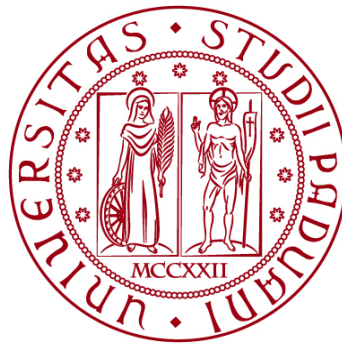


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria**



**TESI DI LAUREA**

**Effetto dello stress termico sulla funzione delle  
cellule del Sertoli: studio *in vitro* sul ruolo dei  
*Transient Receptor Potentials*.**

**Relatore:** Prof. Alberto Ferlin  
Dipartimento di Medicina

**Correlatore:** Luca De Toni

**Laureanda:** Anna Sturaro

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## **INDICE**

<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>INTRODUZIONE</b> .....	2
1.1 EFFETTO DELLE TEMPERATURA AMBIENTALE SULLA FUNZIONE TESTICOLARE .....	2
1.2 RISCALDAMENTO GLOBALE E FUNZIONE TESTICOLARE .....	4
1.3 ANATOMIA DEL TESTICOLO.....	5
1.3.1 Cellule di Leydig.....	6
1.3.2 Cellule germinali e spermatogenesi.....	6
1.4 CELLULE DEL SERTOLI .....	8
1.4.1 Morfologia.....	9
1.4.2 Funzioni .....	10
1.5 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIALS.....	13
1.5.1 TRPV1 .....	14
1.6 MECCANISMI MOLECOLARI CONOSCIUTI DELL'IMPATTO DELLO STRESS TERMICO SUI TESTICOLI .....	15
1.6.1 Effetti sulle cellule germinali.....	15
1.6.2 Effetti sulle cellule del Sertoli.....	17
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	19
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	20
2.1 TM-4 (ATCC® CRL-1715™) .....	20
2.2 REAL- TIME PCR .....	21
2.2.1 Estrazione RNA totale .....	21
2.2.2 Retrotrascrizione .....	22
2.2.3 Real-Time PCR .....	22
2.3 SAGGIO MTT .....	23
2.4 CALCIUM IMAGING .....	24
2.5 STIMOLO CELLULE CON CAPSAICINA e TNF- $\alpha$ .....	25
2.6 STIMOLO CELLULE CON CALORE .....	26
2.7 FRAZIONAMENTO CELLULARE.....	26
2.8 WESTEN BLOT.....	28
2.8.1 Raccolta e lisi cellulare .....	28
2.8.2 Quantificazione proteica mediante BCA.....	29

2.8.3 Western blot .....	29
2.9 KIT ELISA cAMP .....	31
2.10 ANALISI STATISTICHE .....	32
<b>RISULTATI</b> .....	33
4.1 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEI TRPS NEL MODELLO CELLULARE DI TM-4 .....	33
4.1.1 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR di canali appartenenti alla famiglia dei TRPs .....	33
4.1.2 Saggio di vitalità MTT .....	33
4.1.3 Analisi espressione proteica TRPV1 mediante <i>Western Blot</i> .....	33
4.1.4 <i>Calcium Imaging</i> .....	35
4.2 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A NOTI STIMOLANTI DI TRPV1 SUGLI EVENTI CELLULARI cAMP MEDIATI. ....	36
4.3 EFFETTO DELLA STIMOLAZIONE DI TRPV1 SULLA CASCATA APOPTOTICA NELLE CELLULE TM4. ....	38
<b>DISCUSSIONE</b> .....	41
4.1 Caratterizzazione funzionale di TRP in modello cellulare di TM-4 .....	41
4.2 Effetto dell'esposizione a noti stimolanti di TRPV1 sugli eventi cellulari cAMP mediati. ....	42
4.3 Effetto della esposizione a noti stimolanti di TRPV1 a livello della cascata apoptotica. ....	44
<b>CONCLUSIONI</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	47



## ABSTRACT

L'esposizione dei testicoli al calore ha importanti conseguenze sulla funzione d'organo, inclusa la spermatogenesi. La risposta cellulare alla temperatura è mediata dai *Transient Receptor Potentials* (TRPs), una famiglia di canali ionici non selettivi espressi anche a livello testicolare nella componente cellulare germinale e nelle cellule del Sertoli (SC). Lo scopo di questa tesi è valutare il possibile coinvolgimento dei TRPs nella funzione delle SC. La linea cellulare murina TM4 di SC è stata inizialmente caratterizzata per l'espressione di TRPs mediante Real Time PCR, grazie alla quale stata riscontrata un'espressione rilevante solo del *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1). L'analisi di *Calcium Imaging*, che sfrutta la sonda fluorescente FLUO4-AM, ha confermato la piena funzionalità di TRPV1 a seguito dello stimolo con l'agonista TRPV1-specifico capsaicina (CPS). Un significativo aumento dell'espressione cAMP-dipendente di aromatasi era riscontrabile sia dopo esposizione a delle TM4 a 42°C per 1 ora, sia dopo stimolo per 24h con CPS 10 µM. Tali stimoli erano inoltre in grado di aumentare l'espressione NF-kB mediata dei marker apoptotici FAS-Ligando e Caspasi 3. Tali risultati suggeriscono il coinvolgimento di TRPV1 nell'alterazione della funzione sia endocrina che di sostegno alla linea geminale delle SC, mediate dalla temperatura.

## INTRODUZIONE

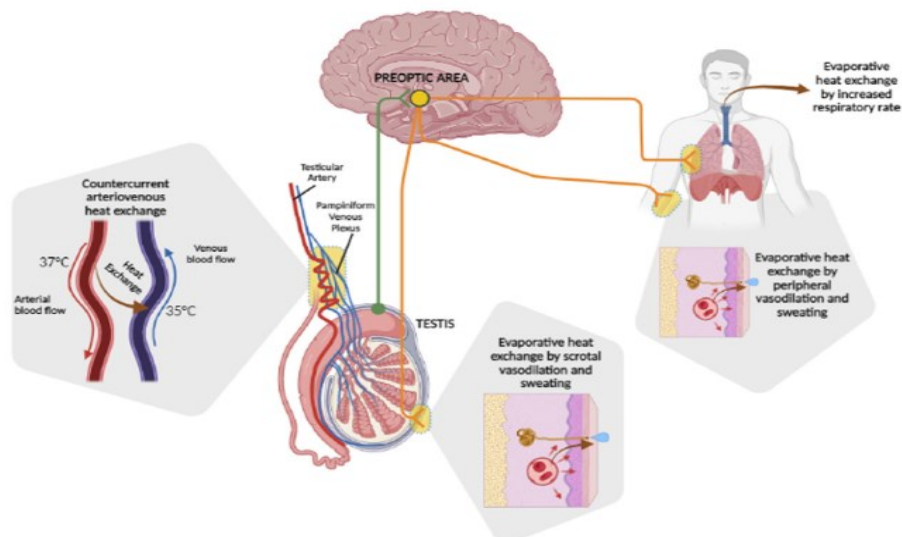
### 1.1 EFFETTO DELLE TEMPERATURA AMBIENTALE SULLA FUNZIONE TESTICOLARE

Nei mammiferi superiori i testicoli, sia per il loro particolare processo di sviluppo nella vita embrionale, sia per la caratteristica posizione anatomica sono organi altamente suscettibili agli agenti esterni, tra i quali la temperatura. In molti mammiferi la discesa dei testicoli dalla cavità addominale in fase fetale o neonatale rappresenta un evento cruciale per la fisiologia di questi organi deputati alla spermatogenesi. Esternamente rispetto alla cavità addominale, la temperatura calcolata a livello della sacca scrotale è tra i 2°C e 4°C inferiore rispetto alla temperatura corporea centrale e tale condizione termica si associa a una corretta produzione di spermatozoi, verificabile in una grande quantità di modelli sperimentali (1). La termoregolazione dei testicoli non è garantita solo dalla collocazione anatomica, ma anche da tutta una serie di caratteristiche attribuibili alla sacca scrotale all'interno della quale sono contenuti. Ad esempio, essa è costituita da un sottile tegumento epidermico, con ridotta rappresentazione di grasso sottocutaneo, scarsa presenza di peluria e abbondante densità di ghiandole sudoripare. Inoltre, anche l'assetto muscolare e la vascolarizzazione dell'area genitale svolgono un ruolo nella regolazione della temperatura testicolare, con lo scopo di massimizzare la dispersione di calore. Infatti, per mantenere una temperatura tissutale ottimale, i muscoli cremastere e dartos vanno incontro a rilassamento con temperature ambientali elevate, riducendo la tensione cutanea dello scroto che consente un aumento della superficie utile allo scambio termico e quindi al mantenimento della temperatura. Inoltre, si assiste a una dilatazione dei vasi sanguigni superficiali dello scroto, favorendo la dissipazione del calore per evaporazione del sudore. Il tessuto testicolare è termoregolato anche attraverso un meccanismo di scambio di calore in controcorrente, nel quale la particolare organizzazione dell'arteria testicolare e le vene del plesso pampiniforme consentono lo scambio di calore tra il sangue arterioso più caldo in ingresso e il sangue venoso più freddo in uscita. Questo processo consente al sangue arterioso di raggiungere il testicolo con una temperatura più bassa rispetto a quella centrale, mentre il sangue venoso può mantenere una temperatura adeguata dissipando il calore attraverso il sottile strato cutaneo dello scroto (2).

La collocazione extra addominale dei testicoli è sicuramente motivata da una maggiore *fitness* riproduttiva (1). Inoltre, è opinione condivisa che la maturazione delle cellule germinali in un ambiente a temperatura più bassa, porta allo sviluppo di una proprietà fondamentale per gli spermatozoi al momento della

fecondazione, ovvero la termotassi (3). Quest'ultima è la capacità dello spermatozoo di orientare la propria motilità verso un gradiente di temperatura crescente e fa in modo che i gameti maschili eiaculati a livello dell'istmo uterino siano spinti a muoversi secondo il gradiente di temperatura verso la tuba di Falloppio, mediamente a una temperatura dai 2 ai 4°C più elevata rispetto alla sede di deposizione dove si trova l'ovocita da fecondare.

La corretta funzione spermatogenetica appare quindi strettamente legata al mantenimento di una differenza di temperatura tra i testicoli e il corpo. Tuttavia, numerosi fattori sono in grado di influenzare tale condizione portando così a un aumentato rischio di problematiche di infertilità. Tra i comportamenti a rischio si annoverano l'utilizzo di indumenti aderenti e lo stile di vita sedentario che minimizzano la dispersione termica del testicolo, provocando un aumento della temperatura scrotale (2). Collegato allo stile di vita sedentario, è importante fare riferimento alla problematica dell'obesità, la quale si associa ad un aumento di grasso addominale, sovra-pubico e nella zona prossimale degli arti inferiori, compromettendo la corretta termoregolazione testicolare e contribuendo così, nei casi più gravi, a una soppressione reversibile della spermatogenesi (2). Ma anche l'esposizione a fonti di calore, quali ad esempio l'utilizzo frequente e prolungato del computer posizionato sopra la zona pelvica, sport come il ciclismo, che prevedono il mantenimento della medesima posizione flessa con indumenti aderenti per lunghi periodi e/o il ricorrere frequentemente a bagni molto caldi e saune, appaiono tutti fattori legati allo stile di vita che implicano un aumento della temperatura a livello scrotale con comprovati effetti negativi a livello della spermatogenesi. (2)



*Figura 1. Meccanismi di dissipazione di calore nei testicoli necessari per mantenere la temperatura basale dai 2°C ai 4°C al sotto della temperatura corporea. Tra questi i principali coinvolgono l'arteria testicolare e il plesso pampiniforme e le afferenze nervose dell'area preottica del cervello che regolano la risposta termoregolatoria agendo a livello della vasodilatazione, sudorazione e frequenza respiratoria. (1)*



Inoltre, sono note anche tutta una serie di problematiche cliniche che provocano aumento della temperatura testicolare, con tutte le conseguenze a ciò connesse. Le principali sono il criptorchidismo, ovvero la mancata discesa dei testicoli nella sacca scrotale appena dopo la nascita e il varicocele, di cui si stima sia affetto il 15% della popolazione maschile adulta e che consiste nel rigonfiamento anomalo delle vene del testicolo con conseguente riduzione del drenaggio venoso, ridotto scambio termico, aumento della temperatura e scarsa ossigenazione tissutale. (2)

## 1.2 RISCALDAMENTO GLOBALE E FUNZIONE TESTICOLARE

Relativamente ai fattori ambientali che minacciano la corretta funzionalità testicolare e quindi più in generale la fertilità maschile, è importante citare anche la problematica estremamente attuale del riscaldamento globale. A partire dalla fine del XIX secolo e l'inizio del XX secolo si sta assistendo a un progressivo e continuo aumento della temperatura media terrestre, fenomeno che a seguito della *United Nations Framework Convention on Climate Change* tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992, prende il nome di "global warming" (4). Tuttavia, sebbene sia stato dimostrato che l'esposizione a shock termico sia in grado di compromettere fortemente la spermatogenesi, rimane comunque difficoltoso stabilire a che livello i cambiamenti della temperatura ambientale siano in grado di influire sulla funzione testicolare, questo per la mancanza di modelli coerenti di studio (1). Sono però motivi di allerta i dati mondiali più recenti del 2020 rispetto all'indice di fertilità, ovvero il numero di figli per donna in età fertile, che con un valore pari a 2,4 risulta dimezzato rispetto ai risultati ottenuti nel 1960, in cui il medesimo valore era pari a 5 (5). A tale evidenza, si unisce un altro dato allarmante. Infatti, secondo una revisione sistematica e analisi di meta regressione che ha preso in considerazione 185 studi in cui sono stati valutati complessivamente 42935 uomini di paesi occidentali, è stata stimata una variazione di  $-0.70 \times 10^6$  cellule/mL all'anno nella concentrazione spermatica e di  $-5.33 \times 10^6$  cellule/eiaculato all'anno nella conta totale degli spermatozoi nell'intervallo di tempo compreso tra il 1973 e il 2011 (6). È quindi evidente un forte correlazione tra la qualità spermatica e fattori ambientali che si stanno via via modificando in seguito alla sempre più crescente industrializzazione e modificazione degli stili di vita che interessano soprattutto i paesi occidentali.

### 1.3 ANATOMIA DEL TESTICOLO

I testicoli sono gli organi riproduttivi primari del maschio, hanno una forma ovale, misurano in media 4 centimetri di lunghezza e 3 centimetri di larghezza e sono deputati alla produzione di spermatozoi e degli ormoni sessuali, tra i quali il testosterone. I primi vengono generati a partire dalla pubertà fino alla morte, mentre la produzione degli ormoni è riscontrabile sin dalla nascita, ma aumenta sostanzialmente durante la pubertà, mantenendosi a livelli elevati per tutta l'età adulta fino a diminuire progressivamente nella quarta decade di vita. Come detto precedentemente, i testicoli sono collocati nella sacca scrotale in cui troviamo anche i relativi epididimi al cui interno confluiscono gli spermatozoi appena prodotti. Durante il transito nell'epididimo gli spermatozoi sottostanno alle ultime fasi del processo maturativo, tra le quali l'acquisizione della motilità cellulare, per ottenere il liquido seminale che verrà eiaculato (7).

Il testicolo è avvolto da 3 tonache, che dall'esterno verso l'interno sono rispettivamente: tonaca vaginale, tonaca albuginea e tonaca vascolare. A partire dalla tonaca albuginea hanno origine dei setti fibrosi che suddividono radialmente il testicolo in tanti lobuli, i quali contengono da uno a cinque tubuli seminiferi che confluiscono al centro dell'organo andando a formare una rete di tubuli anastomizzati tra loro. Tale struttura prende il nome di *rete testis* del corpo di Highmore. Da qui emergono dai 12 ai 20 dotti efferenti rettilinei che raggiungeranno l'epididimo, fungendo quindi da tramite per gli spermatozoi immaturi tra testicolo ed epididimo (7).

A comporre il parenchima testicolare possiamo distinguere 2 principali popolazioni di cellule: le cellule germinali, da cui hanno origine gli spermatozoi e le cellule somatiche rappresentate dalle cellule del Sertoli e dalle cellule di Leydig (7).

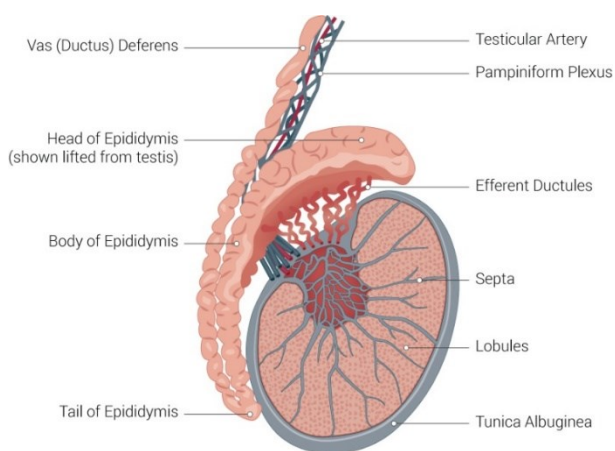


Figura 2. Illustrazione dell'anatomia testicolare. (7)

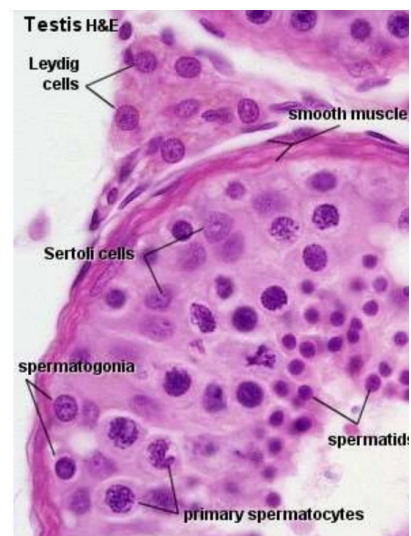


Figura 3. Sezione trasversale di testicolo umano (Fernando, 2007).

### 1.3.1 Cellule di Leydig

Le cellule di Leydig fanno parte del compartimento interstiziale dei testicoli, occupando lo spazio stromale tra i vari tubuli seminiferi insieme ai vasi sanguigni e alle cellule linfatiche e del sistema immunitario. Sono cellule endocrine poiché il loro ruolo è quello di produrre gli steroidi androgenici quali il testosterone (T), l'androstenedione e il deidroepiandrosterone (DHEA) (8). La produzione di tali ormoni avviene a partire dal colesterolo ed è stimolata dall'ormone luteinizzante (LH) di origine ipofisaria, la cui attività è potenziata dalla presenza dell'ormone follicolo stimolante (FSH) che è in grado di aumentare l'espressione dei recettori per l'LH nelle cellule di Leydig stesse (8). Il T è l'ormone fondamentale per lo sviluppo degli organi riproduttivi maschili sia a livello embrionale che nel corso della vita dell'uomo, poiché controlla e regola lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, la fertilità maschile -essendo un fattore essenziale per la spermatogenesi-, la mascolinizzazione di ossa e muscoli e la libido (8). Sebbene le cellule di Leydig siano responsabili della produzione di più del 95% del testosterone nell'uomo, il quale può essere riversato nella circolazione sanguigna e/o accumulato a livello intra-testicolare, rappresentano anche la principale fonte di estrogeni dopo la pubertà. L'estradiolo (E2) è infatti sintetizzato a partire dal T da parte dell'enzima aromatasi (CYP19A1). È importante notare che il mantenimento del corretto rapporto delle concentrazioni intra-testicolari tra testosterone/estradiolo appare necessario nell'ambito della fisiologia della spermatogenesi. Alterazioni di tale parametro vengono riscontrate in soggetti con turbe spermatogenetiche (9).

### 1.3.2 Cellule germinali e spermatogenesi

All'interno dei tubuli seminiferi si trovano le cellule germinali ovvero i precursori staminali dei gameti maschili. Esse sono rappresentate in modo centripeto dal più basso al più alto grado di differenziazione: spermatogoni, spermatociti, spermatidi e infine spermatozoi. La spermatogenesi è un processo della durata di circa 74 giorni, nel maschio adulto, durante i quali si assiste all'ordinata differenziazione cellulare della cellula staminale spermatogoniale, fino ad ottenere la cellula spermatica morfologicamente matura (9). Nell'uomo la formazione delle cellule staminali spermatogoniali ha inizio attorno al 24° giorno dello sviluppo embrionale, a livello degli organi genitali in fase di formazione (9). Tra i 3 e i 6 mesi dopo la nascita si ha l'incremento massimo del numero delle cellule germinali, le quali vanno successivamente incontro solo a divisioni mitotiche. È durante la pubertà che avrà poi inizio il processo di spermatogenesi vero e proprio, in particolare dal momento in cui si verifica l'aumento della produzione di FSH e LH,

due gonadotropine prodotte dall'ipofisi che agiscono in cooperazione. L'FSH agisce stimolando direttamente la spermatogenesi, poiché incrementa la produzione da parte delle cellule del Sertoli del *carrier* intra-cellulare di testosterone *androgen-binding protein* (ABP), con conseguente aumento di testosterone dentro alla cellula. Esso ha anche un ruolo indiretto regolando il numero di cellule del Sertoli, le quali sono fondamentali per il supporto durante il processo maturativo delle cellule germinali. L'LH invece stimola la produzione intra-testicolare di T, fondamentale per la maturazione degli organi sessuali maschili, agendo a livello delle cellule del Sertoli. FSH, LH e T sono quindi gli ormoni principali che regolano finemente questo processo e alterazioni nella loro secrezione o sensibilità recettoriale si associano ad alterazioni della spermatogenesi (10).

La parete dei tubuli seminiferi è costituita da epitelio germinativo di cui fanno parte, insieme alle cellule germinali in diversi stadi differenziali, anche le cellule del Sertoli, cellule nutrici non spermatogeniche, e cellule mioidi che garantiscono supporto meccanico. Le cellule germinali in stadio precoce, ovvero gli spermatogoni si trovano in corrispondenza della lamina basale dell'epitelio, mentre le cellule germinali in stadio tardivo si collocano progressivamente verso il lume (10).

L'intero processo spermatogenetico può essere suddiviso in 3 fasi. La prima fase è la divisione mitotica degli spermatogoni, che nell'uomo constano di 3 tipi e hanno la duplice funzione di fungere da sorgente di nuove cellule germinali e da pool di riserva di cellule indifferenziate. In tal modo viene garantita una produzione continua di gameti durante tutta la vita dell'uomo e una riserva di cellule progenitrici necessarie per questo processo differenziativo. Al termine di questa fase mitotica si originano gli spermatociti primari. È proprio a partire da quest'ultimi che ha inizio la seconda fase in cui avvengono due divisioni meiotiche successive. La prima ha come prodotto gli spermatociti secondari con un assetto aploide ma con un contenuto di DNA uguale a quello delle cellule somatiche, mentre nella seconda i cromatidi si separano senza che avvenga la replicazione del DNA e si distribuiscono nelle cellule figlie che prendono il nome di spermatidi, le quali hanno un corredo aploide di cromosomi, quindi dimezzato rispetto a quelle somatiche (10). Durante questa fase si verificano tutti i processi di *crossing-over*. Infine, nell'ultima fase che prende il nome di spermiogenesi si ha la formazione dello spermatozoo morfologicamente maturo senza alcuna ulteriore divisione cellulare. Gli spermatidi subiscono una serie di mutamenti morfologici come la perdita di citoplasma, la formazione dell'acrosoma sulla testa e lo sviluppo del flagello, ma avviene anche la sostituzione degli istoni nucleari con protamine, le quali conferiscono la caratteristica compattazione del nucleo degli spermatozoi.

Viene a formarsi così lo spermatozoo con la sua caratteristica morfologia di cellula flagellata, il quale tramite la spermiazione viene rilasciato nel lume del tubulo seminifero (10).

Si stima una produzione di spermatozoi giornaliera tra i 150 e i 275 milioni e questo processo continua fino alla tarda età, sebbene si riscontri una diminuzione progressiva del numero delle cellule spermatiche col passare degli anni a partire dalla quarta decade di vita (9).

La spermatogenesi non è solo un processo molto complesso che coinvolge varie componenti testicolari e ormoni, ma è anche sensibile a vari fattori che potrebbero influenzare la qualità e la quantità dell'eiaculato finale, tra i quali la temperatura ambientale.

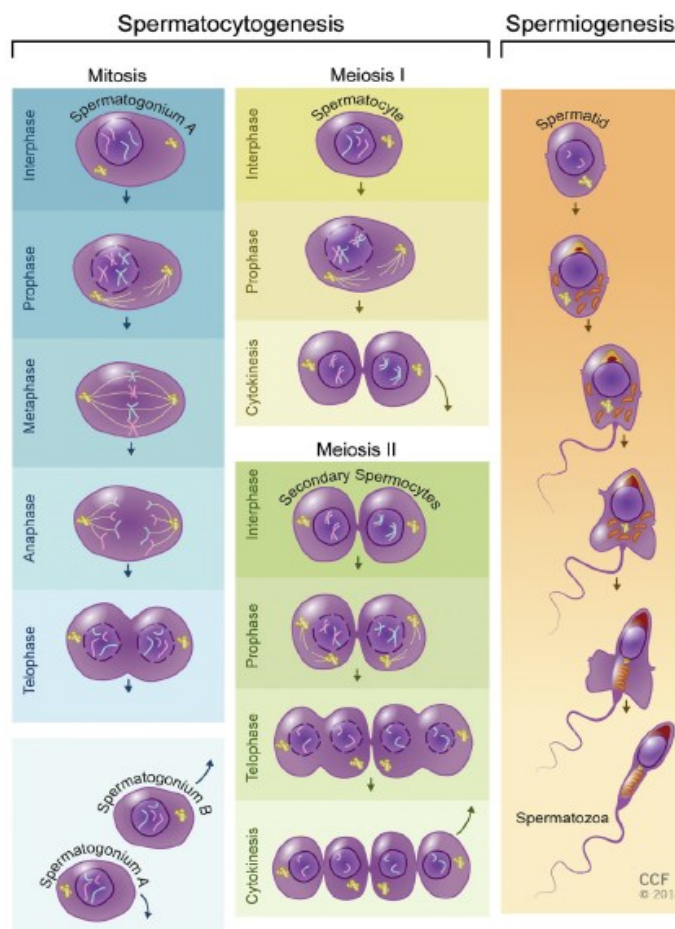


Figura 4. Rappresentazione schematica delle varie fasi della spermatogenesi (11).

#### 1.4 CELLULE DEL SERTOLI

Le cellule del Sertoli sono proprio le protagoniste di questo lavoro di ricerca dal momento che, sebbene non costituiscano parte delle cellule della linea germinale (sono cellule somatiche diploidi), esse svolgono un ruolo essenziale per il processo

di gametogenesi, tanto da essere definite “cellule infermiere” e quindi hanno un compito chiave nel mantenimento della fertilità maschile.

Esse sono state scoperte nel 1865 da Enrico Sertoli, da cui prendono il nome, e la loro molteplicità di funzioni le rende tra le più complesse e dinamiche strutture cellulari conosciute in biologia (12).

### 1.4.1 Morfologia

Le cellule del Sertoli mutano la loro struttura durante lo sviluppo e nel corso del ciclo dell'epitelio seminifero con cui interagiscono strettamente, sia per effetto del tessuto connettivo che circonda i tubuli seminiferi, sia per le peculiari caratteristiche morfo-funzionali degli organelli cellulari come il nucleo, i sottili filamenti citoplasmatici e la presenza di giunzioni inter-cellulari in grado di rompersi e riformarsi (12).

Sono cellule dotate di una caratteristica forma triangolare che poggia sulla membrana basale del tubulo seminifero e si sviluppa fino al lume del tubulo.

Il nucleo è uno degli organelli più facilmente riconoscibili. Si trova solitamente vicino alla membrana basale e di grandi dimensioni, eucromatico e in grado di variare la sua forma poiché spesso la membrana nucleare, circondata da filamenti intermedi di vimentina, forma delle profonde invaginazioni (13). Queste rientranze sono tipiche della raggiunta maturazione cellulare e, anche se ancora poco è noto rispetto alla loro funzione, si ipotizza che possano essere un sito di *targeting* nucleare per specifiche proteine (13). Un altro aspetto che rende unico questo organello è il fatto di presentare molti pori nucleari, che variano di densità in base allo stadio della spermatogenesi (13).

Un altro elemento che caratterizza la morfologia di queste cellule sono i lunghi filamenti citoplasmatici che servono per circondare le cellule germinali fornendo loro sostegno e nutrimento durante il processo di differenziamento (13).

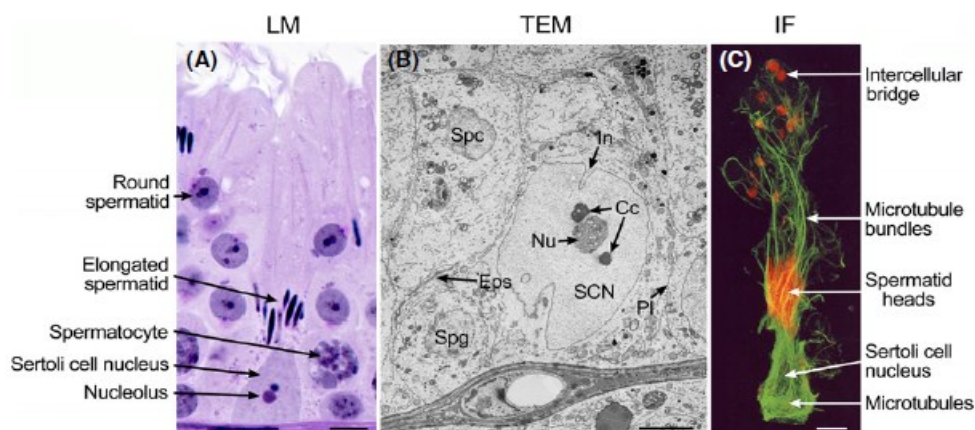


Figura 5. Cellule del Sertoli visualizzate mediante metodi differenti. (13)

La composizione della membrana plasmatica delle cellule del Sertoli è estremamente complessa e variabile dal momento che coinvolge la traslocazione di organelli e l'espressione di molte proteine diverse deputate a specifiche funzioni. Questo è motivato dal fatto che la membrana plasmatica svolge molti ruoli chiave delle cellule del Sertoli stesse come la formazione della barriera emato-testicolare, la spermiogenesi e la fagocitosi dei corpi residui dalla maturazione degli spermatozoi (13). Queste cellule, infatti, non si trovano isolate come inizialmente si riteneva, ma sono organizzate a formare un sincizio grazie alla presenza di un complesso giunzionale che permette loro di associarsi formando una barriera molto stretta. Tuttavia, le cellule germinali, e in modo particolare gli spermatociti, sono in grado di transitare lungo questa barriera senza però distruggerla. Il legame tra le varie cellule del Sertoli e tra cellule del Sertoli e cellule germinali avviene grazie a una struttura chiamata "specializzazione ectoplasmatica" che collega la giunzione stretta con un sottile filamento di actina e il reticolo endoplasmatico da entrambe le parti delle membrane delle cellule collegate tra loro. Questa struttura garantisce non solo plasticità alla barriera emato-testicolare, ma funge anche da sito di ancoraggio tra le cellule germinali e le cellule del Sertoli. (13) Un'altra struttura partecipa nel legame tra cellule del Sertoli e cellule germinali, ovvero il complesso tubulobulbare, descritto per la prima volta nel 1976 come sistema di ancoraggio. È costituito da estensioni tubulari allungate di una cellula all'interno della corrispondente invaginazione della membrana plasmatica della cellula adiacente, terminando con un bulbo che è associato con le cisterne del reticolo endoplasmatico. Questa struttura in particolare è molto importante per la fase finale della maturazione degli spermatozoi ovvero il distacco degli spermatidi e la rimozione dell'eccesso di citoplasma durante la fase di spermiogenesi (14).

#### 1.4.2 Funzioni

Le cellule del Sertoli sono state sin da subito rese note con l'appellativo di "cellule infermiere", questo perché si trovano strettamente associate con le cellule germinali durante tutti i loro diversi stadi differenziativi creando un microambiente ideale per il loro supporto meccanico e metabolico. Uno dei principali modi con cui tali cellule svolgono questa funzione di sostentamento è sicuramente riconducibile al fatto che esse sono in grado di selezionare il trasporto di nutrienti e oligo-elementi attraverso la barriera emato-testicolare. Tra questi il più importante per la spermiogenesi è sicuramente il ferro, che provvede al corretto funzionamento delle diverse fasi di mitosi, meiosi e mitocondriogenesi, ma è anche necessario per molte altre funzioni cellulari. Secondo il modello proposto per spiegare l'ingresso di questo micronutriente, le cellule del Sertoli

sono in grado di captare a livello della membrana basale il ferro che si trova legato alla transferrina nel sangue, lo trasferiscono a una neosintetizzata molecola di transferrina e lo secernono sulla membrana apicale della barriera emato-testicolare (BTB), rendendolo fruibile da parte delle cellule germinali in via di sviluppo (13). Le cellule del Sertoli non solo si occupano del rifornimento di ferro, ma sono anche in grado di provvedere al suo riciclaggio, riducendo così anche il potenziale effetto tossico dovuto al suo accumulo all'interno dei corpi residui. A questo si collega un'altra funzione di queste cellule ovvero quella di provvedere all'eliminazione mediante fagocitosi dei metaboliti di rifiuto prodotti dalle cellule germinali stesse durante il loro processo di sviluppo. Infatti, durante la spermatogenesi, più del 75% delle cellule germinali va incontro a degenerazione apoptotica, diventando cellule germinali apoptotiche (AGC) (15). Questa morte cellulare è regolata a livello ormonale dell'FSH e dal testosterone, i quali non agiscono direttamente a livello delle cellule germinali, dal momento che queste non posseggono i recettori specifici, ma operano a livello delle cellule del Sertoli stesse. Inoltre, nel corso delle ultime fasi di differenziamento si assiste a una trasformazione strutturale degli spermatidi caratterizzata non solo dalla formazione della coda e dell'acrosoma, ma anche dalla perdita di gran parte del citoplasma che viene rilasciato sottoforma di corpi residui (RB) (15). Le cellule del Sertoli hanno quindi il compito di eliminare sia le AGC che i RB e lo fanno generando delle gocce lipidiche visualizzabili a livello citoplasmatico. Questo ruolo nel fagocitare i residui derivanti dalla spermatogenesi è fondamentale per il corretto funzionamento del processo stesso poiché lascia spazio alle nuove cellule in formazione, previene il rilascio di sostanze potenzialmente nocive da parte delle cellule apoptotiche, rimuove autoantigeni che potrebbero indurre una risposta immunitaria e consente il riciclaggio di AGC e RB come fonte di energia per le cellule del Sertoli (15).

Come già accennato, le cellule del Sertoli hanno anche un ruolo chiave nella regolazione paracrina delle cellule germinali, questo perché sono bersaglio dell'FSH e del T a cui rispondono modulando la propria espressione genica, ma anche perché esprimono fattori di crescita e altre molecole di segnalazione che variano in base allo sviluppo del testicolo e alla fase del ciclo dell'epitelio seminifero. Da ciò deriva la necessità di mantenere, proprio grazie alle cellule del Sertoli, la corretta comunicazione paracrina intracellulare necessaria per il mantenimento del processo di maturazione degli spermatozoi (13).

Le cellule del Sertoli si occupano anche del mantenimento, mediante segnali paracrini, delle cellule staminali spermatogoniali con cui si trovano a stretto contatto a livello della membrana basale dei tubuli seminiferi e che sono fondamentali per la conservazione dell'omeostasi tissutale. (13)



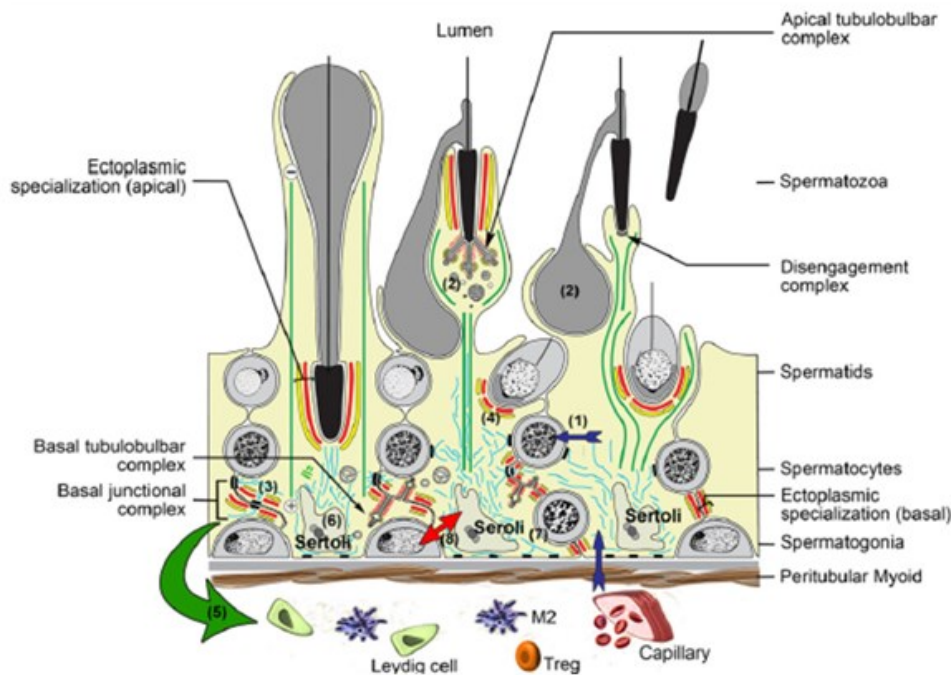


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'interazione tra cellule del Sertoli e cellule germinali durante le varie fasi della spermatogenesi e altre funzioni chiave ricoperte dalle cellule del Sertoli. Le funzioni includono: 1) trasporto di micronutrienti, 2) gestione dei residui cellulari dovuti alla spermatogenesi, 3) mantenimento della BTB, 4) adesione e comunicazione con le cellule germinali, 5) inibizione delle reazioni immunitarie, 6) avvio e regolazione di vie di segnalazione endocrina, 7) regolazione della spermatogenesi, 8) mantenimento dell'omeostasi delle cellule staminali. (13)

Infine, un'ultima funzione che ricoprono le cellule del Sertoli è quella di creare, attraverso la barriera emato-testicolare (BTB), un ambiente immuno-privilegiato per lo sviluppo delle cellule germinali. La necessità di avere un'ambiente di questo tipo è motivata dal fatto che gli spermatozoi e gli spermatozoi compaiono dopo che si è stabilita una tolleranza immunologica nei confronti del *self* e quindi queste cellule potrebbero essere riconosciute come non *self* dal sistema immunitario (13). Questa barriera si forma appena prima della pubertà ed è costituita da cellule del Sertoli unite tra loro da giunzioni strette (*zona occludens*) costituite da occludina, claudine e molecole di adesione giunzionale, ma anche giunzioni aderenti, *gap junctions* e desmosomi in grado di mantenere una certa plasticità necessaria per il completamento di tutte le fasi per la formazione dello spermatozoo maturo. La BTB divide l'epitelio seminifero in due compartimenti, uno basale e uno adluminale: la prima fase della spermatogenesi avviene nel primo, mentre le due fasi meiotiche, la spermiogenesi e la spermiiazione avvengono nel secondo. Il passaggio tra la prima e la seconda fase è l'unico momento durante il quale la barriera può essere attraversata permettendo il flusso in direzione del lume del tubulo seminifero. La barriera non solo impedisce il contatto tra cellule germinali a stadi differenziativi diversi, ma evita anche l'attraversamento di cellule immunitarie e altre molecole infiammatorie, inclusi gli anticorpi contribuendo nel

rendere così i testicoli un sito immuno-privilegiato (13). Inoltre, le cellule del Sertoli della BTB producono anche vari fattori antinfiammatori come l'attivina A e B che contribuiscono a regolare il microambiente immunitario testicolare (15). Le cellule del Sertoli sono quindi cellule estremamente importanti per tutta l'omeostasi tissutale e quindi cambiamenti a livello della morfologia, del numero e della funzione sfociano in uno scorretto funzionamento testicolare e quindi a problematiche legate alla fertilità maschile.

## 1.5 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIALS

I *Transient Receptor Potential (TRPs)* sono i principali trasduttori cellulari responsivi alle variazioni di temperatura. Essi sono una famiglia di canali ionici attivati da cambiamenti della temperatura ambientale, e rispondono ad una gamma di temperature che vanno da caldo cosiddetto "estremo" (>50°C) al freddo (>20°C). Questo considerevole intervallo di temperature è associato all'esistenza di diversi tipi di sensori della temperatura, ciascuno in grado di rispondere a stimoli termici di intervalli caratteristici. Incidentalmente tutti questi termo-recettori sono anche attivati da una serie di composti naturali che si trovano nell'ambiente e nei cibi. I TRPs sono stati scoperti inizialmente a livello neuronale, dove sono coinvolti nella percezione tattile alle diverse temperature ambientali. Tuttavia, studi successivi hanno evidenziato la loro presenza anche a livello di altri tessuti come a livello cardiaco, gastrico e, non ultimo, testicolare (16, 17). La maggioranza dei canali TRP sono canali cationici non selettivi, che mediano principalmente il trasporto di Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Nei mammiferi, questa superfamiglia conta ben 28 membri, i quali sono a loro volta suddivisi in 7 sottofamiglie in base alla loro omologia di sequenza: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRML e TRPN (18,19). Strutturalmente questi canali sono tetrameri e ciascuna subunità contiene 6 domini transmembrana (S1-S6), una regione a poro tra il dominio S5 e S6 e grandi terminali N- e C- citoplasmatici, quest'ultimo in particolare contiene la porzione strutturale necessaria per il *gating*-termico del canale (18). L'origine della sensibilità alla temperatura di questi canali è ancora incerta, tuttavia sono stati proposti 3 possibili meccanismi secondo i quali: i) il cambiamento della temperatura porta alla produzione di ligandi in grado di legare un recettore che a sua volta attiva il canale; ii) la proteina canale subisce un riarrangiamento strutturale temperatura-dipendente e iii) i canali TRPs sono in grado di percepire cambiamenti delle proprietà biofisiche della membrana causate da modificazioni del doppio strato lipidico associate alle variazioni della temperatura (20).

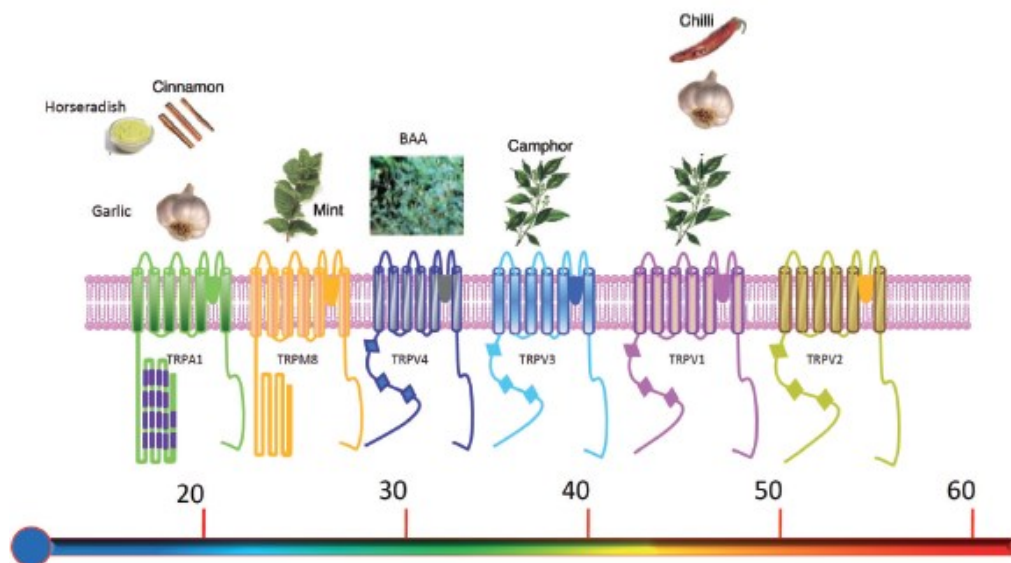


Figura 7. Rappresentazione schematica dei 6 TRPs con i corrispettivi stimoli attivatori (19).

### 1.5.1 TRPV1

Dei vari canali della famiglia dei TRP, il *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) è stato dimostrato essere presente nelle cellule del Sertoli (16). Esso è inoltre il membro di questa famiglia di canali responsabile maggiormente della sensibilità al calore. Infatti, diversamente dagli altri TRPs nei quali si assiste ad un aumento massivo della permeabilità ionica al di sopra di un determinato valore soglia di temperatura, per TRPV1 l'aumento della temperatura aumenta progressivamente la possibilità di attivazione del recettore (19). Inoltre, l'attivazione del canale può avvenire anche mediante una serie di agonisti non termici, come il basso pH, l'etanolo, la lidocaina e, soprattutto, la capsaicina (CPS), il vanilloide tipico del peperoncino. Non a caso, è la CPS che conferisce il caratteristico gusto piccante al vegetale (18,19). La principale funzione di TRPV1 è quindi quella di trasdurre gli stimoli termici, chimici e fisici in eventi biochimici di membrana e ha anche un ruolo di particolare importanza durante l'infiammazione, essendo responsabile della sensazione di calore e del suo mantenimento (18).

Come detto precedentemente, la capsaicina è il più potente agonista specifico di TRPV1, vi sono evidenze che concentrazioni molto piccole di questa sostanza sono in grado di provocare un grande effetto nella corrente in uscita, portando così a uno spostamento verso sinistra della curva di attivazione dose dipendente (20). Numerosi fattori regolano TRPV1, come l'espressione genica, modificazioni post traduzionali e l'associazione con proteine regolatrici, ma anche la fosforilazione di residui importanti può determinare un'aumentata sensibilità agli stimoli termici e chimici. Da ciò ne consegue che la formazione di complessi di segnale e l'unione

fisica di molecole a formare entità macromolecolari sono un *pathway* fondamentale che influenza l'attività di TRPV1. (18)

A livello testicolare, TRPV1 viene ritrovato in tutte le popolazioni cellulari presenti nell'organo in questione, suggerendo il suo coinvolgimento nella regolazione temperatura-dipendente della spermatogenesi. In particolare, a livello delle cellule germinali, è stato dimostrato il suo ruolo nel processo di termotassi e nel *trafficking* del calcio (16), ma uno studio ha anche messo in rilievo la sua funzione di difesa dei testicoli contro l'*heat stress* dal momento che è in grado di prevenire la morte cellulare degli spermatogoni indotta dal calore (17).

## 1.6 MECCANISMI MOLECOLARI CONOSCIUTI DELL'IMPATTO DELLO STRESS TERMICO SUI TESTICOLI

La spermatogenesi è un processo fortemente dipendente da numerosi fattori ambientali. Non a caso, molti sono gli studi mirati a identificare gli effetti e i meccanismi attraverso i quali questi fattori, come lo stress termico, siano in grado di influire sulla funzione e sul differenziamento delle cellule germinali, ma anche sulle cellule somatiche che partecipano indirettamente alla spermatogenesi sostenendo la linea germinale.

### 1.6.1 Effetti sulle cellule germinali

L'effetto del calore ambientale sulla funzione dei testicoli, e in particolare delle cellule germinali, è stato valutato mediante studi condotti su diversi modelli animali di mammiferi. Una prima indagine è stata condotta sui topi, immergendo la parte inferiore del corpo in un bagno termostato impostato a 43°C per 20 min. Dopo 8 ore dal trattamento è stata osservata una diffusa degenerazione vacuolare a livello di tutte le popolazioni cellulari del tubulo seminifero. Inoltre, i nuclei delle cellule germinali mostravano un materiale cromatinico altamente condensato e la presenza di numerosi corpi apoptotici. A 16 ore dal trattamento termico si assisteva ad una progressione del processo generativo, con la formazione di cellule giganti a partire dagli spermatociti iniziali e la massiva frammentazione del DNA legata a fenomeni apoptotici delle cellule germinali andate incontro ad arresto maturativo e degenerazione vacuolare (1). In un altro studio più recente, ai fini di valutare l'entità degli effetti della temperatura sulla spermatogenesi, veniva ricreata una condizione di criptorchidismo artificiale in un modello murino (1). Gli autori osservano che a differenza dei testicoli mantenuti alla fisiologica temperatura di 34°C, nei topi con criptorchidismo "indotto", si verificava un arresto della spermatogenesi a vari livelli di differenziamento a seconda della

temperatura raggiunta a livello scrotale. In particolare, a 36°C l'arresto era a livello degli spermatidi, a 37° degli spermatociti secondari mentre a 38°C l'arresto riguardava gli spermatociti primari. Inoltre, nel tessuto testicolare prelevato *ex vivo*, sia a 34°C che a 38°C, si riscontrava in entrambi i casi l'abbondante presenza di marker delle cellule del Sertoli e degli spermatogoni dimostrando la loro effettiva presenza. È a 38°C che le cellule germinali presenti allo stadio di spermatociti andavano incontro ad apoptosi poiché incapaci di completare l'appaiamento dei cromosomi (1). In un altro studio in cui veniva studiato l'impatto della temperatura ambientale sugli spermatozoi bovini (1). La principale evidenza riscontrata era il significativo aumento del livello di perossidazione lipidica della membrana degli spermatozoi dopo 14 giorni di trattamento con stress termico. Inoltre, rispetto al gruppo di controllo, veniva riscontrata una diminuzione significativa del potenziale di membrana mitocondriale, dei parametri di motilità e dell'integrità della membrana degli spermatozoi. Il liquido seminale di toro è stato analizzato anche dopo 28 giorni dal trattamento col calore ed è stato osservato un aumento significativo della frammentazione del DNA spermatico come possibile effetto tardivo (1).

Altri autori hanno concentrato i loro studi sull'effetto dello stress termico sugli spermatozoi umani. In uno di questi, il riscaldamento testicolare a 43°C è stato somministrato attraverso dei bagni con acqua molto calda per 30 min, ripetuti per un totale di 10 giorni consecutivi. Dopo 6 settimane da questo trattamento, mediante un approccio proteomico, è stata osservata una deregolazione di più di 60 proteine, la quali erano coinvolte non solo nella spermatogenesi, ma anche in altri aspetti della riproduzione (1). Risultati sovrapponibili sono stati riscontrati in un modello murino, con il medesimo approccio sperimentale confermando che la ridotta espressione di tali proteine, strettamente associata alla diminuzione della vitalità e della concentrazione spermatica, era principalmente legata allo stress termico (1). Ulteriori studi condotti nell'uomo si sono posti come obiettivo di valutare l'effetto di determinati stili di vita, associati ad un aumento della temperatura scrotale, sulla funzione testicolare. In particolare, sono stati valutati i rischi correlati alla postura, all'utilizzo di indumenti molto stretti, al lavorare frequentemente con il computer posizionato vicino alla zona genitale, all'esposizione nell'ambiente di lavoro a fonti di calore elevato e al ricorrere frequentemente a saune o bagni molto caldi (1). Quello che si è visto è una tendenza al peggioramento dei parametri seminali, ma non sempre significativo (1).

Un meccanismo comune alla base della patogenesi dell'infertilità maschile è l'alterazione dell'equilibrio redox cellulare (1). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali ad esempio il perossido d'idrogeno, anione superossido e l'ossido nitrico, sono intermedi estremamente reattivi che vengono largamente neutralizzati dai sistemi antiossidanti di cui dispongono le cellule. Tuttavia, una

minima frazione dei ROS appare necessaria e fisiologicamente prodotta per regolare alcuni processi legati alla funzione degli spermatozoi, quali la capacitazione, l'acquisizione dell'iper-motilità e la reazione acrosomiale (1). Lo stress termico è spesso associato a eventi che portano ad esacerbazione dello stress ossidativo, con conseguente sbilanciamento dell'equilibrio redox della cellula che porta a perossidazione lipidica, danni al DNA e infine morte cellulare per apoptosi. Questo è stato dimostrato in diversi studi condotti sugli animali e, in particolare, è stato osservato che a livello degli spermatozoi, l'aumentata produzione di ROS da parte dei mitocondri, conseguente all'esposizione dei testicoli al calore, si associa allo sbilanciamento del potenziale di membrana mitocondriale, a cambiamenti nella composizione della membrana plasmatica associati al coinvolgimento delle *heat shock proteins*, ma anche alla compromissione della sintesi del DNA che porta a cambiamenti dell'espressione genica e della trasduzione del segnale nelle cellule germinali (1).

Infine, lo stress termico ha anche effetti nel processo di spermatogenesi associati all'alterata steroidogenesi. Infatti, in diversi studi è stata osservata una diminuzione della produzione di testosterone in seguito all'esposizione dei testicoli ad elevate temperature (1).

### 1.6.2 Effetti sulle cellule del Sertoli

Oltre al noto effetto del calore sulle cellule germinali, sono state oggetto di indagine anche le sue conseguenze a livello delle altre popolazioni cellulari che vanno a comporre il parenchima testicolare, come le cellule del Sertoli. Come detto precedentemente, tale popolazione cellulare è fondamentale per il corretto funzionamento della spermatogenesi e numerosi sono gli studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* volti a valutare gli specifici effetti dell'esposizione a elevate temperature ambientali.

Una delle funzioni delle cellule del Sertoli è quella di formare la BTB, rendendo così i testicoli un organo immuno-privilegiato. La formazione di questa barriera è permessa dalle giunzioni strette formate da 3 principali classi di proteine di membrana: occludine, claudine e molecole di adesione giunzionale. In uno studio condotto nel topo è stato dimostrato che dopo 24-48 ore dall'esposizione dello scroto a 43°C per 30 minuti, si verifica una diminuzione dell'espressione di alcuni componenti del processo giunzionale in particolare l'occludina, la claudina-3 e la zona occluden-1 (ZO-1), per poi ritornare a livelli pre-trattamento dopo 3 giorni (1). Tali cambiamenti sembrano quindi avvenire precocemente rispetto al trattamento col calore, e, oltre a un'espressione ridotta delle sopracitate proteine, compaiono una serie di alterazioni morfologiche come la formazione di vacuoli

intercellulari tra cellule del Sertoli adiacenti, così come tra cellule del Sertoli e cellule germinali, oltre a frammentazione dei filamenti di actina del reticolo endoplasmatico, contribuendo al danneggiamento complessivo della BTB (21).

Altri studi condotti sia nell'uomo che in roditori si sono focalizzati maggiormente sull'aspetto istopatologico di queste cellule dimostrando che, dopo l'esposizione di animali di controllo a una temperatura di 43°C per 15/30 min o in animali con criptorchidismo indotto, le cellule del Sertoli mostravano una serie di cambiamenti morfologici, in particolare la reversione a un fenotipo puberale immaturo caratterizzato da: nucleo di dimensione ridotta, l'accumulo di gocce lipidiche, la presenza di un reticolo endoplasmatico liscio dilatato e la degenerazione mitocondriale (21). Inoltre, è stata osservata l'espressione di citocheratina-18, un filamento intermedio presente solamente nelle cellule del Sertoli immature, la cui espressione viene persa con la pubertà (21). Si presume quindi che la regressione delle cellule del Sertoli allo stato immaturo ostacoli la funzione di supporto alla spermatogenesi che verrà così soppressa.

Un ulteriore studio ha invece valutato il ruolo della *heat shock protein 32* (hsp32) nell'attenuare l'apoptosi mediata dalla caspasi-3 nelle cellule staminali del testicolo di topo (21). L'hsp32 è il membro di una famiglia di proteine con effetti protettivi e anti-apoptotici in condizioni di stress cellulare, è inducibile dal calore e mostra un'attività aumentata nel testicolo sottoposto a stress termico (21). Le caspasi sono invece mediatori cruciali dell'apoptosi e sono divisibili in due gruppi: iniziatrici ed esecutrici. L'attivazione della caspasi-3, di tipo esecutrice, è responsabile della degenerazione apoptotica delle cellule testicolari dopo l'ipertermia acuta (21). In particolare, lo studio ha rilevato un aumento dei livelli di hsp32 e caspasi-3 nelle cellule del Sertoli a 3-12 ore dopo uno shock termico acuto (43°C) e un aumentato livello di apoptosi nelle stesse cellule dopo 6-12 ore dal trattamento (21). Questo suggerisce che il calore provoca danni diretti alle cellule del Sertoli che, essendo deputate al supporto e al mantenimento delle cellule germinali, determineranno anche la compromissione di quest'ultime.

A fronte dei vari lavori presenti in letteratura, si può quindi concludere che, sebbene le cellule del Sertoli mostrino una qualche resistenza all'esposizione al calore (21), esse sono tuttavia passibili di una serie di alterazioni morfologiche e dell'espressione delle proteine funzionali al supporto della linea germinale. Il risultato è una riduzione della vitalità e della proliferazione di quest'ultime con conseguenze negative a livello quantitativo e qualitativo del liquido seminale.

## SCOPO DELLA TESI

È noto come il riscaldamento globale sia in grado di impattare negativamente sulla salute umana e più nello specifico sulla fertilità maschile. Numerosi studi sono stati condotti e sono tuttora in corso per approfondire quali *pathways* cellulari e quali macromolecole vengono maggiormente compromesse a seguito all'esposizione dei testicoli a temperature elevate. È oggi noto che nella risposta cellulare alle variazioni di temperatura prendono parte i *Transient Receptor Potentials (TRPs)*, una famiglia di canali ionici non selettivi espressi anche a livello testicolare sia nella componente cellulare germinale, che in quella somatica come le cellule del Sertoli. Sono noti, inoltre, agonisti specifici dei diversi TRPs in grado di mimare la risposta cellulare alla temperatura.

Lo scopo di questa tesi è valutare il possibile coinvolgimento dei TRPs nella risposta delle cellule del Sertoli all'esposizione ad elevata temperatura ambientale. A tale scopo è stato utilizzato, quale modello *in vitro* di cellule del Sertoli, la linea cellulare TM4 isolata dal testicolo di topo pre-pubere. Nello specifico gli obiettivi dello studio sono:

- Valutare il repertorio cellulare di TRPs espresso dalle cellule del Sertoli in condizioni basali.
- Determinare la funzionalità dei TRPs espressi a seguito dello stimolo con agonisti specifici. In particolare, valutando il flusso di calcio intracellulare mediante tecniche di *Calcium Imaging*.
- Valutare eventuali implicazioni funzionali legate dell'ingresso di calcio mediato dall'attivazione dei TRPs, a seguito della stimolazione con agenti specifici o calore.
- Determinare l'espressione proteica di alcuni marker apoptotici in seguito al trattamento delle cellule con agonisti specifici o calore.



## MATERIALI E METODI

### 2.1 TM-4 (ATCC® CRL-1715™)

TM-4 è una linea cellulare di cellule del Sertoli isolata da testicoli di topo (*mus musculus*) di sesso maschile, sano e tra gli 11 e i 13 giorni di vita (pre-pubere). Questa linea cellulare è stata depositata da JP Mather nel 1980 (22). La morfologia di queste cellule è di tipo epiteliale, presentano una forma pressoché triangolare, con citoplasma chiaro e lunghi filamenti citoplasmatici. Esprimono l'antigene H-Y e i geni per la proteina legante il retinolo (RBP), l'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA) e la transferrina. Come marker di espressione presentano: FSH, AR (recettore degli androgeni) e PR (recettore del progesterone). È stato riportato che la linea cellulare TM4 risponde all'FSH con un aumento della produzione di cAMP, ma non risponde all'ormone luteinizzante (LH). La reattività all'FSH è molto ridotta rispetto alle colture primarie di cellule del Sertoli. Le cellule di questa linea crescono in adesione sulla superficie inferiore della *flask* per coltura cellulare. Il terreno di coltura completo si compone di: 1:1 mix di *Ham'S F12 medium* e *Dulbecco's modified Eagle's medium* con 1.2 g/L bicarbonato di sodio e 15 mM HEPES, (91.5%) (*EuroClone*, #ECM0095) al quale viene aggiunto *Donor Horse Serum* (*EuroClone*, #ECS0090D) alla concentrazione del 5%, FBS (*EuroClone*, #ECS0182D) al 2,5% e penicillina/streptomina all'1%. Per questa tipologia cellulare, sia l'*Horse Serum* che FBS sono stati sottoposti a un processo di *heat-inactivation* che consiste nell'incubare un'aliquota di ciascuna sostanza nel bagnetto per 30 min a 65°C. Le condizioni ottimali di crescita di questa tipologia cellulare sono la temperatura di 37°C e un'atmosfera con 5% di CO<sub>2</sub> e il 95% di umidità. Quando le cellule raggiungono la concentrazione di circa 2,8 x 10<sup>6</sup> nelle *flask* T-25 e di 8,4 x 10<sup>6</sup> nelle *flask* T-75, è necessario procedere con lo *split*: come prima cosa viene rimosso il terreno dalla *flask*, successivamente si procede con un lavaggio con PBS 1X per rimuovere gli eventuali residui di terreno che potrebbero compromettere l'azione della soluzione Tripsina (0,25% w/v)-EDTA 0,53 mM. Quest'ultima viene aggiunta con un volume tale da coprire il fondo della *flask* e agisce per un tempo necessario affinché lo strato di cellule si disperda (circa 3-5 minuti). Trascorso il tempo necessario, viene aggiunto un volume tra i 6,0 e gli 8,0 mL di terreno di coltura per bloccare l'azione della tripsina, la quale potrebbe danneggiare le cellule, e dopo aver pipettato accuratamente in modo da risospendere bene le cellule, il terreno viene aspirato e trasferito in una Falcon. Quest'ultima viene collocata in una centrifuga impostata a 1300 g x 3 min in modo da ottenere il pellet di cellule che verranno poi ulteriormente risospese in 1 mL di terreno e aliquotate con la concentrazione scelta (raccomandata tra 1:10 e 1:50)

nel nuovo supporto di coltura. In generale è raccomandato cambiare il terreno di coltura ogni 3/4 giorni. (1)

## 2.2 REAL- TIME PCR

Questa parte dell'analisi è finalizzata alla valutazione dell'espressione genica di un pannello di canali appartenenti alla famiglia dei TRPs in cellule TM4 non trattate. Viene utilizzata anche successivamente per valutare l'espressione genica negli estratti cellulari di TM4 trattate con capsaicina e calore del gene per l'aromatasi *CYP19A1*, la cui sintesi si ipotizza essere correlata all'eventuale aumento dell'cAMP a seguito dell'ingresso di calcio nella cellula attraverso TRPV1.

### 2.2.1 Estrazione RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il *RNeasy Plus mini kit (Qiagen)* secondo le istruzioni della ditta. Le cellule sono state precedentemente raccolte con PBS 1X e pellettate mediante una centrifugazione a 4°C, 13000 giri per 15 minuti, al seguito della quale è stato eliminato il surnatante. Il pellet viene poi disgregato mediante l'aggiunta del *buffer RTL plus* presente nel kit. Si procede quindi con l'omogeneizzazione del lisato ottenuto: il pellet disgregato nel *buffer* viene trasferito in una colonna *QIAshredder* da centrifugazione e posto in centrifuga per 2 minuti a velocità massima. L'omogeneizzato viene trasferito in una colonna *gDNA Eliminator* posizionata in una *ependorf* da 2 mL e viene centrifugato per 30 s a 8000 x g. A questo punto viene tenuta solo la colonna, la quale viene trasferita in una nuova *ependorf* a cui sono aggiunti 600 µL di etanolo 70% e mixati per bene. Si trasferiscono poi 700 µL di campione in una colonna *RNeasy spin* posizionata in una *ependorf* da 2 mL, viene chiusa e centrifugata a 8000 x g per 15 s. Al termine della centrifuga viene eliminato il *flow-through* e la colonnina viene trasferita in un'altra *ependorf*. Vengono quindi aggiunti 700 µL di *buffer RW1*, e si procede come nel passaggio precedente. La colonna viene ulteriormente trasferita in una *ependorf* nuova a cui vengono aggiunti 500 µL di *Buffer RPE* e centrifugato per 2 min a 8000 x g. Infine per eliminare tutti gli eventuali residui di buffer, viene effettuata un'ulteriore centrifugazione della colonnina senza aggiungere nulla. A questo punto la colonna *RNeasy spin* viene trasferita in una *ependorf* da 1,5 mL a cui si aggiungono 35 µL di acqua *RNAsi free* e si centrifuga a 8000 x g per 1 minuto per eluire l'RNA. L'estrazione dell'RNA è così completata e si può passare all'analisi successiva. La qualità e la concentrazione di RNA estratto è stata determinata attraverso l'uso dello spettrofotometro *NanoDrop™ ND-1000* (Celbio S.p.A., Milano, Italia). Una volta terminata questa parte, i campioni sono pronti per la reazione di retrotrascrizione.

### 2.2.2 Retrotrascrizione

Il cDNA è stato ottenuto usando il kit *SuperScript® III Reverse Transcriptase (ThermoFisher)*. In dettaglio, 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA seguendo il protocollo. Si prepara la miscela di reazione contenente: 1 µl di random primers, 1 µg di RNA totale, 1 µL di dNTP mix (10mM) e H<sub>2</sub>O fino a raggiungere un volume finale di 13 µL totali. Questa viene incubata a 65°C per 5 min per la denaturazione del campione e successivamente messa in ghiaccio per 1 min. Al termine del processo di denaturazione è stata addizionata al campione la seguente miscela di reazione: 4 µL di 5X *First Strand Buffer*, 1 µL di 0.1 M DTT, 1 µL di *RNAse inhibitor*, 1 µL di *SuperScript III RT* (200 U/µL).

Le seguenti condizioni di reazione sono state applicate per la trasformazione di RNA in cDNA: 25°C per 5 min → 55°C per 60 min → 70°C per 15 min

Per ogni campione retrotrascritto è stata eseguita una reazione di retrotrascrizione con una miscela di reazione priva dell'enzima retrotrascrittasi. Questi campioni sono stati considerati come controllo negativo della reazione di retrotrascrizione.

### 2.2.3 Real-Time PCR

Per valutare l'espressione dei canali appartenenti alla famiglia dei TRP nelle cellule TM4 non trattate è stata eseguita una *Real time PCR* utilizzando una piastra da 96 pozzetti. Per ogni campione è stata eseguita una reazione di amplificazione per i geni *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPV4* e *β-actina* come gene *housekeeping* per la normalizzazione dei dati, utilizzando i seguenti *primers*:

- *TRPV1: Forward: 5'-ATCATCAACGAGGACCCAGG-3'; Reverse: 5'-TGCTATGCCTATCTCGAGTGC-3'*
- *TRPV2: Forward: 5'-CGATGAGTTCTACCGAGGCC-3'; Reverse: 5'-TCACCACATCCCCTGCTTG-3'*
- *TRPV3: Forward: 5'-CAAGGACTGCCACCACCATC-3'; Reverse: 5'-CATCACAGTTGCCAGAGAGG-3'*
- *TRPV4: Forward: 5'-GAGTCCTCAGTAGTGCCTGG-3'; Reverse: 5'-CAACAAGAAGGAGAGCAGTC-3'*
- *β-ACTINA: Forward: 5'-GCTATGCTCTCCCTCACGCCA-3'; Reverse: 5'-GCTATGCTCTCCCTCACGCCA-3'*

Per valutare l'espressione del *CYP19A1* nelle cellule TM4 trattate con capsaicina 5 µM, 10 µM e calore (42°C) è stata eseguita una *Real time PCR* utilizzando una piastra da 96 pozzetti. Per ogni campione è stata eseguita una reazione di amplificazione per *CYP19A1* utilizzando i seguenti *primers*: *Forward: 5'-ATCATGGGCCTCCTTCTCCT-3'* e *Reverse: 5'-GCACTTCCAATCCCCATCCA-3'*. Il gene

*GAPDH* è stato utilizzato come gene *housekeeping* per la normalizzazione dei dati e sono stati utilizzati i seguenti *primers* per la sua amplificazione: *Forward*: 5'-CTGCCACTTCAACAGCAACT -3' e *Reverse*: 5'-GAGTTGGGATAGGGCCTCTC -3'.

In particolare, la reazione di amplificazione in entrambi i tipi di analisi è stata eseguita in un volume finale di 20  $\mu$ l contenenti: 2  $\mu$ l di cDNA, 5  $\mu$ l di *Sybr® Master Mix* (*Applied Biosystem*), 0.5  $\mu$ l del *primer forward* 10 $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l del *primer reverse* 10 $\mu$ M, 2  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O milli Q filtrata.

Le condizioni della reazione di RT-PCR sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95° per 10 minuti seguita da 40 cicli a 95° per 15 secondi, 60° per 1 minuto. Per la curva di melting le condizioni di temperatura sono state le seguenti: 95° per 15 secondi, 60° per 1 minuto, 95° per 15 secondi. L'amplificazione dei prodotti è stata eseguita con il termociclatore *StepOne Plus™ 2.1* (*Applied Biosystems*), mentre l'elaborazione dei dati è stata fatta mediante la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 2.3 SAGGIO MTT

Il saggio MTT viene utilizzato per misurare l'attività metabolica delle cellule sottoposte a un certo stimolo dato dalla sostanza di interesse da testare. Al termine di questo saggio si ottiene un indice della proliferazione e della vitalità cellulare e della citotossicità del trattamento di interesse. L'MTT è un saggio colorimetrico dal momento che si basa sulla riduzione di un sale di tetrazolio giallo (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT) da parte degli enzimi reduttasi NAD(P)H-dipendenti, i quali sono contenuti solo nelle cellule metabolicamente attive e che riducono l'MTT a formazano (*Figura 8A*). Quest'ultimo viene prodotto sottoforma di cristalli insolubili che devono essere dissolti con una soluzione di solubilizzazione composta SDS 1% HCl 0,1M. Al termine del processo di dissoluzione, si otterrà una soluzione dal colore violaceo, la cui intensità dipenderà dal numero di cellule vitali e che verrà quantificata misurando l'assorbanza a 530 nm tramite un apposito spettrofotometro.

Dopo aver seminato le cellule alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto in 100  $\mu$ l di terreno di coltura in una piastra 96 *wells* e atteso che queste abbiano raggiunto il livello di crescita ottimale, si è dato inizio allo stimolo con Capsaicina (*Sigma-Aldrich*, M2028-50 mg). Si sono preparate le giuste aliquote di terreno addizionato con le varie concentrazioni di capsaicina di interesse: 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M. Nei vari pozzetti, dopo aver rimosso il terreno di coltura "originale", sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di terreno con la corrispondente concentrazione di capsaicina per ciascun pozzetto. Ciascuna concentrazione di interesse è stata testata in quadruplicato. Al termine dell'incubazione di 24 h a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>, sono stati aggiunti 10  $\mu$ l di MTT *Reagent* (*Roche*, 11465007001; Concentrazione finale: 0,5 mg/ml) a ogni pozzetto. La piastra è stata poi incubata

per 4 ore, al termine delle quali sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di soluzione di solubilizzazione SDS 1%, HCl 0,1M ad ogni pozzetto, risospendendo accuratamente. La piastra viene ulteriormente incubata *overnight* nell'incubatore impostato come descritto in precedenza e trascorso il tempo necessario per completare la solubilizzazione dei cristalli viola di formazano (Figura 8 A), si è passati alla misurazione dell'assorbanza tramite il lettore di piastra *Mithras* (Berthold technologies; LB940) effettuando la lettura con una lunghezza d'onda di 530nm.

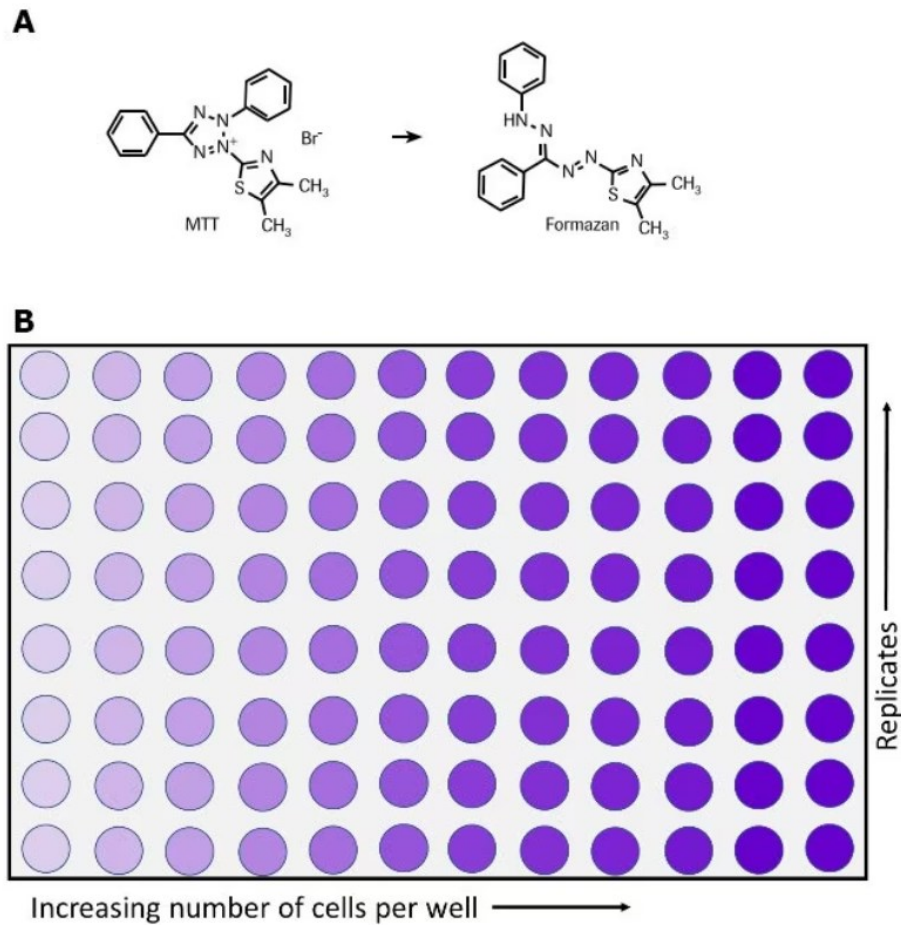


Figura 8. A) Reazione chimica di conversione da parte delle cellule vitali dell'MTT a un sale di formazano; B) esempio di piastra 96-well. (credits: sigmaaldrich.com)

## 2.4 CALCIUM IMAGING

La metodica del *Calcium Imaging* viene utilizzata per verificare l'effettiva funzionalità del canale cationico TRPV1 a seguito dello stimolo col suo agonista specifico capsaicina.

Come prima cosa, le cellule TM-4 sono state seminate con una densità di circa 30000 cellule/well in una piastra 4-well (Sarstedt, #94.6170.402) e lasciate

crescere in condizioni standard fino a quando hanno raggiunto una confluenza di circa 70%. Di seguito le cellule sono state incubate con FLUO-4 AM (*Thermo Fisher*, #F14201), molecola marcata utilizzata per evidenziare la presenza di ione Calcio, dal momento che a seguito del suo legame con lo ione mostra un aumento della fluorescenza. Per effettuare questa metodica, è stato necessario ricorrere all'utilizzo di *Pluronic*<sup>®</sup> F-127 (*Sigma-Aldrich*, P2443), un detergente non ionico utile per solubilizzare molecole idrofobiche come il FLUO 4-AM utilizzato in questo lavoro, in modo da facilitarne l'ingresso nelle cellule.

Dopo aver solubilizzato il FLUO 4-AM in dimetilsolfossido (DMSO) a una concentrazione pari a 5 mM, è stato poi unito in rapporto 1:10 con un volume di 40 µL di *Pluronic*<sup>®</sup> F-127 20% in DMSO. La soluzione così ottenuta è stata poi aggiunta a un'aliquota di DMEM (*EuroClone*; #ECM0095) fino a raggiungere una concentrazione finale di FLUO 4-AM pari a 5 µM. Dalla piastra 4-well contenente le cellule, è stato rimosso il terreno pre-esistente ed è stato sostituito con il terreno contenente il FLUO 4-AM solubilizzato con l'acido pluronico e si è lasciato agire per 30 minuti in incubatore a 37°C. Successivamente la soluzione col FLUO 4-AM è stata rimossa, sostituita con DMEM senza aggiunte e dopo aver atteso circa 30 minuti, si è proceduto con l'analisi mediante microscopio LSM 800 (*Zeiss*). La piastra 4-well è stata posizionata nell'apposito spazio del microscopio in grado di mantenere la temperatura a 37°C e dopo aver messo a fuoco un campo di interesse, è stata aggiunta nel pozzetto la Capsaicina (*Sigma-Aldrich*, M2028-50 mg) a una concentrazione finale di 10 µM. Si è poi atteso il tempo necessario di circa 30 minuti per rilevare un cambio di fluorescenza a livello delle cellule considerate. Per validare l'analisi è stato utilizzato come controllo positivo il calcio ionoforo A23187 a una concentrazione di 5 µM (*Sigma-Aldrich*, C7522) solubilizzato in DMSO e come controllo negativo, si è effettuata una co-incubazione con capsaicina e capsazepina, sempre alla concentrazione di 10 µM (*Sigma-Aldrich*, C191-25MG), la quale rappresenta un antagonista specifico di TRPV1.

## 2.5 STIMOLO CELLULE CON CAPSAICINA e TNF- $\alpha$

Le cellule TM4 sono state seminate nelle piastre 6-well, con una quantità di cellule pari a  $0,3 \times 10^6$  in ogni pozzetto. Una volta che queste hanno raggiunto una confluenza di circa il 70%, prima di iniziare lo stimolo vero e proprio con la sostanza di interesse, le cellule sono state *starvate*. Questo si fa sostituendo il terreno di coltura classico, con un nuovo terreno di coltura contenente FBS CT (*heat inactivated*) invece del normale FBS e lasciando le varie piastre in incubatore con le solite condizioni *overnight*. Trascorso questo tempo, si può procedere con l'inizio dello stimolo vero e proprio. Viene quindi preparata un'aliquota di terreno

di *starving* addizionato di IBMX 0,1M che serve per inibire le cAMP fosfodiesterasi, e questo verrà utilizzato per preparare le varie diluizioni di capsaicina da testare. La capsaicina (*Sigma-Aldrich*, M2028-50 mg) è stata prima solubilizzata in DMSO per ottenere una soluzione madre con la concentrazione di 0,1 M e successivamente sono stati effettuati i vari calcoli delle diluizioni, tenendo in considerazione i risultati del saggio MTT, in modo da ottenere delle aliquote di terreno preparato come indicato sopra con concentrazioni di 10  $\mu$ M e 5  $\mu$ M di capsaicina. Le cellule sono state incubate con questo stimolo per 24 ore a una temperatura di 37°C, 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di umidità.

Per quanto riguarda lo stimolo con TNF- $\alpha$  (*Sigma-Aldrich*, T7539) si procede come descritto precedentemente fino al passaggio di *starving* (compreso). Successivamente, dopo aver diluito opportunamente la soluzione madre di TNF- $\alpha$  (0,1  $\mu$ M) si è preparata un'aliquota di terreno di *starving* con concentrazione finale di 0,02 nM di TNF- $\alpha$ , corrispondente a 10 ng/mL (23), e si è sostituito il terreno con questa soluzione negli appositi pozzetti. Le piastre così preparate sono state lasciate in incubazione a 37°C *overnight* e il giorno successivo si è proceduto con la raccolta delle cellule.

## 2.6 STIMOLO CELLULE CON CALORE

Per procedere con lo stimolo delle cellule mediante l'utilizzo della temperatura di 42°C per 1 ora, si è proceduto come descritto precedentemente seminando le cellule TM-4 in piastre da 6 *wells* e mettendole poi in *starving overnight*. Per questo stimolo sono state preparate due piastre identiche: una è stata lasciata in incubatore a 37°C, mentre l'altra è stata parafilmata e trasferita in un apposito macchinario (*IKA® KS 4000 i control*) settato a 42° ed è stata lasciata in incubazione per 1 ora. Al termine di questo periodo di tempo, la piastra è stata successivamente trasferita in incubatore a 37°C, dove è stata lasciata insieme all'altra piastra *overnight*. Il giorno seguente si è proceduto con la raccolta cellulare.

## 2.7 FRAZIONAMENTO CELLULARE

Il *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells* (*Thermo Scientific™*, # 78840) permette la separazione e preparazione a *steps* successivi di estratti proteici da 5 diversi compartimenti cellulari: citoplasma, membrana, nucleo, cromatina e citoscheletro.

In questo lavoro viene utilizzato per ottenere estratti proteici frazionati a partire dalle cellule trattate con i vari stimoli descritti precedentemente con lo scopo di ricercare, tramite la successiva analisi con *Western Blot*, l'eventuale presenza del

fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B a livello dei vari compartimenti cellulari. Come prima cosa è necessario aggiungere al volume da utilizzare dei vari reagenti l'inibitore delle proteasi fornito dal kit in concentrazione 1:100. Si prendono quindi i pellet ottenuti dopo la centrifugazione a 13000 giri per 10 minuti a 4°C, effettuata dopo la raccolta delle cellule con *Lysis Buffer*, e in base al volume di pellet, si aggiunge il volume di reagente corrispondente come riportato in Tabella 1

<u>Packed Cell Volume (<math>\mu</math>L)</u>	<u>CEB (<math>\mu</math>L)</u>	<u>MEB (<math>\mu</math>L)</u>	<u>NEB (<math>\mu</math>L)</u>	<u>NEB (<math>\mu</math>L)</u> +CaCl <sub>2</sub> , MNase <sup>†</sup>	<u>PEB (<math>\mu</math>L)</u>
10	100	100	50	50	50
20	200	200	100	100	100
50	500	500	250	250	250
100	1000	1000	500	500	500

\*For HeLa cells,  $2 \times 10^6$  cells is equivalent to 20 $\mu$ L packed cell volume. <sup>†</sup>MNase = Micrococcal Nuclease

Tabella 1: Volumi di buffer da utilizzare in base ai corrispondenti volumi di pellet cellulare. (credits: thermofisher.com)

Si procede quindi con la aggiunta di CEB al pellet cellulare nelle *ependorf*, inducendo la permeabilizzazione selettiva della membrana, con conseguente rilascio del contenuto citoplasmatico solubile. Si lascia in incubazione per 10 minuti a 4°C in leggera oscillazione. Le varie *ependorf* vengono poi centrifugate a 500 x *g* per 5 minuti, al termine dei quali il surnatante contenente l'estratto citoplasmatico di interesse viene trasferito in una nuova *ependorf* pre-raffreddata. Al pellet rimasto viene aggiunto il volume corrispondente di MEB che dissolve il plasma, i mitocondri e le membrane del Golgi e del RE, ma non interferisce con le membrane nucleari. Le *ependorf* vengono prima vortexate per 5 secondi, poi incubate a 4°C per 10 minuti in leggera oscillazione e infine vengono centrifugate a 6000 x *g* per 7 minuti. Viene poi trasferito il surnatante contenente il materiale estratto di interesse in una nuova *ependorf*. Viene poi aggiunto al pellet il volume di NEB necessario, il quale libera gli estratti nucleari solubili. Questo per reagire correttamente richiede prima di vortexare i campioni per 15 secondi e successivamente di lasciare in incubazione a 4°C per 30 minuti in leggera oscillazione. Trascorso questo tempo, le *ependorf* vengono poi centrifugate a 7000 x *g* per 7 minuti, al termine dei quali viene raccolto il surnatante e trasferito in una nuova *ependorf*. Il passaggio successivo richiede la preparazione del reagente necessario per l'estrazione delle proteine legate alla cromatina che consiste nell'aggiungere 5 $\mu$ L di 100mM CaCl<sub>2</sub> e 3 $\mu$ L di MNase (fornite dal kit) per 100 $\mu$ L di NEB a temperatura ambiente. Viene quindi messa la giusta aliquota di questo reagente nel pellet ricavato nel passaggio precedente e incubata per 5 minuti nel bagnetto a 37°C. Le *ependorf* vengono poi vortexate per 15 secondi prima di essere centrifugate per 7 minuti a 1300 x *g*. Viene poi trasferito il surnatante in una nuova provetta e al pellet rimasto viene aggiunto l'ultimo reagente di estrazione PEB, che serve per isolare le proteine citoscheletriche e



lasciato reagire per 10 minuti a temperatura ambiente, dopo aver vortexato le *eppendorf* per 15 secondi. Segue quindi la centrifugazione finale a 13000 x g per 8 minuti al termine della quale viene trasferito il surnatante in una nuova *eppendorf*. I vari estratti proteici frazionati così ottenuti, possono essere quindi usati per le analisi successive che in questo caso sono la quantificazione proteica con metodo *Bicinchoninic acid assay* (BCA) e il successivo *Western Blot* per la ricerca di proteina NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

## 2.8 WESTEN BLOT

Il *Western blot* è una tecnica di laboratorio fondamentale per rilevare la presenza di specifiche proteine di interesse in diversi tipi di campioni come sangue, tessuto o estratto cellulare, come in questo lavoro. La metodologia consiste inizialmente nella separazione delle varie proteine secondo il proprio peso molecolare attraverso gel elettroforesi, a questo segue il trasferimento delle proteine separate su una membrana di nitrocellulosa e infine quest'ultima viene incubata con un anticorpo specifico per la proteina di interesse. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati:

- Anti  $\beta$ - actina (*Cell Signaling*, #8457) fatto in coniglio; diluizione 1:1000
- Anti-TRPV1 (*abcam*, ab305299) fatto in coniglio; diluizione 1:1000
- Anti-FasL (*Cell Signaling*, #72062) fatto in coniglio; diluizione 1:1000
- Anti- Caspasi 3 (*Cell Signaling*, #14220) fatto in coniglio; diluizione 1:1000
- Anti- NF- $\kappa$ B (*Cell Signaling*, #8242) fatto in coniglio; diluizione 1:1000

### 2.8.1 Raccolta e lisi cellulare

Per prima cosa le cellule precedentemente seminate e opportunamente stimulate nelle piastre 6 *wells* (circa  $1 \times 10^6$  per pozzetto) sono state raccolte attraverso la tecnica dello '*scraping*' che consiste nel raccogliere il terreno da ciascun pozzetto, effettuare 3 lavaggi con PBS 1X, aliquotare in ogni pozzetto 200  $\mu$ l di *lysis buffer* (Tris 1M, NaCl 2M, NP-40 1%, inibitori proteasi 1:100, H<sub>2</sub>O milliQ ) e infine mediante un apposito strumento "raschiare" il fondo di ogni pozzetto in modo da far staccare le cellule e raccoglierle successivamente in una *eppendorf*. Tutta la procedura è stata svolta in ghiaccio in modo da impedire la degradazione proteica. A questo punto, le cellule così raccolte sono state centrifugate a 13000 giri per 10 minuti a 4° C con lo scopo di rimuovere i detriti cellulari, i quali andranno a formare il pellet, mentre il surnatante, all'interno del quale si trovano tutte le proteine

rilasciate grazie al processo di lisi, è stato trasferito in un'altra provetta ed è stato utilizzato per le analisi successive.

### 2.8.2 Quantificazione proteica mediante BCA

Il kit per il saggio proteico *Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™; #23225)* viene utilizzato per determinare la concentrazione proteica totale dei vari lisati cellulari raccolti nel passaggio precedente ed è un passaggio necessario per poter calcolare la quantità di proteina da caricare nel gel del *Western Blot*. Tutti i campioni che verranno analizzati nello stesso gel durante la metodica del *Western Blot* devono essere caricati alla medesima quantità per poter essere confrontati adeguatamente. Il saggio è di tipo colorimetrico e si basa sulla riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  da parte delle proteine in ambiente alcalino. Due molecole di acido bicinconinico (BCA) si chelano con lo ione  $\text{Cu}^+$ , formando un prodotto di reazione dal colore viola con assorbanza a 562 nm. Si lavora in ghiaccio utilizzando una piastra 96 *well* e in ogni pozzetto vengono caricati 10  $\mu\text{L}$  di campione e successivamente 200  $\mu\text{L}$  di *working solution (reagent B 1:50 reagent A)*. La piastra viene opportunamente coperta con carta stagnola e collocata in incubatore a 37°C per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione, viene misurata l'assorbanza a 530 nm e successivamente viene calcolata la quantificazione proteica di ciascun campione.

### 2.8.3 Western blot

In questo lavoro, il *Western Blot* è stato utilizzato per confermare innanzitutto la presenza di TRPV1 nelle cellule TM-4, e successivamente per valutare la presenza di proteine marker di apoptosi: FasL, Caspasi 3 e NF- $\kappa\text{B}$ .

La prima parte della tecnica consiste nel separare le proteine in base al loro peso molecolare mediante l'utilizzo di un gel di poliacrilamide (*Bio-RAD, 4–20% Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel, 18 well, 30  $\mu\text{L}$  #5671094*) in condizioni denaturanti per far sì che le proteine migrino a seconda del loro peso molecolare. Ciascun campione viene preparato in ghiaccio unendo il volume di lisato cellulare corrispondente alla quantità proteica che si è scelto di caricare, 1/5 del volume totale di 4x *Leammi Sample Buffer (Bio-RAD, #1610747)* e *Lysis buffer* per portare al volume finale di 30  $\mu\text{L}$ . I campioni così preparati vengono poi fatti bollire a 100° per 10 minuti e poi incubati in ghiaccio per altri 10 minuti prima di procedere col caricamento del gel. Insieme ai campioni viene caricato anche il marker di peso molecolare *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-RAD®, #161-0374)*. Viene quindi fatta partire la corsa a 180V per circa 40 minuti.

Terminata la corsa elettroforetica, si procede con la fase di *blotting* in cui le proteine vengono trasferite dal gel dove si sono separate secondo il loro peso molecolare alla membrana di nitrocellulosa mediante l'utilizzo della corrente elettrica. Viene quindi preparato il "sandwich" utilizzando dei supporti in plastica e delle spugne e dei cartoncini ben imbevuti di buffer di trasferimento ( $H_2O$  milliQ, 10 x *Tris/Glycine Buffer* e metanolo) dal momento che il *blot* viene eseguito in modalità *wet*. L'ordine del *sandwich* è visibile nella *Figura 9* ed è importante che l'apparato sia chiuso strettamente per evitare la presenza di bolle, che potrebbero disturbare le analisi successive. Il tutto viene poi collocato nell'apposita vaschetta precedentemente riempita di buffer di trasferimento, e viene impostata la corrente a 100 V per 1 ora, mantenendo tutto l'apparato ben refrigerato.

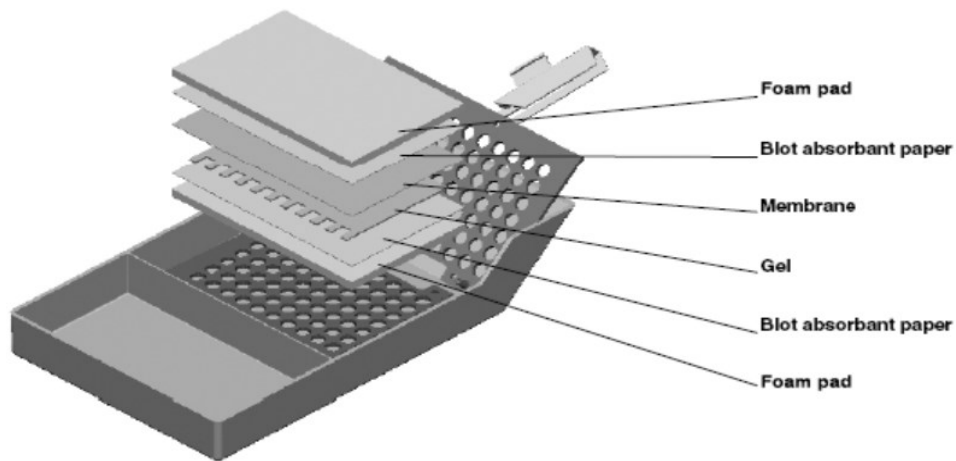


Figura 9. Assemblaggio del "sandwich" per il trasferimento (credits: bio-rad.com)

Una volta terminato il trasferimento, la membrana viene estratta dalla cella e sviluppata col colorante rosso *Ponceau* (*Fluka*, 09189) per verificare che il *blot* sia avvenuto in modo ottimale e si vedano quindi chiaramente le varie bande delle proteine separate. Si procede poi con una serie di lavaggi della membrana con PBS *Tween* 0,1% per rimuovere i residui della colorazione prima di procedere con la fase di *blocking* che consiste nell'incubare la membrana per 15 minuti a temperatura ambiente e in leggera agitazione con la soluzione di bloccaggio *EveryBlot Blocking Buffer* (*Bio-RAD*®; #12010020) con lo scopo di saturare i siti non specifici. Successivamente, la membrana viene incubata *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario di interesse tra quelli citati precedentemente, diluiti nella stessa sostanza usata per il *blocking*. Il giorno successivo vengono effettuati 3 lavaggi in PBS 1X *Tween* 0,1% prima di procedere con l'incubazione per 1 ora, a temperatura ambiente e senza esposizione alla luce, dell'anticorpo secondario HRP-coniugato specifico per gli anticorpi di coniglio (*Cell Signalling*, #7074) diluito 1:1000 in *blocking solution*. Infine, al termine dell'incubazione, vengono effettuati altri 3 lavaggi della membrana con PBS 1X *Tween* 0,1% prima di farla reagire con

la soluzione di rilevazione *WesternBright™* (Advansta; #K-12045-D50) contenente luminolo che viene ossidato ad opera di HRP che emette un segnale luminoso visualizzabile mediante *ImageQuant LAS 500*. Si visualizzerà quindi una banda di intensità dipendente alla quantità di proteina ricercata mediante l'anticorpo primario corrispondente la quale sarà presente all'altezza del marker corrispondente al peso della proteina stessa.

## 2.9 KIT ELISA cAMP

Il kit *cAMP in vitro competitive ELISA* (Abcam; #ab290713) è utilizzato per l'immunodosaggio colorimetrico quantitativo dell'*cAMP* intracellulare in cellule trattate con acido cloridrico (HCl 0,1M). L'*cAMP* è un importante secondo messaggero coinvolto in vari processi fisiologici e in questo lavoro si vuole valutare se la sua produzione viene compromessa a seguito dello stimolo delle cellule TM-4 con capsaicina e calore.

Si utilizza una piastra 96-well pre-incubata con un anticorpo (di capra) *anti-rabbit IgG*, all'interno della quale vengono caricati la standard e i campioni da testare insieme alla fosfatasi alcalina (AP) coniugata con l'antigene *cAMP* e con un anticorpo policlonale di coniglio specifico per l'*cAMP*. Dopo l'incubazione viene aggiunto il substrato pNpp generando all'interno dei pozzetti utilizzati una soluzione di colore giallo che verrà letta a 405 nm e la cui intensità sarà proporzionale alla quantità di *cAMP* presente nel pozzetto. Come prima cosa viene effettuata la raccolta dei vari campioni di interesse: le cellule sono state seminate sulle piastre 6-well e stimolate come descritto precedentemente con calore e capsaicina e incubate secondo i tempi riportati. Al termine dei vari periodi di incubazione è stata effettuata la raccolta e lisi cellulare. In questo caso viene prima rimosso il terreno presente dalle cellule e dopo un lavaggio con PBS 1x, viene aggiunto sul pozzetto un volume di HCl 0,1M pari a 500 µL. L'HCl è lasciato in incubazione per circa 15 min a temperatura ambiente e successivamente per facilitare il distacco delle cellule dal fondo del pozzetto, è stato utilizzato uno *scraper* e infine le cellule sono state trasferite in una *ependorf*. Prima di poter essere utilizzate per l'analisi successiva, le varie *ependorf* contenenti le cellule appena raccolte con HCl sono state centrifugate a 600 x g per 15 min. Si è formato così il pellet con i residui cellulari e il surnatante è stato raccolto per poter essere analizzato. Viene poi preparata la standard diluendola alle varie concentrazioni pmol/mL: 20, 50, 12,5, 3,13, 0,78 e utilizzando come mezzo l'HCl 0,1M utilizzato anche per la raccolta dei campioni cellulari. Si procede quindi al caricamento della piastra in cui oltre alla standard e ai campioni in duplicato vengono anche caricati il bianco (B<sub>s</sub>) contenente solo il substrato, il coniugato (5 µL) e il substrato per valutare la *total activity* (TA), NSB (*non specific binding*) con all'interno il diluente

(HCl 0,1 M), il coniugato e il substrato e  $B_0$  che corrisponde al valore della standard con concentrazione di 0 pmol/mL e contiene HCl 0,1M, il coniugato, l'anticorpo e il substrato. Si caricano 100  $\mu$ L per pozzetto di ogni campione e della standard insieme a 50  $\mu$ L di reagente neutralizzante e successivamente 50  $\mu$ L di *Cyclic AMP Complete Alkaline Phosphatase* di colore blu (coniugato) e 50  $\mu$ L di *Cyclic AMP Complete Antibody* (substrato) di colore giallo. La piastra così preparata avrà i vari pozzetti di colore verde e viene incubata a temperatura ambiente in leggera agitazione per 2 ore, al termine delle quali vengono effettuati un totale di 3 lavaggi con 200  $\mu$ L di *Wash Buffer 1X* fornito nel kit. Al termine di questa fase in ogni pozzetto, vengono aggiunti 200  $\mu$ L di substrato pNpp e lasciato in incubazione per 1 ora e mezza a temperatura ambiente e in leggera agitazione. Trascorso questo tempo, vengono aggiunti 50  $\mu$ L di *Stop Solution* in ogni pozzetto e dopo di ciò la piastra deve essere letta immediatamente utilizzando un lettore di piastre settato con assorbanza a 405 nm. Il valore dell'assorbanza calcolato sarà proporzionale alla quantità di cAMP presente nei campioni analizzati e nella standard.

## 2.10 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SPSS 23 *Statistics per Windows* (Chicago, IL) e *GraphPad PRISM 9.4.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Il confronto dei valori medi dei due gruppi è stato effettuato mediante il test t di *Student*. Le differenze nel valore medio di più di due gruppi sono state condotte utilizzando il test ANOVA con il test *post hoc* di correzione di Bonferroni per confronti a coppie tra sottogruppi. I valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati significativi.

## RISULTATI

### 4.1 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEI TRPS NEL MODELLO CELLULARE DI TM-4

#### 4.1.1 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR di canali appartenenti alla famiglia dei TRPs

È stata valutata preliminarmente l'espressione genica di un pannello di canali appartenenti alla famiglia dei TRPs. In particolare, sono stati analizzati i geni per i canali *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPV4* che vengono attivati da stimoli termici compresi tra i 27°C circa e i 52°C. L'analisi tramite RT-PCR eseguita al basale su cellule TM4 ha evidenziato livelli rilevanti di mRNA del gene *TRPV1* rispetto agli altri canali della famiglia considerata (*Figura 10 A*). A seguito di tale risultato, tutti i successivi esperimenti sono stati orientati alla caratterizzazione funzionale di TRPV1.

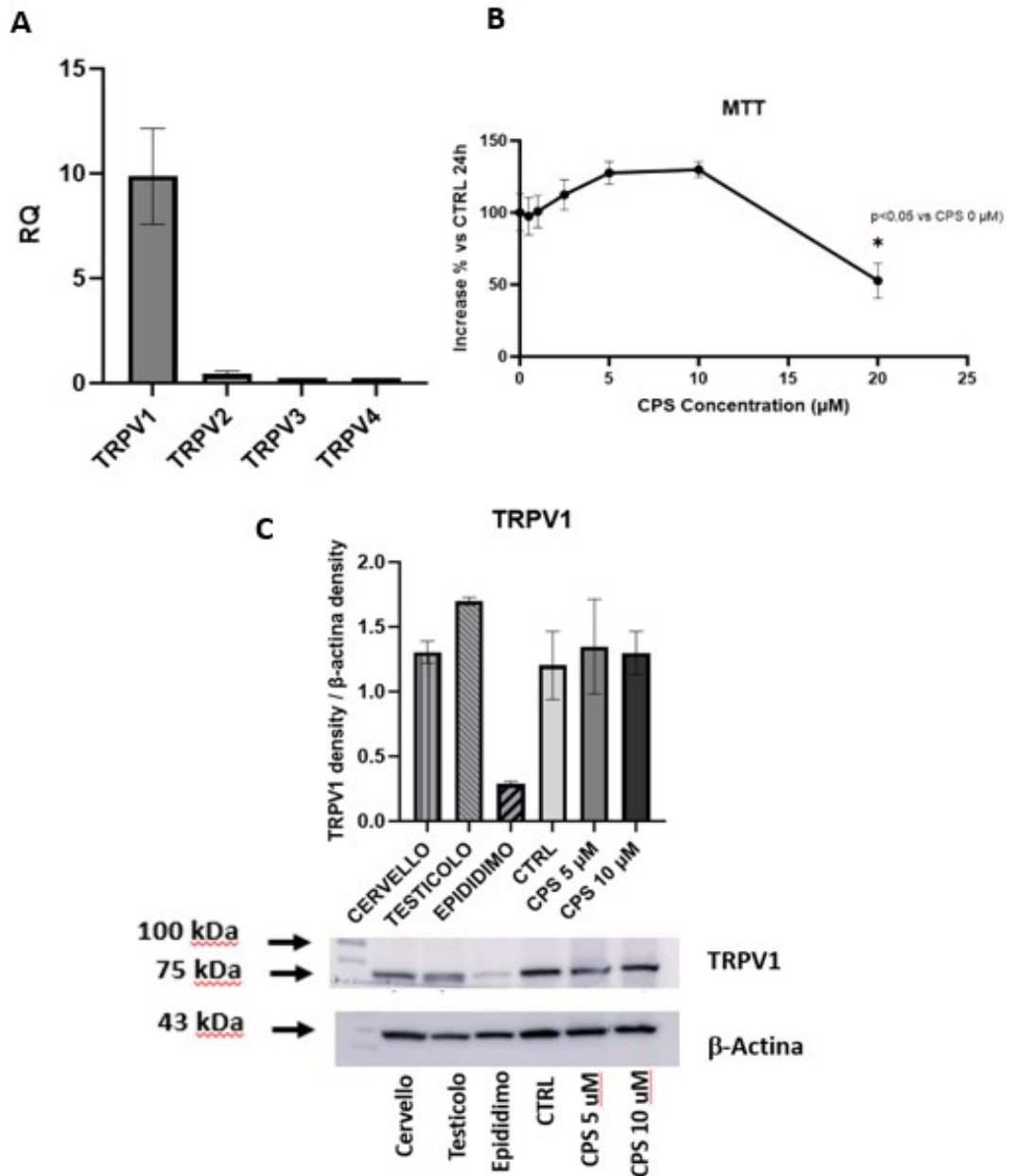
#### 4.1.2 Saggio di vitalità MTT

Una volta stabilito che l'unico TRP espresso a livelli significativi nel modello cellulare di cellule del Sertoli TM4 fosse TRPV1, è stato successivamente caratterizzato il possibile ruolo funzionale di tale proteina. La stimolazione con il vanilloide capsaicina (CPS), agonista specifico di TRPV1, è stata associata a degenerazione apoptotica legata all'eccessivo afflusso cellulare di calcio (24). Inizialmente è stata quindi valutata la vitalità cellulare, mediante saggio con MTT, a seguito del trattamento per 24 ore con CPS a concentrazioni crescenti da 0 a 20 µM (*Figura 10 B*). Una significativa riduzione della vitalità veniva evidenziata solo alla concentrazione più alta testata di 20 µM, rispetto alla condizione di controllo nella quale la CPS veniva omessa. A seguito di tale evidenza, nei successivi esperimenti la massima concentrazione di CPS utilizzata era di 10 µM.

#### 4.1.3 Analisi espressione proteica TRPV1 mediante *Western Blot*

A conferma dell'espressione di TRPV1 da parte delle cellule TM4, è stato eseguito un saggio di espressione proteica mediante *Western Blot Analysis*. Oltre a campioni di cellule TM4 al basale, sono stati utilizzati campioni di cellule trattate con CPS a concentrazioni sicuramente non tossiche per il modello cellulare, in particolare 5 µM e 10 µM. Come tessuti di riferimento per la sicura espressione di TRPV1, sono stati utilizzati cervello e testicolo di topo. Dall'altro canto, l'epididimo murino è stato utilizzato come tessuto di riferimento per la bassa espressione di TRPV1(16) (*Figura 10 C*). Come atteso, la proteina TRPV1 è risultata fortemente espressa a livello cerebrale e testicolare, mentre livelli nettamente inferiori sono stati riscontrati a livello epididimale. I livelli di espressione proteica di TRPV1 nelle cellule TM4 erano confrontabili con quelli di cervello e testicolo. È inoltre

interessante notare che la stimolazione con CPS per 24 ore non era associata ad alcuna variazione significativa dei livelli di TRPV1 rispetto al basale, indipendentemente dalle concentrazioni testate.



**Figura 10.** A) Espressione genica di TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 ottenuti mediante RT-PCR effettuata su campioni da cellule TM4 al basale. I dati sono riportati come quantificazione relativa con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

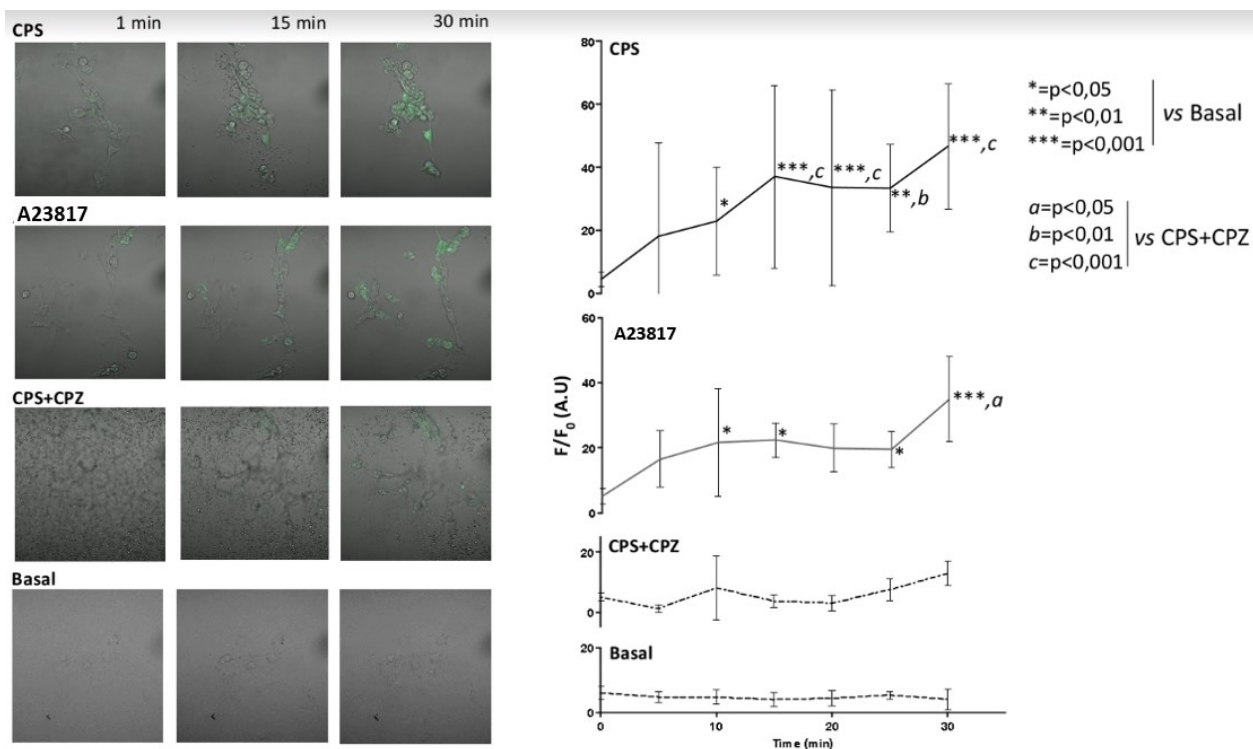
B) Analisi della vitalità cellulare, mediante Saggio MTT dopo 24 ore di esposizione a capsaicina (CPS) alle concentrazioni di 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ . Significatività 20  $\mu\text{M}$  vs CTRL (0  $\mu\text{M}$ ): \*= p-value <0,05.

C) Analisi di espressione proteica mediante Western Blot, in diversi tessuti di topo e in cellule TM4, con e senza stimolo (CTRL) con CPS alle concentrazioni di 5 o 10  $\mu\text{M}$ . Tutti i risultati sono riportati come valori medi di tre esperimenti indipendenti.

#### 4.1.4 *Calcium Imaging*

Considerato il ruolo di TRPV1 come canale ionico non specifico, è stato condotto un esperimento di *Calcium Imaging* che permette di verificare l'effettiva funzionalità di TRPV1 valutando le variazioni delle concentrazioni di calcio intracellulari a seguito dello stimolo col suo agonista specifico capsaicina. A tale scopo, è stata utilizzata la sonda fluoroforica intracellulare calcio sensibile FLUO4-AM. La concentrazione di calcio intracellulare è stata monitorata indirettamente registrando nel tempo le fluttuazioni di fluorescenza del FLUO4-AM. Un campione basale di cellule nel quale veniva omesso qualsiasi tipo di trattamento, fungeva da controllo. Tutti i campioni sono stati monitorati fino a 30 minuti dopo l'eventuale stimolo (*Figura 11*). Come atteso, nel campione di controllo non si osservavano modificazioni della fluorescenza nell'arco del periodo di osservazione. Diversamente, lo stimolo con CPS 10  $\mu$ M si associava ad un progressivo aumento della fluorescenza cellulare, fino a diventare significativamente diversa dal controllo già dopo 10 minuti dallo stimolo. Tempi di esposizione superiori a 10 min si associavano ad un ulteriore e progressivo aumento della fluorescenza. Un campione di cellule trattate con ionoforo del calcio A23187 veniva utilizzato come controllo di riferimento positivo per l'esecuzione del saggio. Le cellule trattate con A23187 presentavano un progressivo aumento della fluorescenza cellulare, i cui livelli divenivano significativamente maggiori del controllo dopo 10 minuti dall'esecuzione dello stimolo. Un ulteriore significativo aumento della fluorescenza veniva osservato dopo 30 minuti dall'applicazione di A23187. È interessante notare come la pre-incubazione per 30 minuti con capsazepina (CPZ), antagonista competitivo di CPS (25), si associava ad una quasi totale perdita di risposta cellulare al successivo stimolo con CPS, ad indicare un ruolo diretto nell'aumento di calcio intracellulare di quest'ultima mediante l'attivazione di TRPV1.





**Figura 11.** Effetto della stimolazione con capsaicina (CPS) 10  $\mu$ M, con e senza capsazepina (CPZ) 10  $\mu$ M, sui livelli di calcio intracellulare, in cellule TM4, valutato attraverso la fluorescenza della sonda FLUO4-AM in un periodo di osservazione fino a 30 min. Nel campione di controllo (Basal), ogni forma di trattamento veniva omessa. Un campione trattato con calcio ionoforo A23187 5  $\mu$ M fungeva da controllo positivo. I risultati vengono riportati come valore medio di 3 esperimenti indipendenti. Le significatività vengono riportate in figura.

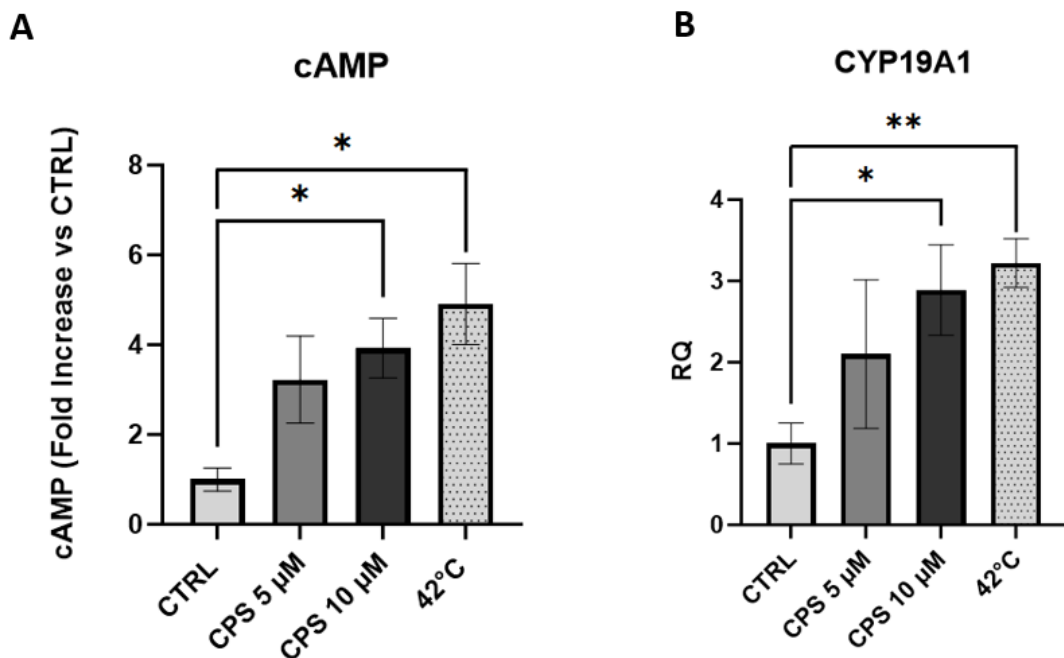
#### 4.2 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A NOTI STIMOLANTI DI TRPV1 SUGLI EVENTI CELLULARI cAMP MEDIATI.

Il ciclico-AMP è un noto secondo messaggero coinvolto nella regolazione di numerose cascate di segnale intracellulari.

L'effetto della stimolazione di TRPV1 sui livelli di cAMP nella linea cellulare TM4 è stato valutato trattando quest'ultima con concentrazioni crescenti di CPS per 24 ore e determinando indirettamente il cAMP intracellulare mediante saggio ELISA specifico. È stato inoltre valutato l'effetto della temperatura ambientale esponendo le cellule a 42°C per 1 ora, seguita da recupero *overnight* a 37°C (Figura 12 A). Rispetto al controllo non stimolato (CTRL), il trattamento con CPS si associava ad un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. Tuttavia, la significatività statistica era osservabile solo per il trattamento con CPS 10  $\mu$ M (rispettivamente: CTRL 1,0 $\pm$ 0,3 A.U vs CPS 10  $\mu$ M 3,8  $\pm$ 1,1 A.U, P=0,0131). Anche

l'esposizione a 42°C si associava ad un significativo aumento dei livelli intracellulari di cAMP ( $4,2 \pm 1,3$ ,  $P=0,0142$  vs CTRL).

Tra gli eventi a valle associati all'aumento di cAMP, nelle SC è stato documentato un aumento dell'espressione di alcuni geni, tra i quali l'aromatasi (*CYP19A1*), enzima coinvolto nella conversione del testosterone ad estradiolo (Figura 12 B). Analogamente a quanto osservato per il cAMP, il trattamento con CPS 10  $\mu\text{M}$  o l'esposizione a 42°C per 1 ora si associavano ad un significativo aumento dei livelli di mRNA del gene *CYP19A1* (rispettivamente: CTRL  $1,0 \pm 0,4$  unità RQ; CPS 10  $\mu\text{M}$   $2,9 \pm 1,1$  unità RQ  $P=0,0482$  vs CTRL; 42°C  $3,1 \pm 0,4$   $P=0,0030$  vs CTRL). Complessivamente, questi dati suggeriscono che la stimolazione di TRPV1 nelle SC possa avere un ruolo nel profilo endocrino testicolare attraverso l'espressione dell'aromatasi.



**Figura 12.** A) Quantificazione dei livelli intracellulari di ciclico AMP (cAMP) nelle cellule TM4, valutati mediante saggio ELISA. Le cellule sono state trattate con capsaicina (CPS) alle concentrazioni indicate o esposte a 42°C per 1 ora seguita da recupero overnight. Nel controllo (CTRL), qualsiasi trattamento veniva omesso. B) Analisi RT-PCR per l'espressione del gene dell'aromatasi (*CYP19A1*), a seguito del trattamento con CPS o dopo esposizione a 42°C come precedentemente indicato. I risultati rappresentano i valori medi di tre esperimenti indipendenti e vengono riportati come variazione rispetto al CTRL. Significatività: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$  vs CTRL.

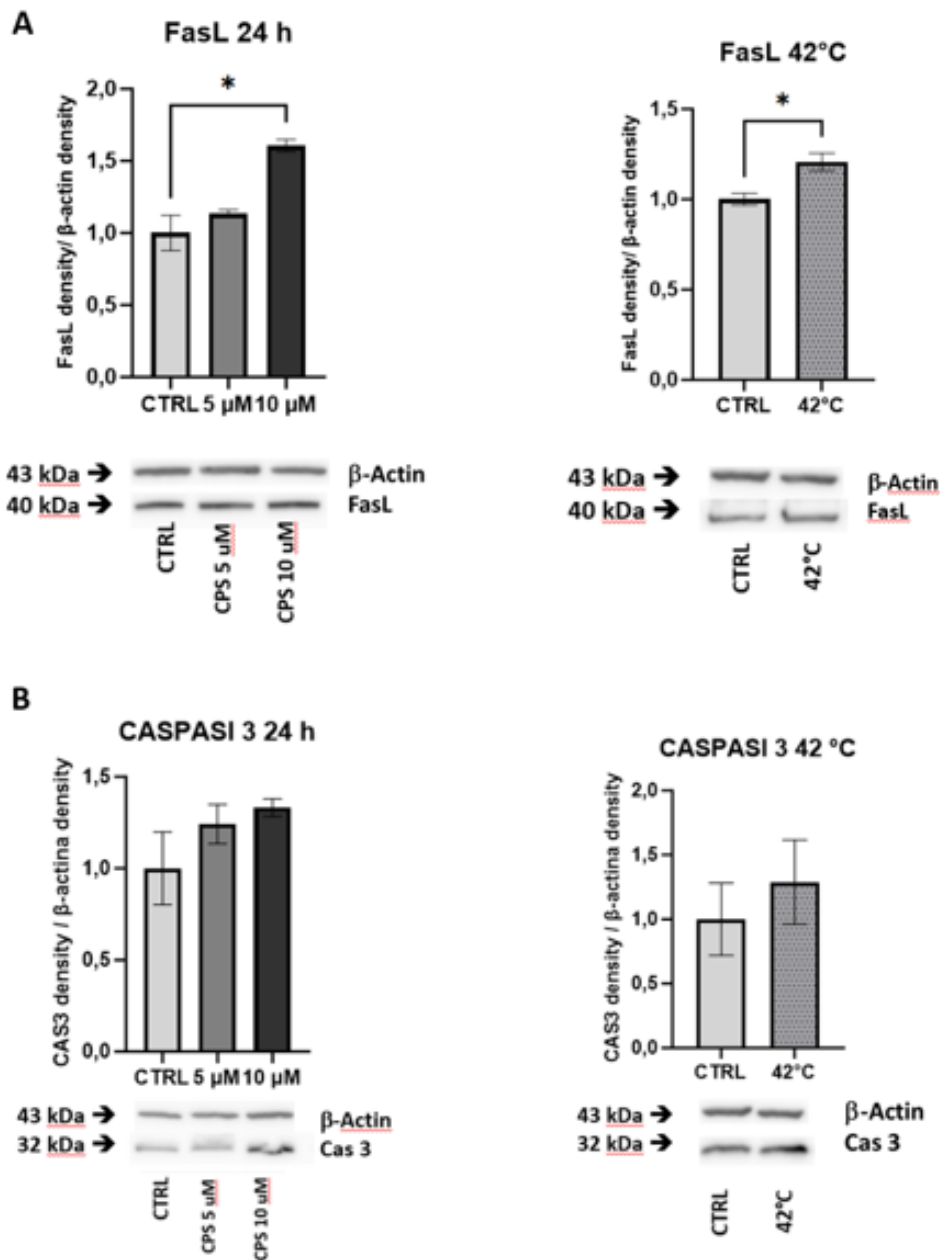
### 4.3 EFFETTO DELLA STIMOLAZIONE DI TRPV1 SULLA CASCATA APOPTOTICA NELLE CELLULE TM4.

L'aumento dei livelli di calcio intracellulare è un evento chiave coinvolto in numerose cascate di segnale nelle cellule del Sertoli, tra le quali la regolazione dei processi apoptotici (26).

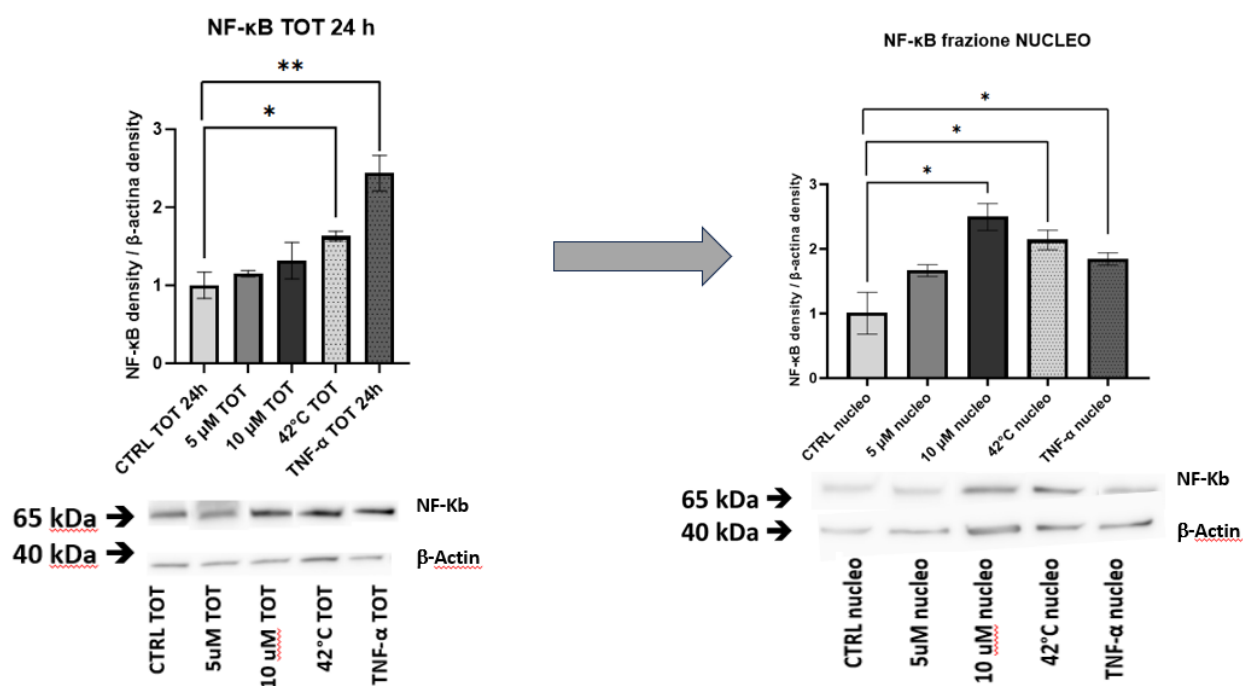
Poiché, dai precedenti risultati, l'effetto di noti stimolanti di TRPV1 si associa ad un aumento della concentrazione di calcio intracellulare, è stato successivamente valutato se l'attivazione di questo TRP fosse in grado di attivare le principali cascate di segnale pro-apoptiche. A tale scopo, l'espressione di alcuni marcatori apoptotici, quali ligando del Fas (FasL) e Caspasi 3, a seguito del trattamento con CPS o esposizione a 42°C, è stata valutata mediante analisi *Western Blot* (Figura 13). Rispetto al controllo non trattato, la stimolazione per 24 ore con CPS si associava ad un significativo aumento dei livelli di FasL solo alla concentrazione di 10 µM (rispettivamente: CTRL 1,0±0,3 A.U. vs CPS 10 µM 1,6±0,1 A.U., P=0.0303). Anche l'esposizione a 42°C si associava ad un significativo aumento dei livelli di espressione proteica di tale marcatore pro-apoptotico rispetto al controllo (CTRL 1,0±0,1 A.U., 42°C 1,3±0,1 A.U., P=0.0213; Figura 13 A). Diversamente, i livelli di espressione proteica di Caspasi 3 non apparivano significativamente modificati dall'esposizione a CPS o l'aumentata temperatura ambientale quali noti agenti stimolati il TRPV1 (Figura 13 B).

È importante notare che una via di segnale responsabile dell'espressione di FasL è quella che coinvolge a monte il fattore di trascrizione *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB). Nello stato inattivato, l'NF-κB si trova nel citosol legato ad una proteina inibitoria. La presenza di stimoli attivatori noti di NF-κB, quali citochine, radicali liberi o irradiazione con ultravioletti, porta alla degradazione proteolitica dell'inibitore e migrazione nel nucleo del fattore di trascrizione e attivazione della trascrizione di geni NF-κB-dipendenti (27). È stato quindi valutato il coinvolgimento di NF-κB a seguito della stimolazione di TRPV1 tramite CPS o esposizione ad aumentata temperatura ambientale (Figura 14). In qualità di noto agonista del *signaling* NF-κB-mediato, è stata utilizzata la citochina pro-infiammatoria *tumor necrosis-factor α* (TNF-α). In particolare, sono stati valutati sia i livelli di NF-κB, che quelli associati al compartimento nucleare grazie al frazionamento proteico delle componenti cellulari. Rispetto al controllo non trattato, l'esposizione a CPS era ininfluenza circa i livelli di NF-κB totale. Dall'altro lato, questi ultimi erano up-regolati a seguito dell'esposizione a 42°C o TNF-α. Rispettivamente: CTRL 1,0±0,2 A.U., 42°C 1,4±0,1 A.U. P=0.0363 vs CTRL; TNF-α 2,2±0,4 A.U., P= 0.0097 vs CTRL). Dall'altro lato, rispetto al controllo non trattato (CTRL 1,0±0,4 A.U.), i livelli nucleari di NF-κB erano significativamente aumentati a seguito della stimolazione con CPS 10 µM (2,1±0,2; P=0.0131 vs CTRL), esposizione

a 42°C (1,8±0,2 A.U., P=0.0363 vs CTRL) o trattamento con TNF-α (1,7±0,1 A.U.; P=0.0424 vs CTRL; Figura 14).



**Figura 13.** Analisi di espressione proteica mediante saggio Western Blot in cellule TM4. I campioni venivano trattati per 24 ore con capsaicina (CPS) alle concentrazioni indicate, o esposti per 1 ora a 42°C e successivamente lasciati recuperare overnight a 37°C. L'analisi era focalizzata sulle proteine ligando del Fas (FasL, A) e caspasi 3 (B). I risultati riportati sono il valor medio di 3 esperimenti indipendenti, normalizzati sui rispettivi controlli non trattati (CTRL). Significatività: \*= $P < 0,05$ ; \*\*= $P < 0,01$ ).



**Figura 14.** Analisi di espressione proteica mediante saggio Western Blot in cellule TM4. I campioni venivano trattati per 24 ore con capsaicina (CPS) alle concentrazioni indicate, o esposti per 1 ora a 42°C e successivamente lasciati recuperare overnight a 37°C o stimolati per 24 ore con tumor necrosis-factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). L'analisi era focalizzata sulla proteina nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB), valutata per la sua espressione totale e nucleare. I risultati riportati sono il valor medio di 3 esperimenti indipendenti, normalizzati sui rispettivi controlli non trattati (CTRL). Significatività:  $*=P<0,05$ ;  $**=P<0,01$ ).

## DISCUSSIONE

I risultati preliminari riportati in questa tesi di laurea depongono a favore di un nuovo modello meccanicistico alla base del noto effetto negativo della temperatura ambientale sulla funzione testicolare dei mammiferi. In particolare, secondo tale modello, un possibile ruolo è giocato dal *transient receptor potential* TRPV1 attraverso l'aumento del calcio intracellulare associato all'aumento della temperatura. Tra gli effetti a valle dell'attivazione di TRPV1 vi sarebbero da un lato l'aumento dell'espressione dell'aromatasi Sertoliana mentre, dall'altro, l'attivazione di eventi pro-apoptotici che culminano con l'espressione di Fas-ligando.

### 4.1 Caratterizzazione funzionale di TRP in modello cellulare di TM-4

Nelle cellule eucariotiche i meccanismi di termosensibilità sono riconducibili alla famiglia di canali *Transient Receptor Potential* (TRP). I membri noti di questa famiglia sono circa 20 e tra questi 6 in particolare sono stati riconosciuti come responsabili alle variazioni di temperatura ambientale. In particolare, i canali TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 sono riconosciuti come attivati dal calore, mentre TRPM8 e TRPA1 come attivati dal freddo (18). È noto da diversi studi che le cellule del testicolo in generale, e le cellule del Sertoli in particolare (16), sono caratterizzate dall'espressione di TRPV1. Alla luce di tale risultato si è quindi potuto confermare che TRPV1 era il canale di nostro interesse per valutare un possibile effetto dello stress termico nelle cellule del Sertoli.

TRPV1 non solo viene attivato massivamente da temperature ambientali superiori o uguali ai 42°C, ma anche da una serie di agonisti, tra i quali il principale è la capsaicina, sostanza responsabile del gusto piccante del peperoncino (19). Si noti che, ai fini di evitare il possibile effetto tossico per le cellule TM4 dato dall'utilizzo di dosi eccessive di capsaicina, è stato effettuato un saggio di citotossicità dose-risposta di tale agonista. I risultati di tale saggio hanno consentito di attestare il *range* di lavoro per la capsaicina tra le concentrazioni di 5 µM e 10 µM.

L'analisi dell'espressione proteica di TRPV1 aveva come obiettivo quello di valutare se vi fosse un cambiamento nei livelli cellulari del canale in seguito al trattamento delle cellule TM4 con capsaicina. I risultati ottenuti mostrano che i livelli di TRPV1 rimangono pressoché costanti, non presentando differenze statisticamente significative, se si confrontano tra loro le cellule al basale con le cellule trattate con le due diverse concentrazioni di capsaicina per 24 ore. Un dato utile che si può ricavare da tale analisi è che è stata dimostrata anche in questo caso la presenza di TRPV1 nelle cellule TM4.

La piena funzionalità del TRPV1 è stata verificata grazie all'analisi del *Calcium Imaging*. A supporto del ruolo specifico di TRPV1 nel mediare l'aumento di calcio intracellulare è la completa perdita di risposta a seguito del pre-trattamento con l'agonista competitivo delle capsaicina: la capsazepina.

#### 4.2 Effetto dell'esposizione a noti stimolanti di TRPV1 sugli eventi cellulari cAMP mediati.

L'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) è un importante secondo messaggero prodotto a partire dall'ATP grazie all'enzima adenilato ciclasi (AC) e coinvolto in meccanismi di trasduzione del segnale che hanno tutti inizio con l'attivazione della protein chinasi A (PKA) o altre (PKC, PI3K, Akt/PKB e ERK1/ERK2) (28). In particolare, a livello delle cellule del Sertoli, la principale via di segnale trasdotta da cAMP è quella che ha inizio con l'attivazione della PKA: il legame tra cAMP e PKA libera le subunità catalitiche di quest'ultima, le quali possono agire a livello di substrati citoplasmatici o traslocare nel nucleo. Nello specifico, a livello nucleare, esse regolano la trascrizione genica fosforilando il fattore di trascrizione cellulare *cAMP response element-binding protein* (CREB). Quest'ultimo è così in grado di legarsi a specifiche sequenze di DNA che prendo il nome di elementi di risposta al cAMP (CRE) e di modulare la trascrizione di geni che svolgono un ruolo indispensabile per la corretta progressione della spermatogenesi (28). Tra i geni la cui trascrizione viene regolata dal *pathway* cAMP-PKA troviamo il gene *CYP19A1* che codifica per l'aromatasi, l'enzima responsabile della trasformazione di testosterone in estradiolo a livello testicolare (29). È noto, infatti, che a livello dei testicoli di mammifero, avvenga anche la sintesi di una determinata quota di estrogeni, i quali contribuiscono alla normale fisiologia dell'apparato. A dimostrazione di ciò, difetti nella sintesi dell'aromatasi, che ne determinano sia una sovrapproduzione che una sottoproduzione, sono riconducibili a problematiche di infertilità. In modo particolare, è stata evidenziata l'importanza di una corretta sintesi di estrogeni da parte delle cellule del Sertoli prima della pubertà: la produzione dell'estradiolo da parte di queste cellule è infatti limitata solo al periodo prepubere, mentre nella vita adulta è attribuibile principalmente alle cellule di Leydig (29). È stato dimostrato che una sovra produzione di estradiolo a discapito del testosterone in età prepubere causi ginecomastia e fusione precoce delle epifisi con conseguente diminuzione della statura in età adulta (30). Negli adulti invece, aumentati livelli di estrogeni sono riconducibili a uno scorretto funzionamento della spermatogenesi che porta quindi a infertilità, ma anche a problematiche come la disfunzione erettile e la depressione (30).

A livello delle cellule del Sertoli, il principale meccanismo di produzione dell'cAMP è quello che ha inizio con il legame dell'ormone FSH al suo specifico recettore FSH-R presente a livello della membrana cellulare. Quest'ultimo è un recettore accoppiato a proteina G e in seguito al legame col suo specifico ligando (FSH), va incontro a cambiamenti conformazionali che hanno come esito finale l'attivazione dell'enzima AC transmembrana con conseguente produzione di cAMP (28). Tuttavia, una produzione basale di cAMP in risposta a modifiche della composizione del liquido interstiziale è stata documentata ad opera dell'adenilato ciclasi solubile (sAC) (31). L'sAC è un enzima responsabile della produzione di cAMP presente nelle cellule di mammifero, comprese quelle del Sertoli (32) che si distingue a livello evolutivo, biochimico e strutturale dall'adenilato ciclasi transmembrana, il quale è responsivo all'attivazioni di recettori accoppiati a proteine G. L'sAC è infatti insensibile a quest'ultimo tipo di regolazione e la sua modulazione è attribuibile all'ingresso di ioni a livello intracellulare, tra questi lo ione  $Ca^{2+}$  (31). L'attivazione dell'sAC da parte del calcio innesca la formazione di cAMP e la conseguente cascata di trasduzione del segnale che questo messaggero è in grado di mediare.

In questo lavoro, dopo aver confermato come l'attivazione del canale TRPV1 sia in grado di mediare l'ingresso di calcio a livello intracellulare, è stato valutato il possibile coinvolgimento della produzione di cAMP indipendentemente dall'attivazione del recettore per l'FSH.

La quantificazione di cAMP intracellulare ha evidenziato un aumento progressivo, all'aumentare della concentrazione di capsaicina utilizzata, della quantità di cAMP prodotta. Analoghi effetti si sono ottenuti a seguito dell'esposizione delle cellule alla temperatura di 42°C. Questo dato permette di supportare l'ipotesi che l'ingresso di calcio, mediato dall'attivazione del canale di TRPV1 da parte del calore e/o del suo agonista specifico, agisca a livello dell'sAC, aumentando la conversione di ATP in cAMP. L'effetto nella produzione di cAMP in questo caso è verosimilmente attribuibile alla stimolazione dell'sAC calcio-mediata vista l'assenza dello stimolo con FSH, il quale legandosi al suo specifico recettore, avrebbe invece innescato la produzione di cAMP mediata dall'AC transmembrana attivato dalla specifica subunità G del recettore stesso.

Alla luce di questo risultato, è stata successivamente valutata l'espressione genica di *CYP19A1*, gene responsabile della sintesi di aromatasi. I risultati ottenuti mostrano un andamento molto simile al precedente: all'aumentare della concentrazione di capsaicina con cui sono state incubate le cellule, aumenta l'espressione genica di *CYP19A1* e lo stesso discorso avviene nelle cellule trattate con la temperatura di 42°C.



Questo risultato permette quindi di sostenere l'ipotesi iniziale secondo la quale il canale TRPV1 una volta attivato, sia in grado di modificare il profilo endocrino intra-testicolare attraverso l'aumentata espressione genica di *CYP19A1*.

#### 4.3 Effetto della esposizione a noti stimolanti di TRPV1 a livello della cascata apoptotica.

L'esposizione del testicolo ad aumentata temperatura testicolare ha come principale evento la compromissione della spermatogenesi, che si manifesta attraverso l'alterazione dei parametri seminali quali la riduzione della conta seminale, la riduzione della motilità cellulare e l'alterazione della morfologia spermatica. Sebbene egualmente esposta allo stesso stress ambientale, la popolazione cellulare Sertoliana appare rispondere diversamente rispetto a quella germinale. Per ottenere un quadro più completo sui possibili effetti dell'esposizione termica, sono stati valutati alcuni elementi della cascata apoptotica a seguito dell'esposizione delle cellule TM4 ad aumentata temperatura o a noti stimolanti di TRPV1.

L'apoptosi è il processo di morte programmata, che a differenza della necrosi consiste in una serie di eventi finemente regolati, non genera infiammazione ed è coinvolta nel mantenimento della corretta omeostasi cellulare dell'organismo. Come detto precedentemente, a livello testicolare l'apoptosi è un evento fondamentale per il corretto progredire della spermatogenesi. Infatti, una quota di cellule spermatiche neoformate vanno inevitabilmente incontro a un processo di morte programmata e i residui cellulari di questo evento vengono tipicamente rimossi dalle cellule del Sertoli (13). Solitamente l'apoptosi è scatenata da vari tipi di stimoli che possono essere extracellulari e intracellulari. Nel primo caso troviamo ad esempio agenti infettivi, radiazioni e sostanze chimiche (es. farmaci chemioterapici), mentre nel secondo caso ricadono eventi come il danno genomico, la privazione di fattori di crescita e lo stress al reticolo endoplasmatico (33).

Il meccanismo dell'apoptosi può essere indotto da due vie: estrinseca ed intrinseca. La via estrinseca ha inizio con l'interazione tra determinati recettori transmembrana e i loro specifici ligandi, ad esempio uno dei più noti è *Fas Ligand* (FasL). Questo legame porta alla formazione del *death-inducing signaling complex* (DISC). Il DISC consiste nel legame tra la proteina FADD (*Fas-associated death domain*) e le pro-caspasi 8/10, che vengono così attivate diventando caspasi iniziatrici. Queste sono poi in grado di attivare a loro volta, mediante taglio proteolitico, le caspasi effettrici, tra le quali la caspasi 3 che, in forma cleavata, sono in grado di agire su determinati bersagli cellulari come l'actina, la laminina e un inibitore delle DNAsi, portando alla morte cellulare. La via intrinseca ha inizio a

livello mitocondriale e hanno un ruolo essenziale le proteine facenti parte della famiglia Bcl-2, che si distinguono in anti-apoptotiche e pro-apoptotiche e di quest'ultima categoria fa parte Bax. Queste proteine traslocano a livello della membrana mitocondriale esterna, oligomerizzano formando un poro sulla membrana stessa che permette l'uscita del citocromo C. Quest'ultimo a livello citoplasmatico lega il complesso APAF-1 che è in grado di attivare le pro-caspasi iniziatrici e dare il via alla cascata apoptotica descritta per la via estrinseca (33).

In questo studio, è stata valutata l'espressione proteica di FasL e Caspasi 3 nelle cellule TM4 esposte a capsaicina o ad aumentata temperatura. È interessante notare che a fronte di un aumento non significativo della Caspasi 3, è stato riscontrato invece un significativo aumento dell'espressione di FasL. Tale evidenza lascia ipotizzare che le cellule del Sertoli, sottoposte a stimoli TRPV1-sensibili, siano in grado di resistere all'insulto pro-apoptotico ma, al contempo, inducano la morte delle cellule germinali adiacenti.

Infine, andando a valutare i livelli di espressione proteica di NF- $\kappa$ B sia a livello citoplasmatico che a livello nucleare, è emerso un significativo aumento dell'espressione proteica nella frazione nucleare delle cellule sia trattate con capsaicina, che stimolate dall'aumento di temperatura. Questo risultato permette di supporre che anche nelle cellule del Sertoli sia attivo un meccanismo già studiato in altri modelli cellulari (34) secondo il quale, aumentati livelli di calcio citosolico siano in grado di determinare l'attivazione di NF- $\kappa$ B e quindi la sua traslocazione nel nucleo (34). La validità di tale modello è supportata dall'analoga risposta cellulare al TNF- $\alpha$ , citochina pro-infiammatoria in grado di attivare NF- $\kappa$ B (23). Anche dai nostri risultati emerge che la funzionalità di tale meccanismo sia l'aumento di NF- $\kappa$ B a seguito dello stimolo delle cellule con TNF- $\alpha$ .

Oltre alla natura preliminare del presente studio, vanno considerati alcuni punti di debolezza. L'utilizzo del modello cellulare TM4, sebbene fenotipicamente corrispondente alle cellule del Sertoli, manca di alcuni aspetti funzionali delle popolazioni cellulari corrispondenti nei mammiferi superiori. Inoltre, la caratterizzazione degli effetti cellulari legati all'aumento della temperatura dovrebbe essere necessariamente integrata dalle prove sperimentali che comportano l'inattivazione del TRPV1 mediante silenziamento genico o mediante l'antagonista competitivo della CPS, ovvero la capsazepina. Ulteriori studi sono quindi necessari per confermare ulteriormente il coinvolgimento del recettore negli eventi cellulari documentati.

## CONCLUSIONI

Il riscaldamento globale è una problematica che sempre di più sta compromettendo la salute umana e non da meno la fertilità maschile. Numerosi studi condotti finora sono mirati a identificare le conseguenze a livello di tutte le popolazioni cellulari che compongono i testicoli dovute all'esposizione di tali organi al calore. È oggi noto il coinvolgimento dei TRPs nel mediare le risposte cellulari alle variazioni di temperatura anche a livello testicolare. Questa tesi ha evidenziato che a livello delle cellule del Sertoli è espresso il canale TRPV1, il quale media l'ingresso del calcio a livello intracellulare a seguito della sua attivazione mediante calore o capsaicina. Si sono quindi dimostrati due effetti innescati da aumentati livelli di calcio citoplasmatico a livello delle cellule del Sertoli pre-puberi. Il primo è l'aumento della sintesi di cAMP con conseguente maggiore espressione genica di aromatasi, la quale è responsabile della conversione di testosterone ed estradiolo. Tale meccanismo potrebbe giustificare l'aumento dei livelli di estrogeni nell'ambiente testicolare. Il secondo effetto riguarda il *pathway* apoptotico. Si è dimostrato che stimoli in grado di indurre l'attivazione di TRPV1, come calore e capsaicina, non inducono la morte per apoptosi delle cellule del Sertoli, ma la promuovono a livello delle cellule della linea germinale. Infatti, è stato dimostrato che aumentati livelli di calcio intracellulare attivano il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, che una volta entrato nel nucleo stimola la trascrizione del gene di FasL, la cui espressione proteica risulta coerentemente aumentata. FasL è un induttore di apoptosi non a livello delle stesse cellule del Sertoli che lo producono, ma agisce sulle cellule germinali (che in età prepubere sono gli spermatogoni) le quali sono così indotte a degenerazione apoptotica.

Tale ricerca si presta a numerosi spunti di approfondimento, dalla conferma del coinvolgimento del TRPV1 attraverso approcci *loss-of-function*, alla valutazione in modelli cellulari da mammiferi superiori. Nonostante la natura preliminare dei dati, tali risultati depongono a favore di un nuovo modello meccanicistico circa gli effetti dell'esposizione termica sulla funzione testicolare.

## BIBLIOGRAFIA

1. De Toni, Luca, Federica Finocchi, Kenda Jawich, e Alberto Ferlin. «Global Warming and Testis Function: A Challenging Crosstalk in an Equally Challenging Environmental Scenario». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (16 gennaio 2023): 1104326. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1104326>.
2. Durairajanayagam, Damayanthi, Ashok Agarwal, e Chloe Ong. «Causes, Effects and Molecular Mechanisms of Testicular Heat Stress». *Reproductive BioMedicine Online* 30, fasc. 1 (gennaio 2015): 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.018>.
3. Xiao W, Yu M, Yuan Y, Liu X, Chen Y. “Thermotaxis of mammalian sperm”. *Mol Hum Reprod.* (29 luglio 2022): 35894944. <https://doi:10.1093/molehr/gaac027>
4. ROWBOTHAM, ELIZABETH J. “The Climate Change Convention and Human Health.” *Medicine and War* 11, no. 4 (1995): 214–22. <http://doi:10.1080/07488009508409241>
5. Data World Bank (2021), Fertility rate, total - world Bank 2021 Available at: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN> .
6. Levine, Hagai, Niels Jørgensen, Anderson Martino-Andrade, Jaime Mendiola, Dan Weksler-Derri, Irina Mindlis, Rachel Pinotti, e Shanna H Swan. «Temporal Trends in Sperm Count: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis». *Human Reproduction Update* 23, fasc. 6 (1 novembre 2017): 646–59. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>.
7. Tiwana MS, Leslie SW. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Testes. 2023 Apr 15. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29261881.
8. Zirkin, Barry R, e Vassilios Papadopoulos. «Leydig Cells: Formation, Function, and Regulation†». *Biology of Reproduction* 99, fasc. 1 (1 luglio 2018): 101–11. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy059>.
9. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Nov;59:10-26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009>
10. <https://www.siams.info/spermatogenesi/>
11. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(3):309-319. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.rbmo.2015.06.010>
12. Griswold, Michael D. «50 Years of Spermatogenesis: Sertoli Cells and Their Interactions with Germ Cells». *Biology of Reproduction* 99, fasc. 1 (1 luglio 2018): 87–100. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy027>.

13. França, L. R., R. A. Hess, J. M. Dufour, M. C. Hofmann, e M. D. Griswold. «The Sertoli Cell: One Hundred Fifty Years of Beauty and Plasticity». *Andrology* 4, fasc. 2 (marzo 2016): 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>.
14. Vogl AW, Young JS, Du M. “New insights into roles of tubulobulbar complexes in sperm release and turnover of blood-testis barrier”. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;303:319-55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00008-8>
15. Wang, Fei, e Daishu Han. «Sertoli Cell Phagocytosis: An Essential Event for Spermatogenesis». In *Male Reproductive Health*, a cura di Wei Wu, Francesco Ziglioli, e Umberto Maestroni. IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86808>.
16. De Toni, Luca, Andrea Garolla, Massimo Menegazzo, Sabina Magagna, Andrea Di Nisio, Iva Šabović, Maria Santa Rocca, Valentina Scattolini, Andrea Filippi, e Carlo Foresta. «Heat Sensing Receptor TRPV1 Is a Mediator of Thermotaxis in Human Spermatozoa». A cura di Sidney Arthur Simon. *PLOS ONE* 11, fasc. 12 (16 dicembre 2016): e0167622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167622>.
17. Mizrak, Sefika Canan, e Federica M.F. Van Dissel-Emiliani. «Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor-1 Confers Heat Resistance to Male Germ Cells». *Fertility and Sterility* 90, fasc. 4 (ottobre 2008): 1290–93. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.081>.
18. Ferrandiz-Huertas, Clotilde, Sakthikumar Mathivanan, Christoph Wolf, Isabel Devesa, e Antonio Ferrer-Montiel. «Trafficking of ThermoTRP Channels». *Membranes* 4, fasc. 3 (19 agosto 2014): 525–64. <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>.
19. Vay, Laura, Chunjing Gu, e Peter A McNaughton. «The thermo-TRP Ion Channel Family: Properties and Therapeutic Implications». *British Journal of Pharmacology* 165, fasc. 4 (febbraio 2012): 787–801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>.
20. Voets, Thomas, Guy Droogmans, Ulrich Wissenbach, Annelies Janssens, Veit Flockerzi, e Bernd Nilius. «The Principle of Temperature-Dependent Gating in Cold- and Heat-Sensitive TRP Channels». *Nature* 430, fasc. 7001 (agosto 2004): 748–54. <https://doi.org/10.1038/nature02732>.
21. Aldahhan, Rashid A., e Peter G. Stanton. «Heat Stress Response of Somatic Cells in the Testis». *Molecular and Cellular Endocrinology* 527 (maggio 2021): 111216. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111216>.
22. Jennie P. Matfier, Establishment and Characterization of Two Distinct Mouse Testicular Epithelial Cell Line, *Biology of Reproduction*, Volume 23, Issue 1, 1 August 1980, Pages 243–252, <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.1.243>.

23. Yao, Pei-Li, Yi-Chen Lin, Pragati Sawhney, e John H. Richburg. «Transcriptional Regulation of FasL Expression and Participation of sTNF- $\alpha$  in Response to Sertoli Cell Injury». *Journal of Biological Chemistry* 282, fasc. 8 (febbraio 2007): 5420–31.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609068200>.
24. Wu, Chih-Chung, Jing-Pin Lin, Jai-Sing Yang, Su-Tze Chou, Ssu-Ching Chen, Yuh-Tzy Lin, Hui-Lu Lin, e Jing-Gung Chung. «Capsaicin Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Esophagus Epidermoid Carcinoma CE 81T/VGH Cells through the Elevation of Intracellular Reactive Oxygen Species and Ca<sup>2+</sup> Productions and Caspase-3 Activation». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 601, fasc. 1–2 (ottobre 2006): 71–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.06.015>.
25. Yang, Min, Sang Jung, Gautam Sethi, e Kwang Ahn. «Pleiotropic Pharmacological Actions of Capsazepine, a Synthetic Analogue of Capsaicin, against Various Cancers and Inflammatory Diseases». *Molecules* 24, fasc. 5 (12 marzo 2019): 995.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24050995>.
26. Lagos-Cabré, Raúl, e Ricardo D Moreno. «Contribution of Environmental Pollutants to Male Infertility: A Working Model of Germ Cell Apoptosis Induced by Plasticizers». *Biological Research* 45, fasc. 1 (2012): 5–14.  
<https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000100001>.
27. TD. Gilmore, «The Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway: introduction», in *Oncogene*, vol. 18, n. 49, novembre 1999, pp. 6842–4, DOI:10.1038/sj.onc.1203237
28. Bhattacharya, Indrashis, Souvik Sen Sharma, Hironmoy Sarkar, Alka Gupta, Bhola Shankar Pradhan, e Subeer S. Majumdar. «FSH Mediated cAMP Signalling Upregulates the Expression of  $\alpha$  Subunits in Pubertal Rat Sertoli Cells». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 569 (settembre 2021): 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.094>.
29. Bouraïma-Lelong, Hélène, Marion Vanneste, Christelle Delalande, Leïla Zanatta, Slawomir Wolczynski, e Serge Carreau. «Aromatase Gene Expression in Immature Rat Sertoli Cells: Age-Related Changes in the FSH Signalling Pathway». *Reproduction, Fertility and Development* 22, fasc. 3 (2010): 508. <https://doi.org/10.1071/RD09168>.
30. Rochira V, Carani C. Estrogens, Male Reproduction and Beyond. [Updated 2023 Mar 21]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278933/>
31. Litvin, Tatiana N., Margarita Kamenetsky, Alla Zarifyan, Jochen Buck, e Lonny R. Levin. «Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase». *Journal*

- of Biological Chemistry* 278, fasc. 18 (maggio 2003): 15922–26.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212475200>.
32. Xu, Wen Ming, Jing Chen, Hui Chen, Rui Ying Diao, Kin Lam Fok, Jian Da Dong, Ting Ting Sun, et al. «Defective CFTR-Dependent CREB Activation Results in Impaired Spermatogenesis and Azoospermia». A cura di Irina Agoulnik. *PLoS ONE* 6, fasc. 5 (9 maggio 2011): e19120.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019120>.
33. Jan R, Chaudhry GE. «Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics». *Adv Pharm Bull.*(giugno 2019);9(2):205-218. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024> .
34. Altamirano, Francisco, Jose R. López, Carlos Henríquez, Tadeusz Molinski, Paul D. Allen, e Enrique Jaimovich. «Increased Resting Intracellular Calcium Modulates NF-κB-Dependent Inducible Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Dystrophic Mdx Skeletal Myotubes». *Journal of Biological Chemistry* 287, fasc. 25 (giugno 2012): 20876–87.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344929>.