



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo Biologia Evoluzionistica

XXVI CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Ruolo del PACAP e del VIP nella spermatogenesi del  
rettile squamato *Podarcis sicula***

Relatore:

Ch.mo Prof. Piero Andreuccetti

Coordinatore del corso:

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Dottorando:

Dott. Luigi Rosati

Anno accademico 2012/2013

## INDICE

<i><u>Introduzione</u></i>	pag.1
<i><u>Abstract</u></i>	pag.4
<b><i><u>-CAPITOLO I: LA SPERMATOGENESI</u></i></b>	pag.6
1.1 Generalità	pag.6
1.2 Regolazione della spermatogenesi	pag.8
1.3 Il ruolo dei neuropeptidi nella spermatogenesi	pag.9
<b><i><u>-CAPITOLO II: PACAP E VIP</u></i></b>	pag.11
2.1 Generalità	pag.11
2.1.1 PACAP	pag.11
2.1.2 VIP	pag.14
2.2 Distribuzione e funzione del PACAP e del VIP	pag.17
<b><i><u>-CAPITOLO III: I RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP</u></i></b>	pag.20
3.1 Generalità	pag.20
3.1.1 Il recettore PAC <sub>1</sub>	pag.21
3.1.2 I recettori VPAC	pag.23
3.2 La distribuzione dei recettori PAC/VPAC	pag.24
3.3 Gli antagonisti dei recettori del PACAP e del VIP	pag.26
<b><i><u>-CAPITOLO IV: PACAP/VIP/RECETTORI NEL TESTICOLO</u></i></b>	pag.28
4.1 Generalità	pag.28
4.1.1 PACAP	pag.28
4.1.2 VIP	pag.30
4.1.3 I recettori	pag.31
4.2 Ruolo di PACAP e VIP nel testicolo	pag.32
4.3 Il PACAP e il VIP nel testicolo di vertebrati non mammiferi	pag.34
<b><i><u>-SCOPO DELLA TESI</u></i></b>	pag.36
<b><i><u>-CAPITOLO V MODELLO SPERIMENTALE: il testicolo di <i>Podarcis sicula</i></u></i></b>	pag.38
5.1 La spermatogenesi in <i>Podarcis sicula</i>	pag.38

5.2 Meccanismi di controllo della spermatogenesi di <i>Podarcis sicula</i>	pag.41
<u>-CAPITOLO VI MATERIALI E METODI:</u>	pag.45
<u>I fase: PACAP/VIP/RECETTORI</u>	pag.45
<i>INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE</i>	pag.45
<i>INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE</i>	pag.50
II fase: colture d'organo sul testicolo di <i>Podarcis sicula</i>	pag.51
<u>-CAPITOLO VII: RISULTATI</u>	pag.54
<u>-I fase: PACAP/VIP/RECETTORI nel testicolo di <i>Podarcis sicula</i></u>	pag.54
<u>-II fase: colture d'organo</u>	pag.61
-PACAP	pag.61
-VIP	pag.64
<u>-DISCUSSIONI</u>	pag.67
<u>-TAVOLE</u>	pag.76
<u>-BIBLIOGRAFIA</u>	pag.104

## **INTRODUZIONE**

La spermatogenesi è un processo che si realizza nel testicolo ed è finemente regolato dall'asse ipotalamo-ipofisi attraverso il rilascio delle gonadotropine ipofisarie, FSH e LH. Tuttavia alla regolazione di questo processo possono partecipare anche fattori locali. Tra le molecole che agiscono a livello testicolare rientrano differenti neuropeptidi tra cui il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), la cui concentrazione testicolare supera quella di qualsiasi altro peptide noto e il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (Li e Arimura, 2003), un peptide strettamente correlato al PACAP.

Questi due neuropeptidi appartenengono alla superfamiglia PACAP/glucagone/secretina, che include, oltre a PACAP e VIP, glucagone, GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1), GLP-2, GIP (Glucose-Dependent-Insulinotropic Polypeptide), GHRH (GH-Releasing Hormone), PHM (Peptide Histidine-Methionine) e secretina, tutti accomunati dalla struttura, dalla distribuzione, dalle funzioni e da recettori comuni (Sherwood et al., 2000).

Il PACAP è il membro della superfamiglia descritto per la prima volta da Miyata e collaboratori nel 1989 in estratti ipotalamici ovis in base alla sua capacità di stimolare la formazione di cAMP nelle cellule dell'ipofisi anteriore di ratto; questo neuropeptide esiste in due diverse forme, PACAP27 e PACAP38, di 27 e 38 aminoacidi, rispettivamente. Nell'ambito di questa superfamiglia, il PACAP riveste un particolare interesse perché la sua sequenza nucleotidica e quella amminoacidica sono altamente conservate nei vertebrati, il che ha suggerito che le sue funzioni siano indispensabili per la sopravvivenza. Infatti il PACAP è coinvolto in molteplici funzioni, quali il rilascio di neurotrasmettitori, la vasodilatazione, la motilità intestinale, la secrezione di insulina e di istamina, la proliferazione e il differenziamento cellulare, l'induzione e/o protezione dall'apoptosi e non ultimo, la riproduzione (Vaudry et al., 2009; Vaudry et al., 2000). È significativo a questo proposito che la presenza del PACAP risulti particolarmente rilevante a livello delle gonadi; nel testicolo, in particolare, è stata rilevata una concentrazione di PACAP paragonabile a quella dell'intero encefalo o addirittura superiore a questa (Arimura et

al., 1991), il che ha fatto ipotizzare che questo peptide sia coinvolto (porta a considerare questo peptide una molecola coinvolta) nella regolazione della spermatogenesi.

Il VIP, che deve il suo nome all'azione vasodilatatoria che induce dopo somministrazione sistemica (Said e Mutt, 1970a,b), è stato invece il membro della superfamiglia PACAP/glucagone/secretina ad essere stato isolato per primo; esso è un peptide di 28 aa che, come il PACAP, ha una sequenza molto conservata nel corso dell'evoluzione ed è implicato in varie funzioni: agisce da neuromodulatore, è coinvolto nel controllo nervoso di funzioni cardiovascolari, respiratorie e gastro-intestinali; regola il rilascio di PRL, LH e GH dall'ipofisi, e come il PACAP, il VIP è ampiamente rappresentato all'interno delle gonadi (Sherwood et al., 2000; Csaba et al., 1997).

Il ruolo svolto da entrambi i neuropeptidi nel controllo della spermatogenesi è ancora in gran parte da definire, e in ogni caso gli studi disponibili riguardano quasi esclusivamente i mammiferi (Heindel et., 1992; Shioda et al., 1994; Romanelli et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a, b, c; El-Gehani et al., 2000; Tanii et al., 2011; Nakamura et al., 2013), dal momento che nei vertebrati non mammiferi i risultati ottenuti sono ancora limitati e riguardano l'anfibio *Triturus carnifex* (Gobbetti and Zerani, 2002), il pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* (Agnese et al., 2013; Agnese et al., 2012) e la lucertola dei campi *Podarcis sicula*. In questo taxon, in particolare, Agnese et al. (2010) hanno messo in evidenza che nel periodo di massima attività testicolare, sono presenti il PACAP e il recettore PAC<sub>1</sub> a livello delle cellule germinali e somatiche (cellule di Leydig e di Sertoli), il che ha fatto ipotizzare che anche in questa specie il PACAP intervenga nel controllo della spermatogenesi. È per questa ragione che lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di determinare il ruolo del PACAP e del VIP nel controllo della spermatogenesi di *Podarcis sicula*, il rettile più diffuso in Italia, in cui il maschio, che ha attività riproduttiva di tipo stagionale, presenta i differenti momenti della spermatogenesi (fase moltiplicativa, meiotica e differenziativa) naturalmente separati (Angelini e Botte, 1992).

Il lavoro è stato sviluppato affrontato lungo due linee differenti: la prima ha avuto l'obiettivo di valutare l'espressione/distribuzione del PACAP, del VIP e dei loro recettori nel testicolo di *Podarcis sicula* nei differenti momenti del ciclo spermatogenico; la seconda, con uno studio più propriamente funzionale, ha avuto lo

scopo di valutare gli effetti indotti da questi neuropeptidi e dagli antagonisti dei loro recettori sulla spermatogenesi. I dati ottenuti hanno evidenziato che i due neuropeptidi sono ampiamente rappresentati nel testicolo nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo e sono altresì coinvolti nel controllo delle attività testicolari e più in particolare nella sintesi del testosterone e del  $17\beta$ -estradiolo.

## **Abstract**

Spermatogenesis is a process that takes place in the testis and is regulated by the hypothalamus-pituitary axis through the release of the pituitary gonadotropins FSH and LH. However, this process can be regulated also by local factors through autocrine and paracrine mechanisms. Among the molecules that act in the testis, there are PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), whose testicular concentration exceeds that of any other peptide, and VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (Li and Arimura, 2003), two neuropeptides belonging to the superfamily PACAP/glucagon/secretin, which includes also glucagon, GLP-1 (glucagon-Like-Peptide-1), GLP-2, GIP (Glucose-Dependent-insulinotropic polypeptide), GHRH (GH-Releasing Hormone), PHM (Peptide Histidine-Methionine) and secretin; they share the structure, distribution, functions and common receptors (Sherwood et al., 2000).

PACAP is the member of the superfamily discovered by Miyata and his staff in 1989 from ovine hypothalamic extracts based on its ability to stimulate the cAMP formation in rat anterior pituitary cells; this neuropeptide exists in two different forms, PACAP27 and PACAP38, of 27 and 38 amino acids, respectively. Within this superfamily, the PACAP is of particular interest because its nucleotide and amino acid sequences are highly conserved in vertebrates, thus suggesting that its functions are essential for survival. Indeed, this neuropeptide is involved in multiple functions, such as the release of neurotransmitters, vasodilation, intestinal motility, secretion of insulin and histamine, proliferation and/or cell differentiation, induction and/or protection from apoptosis and reproduction (Vaudry et al., 2009; Vaudry et al., 2000). In the gonads, in particular in the testis, PACAP levels are higher than those of whole brain (Arimura et al., 1991), thus suggesting that PACAP is a molecule involved in the spermatogenesis control.

VIP, that is the first member of the PACAP/glucagon/secretin superfamily to be isolated (Said and Mutt, 1970a, b), is a 28 amino acid peptide; as PACAP, it has a sequence highly conserved during evolution; it is involved in different functions, as it acts as a neuromodulator, it is involved in the nervous control of cardiovascular, respiratory and gastro-intestinal functions, and in the release of PRL, LH and GH

from the pituitary. Moreover, VIP, as PACAP, is well represented within the gonads (Sherwood et al., 2000; Csaba et al., 1997).

The role of both neuropeptides in the spermatogenesis control has to be clarified; anyway, the informations are available especially in mammals (Heindel et al., 1992; Shioda et al., 1994; Romanelli et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a, b, c; El-Gehani et al., 2000; Tanii et al., 2011; Nakamura et al., 2013). In non-mammalian vertebrates the investigations are still limited to a few species including the amphibian *Triturus cristatus* (Gobbetti and Zerani, 2002), the cartilaginous fish *Torpedo marmorata* (Agnese et al., 2013; Agnese et al., 2012) and the lizard *Podarcis sicula*; in such a species, Agnese et al. (2010) have shown that during the reproductive period PACAP and PAC<sub>1</sub> receptor are widely distributed in both germ and somatic cells, thus suggesting a possible role of PACAP in the control of *Podarcis sicula* spermatogenesis.

The aim of this PhD thesis is to determine the role of PACAP and VIP in the spermatogenesis of *Podarcis sicula*, the most common Italian reptile; the male of *Podarcis sicula* is a seasonal breeder, in which the various stages of spermatogenesis (mitotic, meiotic and differentiative phases) are naturally separated (Angelini and Botte, 1992). The investigation was carried out following two research lines: the first one evaluates the testicular expression/distribution of PACAP, VIP and their receptors in the different periods of the reproductive cycle; the second line studies the effects on spermatogenesis induced by PACAP, VIP and their receptors antagonists. I demonstrated that both neuropeptides are widely distributed in testis in all periods of reproductive *Podarcis sicula* cycle, and that they are involved in the control of testosterone and 17 $\beta$ -estradiol synthesis.

# **CAPITOLO I: LA SPERMATOGENESI**

## **1.1 Generalità**

La spermatogenesi è il processo differenziativo della linea germinale maschile che si attua nel testicolo e porta alla formazione degli spermatozoi a partire dagli spermatogoni. Si distinguono tre fasi: la fase moltiplicativa in cui gli spermatogoni si dividono per mitosi, la fase meiotica che porta alla formazione degli spermatidi e la spermioistogenesi o spermioogenesi in cui gli spermatidi si differenziano in spermatozoi. La spermatogenesi è un processo altamente conservato, sebbene vi siano delle differenze nella struttura del testicolo tra vertebrati anamni e amnioti.

Nei vertebrati anamni (pesci e anfibi) il testicolo ha una struttura cistica. Non c'è un epitelio germinale permanente poiché le cisti vengono sostituite durante la stagione successiva all'accoppiamento (Pudney, 1995; Prisco et al., 2003). All'interno delle cisti sono presenti cellule di Sertoli associate a cellule germinali, le quali si trovano tutte nello stesso stadio di differenziamento. Al termine della spermatogenesi, gli spermatozoi sono rilasciati nel lume dei lobuli seminiferi e poi dotti deferenti, mentre le cellule di Sertoli presenti nella ciste o degenerano per apoptosi o si trasformano in citoplasti, ovvero cellule ad attività endocrina che sostengono le ultime fasi del differenziamento degli spermatozoi (Prisco et al., 2003).

Negli amnioti il testicolo ha una struttura tubulare: la spermatogenesi si realizza nei tubuli seminiferi la cui parete è costituita da un epitelio pluristratificato caratterizzato dalla presenza di due tipi di cellule: le cellule germinali in tutti gli stadi di differenziamento (da spermatogoni a spermatozoi) e quelle somatiche (cellule di Sertoli). Le cellule di Sertoli, che si riconoscono per le loro maggiori dimensioni rispetto alle cellule germinali, sono di forma colonnare, con la parte basale rivolta verso la lamina basale, che circonda il tubulo seminifero, e la apicale rivolta verso il lume. Queste cellule svolgono molteplici funzioni: nutrono le cellule germinali e le accolgono nelle profonde invaginazioni della loro superficie cellulare, regolano la spermiazione, la produzione di molecole endocrine e paracrine che regolano la spermatogenesi. Esse sono inoltre strettamente unite le une alle altre mediante giunzioni occludenti che formano la barriera emato-testicolare, una sorta di occlusione che garantisce la separazione dell'epitelio seminifero in due compartimenti: il compartimento basale e quello adluminale.

La funzione principale di tale barriera è quella di impedire il flusso di elementi cellulari immaturi tra i due compartimenti e l'attacco da parte del sistema immunitario delle cellule germinali localizzate nel compartimento adluminale, che espongono antigeni di superficie diversi da quelli presenti sulle cellule del compartimento basale, ovvero di tutto l'organismo e però riconoscibili come estranee. Le cellule germinali si rinnovano continuamente e alla fine diventano spermatozoi che, una volta differenziati, vengono liberati nel lume del testicolo. La fuoriuscita di queste cellule verso le vie spermatiche, è favorita dalla contrazione delle cellule mioidi, un gruppo di cellule somatiche, localizzate all'esterno della parete tubulare, caratterizzate dalla capacità di contrarsi ritmicamente. All'interno dei tubuli ci sono le cellule germinali a tutti gli stadi di differenziamento che risultano, secondo un gradiente che procede dalla membrana basale verso il lume del tubulo, così distribuite: spermatogoni, spermatociti I, spermatociti II, spermatidi e spermatozoi.

Gli spermatogoni si dividono per tutto il periodo riproduttivo, contribuendo a mantenere la riserva delle cellule staminali. Si possono distinguere diversi tipi di spermatogoni: nell'uomo ad esempio sono presenti spermatogoni di tipo A dark, che sono le cellule staminali in quiescenza, che proliferano in spermatogoni A pale e in spermatogoni B, destinati a trasformarsi in spermatociti I., che dividendosi, danno origine prima agli spermatociti II e poi questi agli spermatidi che si differenzieranno in spermatozoi. L'insieme dei processi che porta al differenziamento degli spermatozoi è detto spermiogenesi, e consiste in profondi cambiamenti strutturali a livello del nucleo e del citoplasma. La durata della spermatogenesi varia da specie a specie, nell'uomo ad esempio circa 74 giorni, nel topo circa 35.

Nel tessuto interstiziale, presente tra i tubuli seminiferi, sono localizzate le cellule di Leydig. Esse sono riunite in piccoli gruppi intorno ai vasi sanguigni presenti nel tessuto interstiziale. Il citoplasma di queste cellule è caratterizzato dalla presenza di numerosi mitocondri con creste tubulari, gocce lipidiche e elementi del reticolo endoplasmatico liscio e, nella specie umana, anche dalla presenza di particolari inclusioni, i cristalli di Reinke, il cui significato funzionale non è ancora del tutto noto. L'assetto è quindi quello tipico delle cellule che sono impegnate nella sintesi degli ormoni steroidei, in questo caso il testosterone (Andreuccetti et al., 2009; Giudice et al., 2010).



LH e secernono testosterone in seguito allo stimolo dell'LH. Recettori per il testosterone sono presenti sulle cellule mioidi e sulle cellule di Sertoli. Queste ultime, stimulate da FSH, secernono la proteina ABP (Androgen Binding Protein), in grado di trasportare il testosterone nel compartimento adluminale dell'epitelio seminifero e verso la rete testis.

A livello locale il testosterone contribuisce a mantenere nell'adulto la persistenza di un'attività spermatogenica continua. Le cellule germinali non hanno recettori per il testosterone, per cui quest'ormone agisce sulle cellule germinali indirettamente tramite le cellule di Sertoli. Il testosterone agisce sull'ipotalamo e sull'ipofisi inibendo la liberazione di GnRH, di LH e di FSH in modo parziale.

Le cellule di Sertoli sintetizzano, inoltre, attivine e inibine. Le inibine agiscono sull'ipofisi, bloccando la liberazione dell'FSH, sui tubuli seminiferi, regolando in modo negativo la spermatogenesi, e sulle cellule di Leydig, potenziando l'azione dell'LH. Le attivine, invece, esercitano un feedback positivo sulla sintesi dell'FSH (Le Moigne e Fouquier, 2004; Andreuccetti et al., 2009).

### **1.3 Il ruolo dei neuropeptidi nella spermatogenesi**

Un ruolo di primo piano nella regolazione della spermatogenesi sembra essere svolto da neuropeptidi di origine nervosa e/o, in alcuni casi, locale. Infatti, recenti studi hanno messo in evidenza la presenza di queste molecole e dei loro recettori nel testicolo, suggerendo un loro possibile coinvolgimento nel controllo delle attività testicolari (Li and Arimura, 2003). Tra i neuropeptidi identificati in questo distretto rientrano il GHRH (Growth-hormone-releasing hormone), il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), la secretina, l'ossitocina e la somatostatina. La funzione di queste molecole nella fisiologia del testicolo è in gran parte sconosciuta, anche se l'avvento di nuove tecniche ha permesso di iniziare a comprenderne le funzioni come fattori regolatori di spermatogenesi e steroidogenesi (Li e Arimura, 2003). La presenza poi di neuropeptidi e dei recettori nello stesso organo ha suggerito che tali molecole possano svolgere la loro attività con modalità di tipo paracrina e/o autocrina. E' interessante inoltre rilevare che la concentrazione di uno di questi neuropeptidi, il PACAP, supera di gran lunga quella di qualsiasi altro peptide testicolare noto, il che ha fatto ipotizzare un suo coinvolgimento nella spermatogenesi (Shioda et al, 1994;

Yanaihara et al., 1998) e più precisamente nella steroidogenesi dal momento che *in vitro* induce una stimolazione dose-dipendente della secrezione del testosterone da cellule di Leydig di ratto (Romanelli et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a).

## **CAPITOLO II: PACAP E VIP**

### **2.1 Generalità**

Il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) e il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) sono due neuropeptidi appartenenti alla superfamiglia degli ormoni della secretina, così chiamata in quanto la secretina è stato il primo membro della superfamiglia ad essere stato descritto. In particolare, di tale superfamiglia sono stati descritti nove peptidi: il glucagone, il GLP-1 (Glucagon-Like-Peptide-1), il GLP-2, il GIP (Glucose-Dependent-Insulinotropic Polypeptide), il GHRH (GH-Releasing Hormone), il PHM (Peptide Histidine-Methionine), la secretina ed infine il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide) ed il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide).

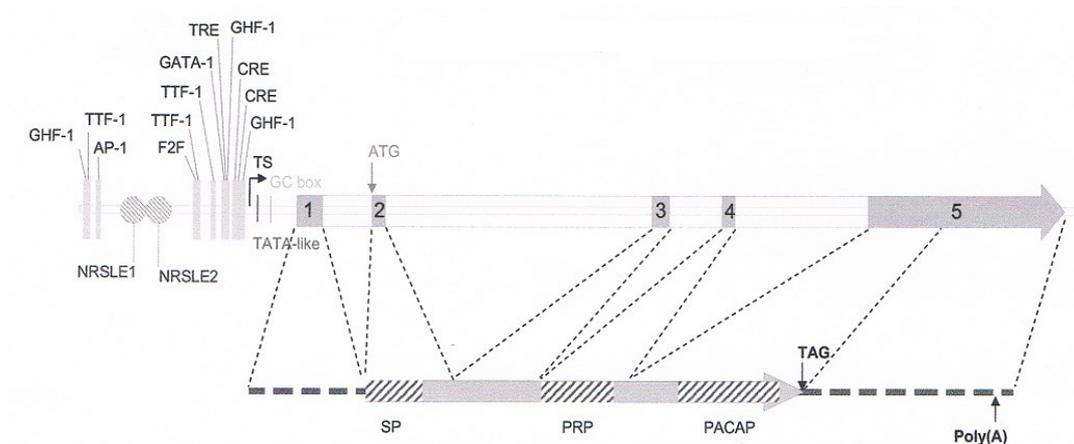
Sei geni codificano i nove peptidi bioattivi della superfamiglia; l'organizzazione strutturale di questi geni è molto simile e tale somiglianza si riflette poi nei precursori dei vari peptidi: ogni gene codifica infatti un peptide segnale, da 1 a 3 peptidi bioattivi e un peptide C-terminale (Sherwood et al., 2000). Oltre ad avere una notevole identità nelle sequenze, la maggioranza dei peptidi di questa superfamiglia presenta anche una somiglianza nella struttura secondaria, con strutture random coil all'N-terminale e regioni ad  $\alpha$ -elica al C-terminale (Cloure et al., 1986, Groneborn et al., 1987; Theriault et al., 1991; Wray et al., 1998).

#### *2.1.1 PACAP*

Il PACAP è un neuropeptide isolato per la prima volta nel 1989 da estratti ipotalamici ovis, in base alla sua capacità di stimolare la formazione di cAMP nelle cellule dell'ipofisi anteriore di ratto (Miyata et al., 1989). Esiste in due forme: PACAP38 e PACAP27, che differiscono per il numero di amminoacidi, rispettivamente 38 e 27. La prima forma ad essere stata identificata è stata il PACAP38 (Miyata et al., 1989); il PACAP27 è stato identificato per la prima volta come prodotto secondario della purificazione della PACAP38 (Miyata et al., 1990); successive analisi hanno dimostrato che il PACAP 37 è una forma tronca del PACAP38, corrispondente ai suoi primi 27 amminoacidi (Miyata et al., 1990).

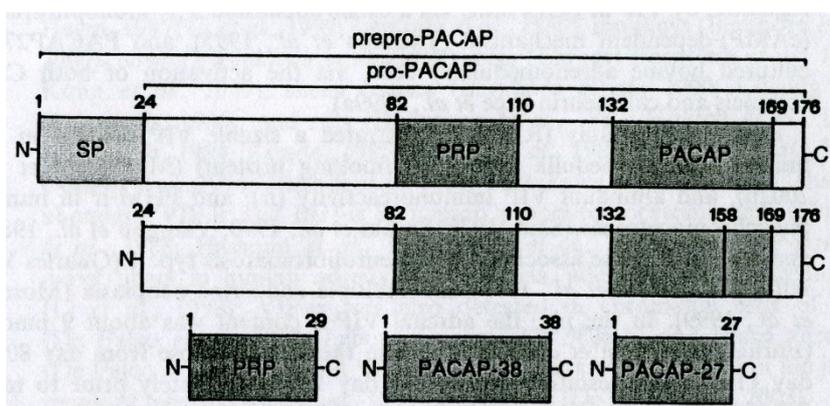
Il PACAP è stato identificato in varie specie di vertebrati, nelle quali è risultato il peptide più conservato della superfamiglia secretina/PACAP/glucagone in termini di lunghezza e di sequenza nucleotidica e aminoacidica. Questo ha fatto ipotizzare che la pressione evolutiva esercitata per la conservazione della sequenza aminoacidica del PACAP è alta, suggerendo che le sue funzioni possono essere essenziali per la sopravvivenza (Vaudry et al., 2000); diversamente, gli altri membri della stessa superfamiglia non manifestano una conservazione della sequenza aminoacidica e di quella nucleotidica così alta. Il gene che lo codifica è il gene ADCYAP1 (Fig. 2), che risulta costituito da cinque esoni e quattro introni; il promotore contiene due elementi CRE (cAMP response element), un elemento di risposta al 12-O-tetradecanoilforbolo 13-acetato e un paio di sequenze omologhe alla sequenza consenso per i siti di legame del GHF-1, che sono importanti per l'espressione tessuto-specifica del GH (Dolle et al., 1990; Castrillo et al., 1991). Queste strutture sono presenti poiché il gene manca delle sequenze TATA o CAAT che sono necessarie per l'avvio del processo di trascrizione. Ricerche sull'attività del promotore hanno rivelato inoltre che il PACAP è espresso costitutivamente e che la trascrizione del suo gene può essere incrementata dal cAMP, dal 12-tetradecanoilforbolo 13-acetato e dal PACAP stesso (Suzuki et al., 1994; Hashimoto et al., 2000). A livello del gene l'assenza di un esone che codifica il PACAP27 indica che questo non deriva da un meccanismo di splicing alternativo bensì dalla proteolisi alternativa post-traduzionale del precursore (Hosoya et al., 1992).

L'organizzazione strutturale dei geni del PACAP, del VIP e del GHRH è simile, il che conferma che tutti e tre originano da un comune gene ancestrale. La struttura del gene del PACAP è stata determinata in numerose specie di mammiferi, fra cui, il ratto, in cui è risultato localizzato sul cromosoma 9q37 (Cai et al., 1995; Yamamoto et al., 1998; Cummings et al., 2002), e l'uomo, in cui è risultato localizzato nella regione p11 del cromosoma 18 (Hosoya et al., 1992). La sua sequenza è stata determinata anche nei vertebrati non mammiferi tra cui la lucertola, *Podarcis sicula* (Valiante et al., 2007), il modello sperimentale utilizzato nella mia attività di ricerca.



**Figura 2:** organizzazione del gene e dell'mRNA del *PACAP* umano (Vaudry et al., 2000).

Il PACAP è dunque sintetizzato come prepro-ormone, che nell'uomo è risultato costituito da 176 aminoacidi; in questo preproormone, il PACAP è preceduto da un peptide segnale e da una proregione (107 aa) ed è seguito dalla sequenza Gly<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup>-Arg<sup>30</sup> che serve per il processamento proteolitico e l'amidazione, (Fig. 3).

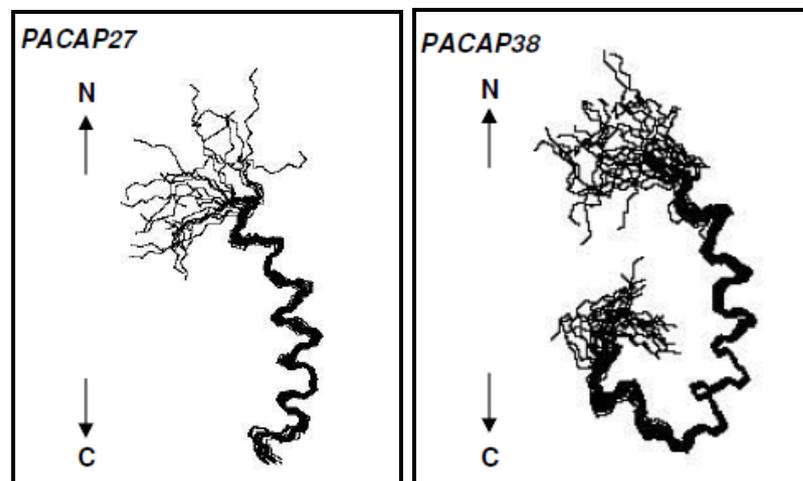


**Figura 3:** schema che illustra il processamento post-traduzionale del preproPACAP (Conconi et al., 2006).

In tali processi interviene una famiglia di proormone convertasi (PCs), enzimi caratterizzati per la prima volta in alcuni tessuti di mammiferi (Li et al., 1998, 2000). Tra queste PCs, la PC<sub>1</sub> e la PC<sub>2</sub> sono espresse in cellule ad attività endocrina e neuronale; tali enzimi, a livello ipotalamico, sono stati evidenziati nel nucleo sopraottico e paraventricolare, in cui molti neuroni esprimono il PACAP, il cui precursore viene processato e convertito nelle forme mature PACAP38 e 27, rispettivamente di 4,5 e 3,0 kDa, proprio grazie all'attività enzimatica di PC<sub>1</sub> e PC<sub>2</sub> (Li et al., 1998, 2000). A livello del testicolo e dell'ovario alla maturazione del precursore

non vi partecipano né la PC<sub>1</sub> né la PC<sub>2</sub>, ma un'altra PC, la PC<sub>4</sub>, che è espressa in modo specifico in queste cellule proprio quando è presente il PACAP (Li et al., 1998, 2000).

La struttura conformazionale del PACAP38 e del PACAP27 è stata determinata mediante spettroscopia CD e NMR. Il PACAP27 è risultato così costituito all'N-terminale da un primo dominio, di 8 aminoacidi, con una struttura random coil; i restanti aminoacidi formano altri 4 domini: uno con conformazione "beta", gli altri con conformazione "alfa-elica". La struttura del PACAP38 è simile a quella del PACAP27: varia solo la zona C-terminale che risulta costituita da una corta coda in conformazione "alfa-elica" (Fig. 4).



**Figura 4:** struttura del PACAP27 e del PACAP38 (Sze et al., 2007).

La tripletta N-terminale His-Ser-Asp, il dominio centrale ad  $\alpha$ -elica e la coda C-terminale formano tre siti di ancoraggio per il riconoscimento del recettore.

Due di questi tre domini strutturali possono contribuire al legame ad alta affinità con il recettore. La tripletta N-terminale, oltre a legare il recettore, è essenziale anche per l'attivazione del recettore e la trasduzione del segnale (Wong et al., 2000).

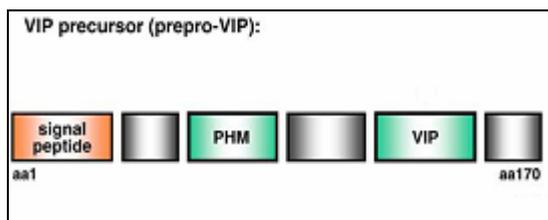
### 2.1.2 Il VIP

Il VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) è un peptide di 28 aminoacidi, che presenta il 68% di identità di sequenza con il PACAP. Diversamente dal PACAP, il VIP è uno dei primi peptidi ad essere stato isolato (Said e Mutt, 1970a) dall'ileo di maiale. Questo peptide deve il suo nome all'azione vasodilatatoria che induce dopo

somministrazione sistemica (Said e Mutt, 1970b). I primi esperimenti dimostrarono che il VIP è localizzato principalmente (presente innanzitutto) nelle cellule nervose; nel tubo digerente, e che il suo rilascio ha potenti effetti sui muscoli lisci, sull'assorbimento di acqua e ioni e sulla secrezione da parte del pancreas e dell'intestino (Barbezat e Grossman, 1971). Successivi studi hanno chiarito che il VIP esplica le sue funzioni tramite la stimolazione dell'adenilato ciclasi con conseguente aumento di cAMP (Desbguois et al., 1973).

Il VIP è stato caratterizzato in varie specie di vertebrati e la sua sequenza risulta altamente conservata nel corso dell'evoluzione (Sherwood et al., 2000; Cardoso et al., 2007).

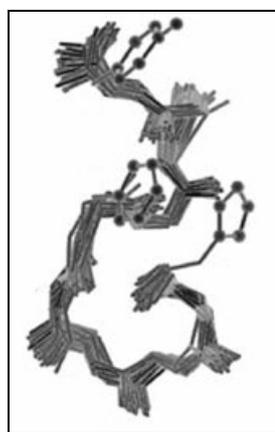
Il gene del VIP umano è stato clonato nel 1985 e mappato sul cromosoma 6 nella regione q25 (Tsukada et al., 1985; Gozes et al., 1987); sei anni dopo sono stati clonati anche il gene del VIP di ratto e di topo, nei quali sono risultati localizzati sul cromosoma 1p11 e 10A1, rispettivamente (Lamperti et al., 1991). Il gene del VIP è costituito da sette esoni e sei introni ed è caratterizzato dalla presenza di un promotore che presenta 3 TATAAA box (Yamagami et al., 1988; Sena et al., 1994), dei siti consenso AP2 (Sena et al., 1994), un elemento di risposta al cAMP (CRE) entro le 100bp dal sito di inizio (Yamagami et al., 1988; Sena et al., 1994; Hahm e Eiden, 1996), un'area responsiva alle citochine circa 1 Kb a monte del sito di inizio (Tolentino et al., 1995) e un'area contenente sequenze di DNA ripetute (Linder et al., 1987). Il gene del VIP codifica anche per un'altra proteina il PHI (Peptide Histidine-Isoleucine amide) nei vertebrati non mammiferi e il PHM (Peptide Histidine-Methionine) nei vertebrati mammiferi. Il PHI e il PHM differiscono solo nell'aminoacido C-terminale, dove nel primo è presente un'isoleucina mentre nel secondo è presente una metionina. Questi sono peptidi biologicamente attivi costituiti da 27 aminoacidi e sono molto simili al VIP nella sequenza e nelle funzioni, anche se sono meno potenti di questo. La traduzione dell'mRNA determina quindi la formazione di un precursore del VIP, (preproVIP), contenente un peptide segnale, un peptide N-terminale, il peptide PHI/PHM, il VIP e un peptide C-terminale. La proteolisi di questo precursore porterà poi alla formazione del VIP (Fig. 5).



**Figura 5:** il precursore del VIP (Dickson e Finlayson, 2009).

Nel precursore, sia il PHI/PHM sia il VIP sono fiancheggiati al C-terminale dagli aminoacidi Gly-Lys-Arg, che guidano il processamento del precursore, dal momento che costituiscono dei siti di proteolisi e successiva amidazione (Fahrenkrug, 2010).

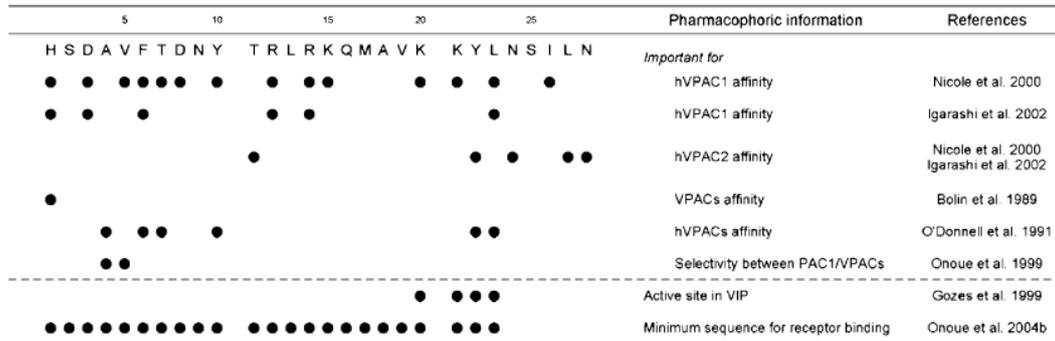
La struttura conformazionale del VIP riflette quella descritta per gli altri membri della superfamiglia; in particolare, numerosi studi conformazionali hanno evidenziato che il VIP possiede due segmenti di strutture secondarie: una struttura random coil all’N-terminale, contenente circa dieci residui aminoacidi (da 1 a 9), e una lunga struttura ad  $\alpha$ -elica nella regione C-terminale (dalla posizione 10 al C-terminale) (Bodanszky et al., 1974; Robinson et al., 1982; Bodanszky e Bodanszky, 1986; Onoue et al., 2008) (Fig. 6).



**Figura 6:** struttura del VIP (Onoue et al., 2008).

Attraverso analisi successive è stato analizzato il rapporto struttura-attività di questo peptide al fine di identificare la parte del peptide coinvolta nell’interazione con i recettori (Stiuso et al., 2006) e la conformazione in cui si trova preferenzialmente il dal VIP.

Le analisi funzionali della struttura del VIP hanno identificato i residui His1, Asp3, Phe6, Arg 12, Arg14 e Leu23 come quelli che interagiscono con il recettore VPAC<sub>1</sub> e i residui Thr11, Tyr22, Asn24, Leu27 e Asn28 con recettore VPAC<sub>2</sub> (Igarashi et al., 2002; Onoue et al., 2008) (Fig. 7).



**Figura 7:** dati di diversi studi riguardanti l'affinità del VIP per i recettori VPAC (Onoue et al., 2008).

Le regioni N-terminale e C-terminale sono importanti per l'interazione con i recettori (Gourlet et al., 1996). Infatti sostituzioni dell'N-terminale del VIP con quello del PACAP mostrano un'attività PACAP-like piuttosto che VIP-like (Sakiyama et al., 1991). Inoltre modificazioni chimiche nella regione N-terminale, determinano un cambiamento significativo nella attività biologica del VIP, incluso la capacità di legare i recettori e la capacità di attivare l'adenilato ciclastasi (Onoue et al., 2008).

## 2.2 Distribuzione e funzione del PACAP e del VIP

Sin dalla loro scoperta, sono stati condotti molti studi al fine di descrivere la distribuzione del PACAP e del VIP nelle diverse specie di vertebrati. Nei mammiferi, in particolare, questi peptidi, sono risultati ampiamente distribuiti in tutto l'organismo. In generale, VIP e PACAP presentano una diversa localizzazione nel sistema nervoso centrale, mentre colocalizzano nei tessuti periferici (Fahrenkrug and Hannibal., 2004). Nel sistema nervoso centrale, questi neuropeptidi sono stati identificati in differenti territori; in particolare, il VIP è stato descritto in tutto l'encefalo, ed in particolare nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, amigdala, nucleo soprachiasmatico (SCN) e ipotalamo (Koves et al., 1991; Mikkelsen and Fahrenkrug 1994; Acsady et al., 1996; Fahrenkrug and Hannibal., 2004). La maggior parte degli studi condotti sulla distribuzione del PACAP nel sistema nervoso centrale

sono stati focalizzati sul PACAP38, dal momento che questa è la forma predominante trovata nell'encefalo; infatti il PACAP27 rappresenta solo il 10 % della quantità del PACAP totale (Arimura et al.,1991). Nel sistema nervoso centrale i livelli più alti di PACAP38 sono stati evidenziati nell'ipotalamo, in particolare nei nuclei paraventricolari e periventricolari e nel nucleo soprachiasmatico (SCN) (Arimura et al., 1991, Masuo et al.,1993); inoltre il PACAP38 è risultato presente anche nel nucleo arcuato, nell'amigdala, nei nuclei talamici, nella corteccia cerebrale e nell'ipofisi posteriore (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993; Masuo et al., 1993; Fukuhara et al., 1997). Infine, sia il VIP sia il PACAP sono stati anche localizzati nelle fibre nervose che innervano i vasi sanguigni cerebrali (Miao and Lee., 1990; Uddman et al., 1993).

La coespressione del VIP e del PACAP è stata documentata in molte strutture periferiche, sebbene non è sempre chiaro se i peptidi siano localizzati all'interno dei neuroni che innervano un particolare organo oppure all'interno delle cellule dell'organo stesso. Tuttavia, entrambi i peptidi colocalizzano nel sistema cardiocircolatorio, nel sistema digerente, nel tratto urogenitale, nel sistema immunitario, nella muscolatura scheletrica e liscia ed infine in molte ghiandole endocrine ed esocrine (Ghatei et al., 1993; Werkstroom et al., 1998; Vaudry et al., 2000). Così come evidenziato nel tessuto nervoso, tra le due forme di PACAP, il PACAP38 è la forma predominante anche negli organi periferici (Arimura et al.,1991). In particolare, i più alti livelli di PACAP38 sono stati riscontrati nel testicolo, dove il PACAP costituisce il neuropeptide più rappresentativo e abbondante con una concentrazione quasi doppia rispetto a quella rilevata nell'encefalo (Arimura et al.,1991). Alla luce dell'ampia distribuzione, PACAP e VIP possono essere considerati peptidi a funzione pleiotropica con un ampio spettro d'azione a livello sistemico (Cardoso et al., 2007a). Infatti è sempre più evidente il coinvolgimento di queste molecole nel controllo di differenti processi biologici come: la risposta infiammatoria, la vasodilatazione, la secrezione di istamina gastrica, la produzione di insulina e glucagone, la risposta immunitaria, la produzione di catecolamine (adrenalina, noradrenalina), lo sviluppo embrionale, la crescita e il differenziamento cellulare, la neurogenesi, la genesi di differenti tipi di cancro e la

riproduzione. (Couvineau et al., 1986; Dejda et al., 2005; Dickson e Finlayson, 2009; Moody et al., 2003a,b; Muller et al., 1995; Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; Vaudry et al., 2000; Waschek, 1995).

## **CAPITOLO III:**

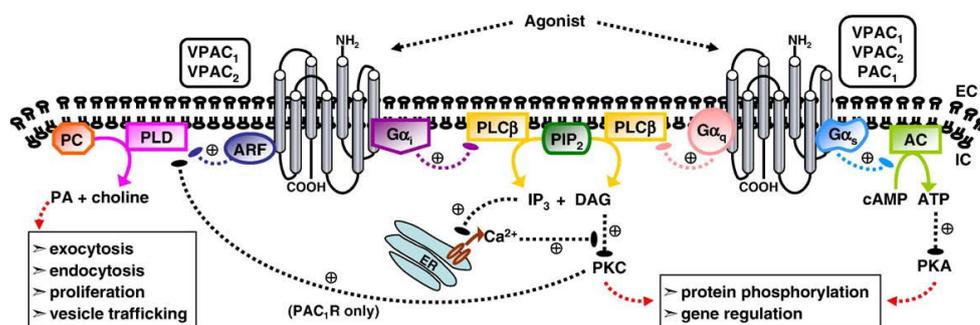
### **I RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP**

#### **3.1 Generalità**

Il PACAP e il VIP sono due peptidi strettamente correlati: presentano infatti il 68% di identità nella sequenza aminoacidica, il che comporta che questi neuropeptidi interagiscono con alcuni recettori comuni: VPAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub>. Oltre a questi due recettori il PACAP interagisce, in modo esclusivo, con il recettore PAC<sub>1</sub> (Dickson e Finlayson, 2009). PAC<sub>1</sub> e VPAC sono membri di una grande famiglia di recettori accoppiati a proteine G, spesso denominati come la famiglia di GPCR-B o famiglia 2 dei GPCRs, che comprende i recettori della famiglia glucagone/secretina, la calcitonina e l'ormone paratiroideo (Laburthe et al. 2002). I GPCR-B sono glicoproteine ampiamente distribuite, che presentano un'identica organizzazione strutturale caratterizzata da un dominio extracellulare N-terminale, sette domini transmembrana idrofobici altamente conservati uniti da loop intra ed extracellulari e da un dominio intracellulare C-terminale (Conconi et al., 2006; Vaudry et al. 2000). L'estremità N-terminale contiene dieci aminoacidi altamente conservati, tra cui sei cisteine e potenziali siti di N-glicosilazione cruciali per la conformazione del recettore e l'interazione con il ligando (Hashimoto et al., 1996; Holtmann et al., 1995; Laburthe et al 2002). Tale estremità, però, non è sufficiente da sola a legare il ligando, infatti, per la completa attivazione del recettore è necessario che il ligando interagisca anche con i loop extracellulari. A seguito dell'interazione con il ligando, i recettori, attraverso le proteine G che legano il terzo loop intracellulare e il dominio C-terminale, attivano diversi pathway di segnalazione che vedono coinvolti diversi secondi messaggeri, quali il cAMP, l'IP<sub>3</sub> o il Ca<sup>++</sup> (Couvineau et al., 2003; Dickson et al., 2006a,b; Laburthe et al., 2002, Vaudry et al.,2009) (Fig. 8).

Come membri della famiglia di GPCR-B, i recettori PAC/VPAC attivati determinano principalmente un innalzamento dei livelli di cAMP dipendente dall'attivazione della proteina G<sub>αs</sub>. Tuttavia, possono anche stimolare la produzione di secondi messaggeri addizionali così come è stato osservato per altri GPCRs. Infatti, in aggiunta all'cAMP, l'attivazione dei recettori può stimolare la produzione di Ca intracellulare ([Ca<sup>2+</sup>];

Dickson et al., 2006a,b) attraverso la via delle proteine  $G\alpha_q$  (attivata tanto dal recettore  $PAC_1$  quanto dai recettori VPAC; (MacKenzie et al., 1996; Van Rampelbergh et al., 1996; Langer e Robberecht, 2005) o  $G\alpha_i$  (attivata esclusivamente dai recettori VPAC (MacKenzie et al., 1996; Langer e Robberecht, 2005). Inoltre, l'attivazione dei recettori può modulare l'attività della fosfolipasi D (PLD) grazie all'intervento di diversi mediatori chimici (Morisset et al., 1995; McCulloch et al., 2000): nel caso dei recettori VPAC e dell'isoforma hop1 del recettore  $PAC_1$ , l'attività della PLD dipende dall'attivazione della piccola proteina G ARF (ADP-Ribosilation Factor) (McCulloch et al., 2000); nel caso delle altre isoforme del recettore  $PAC_1$ , invece, l'attivazione della PLD non dipende da ARF, ma è secondaria all'attivazione della fosfolipasi C (PLC; McCulloch et al., 2000). Infine questi recettori possono attivare la tirosina kinasi (Morisset et al., 1995), i canali del calcio (Chatterjee et al., 1996; Tompkins et al., 2006), la GTPasi RhoA (Henle et al., 2006), la MAPK (Moroo et al., 1998), il monossido di carbonio (Watkins et al., 2004) e la Src (Macdonald et al., 2005).



**Figura 8:** vie di trasduzione del segnale che possono essere stimulate dall'attivazione dei recettori PAC/VPAC (Dickson e Finlayson, 2009).

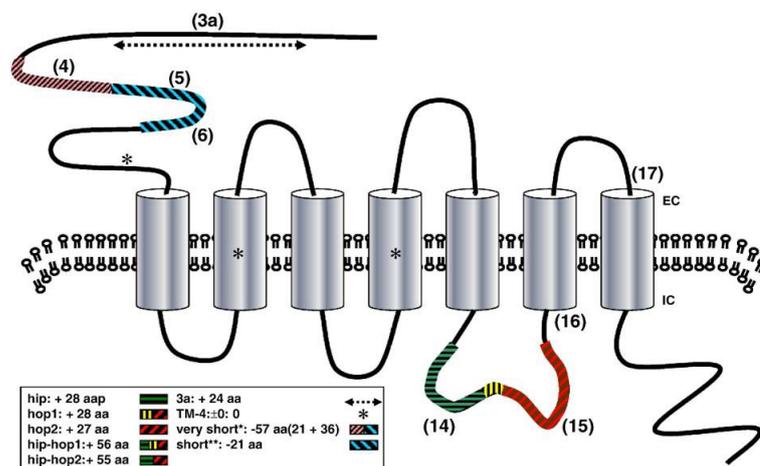
### 3.1.1 Il recettore $PAC_1$

I  $PAC_1$  sono recettori definiti PACAP-specifici, dal momento che legano il PACAP con un'affinità 1000 volte maggiore rispetto al VIP.

La sequenza del cDNA del recettore  $PAC_1$  è stata determinata per la prima volta da linee cellulari di carcinoma degli acini pancreatici (Pisegna e Wank., 1993) ed è caratterizzata da un'elevata percentuale di identità con la sequenza del cDNA dei recettori del glucagone, secretina e della calcitonina (Vaudry et al, 2000). Successivamente il gene del recettore  $PAC_1$  è stato clonato in diverse specie di

vertebrati, quali uomo (Ogi et al., 1993; Pisegna e Wank, 1996), bovini (Miyamoto et al., 1994), ratti (Hashimoto et al., 1993; Spengler et al., 1993) topo (Hashimoto et al., 1996a), pesce dorato *Caraussius auratus* (Wong et al., 1998), rana *Rana ridibunda* (Alexandre et al., 1999) e *Xenopus laevis* (Hu et al., 2000). Nell'uomo il gene è localizzato nella regione p15 del cromosoma 7 (Brabet et al., 1996), nel ratto sul cromosoma 4 (Chatterjee et al., 1997) e nel topo sul cromosoma 18 (Aino et al., 1995). L'organizzazione introne/esone del gene del recettore PAC<sub>1</sub>, è molto simile a quella degli altri membri della famiglia di recettore della secretina (Vaudry et al., 2000). Dalla sua trascrizione e dalla successiva traduzione del suo mRNA, si ha la formazione di una proteina di 495 amminoacidi caratterizzata dalla presenza di un dominio extracellulare N-terminale, sette domini transmembrana idrofobici uniti da loop intra ed extracellulari e da un dominio intracellulari C-terminale.

Lo splicing alternativo nella terza ansa intracellulare genera 6 varianti caratterizzate dall'assenza o dalla presenza di una o due cassette di 28 (hip o hop1) o 27 (hop2) amminoacidi (Journot et al., 1994). È possibile quindi distinguere: l'isoforma null, che è quella breve, caratterizzata dall'assenza delle due cassette (PAC<sub>1</sub>-R-null), l'isoforma hip, l'isoforma hop<sub>1</sub>, l'isoforma hop<sub>2</sub>, le isoforme hip-hop<sub>1</sub>/hip-hop<sub>2</sub> (Fig. 9).



**Figura 9:** isoforme del recettore PAC<sub>1</sub> (Dickson e Finlayson, 2009).

Le 6 varianti sono accoppiate a diverse vie di trasduzione del segnale e sono tutte in grado di attivare la via dell'adenilato ciclasi; solo le varianti null e hop sono invece in grado di attivare, spontaneamente, anche la via di segnalazione della fosfolipasi C, mentre le isoforme hip-hop hanno una capacità ridotta di attivare la fosfolipasi C;

infine la variante hip non è in grado di attivare questa via di segnalazione (Spengler et al., 1993; Journot et al., 1994; Pisegna e Wank, 1993, 1996); infatti la presenza della cassetta hip indebolisce la stimolazione dell'adenilato ciclasi e impedisce l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), suggerendo quindi che le varie cassette siano coinvolte nell'interazione con i secondi messaggeri. La variante null è la forma più abbondante nell'encefalo ed in particolare nell'ipofisi, mentre la variante hop è predominante nel testicolo e nella ghiandola adrenale (Spengler et al., 1993). Successivi studi condotti da Pantaloni et al nel 1996, hanno messo in evidenza la presenza di un'ulteriore isoforma, definita variante corta (PAC1-R-s), caratterizzata da una delezione di 21 amminoacidi nel dominio N-terminale. L'esistenza di questi 21 amminoacidi influenza la selettività del recettore per il PACAP38 e il PACAP27, infatti la variante PAC<sub>1</sub>-R-s mostra una maggiore affinità per il PACAP27. L'isoforma corta attiva la PLC e l'AC (Pantaloni et al., 1996).

Infine, nell'encefalo di ratto è stata clonata una variante aggiuntiva chiamata TM(4), caratterizzata dalla presenza di 4 domini transmembrana e che differisce dalla variante corta per la presenza di sostituzioni amminoacidiche localizzate nei domini transmembrana II e IV (Chatterjee et al., 1996). Sorprendentemente, l'attivazione del recettore PAC<sub>1</sub> TM4 non ha effetti sull'attività dell'adenilato ciclasi o della fosfolipasi C, ma causa un ingresso di calcio attraverso i canali del calcio voltaggio dipendenti (L) (Chatterjee et al., 1996). Lo splicing alternativo del trascritto del gene PAC<sub>1</sub> rappresenta un meccanismo di regolazione coinvolto nell'espressione tessuto-specifica del gene e/o nella stabilità dell'mRNA (Vaudry et al., 2000).

### 3.1.2 I recettori VPAC

I recettori VPAC in base alla loro affinità per l'elodermina (Cristophe et al., 1986) e la secretina (Hubel et al., 1972) sono stati suddivisi in due classi: VPAC<sub>1</sub>R, che mostra una bassa affinità per la secretina e l'elodermina, e VPAC<sub>2</sub>R, che possiede un'alta affinità per l'elodermina, ma non lega la secretina (Arimura, 1993).

Per quanto riguarda il recettore VPAC<sub>1</sub>, nei mammiferi, il gene è stato clonato per la prima volta nell'intestino di ratto; esso è lungo circa 22 Kb ed è caratterizzato dalla presenza di 13 esoni (Sreedharan et al., 1995; Pei, 1997). Successivamente questo gene

è stato isolato anche nell'uomo, in linee cellulari di adenocarcinomi ed è stato localizzato nella regione p22 del cromosoma 3. Dalla trascrizione del gene e dalla successiva traduzione dell'mRNA si ha la formazione di una proteina di 459 amminoacidi che mostra un'identità del 50% con la sequenza amminoacidica del recettore PAC<sub>1</sub> (Pinsegna e Wank., 1993). Nei vertebrati non mammiferi, gli studi sul recettore VPAC<sub>1</sub> sono piuttosto limitati, infatti il suo gene è stato clonato solo nel pesce dorato *Carassius auratus* (Chow et al., 1997) e nella rana *Rana ridibunda* (Alexandre et al., 1999).

Per quanto riguarda il recettore VPAC<sub>2</sub>, il gene è stato clonato inizialmente da librerie di cDNA di ipofisi di ratto (Lutz et al., 1993) e successivamente da librerie di cDNA di placenta umana (Adamou et al., 1995). Il gene di ratto è stato localizzato sul cromosoma 4 (Cai et al., 1995), mentre quello umano, costituito da 13 esoni (Lutz et al., 1999b), è stato localizzato nella regione q36.3 del cromosoma 7 (Mackay et al., 1996). Il recettore umano e quello del ratto presentano un'identità dell'87% nella sequenza amminoacidica (Gagnon et al., 1994; Svoboda et al., 1994; Adamou et al., 1995). Così come per il recettore PAC<sub>1</sub>, anche per i recettori VPAC sono state identificate delle isoforme. Infatti, alcuni studi condotti nel 2006 da Bokaei hanno messo in evidenza la presenza, per VPAC<sub>1</sub> e per VPAC<sub>2</sub>, di un'isoforma a cinque segmenti transmembrana derivante dallo splicing alternativo. Analizzando le proprietà funzionali della forma tronca di VPAC<sub>1</sub>R, è emerso che la presenza di soli cinque segmenti transmembrana riduce l'efficienza di attivazione della via di segnalazione dell'cAMP (Bokaei et al., 2006). Infine è stato descritto anche un recettore specifico per il VIP nelle cellule muscolari lisce di cavia, che differisce dal recettore VPAC<sub>2</sub>R per soli due amminoacidi nel dominio di legame N-terminale (Teng et al., 2001; Zhou et al., 2006); la sostituzione di questi due amminoacidi determina però un'elevata affinità per il VIP e un'affinità di legame molto bassa per il PACAP (Zhou et al., 2006).

### **3.2 La distribuzione dei recettori PAC/VPAC**

Dal momento in cui sono stati scoperti, sono stati condotti molti studi sulla distribuzione dei recettori PAC/VPAC in diverse specie di vertebrati. In particolare,

attraverso l'utilizzo di diverse tecniche, è stato messo in evidenza che questi recettori, presentano una localizzazione sovrapponibile con quella dei loro ligandi, infatti, sono ampiamente distribuiti sia nel sistema nervoso sia in numerosi organi periferici.

Per quanto riguarda il recettore PAC<sub>1</sub>, i più alti livelli di espressione sono stati evidenziati nell'encefalo, mentre, i più bassi livelli sono stati registrati nei polmoni e nel fegato (Hashimoto et al., 1993; Ogi et al., 1993). Nell'ambito del sistema nervoso centrale (SNC), la presenza di questo recettore è stata riportata in diverse aree, quali bulbo olfattivo, ippocampo, area postrema, corteccia cerebrale e cingolata, ipotalamo, talamo e rafe (Hashimoto et al., 1996a; Vaudry et al., 2000; Joo et al., 2004; Kalamatianos et al., 2004). Nei distretti periferici l'espressione del recettore PAC<sub>1</sub> è stata registrata nell'ipofisi, nella ghiandola adrenale, nelle cellule del sistema immunitario, nell'ovario, nell'utero, nei testicoli e nell'epididimo (Shivers et al., 1991; Reubi et al., 2000; Vaudry et al., 2000). Inoltre, gli studi condotti sulla distribuzione delle singole isoforme, seppur limitati, hanno messo in evidenza una diversa localizzazione delle singole varianti; infatti è stato messo in evidenza che le isoforme null e hop sono quelle maggiormente rappresentate nell'encefalo con una particolare localizzazione sia nelle cellule nervose sia nelle cellule di sostegno (microglia, astrociti e oligodendrociti) (Ashur-Fabian et al., 1997; Grimaldi and Cavallo, 1999; Jaworski, 2000; Joo et al., 2004; Pilzer and Gozen, 2006; Kim et al., 2000), mentre le isoforme hop sono le varianti predominanti nel testicolo, nel bulbo olfattivo e nella ghiandola adrenale (Spengler et al., 1993; Zhou et al., 2000). Infine, le altre isoforme hanno una distribuzione piuttosto limitata, infatti l'isoforma hip è circoscritta al bulbo olfattivo e all'ippocampo, mentre l'isoforma TM4 è stata localizzata nella corteccia cerebrale, nei vasi deferenti, nel polmone e nelle cellule  $\beta$  del pancreas (Chatterjee et al., 1996).

Anche i recettori VPAC sono particolarmente espressi nel encefalo; tuttavia questi presentano tra loro una differente distribuzione nelle diverse aree del sistema nervoso centrale. Infatti, numerosi studi hanno messo in evidenza che in questo distretto il recettore VPAC<sub>1</sub> è maggiormente presente nella corteccia cerebrale, nella corteccia piriforme, nel giro dentato, nel putamen caudato, nel nucleo sopraottico e nel nucleo laterale (Usdin et al., 1994; Vertongen et al., 1998; Vaudry et al., 2000), mentre il recettore VPAC<sub>2</sub> è principalmente rappresentato nel nucleo periventricolare, nel

talamo, nell' ipotalamo e nell' amigdala (Sheward et al., 1995; Vertongen et al., 1998; Vaudry et al., 2000). Infine, per quanto riguarda i tessuti periferici la presenza dei recettori VPAC è stata registrata in numerosi distretti, con una distribuzione in alcuni casi sovrapponibile. In particolare, il recettore VPAC<sub>1</sub> è localizzato nel fegato, nei reni, nella prostata, nel seno, nei polmoni, nella mucosa del tratto gastrointestinale e nelle cellule del sistema immunitario (Delgado et al., 1996b,c; Reubi et al., 2000), mentre il recettore VPAC<sub>2</sub> è localizzato nella muscolatura liscia di organi e vasi sanguigni, negli acini pancreatici, nelle cellule della tiroide, negli alveoli polmonari, nella mucosa del tratto gastrointestinale, nelle cellule del sistema immunitario e nel testicolo (Delgado et al., 1996a; Harmar et al., 2004).

### **3.3 Gli antagonisti dei recettori del PACAP e del VIP**

Sulle basi delle loro numerose funzioni, sia il VIP sia il PACAP possono essere considerati come promettenti candidati per il trattamento di molteplici patologie quali disfunzioni erettili, patologie della pelle, ipertensione polmonare, il diabete di tipo 2, disordini della motilità gastrointestinale, patologie di vario tipo del sistema nervoso e varie malattie infiammatorie come sclerosi multipla, malattia di Crohn, artrite reumatoide e shock settico (Abad et al., 2003, 2006; Biancani et al., 1988; Delgado et al., 1999b, 2001; Dinsmore et al., 1999; Kato et al., 2004; Petvok et al., 2003; Tsutsumi et al., 2002; Vaudry 2000). Tuttavia l'ampio spettro di funzioni biologiche in cui sono coinvolti PACAP e VIP, rende questi due peptidi candidati non ideali per il trattamento farmacologico *in vivo*. La scoperta dell'esistenza di tre recettori con diversa localizzazione, due dei quali riconosciuti da entrambi i peptidi, ha però stimolato la ricerca di antagonisti selettivi per PAC<sub>1</sub>R, VPAC<sub>1</sub>R e VPAC<sub>2</sub>R.

Grazie al clonaggio molecolare dei recettori e all'espressione di proteine ricombinanti in cellule che non esprimono costitutivamente alcun recettore, sono stati identificati peptidi analoghi per ogni tipo di recettore (Gourlet et al., 1997a).

Un peptide naturale chiamato maxadilan, è stato caratterizzato come un selettivo agonista del recettore PAC<sub>1</sub> (Moro e Larner, 1997). Il maxadilan è un peptide isolato per la prima volta dalle ghiandole salivari della mosca *Lutzomyia longipalpis* in base all'azione vasodilatatoria che induce dopo somministrazione sistemica in seguito alla

stimolazione dell'cAMP; è costituito da 61 amminoacidi, con due anelli disolfurici tra le cisteine in posizione 1-5 e 14-51 (Lerner et al.,1991). Questo peptide presenta una bassa identità di sequenza con il PACAP, e può essere considerato come uno dei pochi esempi di funzionalità convergente tra due molecole che mostrano una bassa similarità strutturale. Un analogo sintetico del maxadilan, chiamato M65, caratterizzato da una delezione nella sequenza amminoacidica nel tratto 25-41, si è dimostrato essere un potente e specifico antagonista del recettore PAC<sub>1</sub>; infatti non stimola l'attività dell'adenilato ciclasi e inibisce gli effetti del PACAP in maniera competitiva e dose-dipendente (Moro et., 1999).

Per quanto riguarda il recettore VPAC<sub>1</sub> il primo antagonista descritto è il peptide chimerico [Ac-His1, D-Phe2, K15, R16, L27]VIP(3-7)/GRF(8-27) (numero di codice PG 97-269). La sua affinità è più alta per il recettore di uomo piuttosto che per quello di ratto e, così come l'antagonista M65, arresta la produzione di cAMP e limita gli effetti del PACAP e del VIP in maniera competitiva e dose-dipendente (Gourlet et al.,1997a). Infine per il VPAC<sub>2</sub>R sono stati descritti due diverse categorie di antagonisti: derivati ciclici del VIP con diverse mutazioni [Ro 25-1553 (Gourlet et al., 1997b) e Ro25-1392 (Xia et al., 1997)] e derivati acilati all'N-terminale del VIP (PG96-237-PG97-277-PG99-465). È stato osservato che l'acilazione con lunghe catene di acidi grassi di 14, 16, 18 carboni diminuisce l'attività intrinseca dei recettori (Gourlet et al., 1998). L'antagonista PG 99-465 presenta l'acido miristico (acido grasso con 14 atomi di carbonio) e mostra un'alta affinità per VPAC<sub>2</sub> piuttosto che per VPAC<sub>1</sub> (Moreno et al., 2000).

## CAPITOLO IV:

### PACAP/VIP/RECETTORI NEL TESTICOLO

#### 4.1 Generalità

Il controllo delle attività testicolari rientra nelle funzioni in cui sono coinvolti PACAP e VIP; in particolare alcuni studi, condotti prevalentemente nei mammiferi, hanno messo in evidenza che durante la spermatogenesi, sia l'mRNA sia le proteine di questi neuropeptidi, così come i loro recettori, sono presenti nel testicolo in modo stadio-specifico (Shioda et al., 1994; Li e Arimura, 2003).

#### 4.1.1 PACAP

Il PACAP è una molecola che riveste un ruolo di primo piano nel controllo delle attività testicolari (spermatogenesi e steroidogenesi) dal momento che è il neuropeptide più rappresentativo e abbondante presente nel testicolo con una concentrazione quasi doppia rispetto a quella ritrovata nell'encefalo (Arimura et al., 1991). La distribuzione testicolare di questo neuropeptide è stata studiata principalmente nei mammiferi (ratti, uomo, topo), dove è stata registrata una localizzazione stadio-specifico sia della proteina sia del messaggero (Arimura et al., 1991; Miyata et al., 1989); inoltre così come nell'encefalo, il PACAP38 è la forma maggiormente rappresentata in questo distretto (Arimura et al., 1991). Nei ratti, il PACAP è presente nei testicoli di animali immaturi (Koh et al., 2003; El-Gehani et al., 1998a, 2000) e maturi (Kononen et al., 1994; Shioda et al., 1994; Daniel e Habener, 2000). In particolare, nei testicoli di ratti immaturi, i livelli di mRNA aumentano progressivamente a partire da testicoli di 28 giorni e raggiungono un picco al giorno 42, e poi diminuiscono lentamente. Diversamente, la proteina, che è già presente a bassi livelli nel testicolo dei feti e dei neonati, inizia ad aumentare dal giorno 28 e finisce per raggiungere i livelli più alti al giorno 56. Questi risultati suggeriscono che l'espressione del *PACAP* sia regolata e che i cambiamenti nei livelli di mRNA siano poi seguiti da cambiamenti nei livelli di proteina. I bassi livelli di proteina trovati nei feti e neonati possono avere origine extratesticolare, come la placenta (Li e Arimura, 2003). Analisi di ibridazione *in situ* (ISH) hanno inoltre dimostrato che, nel testicolo di ratti

adulti, l'mRNA del *PACAP* è localizzato nelle cellule germinali all'inizio dello sviluppo, in particolare negli spermatogoni e negli spermatociti I (Shioda et al., 1994), indicando che la trascrizione del gene avviene durante gli stadi iniziali del differenziamento delle cellule germinali (McArdle, 1994; Shioda et al., 1998). Ulteriori analisi hanno poi evidenziato che il messaggero è solo debolmente localizzato negli spermatozoi negli spermatidi rotondi e allungati soprattutto negli stadi III-VII del ciclo spermatogenico; analisi di Northern blot hanno mostrato che la più alta quantità di mRNA del *PACAP* è presente dallo stadio V al VII, mentre livelli molto bassi sono presenti negli stadi da I a II e da IX a XIV (Kononen et al., 1994). Tuttavia, mediante analisi di RT-PCR, Daniel e Habener nel 2000 hanno mostrato che il trascritto del PACAP è espresso in maniera altamente stadio specifica negli stadi I-III poco prima di un brusco calo dei livelli di mRNA dell'*FSH* rispettivamente durante gli stadi II-IV. L'espressione stadio-specifica del PACAP è stata confermata anche nel testicolo di topo (Cummings et al., 2002). Diversamente, non è stato trovato nessun segnale per l'mRNA del *PACAP* nelle cellule di Leydig e di Sertoli (Shioda et al., 1994). Analisi immunostochimiche condotte nei ratti, hanno evidenziato che la proteina è presente solo nelle cellule germinali e, tra queste, negli spermatidi situati vicino al lume dei tubuli seminiferi; in particolare, il PACAP è presente negli spermatidi nella fase acrosomica, mentre è assente negli stadi iniziali della spermatogenesi, negli spermatozoi e nelle cellule di Sertoli e di Leydig (Shioda et al., 1994; Yanaihara et al., 1998). A livello ultrastrutturale, il PACAP è stato localizzato nei granuli e nel cappuccio acrosomiale (Shioda et al., 1994). Questi dati dimostrano quindi che nel ratto i livelli maggiori PACAP sono presenti negli spermatidi (Li e Arimura, 2003). Nell'uomo, sia l'mRNA sia la proteina del PACAP presentano una distribuzione testicolare simile a quella riportata per ratti; tuttavia un segnale immunoreattivo per il PACAP38 è stato ritrovato anche negli spermatogoni, suggerendo pertanto, nell'uomo, un possibile coinvolgimento di questo neuropeptide anche nel controllo delle fasi iniziali della spermatogenesi (Nakamura et al., 2013). In aggiunta, recenti studi, condotti nel topo da Tanii nel 2011, hanno messo in evidenza la presenza del PACAP anche nell'acrosoma degli spermatozoi rilasciati nelle vie spermatiche, suggerendo dunque un possibile coinvolgimento di questa molecola

anche nella fecondazione dell'ovocita. Infine il PACAP è stato localizzato anche nei vari tratti dell'epididimo, dove: è risultato più abbondante nelle regioni del *caput* e del *corpus* rispetto a quella della *cauda* (Leung et al., 1998), il che ha fatto ipotizzare un suo coinvolgimento nella regolazione delle secrezioni epididimali e conseguentemente nella maturazione degli spermatozoi (Zhou et al., 1997).

#### 4.1.2 VIP

Come per il PACAP, anche per il VIP è stato ipotizzato un coinvolgimento nei meccanismi che regolano la spermatogenesi. Nei ratti, analisi di RT-PCR e di Northern blot, non hanno mostrato la presenza dell'mRNA del *VIP* nel testicolo di feti o di neonati (El-Gehani et al., 1998a, b). Infatti il *VIP* è presente esclusivamente nelle fibre nervose che innervano l'epididimo e l'area interstiziale; in particolare, molte fibre nervose contenenti il *VIP* sono state osservate nella regione della *cauda* dell'epididimo, nel dotto deferente, nelle ghiandole accessorie e nel pene di ratti di 20 giorni (Zhu et al., 1995; Alm et al., 1977, 1980; Properzi et al., 1992). Il numero di fibre positive al *VIP* aumenta nei ratti di 35 giorni, mentre in ratti più vecchi non sono state osservate ulteriori differenze (Properzi et al., 1992). I tubuli seminiferi e la regione del *caput* dell'epididimo non mostrano alcuna immunoreattività (Vaalasti et al., 1986), mentre l'epididimo è densamente innervato da fibre immunoreattive al *VIP* (Tainio, 1994). Questi dati suggeriscono che le fibre nervose contenenti il *VIP* appaiono nel sistema genitale dopo la nascita e raggiungono il completo sviluppo prima del completamento della pubertà. Inoltre, le fibre nervose positive al *VIP* sono visibili in un primo momento nella zona interstiziale ed immediatamente dopo nella tunica muscolare che delimita i dotti ed i vasi sanguigni nella regione sub-epiteliale del testicolo, suggerendo così un possibile coinvolgimento di tale neuropeptide nel controllo del flusso sanguigno e nelle secrezioni locali (Properzi et al., 1992). Dall'altro lato, l'immunoreattività per il *VIP* nel testicolo di ratti adulti è molto bassa e difficilmente misurabile con il metodo RIA (El-Gehani et al., 1998b, c).

#### 4.1.3 I recettori

Vari studi, condotti principalmente nei mammiferi, hanno messo in evidenza la presenza dei recettori del PACAP e del VIP nel testicolo. In generale, è stato messo in evidenza che nei testicoli dei mammiferi i recettori più rappresentati sono il PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> (Li e Arimura, 2003). Per quanto riguarda il recettore PAC<sub>1</sub>, indagini di ibridazione *in situ*, condotte su sezioni di testicoli di ratti adulti, hanno mostrato che l'mRNA che codifica per questo recettore è localizzato negli spermatogoni, negli spermatociti I, negli spermatidi, nelle cellule di Leydig e di Sertoli (Shioda et al., 1998). La proteina mostra una localizzazione simile a quella del messaggero, infatti è presente nelle cellule germinali (Shivers et al., 1991), nelle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992) e nelle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997). In particolare, studi autoradiografici eseguiti con <sup>125</sup>I-PACAP27, hanno messo in evidenza che il PAC<sub>1</sub>R è presente negli spermatogoni, negli spermatociti, negli spermatidi e nelle code degli spermatozoi (Shivers et al., 1991); successivamente grazie all'utilizzo di un anticorpo specifico per il PAC<sub>1</sub>R è stato dimostrato invece che l'immunoreattività è localizzata soprattutto negli spermatidi rotondi, con una marcatura particolarmente intensa nell'acrosoma, così come riportato per il PACAP, mentre è assente negli spermatogoni e negli spermatociti I (Arimura e Shioda, 1995).

Per quanto riguarda i recettori VPAC, è stato evidenziato che nel testicolo di ratti adulti i trascritti del VPAC<sub>2</sub>R sono espressi a livelli significativi, mentre solo gli spermatozoi umani esprimono un alto livello di mRNA del VPAC<sub>1</sub>R (Li e Arimura, 2003).

Nei testicoli di feti e di neonati di ratti non è stato evidenziato il messaggero di VPAC<sub>1</sub>R, mentre quello di VPAC<sub>2</sub>R è presente dal giorno 15 (El-Gehani et al., 1998b, c); pertanto è possibile ipotizzare che PACAP e VIP possano regolare le fasi iniziali della steroidogenesi, proprio a questo stadio, prima dell'inizio della secrezione di LH, interagendo con il recettore VPAC<sub>2</sub>. Inoltre, indagini di ibridazione *in situ* condotte su sezioni di testicolo di ratti adulti, con una sonda a cDNA per VPAC<sub>2</sub>R, hanno messo in evidenza una positività all'interno dei tubuli seminiferi, in particolare negli spermatociti (Csaba et al., 1997) e nelle cellule di Leydig (Hueso et al., 1989; Krempels et al., 1995). La proteina mostra la stessa localizzazione del messaggero

(Hueso et al., 1989; Krempels et al., 1995). Diversamente il recettore VPAC<sub>1</sub>, che sembrerebbe essere assente all'interno dei tubuli è presente nelle cellule di Leydig e nei vasi deferenti (Moretti et al., 2002).

#### **4.2 Ruolo di PACAP e VIP nel testicolo**

Il ruolo svolto dal PACAP e dal VIP nel controllo delle attività testicolari è ancora in gran parte da definire, e in ogni caso gli studi disponibili riguardano quasi esclusivamente i mammiferi (Heindel et al., 1992; Shioda et al., 1994; Romanelli et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a, b, c; El-Gehani et al., 2000), dove è stato dimostrato che questi peptidi intervengono nel controllo sia della spermatogenesi sia della steroidogenesi testicolare, dal momento che influenzano l'attività delle cellule germinali (West et al., 1995), delle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a) e delle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992).

In particolare, studi *in vitro* condotti su testicoli di esemplari adulti di ratto, hanno evidenziato che nelle cellule germinali il PACAP e il VIP, attraverso l'innalzamento dei livelli di cAMP, attivano la sintesi proteica negli spermatociti e la inibiscono negli spermatidi (West et al., 1995). La differente risposta registrata nei due tipi di cellule può essere spiegata con il fatto che le cellule germinali esprimono in modo stadio-specifico diversi membri della famiglia multigenica CREM/CREB (Delmas e Sassone-Corsi, 1994, West et al., 1994), che include proteine capaci di attivare o inibire la trascrizione genica. Di conseguenza, l'attivazione di diverse proteine può portare ad avere effetti opposti sulla sintesi proteica negli spermatociti (attivazione) e negli spermatidi (inibizione) (West et al., 1995).

Nelle cellule di Sertoli in coltura il PACAP stimola un aumento della sintesi di cAMP, con conseguente innalzamento dei livelli di 17 $\beta$ -estradiolo e aumento della secrezione di inibina, in modo dose-dipendente (Heindel et al., 1992). Diversamente è stato evidenziato che il VIP non ha alcun effetto a livello delle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992).

Il PACAP e il VIP agiscono anche sulle cellule di Leydig. Il PACAP induce una secrezione dose-dipendente di testosterone dalle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a); questo effetto sembra essere

mediato da un'isoforma del recettore PAC<sub>1</sub>R accoppiata a un canale del sodio attraverso una proteina G sensibile alla tossina della pertosse (Rossato et al., 1997). Inoltre è stato dimostrato che l'azione esercitata dal PACAP sulle cellule di Leydig sembra essere influenzata dal turnover dell'hCG (human Corionic Gonadotropin), infatti in caso di bassa concentrazione di gonadotropina si osserva un potenziamento della risposta delle cellule di Leydig, al contrario una elevata concentrazione di hCG determina l'effetto opposto (Romanelli et al., 1997). Bisogna specificare però che delle due forme del PACAP quella coinvolta in tale processo è il PACAP38, in quanto in presenza del PACAP27 non si osserva alcun aumento nella produzione di testosterone, né basale né hCG indotta. Così come il PACAP, anche il VIP è un induttore della produzione di testosterone (Kasson et al., 1986; Romanelli et al., 1997); infatti topi knockout per il VIP mostrano una ridotta steroidogenesi, con livelli di testosterone più bassi rispetto ai topi selvatici (Lacombe et al., 2006, 2007); questo fenomeno è tra l'altro associato ad una riduzione dell'espressione dell'mRNA di due componenti della via biosintetica del testosterone, i.e. StAR e 3 $\beta$ -HSD (Lacombe et al., 2006, 2007), il che suggerisce che il PACAP e il VIP agiscono sugli elementi della via biosintetica del testosterone.

Anche le cellule di Leydig fetali rispondono al PACAP, che può quindi avere un importante ruolo regolatorio prima dell'inizio della secrezione di LH ipofisaria (El-Gehani et al., 2000; Csaba et al., 1997). Il PACAP determina infatti un aumento della produzione di cAMP e di testosterone nelle cellule di Leydig isolate da embrioni di ratto (El-Gehani et al., 2000); gli stessi effetti sono determinati anche dal VIP (El-Gehani et al., 1998b, c), tuttavia il PACAP è almeno cinque volte più potente del VIP nello stimolare la steroidogenesi durante la fase fetale (El-Gehani et al., 1998a). Il PACAP e il VIP sono quindi probabili candidati per la regolazione endocrina/paracrina delle cellule di Leydig fetali, prima ancora dell'intervento dell'LH (El-Gehani, 1998a, b, c, 2000).

Inoltre studi condotti nel topo da Tanii nel 2011, hanno messo in evidenza che il PACAP, nelle vie spermatiche, potrebbe essere coinvolto nel controllo della motilità degli spermatozoi, dal momento che l'attività di queste cellule sembra essere ridotta in presenza degli antagonisti selettivi del PACAP, mentre appare aumentata in presenza

degli agonisti del PACAP e del PACAP stesso. L'utilizzo del VIP non produce lo stesso effetto, per cui questa molecola sembrerebbe non essere coinvolta nel controllo di questo processo (Tanii et al 2011).

Oltre a ciò nell'epitelio dell'epididimo il PACAP stimola la secrezione di cloruro, che è importante per l'attivazione e la conservazione degli spermatozoi (Zhou et al., 1997), per cui il PACAP può agire come regolatore paracrino della maturazione spermatica, stimolando gli spermatozoi presenti nell'epididimo, che, pur avendo perso la capacità di produrre il PACAP (Shioda et al., 1994), contengono ancora i suoi recettori (Shivers et al., 1991). Diversamente, è stato dimostrato che la somministrazione apicale di VIP non influenza la secrezione epididimale di cloruro (Wong, 1990). Infine, è stato dimostrato che nell'uomo il PACAP induce il rilascio di noradrenalina in modo dose-dipendente e che PACAP e VIP inducono la vasodilatazione (agendo sulla muscolatura liscia), stimolando così il flusso sanguigno testicolare (Lissbrant e Bergh, 1997, Lissbrant et al., 1999); ciò suggerisce che questo peptide è coinvolto nell'induzione e nel mantenimento dell'erezione (Hedlund et al., 1994, 1995). Alla luce di questi studi è ipotizzabile che il PACAP e il VIP potrebbero essere utilizzati come molecole per combattere la sterilità maschile.

#### **4.3 Il PACAP e il VIP nel testicolo di vertebrati non mammiferi**

Se per i mammiferi le informazioni circa la distribuzione del PACAP, del VIP e dei loro recettori nel testicolo sono ampie, nei vertebrati non mammiferi i dati disponibili a riguardo sono piuttosto limitati.

La presenza di questi peptidi e dei loro recettori è stata evidenziata tramite indagini di biologia molecolare nel testicolo di varie specie; in particolare, nella rana *Rana ridibunda*, tramite PCR e Northern blot, Alexandre et al. (2000a, 2002) hanno evidenziato che il PACAP non è presente nel testicolo, diversamente dai mammiferi, in cui questo è presente in elevate quantità (Arimura et al., 1991), mentre sono stati evidenziati bassi livelli del suo recettore PAC<sub>1</sub> (Alexandre et al., 2002). L'assenza del PACAP nel testicolo di rana può essere dovuta al fatto che il gene viene espresso solo in rane sessualmente attive e non negli animali tenuti in cattività; in alternativa, nella rana il PACAP potrebbe non essere coinvolto nella regolazione dell'attività testicolare

(Alexandre et al., 2000a). Nel tritone *Triturus carnifex*, infine, Gobbetti e Zerani (2002) hanno dimostrato che il PACAP38 induce la sintesi di PGE<sub>2</sub>, cAMP, 17β-estradiolo e di aromatasi, mentre riduce i livelli di testosterone; la somministrazione di un COX inibitore determina l'effetto inverso. Questo suggerisce che il PACAP38 agisce sulla PLC, inducendo l'aumento di PGE<sub>2</sub>, che a sua volta, agendo sull'adenilato ciclasi, determina un aumento dell'attività dell'aromatasi con conseguente aumento del 17β-estradiolo e riduzione del testosterone (Gobbetti e Zerani, 2002). Più recentemente Agnese et al. (2010), hanno messo in evidenza la presenza del PACAP e del recettore PAC<sub>1</sub> nel testicolo di due riproduttori stagionali, *Triturus carnifex* e *Podarcis sicula*. In particolare, in *Triturus* il neuropeptide e il suo recettore sono presenti nelle cellule germinali delle cisti contenenti spermatogoni e spermatociti I e nelle cellule di Sertoli e di Leydig localizzate dentro e tra queste cisti, mentre negli spermatozoi è presente solo il PACAP. In *Podarcis*, nel testicolo di animali del periodo produttivo, è stata rilevata la presenza sia del PACAP sia del recettore PAC<sub>1</sub> a livello delle cellule germinali e a livello delle cellule somatiche (cellule Leydig e Sertoli) (Agnese et al., 2010). Per quanto riguarda il VIP, uno studio del 2012 condotto da Agnese et al, ha messo in evidenza la presenza di questo neuropeptide e dei suoi recettori nel testicolo del pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* (Agnese et al., 2012): in *Torpedo*, diversamente dai mammiferi, il VIP è risultato ampiamente distribuito nei diversi stadi spermatogenici e nelle cellule somatiche; in modo simile ai mammiferi, il recettore VPAC<sub>1</sub> è poco rappresentato, mentre il recettore VPAC<sub>2</sub> è ampiamente distribuito come il VIP. In base all'ampia distribuzione del PACAP, del VIP e dei loro recettori riscontrata nel testicolo dei vertebrati non mammiferi, è possibile ipotizzare che anche in queste specie il PACAP e il VIP siano molecole coinvolte nella regolazione delle attività testicolari (spermatogenesi e steroidogenesi).

## **SCOPO DELLA TESI**

La riproduzione è un momento strategico nella vita di un organismo, il che, nel corso dell'evoluzione, ha portato al perfezionamento di una serie di meccanismi di controllo che intervengono a livello sistemico (asse ipotalamo-ipofisi-gonade) e a livello intragonadico (meccanismi di tipo paracrino e autocrino). Negli ultimi decenni, lo studio della spermatogenesi ha evidenziato che tale processo è regolato non solo dalle gonadotropine ipofisarie LH e FSH, ma anche da altri fattori tanto di origine ipofisaria quanto di sintesi locale, tra cui il PACAP e il VIP. Non pochi studi sono stati condotti nel testicolo dei mammiferi per definire la distribuzione di questi neuropeptidi e dei loro recettori e per cercare di delineare in quali funzioni possano essere coinvolti (Li e Arimura, 2003; Nakamura et al., 2013; Tanii et al., 2011); d'altra parte piuttosto limitati sono invece gli studi condotti nel testicolo dei vertebrati non mammiferi (Agnese et al 2010; Agnese et al., 2012; Gobbetti e Zerani 2002).

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca più ampio sul differenziamento dei gameti nei vertebrati ed ha lo scopo di fornire un quadro più esauritivo sul ruolo del PACAP e del VIP nel controllo delle attività testicolari (spermatogenesi e steroidogenesi) nei vertebrati non mammiferi. A tal fine è stato scelto come modello sperimentale il rettile squamato *Podarcis sicula*, un riproduttore stagionale caratterizzato da un'organizzazione tubulare del testicolo. Le indagini saranno condotte in differenti momenti del ciclo riproduttivo di *Podarcis*, il che permetterà di prendere in esame testicoli che differiscono non solo per l'organizzazione strutturale dei tubuli seminiferi in essi contenuti ma anche per il profilo ormonale (Andò et al 1990). Inizialmente saranno condotte analisi per studiare l'espressione del sistema PACAP/VIP/recettori nel testicolo di *Podarcis*. In particolare, attraverso indagini di Real Time PCR saranno analizzate le variazioni nei livelli dell'mRNA del *PACAP* e del *VIP* nel corso delle differenti fasi del ciclo riproduttivo; attraverso analisi di ibridazione *in situ*, saranno poi identificati i tipi cellulari coinvolti nella sintesi di questi due neuropeptidi; mediante indagini di immunocitochimica sarà infine valutata la distribuzione del PACAP e del VIP e dei relativi recettori, PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub>. Sempre mediante indagini di

immunocitochimica sarà inoltre valutata la distribuzione dell'aromatasi P450 nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, dal momento che questo è un enzima chiave coinvolto nella conversione degli androgeni in estrogeni.

Successivamente, per poter verificare alcune delle funzioni testicolari del PACAP e del VIP e i recettori coinvolti in tali funzioni, saranno allestite colture d'organo su testicoli di *Podarcis* con i neuropeptidi da soli e in presenza degli antagonisti dei loro recettori utilizzandoli in combinazioni differenti. Per le analisi in coltura *Podarcis sicula* si presenta come modello sperimentale ottimale, in quanto offre situazioni testicolari e ormonali diverse nelle diverse fasi del ciclo: infatti, l'utilizzo di animali del periodo riproduttivo permetterà di lavorare su testicoli in cui la spermatogenesi è attivamente impegnata nella produzione di spermatozoi, mentre l'utilizzo di animali del periodo di stasi estiva e invernale, permetterà di lavorare su testicoli in cui la spermatogenesi è bloccata. Il presente lavoro di tesi oltre a portare un ulteriore contributo alla conoscenza dei meccanismi che controllano l'attività riproduttiva di *Podarcis sicula* permetterà di definire sempre di più i meccanismi che a livello locale regolano il controllo della gametogenesi maschile, in special modo per gli amnioti che presentano, come *Podarcis*, un'organizzazione tubulare a livello del testicolo.

## **CAPITOLO V**

### **MODELLO SPERIMENTALE:**

#### **il testicolo di *Podarcis sicula***

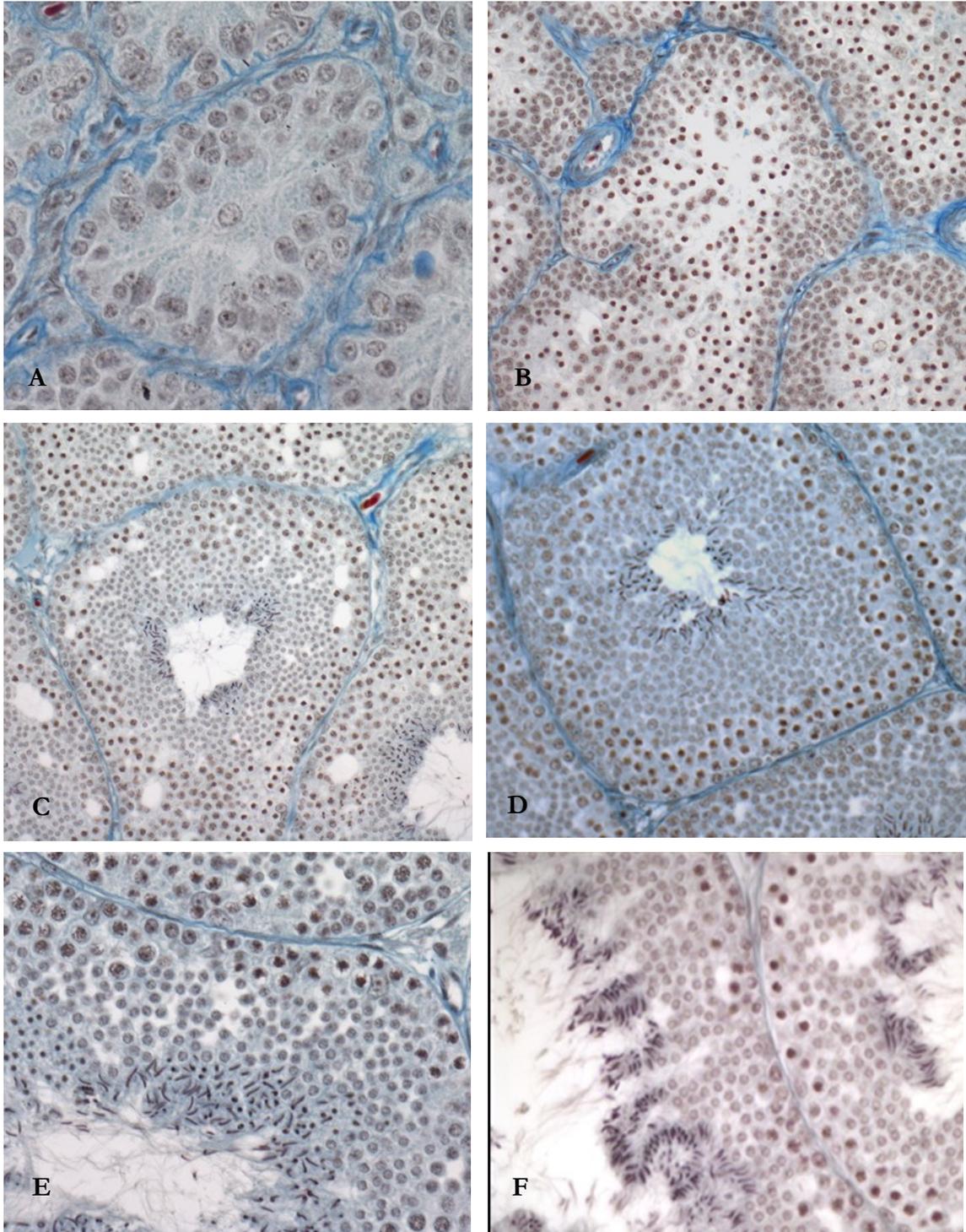
Il modello sperimentale su cui ho condotto le mie indagini è *Podarcis sicula*, il rettile più diffuso in Italia, che appartiene alla famiglia dei Lacertidae (Fig. 10).



**Figura 10:** esemplare maschio di *Podarcis sicula*

#### **5.1 La spermatogenesi in *Podarcis sicula***

Il maschio di *Podarcis sicula* è un esemplare a riproduzione stagionale, il cui testicolo è formato da tubuli seminiferi (Galgano e D'Amore, 1953) (Fig. 11) abbondantemente anastomizzati e ramificati, pochi dei quali convergono in uno spazio che si immette in un canale flessuoso che collega il testicolo alla testa dell'epididimo.



**Figura 11:** il testicolo tubulare di *Podarcis sicula* nei periodi di: stasi estiva (A), prima ripresa autunnale (B), piena ripresa autunnale (C), stasi invernale (D), ripresa primaverile (E) e nel periodo riproduttivo (F).

All'interno dei tubuli seminiferi sono presenti cellule di Sertoli e cellule germinali; le cellule di Leydig si trovano nel tessuto connettivo interstiziale all'esterno dei tubuli. La spermatogenesi è divisa in una fase proliferativa, una meiotica e una di

differenziamento. Le cellule germinali si sviluppano attraverso le varie fasi della spermatogenesi all'interno dei tubuli seminiferi, per cui all'interno del tubulo è possibile distinguere spermatogoni nella porzione basale e spermatozoi nella parte apicale; in particolare nell'epitelio seminifero della lucertola sono presenti due tipi di spermatogoni, gli spermatogoni A e B. Gli spermatogoni A presentano forma ovoidale e sono presenti nell'epitelio durante tutto l'anno; tali cellule vanno incontro a mitosi per dare origine agli spermatogoni B, che, dopo essersi divisi ripetutamente, entrano in meiosi I. All'interno dei tubuli seminiferi si distinguono poi spermatociti I e II, spermatidi rotondi e allungati e infine spermatozoi. Le uniche altre cellule presenti all'interno dell'epitelio seminifero sono le cellule di Sertoli, caratterizzate da un nucleo triangolare e presenti all'interno dei tubuli in ogni periodo dell'anno (Lofts, 1972).

Il ciclo riproduttivo di *Podarvis sicula* è stato suddiviso in 6 diversi periodi (Galgano e D'Amore, 1953; Angelini e Botte, 1992). Il primo periodo (stasi estiva o periodo refrattario) che va da metà Luglio a fine Agosto, è caratterizzato da testicoli di dimensioni ridotte e senza lumi, nei cui tubuli, nei casi di massima regressione testicolare, sono presenti solo pochi spermatogoni di classe A e cellule di Sertoli; (Fig. 11A). Il secondo periodo (prima ripresa autunnale), che va da inizio Settembre a fine Ottobre, è caratterizzato da un aumento delle dimensioni testicolari e da una riattivazione delle mitosi, che vede coinvolti gli spermatogoni, per cui i tubuli seminiferi sono caratterizzati dalla presenza, oltre che degli spermatogoni, di spermatociti primari (Fig. 11B). Il terzo periodo (piena ripresa autunnale), che va da inizio a fine Novembre, è caratterizzato da un aumento delle dimensioni testicolari e da una ripresa della spermatogenesi, dapprima stentata, che poi prosegue e si conclude con la produzione di una quantità limitata di spermatozoi, che talvolta vengono rilasciati nel lume dei tubuli ma mai arrivano all'epididimo: questa ripresa non è infatti utile ai fini della riproduzione (Fig. 11C). A questa breve riattivazione segue poi un quarto periodo (stasi invernale) che va da inizio-metà Dicembre a fine Febbraio; durante questa fase, a causa della precedente ripresa della spermatogenesi, sono presenti nel testicolo tutti gli stadi, dagli spermatogoni a un modesto numero di spermatozoi; il numero delle cellule germinali è comunque ridotto ed esse tendono a rimanere nello stadio differenziativo raggiunto durante il terzo periodo (Fig. 11D). Nel quinto periodo (ripresa primaverile), che va da inizio Marzo a fine Aprile, i

testicoli sono caratterizzati da un aumento considerevole delle dimensioni e da un'intensa attività proliferativa, che è di preparazione al periodo riproduttivo (Maggio-Giugno); la spermatogenesi si riattiva e diventa via via più intensa, con tubuli seminiferi che presentano le cellule germinali in tutti gli stadi di differenziamento con una produzione di nuovi spermatozoi, ora presenti numerosi anche all'interno del lume dei tubuli (Fig. 11E). In questo periodo si osserva anche lo sviluppo dell'epididimo che nei periodi precedenti era rimasto bloccato. Il sesto periodo (periodo riproduttivo o di massima attività), che va da inizio Maggio a fine Giugno-inizio Luglio, risulta caratterizzato da una attività sempre più rilevante che si estrinseca in una elevata produzione di spermatozoi, che, una volta rilasciati, raggiungono l'epididimo, che si presenta in piena attività secretoria (Fig. 11F). Questa fase è seguita da una diminuzione dell'attività spermatogenica, a cui segue il periodo di stasi estiva (Galgano e D'Amore, 1953; Angelini e Botte, 1992).

## **5.2 Meccanismi di controllo della spermatogenesi di *Podarcis sicula***

Nelle specie dei rettili possiamo distinguere due tipi di riproduzione: continua e stagionale (Angelini e Picariello, 1975; Licht, 1984). Le specie con una riproduzione continua sono rare e vivono per lo più nelle foreste tropicali dove le condizioni climatiche sono favorevoli tutto l'anno. Nelle aree tropicali, i cambiamenti climatici (temperatura, umidità) modulano l'attività gonadica. In ambienti con grandi cambiamenti climatici i rettili mostrano un ciclo sessuale stagionale. Le gonadi sono attive solo durante il periodo più favorevole e sono quiescenti per tutto il resto dell'anno. Importanti fattori ambientali come la temperatura e il fotoperiodo intervengono nella ripresa e nel mantenimento della gonade attiva. La riproduzione si arresta con la fase refrattaria regolata da fattori endogeni la cui lunghezza e intensità varia da specie a specie ed è più o meno marcata a seconda della stagionalità dell'ambiente. In queste specie possiamo distinguere due ondate spermatogeniche. Nei maschi, la produzione di spermatozoi e l'attività endocrina sono fattori dipendenti dalla temperatura, e le variazioni del fotoperiodo agiscono come fattori sinergici. Nei rettili, come in altri vertebrati, l'attività gonadica dipende dagli ormoni dell'ipofisi e da due gonadotropine FSH-like ed LH-like. Tuttavia negli squamati all'interno della ghiandola pituitaria è stata isolata una sola gonadotropina (Licht et al., 1976, 1979). Nella lucertola *Podarcis sicula* la riproduzione si ha in primavera e la

refrattarietà inizia in estate e diventa meno intensa con il trascorrere delle settimane per scomparire in autunno quando la temperatura si abbassa (Angelini et al., 1976). In *Podarcis* la ripresa primaverile dipende soprattutto dalla temperatura, poiché inizia ed è mantenuta solo quando raggiunge i 20-23° C. Invece, l'attività endocrina testicolare e lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari richiedono livelli di temperatura più alti (23-28° C) (Angelini et al., 1976). Temperature sotto i 20° permettono una parziale ripresa; intorno agli 8° la gonade non risponde agli stimoli esterni. Il fotoperiodo influenza la ripresa solo se si raggiungono le temperature adeguate. Lunghi fotoperiodi inducono una ripresa precoce e la mantengono nel tempo. È stato suggerito che l'aumento della temperatura in estate induce la refrattarietà coadiuvato dalla diminuzione del fotoperiodo in seguito al solstizio d'estate (Angelini et al., 1976). Alterazioni della temperatura e del fotoperiodo non evitano la refrattarietà, ma l'anticipano o la ritardano, confermando la tesi di Fischer (1967) secondo cui questo è un processo con basi endogene.

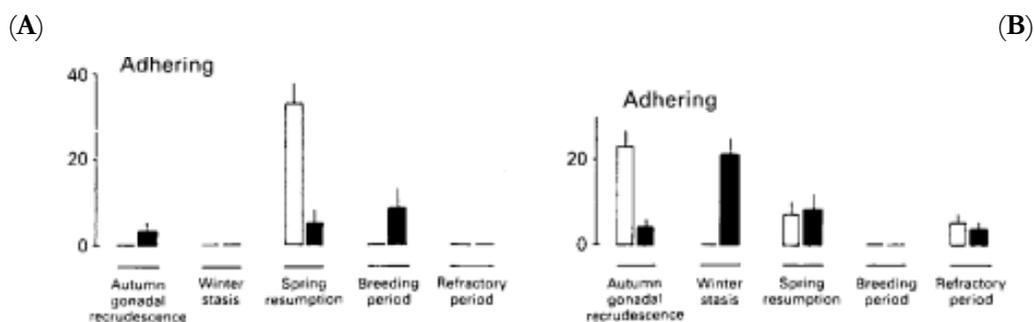
Nei rettili, il testicolo è la più rilevante fonte di ormoni sessuali compresi androgeni ed estrogeni (Botte, 1970). È stato ipotizzato che gli ormoni sessuali prodotti dalle cellule di Leydig vengano rilasciati nel sangue per giungere agli organi periferici; gli ormoni prodotti dalle cellule di Sertoli, invece, potrebbero essere utilizzati per regolare la spermatogenesi e l'attività delle cellule di Leydig (Lofts, 1972; Callard et al., 1976).

Il rapporto tra ormoni sessuali e spermatogenesi è ancora poco conosciuto nei rettili, tuttavia le indagini finora effettuate hanno permesso di evidenziare che la meiosi e la spermioigenesi sono processi androgeno-dipendenti, come nei mammiferi (Lostroh, 1975). Anche in *Podarcis sicula*, durante le due ondate spermatogeniche, sono stati riscontrati livelli significativi di androgeni nel testicolo (Andò et al., 1990; Angelini e Botte, 1992). Nel testicolo, gli androgeni raggiungono il livello massimo in estate, quando la gonade è attiva (Andò et al., 1990, 1992). Iniezioni di antiandrogeni danneggiano la meiosi e la spermioigenesi (Della Corte et al., 1972).

I livelli di testosterone e di 17 $\beta$ -estradiolo variano durante il ciclo riproduttivo: i livelli di androgeni nel plasma sono molto alti a Marzo-Aprile, mentre gli estrogeni prevalgono nel periodo di stasi estiva quando aumentano anche i livelli nel sangue, per cui sono ritenuti responsabili del passaggio dalla fase di piena attività a quella di stasi (Andò et al., 1990). A sostegno di ciò è stato evidenziato che l'iniezione diretta di

estradiolo nei maschi maturi di *Podarvis sicula* induce una regressione drammatica del tessuto testicolare, una compromissione della spermatogenesi e atrofia dell'epididimo. Pertanto, questo steroide potrebbe esercitare una retroazione negativa sistemica sull'asse ipotalamo-ipofisi, con conseguente effetto inibitorio sulla secrezione delle gonadotropine e/o un'azione locale sui tessuti endocrini, regolando negativamente l'attività di alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi degli steroidi (Polzonetti Magni et al., 1984; Varriale et al., 1986).

Nel testicolo sono stati ritrovati anche i recettori per il testosterone e per l'estradiolo. La variazione nei livelli dei recettori riflette quella degli ormoni da essi legati (Paolucci e Di Fiore, 1992). In particolare, i livelli dei recettori del testosterone sono alti durante i periodi di ripresa e nel periodo riproduttivo mentre tale recettore è del tutto assente nei periodi di stasi (Fig. 12A). Diversamente i livelli dei recettori degli estrogeni sono alti durante i periodi di stasi, mentre sono bassi nei periodi di ripresa; tale recettore è assente nel periodo riproduttivo (Fig. 12B). Questi dati confermano che in *Podarvis sicula* il testosterone può essere considerato come l'ormone responsabile dell'attivazione della spermatogenesi, mentre gli estrogeni possono essere considerati gli ormoni implicati nell'inibizione di questo processo (Moger, 1980; Van Der Molen e Rommerts, 1981). Nel testicolo di *Podarvis sicula* sono stati ritrovati anche dei peptidi GnRH-like che potrebbero intervenire come fattori di regolazione della steroidogenesi e della spermatogenesi (King e Millar, 1991; Chieffi et al., 1991).



**Figura 12:** Nei grafici sono riportati le variazioni nei livelli dei recettori del testosterone (A) e degli estrogeni (B) in tutto il ciclo riproduttivo di *Podarvis sicula* (Paolucci e Di Fiore, 1992).

Tra i peptidi identificati a livello del testicolo rientra il PACAP, dal momento che anche nel testicolo di *Podarvis* è stata messa in evidenza la sua presenza e quella del

recettore PAC<sub>1</sub> sia a livello delle cellule germinali sia a livello delle cellule somatiche (cellule Leydig e Sertoli) (Agnese et al. 2010). Questi ultimi risultati, in particolare, mi hanno spinto ad approfondire il ruolo di tale neuropeptide e di un altro ad esso strettamente correlato, il VIP, nel controllo della spermatogenesi di *Podarcis sicula*. Inoltre in *Podarcis*, il PACAP e i suoi recettori sono localizzati anche in altri tessuti, quali l'encefalo, il fegato, lo stomaco, l'intestino e i polmoni (Valiante et al., 2007, 2008, 2009), suggerendo che questo neuropeptide sia coinvolto in svariate funzioni indispensabili per la sopravvivenza di questo rettile. E' infine importante sottolineare che in *Podarcis sicula*, sono note sia la sequenza del PACAP (gi|89593597) sia del recettore PAC<sub>1</sub> (gi|323387845; gi|323387847) sia del VIP (gi|380450150).

## **CAPITOLO VI**

### **MATERIALI E METODI:**

#### **I fase: PACAP/VIP/RECETTORI**

Di seguito sono riportati gli esperimenti riguardanti le indagini di biologia molecolare, di immunoistochimica e le analisi morfologiche e ormonali riguardanti l'allestimento delle colture d'organo.

##### *Animali*

Per gli esperimenti effettuati sono stati utilizzati maschi adulti sessualmente maturi di *Podarcis sicula* in differenti fasi del ciclo riproduttivo; gli esemplari sono stati catturati nei dintorni di Napoli, e poi mantenuti in terrari in condizioni naturali di temperatura e di fotoperiodo e alimentati *ad libitum* con larve di *Tenebrio monitor*. La maturità sessuale di ciascun animale è stata accertata in un primo momento con la misurazione della distanza bocca-cloaca (circa 7 cm) e con la valutazione della presenza di pori femorali ed in un secondo momento con analisi istologiche volte a verificare l'attività spermatogenica. Gli esemplari sono stati sacrificati per decapitazione previa anestesia in ghiaccio.

I testicoli di *Podarcis* sono stati in parte conservati a -80°C per le successive indagini di biologia molecolare e in parte fissati in Bouin per 24 ore, disidratati attraverso una serie crescente di alcoli e inclusi in paraffina. Sezioni di 7 µm di spessore sono state colorate con emallume di Mayer ed eosina e con la colorazione tricromica di Mallory per un'analisi istologica al microscopio ottico. Altre sezioni sono state poste su vetrini polilisinati e superfrost per i successivi esperimenti di immunoistochimica e di ibridazione *in situ*, rispettivamente.

#### **INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

##### *Estrazione di RNA*

RNA totale è stato estratto mediante TRI REAGENT (Sigma) da testicoli di *Podarcis sicula* prelevati tutto l'anno. In particolare il campione è stato omogeneizzato in TRI REAGENT in un omogeneizzatore sterile, centrifugato a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo da microcentrifuga. Per

assicurare una completa dissociazione dei complessi nucleoproteici il campione è stato lasciato per 5 min a temperatura ambiente. Sono stati poi aggiunti 200  $\mu$ L di cloroformio per ogni mL di TRI REAGENT utilizzato. Il campione è stato agitato vigorosamente per 15 secondi e lasciato poi per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela risultante è stata centrifugata a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione ha separato la miscela in tre fasi: una fase organica rossa (contenente proteine), un'interfase (contenente DNA) e una fase acquosa superiore incolore (contenente RNA). La fase acquosa è stata recuperata e trasferita in un nuovo tubo da microcentrifuga e sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di isopropanolo per ogni mL di TRI REAGENT. Il campione è stato lasciato a riposo per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi è stata eseguita una centrifugazione a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. L'RNA ha formato un precipitato sul fondo della provetta. Il surnatante è stato rimosso e l'RNA è stato lavato con 1 mL di etanolo 75° per ogni mL di TRI REAGENT usato. Il campione è stato agitato con vortex e poi centrifugato a 7.500 g per 5 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato e il precipitato di RNA è stato lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti. L'RNA è stato risospeso in 20  $\mu$ L di acqua DEPC. La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio; la concentrazione e la purezza dell'RNA è stata stimata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Il campione risultante è stato conservato a -80°C.

#### *Retrotrascrizione*

L'RNA ottenuto come sopra descritto è stato retrotrascritto mediante SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per ciascuna reazione, 1  $\mu$ g di RNA totale è stato incubato con 1  $\mu$ L di primer oligo-dT (500  $\mu$ g/mL), 1  $\mu$ L di dNTP (10 mM) e acqua fino a 12  $\mu$ L per 5 minuti a 65°C. Dopo una breve centrifugazione, sono stati aggiunti 4  $\mu$ L di 5X First-Strand Buffer, 2  $\mu$ L di DTT 0,1 M e 1  $\mu$ L di acqua RNasi-free; la miscela è stata incubata a 42°C per 2 minuti. E' stato aggiunto 1  $\mu$ L di SuperScript II RT e incubato a 42°C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata mediante incubazione a 70°C per 15 minuti.

### PCR per il PACAP

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template in reazioni di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) volte a verificare la presenza del PACAP nel testicolo di *Podarcis sicula*. Tali reazioni sono state condotte nel termociclatore 2720 dell'Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City, CA). La coppia di primer utilizzata è la stessa utilizzata da Valiante e collaboratori (2007): (F3, 5'-CATTCGGA(CT)GGGATC TTCACGGA(CT)AG-3'; Rd, 5'-CATGTTAIAGAAACACAIGAGCG-3'). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2.5 mM di MgCl<sub>2</sub> e 0.4 µM di ciascun primer. Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	48°C	72°C	72°C	4°C
2'	1'30"	2'	2'	7'	∞
35 cicli					

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio.

### PCR per il VIP

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template in reazioni di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) volte a verificare la presenza del VIP nel testicolo di *Podarcis sicula*. Tali reazioni sono state condotte nel termociclatore 2720 dell'Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City, CA). È stata utilizzata una coppia di primer (VIP for3Ac, 5'-TAGGAAACAGAATGCCCTTTGA-3'; Vip rev1Ac, 5'-AACTCTGTCTTAACTGGGAA-3' disegnati sulla sequenza del PHI/VIP di *Anolis carolinensis* utilizzando il software Genamics Expression 1.1 (Genamics, Hamilton, NZ). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µL di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2 mM di MgCl<sub>2</sub> e 0.4 µM di ciascun primer. Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	45°C	72°C	72°C	4°C
3'	45"	45"	1'	7'	∞
35 cicli					

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

#### *Purificazione dei prodotti di PCR*

I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati eluiti da gel mediante QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) come da data sheet. Il DNA così ottenuto è stato quantificato mediante corsa elettroforetica utilizzando come riferimento una scala quantitativa, la 100 bp ladder (Fermentas). Il campione ottenuto è stato sequenziato con BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e processato con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

#### *Sintesi della sonda a cDNA per il PACAP e per il VIP*

I prodotti dell'eluizione sono stati sottoposti ad amplificazione per PCR utilizzando dNTP marcati con digossigenina (Roche). I prodotti della PCR sono stati corsi su gel di agarosio per stimarne la concentrazione, usando come riferimento la scala quantitativa 100 bp ladder (Fermentas).

#### *Ibridazione in situ*

Per la localizzazione dell'mRNA del *PACAP* e del *PHI/VIP* in *Podarcis sicula* (sonde omologhe) sono state utilizzate due sonde a cDNA ottenute come sopra descritto.

Sezioni di 7  $\mu\text{m}$  di spessore di testicoli di *Podarcis* sono state sparaffinate in histolemon e idratate con una serie decrescente di alcol etilico. Le fette sono state pre-fissate in 4% di paraformaldeide in PBS (NaCl 250 mM, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, pH 7.4), lavate in PBS e digerite con proteinasi K (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM, pH 7.2: di seguito sono state post-fissate in 4% paraformaldeide in PBS, lavate in 2x SSC (NaCl 3 M, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 300 mM) e tenute per almeno 30 minuti in un tampone Tris-Glicina (Tris 100 mM, glicina 100 mM). A questo punto le sezioni sono state pre-ibridate con 40% formammide deionizzata, 5x SSC, 1x Denhardt's solution, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA di sperma di salmone, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di tRNA è ibridata per la notte in camera umida con la miscela di ibridazione, che differisce da quella della pre-ibridazione per la presenza della sonda (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) marcata con digossigenina. La temperatura di ibridazione utilizzata per il PACAP è di 52 C° mentre per il VIP è di 42°C. Le fette sono state lavate in 2x SSC e

formammide 50% per 30 minuti; segue poi un lavaggio in 1x SSC e formammide 50% per 30 minuti e in 0.5x SSC e formammide 50% per 15 minuti. Le fette sono state poi lavate in 2x SSC. Nei passaggi successivi, necessari per la rivelazione della sonda, le fette sono state incubate in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM pH 7.5 per 30 minuti e poi con un anticorpo anti-digossigenina coniugato a fosfatasi alcalina (Roche), diluito 1:5000 v/v in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM, pH 7.5, 10% v/v di siero normale di pecora (Sigma-Aldrich). Tale passaggio è stato effettuato a 4°C per la notte. A questo punto sono state bloccate le fosfatasi endogene lavando le sezioni in 0.1% Tween-20 e 0.5 mg/mL levamisole (Sigma-Aldrich). Le fette sono state poi incubate con un substrato della fosfatasi alcalina, il BM Purple (Roche) in 0.1% Tween-20 e 0.5 mg/mL levamisole. Dopo aver bloccato la reazione in 1 mM EDTA in PBS, le sezioni sono state contrastate con Nuclear Fast Red (Vector), montate in Acquovitrex (Carlo Erba) e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) e acquisite con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### *Real Time PCR*

Campioni di RNA totale (1µg), ottenuti come precedentemente descritto, sono stati retrotrascritti a cDNA utilizzando un kit di trascrizione inversa QuantiTect (QIAGEN). Le reazioni di Real Time PCR sono state effettuate in un Applied Biosystems 7500 in tempo reale del sistema utilizzando il Master Mix PCR SYBR Potenza (Applied Biosystems). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato, e sono stati inclusi diversi controlli negativi. Inoltre è stata quantificata simultaneamente, l'espressione della  $\beta$ -actina, per avere un controllo standard interno. I primer utilizzati nella Real Time PCR sono stati: PACAPF3\_modPs 5' CATTTCGGATGGGATCTTCACGG 3'; PACAP\_rev2NPs 5' GGCTACTCGGCGTCCTTTGTTC 3'; VIPfor3Ac, 5' TAGGAAACAGAATGCCCTTTGA 3'; Vip rev1Ac, 5' AACTCTGTCTTAACTGGGAA-3';  $\beta$ -ACTIN\_ForPs 5' TATCCACGAGACCACCTTC 3',  $\beta$ -ACTIN\_RevPs 5' TCCACCAATCCAGACAGAG 3'. La variazione dell'espressione è stata ottenuta utilizzando il metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . I risultati sono stati analizzati graficamente utilizzando il Software Graphpad 5 (San Diego, California); l'analisi statistica è stata effettuata mediante il test ANOVA con

correzione di Bonferroni e il valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

### **INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE**

Gli esperimenti di immunostochimica sono stati effettuati utilizzando gli anticorpi primari rabbit anti-human PACAP38, rabbit anti-human PACAP27, rabbit anti-human VIP (Phoenix Pharmaceuticals; diluiti 1:500), rabbit anti-human PAC<sub>1</sub>-R (Santa Cruz Biotechnology; diluito 1:50), rabbit anti-human VPAC<sub>1</sub>-R, rabbit anti-human VPAC<sub>2</sub>-R (Santa Cruz Biotechnology; diluiti 1:300) e rabbit anti-human Aromatasi P450 (CYP19) (Santa Cruz Biotechnology; diluito 1:100).

Le indagini sono state effettuate su sezioni di 7  $\mu$ m di testicoli di *Podarcis sicula* fissati in Bouin e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state sparaffinate e idratate con una serie discendente di alcoli. Lo smascheramento antigenico è stato condotto mediante incubazione in tampone sodio citrato 10 mM pH 6.0 in microonde; le perossidasi endogene sono state inattivate mediante incubazione con perossido di idrogeno allo 0.5% in metanolo per 40 minuti a temperatura ambiente. Per bloccare i siti aspecifici, è stata effettuata un'incubazione di un'ora in Normal Goat Serum (Pierce). Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari diluiti in Normal Goat Serum over-night a 4°C. Segue l'incubazione per un'ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario goat anti-rabbit biotinitato; si è poi effettuata un'incubazione con complesso ABC (Avidina-Biotina Perossidasi Complex) per un'ora a temperatura ambiente. La rivelazione è stata effettuata con una soluzione contenente diaminobenzidina come cromogeno, che viene attivata immediatamente prima dell'uso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,03%. I controlli negativi sono stati effettuati attraverso l'omissione degli anticorpi primari e attraverso esperimenti di preassorbimento con i rispettivi antigeni. Le sezioni sono state contrastate con l'emallume di Mayer e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRC5 (Carl Zeiss) e acquisite con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## II fase: COLTURE D'ORGANO SUL TESTICOLO

### DI *Podarcis sicula*

#### *Allestimento delle colture*

Tutte le soluzioni utilizzate sono state filtrate con filtri da 0.22 µm, autoclavate e sterilizzate agli UV over night. Testicoli di *Podarcis sicula* appena prelevati sono stati posti in soluzione fisiologica sterile e fredda per rettili (NaCl 0.75%), sterile a 4° C, tagliati e trasferiti poi nel mezzo F10-HAM (Sigma), contenente L-glutammina 20 mM (Invitrogen), 7% FBS (Invitrogen), 100 U/ml penicillina (Invitrogen), 100 µg/ml streptomina (Invitrogen), 40 µg/ml gentamicina (Invitrogen) e 20 mM Hepes (Sigma). Frammenti di testicoli di dimensioni uguali del periodo di stasi invernale, periodo riproduttivo e di stasi estiva sono stati quindi incubati con una distribuzione random, due pezzi per pozzetto, in piastre da 24 pozzetti a 25°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 2 ore.

I mezzi di coltura sono stati prelevati al tempo zero e sostituiti con mezzo fresco, a cui sono stati aggiunti il PACAP o il VIP da soli o in presenza degli antagonisti dei loro recettori, secondo il seguente schema:

#### **Per il PACAP:**

- 1) solo mezzo;
- 2) PACAP alla concentrazione 10<sup>-7</sup> M (fisiologica);
- 3) PACAP concentrato 10<sup>-7</sup> M in presenza dell'antagonista del recettore VPAC<sub>1</sub> "VIP Receptor 1 Antagonist" (VIP1 Antagonist della Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) e dell'antagonista del recettore VPAC<sub>2</sub> "PG99-465" (Bachem) entrambi concentrati 10<sup>-6</sup> M;
- 4) PACAP concentrato 10<sup>-7</sup> M in presenza dell'antagonista del recettore PAC<sub>1</sub> "M65" (Bachem) e dell'antagonista del recettore VPAC<sub>2</sub> "PG99-465" (Bachem) entrambi concentrati 10<sup>-6</sup> M;
- 5) PACAP concentrato 10<sup>-7</sup> M in presenza dell'antagonista del recettore PAC<sub>1</sub> "M65" (Bachem) e dell'antagonista del recettore VPAC<sub>1</sub> "VIP Receptor 1 Antagonist" (VIP1 Antagonist della Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) entrambi concentrati 10<sup>-6</sup> M;
- 6) PACAP concentrato 10<sup>-7</sup> M in presenza di tutti e tre gli antagonisti concentrati 10<sup>-6</sup> M.

**Per il VIP:**

- 1) solo mezzo;
- 2) VIP alla concentrazione  $10^{-7}$  M (fisiologica);
- 3) VIP concentrato  $10^{-7}$  M in presenza dell'antagonista del recettore VPAC<sub>1</sub> "VIP Receptor 1 Antagonist" (VIP1 Antagonist) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) concentrato  $10^{-6}$  M;
- 4) VIP concentrato  $10^{-7}$  M in presenza dell'antagonista del recettore VPAC<sub>2</sub> "PG99-465" (Bachem) concentrato  $10^{-6}$  M;
- 5) VIP concentrato  $10^{-7}$  M in presenza di entrambi gli antagonisti concentrati  $10^{-6}$  M.

Ciascun trattamento è stato ripetuto in quadruplicato. Dopo due ore di trattamento, i pezzi sono stati fissati in Bouin per 24 ore, disidratati attraverso una serie crescente di alcoli e inclusi in paraffina. Sezioni di 7  $\mu$ m di spessore sono state colorate con emallume di Mayer ed eosina per un'analisi istologica al microscopio ottico. Parallelamente, i mezzi sono stati raccolti e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  per i successivi dosaggi ormonali.

*Dosaggi ormonali*

La determinazione dei livelli di testosterone nei mezzi è stata effettuata utilizzando un kit ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) della DIAMETRA; la sensibilità della tecnica è di 0,075 ng/ml con un range analitico di 0,2-16 ng/ml e un tempo di incubazione di 60+15 minuti con una variabilità intra-saggio inferiore a 5.8% e inter-saggio inferiore a 10.5%.

La determinazione dei livelli di  $17\beta$ -estradiolo nei mezzi è stata effettuata utilizzando un kit ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) della DIAMETRA; la sensibilità è di 8,7 pg/ml con un range analitico di 20-200 pg/ml e un tempo di incubazione di 120+30 minuti con una variabilità intra-saggio inferiore a 9% e inter-saggio inferiore a 10%.

*Analisi statistiche*

I dati sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 5. Tutti i dati sono espressi come la media  $\pm$  deviazione standard. Per verificare se i trattamenti condotti hanno un effetto statisticamente significativo sui livelli di testosterone e  $17\beta$ -estradiolo, le

differenze tra i trattamenti sono state confrontate effettuando il test ANOVA con correzione di Bonferroni e il valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

# **CAPITOLO VII**

## **RISULTATI**

### **I fase: PACAP/VIP/RECETTORI nel testicolo di *Podarcis sicula***

#### *Estrazione di RNA*

L'RNA estratto da testicolo nelle differenti fasi del ciclo riproduttivo di maschi maturi di *Podarcis sicula* è stato corso su gel di agarosio all'1% per verificarne la qualità (Fig. 13). La lettura allo spettrofotometro ha confermato la bontà degli estratti: la ratio 260/280 è infatti maggiore di 1.7.

- **PACAP**

#### *RT-PCR*

Esperimenti di PCR hanno evidenziato che il trascritto del gene del PACAP è espresso nel testicolo di *Podarcis sicula*. La corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% della PCR condotta su cDNA di testicolo ha permesso di evidenziare un prodotto di circa 150 coppie di basi (Fig. 14A); il controllo non presenta alcuna banda (Fig. 14A). Il prodotto della PCR è stato quindi eluito e il prodotto dell'eluizione è stato corso su un gel di agarosio al 2% (Fig. 14B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare un'unica banda della lunghezza attesa, che, sequenziata, corrisponde al PACAP di *Podarcis sicula* (gi|89593597) (Fig. 15).

#### *Real Time PCR*

Le analisi di Real time-PCR hanno rivelato che l'mRNA del *PACAP* mostra un andamento ciclico nel corso del ciclo riproduttivo. I livelli più elevati di messaggero sono presenti nel periodo riproduttivo (Fig. 16), mentre la concentrazione più bassa è presente durante i periodi di stasi estiva e invernale (Fig. 16). Durante la prima e piena ripresa autunnale, così come durante la ripresa primaverile, la Real time PCR mostra una maggiore espressione dell'mRNA del *PACAP* rispetto ai due periodi di stasi (Fig. 16). Le differenze tra i campioni sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

### *Produzione della sonda a cDNA*

La reazione di PCR condotta sul prodotto di eluizione utilizzando dNTP marcati con digossigenina ha evidenziato una banda leggermente più alta di quella ottenuta conducendo parallelamente la PCR con dNTP non marcati (Fig. 17).

### *Ibridazione in situ per la localizzazione del mRNA del PACAP nel testicolo di Podarcis sicula*

Le indagini di ibridazione *in situ* condotte con una sonda omologa a cDNA per il *PACAP* dimostrano che il messaggero è presente nel testicolo di *Podarcis sicula* sia a livello delle cellule germinali sia a livello delle cellule somatiche in tutte le fasi del ciclo riproduttivo.

Nella stasi estiva, l'mRNA è presente soprattutto a livello delle cellule di Sertoli (Fig. 18A); sono debolmente marcati anche gli spermatogoni, le uniche cellule germinali rappresentate in questo periodo (Fig. 18A); diversamente, nessun segnale è evidente nelle cellule di Leydig (Fig. 18A). Nella prima ripresa autunnale, il messaggero è localizzato anche nelle cellule di Leydig (Fig. 18 B), mentre è assente negli spermatociti I (Fig. 18B). Nella piena ripresa autunnale, invece, tutte le cellule germinali mostrano una positività all'mRNA del *PACAP*, in particolare il segnale è molto intenso negli spermatogoni, spermatociti II, spermatidi e spermatozoi, mentre è più debole negli spermatociti I (Fig. 18C); sono marcate anche le cellule di Sertoli e le cellule di Leydig (Fig. 18C, inserto). Nella stasi invernale, il messaggero presenta una localizzazione sovrapponibile a quella registrata nella piena ripresa autunnale (Fig. 18D, inserto), anche se gli spermatidi e gli spermatozoi risultano meno marcati (Fig. 18D). Infine, durante la ripresa primaverile è presente la stessa positività registrata nei periodi di stasi invernale e di piena ripresa autunnale, anche se il messaggero è espresso soprattutto negli spermatidi (Fig. 18E, E', E''). L'mRNA del *PACAP* non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo di controllo (Fig. 18E, inserto).

### *Immunoistochimica per la localizzazione del PACAP27 e 38 nel testicolo di Podarcis sicula*

Le indagini di immunoistochimica eseguite con anticorpi eterologhi, dimostrano che le due isoforme del PACAP27 e 38 sono ampiamente ed equamente distribuite nel testicolo di *Podarcis* nelle differenti fasi del ciclo riproduttivo, sia a livello delle cellule germinali sia a livello delle cellule somatiche.

In particolare, durante la stasi estiva, il PACAP è presente soprattutto a livello delle cellule di Sertoli (Fig. 19A); sono debolmente marcati anche gli spermatogoni e le cellule di Leydig (Fig. 19A). Anche durante la prima ripresa autunnale, un segnale immunoreattivo è evidente in tutte le cellule germinali, rappresentate in questo periodo dagli spermatogoni e spermatociti I, e nelle cellule di Sertoli e di Leydig (Fig. 19B). Come nel periodo precedente, anche durante la piena ripresa autunnale, la proteina è presente in tutte le cellule germinali presenti in questa fase (spermatogoni, spermatociti I e II, spermatidi e spermatozoi) (Fig. 19C), così come nelle cellule somatiche (Sertoli e Leydig) (Fig. 19C). Infine, durante la stasi invernale (Fig. 19D) e la ripresa primaverile (Figg. 19E, E', E''), il PACAP mostra una localizzazione sovrapponibile a quella registrata nella piena ripresa autunnale. I controlli negativi non sono marcati (Fig. 19E, inserto).

- **VIP**

*RT-PCR*

Esperimenti di PCR effettuati con dei primer specifici costruiti sulle regioni codificanti del PHI/VIP di *Anolis carolinensis*, hanno evidenziato che il trascritto del gene del PHI/VIP è espresso nel testicolo di *Podarcis sicula*. La corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% delle PCR (Fig. 20) ha permesso di evidenziare un prodotto lungo poco meno di 400 coppie di basi (Fig. 20); il controllo non presenta alcuna banda (Fig. 20). Il prodotto delle PCR è stato quindi eluito e il prodotto dell'eluizione è stato corso su un gel di agarosio all'1.8% (Fig. 20); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare la banda della lunghezza attesa, che è stata quindi sequenziata. Dal sequenziamento emerge che il prodotto della PCR corrisponde a una parte della sequenza codificante il propeptide e in particolare alla sequenza codificante il PHI, il VIP e la parte del propeptide tra il PHI e il VIP. In figura 21 è riportata la sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica dedotta del PHI/VIP di *Podarcis sicula* (gi|380450150). La sequenza nucleotidica è lunga circa 350 bp con un open reading frame di 312 bp e una sequenza aminoacidica dedotta di 104 aminoacidi. La proteina matura dedotta consta di 104 aminoacidi, che includono parte del propeptide, l'intera sequenza del PHI (27 aminoacidi) e del VIP (28 aminoacidi).

### *Real time PCR :*

Le analisi di Real time-PCR hanno rivelato che l'mRNA del *VIP* mostra un andamento ciclico nel corso del ciclo riproduttivo (Fig. 22). Infatti, a partire dai bassi livelli della stasi estiva, si ha un progressivo aumento, con un primo picco nella piena ripresa autunnale; poi, i livelli diminuiscono drammaticamente, raggiungendo il punto più basso del ciclo durante la stasi invernale; infine aumentano nuovamente durante la ripresa primaverile per raggiungere poi un successivo picco nel corso del periodo riproduttivo. Le differenze tra i periodi sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

### *Produzione della sonda a cDNA*

La reazione di PCR condotta sul prodotto di eluizione utilizzando dNTP marcati con digossigenina ha evidenziato una banda leggermente più alta di quella ottenuta conducendo parallelamente la PCR con dNTP non marcati (Fig. 23).

### *Ibridazione in situ per la localizzazione del mRNA del VIP nel testicolo di Podarcis sicula*

Le indagini di ibridazione *in situ* condotte con una sonda omologa a cDNA per il *VIP* dimostrano che il messaggero è ampiamente distribuito nel testicolo di *Podarcis sicula* sia nelle cellule germinali sia nelle cellule somatiche in tutte le fasi del ciclo riproduttivo.

Durante il periodo riproduttivo, il messaggero del *PHI/VIP* è espresso a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche in modo stadio-dipendente. Nelle cellule germinali, è espresso soprattutto negli spermatociti II e negli spermatidi; sono debolmente marcati anche gli spermatogoni e gli spermatociti I, mentre non sono marcati gli spermatozoi (Fig. 24A). Un segnale di ibridazione positivo è presente anche nelle cellule di Sertoli e nelle cellule di Leydig (Fig. 24A). Durante la stasi estiva, il messaggero è localizzato prevalentemente nelle cellule di Sertoli (Fig. 24B, B'); sono debolmente marcati anche gli spermatogoni, mentre le cellule di Leydig non mostrano alcun segnale (Fig. 24B, B').

Durante la prima ripresa autunnale, la positività è presente solo a livello degli spermatogoni, infatti nessun segnale è evidente a livello degli spermatociti I (Fig. 24C, C'); sono marcate invece le cellule somatiche (Sertoli e Leydig) (Fig. 24C, C').

Durante la piena ripresa autunnale, il segnale è presente sia nelle germinali sia nelle cellule somatiche (Sertoli e Leydig): in particolare, nelle cellule germinali è localizzato

in tutti gli stadi e soprattutto negli spermatociti II e negli spermatidi (Figg. 24D, D', D'').

Nella stasi invernale, l'mRNA mostra la stessa distribuzione del precedente periodo, anche se la marcatura appare meno intensa soprattutto a livello degli spermatidi (Fig. 24E). Infine, durante la ripresa primaverile è evidente la stessa positività registrata durante la piena ripresa autunnale (Figg. 24F, F'). Il messaggero non è stato rilevato nelle sezioni di controllo (Fig. 24A, inserto).

#### *Immunoistochimica per la localizzazione del VIP nel testicolo di Podarcis sicula*

Esperimenti di immunolocalizzazione condotti con un anticorpo eterologo per il VIP dimostrano che tale proteina è ampiamente distribuita nel testicolo di *Podarcis sicula* a livello delle cellule germinali e somatiche durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo.

In particolare, nel periodo riproduttivo il VIP è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi, anche se risultano maggiormente marcati gli ultimi stadi (spermatociti II, spermatidi rotondi e allungati e spermatozoi) rispetto ai primi (spermatogoni e spermatociti I) (Fig. 25A); sono marcate anche le cellule di Leydig e quelle di Sertoli (Fig. 25A'). Nella stasi estiva la proteina presenta una localizzazione sovrapponibile a quella del messaggero, dal momento che è presente prevalentemente nelle cellule di Sertoli, mentre gli spermatogoni presentano una debole marcatura (Fig. 25B'); le cellule di Leydig non mostrano alcun segnale (Fig. 25B').

Nella prima ripresa autunnale, sono marcati, sebbene debolmente, anche gli spermatociti primari (Figg. 25C, C'). Nella piena ripresa autunnale, la proteina è ampiamente distribuita nelle cellule germinali in tutti gli stadi di differenziamento, in particolare negli spermatociti II e spermatidi (Figg. 25D, D', D''); sono marcate anche le cellule di Sertoli e di Leydig (Fig. 25D'').

Durante la stasi invernale il VIP mostra la stessa localizzazione del periodo precedente, anche se la colorazione appare meno intensa in particolare negli spermatidi (Fig. 25E). Infine durante la ripresa primaverile, ritroviamo la stessa immunopositività registrata durante la piena ripresa autunnale (Figg. 25F, F', F''). I controlli negativi non sono marcati (Fig. 25F, inserto).

- **I recettori del PACAP e del VIP**

*Immunoistochimica per la localizzazione del recettore PAC<sub>1</sub> nel testicolo di Podarcis sicula*

Esperimenti di immunolocalizzazione condotti con un anticorpo eterologo per il PAC<sub>1</sub>R dimostrano che tale proteina è ampiamente distribuita nel testicolo di *Podarcis sicula* a livello delle cellule germinali e somatiche, durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo.

Durante la stasi estiva, una positività al recettore è evidente principalmente all'interno delle cellule di Sertoli e leggermente negli spermatogoni (Fig. 26A); non sono marcate le cellule di Leydig (Fig. 26A). Diversamente, durante la prima ripresa autunnale, il segnale è presente solo all'interno delle cellule di Leydig (Fig. 26B, inserto); non è evidente alcuna positività a livello delle cellule germinali e delle cellule di Sertoli (Fig. 26B, inserto). Nella piena ripresa autunnale, la proteina è localizzata in tutte le cellule germinali, così come nelle cellule di Sertoli (Fig. 26C) e di Leydig (Fig. 26C). La stessa distribuzione è registrata durante la stasi invernale (Fig. 26D, inserto) e la ripresa primaverile (Fig. 26E); tuttavia in quest'ultima fase, la marcatura sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche appare più debole (Fig. 26E). I controlli negativi non sono marcati (Fig. 26F).

*Immunoistochimica per la localizzazione dei recettori VPAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> nel testicolo di Podarcis sicula*

Le analisi di immunocitochimica condotte con anticorpi eterologhi per i recettori VPAC, effettuate su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula*, mostrano una distribuzione del recettore VPAC<sub>2</sub> più ampia rispetto al recettore VPAC<sub>1</sub>, che invece è localizzato prevalentemente all'interno delle cellule di Leydig. L'unica fase in cui i due recettori mostrano la stessa localizzazione è il periodo di prima ripresa autunnale, dal momento che la positività per entrambi i recettori è registrata solo nelle cellule di Leydig, mentre non è evidente nelle cellule germinali e di Sertoli (Figg. 27C, 28C). Diversamente, durante il periodo riproduttivo, i due recettori mostrano una differente localizzazione; il recettore VPAC<sub>2</sub> mostra una localizzazione più simile al PAC<sub>1</sub>R piuttosto che al recettore VPAC<sub>1</sub>, dal momento che è localizzato in tutte le cellule germinali, in particolare negli ultimi stadi (spermatociti II, spermatidi rotondi e allungati e spermatozoi) rispetto ai primi stadi (spermatogoni e spermatociti I) (Fig. 28A); sono marcate anche le cellule di Leydig e quelle di Sertoli (Fig. 28A); il recettore VPAC<sub>1</sub> è

presente solo nelle cellule di Leydig (Figg. 27A, A'). Durante la stasi estiva, il recettore VPAC<sub>2</sub> è presente sia nelle cellule germinali sia nelle cellule di Sertoli e di Leydig (Fig. 28B); il recettore VPAC<sub>1</sub> è limitato alle sole cellule di Leydig (Fig. 27B). Durante la piena ripresa autunnale, la stasi invernale e la ripresa primaverile i recettori VPAC presentano una localizzazione sovrapponibile a quella registrata nel periodo riproduttivo (Figg. 27D, E, F; Figg. 28D, E, F, F', F''); tuttavia il recettore VPAC<sub>1</sub> in questi periodi è localizzato anche a livello degli spermatidi (Figg. 27D, E, F). I controlli negativi non sono marcati (Figg. 27G, 28G).

*Immunostochimica per la localizzazione dell'aromatasi P450 nel testicolo di Podarcis sicula*

Esperimenti di immunolocalizzazione condotti con un anticorpo eterologo per l'aromatasi P450 dimostrano che tale enzima è presente nel testicolo di *Podarcis sicula* sia a livello delle cellule germinali sia in quelle somatiche, durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo.

In particolare, durante il periodo riproduttivo, sono principalmente marcate le cellule di Leydig e gli ultimi stadi della spermatogenesi, spermatidi e spermatozoi (Figg. 29A, inserto, A'); una debole positività all'enzima è presente anche a livello delle cellule di Sertoli così come a livello degli spermatogoni (Figg. 29 A, A inserto, A'); non sono marcati gli spermatociti I e II (Figg. 29A, A').

Durante la stasi estiva, l'immunopositività è evidente principalmente all'interno delle cellule di Sertoli; sono debolmente marcati anche gli spermatogoni e le cellule di Leydig (Fig. 29B). Diversamente, durante la prima ripresa autunnale, il segnale è presente solo all'interno delle cellule di Leydig (Fig. 29C); non è evidente alcuna positività a livello delle cellule germinali e delle cellule di Sertoli (Fig. 29C). Nella piena ripresa autunnale, l'enzima è localizzato a livello degli spermatociti I, spermatidi e spermatozoi (Figg. 29D, D'); non sono marcati gli spermatogoni e gli spermatociti II (Figg. 29D, D'). Sono marcate anche le cellule di Sertoli (Fig. 29D) e di Leydig (Fig. 29D). Durante la stasi invernale l'immunopositività è principalmente presente nelle cellule di Leydig (Figg. 29E, E') e negli ultimi stadi delle spermatogenesi, spermatidi e spermatozoi (Figg. 29E, E''); sono debolmente marcate anche le cellule di Sertoli e gli spermatociti I (Figg. 29E, E'). Non sono marcati gli spermatogoni e gli spermatociti II (Figg. 29E, E', E''). Infine durante la ripresa autunnale è evidente una distribuzione più diffusa dell'enzima infatti sono marcati principalmente le cellule di

Leydig, gli spermatidi e gli spermatozoi, e debolmente le cellule di Sertoli gli spermatogoni, gli spermatociti I e II (Figg. 29F, F', F''). I controlli negativi non sono marcati (Fig. 29F, inserto).

## **II fase: colture d'organo**

- *PACAP*

### ANALISI MORFOLOGICA

#### *Periodo di stasi invernale*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 30A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi (rari). La spermatogenesi rispecchia la fase del ciclo riproduttivo. Le cellule di Sertoli mostrano contorni ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

I testicoli sottoposti al trattamento con il PACAP a concentrazione fisiologica (Fig. 30B), con il PACAP in presenza di due dei tre antagonisti (VIP1 Antagonist e PG99-465 (Fig. 30C) o M65 e PG99-465 (Fig. 30D) o M65 e VIP1 Antagonist (Fig. 30E)), e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti non presentano cambiamenti nella spermatogenesi rispetto ai testicoli controllo (Fig. 30F).

#### *Periodo riproduttivo*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 31A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi. La spermatogenesi rispecchia la fase del ciclo riproduttivo. Le cellule di Sertoli mostrano contorni ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

Nei testicoli sottoposti al trattamento con il PACAP a concentrazione fisiologica (Fig. 31B) e con il PACAP in presenza di due dei tre antagonisti (M65 e VIP1 Antagonist (Fig. 31E) o M65 e PG99-465 (Fig. 31D) o VIP1 Antagonist e PG99-465 (Fig. 31C)) e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti (Fig. 31F), non sono evidenti cambiamenti nella spermatogenesi rispetto ai testicoli controllo.

### *Periodo di stasi estiva*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 32A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi (rari). Le cellule di Sertoli mostrano contorni cellulari ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

Nei testicoli sottoposti al trattamento con il PACAP a concentrazione fisiologica (Fig. 32B), con il PACAP in presenza di due dei tre antagonisti (M65 e VIP1 Antagonist (Fig. 32E) o M65 e PG99-465 (Fig. 32D) o VIP1 Antagonist e PG99-465 (Fig. 32C)) e in presenza di tutti e tre gli antagonisti (Fig. 32F), non sono evidenti cambiamenti nella spermatogenesi rispetto ai testicoli controllo. La spermatogenesi nei testicoli controllo e in quelli trattati non rispecchia la fase del ciclo.

## DOSAGGI ORMONALI

### *Periodo di stasi invernale*

I trattamenti effettuati nel periodo di stasi invernale, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, hanno determinato nella maggior parte dei casi variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone. In particolare, come evidente dal grafico riportato in figura 33A, i trattamenti con il solo PACAP o con il PACAP e la combinazione di due dei tre antagonisti (VIP1 Antagonist e PG99-465 o M65 e PG99-465 o M65 e VIP1 Antagonist), inducono aumenti dei livelli di testosterone statisticamente significativi rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il PACAP in presenza dei tre antagonisti; l'aumento del testosterone è confrontabile nel trattamento con il solo PACAP e nei trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 e in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist; le differenze infatti non risultano statisticamente significative.

Per quanto riguarda il  $17\beta$ -estradiolo, come evidente dal grafico riportato in figura 33B, i trattamenti con il solo PACAP e con il PACAP in presenza di due dei tre antagonisti (VIP1 Antagonist e PG99-465 o M65 e PG99-465 o M65 e VIP1 Antagonist) inducono aumenti dei livelli di estradiolo statisticamente significativi rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti (M65, VIP1 Antagonist e PG99-465); l'aumento indotto è simile tra loro; le differenze difatti non risultano statisticamente significative.

### *Periodo riproduttivo*

I trattamenti effettuati nel periodo riproduttivo, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, non hanno determinato variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone, come evidente dal grafico riportato in figura 34A.

Per quanto riguarda il  $17\beta$ -estradiolo, i trattamenti effettuati durante questo periodo, hanno determinato per lo più variazioni nei livelli di tale ormone; in particolare dal grafico figura 34B si evince che il trattamento con il PACAP da solo induce un aumento di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e a tutti gli altri trattamenti; i trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465 e con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 inducono un aumento di estrogeni statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti; infine questi ultimi due trattamenti non determinano cambiamenti statisticamente significativi nei livelli di estradiolo rispetto al controllo.

### *Periodo di stasi estiva*

I trattamenti effettuati nel periodo di stasi estiva, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, hanno determinato nella maggior parte dei casi variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone. In particolare, come evidente dal grafico riportato in figura 35A, il trattamento con il solo PACAP determina un aumento di testosterone statisticamente significativo rispetto al tempo zero, al controllo e a tutti gli altri trattamenti. Diversamente i trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP 1 Antagonist e PG99-465, con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti non determinano cambiamenti statisticamente significativi nei livelli di testosterone rispetto al tempo zero e al controllo. Infine il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 induce un aumento di testosterone statisticamente significativo rispetto al tempo zero, al controllo, ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465 e con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e al trattamento con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti.

Per quanto riguarda il  $17\beta$ -estradiolo, dal grafico in figura 35B si evince che il trattamento con il PACAP da solo induce un aumento di tale ormone statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e a tutti gli altri trattamenti; mentre il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 induce un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti.

Diversamente questi ultimi due trattamenti non inducono variazioni di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significative rispetto al tempo zero e al controllo. Infine il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, invece, induce un aumento di estradiolo statisticamente significativo rispetto al mezzo, al tempo zero e ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti.

- *VIP*

#### ANALISI MORFOLOGICA

##### *Periodo di stasi invernale*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 36A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi (rari). La spermatogenesi rispecchia la fase del ciclo riproduttivo. Le cellule di Sertoli mostrano contorni ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

I testicoli sottoposti al trattamento con il VIP a concentrazione fisiologica (Fig. 36B) e con il VIP e il VIP1 Antagonist (Fig. 36C), il VIP e il PG99-465 (Fig. 36D) e il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti (Fig. 36E) sono confrontabili strutturalmente con quelli del controllo, difatti non sono evidenti cambiamenti significativi nella spermatogenesi.

##### *Periodo riproduttivo*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 37A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi. La spermatogenesi rispecchia la fase del ciclo

riproduttivo. Le cellule di Sertoli mostrano contorni ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

I testicoli sottoposti al trattamento con il VIP a concentrazione fisiologica (Fig. 37B), con il VIP e il VIP1 Antagonist (Fig. 37C), con il VIP e l'antagonista PG99-465 (Fig. 37D) e con il VIP ed entrambi gli antagonisti (Fig. 37E) non presentano variazioni significative nella spermatogenesi rispetto al controllo.

#### *Periodo di stasi estiva*

I testicoli trattati con il solo mezzo (Fig. 38A) mostrano una struttura tubulare ben organizzata con andamento progressivo verso il lume dei diversi stadi differenziativi, da spermatogoni a spermatozoi (rari). Le cellule di Sertoli mostrano contorni cellulari ben definiti. Le cellule di Leydig non presentano cambiamenti significativi.

Nei testicoli sottoposti al trattamento con il VIP a concentrazione fisiologica, (Fig. 38B) con il VIP e il VIP1 antagonist (Fig. 38C), con il VIP e il PG99-465 (Fig. 38D) e con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti (Fig. 38E) non sono evidenti cambiamenti nella spermatogenesi rispetto ai testicoli controllo. La spermatogenesi nei testicoli controllo e in quelli trattamenti non rispecchia la fase del ciclo.

## DOSAGGI ORMONALI

#### *Periodo di stasi invernale*

I trattamenti effettuati nel periodo di stasi invernale, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, hanno determinato per la maggior parte variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone (Fig. 39A). In particolare, i trattamenti con il VIP e il VIP1 Antagonist e con il VIP e l'antagonista PG99-465 determinano aumenti di testosterone statisticamente significativi rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti; il trattamento con il solo VIP, invece ha determinato anche aumenti di testosterone statisticamente significativi rispetto al trattamento con il VIP in presenza dell'antagonista PG99-465; il trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti non induce aumenti statisticamente significativi rispetto al mezzo e al tempo zero. Per quanto riguarda il 17 $\beta$ -estradiolo, in tutti i trattamenti si riscontra un aumento statisticamente significativo rispetto al tempo zero e rispetto al trattamento con il solo mezzo, come evidente dal grafico riportato in figura 39B; l'aumento degli estrogeni è confrontabile

in tutti i trattamenti; difatti le differenze non risultano statisticamente significative tra di loro, ma significative rispetto al controllo e al tempo zero.

#### *Periodo riproduttivo*

I trattamenti effettuati nel periodo riproduttivo, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, non hanno determinato variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone, come evidente dal grafico riportato in figura 40A.

Per quanto riguarda gli effetti sui livelli di  $17\beta$ -estradiolo, in tutti i trattamenti si riscontra un aumento statisticamente significativo rispetto al tempo zero e rispetto al trattamento con il solo mezzo, come evidente dal grafico riportato in figura 39B. Il trattamento con il solo VIP, quello con il VIP e il VIP1 Antagonist e quello con il VIP e l'antagonista PG99-465 inducono un aumento di  $17\beta$ -estradiolo confrontabile; le differenze difatti non risultano statisticamente significative. Diversamente, questi trattamenti inducono un aumento di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significativo rispetto a quello indotto dal trattamento con il VIP ed entrambi gli antagonisti (Fig. 40B).

#### *Periodo di stasi estiva*

Nei trattamenti effettuati nel periodo di stasi estiva, solo quello effettuato con il VIP ha determinato un aumento di testosterone statisticamente significativo rispetto al mezzo, al tempo zero e tutti gli altri trattamenti, infatti quest'ultimi non hanno indotto cambiamenti statisticamente significativi rispetto al tempo zero e al controllo (Fig. 41A).

Per quanto riguarda gli effetti sui livelli di  $17\beta$ -estradiolo, il trattamento con il solo VIP e i trattamenti con il VIP e il VIP1 Antagonist e con il VIP e l'antagonista PG99-465 inducono aumenti di estradiolo confrontabili e statisticamente significativi rispetto al tempo zero, al trattamento con il solo mezzo e con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti (Fig. 41B).

## **DISCUSSIONI**

Le indagini più recenti condotte nei mammiferi (Li e Arimura, 2003; Nakamura et al., 2013; Tanii et al 2011) e nei vertebrati non mammiferi (Gobbetti e Zerani, 2002; Huang et al., 2009; Agnese et al., 2010, 2012) dimostrano sempre più che il PACAP e il VIP rivestono un ruolo di primo piano nella regolazione della spermatogenesi soprattutto a livello locale. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi oltre a confermare alcuni aspetti già precedentemente evidenziati (Agnese et al, 2010, Agnese et al, 2012) hanno permesso di delineare un quadro più esaustivo non solo sulla presenza del PACAP, del VIP e dei loro recettori ma anche sulle modalità di azione dei due neuropeptidi durante le differenti fasi del ciclo riproduttivo del rettile squamato *Podarcis sicula*. Le indagini sono state condotte utilizzando differenti tecniche sperimentali, quali RT-PCR, Real time PCR, ibridazione *in situ*, immunostochimica, saggi E.L.I.S.A, nonché colture di organi. Le analisi di RT-PCR, su RNA estratto da testicolo, hanno evidenziato che i messaggeri del PACAP e del VIP sono sintetizzati a livello testicolare, risultato che ci indirizza verso la possibilità di una sintesi endogena per entrambe le molecole. Per il VIP, questo dato fornisce un'informazione nuova e diversa rispetto a quella nota in letteratura nei mammiferi; in questi ultimi infatti, il VIP ritrovato nei testicoli è risultato di origine esogena (Zhu et al., 1995; Alm et al., 1977, 1980; Properzi et al., 1992). Le analisi di RT-PCR sono state supportate da indagini biomolecolari (Real time PCR e ibridazione *in situ*) per il PACAP e il VIP e da indagini di immunostochimica per il sistema PACAP/VIP/recettori. In particolare gli esperimenti di Real time PCR hanno rilevato un andamento ciclico nei livelli di mRNA del *PACAP* e del *VIP* nel corso delle diverse fasi del ciclo riproduttivo. E' interessante notare che, per entrambi i neuropeptidi, le concentrazioni più basse di mRNA sono state registrate nei periodi di stasi estiva e invernale quando la spermatogenesi è praticamente bloccata; le concentrazioni più elevate sono, invece, evidenti nel periodo di piena ripresa autunnale e soprattutto nel periodo riproduttivo quando si registra la massima attività testicolare; le concentrazioni intermedie, invece, sono state riscontrate nelle fasi di ripresa quando si ha una riattivazione della spermatogenesi.

Questi dati mettono quindi in evidenza che le variazioni nei livelli di mRNA di *PACAP* e *VIP* in *Podarcis* sono strettamente correlate a cambiamenti di attività a livello del testicolo. Le indagini di ibridazione *in situ* e di immunocitochimica hanno messo in evidenza poi che gli mRNA del *PACAP* e del *VIP*, i neuropeptidi ed i loro recettori, diversamente dai mammiferi, sono ampiamente distribuiti nel testicolo di *Podarcis* nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo avvalorando ancor di più l'ipotesi che il sistema *PACAP/VIP/recettori* sia coinvolto nel controllo delle attività testicolari di questo animale. In particolare, nel periodo riproduttivo, l'mRNA del *VIP*, il *VIP* e il recettore *VPAC<sub>2</sub>* mostrano una distribuzione simile all'mRNA del *PACAP*, al *PACAP* e al *PAC<sub>1</sub>R* descritta da Agnese et al nel 2010, ovvero una localizzazione diffusa in tutte le cellule germinali, in particolare negli ultimi stadi e nelle cellule somatiche. Questo suggerisce quindi che nel periodo riproduttivo in *Podarcis sicula* il *VIP*, così come descritto per il *PACAP*, potrebbe controllare la spermatogenesi, in particolare la spermioigenesi e la steroidogenesi probabilmente attraverso l'interazione con il recettore *VPAC<sub>2</sub>*. Come nei mammiferi (Shivers et al., 1991), anche in *Podarcis sicula* in questo periodo il recettore *VPAC<sub>1</sub>* risulta scarsamente rappresentato; esso è infatti presente solo nelle cellule di Leydig, per cui è plausibile ipotizzare che tale recettore sia coinvolto solo nella regolazione della steroidogenesi. Questi dati sono supportati anche dal fatto che esperimenti di Real time PCR hanno fatto registrare, in questo periodo, i livelli più elevati di messaggero per entrambi i neuropeptidi, suggerendo quindi che queste molecole siano sintetizzate in grandi quantità in questa fase del ciclo al fine di regolare differenti attività testicolari.

Nel periodo di stasi estiva, invece, quando la spermatogenesi è bloccata, la presenza di bassi livelli di mRNA di *PACAP* e *VIP* registrati mediante Real time PCR potrebbe non essere dovuta ad una riduzione della trascrizione dei geni, ma alla regressione dei testicoli con una riduzione del numero di cellule germinali, rappresentate in questa fase da soli spermatogoni. Quest'ipotesi viene confermata dal fatto che l'ibridazione *in situ* per entrambi i neuropeptidi mostra un segnale intenso soprattutto a livello delle cellule di Sertoli.

L'assenza dell'mRNA del *VIP* e della proteina a livello delle cellule di Leydig, suggerisce che questo neuropeptide non partecipa al controllo della steroidogenesi di queste cellule con un meccanismo autocrino, bensì paracrino, agendo sui recettori *VPAC*; diversamente il *PACAP* sembrerebbe controllare l'attività steroidogenica delle

cellule di Leydig con entrambi i meccanismi, mediante l'interazione con i recettori VPAC, dal momento che il recettore PAC<sub>1</sub> è assente su queste cellule. Diversamente l'attività steroidogenica delle cellule di Sertoli potrebbe essere controllata da entrambi i neuropeptidi, attraverso meccanismi sia autocrini sia paracrini, mediante l'interazione del PACAP con il PAC<sub>1</sub>R e il VPAC<sub>2</sub>R e del VIP con il VPAC<sub>2</sub>R.

Nel periodo di prima ripresa autunnale, gli mRNA del *PACAP* e del *VIP* sono localizzati oltre che a livello delle cellule somatiche e degli spermatogoni, anche a livello degli spermatociti I. Questi dati sono in accordo con gli aumenti della concentrazione dei messaggeri registrati mediante Real time PCR. I neuropeptidi mostrano la stessa localizzazione degli mRNA. Diversamente i recettori sono localizzati esclusivamente a livello delle cellule di Leydig. Sulla base di questi risultati, è possibile ipotizzare che in questa fase del ciclo riproduttivo il PACAP e il VIP siano coinvolti nel controllo della steroidogenesi, attraverso l'interazione del PACAP con il recettore PAC<sub>1</sub> e i recettori VPAC, del VIP con i recettori VPAC. Inoltre, data la presenza dei messaggeri del PACAP e del VIP, dei peptidi e la parallela assenza dei loro recettori a livello delle cellule germinali, è possibile ipotizzare che questi neuropeptidi in questa fase del ciclo non agiscano direttamente sul controllo delle attività delle cellule germinali, ma che possano invece controllare l'attività steroidogenica delle cellule di Leydig attraverso una via sia paracrina sia autocrina. La ripresa della steroidogenesi, con la conseguente produzione di testosterone, determinerebbe poi la ripresa iniziale della spermatogenesi. Un'ulteriore ipotesi suggerirebbe che a Settembre le cellule germinali comincino a sintetizzare i neuropeptidi che saranno poi utilizzati nella fase successiva.

Nei periodi di piena ripresa autunnale, stasi invernale e ripresa primaverile il sistema PACAP/VIP/recettori mostra una localizzazione simile a quella del periodo riproduttivo anche se in alcune fasi sono evidenti marcature di intensità diversa.

In particolare a Novembre, in piena ripresa autunnale, i segnali di ibridazione e di immunocitochimica sono sovrapponibili a quelli registrati a Maggio, in accordo anche con i dati ottenuti con la Real time PCR in cui i livelli di mRNA dei due neuropeptidi mostrano un andamento simile a quelli registrati a Maggio. Questo suggerisce che nella piena ripresa autunnale, PACAP e VIP siano coinvolti nella riattivazione delle attività testicolari, influenzando in particolare la spermiogenesi (produzione di spermatozoi non utile ai fini riproduttivi) e la steroidogenesi, probabilmente

attraverso l'interazione del PACAP con i recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> e del VIP con il solo recettore VPAC<sub>2</sub>. Inoltre a Novembre, a differenza del periodo riproduttivo il VPAC<sub>1</sub>R sembrerebbe controllare non solo la steroidogenesi, ma anche la spermiogenesi dal momento che è localizzato oltre che nelle cellule di Leydig anche negli spermatidi.

Nel periodo di stasi invernale, quando i testicoli a causa della precedente ripresa sono caratterizzati dalla presenza delle cellule germinali in tutti gli stadi di differenziamento, la debole positività registrata per il mRNA del *PACAP* e del *VIP*, in accordo con i bassi livelli di messaggeri registrati con la Real time PCR, suggerisce che la sintesi di questi neuropeptidi sia ridotta in questa fase in cui le attività testicolari sono bloccate e che le positività riscontrate tanto per i messaggeri quanto per i due neuropeptidi ed i loro recettori potrebbero essere dovute a residui di molecole prodotte durante la ripresa precedente.

Infine, nel periodo di ripresa primaverile, alla luce dell'incremento dei livelli di mRNA di *PACAP* e *VIP* e della diffusa e intensa localizzazione dei loro messaggeri, sia a livello delle cellule somatiche sia a livello delle cellule germinali, è possibile ipotizzare che ci sia una riattivazione della trascrizione dei geni di PACAP e VIP e che i neuropeptidi così prodotti potrebbero essere responsabili della ripresa dell'attività proliferativa e differenziativa delle cellule germinali e dell'attività steroidogenica delle cellule somatiche. Tali funzioni potrebbero essere mediate dai recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> e dal solo recettore VPAC<sub>2</sub>, legati rispettivamente dal PACAP e dal VIP. Anche in questo periodo il recettore VPAC<sub>1</sub> sembrerebbe controllare sia l'attività steroidogenica delle cellule di Leydig sia la spermiogenesi.

In sintesi, questi dati lasciano ipotizzare che nel testicolo di *Podarcis sicula* nella maggior parte dei periodi analizzati, il PACAP e il VIP possano regolare la spermatogenesi e l'attività steroidogenica delle cellule di Sertoli attraverso il legame del primo con i recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> e del secondo con il solo recettore VPAC<sub>2</sub>. Diversamente nella regolazione dell'attività steroidogenica delle cellule di Leydig potrebbero essere coinvolti il PACAP e il VIP principalmente attraverso l'interazione con il recettore VPAC<sub>1</sub>, come sembra suggerire la presenza di questo recettore soprattutto a livello delle cellule di Leydig; tuttavia questo recettore in *Podarcis sicula*, a differenza di quanto descritto nei mammiferi, potrebbe intervenire anche nel controllo della spermiogenesi dal momento che è localizzato anche negli spermatidi.

Inoltre è particolarmente interessante notare che PACAP e VIP potrebbero intervenire nel controllo dell'attività steroidogenica delle cellule germinali dal momento che i dati di immunolocalizzazione mostrano che nel testicolo di *Podarcis* nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo l'aromatasi P450 presenta una distribuzione simile a quella registrata per i neuropeptidi ed i loro recettori.

Le ipotesi finora avanzate sono state ulteriormente supportate dalle colture d'organo, allestite in tre periodi del ciclo: stasi invernale, periodo riproduttivo e stasi estiva. E' particolarmente interessante notare che in tutti i trattamenti eseguiti, le analisi morfologiche non hanno mostrato cambiamenti significativi nella spermatogenesi rispetto ai controlli. Per quanto riguarda i dosaggi ormonali invece, i trattamenti eseguiti hanno determinato nella maggior parte dei casi dei cambiamenti nei livelli di testosterone e di  $17\beta$ -estradiolo.

In particolare, nel periodo di stasi invernale i trattamenti in cui il PACAP è libero di agire su tutti i recettori e i trattamenti sperimentali nei quali il neuropeptide agisce mediante un singolo recettore, hanno indotto un aumento di testosterone e di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e al trattamento in cui tutti i recettori sono bloccati. Questi dati suggeriscono che in questo periodo il PACAP influenza la produzione di entrambi gli ormoni attraverso l'utilizzo di tutti e tre i recettori, dal momento che, quando due dei tre recettori sono bloccati, quello libero "sopperisce" alla mancanza degli altri. La mancanza di effetti sulla spermatogenesi potrebbe essere dovuta al fatto che in questo periodo, a livello del testicolo, è assente il recettore degli androgeni (Paolucci e Di Fiore, 1992) per cui le cellule germinali e somatiche non risentirebbero dell'aumento dei livelli di testosterone. La quota di ormone prodotta e inutilizzata potrebbe essere convertita in estradiolo attraverso l'intervento dell'aromatasi P450 la cui attività potrebbe essere incrementata dal PACAP. A questo proposito sono di particolare supporto i dati di immunocitochimica riferiti a questo periodo, dal momento che ci permettono di ipotizzare che la quota di  $17\beta$ -estradiolo, prodotta in seguito dall'attivazione del recettore VPAC<sub>1</sub>, deriva sia dalle cellule di Leydig sia dagli spermatozoi. Diversamente il  $17\beta$ -estradiolo prodotto in seguito all'attivazione dei recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub>, deriva da un'azione del PACAP sia sulle cellule somatiche (Sertoli e Leydig) sia sulle cellule germinali. Quest'ultima ipotesi viene supportata dal fatto che in questo periodo

i recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> sono presenti con l'aromatasi P450 a livello delle cellule di Leydig, Sertoli, spermatogoni, spermatociti I, spermatidi e spermatozoi.

Per quanto riguarda il VIP, dai dosaggi ormonali è emerso che, così come i trattamenti con il PACAP, anche i trattamenti con questo neuropeptide influenzano sia i livelli di testosterone sia i livelli di estradiolo. In particolare il trattamento con il VIP da solo e i trattamenti con il VIP in presenza di un antagonista, inducono un incremento di testosterone statisticamente significativo rispetto al controllo, al tempo zero e al trattamento con entrambi gli antagonisti. I livelli di 17 $\beta$ -estradiolo sono incrementati anche nel trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti. L'assenza del recettore degli androgeni (Paolucci e Di Fiore, 1992) determinerebbe anche in questo caso la mancanza di cambiamenti sulla spermatogenesi. Alla luce di questi dati, durante la stasi invernale il VIP regola la produzione di testosterone interagendo sia con il recettore VPAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub> e, quando uno dei due recettori è bloccato, l'uno sopperisce all'azione dell'altro.

La produzione di 17 $\beta$ -estradiolo vedrebbe invece, coinvolti, oltre ai recettori VPAC, anche un'altra molecola che potrebbe agire da recettore VIP specifico, secondo quando anche ipotizzato in altri sistemi (Zhou et al., 2006).

Nel periodo riproduttivo, i trattamenti effettuati sia con il PACAP sia con il VIP, in presenza e in assenza dei loro antagonisti hanno determinato effetti sovrapponibili sui livelli di testosterone. Infatti, nei trattamenti in cui i neuropeptidi sono liberi di agire su tutti i recettori e nei trattamenti in cui, questi possono agire solo su un recettore, non hanno determinato aumenti di testosterone statisticamente significativi rispetto ai trattamenti in cui tutti i recettori sono bloccati, al controllo e al tempo zero. Questi risultati potrebbero derivare dal fatto che nel periodo riproduttivo i livelli di testosterone nel testicolo, sono elevati, per cui la quota di testosterone prodotta in seguito al trattamento, potrebbe non essere rivelata, dal momento che tale ormone potrebbe seguire la via di sintesi dell'estradiolo. Quest'ipotesi viene supportata dal fatto che, in seguito ai trattamenti con entrambi i neuropeptidi, si registra un notevole incremento dei livelli di estradiolo rispetto al controllo e al tempo zero. In particolare il trattamento con il PACAP da solo induce un aumento dei livelli di 17 $\beta$ -estradiolo confrontabile con il trattamento in cui il PACAP è libero di agire sui recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>1</sub> e superiore in modo statisticamente significativo rispetto al trattamento in cui è libero solo il recettore VPAC<sub>2</sub>, a quello in cui tutti i recettori sono bloccati, al

controllo e al tempo zero. Questi dati lasciano ipotizzare che, il PACAP in questo periodo, potrebbe regolare la produzione di estradiolo incrementando l'attività dell'aromatasi P450, che utilizzerebbe il testosterone inutilizzato, attraverso l'interazione con i recettori PAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>1</sub> coinvolgendo nel primo caso le cellule germinali, di Leydig e di Sertoli, e nel secondo caso le sole cellule di Leydig. Il VIP, invece, incrementa i livelli di 17β-estradiolo anche attraverso l'interazione con il recettore VPAC<sub>2</sub>, dal momento che, quando quest'ultimo è libero di agire, si registra un aumento di estradiolo confrontabile con quello indotto dal trattamento con il solo VIP e con il trattamento in cui è libero il solo recettore VPAC<sub>1</sub>; tali trattamenti inducono un aumento ormonale statisticamente significativo rispetto al trattamento con entrambi gli antagonisti, al controllo e al tempo zero. Anche in questo caso il VIP attraverso il recettore VPAC<sub>2</sub> potrebbe incrementare l'attività dell'aromatasi P450 agendo a livello sia delle cellule somatiche sia a livello delle cellule germinali. Inoltre l'induzione di estradiolo statisticamente significativa rispetto al controllo e al tempo zero che si registra in presenza di entrambi gli antagonisti lascia ipotizzare un intervento anche in questo periodo del recettore ad azione VIP specifica.

Infine, anche nel periodo di stasi estiva i trattamenti precedentemente indicati hanno determinato nella maggior parte dei casi cambiamenti significativi nei livelli ormonali. In particolare nei trattamenti con il solo PACAP e quello in cui il PACAP è libero di agire sul recettore VPAC<sub>1</sub> sono stati indotti degli aumenti di testosterone statisticamente significativi rispetto al controllo e a tutti gli altri trattamenti. Questo dato suggerisce che il PACAP induce l'incremento di testosterone attraverso l'interazione con il recettore VPAC<sub>1</sub> localizzato in questa fase a livello delle cellule di Leydig. Inoltre l'assenza di cambiamenti dell'ormone mediata dal recettore PACAP specifico (PAC<sub>1</sub>R), viene confermata dai dati di immunocitochimica, i quali hanno mostrato l'assenza di questo recettore a livello delle Leydig. Tuttavia il recettore PAC<sub>1</sub>, insieme al recettore VPAC<sub>1</sub>, è coinvolto, invece, nella produzione di 17β-estradiolo PACAP indotta; infatti i trattamenti in cui il PACAP è libero di agire su questi recettori generano un aumento di 17β-estradiolo paragonabile tra loro e statisticamente significativo rispetto a tutti gli altri trattamenti e al controllo. Il PACAP attraverso i recettori VPAC<sub>1</sub> e PAC<sub>1</sub> potrebbe quindi incrementare l'attività dell'aromatasi P450 agendo nel primo caso solo a livello delle cellule di Leydig e nel secondo caso a livello delle cellule di Sertoli e degli spermatogoni. Per quanto riguarda

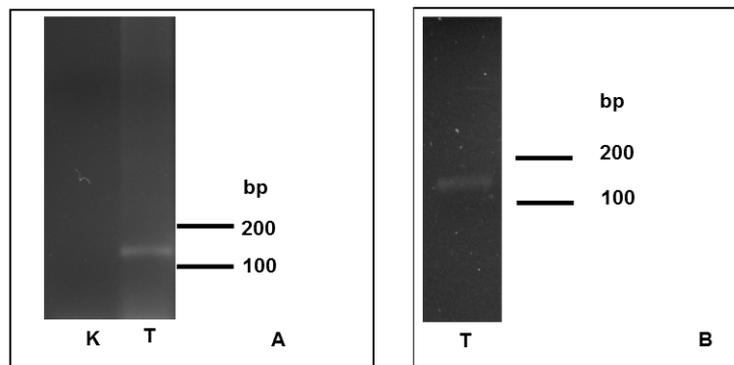
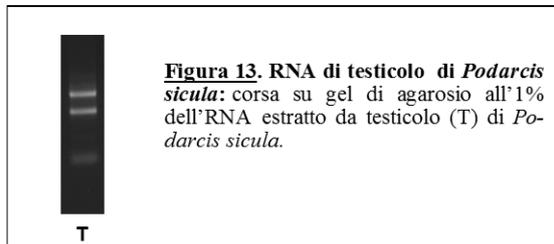
il VIP, i dosaggi ormonali mostrano che l'induzione di testosterone indotta dal VIP non coinvolge i recettori VPAC, dal momento che, l'unico trattamento ad indurre un aumento di testosterone statisticamente significativo rispetto al controllo è quello effettuato con il solo neuropeptide; tale induzione potrebbe quindi, essere mediata da un recettore ad attivazione VIP-specifica. I recettori VPAC mediano, invece, l'innalzamento dei livelli di estradiolo VIP-indotti; infatti l'aumento di  $17\beta$ -estradiolo indotto dai trattamenti in cui il neuropeptide è libero di agire o sul recettore VPAC<sub>1</sub> o sul recettore VPAC<sub>2</sub> è paragonabile all'incremento indotto dal trattamento con il solo VIP. Questi trattamenti sono statisticamente significativi rispetto al controllo, al tempo zero e al trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti. Tali dati, in accordo con le analisi di immunocitochimica, dimostrano che il recettore VPAC<sub>2</sub>, presente in questo periodo a livello delle cellule di Sertoli, Leydig e spermatogoni, non media gli effetti del PACAP sui livelli di testosterone ed estradiolo, bensì regola l'innalzamento dei livelli di  $17\beta$ -estradiolo indotti dal solo VIP. Diversamente invece, il recettore VPAC<sub>1</sub>, localizzato in questa fase a livello delle cellule di Leydig, media invece, gli effetti sia del PACAP sia del VIP sul  $17\beta$ -estradiolo e del solo PACAP sul testosterone. In ogni caso gli aumenti di estradiolo registrati potrebbero derivare da un incremento dell'attività dell'aromatasi P450 dal momento che dai dati di immunocitochimica emerge che in questo periodo quest'enzima mostra una localizzazione sovrapponibile a quella registrata per i recettori.

I dati ottenuti da questi esperimenti dimostrano dunque che gli elementi del sistema PACAP/VIP/recettori sono ampiamente rappresentati nel testicolo di *Podarcis sicula* in tutti i periodi analizzati e suggeriscono che questi neuropeptidi siano coinvolti nel controllo e della spermatogenesi, in particolare la spermiogenesi, e della steroidogenesi, intervenendo con un meccanismo di tipo autocrino, dato che le stesse cellule che sono positive per il PACAP e il VIP lo sono anche per i recettori, o paracrino, per cui le cellule presenti nel testicolo potrebbero comunicare tra di loro usando questo peptide come segnale. Inoltre un ulteriore dato che conferma l'intervento del PACAP e del VIP nella spermiogenesi è fornito dalla presenza in questa specie, diversamente dai mammiferi, del recettore VPAC<sub>1</sub> a livello degli spermatici. Infine dalle colture d'organo è emerso che l'attività steroidogenica è regolata da entrambi i neuropeptidi con il coinvolgimento di tutti e tre i recettori,

anche se il PACAP tra i recettori VPAC agisce prevalentemente sul recettore VPAC<sub>1</sub>, dal momento che le induzioni ormonali PACAP-indotte più significative derivano dall'attivazione di questo recettore, mentre il VIP agisce in egual misura su entrambi i recettori VPAC.

In conclusione, il VIP e il PACAP sono due neuropeptidi che possono essere annoverati tra quei fattori prodotti localmente a livello testicolare, che partecipano alla fine regolazione di processi quali la spermatogenesi, in particolare la spermiogenesi, e la steroidogenesi. I dati a disposizione suggeriscono fortemente che questi peptidi contribuiscono a creare un network di comunicazione intratesticolare finemente intrecciato per garantire il corretto andamento di spermatogenesi e steroidogenesi. In ogni caso la condizione del PACAP e del VIP nel testicolo di *Podarcis* appare molto più complessa di quanto descritto nei mammiferi, non fosse altro per la sintesi endogena e la loro ampia diffusione a livello delle cellule somatiche e germinali (Agnese et al., 2014; Rosati et al., 2014). La presenza del PACAP e del VIP in *Podarcis* invece è sovrapponibile con quella registrata rispettivamente in *Triturus* (Agnese et al. 2010) e in *Torpedo* (Agnese et al., 2012), il che fa ipotizzare che nel corso della storia evolutiva dei vertebrati possano essersi verificati cambiamenti significativi nel controllo della spermatogenesi da parte di queste molecole dal momento che nei mammiferi, diversamente da quanto descritto nei vertebrati non mammiferi, il PACAP è limitato a poche cellule germinali e il VIP è limitato alle sole fibre nervose. Infine il fatto che in *Podarcis sicula* l'aromatasi P450 è presente sia a livello delle cellule somatiche sia a livello delle cellule germinali, in particolare negli ultimi stadi, così come descritto nei mammiferi (Carreau et al., 2011), avvalorava ancora di più la scelta di utilizzare questo animale come modello sperimentale utile per lo studio dei meccanismi di controllo delle attività testicolari per organismi che presentano un'organizzazione tubulare del testicolo.

## TAVOLE

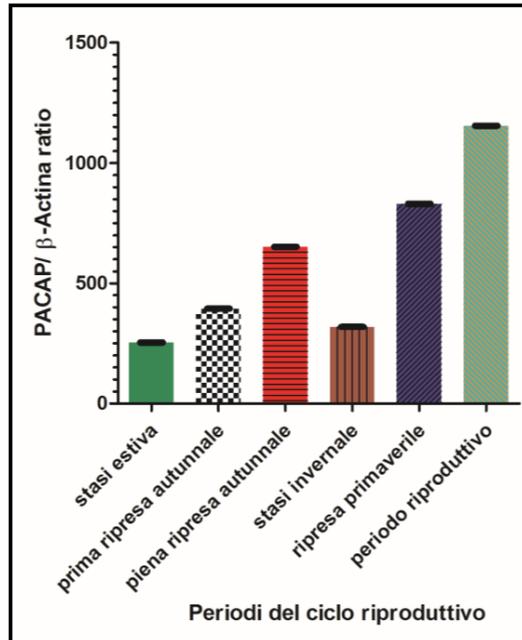


```

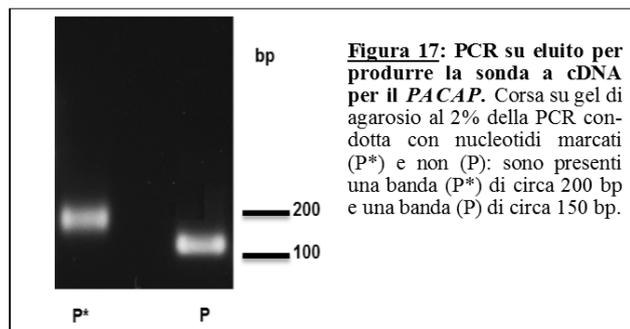
cattcggatgggatccttcacggatagctacagccgctaccgaaaacaaatggctgtcaag
H S D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V K
aaatacttggcagcagtcctggggaaaaggtataaacaagagttagaacaaaggacgc
K Y L A A V L G K R Y K Q R V R N K G R
cgagtagcctattttag
R V A Y L -

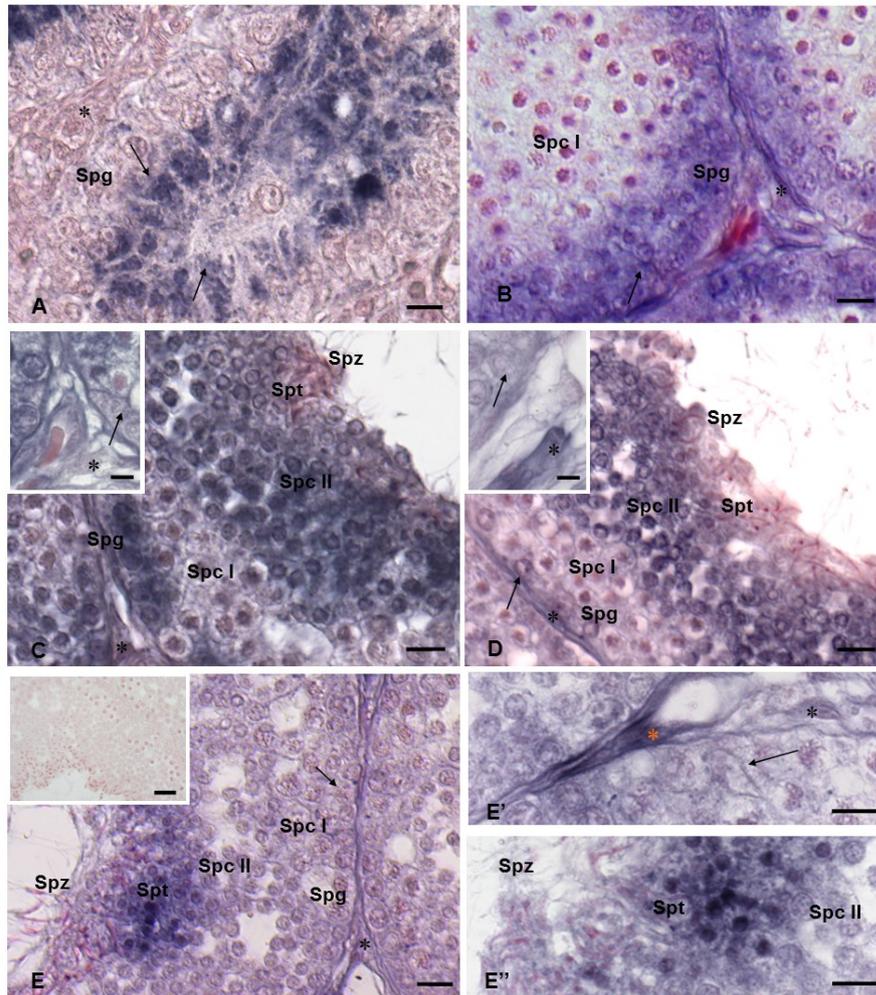
```

**Figura 15.** Sequenza del *PACAP* di *Podarcis sicula* nucleotidica e aminoacidica dedotta (gi|89393397).

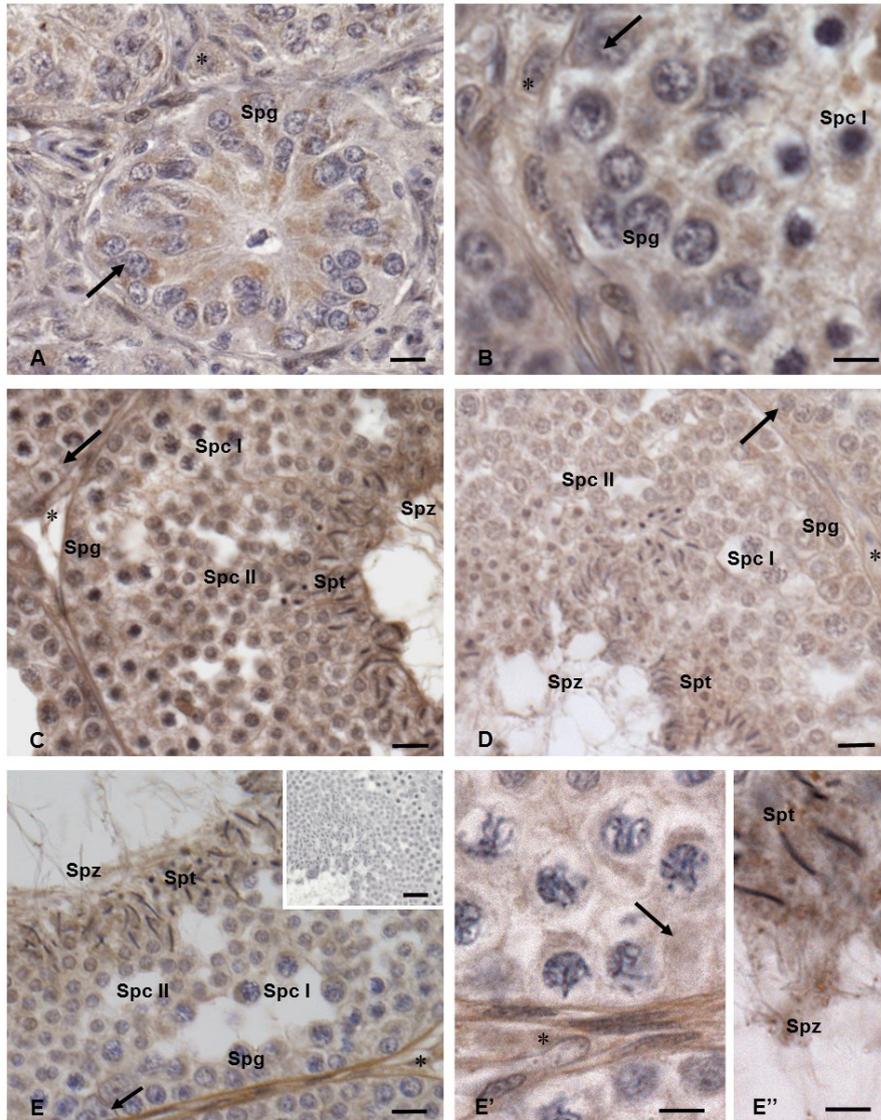


**Figura 16. Real-Time PCR per il PACAP in *Podarcis sicula*.** Nel grafico è riportato il rapporto PACAP/β-actina nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo. La concentrazione dell'mRNA del *PACAP* ha mostrato un andamento ciclico durante il ciclo riproduttivo: i più alti livelli di mRNA del *PACAP* sono evidenti nel periodo riproduttivo, mentre i livelli più bassi sono evidenti durante la stasi estiva e invernale. Un aumento progressivo dei livelli di mRNA è registrato nella prima e piena ripresa autunnale, così come nella ripresa primaverile. Le differenze tra i periodi sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

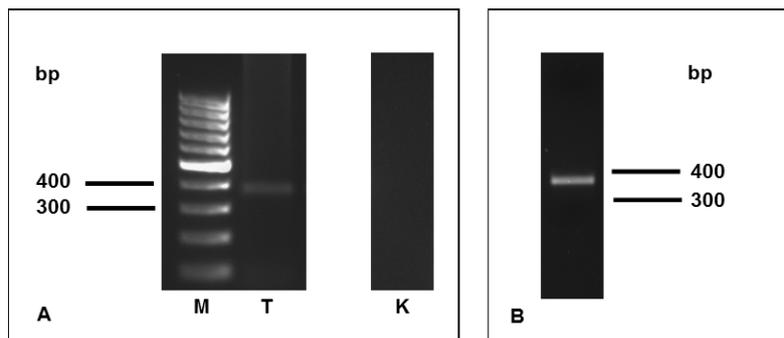




**Figura 18.** Ibridazione *in situ* per il PACAP nel testicolo di *Podarcis sicula* nelle varie fasi del ciclo riproduttivo. Sezioni di testicolo sono state incubate con sonda a cDNA per il PACAP marcata con digossigenina. Il segnale di ibridazione appare come aree colorate di blu. A: stasi estiva. Il segnale di ibridazione è evidente nelle cellule di Sertoli (freccie) e spermatogoni (Spg); nessun segnale è evidente nelle cellule di Leydig (asterisco). B: prima ripresa autunnale. Il segnale è presente negli spermatogoni (Spg), nelle cellule di Sertoli (freccia) e nelle cellule di Leydig (asterisco). Nessun segnale è evidente negli spermatociti primari (Spc I). C: piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz), nelle cellule di Sertoli (inserto, freccia) e nelle cellule di Leydig (asterischi). D: stasi invernale. Il segnale di ibridazione è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e Leydig (asterischi), così come negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e spermatozoi (Spz). E, E', E'': ripresa primaverile. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I), negli spermatociti secondari (E'', Spc II), negli spermatidi (Spt), dove il segnale è molto forte, negli spermatozoi (Spz), nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterischi). E inserto: nessun segnale di ibridazione è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20 µm nell'inserto E, 10 µm nella figura A, B, C, D, E, 5 µm nelle figure E', E'' e negli inserti C, D.



**Figura 19.** Immunolocalizzazione del PACAP27 e 38 mediante anticorpi eterologhi anti-PACAP27 e 38 su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo. Il segnale appare come marroni. A: stasi estiva. L'immunoreattività è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia), nelle cellule di Leydig (asterisco) e negli spermatogoni (Spg). B: prima ripresa autunnale. La positività è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I), nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterischi). C: piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente all'interno di spermatogoni (Spg), spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), spermatidi (Spt), spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco). D: stasi invernale. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco), negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz). E, E', E'': ripresa primaverile. L'immunopositività è evidente negli spermatogoni (E, Spg), negli spermatociti primari (E, Spc I) e secondari (E', Spc II), negli spermatidi (E'', Spt), negli spermatozoi (E'', Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterischi). E inserto: nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20 micron nell'inserto della figura E, 10 micron nelle figure A, C, D, E, 5 micron nelle figure B, E', E''.



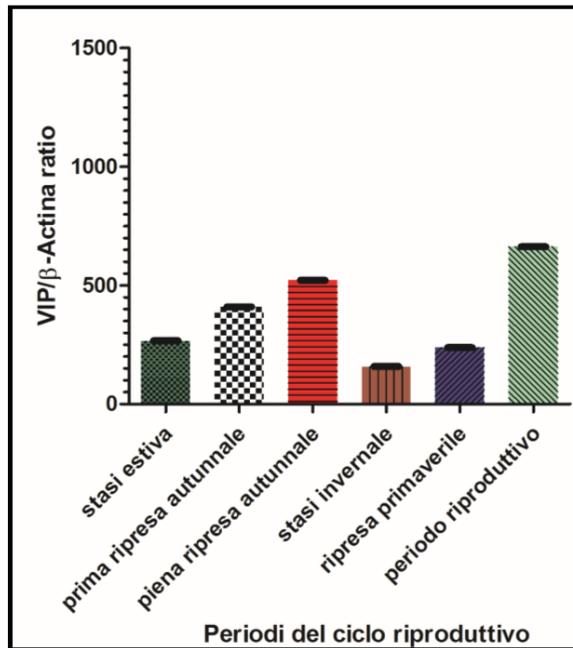
**Figura 20.** PCR (A) ed eluizione (B) per il PHI/VIP di *Podarcis sicula*. A: corsa su gel di agarosio all'1.8% della PCR per il PHI/VIP condotta su cDNA di testicolo di *Podarcis sicula* (T) e senza cDNA (K): è presente una banda di poco meno di 400 bp, mentre nel controllo non è presente alcuna banda. M: markers di peso molecolare. B: corsa su gel di agarosio all'1.8% del prodotto dell'eluizione: è presente la banda attesa di circa 400 bp.

```

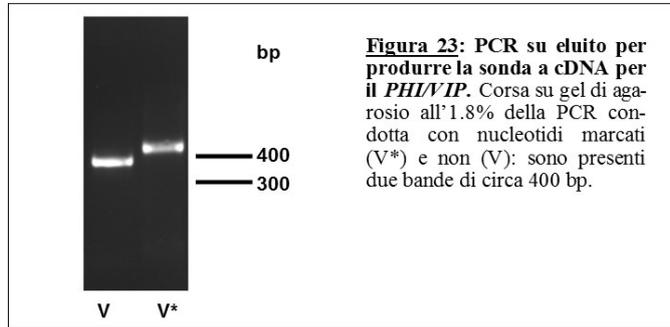
aaatctgaggctgacattttgcaaactacactacctgagaatgacaagttctattatgat
K S E A D I L Q T T L P E N D K F Y Y D
gtgtacagagctatggataggaacacaagacatgccgatggactcttcacaagcggctac
V Y R A M D R N T R H A D G L F T S G Y
agcaaaacttctgggtcaaatttcggcaagaaaatatttggaatcgcttataggaaaaaga
S K L L G Q I S A R K Y L E S L I G K R
gttggaaataacactcccttgatgaacagacaccgccagtcaaacgccattcagatgct
V G N N T P L D E Q T P P V K R H S D A
gtctttactgacaactacagtcgcttttcgaaagcagatggctgtgaagaaatatttgaac
V F T D N Y S R F R K Q M A V K K Y L N
tctgtcttaactga
S V L T

```

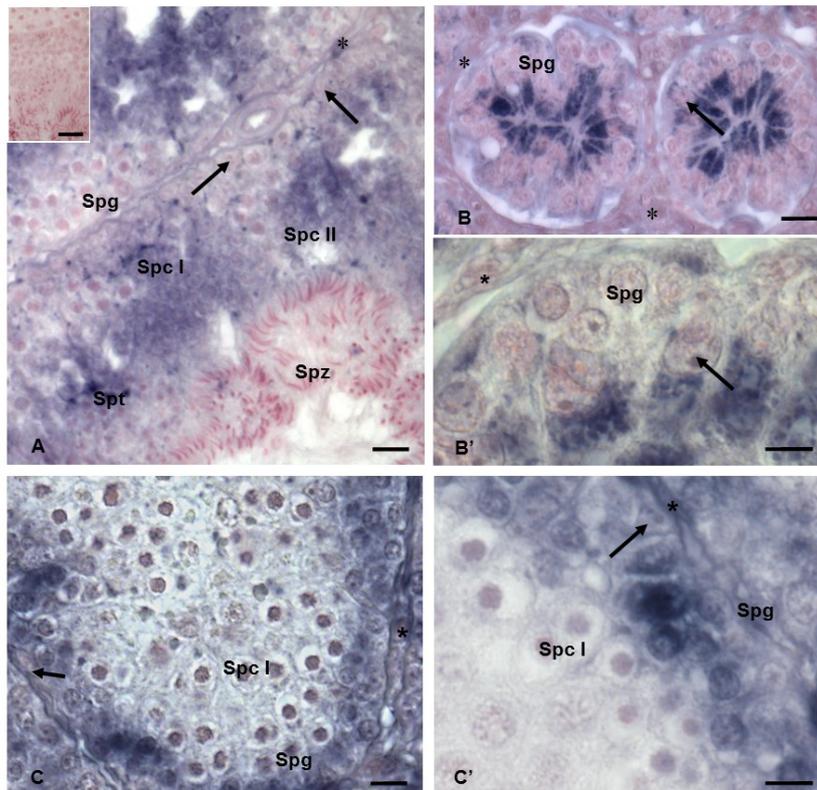
**Figura 21.** Sequenza del PHI/VIP di *Podarcis sicula* nucleotidica e aminoacidica dedotta (gi380450150).

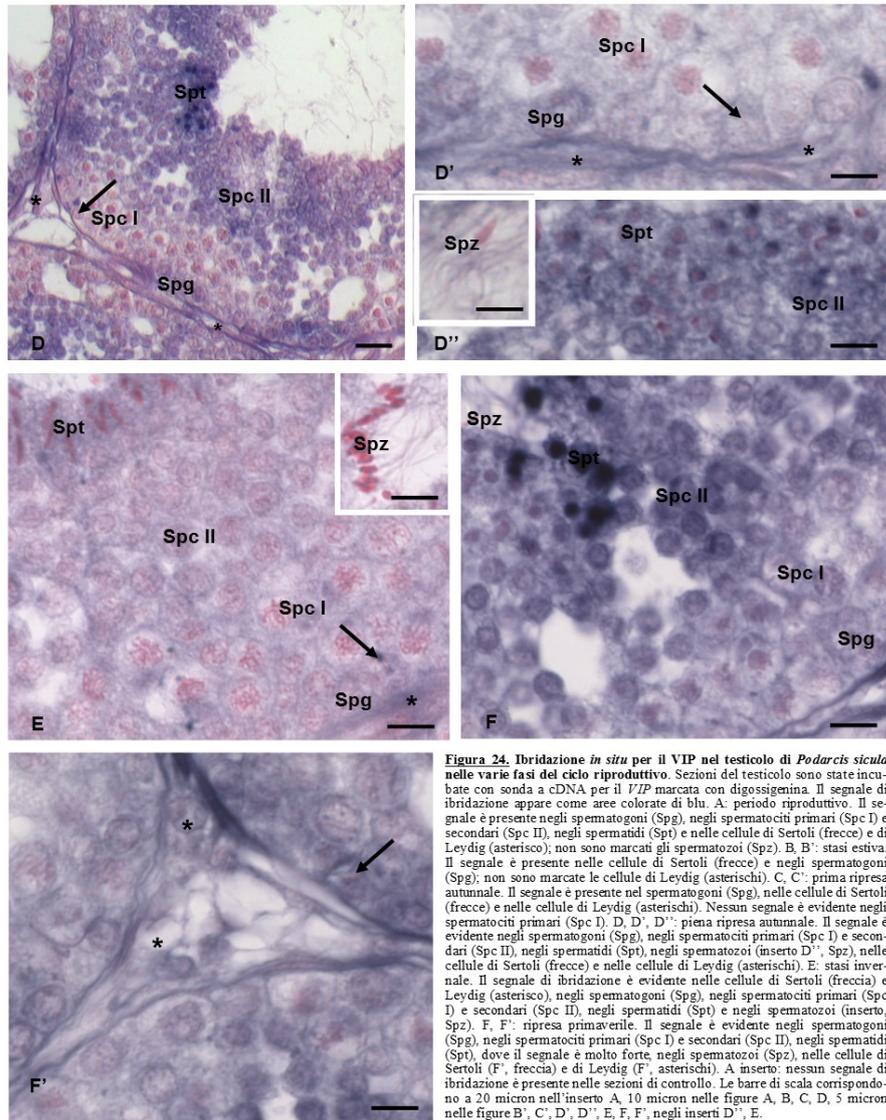


**Figura 22. Real-Time PCR per il VIP in *Podarcis sicula*.** Nel grafico è riportato il rapporto VIP/β-actina nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo. L'mRNA del VIP mostra un andamento ciclico nel corso delle diverse fasi del ciclo riproduttivo: partendo dai bassi livelli della stasi estiva, aumenta progressivamente, fino ad un primo picco nella piena ripresa autunnale; poi diminuisce drasticamente, raggiungendo il livello più basso del ciclo durante la stasi invernale; infine, aumenta nuovamente durante la ripresa primaverile per raggiungere poi un successivo picco nel corso del periodo riproduttivo. Le differenze tra i periodi sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

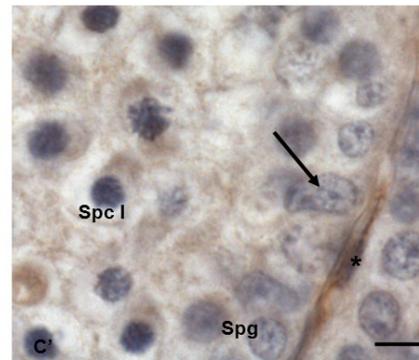
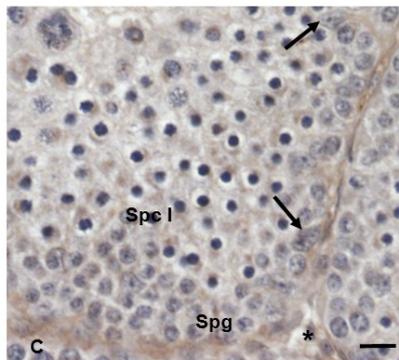
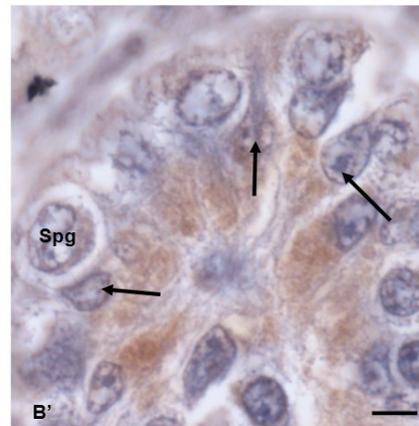
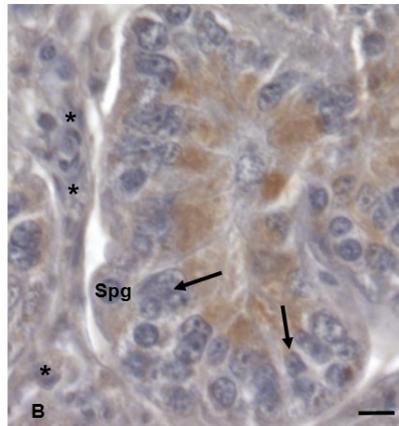
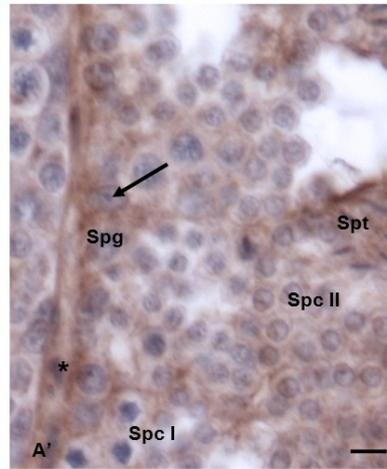
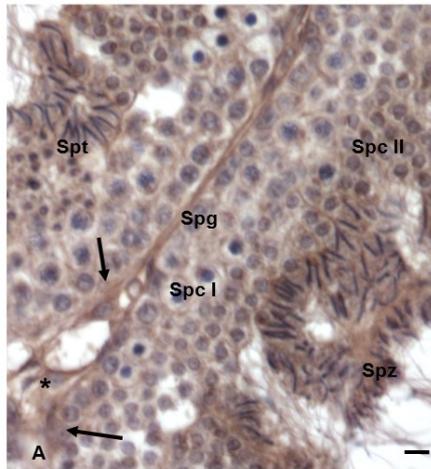


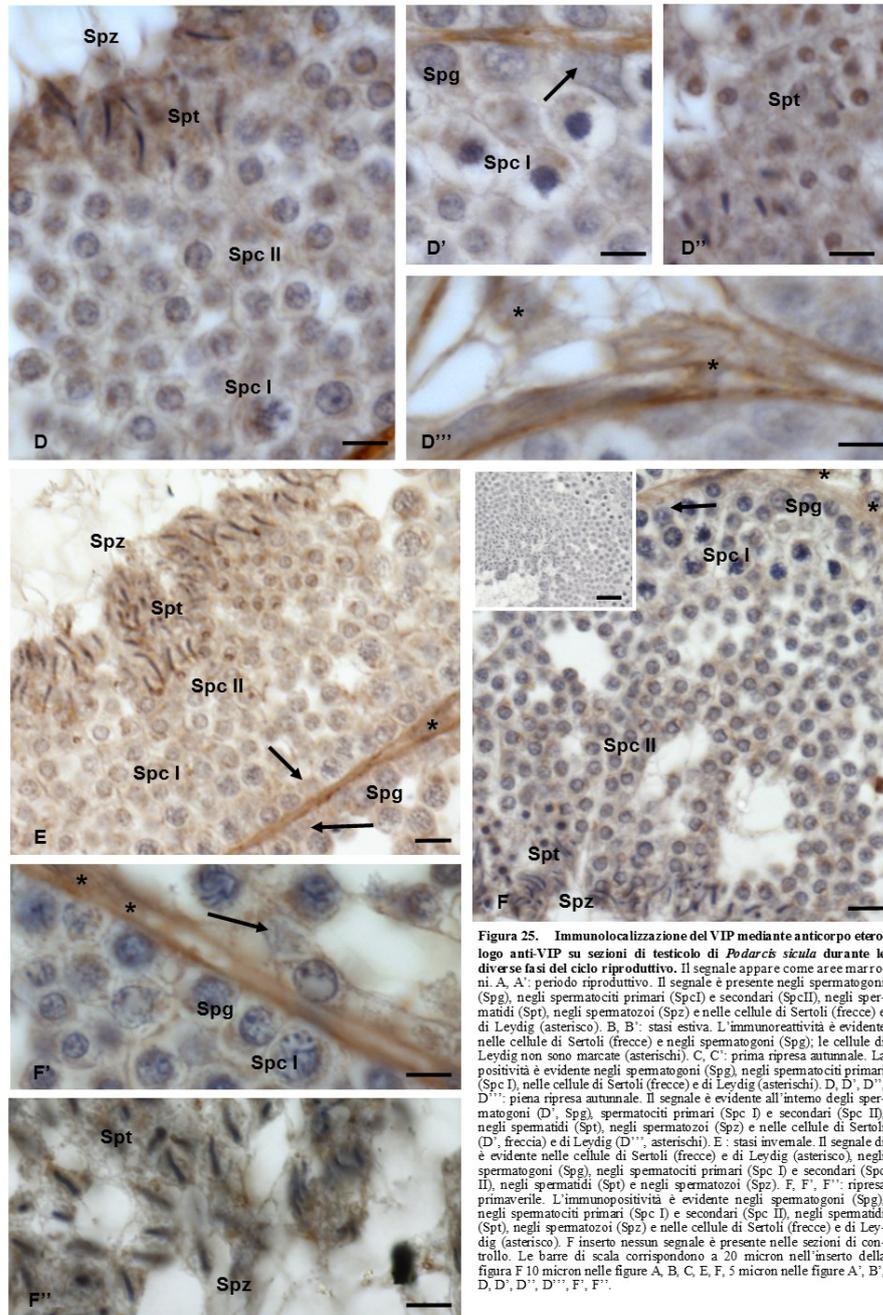
**Figura 23:** PCR su eluito per produrre la sonda a cDNA per il *PHLVIP*. Corsa su gel di agarosio all'1.8% della PCR condotta con nucleotidi marcati (V\*) e non (V): sono presenti due bande di circa 400 bp.



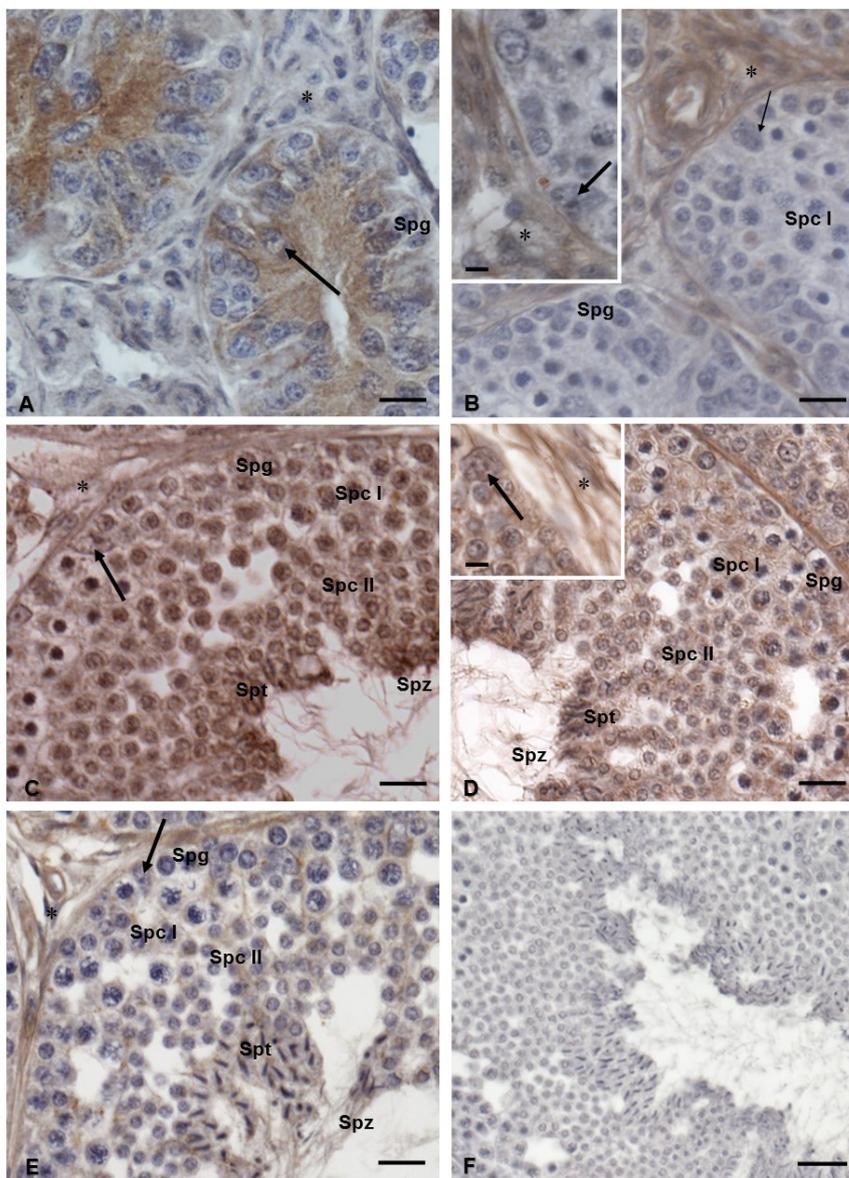


**Figura 24.** Ibridazione *in situ* per il VIP nel testicolo di *Podarcis sicula* nelle varie fasi del ciclo riproduttivo. Sezioni del testicolo sono state incubate con sonda a cDNA per il VIP marcata con digossigenina. Il segnale di ibridazione appare come aree colorate di blu. A: periodo riproduttivo. Il segnale è presente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco); non sono marcati gli spermatozoi (Spz). B, E: stasi estiva. Il segnale è presente nelle cellule di Sertoli (freccia) e negli spermatogoni (Spg); non sono marcate le cellule di Leydig (asterischi). C, C': prima ripresa autunnale. Il segnale è presente negli spermatogoni (Spg), nelle cellule di Sertoli (freccia) e nelle cellule di Leydig (asterischi). Nessun segnale è evidente negli spermatociti primari (Spc I). D, D', D'': piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (inserto D''). Spz, nelle cellule di Sertoli (freccia) e nelle cellule di Leydig (asterischi). E: stasi invernale. Il segnale di ibridazione è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e Leydig (asterisco), negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (inserto, Spz). F, F': ripresa primaverile. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) dove il segnale è molto forte, negli spermatozoi (Spz), nelle cellule di Sertoli (F', freccia) e di Leydig (F', asterischi). A inserto: nessun segnale di ibridazione è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20 micron nell'inserto A, 10 micron nelle figure A, B, C, D, 5 micron nelle figure B', C', D', D'', E, F, F', negli inserti D'', E.

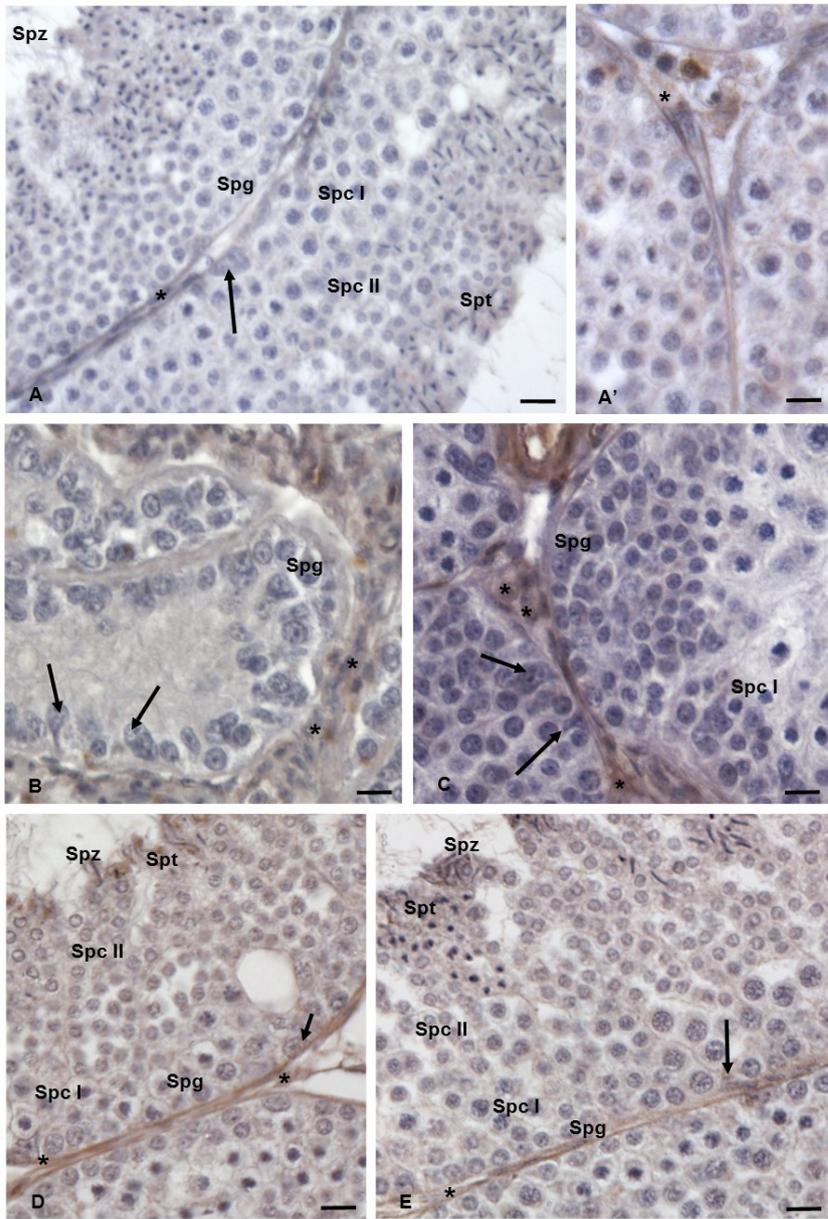


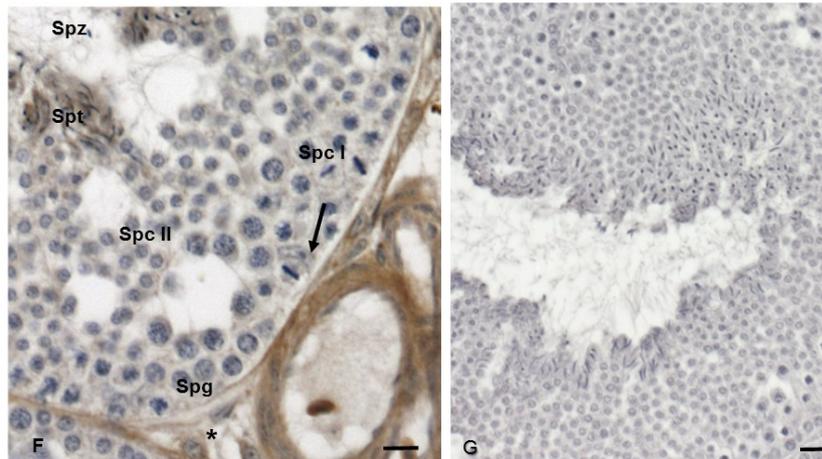


**Figura 25.** Immunolocalizzazione del VIP mediante anticorpo eterologo anti-VIP su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo. Il segnale appare come aree marroni. A, A': periodo riproduttivo. Il segnale è presente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (frecce) e di Leydig (asterisco). B, B': stasi estiva. L'immunoreattività è evidente nelle cellule di Sertoli (frecce) e negli spermatogoni (Spg); le cellule di Leydig non sono marcate (asterischi). C, C': prima ripresa autunnale. La positività è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I), nelle cellule di Sertoli (frecce) e di Leydig (asterischi). D, D', D'', D''': piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente all'interno degli spermatogoni (D', Spg), spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (D', frecce) e di Leydig (D'', asterischi). E: stasi invernale. Il segnale di è evidente nelle cellule di Sertoli (frecce) e di Leydig (asterisco), negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz). F, F', F'': ripresa primaverile. L'immunopositività è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (frecce) e di Leydig (asterisco). F inserto nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20 micron nell'inserto della figura F 10 micron nelle figure A, B, C, E, F, 5 micron nelle figure A', B', D, D', D'', D''', F', F''.

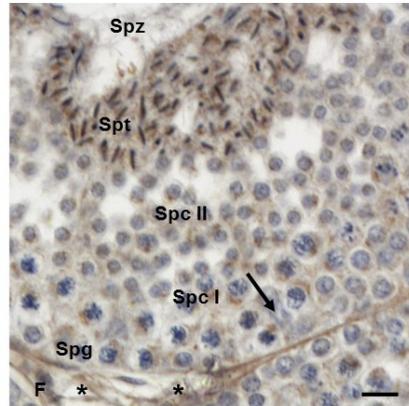
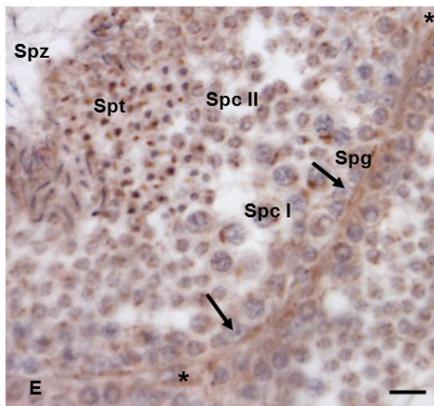
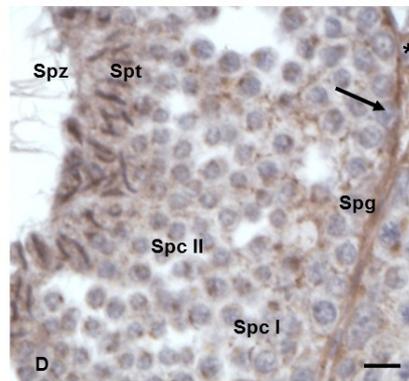
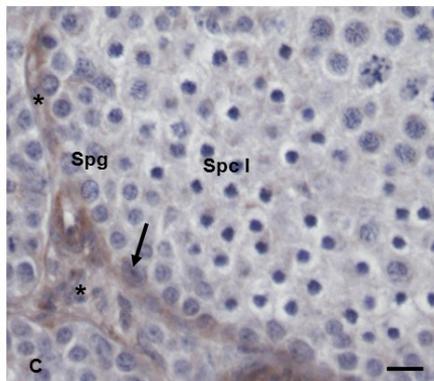
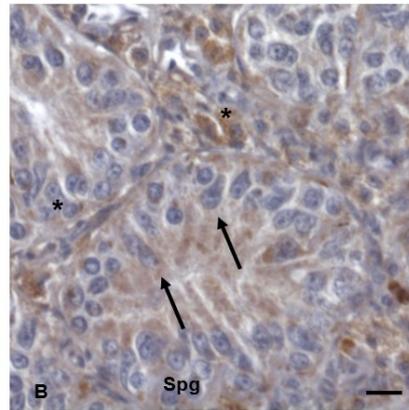
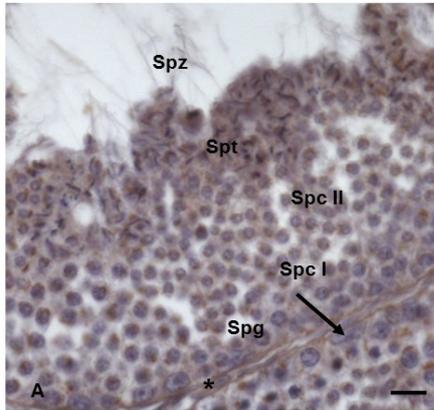


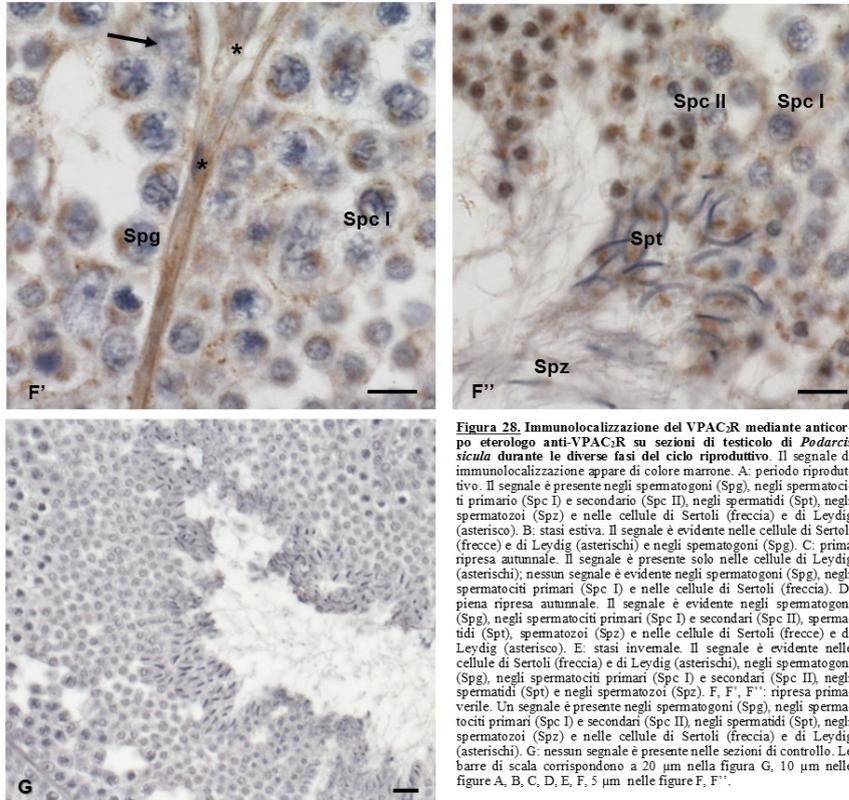
**Figura 26.** Immunocalizzazione del PAC<sub>1</sub>R mediante anticorpo eterologo anti-PAC<sub>1</sub>R su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo. Il segnale di immunocalizzazione appare di colore marrone. A: stasi estiva. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e negli spermatogoni (Spg); nessun segnale è presente nelle cellule di Leydig (asterisco). B: prima ripresa autunnale. Il segnale è presente solo nelle cellule di Leydig (asterischi); nessun segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e nelle cellule di Sertoli (freccie). C: piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), spermatidi (Spt), spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco). D: stasi invernale. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (insetto, asterisco), negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz). E: ripresa primaverile. Un segnale positivo è presente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco). F: nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20  $\mu$ m nella figura F, 10  $\mu$ m nella figura A, B, C, D, E, 5  $\mu$ m nella figura nell'insetto B, D.



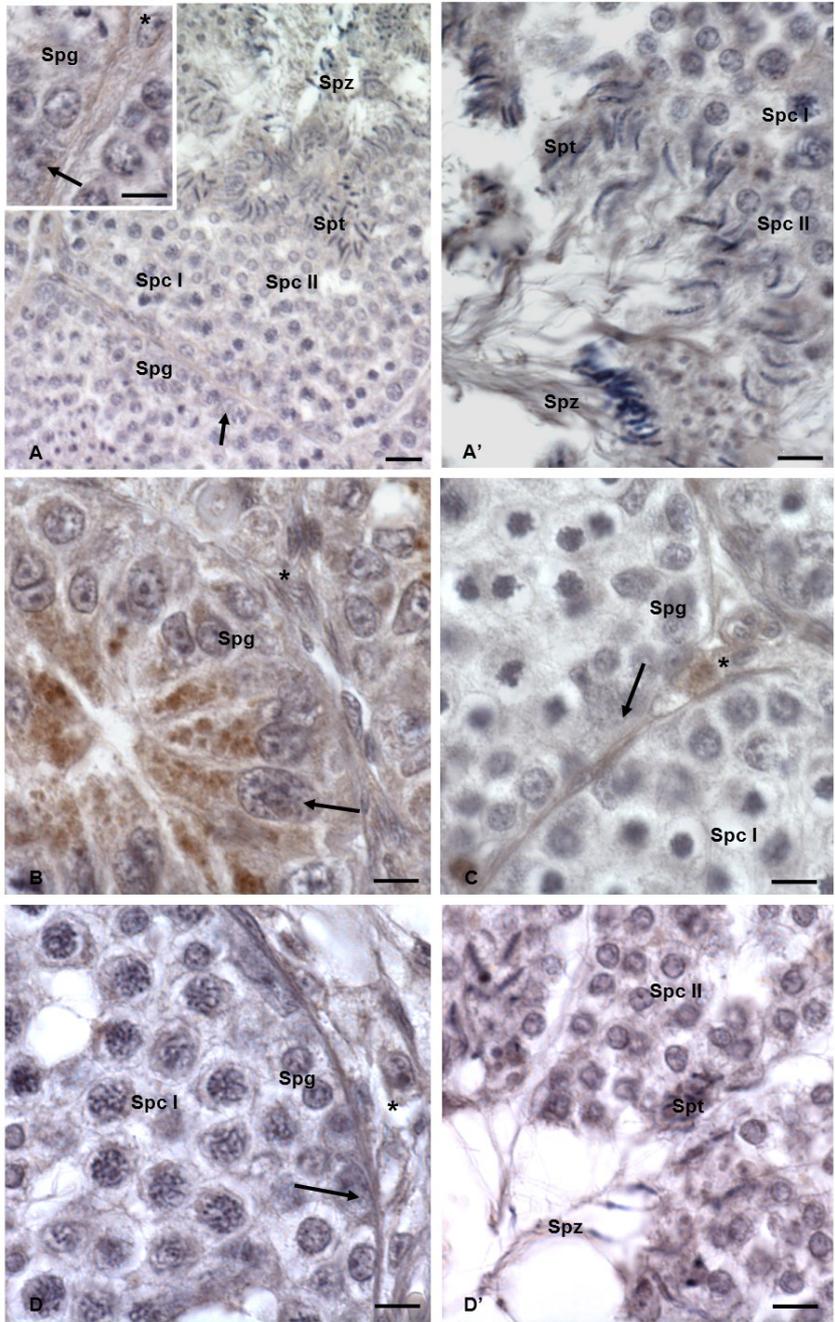


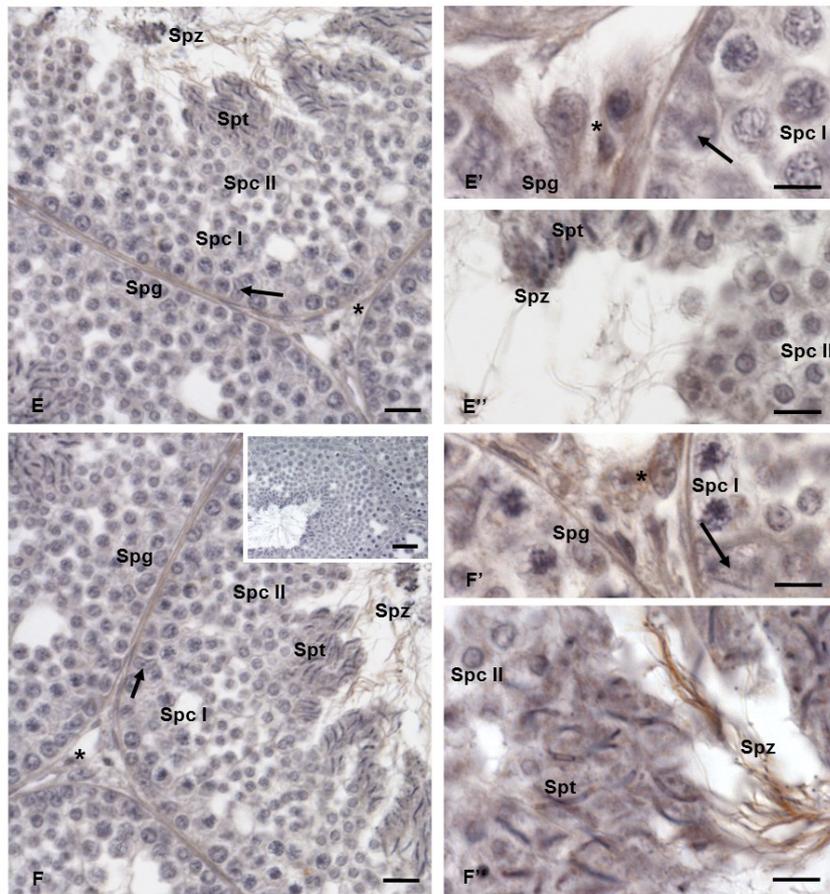
**Figura 27. Immunolocalizzazione del VPAC<sub>1</sub>R mediante anticorpo eterologo anti-VPAC<sub>1</sub>R su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo.** Il segnale di immunolocalizzazione appare di colore marrone. A, A': periodo riproduttivo. Il segnale è presente solo nelle cellule di Leydig (asterischi); non sono marcati gli spermatogoni (Spg), gli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), gli spermatidi (Spt), gli spermatozoi (Spz) e le cellule di Sertoli (freccia). B: stasi estiva. Il segnale è evidente nelle cellule di Leydig (asterischi); non sono marcate le cellule di Sertoli (freccie) e gli spermatogoni (Spg). C: prima ripresa autunnale. Il segnale immunoreattivo è presente solo nelle cellule di Leydig (asterischi); nessun segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e nelle cellule di Sertoli (freccie). D: piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente nelle cellule di Leydig (asterischi) e negli spermatidi (Spt), mentre è assente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia). E: stasi invernale. Il segnale è evidente nelle cellule di Leydig (asterisco) e negli spermatidi (Spt); è assente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia). F: ripresa primaverile. Il segnale è presente nelle cellule di Leydig (asterisco) e negli spermatidi (Spt); è assente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia). G: nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20  $\mu$ m nella figura G, 10  $\mu$ m nelle figure A, B, C, D, E, F.



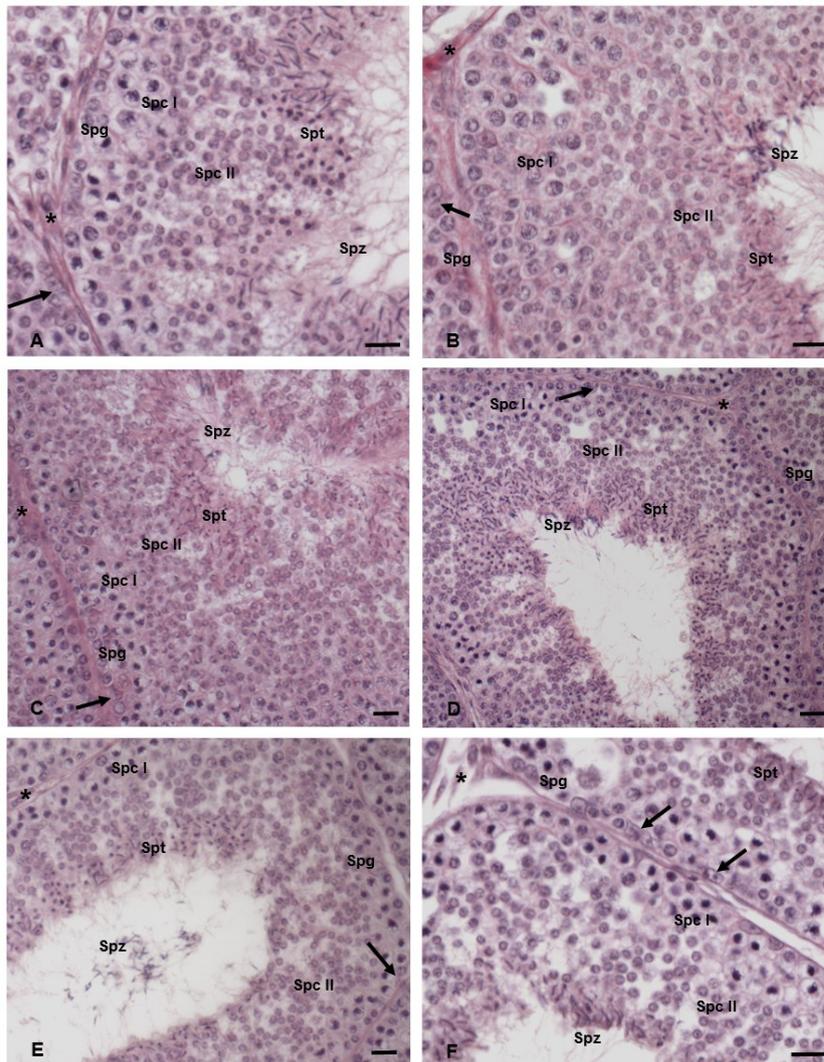


**Figura 28.** Immunolocalizzazione del VPAC<sub>2</sub>R mediante anticorpo eterologo anti-VPAC<sub>2</sub>R su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo. Il segnale di immunolocalizzazione appare di colore marrone. A: periodo riproduttivo. Il segnale è presente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondario (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco). B: stasi estiva. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterischi) e negli spermatogoni (Spg). C: prima ripresa autunnale. Il segnale è presente solo nelle cellule di Leydig (asterischi); nessun segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e nelle cellule di Sertoli (freccia). D: piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), spermatidi (Spt), spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco). E: stasi invernale. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterischi), negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz). F, F': ripresa primaverile. Un segnale è presente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterischi). G: nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20 μm nella figura G, 10 μm nelle figure A, B, C, D, E, F, F'.

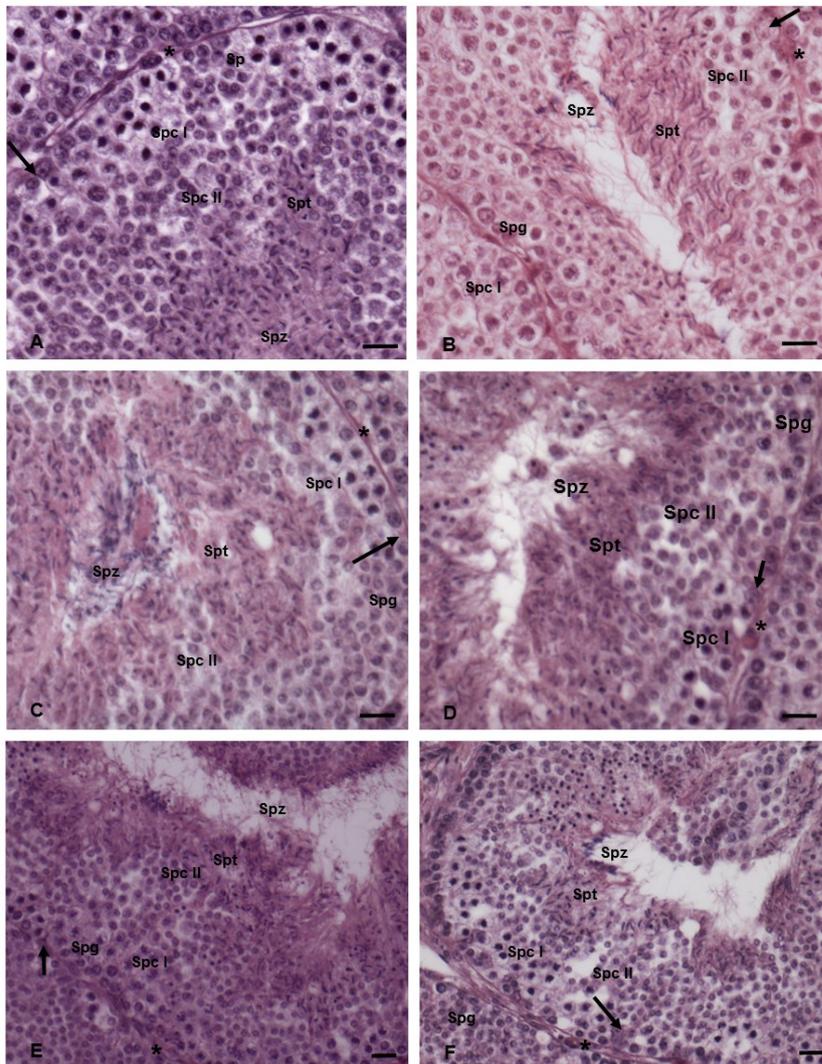




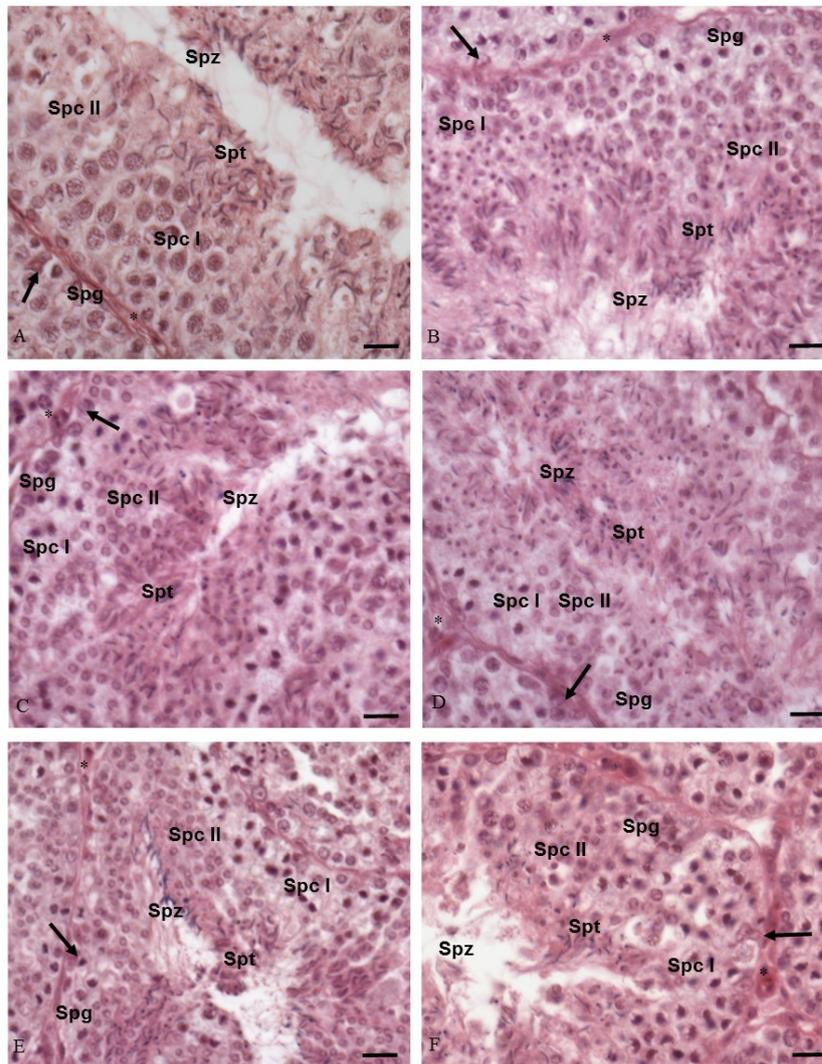
**Figura 29.** Immunolocalizzazione dell'aromatasi P450 mediante anticorpo eterologo anti-aromatasi su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo. Il segnale di immunolocalizzazione appare di colore marrone. A, A': periodo riproduttivo. Il segnale è presente principalmente nelle cellule di Leydig (insetto, asterisco), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz); sono debolmente marcate le cellule Sertoli (insetto, freccia) e gli spermatogoni (Spg); il segnale è assente negli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II). B: stasi estiva. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccia), di Leydig (asterisco) e negli spermatogoni (Spg). C: prima ripresa autunnale. La positività è evidente solo nelle cellule di Leydig (asterisco); il segnale è assente negli spermatogoni (Spg), negli spermatociti primari (Spc I) e nelle cellule di Sertoli (freccia). D, D': piena ripresa autunnale. Il segnale è evidente negli spermatociti primari (Spc I), negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Sertoli (freccia) e di Leydig (asterisco); il segnale è assente negli spermatogoni (Spg) e negli spermatociti secondari (Spc II). E, E', E'': stasi invernale. Il segnale è evidente nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterischi), negli spermatociti primari (Spc I), negli spermatidi (Spt) e negli spermatozoi (Spz); non sono marcati gli spermatogoni (Spg) e gli spermatociti secondari (Spc II). F, F', F'': ripresa primaverile. Il segnale è evidente principalmente negli spermatidi (Spt), negli spermatozoi (Spz) e nelle cellule di Leydig (asterischi); sono debolmente marcate anche le cellule di Sertoli (freccie), gli spermatogoni (Spg), gli spermatociti primari (Spc I) e secondari (Spc II). F insetto nessun segnale è presente nelle sezioni di controllo. Le barre di scala corrispondono a 20  $\mu\text{m}$  nell'insetto della figura F, 10  $\mu\text{m}$  nelle figure A, E, F, 5  $\mu\text{m}$  nelle figure A insetto, A', B, C, D, D', E', E'', F', F''.



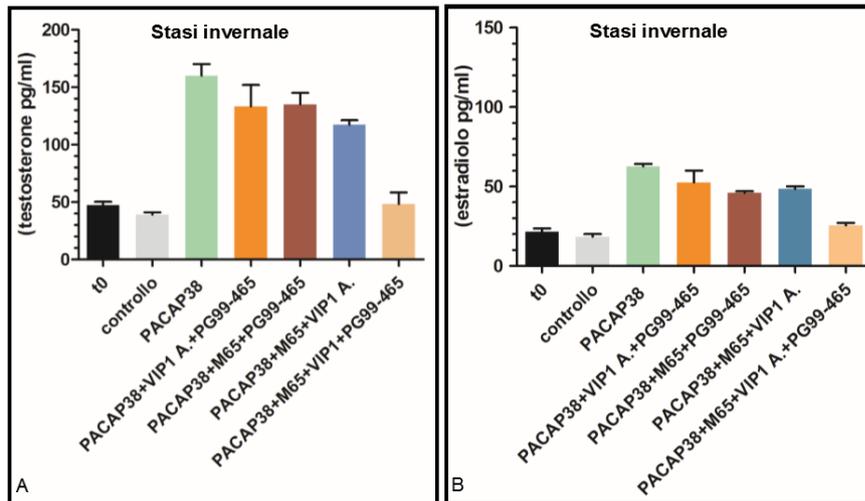
**Figura 30.** Sezioni di testicoli di *Podarcis sicula* del periodo di stasi invernale trattati con il solo mezzo (A), con il PACAP alla concentrazione fisiologica (B), con il PACAP, il VIP1 Antagonist e il PG 99-465 (C), con il PACAP, l'M65 e il PG99-465 (D), con il PACAP, l'M65 e il VIP1 Antagonist (E) e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti (F). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 20 µm nelle figure C, D, E, 10 µm la figura A, B, F. Colorazione emallume eosina.



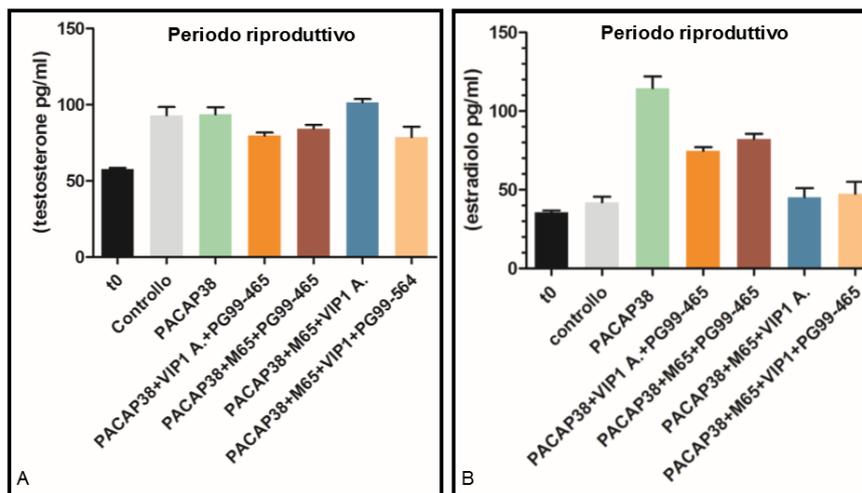
**Figura 31.** Sezioni di testicoli di *Podarcis sicula* del periodo riproduttivo trattati con il solo mezzo (A), con il PACAP alla concentrazione fisiologica (B), con il PACAP, il VIP1 Antagonist e il PG 99-465 (C), con il PACAP, l'M65 e il PG99-465 (D), con il PACAP, l'M65 e il VIP1 Antagonist (E) e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti (F). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 20 µm nelle figure E, F, 10 µm nelle figure A, B, C, D. Colorazione emallume-eosina.



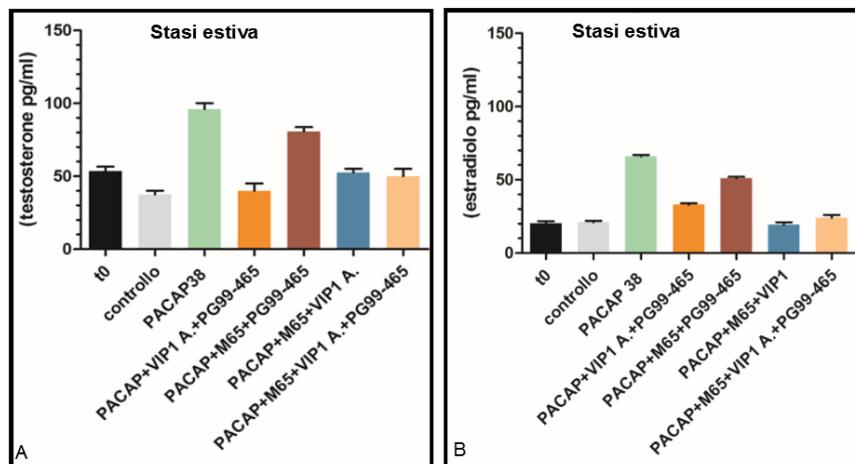
**Figura 32.** Sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* del periodo di stasi estiva trattati con il solo mezzo (A), con il PACAP alla concentrazione fisiologica (B), con il PACAP, il VIP1 Antagonist e il PG 99-465 (C), con il PACAP, l'M65 e il PG99-465 (D), con il PACAP, l'M65 e il VIP1 Antagonist (E) e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti (F). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 10 µm. Colorazione emallume-eosina.



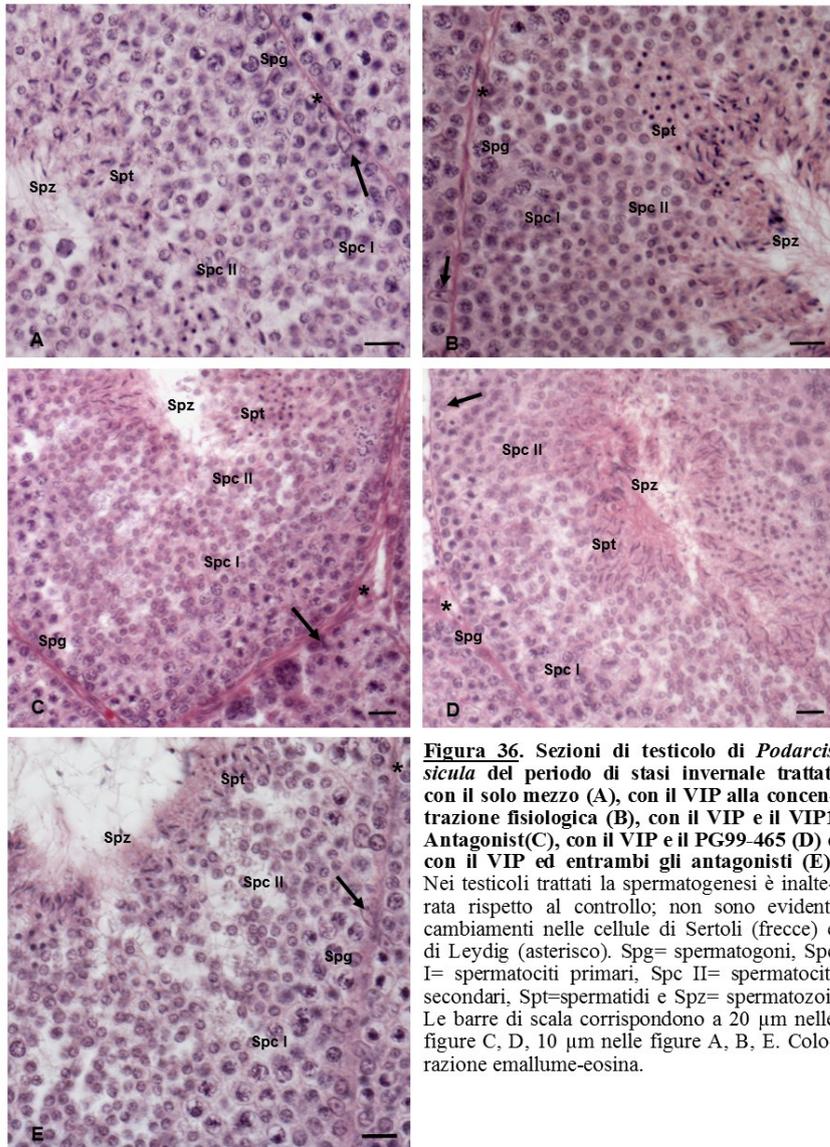
**Figura 33.** Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il PACAP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di 17 $\beta$ -estradiolo (B) nel periodo di stasi invernale nel testicolo di *Podarcis sicula*. A: i trattamenti con il solo PACAP o con il PACAP e la combinazione di due dei tre antagonisti (VIP1 Antagonist e PG99-465 o M65 e PG99-465 o M65 e VIP1), inducono aumenti dei livelli di testosterone statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il PACAP e i tre antagonisti; l'aumento del testosterone in questi trattamenti è confrontabile, le differenze non risultano statisticamente significative. B: i trattamenti con il PACAP da solo e con il PACAP in presenza di due dei tre antagonisti (VIP1 Antagonist e PG99-465 o M65 e PG99-465 o M65 e VIP1 Antagonist) inducono aumenti dei livelli di estradiolo statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti; l'aumento indotto è confrontabile tra loro, le differenze non risultano statisticamente significative.



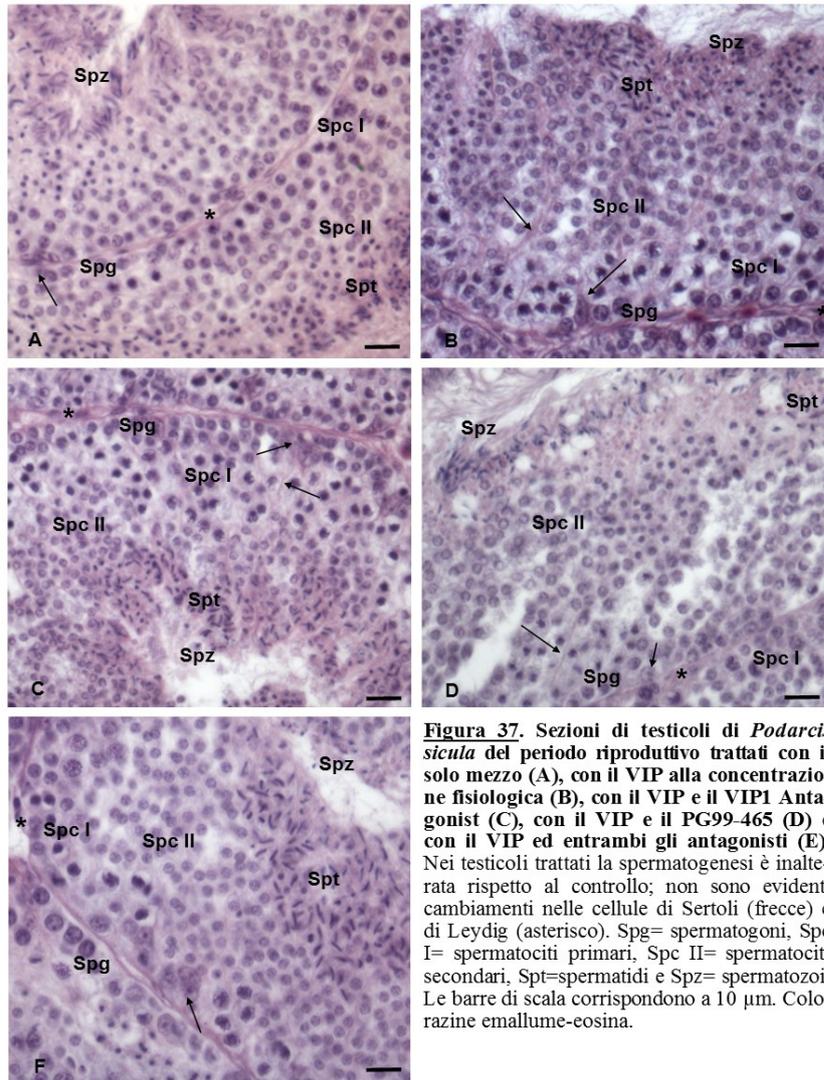
**Figura 34.** Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il PACAP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di 17 $\beta$ -estradiolo (B) nel periodo riproduttivo nel testicolo di *Podarcis sicula*. A: i trattamenti effettuati in questo periodo, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, non hanno determinato variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone. B: il PACAP da solo induce un aumento di 17 $\beta$ -estradiolo statisticamente superiore ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, al tempo zero e a tutti gli altri trattamenti; il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465 e con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 inducono un aumento di 17 $\beta$ -estradiolo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, al tempo zero e al trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e al trattamento con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti; i trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti non determinano cambiamenti statisticamente significativi nei livelli di estradiolo rispetto al controllo e al tempo zero.



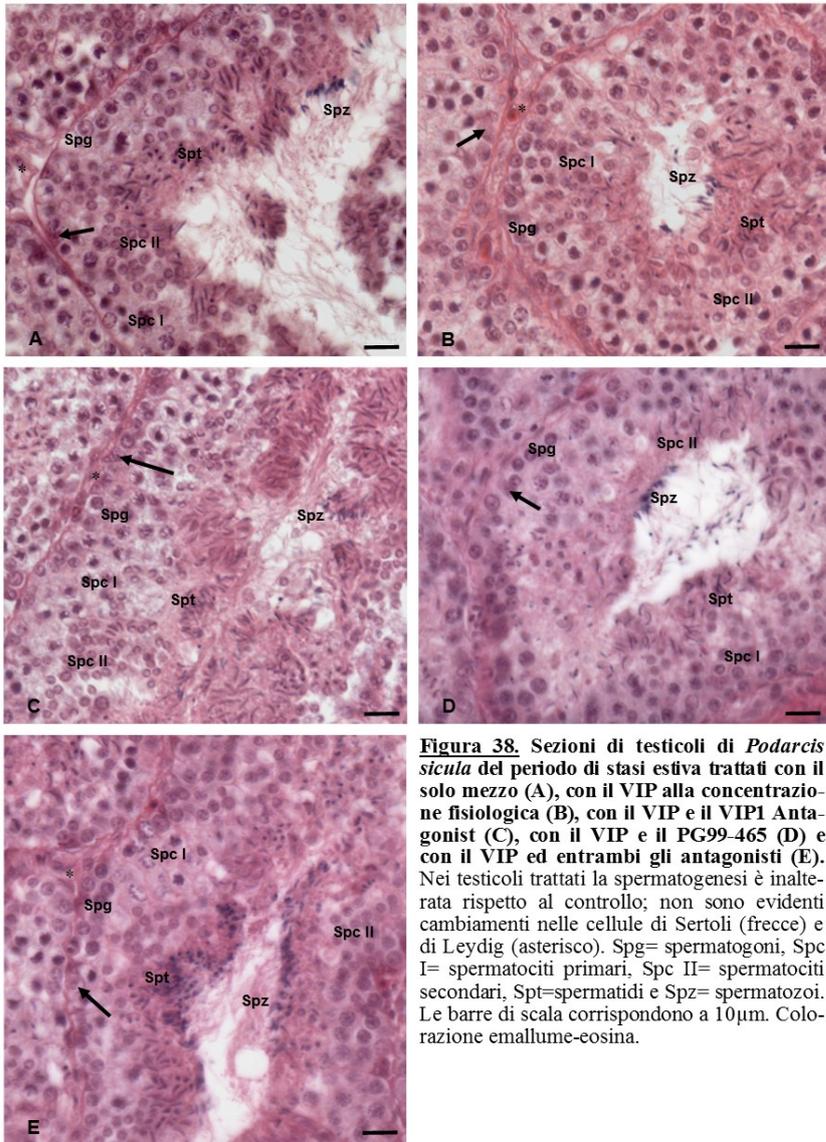
**Figura 35. Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il PACAP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di 17 $\beta$ -estradiolo (B) nel periodo di stasi estiva nel testicolo di *Podarcis sicula*.** **A:** il trattamento con il solo PACAP determina un aumento di testosterone statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero, al controllo e a tutti gli altri trattamenti. I trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti non determinano cambiamenti statisticamente significativi nei livelli di testosterone rispetto al tempo zero e al controllo. Il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 induce un aumento di testosterone statisticamente significativo rispetto al tempo zero, al controllo, ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti e tre gli antagonisti ( $p < 0,05$ ). **B:** il trattamento con il PACAP da solo induce un aumento di 17 $\beta$ -estradiolo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, al tempo zero e a tutti gli altri trattamenti; il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e PG99-465 induce un aumento statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, al tempo zero e ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti. I trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti non inducono variazioni statisticamente significative di estradiolo rispetto al tempo zero e al controllo. Infine il trattamento con il PACAP in presenza degli antagonisti VIP1 Antagonist e PG99-465, invece, induce un aumento di estradiolo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al mezzo, al tempo zero e ai trattamenti con il PACAP in presenza degli antagonisti M65 e VIP1 Antagonist e con il PACAP in presenza di tutti gli antagonisti.



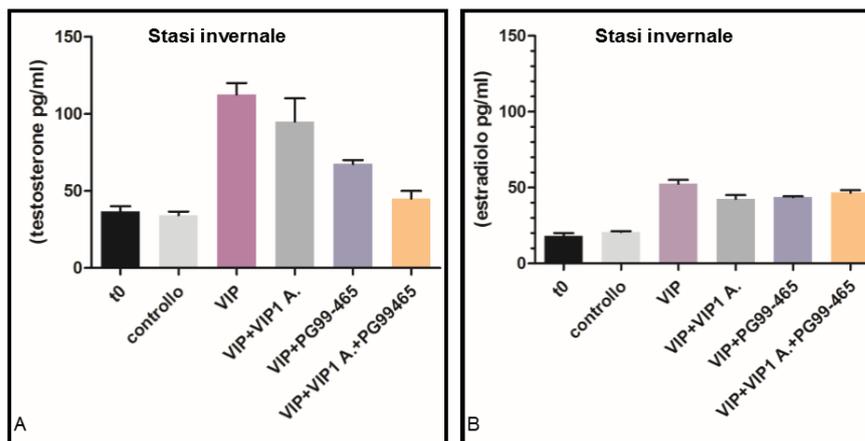
**Figura 36.** Sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* del periodo di stasi invernale trattati con il solo mezzo (A), con il VIP alla concentrazione fisiologica (B), con il VIP e il VIP1 Antagonist(C), con il VIP e il PG99-465 (D) e con il VIP ed entrambi gli antagonisti (E). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 20  $\mu$ m nelle figure C, D, 10  $\mu$ m nelle figure A, B, E. Colorazione emallume-eosina.



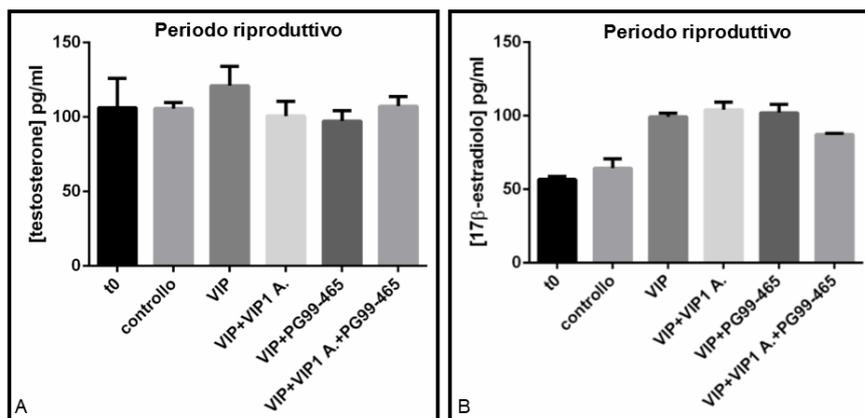
**Figura 37.** Sezioni di testicoli di *Podarcis sicula* del periodo riproduttivo trattati con il solo mezzo (A), con il VIP alla concentrazione fisiologica (B), con il VIP e il VIP1 Antagonist (C), con il VIP e il PG99-465 (D) e con il VIP ed entrambi gli antagonisti (E). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 10 µm. Colorazione emallume-eosina.



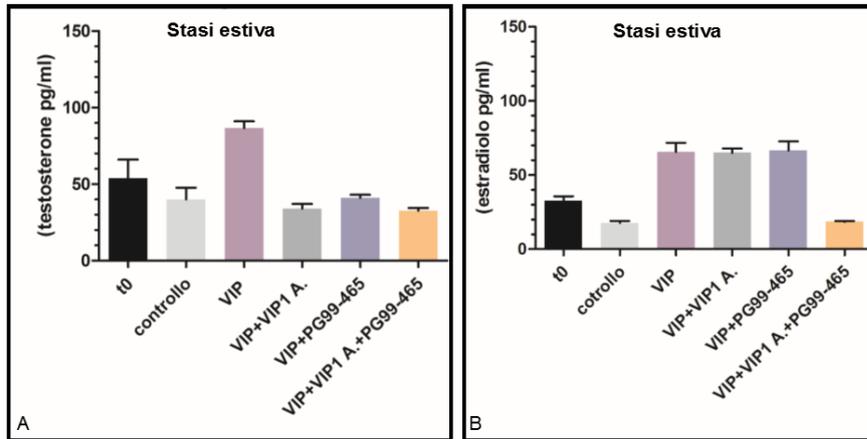
**Figura 38.** Sezioni di testicoli di *Podarcis sicula* del periodo di stasi estiva trattati con il solo mezzo (A), con il VIP alla concentrazione fisiologica (B), con il VIP e il VIP1 Antagonist (C), con il VIP e il PG99-465 (D) e con il VIP ed entrambi gli antagonisti (E). Nei testicoli trattati la spermatogenesi è inalterata rispetto al controllo; non sono evidenti cambiamenti nelle cellule di Sertoli (freccie) e di Leydig (asterisco). Spg= spermatogoni, Spc I= spermatociti primari, Spc II= spermatociti secondari, Spt=spermatidi e Spz= spermatozoi. Le barre di scala corrispondono a 10µm. Colorazione emallume-eosina.



**Figura 39.** Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il VIP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di  $17\beta$ -estradiolo (B) nel periodo di stasi invernale nel testicolo di *Podarcis sicula*. **A:** i trattamenti con il VIP in presenza dell'antagonista VIP1 Antagonist e con il VIP in presenza dell'antagonista PG99-465 determinano aumenti di testosterone statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero, al controllo e al trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti; il trattamento con il solo VIP determina aumenti di testosterone statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) rispetto ai trattamenti con il VIP in presenza dell'antagonista PG99-465, con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti, al controllo e al tempo zero; il trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti non induce aumenti statisticamente significativi rispetto al mezzo e al tempo zero. **B:** in tutti i trattamenti si riscontra un aumento statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero e rispetto al trattamento con il solo mezzo.



**Figura 40.** Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il VIP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di  $17\beta$ -estradiolo (B) nel periodo riproduttivo nel testicolo di *Podarcis sicula*. **A:** i trattamenti effettuati in questo periodo, confrontati tra di loro e rispetto al tempo zero, non hanno determinato variazioni statisticamente significative sui livelli di testosterone (A). **B:** in tutti i trattamenti si riscontra un aumento di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero e rispetto al trattamento con il solo mezzo. I trattamenti con il solo VIP, quello con il VIP e il VIP1 Antagonist e quello con il VIP e l'antagonista PG99-465, inducono un aumento di  $17\beta$ -estradiolo confrontabile; infatti le differenze non risultano statisticamente significative. Questi trattamenti inducono un aumento di  $17\beta$ -estradiolo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto a quello indotto dal trattamento con il VIP ed entrambi gli antagonisti.



**Figura 41.** Confronto degli effetti indotti dai trattamenti con il VIP e gli antagonisti dei suoi recettori sui livelli di testosterone (A) e di 17 $\beta$ -estradiolo (B) nel periodo di stasi estiva nel testicolo di *Podarcis sicula*. **A:** il trattamento con il solo VIP ha determinato un aumento di testosterone statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto al mezzo, al tempo zero e a tutti gli altri trattamenti. **B:** i trattamenti con il solo VIP e i trattamenti con il VIP in presenza dell'antagonista VIP1 Antagonist e con il VIP in presenza dell'antagonista PG99-465 inducono aumenti di estradiolo confrontabili e statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) rispetto al tempo zero, al trattamento con il solo mezzo e al trattamento con il VIP in presenza di entrambi gli antagonisti.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abad C., Gomariz R.P. and Waschek J.A.** 2006. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 6:151–163.
- Abad C., Martinez C., Juarranz M.G., Arranz A., Leceta J., Delgado M. and Gomariz R.P.** 2003. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961–971.
- Acsady L., Arabadzisz D. and Freund T.F.** 1996. Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73: 299–315.
- Adamou J.E., Aiyar N., Van Horn S. and Elshourbagy N.A.** 1995. Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 385–392.
- Agnese M., Valiante S., Angelini F., Laforgia V., Andreuccetti P. and Prisco M.** 2010. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptor PAC<sub>1</sub> in the testis of *Triturus carnifex* and *Podarcis sicula*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 168: 256-261.
- Agnese M., Rosati L., Muriano, F., Valiante, S., Laforgia, V., Andreuccetti, P., Prisco, M.,** 2012. Expression of VIP and its receptors in the testis of the spotted ray *Torpedo marmorata* (Risso 1880). *M. J. Mol. Neurosci.* 48,638-46.
- Agnese M., Valiante S., Laforgia V., Andreuccetti P. and Prisco M.,** 2013. PACAP and its receptors in the ovary of the cartilaginous fish *Torpedo marmorata*. *J. Exp. Zool* 319(1):1-9.
- Agnese M., Rosati L., Prisco M., Coraggio F., Valiante S., Scudiero R., Laforgia V., Andreuccetti P.** 2014. The VIP/VPACR system in the reproductive cycle of male lizard *Podarcis sicula*. Accepted in *Gen. and Com. Endocrinol.*
- Aino H., Hashimoto H., Ogawa N., Nishino A., Yamamoto K., Nogi H., Nagata S. and Baba A.** 1995. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide receptor. *Gene* 164: 301-304.
- Alexandre D., Anouar Y., Jègou S. and Vaudry H.** 1999. A cloned frog vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor exhibits pharmacological and tissue distribution characteristics of both VPAC1 and VPAC2 receptors in mammals. *Endocrinology* 140: 1285-1293.
- Alexandre D., Vaudry H., Jègou S. and Anouar Y.** 2000a. Structure and distribution of the mRNAs encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in the frog, *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 421: 234-246.
- Alexandre D., Vaudry H., Grumolato L., Turquier V., Fournier A., Jegou S. and Anouar Y.** 2002. Novel splice variants of type I pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in frog exhibit altered adenylate cyclase stimulation and differential relative abundance. *Endocrinology* 143: 2680–92.
- Alm P., Alumets J., Håkanson R. and Sundler F.** 1977. Peptidergic (vasoactive intestinal peptide) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* 2: 751-4.

- Alm P., Alumets J., Håkanson R., Owman O., Sjöberg N.O., Sundler F. and Walles B.** 1980. Origin and distribution of VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res.* 205: 337-47.
- Andò S., Panno M.L., Ciarcia G., Imbrogno E., Buffone M., Beraldi E., Sisci D., Angelini F. and Botte V.** 1990. Plasma sex hormone concentrations during the reproductive cycle in the male lizard, *Podarcis s. sicula*. *J. Reprod. Fertil.* 90: 353-60.
- Andò S., Ciarcia G., Panno M. L., Imbrogno E., Tarantino C., Buffone M., Beraldi E., Angelini F and Botte V.** 1992. Sex steroid levels in the plasma and testis during the reproductive cycle of the lizard *Podarcis s. sicula* Raf. *Gen. comp. Endocrinol.* 85: 1-7.
- Andreuccetti P., Carnevali O., Dini L., Falugi C., Filosa S., Kalthoff K. and Viscuso R.** 2009. *Biologia dello sviluppo.*
- Angelini F., Picariello O. and Botte V.** 1976. Influence of photoperiod and temperature on the testicular activity of the lizard *Lacerta s. sicula*. Raf. *Boll. Zool.* 43:111-123.
- Angelini F. and Botte V.** 1992. Spermatogenesis in reptiles: dynamic and regulatory aspects. In: Dallai, R, Eds. Sex origin and evolution. Mucchi Selected Symposia and Monographs UZI, Modena, Italy, pp. 211-230.
- Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D.H. and Kitada C.** 1991. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789.
- Arimura A. and Shioda S.** 1995. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 16: 53-88.
- Arimura A.** 1998. Perspectives on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine and nervous system. *Jpn. J. Physiol.* 48: 301-331.
- Ashur-Fabian O, Giladi E, Brenneman DE, and Gozes I.** 1997. Identification of VIP/PACAP receptors on rat astrocytes using antisense oligodeoxynucleotides. *J Mol Neurosci* 9:211–222.
- Barbezat GO and Grossman MI.** 1971. Intestinal secretion: stimulation by peptides. *Science* 174: 422-4.
- Biancani P., Beinfeld M.C., Coy D.H., Hillemeier C., Walsh J.H. and Behar J.** 1988. Dysfunction of the gastrointestinal peptide in peristalsis and sphincter function. *Ann N Y Acad Sci* 527:545–567.
- Bodanszky M., Bodanszky A., Klausner Y.S. and Said S.I.** 1974. A preferred conformation in the vasoactive intestinal peptide (VIP). Molecular architecture of gastrointestinal hormones. *Bioorg. Chem.* 3: 133–140.
- Bodanszky M. and Bodanszky A.** 1986. Conformation of peptides of the secretin–VIP–glucagon family in solution. *Peptides* 7: 43–48.
- Bokaei P.B., Ma X.Z., Byczynski B., Keller J., Sakac D., Fahim S. and Branch D.R.** 2006. Identification and characterization of five-transmembrane isoforms of human vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *Genomics* 88: 791–800.
- Botte V.** 1970. Gli ormoni sessuali nei Vertebrati non mammiferi. *Boll. Zool.* 37: 371-407.

- Brabet P., Diriong S., Journot L., Bockaert J. and Taviaux S.** 1996. Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP<sub>1</sub>-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 38: 100-102.
- Cai Y., Xin X., Yamada T., Muramatsu Y., Szpirer C. and Matsumoto K.** 1995. Assignments of the genes for rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (Adcyap1) and its receptor subtypes (Adcyap1r1, Adcyap1r2 and Adcyap1r3). *Cytogenet. Cell. Genet.* 71: 193-196.
- Callard I. P., Callard G. V., Lance V. And Eccles S.** 1976. Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotropins in the freshwater turtle, *Chrysemis picta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30: 347-356.
- Cardoso J.C., Vieira F.A., Gomes A.S. and Power D.M.** 2007a. PACAP, VIP and their receptors in the metazoa: insights about the origin and evolution of the ligand-receptor pair. *Peptides* 28: 1902-1919.
- Castrillo J.L., Theill L.E. and Karin M.** 1991. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253: 197-199.
- Chatterjee T.K., Sharma R.V. and Fisher R.A.** 1996. Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 271: 32226-32232.
- Chatterjee T.K., Liu X., Davisson R.L. and Fisher R.A.** 1997. Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 272: 12122-12131.
- Chieffi G., Pierantoni R. And Fasano S.** 1991. Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *Int. Rev. Cytol.* 127: 1-55.
- Chow B.K.C., Yuen T.T.H. and Chan K.W.** 1997. Molecular evolution of vertebrate VIP receptors and functional characterization of a VIP receptor from goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 176-185.
- Christophe J., Svoboda M., Lambert M., Waelbroeck M., Winand J., Dehaye J.P., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A. and Robberecht P.** 1986. Effector mechanisms of peptides of the VIP family. *Peptides* 7: 101-107.
- Clore G.M., Martin S.R. and Gronenborn A.M.** 1986. Solution structure of human growth hormone releasing factor. Combined use of circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 191: 553-561.
- Conconi M.T., Spinazzi R. and Nussdorfer G.G.** 2006. Endogenous ligands of PACAP/VIP receptors in the autocrine-paracrine regulation of the adrenal gland. *Int. Rev. Cytol.* 249: 1-51.
- Carreau S., Bouraima-Lelong H., Delalande C.** 2011. Estrogens-new players in spermatogenesis. Institute of Fundamental and Applied Biology, University of Caen Basse-Normandie, Caen; 3 INRA, University of Caen Basse-Normandie, Caen, France.
- Couvineau A., Gammeltoft S. and Laburthe M.** 1986. Molecular characteristics and peptide specificity of vasoactive intestinal peptide receptors from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 47: 1469-75.

- Couvineau A., Lacapere J.J., Tan Y.V., Rouyer-Fessard C., Nicole P. and Laburthe M.** 2003. Identification of cytoplasmic domains of hVPAC1 receptor required for activation of adenylyl cyclase. Crucial role of two charged amino acids strictly conserved in class II G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 278: 24759–66.
- Csaba Z.S., Csernus V. and Gerendai I.** 1997. Local Effect of PACAP and VIP on Testicular Function in Immature and Adult Rats. *Peptides* 18: 1561–1567.
- Cummings K.J., Gray S.L., Simmons C.J., Kozak C.A. and Sherwood N.M.** 2002. Mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): gene, expression and novel splicing. *Mol. Cell. Endocrinol.* 192: 133-45.
- Daniel P.B. and Habener J.F.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression regulated by a testis-specific promoter in germ cells during spermatogenesis. *Endocrinology* 141: 1218-27.
- Dejda A., Sokolowska P. and Nowak J.Z.** 2005. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol. Rep.* 57: 307–20.
- Delgado M., Garrido E., De la Fuente M. and Gomariz R.P.** 1996. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) stimulates rat peritoneal macrophage functions. *Peptides* 17: 1097-1105.
- Delgado, M., Martinez, C., Johnson, M. C., Gomariz, R. P., & Ganea, D.** 1996. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 68, 27–38.
- Delgado, M., Martinez, C., Leceta, J., Garrido, E., & Gomariz, R. P.** 1996. Differential VIP and VIP1 receptor gene expression in rat thymocyte subsets. *Peptides* 17, 803–807.
- Delgado, M., Pozo, D., Martinez, C., Garrido, E., Leceta, J., Calvo, J. R., et al.** 1996. Characterization of gene expression of VIP and VIP1-receptor in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Regul Pept* 62, 161–166.
- Delgado M., Martinez C., Pozo D., Calvo J.R., Leceta J., Ganea D. and Gomariz R.P.** 1999b. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J Immunol* 162:1200–1205.
- Della Corte F., Angelini F., Varano L. and Cavagnuolo A.** 1972. Azione del ciproterone sui maschi della lucertola (*Lacerta s. sicula* Raf.). *Atti Soc. Pelor. Sci. fis. Mat. Nat.* XVIII: 17-28.
- Delmas V. and Sassone-Corsi P.** 1994. The key role of CREM in the cAMP signaling pathway in the testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100: 121-4.
- Desbugois B., Laudat M.H. and Laudat P.** 1973. Vasoactive intestinal polypeptide and glucagon: Stimulation of adenylate cyclase activity via distinct receptors in liver and fat cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 1187–1194.
- Dickson L., Aramori I., McCulloch J., Sharkey J. and Finlayson K.** 2006a. A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology* 51: 1086–1098.

- Dickson L., Aramori I., Sharkey J. and Finlayson K.** 2006b. VIP and PACAP receptor pharmacology: A comparison of intracellular signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070: 239–242.
- Dickson L. and Finlayson K.** 2009. VPAC and PAC receptors: from ligands to function. *Pharmacol. Ther.* 121: 294–316.
- Dinsmore W.W., Gingell C., Hackett G., Kell P., Savage D., Oakes R. and Frenzt G.D.** 1999. Treating men with predominantly nonpsychogenic erectile dysfunction with intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate in a novel auto-injector system: a multicentre double-blind placebo-controlled study. *BJU Int* 83:274–279.
- Dolle P., Castrillo J.L., Theill L.E., Deerinck T., Ellismann M. and Karin M.** 1990. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of the growth hormone gene activity. *Cell.* 60: 809-820.
- El-Gehani F., Zhang F.P., Pakarinen P., Rannikko A. and Huhtaniemi I.** 1998a. Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol. Reprod.* 58: 116–123.
- El-Gehani F., Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 1998b. Vasoactive intestinal peptide is an important endocrine regulatory factor of fetal rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 139: 1474–1480.
- El-Gehani F. Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 1998c. Vasoactive intestinal peptide stimulates testosterone production by cultured fetal rat testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140: 175–178.
- El-Gehani F., Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 2000. Evidence that Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 63: 1482–1489.
- Fahrenkrug J.** 1993. Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 354–363.
- Fahrenkrug J.** 2010. VIP and PACAP. *Results Probl. Cell. Differ.* 50:221-34.
- Fahrenkrug J. and Hannibal J.** 2004. Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides* 25: 393–401.
- Fischer K.** 1967. Untersuchungen zur Physiologie der Lahresperiod des Sexualverhatlens bei männlichen Ruineidechsen (*LAcerta sicala campestris* Betta); Refraktarperiode und endogener Jahresrhythmus. *Nachr. Akad. Wiss. Göttingen Math. Physic. Kl.* 10:119.
- Fukuhara C., Suzuki N., Matsumoto Y., Nakayama Y., Aoki K., Tsujimoto G., Inouye S.I. and Masuo Y.** 1997. Day–night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 229: 49–52.
- Gagnon AW, Aiyar N, and Elshourbagy NA (1994).** Molecular cloning and functional characterization of a human liver vasoactive intestinal peptide receptor. *Cell Signal* 6:321–333.

- Galgano M. e D'Amore C.** 1953. Il ciclo sessuale annuo nel maschio di *Lacerta s.sicula* Raf. in Atti della Società Italiana di Anatomia , XV Convegno Sociale Milano 1953 Monit. Zool. Ital. (suppl.) 62: 320-325.
- Ghatei M.A., Takahashi K., Suzuki Y., Gardiner J., Jones P.M. and Bloom S.R.** 1993. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. J. Endocrinol. 136: 159–166.
- Giudice G., Augusti-Tocco G., Campanella C.** 2010 Biologia dello sviluppo.
- Gobbetti A. and Zerani M.** 2002. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide induces testicular testosterone synthesis through PGE2 mediation in crested newt, *Triturus cristatus*. J. Exp. Zool. 293: 73-80.
- Gourlet P., Vilardaga J.P., De Neef P., Waelbroeck M., Vandermeers A. and Robberecht P.** 1996. The C-terminus ends of secretin and VIP interact with the N-terminal domains of their receptors. Peptides 17: 825–829.
- Gourlet P., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M. and Robberecht P.** 1997a. In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. Peptides 18:1555–1560.
- Gourlet P., Vertongen P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Rathe´ J., De Neef P. and Robberecht P.** 1997b. The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass. Peptides 18:403– 408.
- Gourlet P., Rathe´ J., De Neef P., Cnudde J., Vandermeers-Piret M.C., Waelbroeck M. and Robberecht P.** 1998. Interaction of lipophilic VIP derivatives with recombinant VIP1/PACAP and VIP2/PACAP receptors. Eur. J. Pharmacol. 354:105–11.
- Gozes I., Avidor R., Yahav Y., Katznelson D., Croce C.M. and Huebner K.** 1987. The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p2–6qter. Hum. Genet. 75: 41–44.
- Grimaldi, M., & Cavallaro, S.** (1999). Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. Eur J Neurosci 11, 2767–2772.
- Gronenborn A.M., Bovermann G. and Clore G. M.** 1987. A 1H-NMR study of the solution conformation of secretin. Resonance assignment and secondary structure. FEBS Lett. 215: 88–94.
- Hahm S.H. and Eiden L.E.** 1996. Tissue-specific expression of the vasoactive intestinal peptide gene requires both an upstream tissue specifier element and the 59 proximal cyclic AMP-responsive element. J. Neurochem. 67: 1872–1881.
- Harmar, A. J., Sheward, W. J., Morrison, C. F., Waser, B., Guggler, M., & Reubi, J. C.** 2004. Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. Endocrinology 145, 1203–1210.
- Hashimoto H., Ishihara T., Shigemoto R., Mori K. and Nagata S.** 1993. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Neuron. 11: 333-342.

- Hashimoto H., Yamamoto K., Hagihara N., Ogawa N., Nishino A., Aino H., Nogi H., Imanishi K., Matsuda T. and Baba A.** 1996a. cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1281: 129-133.
- Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S. and Baba A.** 1996b. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 371: 567–577.
- Hashimoto H., Hagihara N., Koga K., Yamamoto K., Shintani N., Tomimoto S., Mori W., Koyama Y., Matsuda T. and Baba A.** 2000. Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J. Neurochem.* 74: 501-507.
- Hedlund P., Alm P., Hedlund H., Larsson B. and Andersson K.E.** 1994. Localization and effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human penile erectile tissue. *Acta Physiol. Scand.* 150: 103–104.
- Hedlund P., Alm P., Ekström P., Fahrenkrug J., Hannibal J., Hedlund H., Larsson B. and Andersson K.E.** 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2258–2266.
- Heindel J.J., Powell C.J., Paschall C.S., Arimura A. and Culler M.D.** 1992. A novel hypothalamic peptide, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol. Reprod.* 47: 800-806.
- Henle F., Fischer C., Meyer D.K. and Leemhuis J.** 2006. Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J. Biol. Chem.* 281: 24955–24969.
- Holtmann M.H., Hadac E.M. and Miller L.J.** 1995. Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *Studies of chimeric receptors. J. Biol. Chem.* 270: 14394–8.
- Hosoya M., Kimura C., Ogi K., Ohkubo S., Miyamoto Y., Kugoh H., Shimizu M., Onda H., Oshimura M., Arimura A. and Fujino M.** 1992. Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1129: 199-206.
- Hu Z., Lelievre V., Tam J., Cheng J.W., Fuenzalida G., Zhou X. and Waschek J.A.** 2000a. Molecular cloning of growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the frog, *Xenopus laevis*: brain distribution and regulation after castration. *Endocrinology* 141: 3366-3376.
- Hu Z., Lelievre V., Chao A., Zhou X. and Waschek J.A.** 2000b. Characterization and messenger ribonucleic acid distribution of a cloned pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor in the frog *Xenopus laevis* brain. *Endocrinology* 141: 657-665.
- Huang W.T., Li C.J., Wu P.J., Chang Y.S., Lee T.L. and Weng C.F.** 2009. Expression and in vitro regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) and its type I receptor (PAC1R) in the gonads of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Reproduction* 137: 449–467.

- Hubel K.A.** 1972. Secretin: a long progress note. *Gastroenterology* 62: 318–341.
- Hueso C., Carmena M.J. and Prieto J.C.** 1989. Identification of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat testis Leydig cells and study of developmental changes. *Biochem. Int.* 19: 951-958.
- Inagaki N., Yoshida H., Mizuta M., Mizuno N., Fujii Y., Gono T., Miyazaki J.I. and Seino S.** 1994. Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2679-2683
- Jaworski, D. M.** (2000). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the PACAP-selective receptor in cultured rat astrocytes, human brain tumors, and in response to acute intracranial injury. *Cell Tissue Res* 300, 219–230.
- Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H. and Cha C.I.** 2004. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476: 388–413.
- Journot L., Pantaloni C., Dumuis A., Sebben M. and Bockaert J.** 1994. The PACAP receptor: Generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin. Cell. Biol.* 5: 263-272.
- Kalamatianos T., Kallo I., Piggins H.D. and Coen C.W.** 2004. Expression of VIP and/or PACAP receptor mRNA in peptide synthesizing cells within the suprachiasmatic nucleus of the rat and in its efferent target sites. *J. Comp. Neurol.* 475: 19–35.
- Kasson B.G., Lim P. and Hsueh A.J.W.** 1986. Vasoactive intestinal peptide stimulates androgen biosynthesis by cultured neonatal testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 48: 21-29.
- Kato H., Ito A., Kawanokuchi J., Jin S., Mizuno T., Ojika K., Ueda R. and Suzumura A.** 2004. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult Scler* 0:651–659.
- Kim, W. K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R. P., Gozes, I., & Jonakait, G. M.** (2000). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 20, 3622–3630.
- King J. A. and Millar R. P.** 1991. Gonadotropin-releasing hormones. In: *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*, Academic Press, Vol. 4, part B, pp. 1-31.
- Koh P.O., Noh H.S., Kim Y.S., Cheon E.W., Kim H.J., Kang S.S., Cho G.J. and Choi W.S.** 2003. Cellular localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat testis. *Mol. Cells.* 15: 271-6.
- Kononen J., Paavola M., Penttilä T.L., Parvinen M. and Pelto-Huikko M.** 1994. Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mRNA in the rat seminiferous tubules. *Endocrinology.* 135: 2291-4.

- Koves K., Arimura A., Gorcs T.G. and Somogyvari-Vigh A.** 1991. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 54: 159–169.
- Krempels K., Usdin T.B., Harta G. and Mezey E.** 1995. PACAP acts through VIP type 2 receptors in the rat testis. *Neuropeptides* 29: 315–320.
- Laburthe M., Couvineau A. and Marie J.C.** 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Recept. Channels* 8: 137–53.
- Lacombe A., Lelievre V., Roselli C.E., Salameh W., Lue Y.H., Lawson G., Muller J.M., Waschek J.A. and Vilain E.** 2006. Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3793–3798.
- Lacombe A., Lelievre V., Roselli C.E., Muller J.M., Waschek J.A. and Vilain E.** 2007. Lack of vasoactive intestinal peptide reduces testosterone levels and reproductive aging in mouse testis. *J. Endocrinol.* 194: 153–160
- Lamperti E.D., Rosen K.M. and Villa-Komaroff L.** 1991. Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 9: 217–231.
- Langer I. and Robberecht P.** 2005. Mutations in the carboxy-terminus of the third intracellular loop of the human recombinant VPAC1 receptor impair VIP-stimulated  $[Ca^{2+}]_i$  increase but not adenylate cyclase stimulation. *Cell Signal.* 17: 17–24.
- Le Moigne A. and Foucrier J.** 2004 *Biologia dello sviluppo.*
- Lerner, E. A., Ribeiro, J. M. C., Nelson, R. J., and Lerner, M. R.** 1991 *J. Biol. Chem.* 266, 11234–11236
- Leung P.S., Wong T.P., Wong P.Y. and Chan H.C.** 1998. Localization and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat epididymis. *Cell Biol. Int.* 22: 193–198.
- Li M., Nakayama K., Somogivari-Vigh A. and Arimura A.** 1998. Testis-specific prohormone convertasi PC4 processes the precursor of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 17: 359-368.
- Li M., Mbikay M. and Arimura A.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads. *Endocrinology* 141: 3723-3730.
- Li M. and Arimura A.** 2003. Neuropeptides of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide/growth hormone-releasing hormone/secretin family in testis. *Endocrin.* 20: 201-14.
- Licht P. and Pearson A.K.** 1969. Effects of adenohipophysectomy on testicular function in the lizard *Anolis carolinensis*. *Biol. Reprod.* 1: 107-119.
- Licht P.** 1973. Thermal and photic influences of reptilian reproduction. *International Endocrinology Congress, Washington DC. Excerpta Medica International Congress Series*, 273: 185-190.
- Licht P.** 1984. Reptiles. In: *Marshall's Physiology of reproduction*, Vol. 1. G. E. Lamming, ed. Churchill Livingstone, pp 206-282.

- Linder S., Barkhem T., Norberg A., Persson H., Schalling M., Hökfelt T. and Magnusson G.** 1987. Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 605–609.
- Lissbrant E. and Bergh A.** 1997. Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the testicular vasculature of the rat. *Int. J. Androl.* 20: 356-60.
- Lissbrant E., Collin O. and Bergh A.** 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): effects on blood flow in the testis and caput epididymidis of the rat. *J. Androl.* 20: 366–374.
- Lofts B.** 1972. The Sertoli cells. *Cen Comp. Endocrinol. Suppl.*3: 636-648.
- Lostroh A. J.** 1975. Hormonal control of spermatogenesis. In: C. H. Spilman & et al. (eds.), *Regulatory mechanisms of male reproductive physiology.* Excerpta Medica, Amsterdam. Pp. 13-23.
- Lutz E.M., Sherward W.J., West K.M., Morrow J.A., Fink G. and Harmar A.J.** 1993. The VIP<sub>2</sub> receptor: Molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334: 3-8.
- Macdonald D.S., Weerapura M., Beazely M.A., Martin L., Czerwinski W., Roder J.C., Orser B.A. and MacDonald J.F.** 2005. Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src. *J. Neurosci.* 25: 11374–11384.
- Mackay M., Fantes J., Scherer S., Boyle S., West K., Tsui L.C., Belloni E., Lutz E., Van Heyningen V. and Harmar A.J.** 1996. Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: A possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. *Genomics* 37: 345-353.
- MacKenzie C.J., Lutz E.M., McCulloch D.A., Mitchell R. and Harmar A.J.** 1996. Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 805: 579–584.
- Masuo Y., Suzuki N., Matsumoto H., Tokito F., Matsumoto Y., Tsuda M. and Fujino M.** 1993. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res* 602: 57–63.
- McArdle C.A.** 1994 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a key player in reproduction? *Endocrinology.* 135: 815-7.
- McCulloch D.A., Lutz E.M., Johnson M.S., MacKenzie C.J. and Mitchell R.** 2000. Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921: 175–185.
- Miao F.J. and Lee T.J.** 1990. Cholinergic and VIPergic innervation in cerebral arteries: A sequential double-labeling immunohistochemical study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 32–37.
- Mikkelsen J.D. and Fahrenkrug J.** 1994. Concentrations and distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP), peptide histidine isoleucine (PHI) and peptide histidine valine (PHV) in the cerebral cortex and the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Brain Res.* 656: 95–107.

- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D. and Coy D.H.** 1989. Isolation of a novel 38 residues-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Miyata A., Jiang L., Dahl R.D., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N. and Arimura A.** 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 643-648.
- Moger W. H.** 1980. Direct effect of the estrogen on the endocrine function of the mammalian testis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 1001-1022.
- Moody T.W., Chan D., Fahrenkrug J. and Jensen R.T.** 2003a. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des* 9: 495–509.
- Moody T.W., Hill J.M. and Jensen R.T.** 2003b. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides* 24: 163–77.
- Moreno D., Gourlet P., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M. and Robberecht P.** 2000. Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. *Peptides.* 21(10):1543-1549.
- Moretti C., Mencacci C., Frajese G.V., Cerilli M. and Frajese G.** 2002. Growth hormone-realising hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 428-35.
- Morisset J., Douziech N., Rydzewska G., Buscail L. and Rivard N.** 1995. Cell signaling pathway involved in PACAP-induced AR4-2J cell proliferation. *Cell. Signal.* 7: 195–205.
- Moro, O., and Lerner, E. A.** 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 966–970
- Moro Osamu, Wakita Kaori, Ohnuma Manami, Denda Sumiko, Lerner Ethan A., and Tajima Masahiro**.1999. Functional Characterization of Structural Alterations in the Sequence of the Vasodilatory Peptide Maxadilan Yields a Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide Type 1 Receptor-specific Antagonist’ from the Shiseido Research Center, Yokohama, Kanagawa 223-8553, Japan and the §Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts 02129,.
- Moroo I., Tatsuno I., Uchida D., Tanaka T., Saito J., Saito Y. and Hirai A.** 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 795: 191-196.
- Muller J.M., Lelievre V., Becq-Giraudon L. and Meunier A.C.** 1995. VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Mol. Neurobiol.* 10: 115–34.
- Nakamura K., Nakamachi T., Endo K., Ito K., Machida T., Oka T., Hori M., Ishizaka K. & Shioda S.,** 2013. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *First International Journal of Andrology.* *Andrologia* 2013, xx, 1–6.
- Ogi K., Miyamoto Y., Masuda Y., Habata Y., Hosoya M., Ohtaki T., Masuo Y., Onda H. and Fujion M.** 1993. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human

pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1511-1521.

**Onoue S., Misaka S. and Yamada S.** 2008. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377: 579–590.

**Pantaloni C., Brabet P., Bilanges B., Dumuis A., Houssami S., Spengler D., Bockaert J. and Journot L.** 1996. Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptors selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 271: 22146-22151.

**Paolucci M. and Di Fiore M.M.** 1992 Putative steroid-binding receptors and non receptor components ad testicular activity in the lizard *Podarcis sicula sicula*. Dipartimento di Zoologia università di Napoli, via Mezzocannone 8, 80134 Napoli, Italy.

**Petkov V., Mosgoeller W., Ziesche R., Raderer M., Stiebellehner L., Vonbank K., Funk G.C., Hamilton G., Novotny C., Burian B. and Block L.H.** 2003. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 111:1339–1346.

**Pilzer I. and Gozes I.** 2006. A splice variant to PACAP receptor that is involved in spermatogenesis is expressed in astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070: 484–490.

**Pisegna J.R. and Wank S.A.** 1993. Molecular cloning and functional expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6345-6349.

**Pisegna J.R. and Wank S.A.** 1996. Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 17267-17274.

**Polzonetti-Magni A., Botte V., Bellini Cardellini L., Gobbetti A. and Castro A.** 1984. Plasma sex hormones and post-reproductive period in the green frog *Rana esculenta* complex. *Gen. comp. Endocrinol.* 54: 372-377.

**Prisco M., Liguoro A., Comitato R., Cardone A., D'Onghia B., Ricchiari L., Angelini F. and Andreuccetti P.** 2003. Apoptosis during spermatogenesis in the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 341-348.

**Properzi G., Cordeschi G. and Francavilla S.** 1992. Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat. An immunohistochemical study. *Histochemistry.* 97: 61-8.

**Pudney J.** 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32:459-97.

**Re R.N.** 2003. Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H751–H757.

**Reubi J.C., Laderach U., Waser B., Gebbers J.O., Robberecht P. and Laissue J.A.** 2000. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res.* 60: 3105–3112.

**Robinson R.M., Blakeney E.W. Jr. and Mattice W.L.** 1982. Lipid-induced conformational changes in glucagon, secretin, and vasoactive intestinal peptide. *Biopolymers* 21: 1271–1228

- Romanelli F., Fillo S., Isidori A. and Conte D.** 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. *Neuropeptides* 31: 311-317.
- Rosati L., Prisco M., Coraggio F., Valiante S., Scudiero R., Laforgia V., Andreuccetti P., Agnese M.** 2014. PACAP and PAC1 receptor in the reproductive cycle of male lizard *Podarvis sicula*. Accepted in *Gen. and Com. Endocrinol.*
- Rossato M., Nogara A., Gottardello F., Bordon P. and Foresta C.** 1997. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology* 138: 3228-3235.
- Said S.I. and Mutt V.** 1970a. Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science* 169: 1217–1218.
- Said S. I. and Mutt V.** 1970b. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225: 863-864.
- Sakiyama A., Kitada C., Watanabe T., Masuda Y. and Fujino M.** 1991. Structure–activity relationship of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). In: Suzuki A (ed) *Japanese Peptide Symposium*. Protein Research Foundation, Osaka, pp 215–220.
- Sena M., Bravo D.T., Agoston D. and Waschek J.A.** 1994. High conservation of upstream regulatory sequences on the human and mouse vasoactive intestinal peptide (VIP) genes. *DNA Seq.* 5: 25–29.
- Sherwood N.M., Krueckl S.L. and McRory J.E.** 2000. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/Glucagon superfamily. *Endocrine Review* 21: 619-670.
- Sheward W.J., Lutz E.M. and Harmar A.J.** 1995. The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by *in situ* hybridization. *Neuroscience* 67: 409–418.
- Shioda S., Legradi G., Leung W.C., Nakajo S., Nakaya K. and Arimura A.** 1994. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Endocrinology* 135: 818-825.
- Shioda S., Nakajo S., Nakai Y. and Arimura A.** 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a key player in male reproduction? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 839: 524-5.
- Shivers B.D., Gorcs T.J., Gottschall P.E. and Arimura A.** 1991. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distribution. *Endocrinology* 128: 3055-3065.
- Spengler D., Waeber C., Pantaloni C., Holsboer F., Bocaert J., Seeburg F.H. and Journot L.** 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170-175.
- Sreedharan S.P., Huang J.X., Cheung M.C. and Goetzl E.J.** 1995. Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2939-2943.

- Stiuso P., Marabotti A., Facchiano A., Lepretti M., Dicitore A., Ferranti P. and Carteni M.** 2006. Assessment of the conformational features of vasoactive intestinal peptide in solution by limited proteolysis experiments. *Biopolymers* 81:110–119.
- Suzuki N., Harada M., Hosoya M. and Fujino M.** 1994. Enhanced production of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by 1,N<sup>6</sup>-dibutyryl-adenosine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *Eur. J. Biochem.* 223: 147-153.
- Svoboda M, Tastenoy M, Van Rampelbergh J, Goossens JF, De Neef P, Waelbroeck M, and Robberecht P (1994).** Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1617–1624.
- Sze K.H., Zhou H., Yang Y., He M., Jiang Y. and Wong A.O.L.** 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148: 5042-59.
- Tainio H.** 1994. Peptidergic innervation of the human testis and epididymis. *Acta Histochem.* 96: 415-20.
- Talbot R.T., Dunn I.C., Wilson P.W., Sang H.M. and Sharp P.J.** 1995. Evidence for alternative splicing of the chicken vasoactive intestinal polypeptide gene transcript. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 81–91.
- Tanii, I., Aradate, T., Matsuda, K., Komiya, A., Fuse, H.,** 2011. PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. *Reproduction.* 141, 163-171.
- Teng B.Q., Grider J.R. and Murthy K.S.** 2001. Identification of a VIP-specific receptor in guinea pig tenia coli. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G718–G725.
- Theriault Y., Boulanger Y. and St-Pierre S.** 1991. Structural determination of the vasoactive intestinal peptide by two-dimensional H-NMR spectroscopy. *Biopolymers* 31: 459–464.
- Tolentino P.J., Dikkes P., Tsuruda L., Ebert K., Fink J.S., Villa-Komaroff L. and Lamperti E.D.** 1995. Quantitative analysis of the expression of a VIP transgene. *Mol. Brain. Res.* 33: 47–60.
- Tompkins J.D., Hardwick J.C., Locknar S.A., Merriam L.A. and Parsons R.L.** 2006. Ca<sup>2+</sup> influx, but not Ca<sup>2+</sup> release from internal stores, is required for the PACAP-induced increase in excitability in guinea pig intracardiac neurons. *J. Neurophysiol.* 95: 2134–2142.
- Tsukada T., Horovitch S.J., Montminy M.R., Mandel G. and Goodman R.H.** 1985. Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene. *DNA* 4: 293–300.
- Uddman R., Goadsby P.J., Jansen I. and Edvinsson L.** 1993. PACAP, a VIP-like peptide: Immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries and cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 291–297.
- Usdin T.B., Bonner T.I. and Mezey E.** 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135: 2662-2680.

- Vaalasti A., Tainio H., Pelto-Huikko M. and Hervonen A.** 1986. Light and electron microscope demonstration of VIP- and enkephalin-immunoreactive nerves in the human male genitourinary tract. *Anat Rec.* 215: 21-7.
- Valiante S., Prisco M., Capaldo A., Zambrano I., De Falco M., Andreuccetti P., Laforgia V. and Varano L.** 2007. Molecular characterization and gene expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the lizard brain. *Brain Res.* 1127: 66-75.
- Valiante S., Prisco M., Sciarrillo R., De Falco M., Capaldo A., Gay F., Andreuccetti P., Laforgia V. and Varano L.** 2008. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors: distribution and involvement in the secretion of *Podarcis sicula* adrenal gland. *J. Endocrinol.* 196: 291–303.
- Valiante S., Prisco M., De Falco M., Sellitti A., Zambrano I., Sciarrillo R., Capaldo A., Gay F., Andreuccetti P. and Laforgia V.** 2009. Distribution and molecular evolution of the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the lizard *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae). *J. Mol. Neurosci.* 39: 144–156.
- Van Der Molen H. J. and Rommerts F. F. G.** 1981. Testicular steroidogenesis. In: L. Martini, H. Burger & D. Krester (eds.). *The testis. Comprehensive endocrinology series*, Raven Press. Pp. 213-238.
- Van Rampelbergh J., Gourlot P., De Neef P., Robberecht P. and Waelbroeck M.** 1996. Properties of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide I and II receptors, vasoactive intestinal peptide-1, and chimeric amino-terminal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide-1 receptors: Evidence for multiple receptor states. *Mol. Pharmacol.* 50: 1596-1604.
- Varriale B., Pierantoni R., Di Matteo L., Minucci S., Fasano S. D'Antonio M. and Chieffi G.** 1986. Plasma and testicular estradiol and plasma androgen profile in the male frog *Rana esculenta* during the annual cycle. *Gen. comp. Endocrinol.* 64: 401-404.
- Vaudry D., Gonzales B.J., Basille M., Yon L., Fournier A. and Vaudry H.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B.K., Hashimoto H., Galas L. and Vaudry H.** 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61: 283-357.
- Vertongen, P., Schiffmann, S. N., Gourlet, P., & Robberecht, P.** (1998). Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 865, 412–415.
- Waschek J.A.** 1995. Vasoactive intestinal peptide: an important trophic factor and developmental regulator? *Dev. Neurosci.* 17: 1–7.
- Werkstrom V., Alm P., Persson K. and Andersson K.E.** 1998. Inhibitory innervation of the guinea-pig urethra; roles of CO, NO and VIP. *J. Auton. Nerv. Syst.* 74: 33–42.

- West A.P., Sharpe R.M. and Saunders P.T.** 1994. Differential regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein and cAMP response element modulator messenger ribonucleic acid transcripts by follicle-stimulating hormone and androgen in the adult rat testis. *Biol. Reprod.* 50: 869-81.
- West A.P., McKinnell C., Sharpe R.M. and Saunders P.T.K.** 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide can regulate testicular germ cell protein synthesis in vitro. *J. Endocrinol.* 144: 215–223.
- Wong A.O.L., Leung M.Y., Shea W.L.C., Tse L.Y., Chan J.P. and Chow B.K.C.** 1998. Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: Immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology* 139: 3465-3476.
- Wong A.O.L., Li W.S., Lee E.K.Y., Leung M.Y., Tse L.Y., Chow B.K.C., Lin H.R. and Chang J.P.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 329-343.
- Wong P.Y.D.** 1990. Electrolyte and fluid transport in the epididymis. *In* *Epithelial Secretion of Water and Electrolytes*. pp 333–347. Eds JA Young & PYD Wong. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Wray V., Nokihara K. and Naruse S.** 1998. Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 865: 37–44.
- Yamagami T., Ohsawa K., Nishizawa M., Inoue C., Gotoh E., Yanaihara N., Yamamoto H. and Okamoto H.** 1988. Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene and its inducible promoter. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527: 87–102.
- Yamamoto K., Hashimoto H., Hagihara N., Nishino A., Fujita T., Matsuda T. and Baba A.** 1998. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 211: 63-69.
- Yanaihara H., Vigh S., Kozicz T., Somogyvári-Vigh A. and Arimura A.** 1998. Immunohistochemical demonstration of the intracellular localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat testis using the stamp preparation. *Regul. Pept.* 78: 83-8.
- Zhou C.J., Kikuyama S., Shibamura M., Hirabayashi T., Nakajo S., Arimura A. and Shioda S.** 2000. Cellular distribution of the splice variants of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in the rat brain by *in situ* RTPCR. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75: 150–158.
- Zhou H., Huang J. and Murthy K.S.** 2006. Molecular cloning and functional expression of a VIP-specific receptor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G728–G734.
- Zhou W.L., Leung P.S., Wong T.P., Dun N.J., Wong P.Y. and Chan H.C.** 1997. Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Endocrinol.* 154: 389–395.

**Zhu B.C., Chiochio S.R., Suburo A.M. and Tramezzani J.H.** 1995. Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and the inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. *J. Androl.* 16: 248-58.