

**Curriculum dell'attività didattica, scientifica ed organizzativa svolta
dalla Prof.Silvia Fasano, Professore Ordinario di Biologia Applicata
(S.S.D. BIO/13).**

DATI PERSONALI

Cognome FASANO

Nome SILVIA

*Data di
nascita* 30 NOVEMBRE 1953

Cittadinanza ITALIANA

Domicilio: Via Vincenzo Arangio Ruiz 69
80122 NAPOLI

Afferenza: Dipartimento di MEDICINA SPERIMENTALE
Via Costantinopoli 16
80138 Napoli
telefono 081 5665837
telefax: 081 5667536/7500
e-mail silvia.fasano@unicampania.it

La Prof. Silvia Fasano è nata a Napoli il 30/11/53. Si è iscritta nell'aa.1972-73 al Corso di Laurea in Scienze Biologiche dell'Università degli Studi di Napoli.

Il 28/10/76 si è laureata con lode (relatore il Prof. Giovanni Chieffi).

Dal novembre 1976 al dicembre 1978 ha frequentato, come laureato interno, l'Istituto di Anatomia Chirurgica e Corso di Operazioni del II Policlinico di Napoli diretto dal Prof. Giuseppe Califano.

Nell'aa.1978-79 si è iscritta al Corso di Specializzazione in "Tecnologie Biomediche" presso l'Istituto di Fisiologia della II Facoltà di Medicina di Napoli conseguendo, il 22/7/81, il Diploma con il massimo dei voti (50/50).

Nel periodo 1979-1984 ha frequentato i laboratori dell'Istituto di Zoologia, Facoltà di Scienze, interessandosi alle tematiche dell'Endocrinologia Comparata, in qualità di laureato interno, fino al 1982 anno in cui ha cominciato ad usufruire di un assegno di formazione professionale del CNR.

Ha fatto parte del PF del CNR "Controllo della crescita neoplastica" sottoprogetto "Controllo endocrino" diretto dal Prof. Giovanni Delrio. L'interesse era centrato sui recettori per gli ormoni steroidi e proteici dosati su tessuto neoplastico nonché sul dosaggio di ormoni steroidi e proteici su campioni di plasma di donne portatrici di carcinoma mammario operabile.

Nel periodo 1984-1986 ha lavorato nell'ambito del PF del CNR "Ingegneria Genetica e Basi Molecolari delle Malattie Ereditarie" Unità Operativa diretta dal Prof. Francesco Salvatore, occupandosi del clonaggio di sequenze geniche stimulate da un promotore di tumore.

Nel periodo 1986-1990 ha lavorato nell'ambito del PF "Oncologia" Unità Operativa diretta dal Prof. Ferdinando Auricchio, presso l'Istituto di Biologia della I Facoltà di Medicina, nel gruppo diretto dal Prof. Giovanni Chieffi. L'interesse era concentrato sui meccanismi di controllo locale della steroidogenesi e della spermatogenesi che sono stati studiati in modelli sperimentali diversi (anfibi e pesci, Teleostei ed Elasmobranchi).

Nel 1987 ha lavorato presso il Dipartimento di "Experimental Zoology" dell'Università di Utrecht nell'ambito del Progetto Bilaterale Italia-Olanda, finanziato dal CNR, sul "Ruolo del GnRH nella fisiologia della riproduzione nei vertebrati: controllo locale dell'attività gonadica". Nei laboratori olandesi si è occupata principalmente della messa a punto del dosaggio del GnRH e dei suoi recettori.

Dal 1992 al 1994 ha lavorato all'Università di Rennes I (Francia) nell'ambito del Progetto Bilaterale Italia-Francia presso il GERM (Group d'étude de la reproduction chez le male) diretto dal Prof. Bernard Jégou occupandosi dell'espressione di alcuni proto-oncogeni nel testicolo di *Scyliorhinus canicula*.

Dal 1990 al 1998 è stata Funzionario Tecnico presso il Dipartimento di Fisiologia Umana e Funzioni Biologiche Integrate "F. Bottazzi" della II Università di Napoli, Facoltà di Medicina e Chirurgia.

E' stata cultore della materia a partire dall'anno accademico 1990-91.

Nel 1998 è stata dichiarata vincitrice del concorso a Professore Universitario di ruolo di seconda fascia per il raggruppamento disciplinare E13X (BIO/13 attuale) "Biologia Applicata agli Studi Medici", indetto con D.D.M.M. 22/12/95 e 29/2/96.

Dal 30/10/1998 fino al 01/10/06 ha prestato servizio come Professore Associato presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia della II Università di Napoli.

E' risultata idonea nella procedura di valutazione comparativa per la copertura di un posto di professore di I fascia ssd BIO/13 (Biologia Applicata) presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia bandito dalla Seconda Università di Napoli (DR n.2185 del 17/07/06). Dal 01/11/06 al 01/11/09 ha prestato servizio come Professore Straordinario presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia della II Università di Napoli. Dal 01/11/09 presta servizio come Professore Ordinario presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia della II Università di Napoli.

ATTIVITA' DIDATTICA

Nell'anno accademico 1998/99 la Prof. Silvia Fasano ha tenuto il corso di Biologia e Genetica presso il polo di Napoli della Facoltà di Medicina e Chirurgia (SUN).

Dall'aa. 1999/00 a tutt'oggi è coordinatore del corso di Biologia e Genetica presso il polo di Caserta della Facoltà di Medicina e Chirurgia (SUN).

Dall'aa 1998/99 all'aa 2000/01 ha ricoperto l'incarico di insegnamento di Biologia Generale presso la Facoltà di Psicologia della II Università di Napoli.

Ha ricoperto l'incarico di insegnamento di Biologia Generale nelle Lauree Triennali per le professioni Sanitarie di Infermiere, Infermiere Pediatrico e Ostetrica del Polo di Napoli (dall'aa. 2000/01 a 2003/04) e nelle due sedi distaccate Ospedale Civile di Caserta (dall'aa. 2002/03 a tutt'oggi) e ASL CE2 (dall'aa. 2003/04 a tutt'oggi).

Dall'aa. 2000/01 ricopre l'incarico di insegnamento di Biologia presso la Scuola di Specializzazione in Nefrologia.

DOTTORATO DI RICERCA

E' stata componente del Collegio dei docenti per il dottorato di ricerca in Endocrinologia Comparata (Sede Amministrativa Padova) dall'aa 2000/01 fino all'aa 2003/04.

Dall'anno 2005 è componente del Collegio dei docenti del Dottorato di Ricerca "Patologia della trasduzione del segnale cellulare" (Sede Amministrativa SUN)

ASSEGNO DI RICERCA

Dal 1998 al 2001 è stata titolare di un assegno di ricerca cofinanziato dal F.S.E. per la Regione Campania sul P.O. "Ricerca, Sviluppo Tecnologico ed Alta Formazione".

FINANZIAMENTI

Progetto di ricerca di ateneo - Il Università Napoli (2001) (Coordinatore) € 10930.52
Progetto di ricerca di ateneo - Il Università Napoli (2002) (Coordinatore) € 9181.00
Progetto di ricerca di ateneo - Il Università Napoli (2003) (Coordinatore) € 9600.00
Progetto di ricerca di ateneo - Il Università Napoli (2004) (Coordinatore) € 7978.68
Ricerca finanziata dall'Agenzia Spaziale Italiana (2003) (Coordinatore UO) € 14759.53
PRIN 2004-2006 – Coordinatore Nazionale € 40000.00

COLLABORAZIONI

-Prof. Alberta Polzonetti-Magni – Università di Camerino
-Prof. Fiorella Altruda- Università di Torino
-Dr. Marie-Pierre Junier- College de France, Parigi
-Prof. Giovanna Berruti- Università Bicocca di Milano
-Prof. Antimo Migliaccio- Il Università di Napoli
-Prof. Mauro Vallarino- Università di Genova
-Prof. Henk Goos – Utrecht University
-Prof. Bernard Jegou – Université Rennes I
-Prof. Fosca Franzoni – Università di Torino
-Prof. Ken Mackie – Washington University
Inviti a Congressi

-11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Saint Malo, France, 2000 (invitata come chairman).

-14th International Congress of Comparative Endocrinology, Sorrento, Italia, 2001 (invitata come speaker)

-Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, Camerino, Italia, 2001 (invitata come chairman)

-21th Conference of European Comparative Endocrinologists, Bonn, Germania, 2002 (invitata come speaker per una state-of-art lecture)

-24th Conference of European Comparative Endocrinologists, Genova, Italy, 2008 (invitata come speaker per una state-of-art lecture)

ATTIVITA' DI REFEREE

-referee per le riviste: General Comparative Endocrinology, Reproductive Biology and Endocrinology, Molecular and Cellular Endocrinology

-iscritta nell'albo degli Esperti (peer reviewers) utilizzati per la valutazione dei programmi

di ricerca di interesse nazionale (MIUR).

-iscritta nell'albo degli esperti del Comitato di Indirizzo per la Valutazione della Ricerca CIVR.

- Dal 2005 è componente del Consiglio Scientifico nell'ambito del "Programme de Recherche National sur les Perturbateurs Endocriniens" del Ministero francese de "l'Ecologie et du Development Durable".

- E' componente di società scientifiche nazionali (AIGB) ed internazionali (ESCE).

- Componente dal 2006 del Consiglio della Società Europea di Endocrinologia Comparata (ESCE)

ATTIVITÀ SCIENTIFICA

L'attività scientifica è documentata da numerose pubblicazioni su riviste e libri a diffusione internazionale.

Le tematiche affrontate sono riassunte nei seguenti punti:

-QUADRO ENDOCRINO E REGOLAZIONE DEI CICLI RIPRODUTTIVI NEI VERTEBRATI

-Mammiferi

E' ben noto che in natura gli animali concentrano la loro funzione riproduttiva in un periodo ben preciso in modo che la prole possa nascere durante la stagione che consente migliori condizioni di sopravvivenza.

Si è studiato il suino domestico e si è visto che il periodo di subfertilità, che coincide con un periodo di anaestro estivo, è caratterizzato da squilibri endocrini con una inadeguata produzione di progesterone durante la fase luteinica. Pare quindi che il problema della subfertilità sia da collegarsi essenzialmente a fattori ambientali (es. il fotoperiodo).

L'effetto del fotoperiodo è stato studiato nell'ariete "Gentile di Puglia" misurando i livelli plasmatici di androgeni ed estradiolo tenendo conto del fatto che in molte specie animali esso costituisce un fattore importante nella regolazione dell'attività riproduttiva. Gli ovini sono considerati riproduttori stagionali a giorno breve ma fra di essi c'è la razza Gentile di Puglia che mostra un'aumentata attività riproduttiva in tarda primavera. Si dimostra che il profilo degli androgeni è influenzato dai diversi trattamenti fotoperiodici, infatti manipolazioni sperimentali del fotoperiodo modificano la concentrazione di androgeni plasmatici.

Da un'indagine immunoistochimica su epididimo di topi sottoposti a castrazione ed a trattamento con 5α -diidrotestosterone (DHT) si dimostra che l'epididimo non è uniforme ma presenta attività diverse in differenti regioni. La castrazione provoca fenomeni involutivi come la scomparsa degli spermatozoi dal lume del dotto, la diminuzione dello spessore dell'epitelio dell'epididimo. Tali effetti sono contrastati dal trattamento con androgeni. Si è osservata una differenza quantitativa nella risposta dei tre segmenti in cui è suddiviso l'epididimo al trattamento con androgeni. Ciò porta a concludere che i diversi tratti dell'epididimo possono differire sia in termini di risposta alla stessa dose di androgeni, sia essere influenzati in modo diverso secondo la natura dell'androgeno usato.

-Non mammiferi

Si è studiato l'effetto della temperatura e del fotoperiodo nella regolazione della produzione di androgeni in maschi di *Rana esculenta*.

Dagli esperimenti condotti si è visto che entrambi i parametri studiati hanno un effetto significativo; in particolare alte temperature e fotoperiodi lunghi sembrano avere un effetto stimolatorio. I fotoperiodi brevi pare, invece, che agiscano deprimendo la produzione di GnRH mentre l'alta temperatura sembrerebbe favorire la secrezione di gonadotropine

nonchè indurre un aumento della sensibilità del testicolo all'azione dell'ormone LH.

Si è condotto uno studio nei maschi di *Triturus cristatus carnifex* sulla correlazione tra funzionalità tiroidea e recettori per gli androgeni e per la prolattina nella pinna caudale e nella pelle dorsale durante il ciclo annuale. L'attività della tiroide sembra essere correlata con l'aumento dei recettori per gli androgeni mentre pare avere un ruolo antagonista per quanto riguarda i recettori per la prolattina.

In maschi di *Rana esculenta* si è studiata la presenza di recettori per la prolattina sia nella pelle che nel rene e si è visto che le variazioni stagionali di questo parametro, nella pelle, sono correlabili con i livelli di androgeni circolanti e con la presenza di recettori per gli androgeni. I risultati ottenuti nella pelle suggeriscono un "up-regulation" nel controllo dei siti recettoriali per la prolattina da parte della prolattina stessa. Circa l'interazione ormoni steroidi-recettori per la prolattina, si è visto che il testosterone induce nella pelle di animali ipofisectomizzati la comparsa di siti di legame specifici per la prolattina. Questo risultato è avvalorato dal fatto che nella pelle esistono recettori per gli androgeni.

Per quanto riguarda la femmina di *Rana esculenta* si sono dosati i livelli plasmatici di estradiolo, estrone, progesterone ed androstenedione durante il ciclo riproduttivo. Il profilo dell'estradiolo è in correlazione con la vitellogenesi mentre quelli di progesterone ed androstenedione fanno pensare ad un loro coinvolgimento nel processo di ovulazione.

-CONTROLLO ENDOCRINO E TUMORI

La crescita ed il differenziamento di una cellula normale sono eventi complicati controllati da numerosi fattori altamente coordinati fra loro così da assicurare la funzionalità corretta di un tessuto ed in ultima analisi dell'intero organismo. Molte ricerche sono state condotte negli ultimi 20 anni per capire il meccanismo molecolare che permette lo sviluppo di un tumore. Gli ormoni steroidi sono conosciuti come importanti regolatori della crescita neoplastica. Fin dal 1968 è noto che la risposta biologica degli steroidi è mediata dai recettori. Il legame steroide-recettore induce modificazioni conformazionali dei recettori stessi. Ciò abilita i recettori a legarsi a specifiche sequenze di DNA funzionando, quindi, come fattori di trascrizione che inducono o bloccano l'espressione di geni specifici.

Nell'ambito del Progetto Finalizzato del CNR "Controllo della crescita neoplastica" si è impostato un protocollo di terapia endocrina in donne portatrici di carcinoma mammario primario operabile. In tutte le pazienti sono stati valutati i livelli plasmatici di estradiolo, estrone, FSH, LH, prolattina e testosterone prima dell'intervento chirurgico ed a vari intervalli di tempo dall'inizio della terapia. Le pazienti entrate in protocollo venivano suddivise in gruppi in base allo stato menopausale ed alla situazione linfonodale. Le pazienti in pre-menopausa erano trattate con cyclo-phosphamide, methotrexate e 5-fluorouracile (CMF) o CMF+Tamoxifene; le pazienti in postmenopausa ricevevano Tamoxifene o nessuna terapia. Non si sono riscontrate alterazioni del profilo ormonale di base per cui il profilo degli ormoni non può essere usato per identificare persone a rischio per lo sviluppo della malattia.

I dati suggeriscono un effetto estrogenico diretto del Tamoxifene a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi quando i livelli di estrogeni circolanti sono bassi, vale a dire in pazienti in menopausa fisiologica o in donne trattate con farmaci citotossici. E' stata valutata anche la funzionalità endocrina di pazienti sottoposte a cicli di chemioterapia (CMF) e/o Tamoxifene. Si sono misurati i livelli di estrogeni, FSH, LH, prolattina e testosterone prima e dopo la terapia.

Mentre il CMF sopprime la funzionalità ovarica ma non altera la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi, il Tamoxifene provoca effetti profondi sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovario.

In uno studio effettuato su tumori del colon e del retto si sono dosati i livelli dei recettori per estrogeni, androgeni e progesterone. E' ben noto che la presenza del recettore è fondamentale per poter individuare un tumore che sia ormono-dipendente e quindi poter decidere per una terapia di tipo endocrino. Inoltre la presenza di recettori è indicativa di un tessuto differenziato e tumori ben differenziati hanno una migliore prognosi. Il recettore per gli estrogeni non è mai stato evidenziato mentre il recettore per il progesterone è presente nel 50% dei casi di tumore del colon e nel 12.5% dei casi di tumore del retto. Il recettore per gli androgeni è presente in entrambi i casi con percentuali del 58% e del 43%.

-ESPRESSIONE DI GENI REGOLATA DA TPA

Si è studiata l'espressione di geni regolati da 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), un potente promotore di tumore nella pelle di topo, in una linea cellulare umana (A1251) derivata da carcinoma renale. Si è valutata l'espressione di tre geni dei quali uno ha come prodotto una proteina di 89 KDa, un secondo che produce l'attivatore del plasminogeno ed un terzo il cui prodotto è sconosciuto.

L'espressione della proteina di 80Kda è regolata positivamente dal TPA. I livelli di attivatore del plasminogeno, sia di tipo tissutale che urochinasi, sono aumentati dopo trattamento con TPA e si è visto in A1251 che la regolazione dell'espressione di urochinasi è a livello trascrizionale. Inoltre la sintesi dell'attivatore del plasminogeno è associata al movimento delle cellule, quindi all'invasività del tumore e alle metastasi.

Per quanto riguarda il terzo gene (5G5) la cui proteina è sconosciuta, si è visto che esso è espresso in tutti i tessuti umani e nella linea cellulare testata. Si tratta quindi di un gene che svolge un ruolo essenziale nonché "universale" nella cellula.

-MECCANISMI DI REGOLAZIONE INTRAGONADICI

-Steroidi

Si è studiata la possibilità che, oltre i classici meccanismi di controllo endocrino, meccanismi di controllo locale (paracrino ed autocrino) siano attivi nel testicolo di vertebrati non mammiferi. Si è visto che l'estradiolo, forse prodotto dalle cellule del Leydig, inibisce la produzione di androgeni in *Rana esculenta* mentre la stimola in *Torpedo marmorata* ed *ocellata*. In *Rana esculenta*, gli androgeni, contrariamente ai mammiferi, stimolano la loro stessa produzione in seguito a stimolazione con LH.

L'etano dimetano sulfonato (EDS) è stato usato per mettere in evidenza l'esistenza di tali meccanismi di controllo locale nel testicolo. EDS è un noto agente alchilante, una singola iniezione di questa sostanza è in grado di distruggere le cellule di Leydig con conseguente disorganizzazione della spermatogenesi nello scomparto germinativo adiacente. Con l'uso di iniezioni multiple di EDS si è ottenuta anche la distruzione di cellule di Sertoli adiacenti lo scomparto interstiziale apparentemente intatto. Questi dati potrebbero aiutare a capire meglio il cross-talk esistente tra le Sertoli e le Leydig.

-Fattore di rilascio per le gonadotropine GnRH

Il GnRH è un decapeptide di origine ipotalamica che induce la sintesi ed il rilascio delle gonadotropine da parte dell'ipofisi. Esperimenti *in vitro* ed *in vivo* in animali ipofisectomizzati (HPX) hanno dimostrato un effetto locale, in *Rana esculenta*, in termini di aumento di androgeni e di incremento delle mitosi spermatogoniali. Per questi esperimenti è stata usata la buserelina, un analogo sintetico del GnRH. Questo effetto è mediato da recettori specifici. Inoltre è stata parzialmente caratterizzata la forma di GnRH testicolare in *Rana esculenta*. Tale forma, nota come chicken II-GnRH (His⁵-Trp⁷-Tyr⁸-GnRH), è stata localizzata sia in cellule germinali che nell'interstizio.

E' stato visto come il GnRH promuove la transizione G1-S del ciclo cellulare degli spermatogoni primi.

In numerosi lavori precedenti avevamo dimostrato come anche gli steroidi potevano svolgere il ruolo di bioregolatori locali nel testicolo dei vertebrati, in particolare, più recentemente, abbiamo visto come l'estradiolo agisce incrementando il numero delle mast cells e l'indice mitotico degli spermatogoni primi.

Esperimenti paralleli sono stati condotti su testicolo di *Gobius paganellus* (teleosteo), *Torpedo ocellata* e *marmorata* (elasmobranchi). Si sono effettuati esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* e si è visto che nel *Gobius paganellus* la buserelina è capace di indurre un aumento degli androgeni intratesticolari agendo probabilmente attraverso l'ipofisi.

In *Torpedo marmorata* ed *ocellata*, dopo iniezione intratesticolare di buserelina in animali HPX, si è verificato un aumento significativo degli androgeni circolanti dopo 6h dal trattamento. Il ritrovamento di una forma molecolare di GnRH nel plasma di *Torpedo* ha fatto ipotizzare che negli elasmobranchi, ove manca la circolazione portale che connette l'ipotalamo con le gonadotrope, l'attività ipofisaria possa essere regolata attraverso la grande circolazione.

Per studiare le comunicazioni fra scomparto germinativo ed interstiziale nel testicolo di vertebrati abbiamo usato l'etano dimetano sulfonato (EDS), che è noto come agente alchilante. Nostri lavori precedenti avevano dimostrato come una singola iniezione di questa sostanza era in grado di distruggere le cellule di Leydig con conseguente disorganizzazione della spermatogenesi nello scomparto germinativo adiacente. Con l'uso di iniezioni multiple di EDS si è ottenuta, oltre gli effetti prima descritti nell'interstizio, anche la distruzione di cellule di Sertoli adiacenti lo scomparto interstiziale apparentemente intatto. Questi dati potrebbero aiutare a capire meglio il cross-talk esistente tra le Sertoli e le Leydig.

-Peptidi oppioidi

I peptidi oppioidi sono stati studiati sia in anfibi (*Rana esculenta*) che rettili (*Podarcis s.sicula*).

La presenza di Met-Enkefaline e di sostanze β -endorfina(β -EP)-simili è stata dimostrata nel cervello, nell'ipofisi e nel testicolo di maschi di *Rana esculenta* con HPLC, RIA e tecniche immunocitochimiche. L'attività biologica è stata valutata con il Naltrexone, un antagonista degli oppioidi, sia *in vivo* che *in vitro*. La presenza di sostanze β -EP-simili è stata dimostrata sia nello scomparto germinativo che interstiziale ed i risultati ottenuti suggeriscono un coinvolgimento degli oppioidi endogeni nella regolazione della riproduzione attraverso meccanismi di controllo intragonadici.

Anche nella femmina di *Rana esculenta* si è dimostrata la presenza di peptidi oppioidi nell'ovario. Studi biochimici ed immunocitochimici supportano l'ipotesi che la β -EP possa giocare un ruolo fisiologico nella regolazione della funzionalità ovarica.

In maschi di *Podarcis s. sicula* (rettili) si è dimostrato che i peptidi oppioidi agiscono a livello ipofisario per regolare l'attività riproduttiva stagionale e che oppioidi endogeni sono presenti nel testicolo.

-PROTO-ONCOGENI

-Attività testicolare

L'interesse per lo studio dell'espressione di alcuni proto-oncogeni nel testicolo di vertebrati non mammiferi è scaturito dal fatto che, una volta individuati alcuni bioregolatori locali dell'attività testicolare, c'era bisogno di trovare l'interruttore che consentisse specificamente il loro funzionamento. Il primo approccio, con l'uso di tecniche

immunocitochimiche, ha consentito di individuare alcuni proto-oncogeni nel testicolo di *Scyliorhinus canicula* (elasmobranchi), ed in quello di *Rana esculenta* (anfibi). I risultati sono stati particolarmente interessanti data la discrepanza con i dati presenti in letteratura riguardanti i mammiferi (principalmente ratto e topo). Nello *Scyliorhinus canicula* i proto-oncogeni Myc, Fos, Jun e Mos sono sempre presenti nel tessuto epigonale annesso al testicolo (organo emopoietico che è sede del differenziamento delle cellule della linea linfoide e mieloide). Inoltre, nel testicolo, Mos è stato trovato esclusivamente nel tessuto interstiziale mentre Fos è risultato presente anche negli spermatozoi. Per quanto riguarda l'ulteriore caratterizzazione del proto-oncogene mos, si è proceduto all'analisi del messaggero per Northern blot e della proteina tramite Western blot. Quello che era considerato un proto-oncogene legato a cellule meiotiche e postmeiotiche nei mammiferi, si è rivelato in questo basso vertebrato non coinvolto, almeno non con un ruolo chiave, direttamente nella regolazione della spermatogenesi.

L'anfibio *Rana esculenta*, in quanto riproduttore stagionale avente una spermatogenesi di tipo cistico, ha dato risultati molto interessanti soprattutto per quanto riguarda i proto-oncogeni fos e jun. In precedenza avevamo localizzato con tecniche immunocitochimiche, sia nel citoplasma che nel nucleo di spermatogoni, le oncoproteine fos, jun, myc. In particolare la presenza delle oncoproteine nel nucleo coincideva con il periodo di attiva spermatogenesi. Con tecniche di northern blot abbiamo messo in evidenza un ciclo annuale di espressione di c-fos nel testicolo di *Rana esculenta*, in particolare abbiamo visto che c'è una correlazione tra la sua espressione ed il profilo dei livelli plasmatici di estradiolo ed androgeni. Questo fatto lasciava pensare che l'attivazione di fos avrebbe potuto essere causata dal picco dell'estradiolo. Partendo da questo dato abbiamo cercato di approfondire il legame tra estradiolo e fos. Siamo riusciti a dimostrare con esperimenti *in vivo* ed *in vitro* che l'estradiolo induce un incremento del messaggero di c-fos e che questo effetto è contrastato da un anti-estrogeno di sintesi (ICI 182-780, Astra Zeneca, Italia).

Per approfondire le nostre conoscenze sull'espressione di Fos, abbiamo saggiato l'espressione della proteina FOS durante il ciclo annuale in estratti proteici citoplasmatici e nucleari di testicolo. I risultati indicano che esiste una forma esclusivamente citoplasmatica (52 Kda) ed una forma esclusivamente nucleare (68 Kda). Esperimenti di fosforilazione e defosforilazione suggeriscono che la forma nucleare di 68 Kda potrebbe derivare dalla 52 Kda in seguito a fosforilazione.

Inoltre, con tecniche immunocitochimiche abbiamo visto che, in seguito a trattamento con estradiolo *in vivo*, la proteina Fos trasloca dal citoplasma al nucleo.

Oltre l'estradiolo, anche il GnRH ha un ruolo diretto come bioregolatore locale nel testicolo e sembra attivare alcuni proto-oncogeni. Dalla letteratura si sa che il GnRH è capace di indurre l'attività del complesso AP-1 nelle cellule GT1. Rispetto al testicolo, si sa che il GnRH induce la proliferazione degli spermatogoni come l'estradiolo. Si può quindi supporre una relazione fra i due fattori. Con western blot abbiamo visto che la banda di 52 Kda scompare in seguito a trattamento con GnRH dall'estratto proteico citoplasmatico e, contemporaneamente, compare nell'estratto proteico nucleare una banda di 55 Kda. Dall'insieme dei risultati ottenuti il quadro proponibile vede nel controllo della traslocazione della proteina Fos nel nucleo un importante livello di regolazione, di conseguenza la ritenzione di Fos nel citoplasma potrebbe avere un significato fisiologico che coincide con la sua in attivazione.

Usando un anticorpo che era in grado di riconoscere tutti i membri della famiglia Fos, avevamo trovato, con Western blot, una banda di 43 Kda, presente nell'estratto di proteine nucleari da testicolo di anfibio. Date le dimensioni, avevamo ipotizzando si trattasse di Fra-

1. Con l'uso di un anticorpo specifico abbiamo identificato la banda di 43 Kda come Fra-1. Con tecniche immunocitochimiche abbiamo localizzato Fra-1 nelle cellule peritubulari mioidi (PMC), nei dotti efferenti e nei vasi sanguigni. Durante il ciclo annuale Fra-1 compare durante il periodo di Marzo-Aprile, periodo di accoppiamento. Per corroborare l'ipotesi che Fra-1 avesse un ruolo nel trasporto degli spermatozoi dal comparto tubulare ai dotti efferenti, abbiamo condotto esperimenti *in vivo* ed *in vitro* trattando gli animali con omogenato di ipofisi (PD) che si sa indurre il rilascio di spermatozoi. In seguito a trattamento con PD abbiamo osservato un incremento del numero di cellule PMC che esprimono Fra-1 ed la propulsione degli spermatozoi dal tubulo ai dotti efferenti. Sembra, quindi, esserci una stretta relazione fra l'espressione di Fra-1 e l'attività di PMC.

-Attività nel cervello

L'espressione di alcuni proto-oncogeni è stata studiata anche nel cervello di *Rana esculenta* ed è stata messa in relazione con il GnRH. Come in altri bassi vertebrati, in *Rana esculenta*, il ciclo riproduttivo annuale è caratterizzato da lunghi periodi durante i quali il GnRH si accumula nel cervello (tarda primavera-estate) e lunghi periodi durante i quali esso viene rilasciato (tardo autunno-inizio inverno), sia nei maschi che nelle femmine. D'altra parte, l'espressione cronica del proto-oncogene Fos è stata vista sia nel cervello che nel testicolo di anfibi e mostra modificazioni stagionali. Sia Fos che Jun sono espressi nell'ipofisi, gonadi e nei neuroni secernenti GnRH in associazione con il picco di LH durante il proestro nei mammiferi.

Nostri dati relativamente recenti confermano che la localizzazione citoplasmatica per la proteina Fos non è da considerarsi più un'eresia. L'attività trascrizionale di c-fos (1.9 kb) è intensa in febbraio ed aprile, prima della comparsa della proteina (marzo e maggio-giugno). Sia Fos che GnRH sono presenti nell'area preottica anteriore, ma sono espressi in differenti popolazioni cellulari. Questo risultato è confermato anche in altri bassi vertebrati e ciò farebbe pensare che la correlazione fra le attività di Fos e GnRH non si è conservata durante l'evoluzione.

-ATTIVITÀ DELLA PROTEINA MSJ-1 NEL TESTICOLO E NEL MIDOLLO SPINALE

MSJ-1 (mouse sperm cell specific DnaJ first homologue) appartiene alla famiglia delle proteine J, le quali regolano l'attività delle heat shock proteins (HSP) e sono coinvolte in diversi processi cellulari, quali il "folding" delle proteine, la trasduzione del segnale ed il traffico delle vescicole. Il gene codificante per MSJ-1 è stato identificato nel 1998 mediante lo screening di una cDNA teca di cellule germinali di testicolo di topo. La sua espressione è stata inizialmente ascritta esclusivamente al testicolo, ristretta alle cellule germinali aploidi (spermatidi e spermatozoi), mentre la proteina è localizzata in sede acrosomale, periacrosomale e centriolare. In un secondo momento si è vista l'espressione di MSJ-1 anche nel cervello e nel midollo spinale. Il ruolo fisiologico svolto da MSJ-1 resta ancora da chiarire pienamente. La nostra attenzione è stata catturata dal fatto che MSJ-1 sembrava essere una proteina testicolo-specifica, per cui abbiamo condotto numerosi esperimenti usando due modelli sperimentali: l'anfibio anuro *Rana esculenta* ed il topo wobbler.

Dal primo modello abbiamo avuto indicazione della conservatività della proteina ed anche il fatto che la sua espressione è legata alla comparsa degli stadi postmeiotici.

Il topo "wobbler" ha fornito delle indicazioni indirette sul possibile ruolo svolto dalla proteina nel corso della spermatogenesi. Va ricordato che i topi wobbler, portatori di una mutazione autosomica recessiva, la cui natura è ancora sconosciuta, sono fenotipicamente caratterizzati da atrofia muscolare e sterilità maschile. La prima è dovuta alla degenerazione dei motoneuroni del tratto cervicale del midollo spinale, mentre la seconda

ad un difetto che sopravviene durante la spermiogenesi e che determina la mancata fusione delle vescicole acrosomali con conseguente mancanza di un vero e proprio acrosoma. Mediante Northern blot, RT-PCR, western blot e immunocitochimica si è evidenziato che:

- nel topo wobblers sia il gene *msj-1* che la corrispondente proteina sono scarsamente espressi rispetto ai topi wild type;

- il livello di espressione del gene decresce anche nei topi adulti eterozigoti per la mutazione wobblers.

La down regolazione di *msj-1* nel testicolo di topo wobblers ci ha indotto ad analizzare la sua presenza anche nel target principale della mutazione wobblers, cioè nel midollo spinale, tessuto mai testato fino ad oggi per l'espressione di questo gene. Nel midollo spinale, sia di topo normale che mutante, l'espressione di *msj-1* è piuttosto debole. La proteina è stata localizzata per immunofluorescenza nei motoneuroni delle corna ventrali; per contro, nel topo wobblers il gene non è espresso e la proteina non è prodotta, ancora prima che il fenotipo wobblers risulti evidente. Anche nel midollo spinale di *Rana esculenta* con western blot abbiamo evidenziato un debole segnale. Quindi il gene *msj-1* è espresso nel midollo spinale sia di roditori che di anfibi ed è down regolato in tutti i tessuti affetti dalla mutazione wobblers e, per il momento, non è da escludere il fatto che possa essere il target diretto della mutazione wobblers.

Il ritrovamento della proteina MSJ-1 sia nel testicolo che nel midollo spinale di un basso vertebrato, l'anfibio anuro *Rana esculenta*, nei medesimi tipi cellulari osservati nei roditori, suggerisce un suo alto grado di conservazione, nonché l'espletamento di una basilare funzione.

BIOMARCATORI PRECOCI DEL MESOTELIOMA

Il mesotelioma è un tumore particolarmente aggressivo delle cellule sierose (pleura, peritoneo, pericardio). Dati clinici ed epidemiologici dimostrano l'esistenza di una correlazione tra esposizione all'amianto e l'insorgere del mesotelioma pleurico. La prognosi è infausta, la morte sopraggiunge in tempi brevi (dopo 4 - 12 mesi); i tempi di latenza, invece, sono molto lunghi. La ricerca di biomarcatori precoci dell'insorgenza della malattia rappresenta, quindi, una sfida di grande importanza tenendo conto del fatto che ci si aspetta un incremento notevole di casi di mesotelioma nel mondo con un picco nel 2020.

Utilizzando microarrays, abbiamo identificato in campioni di mesotelioma, interessanti variazioni dell'espressione del gene della metalloproteinasi 14 (MMP14). Ciò potrebbe incoraggiare ad utilizzare i livelli serici di MMP14 come indicatori precoci di malattia.

ENDOCANNABINOIDI E RIPRODUZIONE

I cannabinoidi sono derivati della canapa indiana (*Cannabis sativa*), conosciuti e utilizzati dall'antichità a scopo terapeutico in numerose patologie. Dalla cannabis si ricavano tre principali tipi di cannabinoidi, di cui il delta-9-tetraidrocannabinolo risulta essere quello più attivo. Attualmente, tale composto, con il nome di dronabinol, viene utilizzato per il trattamento del vomito e per aumentare l'appetito soprattutto in pazienti con AIDS. Nel corso degli anni sono stati identificati altri composti quali l'anandamide e il 2-arachidonilglicerolo (2-AG), denominati endocannabinoidi (eCBs), i quali producono gli stessi effetti dei cannabinoidi, interagendo con gli stessi recettori (CB1 e CB2). Il recettore CB1 è presente nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico ed in numerosi organi, mentre il recettore CB2 è presente nel tessuto linfoide, ed è direttamente correlato con le funzioni immunitarie incluse quelle mediate dai macrofagi e dalle cellule B. Il KO del recettore dei cannabinoidi CB1 ha rivelato l'importanza di questo sistema che è coinvolto in

numerosi processi ma, mentre gli effetti determinati dai cannabinoidi nel sistema nervoso centrale sono ben caratterizzati, poco si sa circa il ruolo svolto nella regolazione dell'attività riproduttiva. Alcuni dati indicano la presenza di recettori per i cannabinoidi sugli spermatozoi di riccio di mare, in particolare, è stato dimostrato che, incubando queste cellule in presenza di cannabinoidi, esse perdono la loro capacità fecondante perché non sono in grado di attivare la reazione acrosomale. Questa incapacità deriva dal fatto che gli spermatozoi non possono più legare il ligando naturale, una glicoproteina, che è presente nello strato gelatinoso che circonda la cellula uovo.

Il sistema di segnalazione degli eCBs pare essere molto conservato dal punto di vista evolutivo, infatti usando RT-PCR, abbiamo studiato, come primo approccio, l'espressione del recettore CB1 in numerosi tessuti dell'anfibio anuro *Rana esculenta* ed abbiamo trovato un segnale nel SNC, testicolo, rene, fegato, ovario, muscolo, cuore, milza ed ipofisi. Nel testicolo, l'espressione di CB1 è associata alla stagione riproduttiva dell'animale, inoltre, la sua presenza nel cervello è stata dimostrata in aree che si sa essere coinvolte nel controllo dell'attività riproduttiva.

Un altro dato interessante è venuto da un altro studio centrato sulla relazione fra endocannabinoidi e motilità degli spermatozoi. Utilizzando due modelli sperimentali, anfibi e mammiferi, abbiamo dimostrato sia che il sistema opera in specie filogeneticamente molto distanti, sia che gli eCBs svolgono un ruolo fisiologico nel controllo della motilità degli spermatozoi. Il meccanismo vede coinvolti oltre il recettore CB1, una molecola trasportatore di membrana ed un enzima, una idrolasi, che ha il compito di degradare l'anandamide.

Circa il sistema riproduttivo femminile, abbiamo esaminato, in campioni di placenta umana, l'espressione dell'enzima nape-pld (responsabile della sintesi di AEA), di CB1 e di FAAH (l'enzima responsabile della degradazione di AEA) partendo dall'ipotesi che il sistema degli eCBs esercitasse un importante ruolo durante la gravidanza. Abbiamo dimostrato che bassi livelli di FAAH correlano con meccanismi che inducono l'aborto spontaneo. I livelli di FAAH e CB1 nei villi placentali, inoltre, sono anche coinvolti nei meccanismi che generano le contrazioni durante il parto.

Nuovi recettori, quali GPR55, GPR119 e TRPV1, sono stati recentemente aggiunti alla lista dei recettori degli eCBs. I principali eCBs sono l'arachidonoil-etanolammide (AEA o anandamide) ed il 2-arachidonoil-glicerolo (2-AG), molecole di natura lipidica che agiscono come molecole di segnalazione endocrina/paracrina/autocrina. Del sistema fanno parte anche un ipotetico trasportatore di membrana, gli enzimi di sintesi (i principali sono NAPE-PLD e DAGL) e di degradazione (i principali sono FAAH e MAGL).

Gli eCBs hanno un ruolo cruciale nella regolazione del sistema nervoso centrale e riproduttivo; in particolare, negli ultimi anni ne sta emergendo il ruolo chiave di modulatori della spermatogenesi.

Nel testicolo, i componenti del ECS sono stati identificati sia nelle cellule somatiche che germinali, da spermatogoni/SPG a spermatozoi/SPZ.

Abbiamo studiato la progressione delle cellule germinali, in particolare durante la fase di proliferazione spermatogoniale; il testicolo post natale durante la prima ondata della spermatogenesi (da 1 a 60 giorni dopo la nascita) e in particolare durante le fasi meiotiche e post meiotiche; la spermiogenesi ed in particolare la morfogenesi degli spermatidi/SPT (allungamento del nucleo) e gli eventi descritti a monte e a valle della protaminizzazione (livelli di espressione delle proteine di transizione e protammine, sostituzione degli istoni, integrità del DNA).

"Interplay" tra sistema degli endocannabinoidi e GnRH a livello ipotalamico. Il sistema degli endocannabinoidi (eCBs) consta di un set di mediatori lipidici che, legando specifici recettori (CB1, CB2, TRPV1), è coinvolto nella regolazione centrale e locale dell'attività riproduttiva in entrambi i sessi. A livello centrale, gli eCBs down-regolano la sintesi del GnRH ipotalamico, impedendo il rilascio ipofisario di LH e la conseguente produzione di steroidi sessuali. L'encefalo dei vertebrati, uomo incluso, produce almeno due forme molecolari di GnRH (GnRH1 e GnRH2) e almeno un recettore per il GnRH (GnRHR). Sin dagli anni '90, indicazioni provenienti da esperimenti di HPLC-RIA, avevano fatto ipotizzare la presenza di forme multiple di GnRH e di un recettore nei tessuti periferici di rana, ma a livello molecolare queste osservazioni erano ancora in attesa di conferma. Quindi, durante il triennio in esame, sono stati clonate 2 forme molecolari di GnRH (*GnRH1* e *GnRH2*) e tre recettori per il GnRH (*GnRHR1*, *R2*, *R3*) dal diencefalo di maschi di rana. Dal momento che in rana, così come nei ratti, è stato evidenziato un interessante cross-talk tra i neuroni GnRH1 secernenti e gli endocannabinoidi -suggerendo che il GnRH1 possa regolare la sua stessa sintesi mediante la produzione di endocannabinoidi e l'attivazione di CB1-, sono stati valutati gli effetti dell'endocannabinoide anandamide (AEA) sulla espressione dell'intero sistema del GnRH, sia ligandi che recettori. Quindi, nel periodo post-riproduttivo, sono stati allestiti trattamenti *in vitro* di diencefalo di maschi di rana con AEA ± SR141716A (Rimonabant, uno specifico antagonista del recettore CB1) e, mediante PCR quantitativa (qPCR) sono state valutate le modifiche nell'espressione di *GnRH1*, *GnRH2*, *GnRHR1*, *R2* e *R3*. Il trattamento down-regola significativamente rispetto ai controlli l'espressione di *GnRH1* e *GnRH2*, up-regola l'espressione di *GnRHR1* e *GnRHR2* mentre non ha alcun effetto sull'espressione di *GnRHR3*. Tutti gli effetti sopraelencati sono stati pienamente contrastati dal pretrattamento con SR141716A, indicando un'azione mediata dal recettore CB1.

Quindi, per la prima volta in un vertebrato è stato dimostrato che a livello centrale gli endocannabinoidi modulano il sistema del GnRH agendo tanto sui ligandi che sui recettori.

"Interplay" fra Endocannabinoidi e GnRH nel controllo delle funzioni riproduttive a livello testicolare

Tanto il sistema degli endocannabinoidi che il sistema del GnRH esercitano la loro azione in distretti extraipotalamici e negli organi periferici, testicolo incluso. Il primo modula l'attività steroido-secernente, l'ontogenesi delle cellule del Leydig, la progressione della spermatogenesi e una serie di funzioni strettamente correlate alla capacità fecondante dello spermatozoo (es. acquisizione della motilità e reazione acrosomale). Il secondo, riveste un ruolo fondamentale nella comunicazione fra cellule del Leydig e del Sertoli e nella progressione della spermatogenesi. Quindi, sulla scia dei risultati ottenuti nel diencefalo, è stato caratterizzato l'intero sistema del GnRH nel testicolo di rana, valutando l'espressione dei ligandi e dei recettori durante il ciclo riproduttivo annuale e localizzando mediante ibridazione *in situ* i relativi trascritti. La capacità del testicolo di produrre endocannabinoidi è stata accertata mediante clonaggio, analisi del profilo di espressione e localizzazione del trascritto della *Nape-pld*, l'enzima biosintetico dell'AEA. Parallelamente è stato valutato il profilo di espressione di *CB1* e la localizzazione del relativo trascritto durante il ciclo riproduttivo annuale. Infine, in due periodi critici, Febbraio (fine della stasi invernale e onset di una nuova ondata di spermatogenesi) e giugno (periodo post riproduttivo), sono state allestiti trattamenti *in vitro* di testicoli con AEA ± SR141716A. Gli effetti CB1 dipendenti dell'AEA sull'espressione delle componenti del sistema del GnRH testicolare sono risultati

essere differenti e stadio-specifici, confermando la ripartizione di funzione emersa tra le due forme molecolari del GnRH ed i tre recettori durante il ciclo riproduttivo annuale.

Dal momento che l'AEA, agendo a tutti gli effetti come endovanilloide, può attivare anche il recettore per i vanilloidi TRPV1, nel periodo post-riproduttivo sono stati condotti in parallelo trattamenti *in vitro* con AEA \pm SR141716A e con capsaicina (CAP) \pm capsazepina (CPZ), questi ultimi rispettivamente un agonista ed antagonista selettivo del recettore TRPV1; in seguito ai due trattamenti è stata valutata l'espressione delle componenti del sistema del GnRH. Sorprendentemente, non solo entrambi i trattamenti hanno modulato l'espressione dell'intero sistema del GnRH (con l'unica eccezione del *GnRHR3*), ma gli effetti osservati sono stati diametralmente opposti. Quindi agendo attraverso due recettori differenti, l'AEA potrebbe determinare lo "switch on/off" del sistema del GnRH testicolare.

Caratterizzazione ed azione intra-testicolare del sistema kisspeptine/Gpr54

Le kisspeptine rappresentano una nuova classe di peptidi con una posizione chiave nello scenario della riproduzione. Esse sono codificate dal gene *kiss1*, identificato nel 1996 come gene soppressore di metastasi, e sono i prodotti di "cleavage" di un precursore instabile di 145 amminoacidi il quale dà origine alla kisspeptina (kp) -54, -14,-13 e -10. Tutte le kisspeptine attivano un recettore di membrana denominato GPR54, localizzato tra l'altro sui neuroni ipotalamici GnRH secernenti. Il target primario delle kisspeptine è proprio il GnRH ipotalamico, la cui sintesi è positivamente influenzata. Mentre mutazioni nei geni *kiss1* e *GPR54* sono causa di ipo-gonadismo ipogonadotropo, la somministrazione di kisspeptine comporta un anticipo della pubertà in numerose specie, dai pesci ai mammiferi. A livello funzionale, le interrelazioni kisspeptine/GnRH sono state ben caratterizzate a livello ipotalamico; al contrario, nonostante l'espressione di *kiss1* e *GPR54* sia stata riportata a livello testicolare in diverse specie, appare ancora del tutto sconosciuto il loro ruolo a livello locale. Quindi, è stato utilizzato il modello *Rana esculenta* per clonare il recettore *Gpr54*, analizzarne l'espressione durante il ciclo riproduttivo annuale in ipofisi e testicolo e localizzare il suo trascritto nella gonade maschile mediante ibridazione *in situ*. Durante il ciclo riproduttivo annuale, sia nell'ipofisi che nel testicolo, alti livelli di espressione di *Gpr54* correlano con la ripresa della spermatogenesi, quando il testicolo si ripopola di stadi mitotici. L' ibridazione *in situ* di *Gpr54* conferma che il trascritto è localizzato prevalentemente nelle cisti di spermatozoni secondari, ma anche a livello interstiziale. In due periodi dell'anno, febbraio (fine della stasi invernale e onset di una nuova ondata di spermatogenesi) e giugno (periodo post riproduttivo), l'espressione di *Gpr54* è risultata essere dipendente dall'estradiolo, un ormone che negli anfibi riveste un ruolo fondamentale per l'innesco delle mitosi spermatogoniali. Stabilita l'espressione di *Gpr54* nel nostro modello di riferimento, nel mese di febbraio si è valutato l'effetto di dosi crescenti di kp-10 sull'espressione di *Gpr54* e del *recettore degli estrogeni di tipo α (ER α)*, dimostrando l'esistenza di una up-regolazione trascrizionale kp-10 dipendente. Infine, nel successivo mese di Marzo, a spermatogenesi avviata, la kp-10 continua a modulare l'espressione di *Gpr54* e *ER α* ed i suoi effetti sono contrastati da uno specifico antagonista di GPR54. Nonostante la strada per la definizione di un ruolo delle kisspeptine quali modulatori locali della spermatogenesi sia ancora lunga, i risultati ottenuti lasciano ipotizzare che le kisspeptine possano avere un ruolo diretto nei modulazione delle funzioni testicolari estradiolo dipendenti quali ad esempio, la steroidogenesi e la proliferazione degli spermatozoni.

Spermiazione e meccanismo di maturazione degli spermatozoi.

La spermatogenesi consta di tre fasi: "self renewal" e proliferazione degli spermatogoni (SPG), meiosi degli spermatociti (SPC) e differenziamento degli spermatidi (SPT). Gli spermatozoi (SPZ) che ne derivano, perdono i contatti citoplasmatici con le cellule del Sertoli e vengono rilasciati nel lume del tubulo seminifero, attraverso un meccanismo che prende il nome di spermiazione. Una volta rilasciati, gli spermatozoi vengono trasportati all'epididimo dove un nuovo ambiente ne modula la composizione biochimica, utile alla fecondazione. Nell'epididimo infatti, durante il transito *caput-cauda*, gli SPZ acquisiscono capacità di movimento e rimodellano alcuni compartimenti cellulari 1) la componente citoplasmatica del flagello viene eliminata, 2) cambia la componente lipidica della membrana plasmatica, 3) si formano i ponti disolfuro inter/intra protammine, 4) cambia il contenuto citoplasmatico di proteine ed RNA. Queste ultime molecole, infatti, in parte vengono degradate, in parte vengono acquisite dall'epitelio epididimale, *via* epididimosomi. Tali vescicole, trasferiscono allo SPZ un ricco repertorio di proteine ed RNA non codificanti, specialmente microRNA/miRNA e frammenti di tRNA. Poco si sa circa gli RNA circolari (circRNAs), una nuova classe di RNA non codificanti, implicati attivamente nei meccanismi di regolazione di espressione genica durante la spermatogenesi.

Lo studio dei meccanismi che sono alla base dei processi di spermiazione e maturazione epididimale degli spermatozoi sono di grande interesse.

Spermiazione.

Sia il ligando kiss che il recettore GPR54 sono espressi nella testa e nella coda degli spermatozoi lasciando ipotizzare un ruolo del sistema nella modulazione dell'attività di tali cellule. Nei pesci la somministrazione di kisspeptina induce spermiazione. Tale effetto è stato dimostrato anche negli anfibi. La kisspeptina, infatti, induce il distacco degli spermatozoi dalle cellule del Sertoli attraverso la modulazione dell'espressione di proteine giunzionali come la connessina.

Maturazione degli spermatozoi

Gli RNA circolari originano da una reazione di back-splicing secondo cui un sito downstream 5' di splicing interagisce con un sito upstream 3' formando un loop chiuso covalentemente. In base alla loro origine, possono suddividersi in tre categorie: esonici, intronici ed eso-intronici. Di recente sono stati identificati circa 18000 RNA circolari in cellule germinali staminali di topo, con l'ipotesi che essi abbiano un ruolo nel self-renewal e nel differenziamento delle stesse. Rimane da scoprire ancora se tali RNA possano avere un ruolo nella maturazione degli spermatozoi. La possibilità che gli spermatozoi umani eiaculati e quelli murini ottenuti dall'epididimo possano conservare circRNA è emersa recentemente da esperimenti preliminari condotti in collaborazione con il gruppo del prof Purrello (Università di Catania).

elenco pubblicazioni vedi allegato 1 da Scopus