pH 7.4). L'anticorpo primario è stato evidenziato con un IRDye800 coniugato ad IgG di topo (1:800; Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA). Successivamente le piastre sono state lavate, asciugate e gli immunocomplessi quantificati usando il sistema Odyssey (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

### ***Saggio quantitativo della fosforilazione di ERK1/2.***

Le cellule HEK293, stabilmente transfettate con il recettore CNR1 di ratto, sono state cresciute in piastre rivestite di poli-D-lisina fino alla confluenza del 90% in DMEM contenente il 10% FBS e penicillina/streptomina (Gibco, Carlsbad, CA) a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Prima del trattamento farmacologico, le cellule sono state incubate ON in DMEM, contenente solo penicillina/streptomina. Agonisti ed antagonisti sono stati diluiti in DMSO/ HBS-BSA (1mg/ml), in modo che la concentrazione di DMSO nell'incubazione

finale non superasse lo 0.1%. I reagenti sono stati posti a 37°C e le cellule incubate in HBS-BSA per 7 minuti prima del saggio. Dopo i trattamenti, le cellule sono state fissate con 4% paraformaldeide in ghiaccio per 5 minuti e a temperatura ambiente per altri 45 minuti. Le cellule sono state permeabilizzate con 100% metanolo per almeno 20 minuti a -20°C.

Dopo aver rimosso il metanolo, le cellule sono state bloccate in TBS-BSA (5mg/ml) a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo il bloccaggio, le cellule sono state incubate ON a 4°C con un anticorpo policlonale anti pERK1/2, diluito 1:200 in TBS-BSA (Cell Signaling Technologies Inc., Danvers, MA). Dopo 16 ore, le cellule sono state lavate per 1.5 ore in TBS-0.05% Tween 20. L'anticorpo primario è stato evidenziato con un IRDye800 coniugato ad IgG di coniglio (1:800; Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA). Successivamente le piastre sono state lavate, asciugate e gli immunocomplessi quantificati usando il sistema Odyssey (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

### ***Immunocitochimica***

Le cellule HEK293, stabilmente transfettate con il recettore CNR1 di ratto e la sua forma mutata S426/430A, sono state cresciute in piastre rivestite di poli-D-lisina fino alla confluenza del 90% in DMEM contenente il 10% FBS e penicillina/streptomicina (Gibco, Carlsbad, CA) a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Dopo specifici trattamenti in HBS/BSA (0.2mg/ml) a 37°C, le cellule sono state fissate per 20 minuti in 4% PFA, lavate per due volte in PB (10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl, pH 7.4) e per tre volte in PBS (PBS; PB con 150mM NaCl). Le cellule sono state bloccate per 1ora in PBS contenente 5% Siero di asino e 0.1% Saponina (per permeabilizzare le membrane cellulari) a temperatura ambiente. Dopo il bloccaggio, le cellule sono state incubate ON at 4°C con un anticorpo monoclonale di topo anti-HA (1:1000; Covance, Berkley, CA). Dopo 5 lavaggi in PBS, gli immunocomplessi sono stati evidenziati con un anticorpo secondario di topo coniugato con FITC (1:150; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate per due volte in PBS, una volta in PB, una volta in acqua, seccate all'aria, e montate con una goccia di Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Per l'analisi di immunistoichimica per ERK1/2, le cellule HEK293 sono state trattate fino alla fissazione nello stesso modo. Poi, le cellule sono state permeabilizzate con metanolo assoluto per 30 minuti a -20°C ed incubate ON a 4°C con un anticorpo policlonale di coniglio anti ERK1/2 (1:500 in TBS/BSA 5mg/ml) (Cell Signaling Technologies Inc., Danvers, MA). Per evidenziare gli immunocomplessi, è stato utilizzato un anticorpo secondario anti IgG di coniglio, coniugato con FITC (1:150; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA).

Le immagini delle cellule (1024x1024 pixels), acquisite al microscopio confocale (Leica SP1/MP), sono state ottenute con obiettivo ad immersione 100x.

### *Analisi statistiche*

Negli studi di internalizzazione, la percentuale dei recettori rimasti sulla membrana cellulare è stata determinata calcolando la media integrata dell'intensità dei segnali fluorescenti per ciascun trattamento farmacologico. I valori finali sono stati normalizzati sulla base delle intensità fluorescenti dei controlli e sono espressi come la media  $\pm$  SEM. Le curve di internalizzazione sono regressioni di tipo non lineare, da cui sono stati ricavati i valori di  $t_{1/2}$ . Nei saggi di attivazione di ERK1/2, la percentuale di risposta massima è stata calcolata definendo come basale il valore al tempo zero e settando il picco massimo al 100%. Le differenze statistiche, riguardanti la quota di internalizzazione e l'attivazione di ERK1/2, sono state determinate con il test  $t$  di Student.

Tutti i grafici e le analisi statistiche sono state ottenute usando il programma GraphPad Prism (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

## RISULTATI

### *La mutazione delle serine 426 e 430 del recettore CNR1 prolunga l'attivazione di ERK1/2.*

Per testare l'ipotesi che i probabili siti di fosforilazione delle GRK (serine 426 e 430) (Jin *et al.* 1999) nella regione carbossi terminale del recettore CNR1 influenzano l'inattivazione di ERK1/2, sono state analizzate le cinetiche di fosforilazione di ERK1/2 in cellule HEK293, che esprimono stabilmente la forma wild type (CNR1WT) o quella mutata (CNR1 S426/430A) del recettore CNR1. La curva dose-risposta per CP55,940 mostra un  $EC_{50}$  pari a  $0.97 \pm 0.06$  nM per l'attivazione di ERK1/2 a 7 minuti di stimolazione (Fig. 1). La stimolazione con [100nM] CP55,940 (la massima concentrazione efficace) del recettore CNR1 induce una fosforilazione transiente di ERK1/2 con un picco di attivazione a 5 minuti che rapidamente diminuisce ai valori basali. I recettori CNR1WT e CNR1 S426/430A presentano un picco di attivazione delle MAPK simile, tuttavia il recettore CNR1 S426/430A mostra una fosforilazione di ERK1/2 prolungata nel tempo rispetto al recettore CNR1WT (Fig. 2A). Questa prolungata attivazione di ERK1/2 è stata osservata in 8 diverse popolazioni monoclonali che esprimevano il recettore S426/430A e non è dovuta ad un incremento dell'attività costitutiva del recettore modificato, dal momento che si osserva solo in presenza di ligando. Poichè i residui serinici sono importanti per la desensibilizzazione indotta da ligando (desensibilizzazione omologa) mediata da GRK (Jin *et al.* 1999), questi risultati suggeriscono che la desensibilizzazione omologa del recettore CNR1 modula la rapida diminuzione della fosforilazione di ERK1/2.

L'analisi di immunocitochimica conferma la prolungata fosforilazione di ERK nelle cellule CNR1 S426/430A (Fig. 2B). Infine, per valutare se l'attivazione di ERK1/2 è dipendente da CNR1, le cellule CNR1WT e CNR1 S426/430A sono state pretrattate con [1 $\mu$ M] SR141716A (antagonista di CNR1) e successivamente stimulate con CP55,940. Il trattamento con SR141716A impedisce la fosforilazione di ERK1/2, indicando che tale attivazione è dipendente da CNR1 (Fig. 2B).



**Figura 1:** Curva dose-risposta con CP55,940. Cellule HEK293, stabilmente transfettate con il recettore CNR1WT sono state incubate con diverse concentrazioni di CP55,940 ed analizzate per la fosforilazione di ERK1/2.



**Figura 2A:** Analisi quantitativa dell'attivazione di ERK1/2. Le cellule transfettate con CNR1WT e CNR1S426/430A sono state trattate con [100nM] CP55,940 per i tempi indicati. I dati sono espressi come la media  $\pm$  SEM e sono rappresentativi di 5 esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato. a vs b  $p < 0.01$ .



**Figura 2B:** Analisi di immunocitochimica per ERK1/2 in cellule transfettate con CNR1WT e CNR1 S426/430A. Le cellule sono state trattate con DMSO (a, b), [100nM] CP55,940 (c-f) o con [100nM] CP55,940 ed [1µM] SR141716A (g, h). Scale bar: 10 µm.

***L'internalizzazione del recettore CNR1 non è necessaria per l'attivazione di ERK1/2.***

L'internalizzazione dei GPCR, indotta dall'agonista, è un fenomeno ampiamente osservato ed induce tolleranza. Studi *in vivo* ed *in vitro* dimostrano che il recettore CNR1 è internalizzato in seguito a trattamento con agonisti (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1999). Noi dimostriamo che entro 15 minuti di stimolazione con [100nM] CP55,940 (dose necessaria per indurre l'internalizzazione di CNR1), i recettori WT e mutato mostrano una stessa curva di internalizzazione ( $78 \pm 0.6\%$  vs  $78 \pm 2\%$  di recettori sulla membrana plasmatica, rispettivamente) (Fig. 3A). Dopo 15 minuti di trattamento con un agonista, la quota di internalizzazione del recettore mutato rispetto al recettore WT riduceva significativamente. Studi relativamente recenti suggeriscono l'ipotesi che l'internalizzazione sia necessaria per l'attivazione di ERK1/2 (Daaka *et al.* 1998).

Per verificare tale ipotesi, abbiamo valutato il time course dell'attivazione di MAPK bloccando l'internalizzazione, mediante trattamento con Concanavalina A (ConA; 100 $\mu$ g/ml) (molecola che impedisce l'endocitosi clatrina dipendente) (Arttamangkul *et al.* 2006). L'incubazione con ConA (Fig. 3B) inibisce l'internalizzazione del recettore trasfettato dopo stimolazione prolungata con CP55,940 (Fig. 3Ba, b). In assenza di ConA, invece, il trattamento con CP55,940 induce internalizzazione del recettore (Fig. 3Bc). Il blocco dell'endocitosi (Fig. 3C) non altera il time course della fosforilazione di ERK1/2, in presenza di [100nM] CP55,940, nelle cellule che esprimevano il recettore WT o quello mutato.



**Figura 3A:** Internalizzazione di CNR1 WT e mutato. Le cellule sono state trattate con CP55,940 per i tempi indicati a 37°C. I dati sono espressi come la media  $\pm$  sem e sono rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.01$ .



**Figura 3B:** Immunolocalizzazione del recettore CNR1 dopo trattamento con ConA. Le cellule, preincubate in HBS contenente 100µg/ml ConA (a, b) o HBS da solo(c) per 30 minuti, sono state successivamente trattate con [100nM] CP55,940 per i tempi indicati. Scale bar, 10µm.



**Figura 3C:** Time course dell'attivazione di ERK1/2 in cellule trasfettate e stimulate con CP55,940 con e senza ConA.

Le cellule, che esprimevano CNR1 WT o mutato, preincubate con HBS da solo o con 100µg/ml ConA per 30 minuti, sono state successivamente stimulate con 100nM CP55,940. I dati sono espressi come la media  $\pm$  sem e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. \*p<0.01.

## DISCUSSIONE

La principale novità di questo studio è che la desensibilizzazione del recettore CNR1 regola le cinetiche di fosforilazione di ERK1/2, indotte dal trattamento con agonista. Usando le cellule HEK293, stabilmente transfettate con la forma modificata (S426/430A) del recettore CNR1, abbiamo mostrato che la sostituzione dei residui serinici in posizione 426 e 430 con alanine sostiene la cinetica di attivazione di ERK1/2 in presenza di agonista. La prolungata fosforilazione di ERK1/2 dipende dall'azione dell'agonista sul recettore CNR1 S426/430A e dal recettore stesso, come confermato dal trattamento con SR141716A.

Inoltre i nostri risultati mostrano che l'internalizzazione del recettore CNR1 non interviene nell'attivazione di ERK1/2: l'internalizzazione mediata da ligando, infatti, se inibita farmacologicamente, non influenza la cinetica di fosforilazione di ERK1/2.

In conclusione noi suggeriamo che la rapida inattivazione di ERK1/2 durante la stimolazione con agonista del recettore CNR1 è mediata dalle GRK, che fosforilano le serine 426 e 430, portando alla desensibilizzazione di CNR1, senza che vi sia internalizzazione.

## BIBLIOGRAFIA

Angel, P. and Karin, M. (1991a) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim.Biophys.Acta*, **1072**, 129-157.

Arttamangkul S, Torrecilla M, Kobayashi K, Okano H, Williams JT (2006) Separation of mu-opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures. *J. Neurosci.*, **26**: 4118-4125.

Auvinen M, Jarvinen K, Hotti A, Okkeri J, Laitinen J, Janne OA, Coffino P, Bergman M, Andersson LC, Alitalo K, Holtta E (2003) Transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by c-Myc/Max/Mad network and retinoblastoma protein interacting with c-Myc. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**: 496-521.

Basavarajappa BS (2007) Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept. Lett.*, **14**: 237-246.

Bass CE, Martin BR (2000) Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug Alcohol Depend.*, **60**: 113-119.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, **277**: 1094-1097.

Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., (1995) Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol.Cell Biol.*, **15**, 3748-3758.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le FG, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CNR1. *Biochem. J.*, **312 ( Pt 2)**: 637-641.

Breivogel CS, Scates SM, Beletskaya IO, Lowery OB, Aceto MD, Martin BR (2003) The effects of delta9-tetrahydrocannabinol physical dependence on brain cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **459**: 139-150.

Brown TT, Dobs AS (2002) Endocrine effects of marijuana. *J. Clin. Pharmacol.*, **42**: 90S-96S.

Chang MC, Berkery D, Schuel R, Laychock SG, Zimmerman AM, Zimmerman S, Schuel H (1993) Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, **36**: 507-516.

Chieffi, P., Angelini, F., and Pierantoni, R. (1997) Proto-oncogene activity in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*, during the annual reproductive cycle. *Gen.Comp Endocrinol.*, **108**, 173-181.

Cobellis G, Cacciola G, Scarpa D, Meccariello R, Chianese R, Franzoni MF, Mackie K, Pierantoni R, Fasano S (2006) Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. *Biol. Reprod.*, **75**: 82-89.

Cobellis G, Lombardi M, Scarpa D, Izzo G, Fienga G, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S (2005) Fra-1 activity in the frog, *Rana esculenta*, testis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1040**: 264-268.

Cobellis G, Lombardi M, Scarpa D, Izzo G, Fienga G, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S (2005b) Fra1 activity in the frog, *Rana esculenta*, testis: a new potential role in sperm transport. *Biol. Reprod.*, **72**: 1101-1108.

Cobellis G, Meccariello R, Fienga G, Pierantoni R, Fasano S (2002) Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology*, **143**: 163-170.

Cobellis G, Meccariello R, Minucci S, Palmiero C, Pierantoni R, Fasano S (2003) Cytoplasmic versus nuclear localization of Fos-related proteins in the frog, *Rana esculenta*, testis: in vivo and direct in vitro effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, **68**: 954-960.

Cobellis G, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S (2003) Intratesticular signals for progression of germ cell stages in vertebrates. *Gen. Comp Endocrinol.*, **134**: 220-228.

Cobellis G, Pierantoni R, Minucci S, Pernas-Alonso R, Meccariello R, Fasano S (1999) c-fos activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. *Endocrinology*, **140**: 3238-3244.

Cohen, D. R., Ferreira, P. C., Gentz, R. (1989) The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.*, **3**, 173-184.

Cohen, D. R., Vandermark, S. E., McGovern, J. D. (1993) Transcriptional regulation in the testis: a role for transcription factor AP-1 complexes at various stages of spermatogenesis. *Oncogene*, **8**, 443-455.

Cooper TG (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **53**: 119-136.

Cravatt BF, Lichtman AH (2003) Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**: 469-475.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, la Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**: 685-688.

- Dalterio SL, Bartke A, Mayfield D (1983) Cannabinoids stimulate and inhibit testosterone production in vitro and in vivo. *Life Sci.*, **32**: 605-612.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.*, **23**: 2371-2382.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**: 1946-1949.
- Di Marzo V. (1999) Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci.*, **65**: 645-655.
- Dixit VP, Sharma VN, Lohiya NK (1974) The effect of chronically administered cannabis extract on the testicular function of mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **26**: 111-114.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, **137**: 4796-4805.
- Ellis LC, Groesbeck MD, Farr CH, Tesi RJ (1981) Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male. *Arch. Androl*, **6**: 283-294.
- Farzaneh-Far, A., Davies, J. D., Braam, L. A., (2001) A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J.Biol.Chem.*, **276**, 32466-32473.
- Fernandez-Ruiz J, Gonzales S (2005) Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 479-507.
- Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C. (2000b) Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev.*, **14**, 2695-2700.
- Galdieri M, Ricci G (1998) Characterization of different cell populations isolated from rat testis peritubular cells. *Differentiation*, **63**: 13-19.
- Gruda, M. C., Kovary, K., Metz, R. (1994) Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene*, **9**, 2537-2547.
- Gye MC, Kang HH, Kang HJ (2005) Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Arch. Androl*, **51**: 247-255.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, Mackie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur. J. Neurosci.*, **12**: 3239-3249.

- Hargrove JL, MacIndoe JH, Ellis LC (1977) Testicular contractile cells and sperm transport. *Fertil. Steril.*, **28**: 1146-1157.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB (1997) A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, **390**: 509-512.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.*, **69**: 631-638.
- Hillard CJ, Jarrahan A (2003) Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br. J. Pharmacol.*, **140**: 802-808.
- Hong CY, Chaput de Saintonge DM, Turner P, Fairbairn JW (1982) Comparison of the inhibitory action of delta-9-tetrahydrocannabinol and petroleum spirit extract of herbal cannabis on human sperm motility. *Hum. Toxicol.*, **1**: 151-154.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*, **54**: 161-202.
- Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K (1999) Internalization and recycling of the CNR1 cannabinoid receptor. *J. Neurochem.*, **73**: 493-501.
- Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Koo A, Chavkin C, Mackie K (1999) Distinct domains of the CNR1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J. Neurosci.*, **19**: 3773-3780.
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**: 240-246.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483-16486.
- Karin, M. and Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.*, **5**, 747-757.
- Kierszenbaum, A. L. (1994) Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr. Rev.*, **15**, 116-134.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G (1974) Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N. Engl. J. Med.*, **290**: 872-874.
- Kovary, K. and Bravo, R. (1992) Existence of different Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 5015-5023.

Leppa, S. and Bohmann, D. (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 6158-6162.

Leterrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z (2004) Constitutive endocytic cycle of the CNR1 cannabinoid receptor. *J. Biol. Chem.*, **279**: 36013-36021.

Lowry OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.*, **115**: 455-465.

Lutz B (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**: 123-142.

Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M (2005) Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Cell Sci.*, **118**: 4393-4404.

Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agro A (2003) Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology*, **144**: 20-28.

Maccarrone M, Falciglia K, Di RM, Finazzi-Agro A (2002) Endocannabinoids, hormone-cytokine networks and human fertility. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**: 309-317.

Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**: 3825-3829.

Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.*, **15**: 6552-6561.

Maekawa M, Kamimura K, Nagano T (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch. Histol. Cytol.*, **59**: 1-13.

Martin BR, Sim-Selley LJ, Selley DE (2004) Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**: 325-330.

Matias I, McPartland JM, Di M, V (2005) Occurrence and possible biological role of the endocannabinoid system in the sea squirt *Ciona intestinalis*. *J. Neurochem.*, **93**: 1141-1156.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**: 561-564.

- Meccariello R, Chianese R, Cacciola G, Cobellis G, Pierantoni R, Fasano S (2006) Type-1 cannabinoid receptor expression in the frog, *Rana esculenta*, tissues: a possible involvement in the regulation of testicular activity. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**: 551-558.
- Mechoulam R, Hanus L (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids*, **108**: 1-13.
- Minucci S, Di ML, Chieffi BG, Pierantoni R (1989) A gonadotropin releasing hormone analog induces spermiation in intact and hypophysectomized frogs, *Rana esculenta*. *Experientia*, **45**: 1118-1121.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**: 61-65.
- Murphy LL, Gher J, Steger RW, Bartke A (1994) Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**: 1011-1017.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, **22**: 289-318.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.*, **27**: 73-100.
- Patra PB, Wadsworth RM (1990) Effect of the synthetic cannabinoid nabilone on spermatogenesis in mice. *Experientia*, **46**: 852-854.
- Patra PB, Wadsworth RM (1991) Quantitative evaluation of spermatogenesis in mice following chronic exposure to cannabinoids. *Andrologia*, **23**: 151-156.
- Pertwee RG, Ross RA (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**: 101-121.
- Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Palmiero C, Fienga G, Minucci S, Fasano S (2002) The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, **132**: 131-139.
- Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R. (2002) Evolutionary aspects of cellular communication in the vertebrate hypothalamo-hypophysio-gonadal axis. *Int.Rev.Cytol.*, **218**, 69-141.
- Polzonetti-Magni AM, Mosconi G, Carnevali O, Yamamoto K, Hanaoka Y, Kikuyama S (1998) Gonadotropins and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta*. *Biol. Reprod.*, **58**: 88-93.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid,

- virodhamine, with antagonist activity at the CNR1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**: 1020-1024.
- Rastogi RK, Chieffi G (1972) Hypothalamic control of the hypophyseal gonadotropic function in the adult male green frog, *Rana esculenta* L. *J. Exp. Zool.*, **181**: 263-270.
- Reich R, Laufer N, Lewysohn O, Cordova T, Ayalon D, Tsafiriri A (1982) In vitro effects of cannabinoids on follicular function in the rat. *Biol. Reprod.*, **27**: 223-231.
- Rinaldi-Carmona M, Le DA, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le FG (1998) Modulation of CNR1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**: 1038-1047.
- Robertson KM, Simpson ER, Lacham-Kaplan O, Jones ME (2001) Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J. Androl.*, **22**: 825-830.
- Rossato M, Ion PF, Ferigo M, Clari G, Foresta C (2005) Human sperm express cannabinoid receptor CNR1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**: 984-991.
- Roux, P., Blanchard, J. M., Fernandez, A.(1990) Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell*, **63**, 341-351.
- Rubino T, Forlani G, Vigano D, Zippel R, Parolaro D (2004) Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol. Cell Neurosci.*, **25**: 355-362.
- Rusovici, R. and LaVoie, H. A. (2003) Expression and distribution of AP-1 transcription factors in the porcine ovary. *Biol.Reprod.*, **69**, 64-74.
- Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjogren S, Greasley PJ (2005) Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CNR1 receptor. *FEBS Lett.*, **579**: 259-264.
- Salio C, Cottone E, Conrath M, Franzoni MF (2002) CNR1 cannabinoid receptors in amphibian spinal cord: relationships with some nociception markers. *J. Chem. Neuroanat.*, **24**: 153-162.
- Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK (1997) Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 4188-4192.
- Schreiber, M., Wang, Z. Q., Jochum, W. (2000) Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development*, **127**, 4937-4948.
- Schuel H, Burkman LJ (2005) A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol. Reprod.*, **73**: 1078-1086.

- Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A (2002) N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem. Phys. Lipids*, **121**: 211-227.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le FG, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **270**: 3726-3731.
- Sim-Selley LJ (2003) Regulation of cannabinoid CNR1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev. Neurobiol.*, **15**: 91-119.
- Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L (2003) Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**: 40.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K (1996) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**: 113-117.
- Tripiciano A, Filippini A, Giustiniani Q, Palombi F (1996) Direct visualization of rat peritubular myoid cell contraction in response to endothelin. *Biol. Reprod.*, **55**: 25-31.
- Tripiciano A, Peluso C, Morena AR, Palombi F, Stefanini M, Ziparo E, Yanagisawa M, Filippini A (1999) Cyclic expression of endothelin-converting enzyme-1 mediates the functional regulation of seminiferous tubule contraction. *J. Cell Biol.*, **145**: 1027-1038.
- Tung PS, Fritz IB (1990) Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: alpha-smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biol. Reprod.*, **42**: 351-365.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **78**: 43-50.
- Valjent E, Caboche J, Vanhoutte P (2001) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol. Neurobiol.*, **23**: 83-99.
- Vallone, D., Battista, S., Pierantoni, G. M. (1997) Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *EMBO J.*, **16**, 5310-5321.
- Van der Stelt M., Di Marzo V. (2005) Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **77**: 111-122.
- Xavier, F., Lagarrigue, S., Guillomot, M. (1997) Expression of c-fos and jun protooncogenes in ovine trophoblasts in relation to interferon-tau expression and early implantation process. *Mol.Reprod.Dev.*, **46**, 127-137.

Wenger T, Ledent C, Csernus V, Gerendai I (2001) The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**: 363-368.

Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE (2006) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertil. Steril.*, **85**: 653-660.

Zimmerman AM, Bruce WR, Zimmerman S (1979) Effects of cannabinoids on sperm morphology. *Pharmacology*, **18**: 143-148.