



Centro per la Ricerca, Trasferimento e Alta
Formazione DENOTe, Università di Firenze



Università degli Studi di Firenze



Firenze 29 febbraio 2008

II Riunione Scientifica del
**Gruppo Italiano
di Scienze Neuroendocrine
(GISNe)**

**PROGRAMMA E RIASSUNTI DELLE
COMUNICAZIONI E DEI POSTERS**

**Dipartimento di Fisiopatologia Clinica
Complesso polivalente "cubo"
viale Pieraccini 6**

Comitato Promotore GISNe

Giovanni Biggio (Cagliari)

Ezio Ghigo (Torino)

Bianca Marchetti (Catania)

Roberto C. Melcangi (Milano)

Marcella Motta (Milano)

Eugenio Müller (Milano)

GianCarlo Panzica (Torino)

Anna Spada (Milano)

La responsabilità sul contenuto dei riassunti è totalmente a carico degli autori.

Publicato a Torino, 11 febbraio 2008
a cura di G.C.Panzica

Copyright GISNe

**GRUPPO ITALIANO DI
SCIENZE NEUROENDOCRINE
(GISNe)**

2^a RIUNIONE SCIENTIFICA

29 FEBBRAIO 2008

**Centro Polivalente, Università degli Studi di Firenze, viale
Pieraccini 6, Firenze**

**PROGRAMMA E RIASSUNTI DELLE
COMUNICAZIONI E DEI POSTERS**

**Comitato organizzatore locale:
Alessandro Peri (Presidente)
Susanna Benvenuti
Giovanni Danza
Paola Luciani**

PROGRAMMA SCIENTIFICO

Lettura Plenaria (Chairmans: Marcella Motta - Eugenio Muller)

Ormoni tiroidei e difetto di rimielinizzazione nella sclerosi multipla: un caso di "non-thyroidal illness syndrome"?

Laura Calzà (Bologna)

Comunicazioni Orali (I sessione) (Chairmans: Roberto Melcangi - Anna Spada)

1) EFFETTI COMPORTAMENTALI DEL KNOCK-OUT CONDIZIONALE DEL RECETTORE Y1 PER IL NEUROPEPTIDE Y NEL PROENCEFALO DI TOPO

Ilaria Bertocchi, Alessandra Oberto, Angela Longo, Paolo Mele, Paola Palanza, Rolf Sprengel, Carola Eva (Torino, Parma, Heidelberg)

2) ALTERAZIONE DEL COMPORTAMENTO SESSUALE E DEL PROFILO NEUROENDOCRINO IN SEGUITO ALL'ESPOSIZIONE A STRESS SOCIALE CRONICO.

Dadomo Harold, Bartolomucci Alessandro, Palanza Paola, Panzica Giancarlo, Parmigiani Stefano. (Parma-Torino)

3) IL RECETTORE DEGLI ANDROGENI E' NECESSARIO PER LA COMPLETA MASCOLINIZZAZIONE DEL SISTEMA NITRINERGICO E DEL SISTEMA VASOPRESSINERGICO DEL RATTO.

Mariangela Martini, Francesca Allieri, Gabriele Di Sante, Giada Spigolon, Helena Pinos, Antonio Guillamón, Paloma Collado, Carla Viglietti-Panzica, GianCarlo Panzica (Torino)

4) IL GnRH ED IL SUO ANALOGO LEUPROLIDE ACETATO MODULANO L'ESPRESSIONE DI SELADIN-1/DHCR24 IN MODELLI CELLULARI NEURONALI.

Rosati Fabiana, Cungi Chiara, Galbiati Mariarita, Maggi Roberto, Morello Matteo, Sturli Niccolò, Vannelli B. Gabriella, Luciani Paola, Benvenuti Susanna, Peri Alessandro, Serio Mario, Danza Giovanna. (Firenze)

5) INTRACELLULAR TRAFFICKING OF THE HUMAN OXYTOCIN RECEPTOR IN HEK293 CELLS: EVIDENCE OF RECEPTOR RECYCLING VIA A RAB4/RAB5 "SHORT CYCLE".

Francesca Conti, Sara Sertich, Alessandra Reversi, Bice Chini (Milano)

6) IL COUPLING CON LE PROTEINE G E L'INIBIZIONE DELL'ADENILATO CICLASI SONO MEDIATE DAL DRY MOTIF LOCALIZZATO NEL SECONDO LOOP DEL RECETTORE SST5.

Erika Peverelli, Giovanna Mantovani, Sara Bondioni, Paolo Beck-Peccoz, Andrea Lania, Anna Spada (Milano)

7) EFFETTI PROLIFERATIVI E PROTETTIVI DI GHRELINA E DEL SUO ANALOGO HEXARELINA SU CELLULE PROGENITRICI IPPOCAMPALI DI RATTO ADULTO.

Silvia Destefanis, Inger Johansson, Riccarda Granata, Jorgen Isgaard, Ezio Ghigo, Giampiero Muccioli. (Torino)

8) EFFETTI ENDOCRINO-METABOLICI DEGLI ANTIPICOTICI ATIPICI.

Giovanni Tulipano, Michela Giovannini, Dario Zanetti, Daniela Cocchi. (Brescia)

Sessione Poster (Chairmans: Bice Chini - Giovanna Danza)

CONTROLLO SEROTONINERGICO SULL'ESPRESSIONE GENICA DELLA VASOPRESSINA DURANTE IL CICLO ESTRALE DI TOPO: TRE ATTORI SUL PALCOSCENICO DELLA DEPRESSIONE

Francesca Allieri, Valérie Grange-Messent, Jean Marc Lacorte, Dominique Peppar, GianCarlo Panzica, Carla Viglietti-Panzica, Hélène Hardin-Pouzet (Torino-Parigi)

G-PROTEIN COUPLING SPECIFICITY OF THE HUMAN OXYTOCIN RECEPTOR: ROLE IN DIFFERENTIAL SIGNALLING PATHWAY ACTIVATION

ALESSANDRA REVERSI, SARA RICCIARDI, CELINE GALES, MICHEL BOUVIER, BICE CHINI (Milano-Montreal)

ELEVATE CONCENTRAZIONI INTERMITTENTI DI GLUCOSIO RIDUCONO LA PROLIFERAZIONE DI PRECURSORI NEURONALI ALTERANDO IL SISTEMA DELL'IGF: RUOLO DEL FATTORE NEUROPROTETTIVO SELADIN-1

Cristiana Deledda, Stefano Giannini, Anna Pezzatini, Paola Luciani, Cinzia Manuelli, Susanna Benvenuti, Iliara Cellai, Gabriella Barbara Vannelli, Carlo Maria Rotella, Mario Serio ed Alessandro Peri (Firenze)

IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL PEPTIDE OPIOIDE ALIMENTARE GLUTEN EXORPHIN B5 IN LIQUIDI BIOLOGICI

Alessandro Delitala, Emanuela Azara, Giuseppe Fanciulli, Mauro Marchetti, Giuseppe Delitala (Sassari)

APPRENDIMENTO SCOLASTICO, RISERVA COGNITIVA E RISPOSTA ALLO STRESS DEL BAMBINO: UNA PROSPETTIVA DI RICERCA INTEGRATA NEUROSCIENZE-PEDAGOGIA ED UN DISEGNO SPERIMENTALE PILOTA

Maria Luisa Eboli, Claudio Babiloni e Paolo Maria Ferri (Roma-Milano)

POLIMORFISMI DEL RECETTORE DELLA DOPAMINA D2 E RISPOSTA ALLA TERAPIA CON CABERGOLINA IN PAZIENTI CON ADENOMA IPOFISARIO PROLATTINA SECERNENTE.

Filopanti M, Barbieri AM, Angioni AR, Colao A, Gasco V, Grottoli S, Peri A, Baglioni S, Faustini Fustini M, Pigliaru F, Del Monte P, Borretta G, Ambrosi B, Jaffrain-Rea ML, Gasperi M, Brogioni S, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Lania A, Spada A. (Milano-Firenze)

EFFETTI PROTETTIVI DEL PROGESTERONE E DEI SUOI DERIVATI NELLA NEUROPATIA DIABETICA.

Silvia Giatti, Iliara Roglio, Marzia Pesaresi, Roberto Bianchi, Guido Cavaletti, Luis M. Garcia-Segura, Giuseppe Lauria, Roberto C. Melcangi (Milano-Madrid)

IL PRETRATTAMENTO CON GHRELIN ACILATO ABOLISCE LA RISPOSTA SOMATOTROPA AL GHRH E INIBISCE LE RISPOSTE A GHRH+ARGININA E A GHRELIN STESSO.

Gramaglia Elena, Pomero Elisa, Riganti Fabrizio, Olivetti Iliara, Ramella Valentina, Benso Andrea, Ghigo Ezio, Broglio Fabio (Torino)

STIMOLAZIONE ESTROGENICA E IPEROSMOTICA: EFFETTI SULL'ESPRESSIONE DELLA VASOPRESSINA NEL NUCLEO SUPRAOTTICO DELL'IPOTALAMO.

Daniela Grassi, Miguel Augusto de Amorim, GianCarlo Panzica, Luis Miguel Garcia Segura (Torino-Madrid)

EFFETTI COMPORTAMENTALI DEL KNOCK-OUT CONDIZIONALE DEL RECETTORE Y1 PER IL NEUROPEPTIDE Y NEI NEURONI DELL'ENCEFALO DI TOPO CHE COESPRIMONO I RECETTORI Y1 E Y5.

Angela Longo, Alessandra Oberto, Iliara Bertocchi, Paolo Mele, Paola Palanza, Rolf Sprengel, Carola Eva (Torino, Parma, Heidelberg)

EFFETTI DELL' ESPOSIZIONE AMBIENTALE A XENOESTROGENI SUL
DIFFERENZIAMENTO SESSUALE DEL SISTEMA NERVOSO

Paola Materazzi¹, Francesco Dessì-Fulgheri¹, Leonida Fusani (Firenze-Ferrara)

EFFETTI ORGANIZZAZIONALI DEL BISFENOLO-A SULL'ESPRESSIONE DELLA
KISSPEPTINA NELL'IPOTALAMO DI TOPI CD-1

Désirée Miceli, Isabelle Franceschini, Paola Palanza, GianCarlo Panzica (Tours-Parma-Torino)

STUDIO MULTIGENERAZIONALE DEGLI EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL
METOSSICLORO TRAMITE LA DIETA SUL SISTEMA PARVOCELLULARE A VASOTOCINA
DELLA BOBWHITE QUAIL

Elena Mura, Viola Sacchi, Nikki Thompson, Mary Ann Ottinger, GianCarlo Panzica, Carla Viglietti-
Panzica (Torino-College Park)

EFFETTI PROTETTIVI DEL TESTOSTERONE E DEI SUOI DERIVATI NELLA NEUROPATIA
DIABETICA SPERIMENTALE.

Marzia Pesaresi, Ilaria Roglio, Silvia Giatti, Roberto Bianchi, Guido Cavaletti, Donatella Caruso,
Samuele Scurati, Luis M. Garcia-Segura, Giuseppe Lauria, Roberto C. Melcangi (Milano-Madrid)

NELL'UOMO L'ATTIVITA' GH LIBERATRICE DI GHRELIN E' SENSIBILE AL FEEDBACK
INIBITORIO DI IGF-I MA NON DEL GH STESSO

Elisa Pomerio, Elena Gramaglia, Fabrizio Riganti, Ilaria Olivetti, Barbara Lucatello, Andrea Benso,
Ezio Ghigo, Fabio Broglio (Torino)

STEROIDI NEUROATTIVI E NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA TRAUMA: EFFETTI
PROTETTIVI ESERCITATI DAL PROGESTERONE E DAL DIIDROPROGESTERONE

Ilaria Roglio, Roberto Bianchi, Silvia Giatti, Marzia Pesaresi, Samuele Scurati, Donatella Caruso,
Roberto C. Melcangi (Milano)

Comunicazioni Orali (II) (Chairmans: Paolo Beck-Peccoz - Giancarlo Panzica)**1) EFFETTO MODULATORIO DEI NEUROSTERODI SULL'EPILETTOGENESI IPPOCAMPALILE NEL MODELLO DELLA PILOCARPINA**

Longo D., Baldelli E., Biagini G. (Modena - Reggio Emilia)

2) VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E PERIFERICO ATTRAVERSO LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA: EFFETTO DEL DIABETE.

Samuele Scurati, Ilaria Roglio, Silvia Giatti, Marzia Pesaresi, Donatella Caruso, Roberto C. Melcangi (Milano).

3) ANDROGENI E LEPTINA, MA NON KISSPEPTINA, REGOLANO SINERGICAMENTE L'ESPRESSIONE DI GnRH IN NEUROBLASTI UMANI GnRH-SECERNENTI.

Annamaria Morelli, Rosa Mancina, Benedetta Fibbi, Enrico Silvestrini, Giulia De Vita, Mirca Marini, Gabriella B. Vannelli, Mario Maggi (Firenze).

4) STUDIO DEL RUOLO SVOLTO DAGLI ORMONI GONADICI NELLA MODULAZIONE DEL DOLORE VISCERALE SPERIMENTALE

Ilaria Ceccarelli, Paolo Fiorenzani e Anna Maria Aloisi (Siena)

5) GLI ORMONI TIROIDEI PROMUOVONO LA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE E UP-REGOLANO L'ESPRESSIONE DEL GENE SELADIN-1 IN MODELLI IN VITRO DI PRECURSORI NEURONALI UMANI.

Ilaria Cellai, Susanna Benvenuti, Paola Luciani, Cristiana Deledda, Silvana Baglioni, Riccardo Saccardi, Serena Urbani, Fabio Francini, Roberta Squecco, Corinna Giuliani, Gabriella Barbara Vannelli, Mario Serio, Alessandro Peri (Firenze).

6) ALTERAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO SESSUALE IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE AMBIENTALE A XENOESTROGENI

Leonida Fusani, Daniele Della Seta, Francesco Dessi'-Fulgheri, Francesca Farabollini (Ferrara-Firenze-Siena).

7) LA TRANSIZIONE MENOPAUSALE: UN MILIEU BIOLOGICO-ENDOCRINO CHE PREDISPONE ALLA NEURODEGENERAZIONE.

Marialuisa Giunta, Sara M. Bonomo, Antonello E. Rigamonti, Maria Grazia Gagliano, Eugenio E. Müller, e Silvano G. Cella. (Milano)

LETTURA PLENARIA

Ormoni tiroidei e difetto di rimielinizzazione nella sclerosi multipla: un caso di "non-thyroidal illness syndrome"?

Laura Calzà

ASC-Lab, DIMORFIPA, Università di Bologna

laura.calza@unibo.it

Da molti anni è noto e accettato che il sistema nervoso centrale (SNC) è altamente sensibile all'azione dell'ormone tiroideo, sia nel corso dello sviluppo che nella vita adulta, ma i meccanismi cellulari e molecolari alla base di così profondi effetti non sono ancora chiariti. In particolare, la mielinizzazione del sistema nervoso centrale è un processo strettamente dipendente dagli ormoni tiroidei, sia per la maturazione delle cellule responsabili (oligodendrociti), sia per l'espressione di geni che codificano per le proteine della guaina mielinica. Gli stessi processi che sottendono la mielinizzazione dello sviluppo, sono considerati responsabili nel processo di riparazione della mielina (rimielinizzazione), normalmente assai efficace nel soggetto adulto. Al contrario, uno dei momenti patogenetici ritenuti più importanti nella sclerosi multipla (SM), la più diffusa malattia demielinizzante del SNC, indicato anche come evento chiave nella progressione della disabilità, è l'incapacità di riparare le lesioni demielinizzanti della guaina assonale. La ragione di questo fallimento non è nota, e la ricerca di terapie volte a potenziare questo processo riparativo è un obiettivo primario per la cura della SM.

Obiettivo di questa lettura è illustrare e discutere il razionale che ha portato alla proposta della somministrazione di ormone tiroideo come terapia adiuvante nella SM, al fine di stimolare il processo riparativo della guaina mielinica, basato su studi sperimentali nei modelli animali di malattia generati nel ratto e del primate non umano marmoset comune (*Callithrix jacchus*).

Saranno in particolare trattati:

1. dalla produzione dell'ormone all'azione cellulare sulla cellula rimielinizzante: passaggio della barriera ematoencefalica, deiodinasi tessuto-specifiche, recettori di membrana e nucleari dell'ormone;
2. ormone tiroideo e ri-mielinizzazione: genesi di precursori degli oligodendrociti da neural stem cells; T3 e maturazione del precursore dell'oligodendrocita (OPC) a oligodendrocita; T3 e regolazione dell'espressione di geni mielina-specifici;
3. dis-tiroidismo tissutale in corso di malattia sperimentale

Sulla base dei risultati di pregressi esperimenti nel ratto e recenti esperimenti nel primate, si discuterà l'ipotesi che in corso di MS, ed in particolare nelle fasi più gravi di malattia, si possa creare una situazione di transitorio calo della biodisponibilità dell'ormone attivo, come si configura nella "euthyroid sick syndrome", con il conseguente insuccesso di processi strettamente dipendenti dalla disponibilità di T3. Si discuterà infine come la correzione di questo transitorio ipotiroidismo mediante uno schema di somministrazione dell'ormone tiroideo che non induce ipertiroidismo sposti il rapporto fra demielinizzazione e rimielinizzazione a favore della rimielinizzazione, migliorando anche il quadro clinico di malattia.

- Calzà et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95:3209-3214
- Calzà et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 3258-3263
- Fernandez et al., Eur J Neurosci, 20:2059-2070, 2004
- Fernandez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:16363-16368, 2004
- Calzà et al., Brain Res Review, 48:339-346, 2005
- D'Intino et al., Neurological Res 28:513-7, 2006

COMUNICAZIONI ORALI

EFFETTI COMPORTAMENTALI DEL KNOCK-OUT CONDIZIONALE DEL RECETTORE Y1 PER IL NEUROPEPTIDE Y NEL PROENCEFALO DI TOPO

Ilaria Bertocchi^a, Alessandra Oberto^a, Angela Longo^a, Paolo Mele^a, Paola Palanza^b, Rolf Sprengel^c, Carola Eva^a

a Università di Torino, Dip. Anatomia, Farmacologia e Med.Leg. Laboratorio Prof.ssa Carola Eva

b Università di Parma, Dip. di Biologia Evolutiva e Funzionale

c Max Planck Institute for Medical Research, Heidelberg, Germany

ilaria.bertocchi@unito.it

Il neuropeptide Y (NPY) è uno dei più importanti ed abbondanti neuropeptidi del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico dei mammiferi, dove interagisce con una famiglia di recettori accoppiati a proteine G che include i sottotipi Y1, Y2, Y4, Y5 e y6 (Michel et al., 1998). Fra tutti i recettori per NPY, Y1R è stato particolarmente studiato perché coinvolto nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, della risposta allo stress, dell'assunzione di etanolo, della riproduzione, del comportamento alimentare ed emozionale (Eva et al., 2006).

I risultati ottenuti finora con modelli animali di knock-out germinale per Y1R sono stati utili per alcuni aspetti, ma la strategia dell'inattivazione genica tramite ricombinazione omologa presenta qualche limite, soprattutto riguardo alle influenze dello sviluppo sul fenotipo degli animali. Per questo motivo, per studiare gli effetti della neurotrasmissione NPY-Y1R sul comportamento alimentare ed emozionale dei topi, abbiamo generato un nuovo modello di knock-out condizionale, che consente di evitare i problemi relativi alle influenze dello sviluppo sul fenotipo e all'ablazione del gene in tutto l'organismo (Herzog, 2003). Nel nostro modello, la delezione del recettore Y1 avviene selettivamente in alcuni nuclei del proencefalo e nell'animale adulto, grazie al controllo doxiciclina dipendente della ricombinasi CRE.

Per caratterizzare il fenotipo di questi topi è stato studiato il loro comportamento alimentare e quello emozionale in specifici test comportamentali. Inoltre, dal momento che l'induzione del knock-out condizionale richiede che i cuccioli vengano separati dalla madre naturale e dati in adozione alla nascita, abbiamo utilizzato madri adottive di ceppi diversi (C57 e FVB) per determinare se un diverso comportamento materno potesse influenzare il comportamento emozionale ed alimentare dei topi recanti la delezione del Y1R. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che le diversità tra i vari ceppi murini relative alla cura materna, esercitano una profonda influenza sullo sviluppo e sul comportamento ansioso dei topi (Millstein et al., 2007).

Questo modello di knock-out condizionale dimostra, per la prima volta, che la delezione del Y1R nel topo maschio adulto, intorno a P40, induce una diminuzione significativa del peso corporeo e anche un aumento dell'ansia rilevabile nel test del labirinto sopraelevato. Un altro risultato di interesse che abbiamo ottenuto in questo studio è che il ceppo della mamma adottiva modifica il comportamento emozionale e alimentare sia nei topi controllo che dei topi ko condizionali. Ciò conferma quanto è già stato abbondantemente descritto in bibliografia, e cioè che la cura materna esercita una profonda influenza sul comportamento dell'individuo in età adulta e che queste alterazioni comportamentali sono associate ad alterazioni morfologiche e neurochimiche (Millstein et al., 2007).

ALTERAZIONE DEL COMPORTAMENTO SESSUALE E DEL PROFILO NEUROENDOCRINO IN SEGUITO ALL'ESPOSIZIONE A STRESS SOCIALE CRONICO.

Dadomo Harold¹, Bartolomucci Alessandro¹, Palanza Paola¹, Panzica Giancarlo², Parmigiani Stefano¹.

¹Dipartimento di Biologia Evolutivo e Funzionale, Università degli Studi di Parma. Email: harolddadomo@libero.it

²Dipartimento di Anatomia, farmacologia e medicina forense, Università di Torino.

Nello studio del comportamento sessuale lo status gerarchico dell'individuo diventa, nella maggior parte dei mammiferi, un elemento che discrimina e determina sia l'accesso preferenziale al partner sessuale ma anche alcune caratteristiche del comportamento sessuale stesso come la latenza eiaculatoria o la potenza sessuale. Al contempo sappiamo anche come l'instabilità o la minaccia alla gerarchia di dominanza porti a uno stress sociale che può agire come potente inibitore della risposta sessuale. Lo scopo di questo lavoro quindi è quello di studiare come l'aggressività e la gerarchia di dominanza, all'interno di un modello di stress sociale cronico (Bartolomucci et al., 2005) possano influenzare vari aspetti legati al comportamento riproduttivo nonché neuroendocrino come la latenza eiaculatoria e il comportamento di esplorazione sociale del maschio.

Per questo studio sono stati utilizzati topi maschi alloggiati a coppie, in cui un individuo era residente da almeno una settimana e il secondo veniva introdotto come intruso. La coppia era divisa da una grata per permettere un contatto sensoriale continuo, ma non una piena interazione. Questa grata veniva in seguito tolta per 10 minuti al giorno. Questo portava a un'interazione aggressiva che permetteva di raggiungere una gerarchia di dominanza-sottomissione stabile nella diade. Dopo le 4 settimane ogni soggetto è stato sottoposto a un test sessuale in una cassetta in plexiglass trasparente con una femmina in estro e successivamente registrato per 30 minuti con due telecamere poste sia sopra che sotto la cassetta; per permettere di osservare tutte le fasi del comportamento sociale e sessuale e in particolare la durata della penetrazione e la latenza di eiaculazione. La nostra ipotesi è che i maschi socialmente subordinati infatti in seguito a numerose sconfitte comincino a mostrare importanti modificazioni sia a livello fisiologico, endocrino, immunitario che più specificatamente nel comportamento sessuale; che si traduce in una riduzione della latenza eiaculatoria, e dei tentativi di monta. Si ritiene che questo effetto a livello del comportamento sessuale, in questa specie, risulti adattativo in quanto limita l'esposizione del soggetto al rischio che potrebbe incorrere, nell'ambiente naturale, all'aggressione continua del maschio dominante e che al contempo permetta quindi di massimizzare i tentativi di monta alle situazioni meno rischiose. I risultati preliminari mostrano infatti come i soggetti non siano stati interessati in egual maniera dalla situazione sperimentale e come alcuni correlati neuroendocrini sostengano queste osservazioni, a prova di come la risposta a lungo termine allo stress sociale cronico possa essere modulato in maniera differenziale da una variabile interindividuale come la gerarchia di dominanza.

Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(1):67-81.

IL RECETTORE DEGLI ANDROGENI È NECESSARIO PER LA COMPLETA MASCOLINIZZAZIONE DEL SISTEMA NITRINERGICO E DEL SISTEMA VASOPRESSINERGICO DEL RATTO

Mariangela Martini¹, Francesca Allieri¹, Gabriele Di Sante¹, Giada Spigolon¹, Helena Pinos², Antonio Guillamón², Paloma Collado², Carla Viglietti-Panzica¹, GianCarlo Panzica¹

¹Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino, Italia; ²Dipartimento di Psicobiologia, UNED, Madrid, Spagna

I dimorfismi sessuali cerebrali dipendono in larga parte dagli effetti organizzazionali legati all'esposizione precoce dei circuiti cerebrali agli steroidi gonadici, in particolare, si ritiene che l'estradiolo (E2) prodotto localmente tramite l'aromatizzazione del testosterone (T) svolga un ruolo primario. Tuttavia, alcuni recenti studi sembrano indicare che anche gli androgeni possano contribuire al processo di differenziazione sessuale di alcuni circuiti. Per comprendere quale possa essere questo ruolo, abbiamo utilizzato, in questo studio, ratti mutanti Tfm (*testicular feminization mutation*) che sono caratterizzati dalla presenza di un recettore degli androgeni non funzionante. In particolare abbiamo studiato, con tecniche di localizzazione immunocitochimica e di analisi di immagine, la distribuzione del sistema produttore di ossido di azoto (NO), tramite la identificazione della sintasi del NO (NOS) e di arginin-vasopressina (AVP) in animali Tfm o controlli di entrambi i sessi.

Il sistema a NOS è ben sviluppato in vari nuclei ipotalamici e limbici come i nuclei preottico mediale (POM), paraventricolare (PVN), arcuato (ARC), ventromediale (VMN) e della stria terminale (BST), e la sua espressione può essere sessualmente dimorfica (POM, VMN e BST) e regolata nell'adulto dai livelli di ormoni gonadici circolanti. Il sistema a AVP è costituito da una parte magnocellulare ed una parvocellulare. Quest'ultima, localizzata nel BST, nell'amigdala mediale (AMY) e nel setto laterale (SL), è sessualmente dimorfica e sensibile all'azione esercitata dagli steroidi gonadici. In entrambi i casi il dimorfismo risulta da una maggiore presenza di cellule positive o di fibre immunoreattive nel maschio rispetto alla femmina.

Per quanto riguarda il sistema a NOS, nei ratti maschi Tfm abbiamo osservato una significativa diminuzione degli elementi positivi nel VMN e nel BST (demascolinizzazione del sistema), mentre nelle femmine abbiamo osservato un significativo aumento delle cellule positive nel BST (mascolinizzazione). Per quanto riguarda il sistema a AVP i ratti maschi Tfm presentano un significativo decremento dell'immunoreattività sia nel BST, sia nel AMY (demascolinizzazione del sistema), mentre non abbiamo osservato effetti nelle femmine. In studi precedenti abbiamo dimostrato che il differenziamento del sistema ad AVP del BST/AMY non dipende dalla presenza di estrogeni, infatti topi knock out per l'enzima aromatasi (incapaci quindi di sintetizzare E2) hanno un sistema ad AVP normale, quando venga loro somministrato E2 da adulti.

I dati ottenuti nei ratti Tfm, indicano che, contrariamente alle opinioni correnti, gli androgeni possono giocare un ruolo assai importante nel differenziamento e nel funzionamento di alcuni sistemi cerebrali sessualmente dimorfici, in particolare del sistema a NOS nel BST e nel VMN e del sistema a AVP nel BST e nel AMY. L'alterazione dello sviluppo di questi sistemi neuronali si riflette poi negli elevati deficit comportamentali presenti in questi animali.

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato eseguito con il contributo del MIUR (PRIN, 2006, GCP) e dell'Università di Torino (GCP, CVP).

IL GnRH ED IL SUO ANALOGO LEUPROLIDE ACETATO MODULANO L'ESPRESSIONE DI SELADIN-1/DHCR24 IN MODELLI CELLULARI NEURONALI.

Rosati Fabiana¹, Cungi Chiara¹, Galbiati Mariarita², Maggi Roberto², Morello Matteo¹, Sturli Niccolò¹, Vannelli B. Gabriella³, Luciani Paola¹, Benvenuti Susanna¹, Peri Alessandro¹, Serio Mario¹, Danza Giovanna¹.

1.Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, sezione di endocrinologia, Università di Firenze; 2.Istituto di Endocrinologia, Università degli Studi di Milano, 3.Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Forense, Università di Firenze. mail:f.rosati@dfc.unifi.it

È noto che la variazione di tutti gli ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi conseguente alla menopausa/andropausa è coinvolta nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD). Gli steroidi sessuali, ed in particolare gli estrogeni, possiedono effetti neuroprotettivi; essi modulano la produzione della beta-amiloide, il cui accumulo ha un ruolo chiave nella patogenesi dell'AD, e sembrano contrastare i processi infiammatori e lo stress ossidativo (Barron AM et al. 2006). La diminuzione dei livelli di ormoni sessuali che si riscontra nella menopausa sembra quindi correlata con la maggiore suscettibilità ai fenomeni neurodegenerativi tipici dell'AD. Recentemente è stato inoltre ipotizzato che gli elevati livelli di LH che si riscontrano nella menopausa-andropausa abbiano potenziali effetti neurodegenerativi. Infatti, in soggetti affetti da AD sono stati riscontrati livelli di LH maggiori rispetto ai controlli sani sia nel siero sia nelle aree cerebrali maggiormente colpite da questa patologia (Bowen RL et al 2002, Webber KM et al 2006).

Di recente abbiamo dimostrato che gli estrogeni up-regolano l'espressione di seladin-1 (Selective Alzheimer disease indicator 1) (Benvenuti S. et al 2005), un gene down-regolato nelle aree cerebrali colpite dall'AD. Esperimenti di silenziamento genico hanno indicato che seladin-1 è il mediatore dell'effetto neuro protettivo degli estrogeni. Seladin-1 è identico a DHCR24, l'enzima che catalizza l'ultima tappa biosintetica del colesterolo. Esso modula il colesterolo della membrana e l'organizzazione dei lipid rafts, microdomini di membrana che hanno un ruolo primario nella regolazione di importanti processi cellulari e di trasduzione del segnale (Cramer et al, 2006). La secrezione di GnRH aumenta nell'anziano ma il ruolo del GnRH nella patogenesi dell'AD è poco investigato, nonostante siano in atto trials clinici per stabilire il ruolo degli agonisti del GnRH nel migliorare i parametri cognitivi nell'AD. Oltre che nelle cellule gonadotrope i recettori per il GnRH (GnRH-R) sono localizzati in altre aree cerebrali e recenti dati di letteratura indicano come il GnRH stimoli la produzione di LH in cellule di neuroblastoma umano M17 (Wilson AC et al., 2006). Nelle stesse cellule LH incrementa l'espressione di StAR protein e la produzione di pregnenolone (Liu T et al., 2007).

In modelli cellulari murini di cellule GnRH secernenti (Gn11 e GT1-7) abbiamo riscontrato differenti livelli di espressione di seladin-1/DHCR-24. Le cellule GT1-7, che producono elevate quantità di GnRH, hanno livelli maggiori di mRNA di seladin-1/DHCR24 rispetto alle Gn11 che producono basse quantità di GnRH. Questo dato preliminare suggerisce che ci possa essere una correlazione tra l'espressione di seladin-1/DHCR-24 e i livelli di GnRH. Abbiamo quindi ritenuto interessante analizzare l'espressione di seladin-1/DHCR24 dopo stimolo con GnRH o con LH in due modelli cellulari umani: la linea di neuroblastoma SH-SY5Y ed una coltura a lungo termine di neuroblasti umani fetali GnRH-secernenti (FNC). Sia nelle SH-SY5Y sia nelle FNC il GnRH 1 nM a tempi brevi (90 min) up-regola seladin-1/DHCR24 mentre la dose 1µM lo down-regola. La up-regolazione di seladin-1/DHCR24 a basse concentrazioni e a tempi brevi da parte del GnRH potrebbe rappresentare una spinta alla steroidogenesi nel neurone. Nelle SH-SY5Y l'effetto del GnRH 1µM si accompagna anche alla down-regolazione del GnRH-R a tempi brevi. Il trattamento delle cellule SH-SY5Y con GnRH 1µM a tempi più lunghi (24 ore) provoca invece una up-regolazione del gene. Oltre al GnRH anche il suo agonista Leuprolide acetato è in grado di up-regolare seladin-1/DHCR-24 alla concentrazione 1 µM dopo 24 ore e questo dato potrebbe supportare l'ipotesi di un ruolo neuroprotettivo per questa molecola indicando un meccanismo aggiuntivo a quello della diminuzione di LH. Dati preliminari indicano invece che l'LH (10-100 mIU/mL per 24 ore) non ha effetto sull'espressione di seladin-1/DHCR-24. Infine, i nostri dati dimostrano per la prima volta la presenza di StAR, di LH e del suo recettore (LH-R) in entrambe le linee cellulari. Inoltre, risultati preliminari indicano che StAR è up-regolata dal trattamento con GnRH 1 nM mentre risulta down-regolata alla concentrazione 1 µM. Questi dati suggeriscono che la steroidogenesi neuronale possa avere un ruolo nelle patologie neurodegenerative.

Nel loro insieme, i dati riportati ci indicano che il GnRH è in grado di modulare un gene neuroprotettivo in modelli neuronali umani e suggeriscono che possa influire sull'assetto lipidico della membrana e sulla funzionalità neuronale.

INTRACELLULAR TRAFFICKING OF THE HUMAN OXYTOCIN RECEPTOR IN HEK293 CELLS: EVIDENCE OF RECEPTOR RECYCLING VIA A RAB4/RAB5 “SHORT CYCLE”.

Francesca Conti¹⁾, Sara Sertich¹⁾, Alessandra Reversi¹⁾²⁾, Bice Chini¹⁾²⁾

¹⁾ CNR Institute of Neuroscience, via Vanvitelli 32, 20129 Milan, Italy

²⁾ Dept. of Pharmacology, University of Milan, via Vanvitelli 32, Milan, Italy

E-mail F.conti@in.cnr.it

As with most G-protein coupled receptors, agonist stimulation of the human oxytocin receptor (OTR) results in its desensitization and internalization. The subsequent intracellular trafficking of the receptor, which is crucial to re-establish agonist responsiveness, is far well understood. Here, we examined the cellular processes mediating OTR resensitization in HEK293 cells stably expressing the human OTR. Upon agonist activation, the receptor is almost completely sequestered inside intracellular compartments that are not labelled by lysosomal markers, indicating that the internalized receptor is not sorted to these degradative organelles. Binding and fluorescence assays performed in order to monitor and quantify the re-appearance of OTR at the cell surface indicate that after 4 hours almost 85% of receptors were again present at the cell surface; at this time, cell responsivity to the agonist was also completely restored, as shown by measuring PLC activation. Similar results were also obtained in presence cycloeximide, an inhibitor protein synthesis, indicating that receptor recycling and not de novo receptor synthesis is responsible for resensitization. The receptor recycling pathways were then investigated. Our data indicate that the OTR localize in vesicles that also contain the small GTPases Rab5 and Rab4, which are markers of the “short cycle”, while no colocalization is observed between the receptor and Rab11, a marker of the “long cycle”. In conclusion, our data indicate that the human OTR, despite being previously classified as a slowly or non recycling receptor on the basis of its stable association with β -arrestin, is indeed capable of a very efficient and complete resensitization due to receptor recycling via the “short cycle”. We are currently investigating OTR resensitization by receptor recycling in native tissues in order to understand its role in normal and pathological conditions.

IL COUPLING CON LE PROTEINE G E L'INIBIZIONE DELL'ADENILATO CICLASI SONO MEDIATE DAL DRY MOTIF LOCALIZZATO NEL SECONDO LOOP DEL RECETTORE SST5

Erika Peverelli, Giovanna Mantovani, Sara Bondioni, Paolo Beck-Peccoz, Andrea Lania, Anna Spada
Dipartimento di Scienze Mediche, U.O. di Endocrinologia, Università di Milano, Fondazione Ospedale Maggiore IRCCS

L'effetto inibitorio della somatostatina sulla secrezione ormonale e sulla proliferazione cellulare è mediato dall'attivazione di 5 recettori specifici (SST1-SST5) accoppiati alle proteine G. I domini recettoriali coinvolti in tale interazione non sono stati ancora chiaramente identificati. Poiché la somatostatina è il peptide ipotalamico che fisiologicamente inibisce la secrezione di GH, abbiamo voluto studiare i determinanti molecolari che mediano l'interazione dell'SST5 con le proteine G e pertanto coinvolti nell'attivazione del signaling intracellulare dopo stimolo con BIM23206 (l'agonista dell'SST con maggiore affinità per SST5) nella linea ipofisaria di ratto GH3. In numerosi GPCR le regioni principalmente coinvolte nella trasduzione del segnale intracellulare sono il secondo e il terzo loop intracellulare (i2 e i3). Al fine di valutare la rilevanza di queste regioni nell'SST5, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul DRY motif (Asp-Arg-Tyr, localizzato nel loop i2) e sul dominio BBXXB (localizzato nel loop i3). Abbiamo quindi introdotto mutazioni nell'SST5 sostituendo i residui D¹³⁶ e R¹³⁷ nel DRY motif con una Ala, ed abbiamo utilizzato un mutante naturale (R240W) precedentemente identificato in un paziente acromegalico resistente al trattamento con analoghi della somatostatina in cui tale mutazione va ad alterare il dominio BBXXB. La sostituzione dei residui D¹³⁶ e R¹³⁷ nel DRY motif induce la marcata riduzione dell'effetto inibitorio del BIM23206 sull'adenilato ciclasi (inibizione massima 15% vs 53.4% dei wt). La sostituzione del residuo R²⁴⁰ localizzato del dominio BBXXB non si associa invece a significative modificazioni dell'effetto inibitorio dell'analogo superselettivo della somatostatina sull'adenilato ciclasi (inibizione 50.5% vs 53.4% dei wt). In tale mutante, tuttavia, il pre-trattamento con l'agonista non induce il fenomeno di desensitizzazione come osservato invece nelle cellule GH3 transfettate con il recettore wt. I nostri dati suggeriscono quindi che il dominio BBXXB non riveste un ruolo cruciale nel mediare l'attivazione della proteina G mentre sembra essere coinvolto nel mediare i processi di desensitizzazione. Il DRY motif localizzato nel secondo loop è invece fondamentale per consentire la corretta interazione con le proteine G e l'inibizione dell'adenilato ciclasi.

Presentatore: Erika Peverelli, Dipartimento di Scienze Mediche, U.O. di Endocrinologia, Università di Milano, Fondazione Ospedale Maggiore IRCCS
Mail: erika.peverelli@unimi.it

Effetti proliferativi e protettivi di ghrelina e del suo analogo hexarelina su cellule progenitrici ippocampali di ratto adulto.

¹Silvia Destefanis, ³Inger Johansson, ²Riccarda Granata, ³Jorgen Isgaard, ²Ezio Ghigo, ¹Giampiero Muccioli.

silvia.destefanis@unito.it

¹Laboratorio di di Farmacologia e Terapia Sperimentale, Divisione di Farmacologia Medica, Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale; ²Laboratorio di Endocrinologia Molecolare, Divisione di Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Torino, Torino, Italia, ³Laboratory of Experimental Endocrinology, Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy at the University of Göteborg, Sweden.

La presenza di cellule progenitrici nella zona subgranulare dell'ippocampo riveste un ruolo importante nei processi rigenerativi del sistema nervoso centrale dell'adulto per la capacità di queste cellule di differenziare in senso neuronale [Gage et al, 1998]. L'espressione del recettore di ghrelina (GHS-R1a) e di alcuni peptidi ghrelino-mimetici di sintesi (hexarelina), noti anche con il nome di di GH secretagoghi (GHS), è stata dimostrata in diverse aree del sistema nervoso centrale ed in particolare nell'ippocampo, dove ghrelina ed i suoi analoghi esercitano effetti neuroprotettivi e nootropi [Brywe et al, 2005, Diano et al, 2006]. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare se ghrelina, nella sua forma nativa acilata, ed il suo analogo hexarelina fossero in grado di stimolare la proliferazione cellulare e/o di esercitare effetti protettivi su cellule progenitrici di ippocampo di ratto adulto (linea cellulare AHP). I risultati ottenuti hanno documentato che ghrelina, ed in modo particolare hexarelina stimolano in maniera dose-dipendente la proliferazione cellulare ed aumentano la vitalità delle cellule AHP. Inoltre, hexarelina, ma non ghrelina, riduce sia l'apoptosi indotta da privazione di nutrienti, (riduzione dei marcatori apoptotici quali annessina V e attività di caspasi 3), sia la necrosi cellulare valutata come rilascio di lattato deidrogenasi nel medium di coltura. Gli effetti citoprotettivi di hexarelina sembrano coinvolgere l'attivazione della via di trasduzione intracellulare mitogen-activated protein kinasica (MAPK) e della PI3K/Akt. Diversamente da hexarelina, ghrelina attiva soltanto la via MAPK. L'analisi dell'espressione dell'mRNA per il recettore GHS-R1a è risultata negativa nelle cellule AHP. Tuttavia, studi di binding radiorecettoriale con [¹²⁵I-Tyr-Ala]-hexarelina hanno rivelato l'esistenza di siti di legame saturabili per hexarelina, per ghrelina, ma non per ghrelina non-acilata, una forma circolante del polipeptide inattiva negli studi di proliferazione e apoptosi delle cellule AHP. In conclusione, i nostri risultati indicano che ghrelina ed il suo analogo di sintesi hexarelina hanno un effetto proliferativo e protettivo sulle cellule progenitrici ippocampali di ratto adulto, suggerendo che queste attività possano essere mediate da un recettore, non ancora identificato, distinto dal GHS-R1a.

References

1. Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J 1998 Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* 36:249-266
2. Brywe KG, Leverin AL, Gustavsson M, Mallard C, Granata R, Destefanis S, Volante M, Hagberg H, Ghigo E, Isgaard J 2005 Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *Endocrinology* 146:4665-4672
3. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschop MH, Horvath TL 2006 Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 9:381-388

EFFETTI ENDOCRINO-METABOLICI DEGLI ANTIPSICOTICI ATIPICI

Giovanni Tulipano, Michela Giovannini, Dario Zanetti, Daniela Cocchi

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, sezione di Farmacologia e Tossicologia Sperimentale, Università degli Studi di Brescia. tulipano@med.unibs.it

Clozapina e olanzapina, farmaci efficaci nella cura della schizofrenia, possono determinare un incremento significativo del peso corporeo, iperlipidemia e insorgenza di diabete mellito insulino-resistente. È possibile che la somministrazione di clozapina e olanzapina aggravi un quadro endocrino-metabolico già alterato nel paziente schizofrenico e non del tutto caratterizzato. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di sviluppare modelli preclinici atti a studiare i meccanismi associati all'effetto diabetogeno di clozapina e olanzapina.

A questo proposito, abbiamo studiato nel ratto Sprague-Dawley gli effetti della somministrazione di clozapina sull'assunzione di cibo, l'incremento del peso corporeo, la tolleranza al carico di glucosio e la secrezione insulinica basale e in risposta al glucosio. Abbiamo analizzato, inoltre, gli effetti del farmaco sulla secrezione di corticosterone e sull'espressione degli enzimi 11- β -HSD-1 e PEPCK a livello epatico. In colture di mioblasti murini (C2C12), abbiamo studiato gli effetti di clozapina e olanzapina sul trasporto di glucosio, la proliferazione e il differenziamento cellulare e approfondito, in particolare, gli effetti dei farmaci sulla risposta cellulare all'insulina.

Nel ratto, la somministrazione di clozapina ha determinato un aumento della glicemia basale e una ridotta tolleranza al carico di glucosio associata a iperinsulinemia; non si sono osservate variazioni significative del consumo di cibo e del peso corporeo. La somministrazione del farmaco causava una marcata stimolazione della secrezione di corticosterone. Il pretrattamento dei ratti con RU486, antagonista del recettore dei glucocorticoidi, contrastava l'effetto iperglicemizzante acuto della clozapina. Il trattamento cronico con clozapina ha indotto un aumento dell'espressione di 11- β -HSD-1 e PEPCK a livello epatico.

Gli studi condotti in colture di miotubi murini, non hanno evidenziato un effetto inibitorio diretto di clozapina sul trasporto di glucosio basale o indotto da insulina. Clozapina contrastava l'induzione del trasporto di glucosio mediata dall'agonista serotoninergico, α -metil-5-HT. Diversamente da clozapina, olanzapina stimolava l'assunzione di glucosio nei mioblasti in coltura in modo dose-dipendente e risultava più potente della stessa α -metil-5-HT (dose minima efficace: 2 μ M olanzapina contro 10 μ M α -metil-5-HT). La somministrazione simultanea di α -metil-5-HT e olanzapina non determinava un ulteriore aumento dell'assunzione di glucosio rispetto all'effetto della sola olanzapina; al contrario, insulina e olanzapina manifestavano un effetto additivo. Sia insulina che olanzapina inducevano un incremento dei livelli di trasportatore del glucosio GLUT4 nella membrana plasmatica esterna senza variare il contenuto totale cellulare di GLUT4. L'induzione del trasporto di glucosio da parte di insulina era correlata all'aumento dei livelli di fosforilazione della chinasi Akt/PKB ed era bloccata da wortmannin, inibitore di fosfoinositide-3 chinasi (PI3K). L'olanzapina non determinava variazioni nello stato di fosforilazione di Akt e il suo effetto non era inibito significativamente da wortmannin. L'induzione dell'assunzione di glucosio in colture di mioblasti murini da parte di olanzapina, per quanto il meccanismo non sia stato chiarito, può considerarsi rilevante sul piano farmacologico in quanto è stato provato che, al contrario di clozapina, olanzapina induce un aumento dell'assunzione di cibo nei roditori e tale effetto è preceduto da una diminuzione del glucosio e dell'insulina plasmatica (Albaugh VL, Obesity 14: 36-50, 2006).

Olanzapina e clozapina riducevano l'incorporazione di timidina triziata da parte di mioblasti in attiva proliferazione (dose minima efficace: 20 μ M). L'osservazione al microscopio, gli studi di incorporazione di L-tirosina radiomarcata e quelli di frammentazione del DNA (DNA laddering), non hanno evidenziato effetti avversi dei due farmaci sul differenziamento dei mioblasti giunti a confluenza e sulla crescita e vitalità dei miotubi differenziati.

EFFETTO MODULATORIO DEI NEUROSTERODI SULL'EPILETTOGENESI IPOCAMPALE NEL MODELLO DELLA PILOCARPINA

Longo D., Baldelli E., Biagini G.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, via Campi 287, 41100 Modena. E-mail: danylong@virgilio.it

La conversione del colesterolo in pregnenolone, ad opera dell'enzima staccante la catena laterale del colesterolo associato al citocromo P450 (P450scc), costituisce la reazione limitante nella via biosintetica degli steroidi prodotti nel tessuto nervoso (neurosteroidi). I neurosteroidi giocano diversi ruoli nel sistema nervoso centrale, tra i quali si annoverano la regolazione della crescita e mielinizzazione assonale, la sinaptogenesi e, in generale, il trofismo neuronale. Inoltre, i neurosteroidi modulano vie neurotrasmettitoriali come quella GABAergica, potenziando le correnti postsinaptiche inibitorie mediate dai recettori GABA-A che, nel caso di crisi epilettiche di tipo motorio, svolgono un ruolo di controllo sull'attività neuronale sincrona. La classe principale di cellule in cui sono sintetizzati i neurosteroidi è la glia, in particolare gli astrociti. Queste cellule sono attivate in seguito ad eventi lesivi del tessuto nervoso, tra i quali lo stato epilettico (SE). Questa condizione potrebbe indurre attivazione astrocitaria, incremento nella produzione di neurosteroidi e facilitazione nell'attività dei sistemi inibitori centrali; non vi sono, al momento, studi volti a caratterizzare tale concatenazione di eventi. L'epilessia del lobo temporale (TLE) associata a sclerosi ippocampale è caratterizzata dalla presenza di gliosi reattiva. I modelli animali di TLE sono, anch'essi, caratterizzati dall'induzione di ipertrofia astrocitaria. La reattività gliale è particolarmente evidente nell'intervallo di tempo che segue immediatamente lo SE e potrebbe essere responsabile di un incremento nella sintesi dei neurosteroidi proprio durante la cosiddetta fase di latenza dell'epilettogenesi, ossia nel periodo che separa lo SE dalla comparsa di crisi epilettiche spontanee. Per questa ragione, abbiamo voluto studiare le possibili variazioni nella via di sintesi dei neurosteroidi in rapporto all'epilettogenesi nel modello di TLE basato sulla somministrazione di pilocarpina. Sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley maschi di 8 e 3 settimane d'età, nei quali è stato indotto SE della durata di 90 minuti. In questi animali, abbiamo caratterizzato la reazione gliale utilizzando un anticorpo contro l'enzima P450scc. In esperimenti successivi, gli stessi gruppi di animali sono stati trattati con l'inibitore dell'enzima 5 α -reduttasi (della via di sintesi dei neurosteroidi) finasteride (100 mg/kg s.c.) o il solvente del farmaco. Durante il trattamento, abbiamo monitorato la comparsa di crisi motorie generalizzate spontanee, e valutato la durata del periodo di latenza. Abbiamo osservato un incremento nell'immunoreattività per l'enzima P450scc in varie regioni della formazione ippocampale (le aree CA1-2, CA3, il giro dentato, il subiculum e la corteccia entorinale) ed in aree extraippocampali (amigdala, neocorteccia). Tale incremento è risultato essere significativamente ($p < 0,01$) maggiore nei ratti giovani (3 settimane di vita) rispetto a quelli adulti (8 settimane) che, invece, hanno presentato variazioni nei livelli di P450scc molto contenute. Inoltre, il periodo di latenza è risultato essere più lungo nei ratti giovani. La somministrazione di finasteride non ha influenzato la latenza nella comparsa di crisi epilettiche generalizzate nei ratti adulti, mentre ha causato la comparsa di crisi precoci in circa la metà dei ratti giovani ($p < 0,01$). Questi risultati sono apparsi in linea con dati precedentemente pubblicati, nei quali abbiamo dimostrato una correlazione inversa fra comparsa di crisi epilettiche ed induzione di P450scc (1). Inoltre, hanno dimostrato che la riduzione del periodo di latenza da parte della finasteride dipende dalla presenza di una significativa induzione dell'enzima P450scc. In conclusione, l'enzima P450scc è indotto negli astrociti in molte regioni ippocampali a seguito del danno da SE. L'utilizzo di farmaci che interferiscano con la sintesi delle molecole steroidee sembra accelerare la comparsa delle crisi spontanee anche negli animali che non abbiano ancora raggiunto la maturità sessuale. Questi dati suggeriscono che i neurosteroidi possano modulare l'epilettogenesi nella TLE.

- (1) Biagini G., Baldelli E., Longo D., Pradelli L., Zini I., Rogawski M.A., Avoli M. (2006) Endogenous neurosteroids modulate epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 201: 519-24.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E PERIFERICO ATTRAVERSO LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA: EFFETTO DEL DIABETE

Samuele Scurati^{#1}, Ilaria Roglio², Silvia Giatti², Marzia Pesaresi², Donatella Caruso¹, Roberto C. Melcangi²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Italia, samuele.scurati@unimi.it; ²Istituto di Endocrinologia e Centro di Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Università degli Studi di Milano, Italia.

Il sistema nervoso è un organo bersaglio per gli effetti fisiologici e protettivi degli steroidi neuroattivi (Melcangi et al., 2007). Di conseguenza, la valutazione dei livelli di tali steroidi nelle strutture nervose durante condizioni fisiologiche e patologiche ha un'importante priorità in campo biomedico. A questo scopo, è stato da noi sviluppato un metodo basato sulla cromatografia in fase liquida accoppiato alla spettrometria di tandem massa (LC-MS/MS) per l'identificazione e la quantificazione di pregnenolone (PREG), progesterone (PROG), diidroprogesterone (DHP), tetraidroprogesterone (THP), testosterone (T), diidrotestosterone (DHT), 5 α -androstano-3 α ,17 β -diolo (3 α -diolo), 17 α - e 17 β - estradiolo (17 α -E e 17 β -E). Dopo validazione, il metodo è stato applicato per la determinazione dei livelli di steroidi neuroattivi nel sistema nervoso centrale (corteccia cerebrale, cervelletto e midollo spinale) e periferico (nervo brachiale) di ratti controllo e diabetici. I dati da noi ottenuti (Caruso et al., 2007) hanno mostrato che negli animali controllo, solo il nervo brachiale presenta livelli determinabili di tutti gli steroidi da noi considerati. Al contrario, sono risultati al di sotto dei limiti di determinazione il 17 α -E nel cervelletto, il 17 α -E, 17 β -E, DHP e THP nella corteccia, ed il 17 α -E, 17 β -E, DHP nel midollo spinale. Il diabete, indotto attraverso una singola iniezione di streptozotocina, è in grado di influenzare in maniera marcata i livelli di alcuni steroidi neuroattivi. In particolare, i livelli di PREG, PROG e T nel cervelletto, di PROG, T e 3 α -diolo nella corteccia, di PROG, DHT e 3 α -diolo nel midollo spinale e di PREG, DHP, THP, T, DHT e 3 α -diolo nel nervo brachiale sono risultati significativamente più bassi se confrontati con i corrispettivi controlli.

In conclusione, i dati qui riportati dimostrano che il metodo LC-MS/MS da noi sviluppato permette la valutazione di steroidi neuroattivi nel sistema nervoso con elevata sensibilità e specificità, inoltre è stato dimostrato che il diabete è in grado di influenzare in maniera significativa i livelli tissutali degli steroidi neuroattivi. Queste osservazioni costituiscono un importante background per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la neuropatia diabetica basate sugli steroidi neuroattivi.

(PRIN-2005060584_004 e FIRST dell'Università degli Studi di Milano).

Caruso D., Scurati S., Maschi O., De Angelis L., Roglio I., Giatti S., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochem. Intern.* 2007, doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.004

Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., Mensah-Nyagan A.G. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, doi: 10.1007/s00018-007-7403-5

ANDROGENI E LEPTINA, MA NON KISSPEPTINA, REGOLANO SINERGICAMENTE L'ESPRESSIONE DI GnRH IN NEUROBLASTI UMANI GnRH-SECERNENTI.

Annamaria Morelli¹, Rosa Mancina¹, Benedetta Fibbi¹, Enrico Silvestrini¹, Giulia De Vita¹, Mirca Marini², Gabriella B. Vannelli², Mario Maggi¹

¹Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Andrologia, ²Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale, Università degli Studi di Firenze.

In un precedente studio in neuroblasti fetali umani GnRH-secernenti, le cellule FNC-B4, abbiamo osservato che androgeni e leptina sono i principali regolatori dell'espressione genica e proteica di kisspeptina e del suo recettore GPR54, che rappresentano un sistema cruciale, attivo a livello ipotalamico, per l'attivazione dell'asse neuroendocrino riproduttivo. In questo studio abbiamo voluto valutare l'azione di kisspeptina, androgeni e leptina sull'espressione quantitativa di GnRH nelle stesse cellule. Il trattamento per 24 ore con kisspeptina induceva un'incremento del GnRH liberato nel mezzo di coltura, ma non variazioni dell'espressione genica. Al contrario, il DHT (24 ore), in modo dose-dipendente, faceva raddoppiare ($p < 0.01$) l'espressione genica del GnRH, con effetto significativo ($p < 0.05$) sin dalla dose 10 pM. Esposizioni più protratte (48 ore) di DHT determinavano lo stesso effetto stimolatorio. Analogamente, il trattamento con 1 nM di leptina (24 ore) faceva aumentare l'espressione di GnRH (3 volte, $p < 0.01$), ma tale effetto stimolatorio veniva perso per tempi più prolungati, molto probabilmente a causa della down-regolazione dell'espressione genica del recettore per leptina, osservato nelle cellule FNC-B4 in seguito a trattamento cronico (48 ore) con leptina (decremento maggiore del 50%, $p < 0.05$). Questi ultimi effetti non sono stati osservati quando le cellule venivano pre-trattate con DHT, il quale stabilizzava la risposta alla leptina anche a 48 ore impedendo la down-regolazione del suo recettore. In conclusione, sia gli androgeni che la leptina stimolano l'espressione genica di GnRH in neuroblasti fetali umani, ma l'effetto della leptina è transiente se non sono presenti simultaneamente adeguati livelli di androgeni. I nostri dati sono importanti perché possono rappresentare un modello cellulare per capire i determinanti dell'aumento della produzione di GnRH che avviene alla pubertà. Un aumento dei segnali provenienti dalle riserve energetiche (di cui la leptina è un prototipo) può non essere sufficiente se il testicolo ed il surrene non sono pronti (adrenarca).

STUDIO DEL RUOLO SVOLTO DAGLI ORMONI GONADICI NELLA MODULAZIONE DEL DOLORE VISCERALE SPERIMENTALE

Ilaria Ceccarelli, Paolo Fiorenzani e Anna Maria Aloisi

Dipartimento di Fisiologia, Sez. Neuroscienze e Fisiologia Applicata, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia. E-mail: iceccarelli@unisi.it

Studi epidemiologici compiuti su ampi strati della popolazione generale e clinica documentano una maggiore prevalenza nelle donne rispetto agli uomini di sindromi dolorose croniche cosiddette "benigne", inoltre le donne lamentano dolori più intensi, più frequenti e più prolungati nel tempo, un maggior numero di aree o siti dolorosi e un maggior consumo di analgesici da banco (Berkley, 1997, Fillingim, 2001).

Il dimorfismo sessuale presente nelle risposte ad uno stimolo doloroso, ha promosso una serie di studi per chiarire il ruolo svolto dagli ormoni gonadici sul sistema nervoso centrale e in particolare sulle strutture coinvolte nelle funzioni cognitive.

La calcolosi ureterale animale è un modello che simula la condizione clinica del calcolo ureterale. I ratti con calcoli presentano, infatti, sia segni di dolore viscerale diretto (crisi ripetute comportamentali, considerate equivalenti delle coliche ureterali) ed iperalgesia riferita dei muscoli obliqui ipsilaterali (gli stessi muscoli coinvolti nel paziente con coliche), con un rapporto lineare diretto tra l'entità dell'iperalgesia e il numero di "crisi ureterali" (Giamberardino et al., 1995).

Sebbene estremamente frequenti nella clinica convenzionale, i fenomeni di dolore viscerale sono ancora oggi non completamente conosciuti: soprattutto per quel che riguarda i meccanismi fisiopatologici della iperalgesia riferita (Cervero, 1995).

Per questi motivi abbiamo voluto valutare, in ratti maschi e femmine, il ruolo svolto dagli ormoni gonadici nella modulazione del dolore. Per far questo a ratti maschi e femmine, sono stati somministrati per via sottocutanea, quantità sopra fisiologiche di Testosterone Propionato (5mg/Kg peso corporeo) o 17 beta-estradiolo (50µg/Kg peso corporeo) o olio di mandorle dolci (veicolo) per 5 giorni: dai due giorni precedenti all'intervento chirurgico ai due giorni seguenti l'intervento. Il terzo giorno, oltre alla somministrazione degli ormoni, tutti gli animali sono stati divisi nel gruppo sham o calcolosi ureterale: al gruppo con calcolosi è stato inserito, in anestesia generale, un calcolo nel terzo superiore dell'uretere sinistro, mentre al gruppo sham l'uretere è stato solo esposto, ma non è stato inserito il calcolo. È stato registrato ed in seguito analizzato il comportamento spontaneo ed il comportamento di dolore (crisi), dal risveglio dopo l'operazione fino al sacrificio (66 ore). Sono stati quindi prelevati il sangue per la determinazione dei livelli plasmatici del testosterone e dell'estradiolo tramite dosaggio radioimmunologico (RIA) ed il cervello e il midollo spinale, in seguito alla perfusione con PBS e paraformaldeide, per la determinazione immunocitochimica dei livelli di c-Fos ed ER alfa.

Nelle femmine la fase del ciclo estrale è stata determinata attraverso lo striscio vaginale; il trattamento è stato iniziato nella fase di proestro, quando i livelli di estrogeni sono più alti.

Dai risultati ottenuti si può evincere come gli ormoni gonadici siano in grado di modulare, diversamente nei due sessi, le risposte comportamentali e neuronali ad uno stimolo doloroso viscerale, ma ulteriori studi serviranno per determinare se tali azioni degli ormoni sono dirette, mediate dall'interazione con i propri recettori sulle vie di modulazione del dolore, o indirette, tramite l'attivazione di sistemi neuronali che agiscono sul sistema modulatore.

Bibliografia

Berkley KJ 1997 Sex differences in pain. *Behav Brain Sci* 20: 371-80.

Cervero F, 1995. Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization. *Ann Med* 27: 235-239.

Fillingim RB Sex, Gender and Pain, IASP Press Seattle, USA, 2001

Giamberardino et al., 1995 Artificial ureteral calculosis in rats: behavioural characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. *Pain* 61: 459-469.

GLI ORMONI TIROIDEI PROMUOVONO LA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE E UP-REGOLANO L'ESPRESSIONE DEL GENE *SELADIN-1* IN MODELLI *IN VITRO* DI PRECURSORI NEURONALI UMANI

Ilaria Cellai, Susanna Benvenuti, Paola Luciani, Cristiana Deledda, Silvana Baglioni, Riccardo Saccardi, Serena Urbani, Fabio Francini, Roberta Squecco, Corinna Giuliani, Gabriella Barbara Vannelli, Mario Serio, Alessandro Peri

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Center for Research, Transfer and High Education on Chronic, Inflammatory, Degenerative and Neoplastic Disorders for the Development of Novel Therapies” (DENOTHe), Università degli Studi di Firenze, Firenze

ilaria.cellai@virgilio.it

Gli ormoni tiroidei (OT) svolgono un ruolo importante nello sviluppo del cervello umano modulando l'espressione di geni specifici. *Seladin-1* (da SElective Alzheimer's Disease Indicator-1) è un gene identificato di recente che ha proprietà neuroprotettive e che risulta down-regolato nelle regioni cerebrali affette dalla malattia di Alzheimer. In aggiunta, seladin-1 ha proprietà anti apoptotiche dal momento che inibisce l'attivazione della caspasi 3. Scopo del presente studio è stato quello di determinare se seladin-1 può essere considerato come un nuovo mediatore dei fondamentali effetti degli OT nel processo della neurogenesi cerebrale. Per dimostrare questa ipotesi sono stati valutati gli effetti degli OT sulla differenziazione cellulare e sulla espressione di *seladin-1* in due diversi modelli cellulari: 1. cellule neuroepiteliali fetali umane (FNC) e 2. cellule umane staminali mesenchimali (hMSC) che sono in grado di differenziare verso neuroni. Abbiamo dimostrato che la triiodotironina (T3) determina in ambedue i modelli cellulari studiati diverse risposte biologiche quali l'inibizione della adesione cellulare, confermata dalla ridotta espressione di molecole di adesione, l'induzione della migrazione, l'espressione di markers neuronali e di canali ionici. Inoltre gli OT aumentano significativamente i livelli di espressione di seladin-1 sia nelle FNC che nelle hMSC e, in parallelo, prevengono l'apoptosi indotta da camptotecina. Tuttavia, nelle hMSC differenziate a neuroni la quantità della espressione di seladin-1 non varia dopo trattamento con OT. Questi risultati dimostrano per la prima volta che *seladin-1* è un nuovo gene regolato dagli OT nei precursori neuronali. Quindi potrebbe essere ipotizzato che, a causa della sua attività anti-apoptotica, una delle funzioni degli aumentati livelli di seladin-1 durante la neurogenesi possa essere quella di proteggere i precursori neuronali dalla morte programmata.

ALTERAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO SESSUALE IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE AMBIENTALE A XENOESTROGENI

Leonida Fusani¹, Daniele Della Seta², Francesco Dessì-Fulgheri³, Francesca Farabollini²

¹Dip. Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara; ²Dip. Fisiologia, Università di Siena; ³Dip. Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze

leonida.fusani@unife.it

Introduzione. Gli estrogeni agiscono sul differenziamento del sistema nervoso e del comportamento durante lo sviluppo. Gli estrogeni ambientali, detti anche xenoestrogeni, entrano nella catena alimentare e possono interferire con i processi di differenziamento e provocare alterazioni permanenti della fisiologia, del comportamento, e dei tessuti neurali. Le dimostrazioni sperimentali di questo tipo di interferenze endocrine sono scarse soprattutto per i mammiferi, e la rilevanza biologica dei risultati di tali studi è stata messa in discussione perché le modalità del trattamento si distanziano notevolmente da quelle tipiche di una esposizione ambientale. Inoltre la maggior parte degli xenoestrogeni ha effetti tossici addittivi che rendono difficile l'identificazione di meccanismi di interferenza endocrina.

Metodi. Abbiamo studiato gli effetti di una esposizione 'similambientale' a uno xenoestrogeno puro, l'etinilestradiolo (EE), sul differenziamento sessuale del sistema nervoso e del comportamento in ratti del ceppo outbred Spargue-Dawley. A causa del suo uso diffuso – è il principale componente estrogenico delle pillole anticoncezionali – EE è un contaminante comune delle acque superficiali. I ratti sono stati trattati dal concepimento alla pubertà con due dosi di EE: una dose molto bassa (4 ng/kg/giorno), equivalente all'esposizione potenziale risultante dalla contaminazione ambientale, e una dose più alta (400 ng/kg/giorno) equivalente a quella della pillola anticoncezionale. Il trattamento era indiretto dal 5° giorno di gestazione fino allo svezzamento al 21° giorno di età: durante questo periodo EE veniva somministrato alle madri con il cibo e passava ai figli tramite la placenta e il latte. Successivamente EE veniva somministrato direttamente agli animali sperimentali tramite il cibo fino al 30° giorno di età. A partire dal 35° giorno di età, gli animali sperimentali sono stati suddivisi in gruppi e sottoposti a una serie di tests per valutare gli effetti del trattamento sul comportamento cognitivo e sessuale. Inoltre, sono stati registrati parametri fisiologici come la distanza anogenitale, le concentrazioni plasmatiche di ormoni androgeni e estrogeni, la regolarità del ciclo estrale, la fertilità e la fecondità.

Risultati e conclusioni. L'esposizione alla dose clinica ha avuto conseguenze profonde: le femmine presentavano estro vaginale permanente già a 3 mesi di età, e coppie formate da animali esposti a questa dose erano sterili. L'esposizione alla dose ambientali, per contro, non aveva effetti evidenti sulla fisiologia riproduttiva. Tuttavia, gli animali esposti a questa dose mostravano una serie di anomalie fisiologiche e comportamentali non riportate in alcun studio precedente. In particolare, il comportamento sessuale proiettivo femminile era alterato, e la fecondità delle coppie era aumentata. Nei maschi, entrambe le dosi avevano effetti significativi sull'apprendimento spaziale nel Morris water maze. In conclusione, i nostri studi mostrano che una esposizione prolungata a dosi ambientali di uno xenoestrogeno puro durante lo sviluppo produce effetti permanenti sul comportamento e sulla fisiologia riproduttiva.

LA TRANSIZIONE MENOPAUSALE: UN *MILIEU* BIOLOGICO-ENDOCRINO CHE PREDISPONE ALLA NEURODEGENERAZIONE.

Marialuisa Giunta, Sara M. Bonomo, Antonello E. Rigamonti, Maria Grazia Gagliano, Eugenio E. Müller, e Silvano G. Cella.

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano

email: marialuisa.giunta@unimi.it

Razionale e obiettivi. La prevalenza della malattia di Alzheimer (AD) aumenta consistentemente nelle donne in postmenopausa rispetto agli uomini di pari età. Poiché alla menopausa alcuni assi del sistema endocrino, come quelli gonadico, adrenocorticotropo e somatotropo, subiscono un'alterazione funzionale, si è ritenuto interessante studiare se (e come) variasse il bilancio tra alcuni parametri biologico-endocrini considerati neuroprotettivi oppure proneurotossici durante l'arco della vita in entrambi i sessi in condizioni di normalità e in corso di patologia neurodegenerativa.

Soggetti e metodi. In 209 soggetti sani (73 M, 106 F, 20-91 anni) e 85 pazienti con AD (36 M, 49 F, 65-89 anni), veniva determinata l'espressione leucocitaria dei recettori degli estrogeni (ERs), dei recettori dei glucocorticoidi (GRs), interleuchina-6 (IL-6) e CD36, un recettore *scavenger* di classe B, che giocherebbe un ruolo chiave negli eventi proinfiammatori associati alla AD. Venivano anche valutati i livelli plasmatici di estrogeni, cortisolo e deidroepiandrosterone solfato (DHEAS).

Risultati. Negli uomini sani tutti i parametri valutati nello studio rimanevano stabili per tutta la durata della vita. Nelle donne, invece, alla transizione menopausale (41-50 anni, n = 15), si osservava una serie di alterazioni, che potrebbe predisporre alla neurodegenerazione: in particolare, 1) *up-regulation* di ERs e un concomitante aumento dell'espressione genica di IL-6, eventi probabilmente dovuti alla perdita del controllo inibitorio esercitato dall'estradiolo; 2) un incremento del rapporto GR α :GR β , indicativo di un'augmentata attività del cortisolo su GR α , non sufficientemente controbilanciato dalla funzione inibitoria di GR β ; 3) una ridotta espressione di CD36, direttamente correlata all'augmentata attività adrenocorticotropa e, 4) un incremento del rapporto cortisolo:DHEAS, unanimemente riconosciuto come un indice prognostico negativo per le patologie neurodegenerative. Nei pazienti con AD di entrambi i sessi l'espressione dei parametri valutati nello studio era simile a quella riscontrata nei soggetti sani dello stesso sesso e gruppo di età, indicando così l'inesistenza di un'associazione con la malattia, ma piuttosto con gli eventi biologici.

Conclusioni. La transizione menopausale è una fase critica della vita della donna, durante la quale lo sviluppo di un *milieu* biologico-endocrino sfavorevole predisporrebbe a un aumento del rischio di neurodegenerazione. Pertanto, la più elevata prevalenza della AD nella popolazione femminile dipenderebbe, almeno in parte, dalla presenza di fattori di rischio, il cui contributo allo sviluppo della malattia diventa decisivo in presenza di possibili eventi scatenanti età-dipendenti. Diversi studi sono attualmente in corso per definire il ruolo di altri parametri biologico-endocrini, come i recettori del progesterone e il fattore di crescita insulino-simile I, strettamente connessi con l'attivazione di ERs, e l'efficacia di una terapia ormonale sostitutiva nella prevenzione della AD.

POSTERS

CONTROLLO SEROTONINERGICO SULL'ESPRESSIONE GENICA DELLA VASOPRESSINA DURANTE IL CICLO ESTRALE DI TOPO: TRE ATTORI SUL PALCOSCENICO DELLA DEPRESSIONE

Francesca Allieri^{1,2}, Valérie Grange-Messent¹, Jean Marc Lacorte³, Dominique Peppar³, GianCarlo Panzica², Carla Viglietti-Panzica², Hélène Hardin-Pouzet¹

¹Laboratorio di Neurobiologia dei Segnali Intercellulari, Unité Mixte de Recherche 7101, Centre National de la Recherche Scientifique, Pierre et Marie Curie University, 75252 Paris Cedex 05, Francia; ² Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dip. di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino, Italia; ³UMR505 INSERM/UPMC, Centre de Recherches Biomedicales des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Medecine, 75006 Paris F-75006, Francia.

Depressione ed ansia sono patologie comunemente associate alla popolazione femminile, soprattutto durante il periodo fertile. Le strutture cerebrali coinvolte nei disturbi comportamentali sono localizzate principalmente nel sistema limbico, come l'amigdala mediale. Nei roditori, l'amigdala mediale è suddivisa in una parte anteriore (MeA) ed una posteriore (MeP) e presenta una popolazione parvocellulare sessualmente dimorfica di neuroni a vasopressina (AVP) sensibile all'azione degli steroidi gonadici. MeA ed MeP ricevono un denso fascio di fibre provenienti dal sistema serotoninergico del midollo allungato. Sia la serotonina che la AVP regolano svariati aspetti del comportamento: in particolare il sistema serotoninergico è strettamente collegato con l'insorgenza di alcuni disturbi comportamentali, come la depressione. Nei roditori femmina e nelle donne, gli estrogeni mostrano effetto anti-depressivo e anti-ansigeno. Al fine di comprendere le relazioni tra gli estrogeni, il sistema a serotonina e l'espressione del gene per la AVP nel complesso amigdaloidale, abbiamo trattato topi femmina con il farmaco paraclorofenilalanina (pCpA), questo farmaco è un potente inibitore della catena di sintesi della serotonina. L'espressione del mRNA per la AVP e della quantità di proteina AVP (tramite saggio immunoenzimatico e Real time-PCR quantitativa) è stata misurata durante le differenti fasi del ciclo estrale di topo femmina. Nelle femmine di controllo, non trattate farmacologicamente, le differenze rilevate nell'espressione del gene per la AVP durante le varie fasi del ciclo estrale sono perfettamente corrispondenti ai livelli di proteina. Nelle femmine trattate con pCpA possiamo osservare l'alterazione della ciclicità con cui viene espresso il gene per l'AVP durante il proestro. In conclusione, i nostri dati suggeriscono che estrogeni e serotonina cooperino nella regolazione dell'espressione del gene per la AVP nel complesso dell'amigdala mediale, aprendo nuove ipotesi sui meccanismi che portano allo sviluppo di comportamenti depressivi nelle donne.

Ringraziamenti: FA ha usufruito di una borsa di studio San Paolo per la permanenza in Francia.

G-PROTEIN COUPLING SPECIFICITY OF THE HUMAN OXYTOCIN RECEPTOR: ROLE IN DIFFERENTIAL SIGNALLING PATHWAY ACTIVATION

ALESSANDRA REVERSI¹, SARA RICCIARDI¹, CELINE GALES², MICHEL BOUVIER²¹, BICE CHINI

B.Chini@in.cnr.it

1

¹CNR-Institute of Neuroscience, via Vanvitelli 32, Milan Italy

²Department of Biochemistry, Université de Montréal, Canada

GPCRs induce intracellular signals via interaction with cytosolic/ peripheral membrane proteins, mainly G proteins. The discovery that a single GPCR may couple to several G proteins and that different ligands might regulate this process, has made the investigation of the mechanism of receptor-G protein selection and interaction particularly relevant. The human oxytocin receptor (OTR) is a prototypical GPCR known to couple to Galphaq/11. Via this pathway, the OTR activates PLCgamma, leading to phospho-inositols production and intracellular calcium mobilization. However, the human OTR was also shown to mobilize calcium via a PTX sensitive G-protein, presumably of the Galphai family, (Phaneuf et al. J Endocrinol. 1993) and we have recently shown that a PTX sensitive G-protein is involved in mediating the anti-proliferative actions of OT in HEK293 and MDCK cells (Guzzi et al Oncogene, 2002, Rimoldi et al, Oncogene, 2003). Furthermore, we have found that a selective OTR ligand, atosiban, specifically promotes receptor coupling to a PTX sensitive G-protein, thus acting as a biased agonist (Reversi et al. JBC, 2005). The human OTR is thus a good example of a promiscuous GPCR, capable of activating different G-protein-mediated signalling pathways regulated by specific ligands. In order to further explore the coupling specificity of human OTR, we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay. BRET is based on a non-radioactive energy transfer between suitable donor and acceptor species; in particular, we used an OTR fused at its carboxyl tail to Renilla reniformis luciferase (Rluc) as a donor and a Galpha2- subunit fused to GFP10 at its N-terminal as an acceptor (Gales et al Nat Methods, 2005). The experiments were performed transfecting HEK293 cells with the OTRLuc and untagged complementary subunits of the G protein. As shown in figure 1, the stimulation with OT promotes a significant increase in BRET ratio when we coexpressed the OTR with the Galphaq, Galphai1 and Galphai2 subunit respectively. In presence of Galphas subunit, on the contrary, the increase in BRET ratio is quite similar to that observed when no Galpha-subunit is cotransfected, a situation that reflects the coupling of the receptor to the endogenously expressed Galpha-subunit (line -alpha). We can conclude that the binding of OT promotes a conformational change in the receptor in presence of Galphaq, Galphai1 and Galphai2 subunits, while there is no evidence of recruitment of Galphas. These data indicate that the human OTR has the capability to couple to Galphaq and Galphai, but not to Galphas, thus confirming its high grade of "promiscuity". As the human OTR is expressed in different cell types (neurons, astrocytes, myometrial cells, osteoblasts, endothelial cell) characterized by a different G- proteins repertoire, differences in coupling specificity may be responsible for the activation of different signalling pathways in these cells. In particular, we are now investigating the signalling pathways activated by the OTR in neuronal cells.

Titolo: ELEVATE CONCENTRAZIONI INTERMITTENTI DI GLUCOSIO RIDUCONO LA PROLIFERAZIONE DI PRECURSORI NEURONALI ALTERANDO IL SISTEMA DELL'IGF: RUOLO DEL FATTORE NEUROPROTETTIVO SELADIN-1

Cristiana Deledda¹, Stefano Giannini, Anna Pezzatini, Paola Luciani, Cinzia Manuelli, Susanna Benvenuti, Ilaria Cellai, Gabriella Barbara Vannelli, Carlo Maria Rotella, Mario Serio ed Alessandro Peri

1 Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, “Center for Research, Transfer and High Education on Chronic, Inflammatory, Degenerative and Neoplastic Disorders for the Development of Novel Therapies” (DENOThe), Università di Firenze
delfam@libero.it

Abstract: Le elevate concentrazioni di glucosio che caratterizzano il diabete mellito sono responsabili dei processi degenerativi a carico dei neuroni, determinando la neuropatia diabetica; tra i fattori invece che svolgono attività neurotrofica sono noti i membri del sistema dell'Insulin-like Growth Factor (IGF). Abbiamo pertanto investigato gli effetti di elevate concentrazioni di glucosio, sia costanti che intermittenti, sull'IGF-I e sulle IGF Binding Proteins (IGFBPs), utilizzando colture cellulari long-term di neuroblasti fetali umani (FNC). Queste cellule esprimono il recettore dell'IGF-I e sono in grado di esprimere e secernere nel mezzo di coltura IGFBP2, IGFBP4 ed IGF-I. L'esposizione delle FNC all'IGF-I (100 nM) determina un aumento significativo della secrezione di IGFBP2, che facilita il legame dell'IGF al suo recettore, ed una riduzione di IGFBP4, considerata un inibitore degli effetti biologici dell'IGF-I. L'IGF-I (1-100 nM) stimola la proliferazione delle cellule FNC in modo dose-dipendente. Abbiamo ipotizzato che questo effetto sia dovuto, almeno in parte, all'up-regolazione indotta dall'IGF dell'espressione di seladin-1, gene correlato alla malattia di Alzheimer e che agisce come fattore di sopravvivenza per le cellule neuronali. Al contrario, l'esposizione ad alte concentrazioni intermittenti di glucosio (20/10 mM) riduce il rilascio di IGF-I ed IGFBP2 nel mezzo di coltura, inibendo la crescita delle cellule FNC; questi effetti non si presentano quando le cellule vengono stimulate in modo continuo con glucosio 20 mM. Inoltre, elevate concentrazioni di glucosio riducono l'espressione di seladin-1.

In conclusione i nostri risultati indicano per la prima volta che l'esposizione ad alte concentrazioni di glucosio intermittenti, assimilabili a quelle riscontrate in pazienti diabetici in scarso compenso glicometabolico, può contribuire allo sviluppo della neuropatia diabetica, interferendo con il sistema dell'IGF-I. Inoltre i dati ottenuti propongono seladin-1 come mediatore degli effetti neuroprotettivi di questo sistema.

IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL PEPTIDE OPIOIDE ALIMENTARE GLUTEN EXORPHIN B5 IN LIQUIDI BIOLOGICI

Alessandro Delitala^{§#}, Emanuela Azara[°], Giuseppe Fanciulli[§], Mauro Marchetti[°], Giuseppe Delitala[§]

[§]Istituto di Clinica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Sassari

[°]Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Sezione di Sassari

[#] e-mail: aledelitala@tiscalinet.it

La famiglia delle Gluten Exorphins (GEs) è costituita da un gruppo di peptidi ottenuti agli inizi degli anni 90 da un equippe di farmacologi dell'Università di Tokio mediante frammentazione enzimatica del glutine; la Gluten Exorphin B5 (Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu) è, nell'ambito delle GEs, il peptide dotato della più alta attività e affinità per i recettori oppioidi *in vitro* (1,2). Gli effetti della somministrazione della GE-B5 *in vivo* sono scarsamente conosciuti: in modelli animali, la GE-B5 esercita una azione di stimolo sulla secrezione di Insulina (3); studi condotti dal nostro Gruppo hanno inoltre dimostrato che la GE-B5 è dotato di azione neuroendocrina, agendo sulla secrezione di Prolattina (4,5) mediante recettori situati esternamente alla Barriera Emato-Encefalica (6).

La maggiore limitazione agli studi sul ruolo delle GEs *in vivo* (sia in modelli animali che nell'uomo) è stata senza dubbio l'assenza di metodiche in grado di identificare e quantificare le GEs (e la GE-B5 in particolare) in liquidi biologici. In particolare, nessun gruppo era mai riuscito a dimostrare la presenza delle GEs in un liquido biologico umano, presupposto quest' ultimo fondamentale per permettere alle GEs il passaggio da "possibile artefatto di laboratorio" a vero e proprio analita del sangue umano.

Nel novembre 2007, grazie ad uno studio collaborativo cui ha partecipato il nostro Gruppo di ricerca, la GE-B5 (e la sua frazione GE-B4, Tyr-Gly-Gly-Trp) è stata per la prima volte identificata nel plasma umano (7); tale studio, che si è avvalso di una metodica di LC-MS-MS, è stato compiuto mediante l'impiego di "modelli sperimentali" umani caratterizzati da una condizione di incrementata permeabilità intestinale (malattia celiaca). Tale studio, per la sua natura di tipo puramente qualitativa, non ha permesso di conoscere le concentrazioni di GE-B5 nel sangue umano; tuttavia, il nostro Laboratorio ha nel frattempo messo a punto una metodica di LC-MS con strumentazioni "bench" in grado di quantificare la GE-B5 nel plasma umano, ottenendo sinora una sensibilità di 1.75 ng/mL (dati non pubblicati). Tale metodica, unitamente a quella recentemente messa a punto per il dosaggio della GE-B5 nel liquido cefalo-rachidiano (8) offre la possibilità di studiare per la prima volta il comportamento di questo oppioide alimentare nei liquidi biologici e chiarire le azioni che esso svolge a concentrazioni fisiologiche.

(1) Fukudome S, Yoshikawa M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett.* 1992 ;296(1):107-11.

(2) Fukudome S, Yoshikawa M. Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Lett.* 1993 ;316(1):17-9.

(3) Fukudome S, Shimatsu A, Suganuma H, Yoshikawa M. Effect of gluten exorphins A5 and B5 on the postprandial plasma insulin level in conscious rats. *Life Sci.* 1995;57(7):729-34.

(4) Fanciulli G, Dettori A, Tomasi PA, Demontis MP, Gianorso S, Anania V, Delitala G. Prolactin and growth hormone response to intracerebroventricular administration of the food opioid peptide gluten exorphin B5 in rats. *Life Sci.* 2002 ;71(20):2383-90.

(5) Fanciulli G, Dettori A, Fenude E, Demontis MP, Alberico E, Delitala G, Anania V. Intravenous administration of the food-derived opioid peptide gluten exorphin B5 stimulates prolactin secretion in rats. *Pharmacol Res.* 2003 ;47(1):53-8.

(6) Fanciulli G, Dettori A, Demontis MP, Tomasi PA, Anania V, Delitala G. Gluten exorphin B5 stimulates prolactin secretion through opioid receptors located outside the blood-brain barrier. *Life Sci.* 2005 ;76(15):1713-9.

(7) Pennington CL, Dufresne CP, Fanciulli G, Wood TD. Detection of Gluten Exorphin B4 and B5 in Human Blood by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. *Open Spectrosc J.* 2007 ; 1:9-16.

(8) Fanciulli G, Azara E, Wood TD, Delitala G, Marchetti M. Liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantification of Gluten Exorphin B5 in cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 ;852(1-2):485-90.

APPRENDIMENTO SCOLASTICO, RISERVA COGNITIVA E RISPOSTA ALLO STRESS DEL BAMBINO: UNA PROSPETTIVA DI RICERCA INTEGRATA NEUROSCIENZE-PEDAGOGIA ED UN DISEGNO SPERIMENTALE PILOTA

Maria Luisa Eboli*¹, Claudio Babiloni² e Paolo Maria Ferri³

¹Istituto di Patologia generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica S. Cuore, Roma

²Dipartimento di Fisiologia umana e Farmacologia, Università “La Sapienza”, Roma

³Dipartimento di Scienze Umane per la Formazione “Riccardo Massa”, Università Milano Bicocca

*mleboli@rm.unicatt.it

Il cervello è l'organo centrale di regolazione della risposta allo stress dell'individuo ed anche il bersaglio più importante di interventi atti a ridurre il “carico allostatico” indotto a livello delle strutture da condizioni di stress cronico. In genere questi interventi consistono in trattamenti farmacologici (es., ansiolitici, beta-bloccanti, antidepressivi), incremento dell'attività fisica e supporto di tipo sociale, soprattutto psico-emozionale, del soggetto colpito. Eppure studi epidemiologici longitudinali di gerontologia cognitiva hanno identificato nell'istruzione ed in particolare nelle attività scolastiche ad alto contenuto mentale svolte dal soggetto nelle prime due decadi di vita, i determinanti “ambientali” più importanti del mantenimento dello stato di salute dell'individuo lungo tutto l'arco della vita dall'infanzia alla vecchiaia (ipotesi della riserva cognitiva). Inoltre, studi clinici recenti hanno dimostrato che percorsi educativi (simil-scolastici) “sommministrati” per breve durata a pazienti in trattamento farmacologico tradizionale possono migliorare la riuscita terapeutica globale e/o gli indici di malattia/stress del paziente rispetto ai controlli trattati solo farmacologicamente e che questo effetto migliorativo indotto dalla stimolazione cognitiva è indipendente dal tipo di patologia, fisica o mentale, in atto. Non si conoscono finora i meccanismi attraverso i quali l'intervento educativo, basato sulla relazione insegnamento-apprendimento, produrrebbe effetti benefici sullo stato di salute/malattia dell'individuo.

Sulla base di queste premesse, focalizzando l'attenzione al tema della costruzione della riserva cognitiva nelle prime fasi di vita, gli autori avanzano l'ipotesi che esista una relazione diretta tra apprendimento cognitivo, aumento di plasticità a livello dei circuiti cerebrali e modulazione della risposta allo stress nel bambino-adolescente e discutono un modello di ricerca/primo studio sperimentale pilota disegnato integrando le differenti prospettive pedagogica, neurofisiologica e neuroendocrinologica.

Bibliografia

Eboli M.L., Babiloni C., Ferri P.M. (2007), *Early life education and constitution of cognitive reserve: addressing an emerging issue by combining pedagogical and biomedical perspectives*, Proceed. 2nd Intern. Congr. Bioeducational Sciences, Napoli, 29-30 novembre.

POLIMORFISMI DEL RECETTORE DELLA DOPAMINA D2 E RISPOSTA ALLA TERAPIA CON CABERGOLINA IN PAZIENTI CON ADENOMA IPOFISARIO PROLATTINA SECERNENTE.

Filopanti M¹, Barbieri AM¹, Angioni AR¹, Colao A², Gasco V³, Grotoli S³, Peri A⁴, Baglioni S⁴, Faustini Fustini M⁵, Pigliaru F⁶, Del Monte P⁷, Borretta G⁸, Ambrosi B⁹, Jaffrain-Rea ML¹⁰, Gasperi M¹¹, Brogioni S¹², Mantovani G¹, Beck-Peccoz P¹, Lania A¹, Spada A¹.

¹ Department of Medical Sciences, University of Milan, Endocrine and Diabetes Unit Fondazione Ospedale Maggiore IRCCS, Milan, Italy ² Department of Molecular and Clinical Endocrinology and Oncology, Federico II University of Naples, Italy ³ Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, University of Turin, Italy ⁴ Endocrine Unit, Dept of Clinical Physiopathology, Center for Research, Transfer and High Education DENOThe, University of Florence, Italy ⁵ Endocrinology Unit, Dept. of Medicine, Ospedale Bellaria, Bologna, Italy ⁶ Endocrinology, Department of Medical Sciences "M. Aresu" University of Cagliari, Italy ⁷ Unit of Endocrinology, Galliera Hospital, Genoa, Italy ⁸ Endocrinology Unit, Santa Croce Hospital, Cuneo, Italy

⁹ Endocrinology Unit, Department of Medical and Surgical Sciences, University of Milan, IRCCS Policlinico San Donato, Milan, Italy ¹⁰ Dept of Experimental Medicine, University of L'Aquila and Neuromed IRCCS, Pozzilli, Italy ¹¹ Chair of Endocrinology, University of Molise, Campobasso, Italy ¹² Department of Endocrinology, University of Pisa, Italy

Il farmaco dopamino agonista Cabergolina (CB) è in grado di ridurre, mediante il legame con il recettore della dopamina D₂ (DRD2), la secrezione di prolattina (PRL) e la dimensione del tumore nel 80% dei pazienti con adenoma ipofisario prolattina secernente (PRLoma). I meccanismi responsabili della resistenza alla CB sono in gran parte sconosciuti. Per verificare la associazione di DRD2 con la sensibilità alla CB, i polimorfismi TaqI-A1/A2, TaqI-B1/B2, HphI-G/T e NcoI-C/T sono stati analizzati in uno studio retrospettivo cross-sezionale che includeva 203 pazienti con PRLoma. Le frequenze dei vari alleli di DRD2 non differivano significativamente fra i pazienti ed un gruppo di 212 soggetti sani. La frequenza dell'allele NcoI-T era più alta nei resistenti rispetto ai pazienti responsivi al trattamento, sia per quanto riguarda la normalizzazione della PRL (56.6% vs 45.3%, P=0.038) sia per la riduzione della dimensione tumorale (70.4% vs 41.4%, P=0.006). Infine, l'aplotipo [TaqIA1-/TaqIB1-/HphIT-/NcoIT-] era presente nel 34.5% dei pazienti che normalizzavano la PRL con dosaggio di CB ≤ 3 mg/sett vs lo 11.3% dei resistenti (P=0.021). In conclusione, la resistenza alla CB potrebbe essere associata con l'allele NcoI-T+ del gene DRD2. Tale risultato è consistente con le evidenze disponibili, che suggeriscono che questa variante possa conferire una ridotta espressione o una maggiore instabilità dello mRNA o della proteina DRD2.

EFFETTI PROTETTIVI DEL PROGESTERONE E DEI SUOI DERIVATI NELLA NEUROPATIA DIABETICA.

Silvia Giatti^{#1}, Ilaria Roglio¹, Marzia Pesaresi¹, Roberto Bianchi², Guido Cavaletti³, Luis M. Garcia-Segura⁴, Giuseppe Lauria⁵, Roberto C. Melcangi¹

¹Ist. di Endocrinologia e Centro di Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Università di Milano, Milano, Italia, silvia.giatti@unimi.it; ²Dip. di Biochimica Molecolare e Farmacologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, Italia; ³Dip. di Neuroscienze e Biotecnologie Mediche, Università di Milano "Bicocca", Monza, Italia; ⁴Istituto Cajal, C.S.I.C., Madrid, Spagna; ⁵Unità per le Malattie Neuromuscolari, Istituto Neurologico Nazionale "Carlo Besta", Milano, Italia.

Recenti osservazioni hanno dimostrato che gli steroidi neuroattivi possono essere considerati agenti protettivi a livello del sistema nervoso sia centrale che periferico (Melcangi et al., 2007). Infatti, steroidi neuroattivi come ad esempio il progesterone (P), il testosterone ed i loro derivati, si sono dimostrati efficaci in diversi modelli sperimentali di neuropatia periferica di tipo acquisito (Roglio et al., 2007). Fra questi tipi di neuropatie, quella indotta dal diabete risulta di particolare importanza per la sua frequenza e per la mancanza di una soddisfacente terapia. Utilizzando il modello sperimentale del ratto reso diabetico mediante induzione con streptozotocina, abbiamo valutato il possibile effetto protettivo del P e dei suoi derivati, diidroprogesterone (DHP) e tetraidroprogesterone (THP) su diversi parametri neurofisiologici, funzionali, biochimici e neuropatologici (Leonelli et al., 2007). I risultati da noi ottenuti, hanno dimostrato che il trattamento con questi steroidi neuroattivi è in grado di riportare alla norma la velocità di conduzione nervosa, la sensibilità termica e la densità delle fibre intraepidermiche che sono alterate in questo modello sperimentale. Inoltre, il trattamento induce anche un miglioramento dell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi ed un'augmentata espressione di proteine della mielina periferica, come ad esempio la glicoproteina zero (P0) e la proteina della mielina periferica di 22 Kda (PMP22). Gli effetti neuroprotettivi sono anche evidenti dal punto di vista morfologico sulla degenerazione del nervo sciatico, in quanto il trattamento con P o DHP diminuisce significativamente il numero delle anomalie a carico della guaina mielinica. Nel complesso, tali evidenze suggeriscono un ruolo protettivo di questi steroidi neuroattivi nella neuropatia diabetica. Risulta particolarmente interessante osservare che questi effetti sembrano essere dovuti all'interazione con diversi recettori. Infatti, l'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi, l'integrità morfologica della mielina e l'espressione di P0 e PMP22 vengono influenzate solo dal trattamento con P o DHP, che sono ligandi del classico recettore del progesterone, mentre la velocità di conduzione nervosa, la sensibilità termica e la densità delle fibre intraepidermiche sono influenzate anche dal THP, che interagisce con un recettore non classico per gli steroidi, come il recettore GABA_A . Poiché una possibile strategia terapeutica per la neuropatia diabetica potrebbe essere quella di agire direttamente su questi recettori con specifici ligandi di sintesi, risulterà particolarmente importante in future sperimentazioni chiarire il loro ruolo negli effetti da noi osservati. (PRIN-2005060584_004 e FIRST dell'Università degli Studi di Milano).

Melcangi RC, Garcia-Segura LM, Mensah-Nyagan AG. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, doi: 10.1007/s00018-007-7403-5

Roglio I, Giatti S, Pesaresi M, Bianchi R, Cavaletti G, Lauria G, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Neuroactive steroids and peripheral neuropathy. *Brain Res Rev.* 2007, doi:10.1016/j.brainresrev.2007.04.010

Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience.* 2007 Feb 23;144(4):1293-304.

IL PRETRATTAMENTO CON GHRELIN ACILATO ABOLISCE LA RISPOSTA SOMATOTROPA AL GHRH E INIBISCE LE RISPOSTE A GHRH+ARGININA E A GHRELIN STESSO.

Gramaglia Elena , Pomero Elisa, Riganti Fabrizio, Olivetti Ilaria, Ramella Valentina, Benso Andrea, Ghigo Ezio, Broglio Fabio
gramagliaelena@libero.it

La secrezione di GH è principalmente regolata dall'interazione di GHRH e somatostatina, a sua volta modulata da diversi segnali ormonali, neurotrasmettitoriali e metabolici centrali e periferici. Tra questi, è stato recentemente approfondito il ruolo di ghrelin acilato (AG), ormone prevalentemente gastrico, in grado di indurre, sia nell'animale sia nell'uomo, in seguito a somministrazione endovenosa acuta, un rilascio ipofisario di GH assai maggiore rispetto a quello indotto dal GHRH. L'effetto di ghrelin acilato è mediato dall'attivazione di specifici recettori a livello ipotalamo-ipofisario, noti come GHS-R1a, e, almeno in parte, secondario ad una attivazione dei neuroni GHRH secernenti e ad un antagonismo funzionale della somatostatina. Sulla base di queste premesse, scopo di questo studio è stato quello di approfondire le interazioni funzionali tra GHRH e ghrelin, indagando in particolare se la somministrazione di ghrelin è in grado di indurre desensitizzazione autologa o eterologa nei confronti del GHRH da solo o in co-somministrazione con arginina, aminoacido in grado di potenziare le risposte di GH al GHRH mediante inibizione del tono somatostatinergico. A tale fine in 5 soggetti volontari sani, sono state studiate le risposte secretorie di GH in seguito a : 1) somministrazione acuta di AG (1 µg/Kg e.v. a bolo) dopo 4 h di infusione di soluzione fisiologica o dopo 4 h di infusione e.v. di AG (1µg/Kg/h); 2) somministrazione acuta di GHRH (1 µg/Kg e.v. a bolo) dopo 4 h di infusione di soluzione fisiologica o dopo 4 h di infusione e.v. di AG (1µg/Kg/h); c) somministrazione acuta di GHRH + arginina (GHRH 1 µg/Kg + arginina 0,5 g/Kg per 30 min) somministrati dopo 4 h di infusione di soluzione fisiologica o dopo 4 h di infusione e.v. di AG (1µg/Kg/h). I risultati ottenuti hanno mostrato significativi incrementi dei livelli di GH dopo somministrazione di GHRH (delta auc:964,5 e delta picco: 17,1 ; p<0.01), GHRH+arginina (delta auc 2371,9 e delta picco 52,2; p<0.01) e AG (delta auc 2216,1 e delta picco39,9; p<0.01) quando somministrati in corso di infusione di soluzione salina. Le risposte di GH a GHRH+arginina e AG sono risultate tra loro sovrapponibili ed entrambe superiori (p<0.01) a quelle al GHRH da solo. L'infusione di AG ha indotto un significativo incremento dei livelli di GH con picco a 60' (43,7 µg/l), con progressivo decremento seppur mantenendo livelli di GH circolanti sempre significativamente superiori rispetto al basale (a 240' 9,8 µg/l e a 0' 0,1µg/l). Durante infusione di AG, la somministrazione di GHRH non è risultata in grado di indurre significative variazioni dei livelli di GH (delta auc -127,7 e delta picco 2,2). Similmente durante AG, le risposte di GH sia ad AG stesso (delta auc 153 e delta picco 8) sia al GHRH+arginina (delta auc 145,9 e delta picco 3,8) sono risultate nettamente ridotte seppur non assenti. I risultati di questo studio mostrano che il pretrattamento con ghrelin acilato abolisce la risposta somatotropa al GHRH e inibisce marcatamente le risposte somatotrope a ghrelin acilato stesso e a GHRH+arginina. Tale effetto potrebbe essere dovuto alla presenza di fenomeni di desensitizzazione autologa ed eterologa di AG. Tuttavia ulteriori studi sono necessari per escludere che si tratti invece dell'esito di un deauperamento della riserva secretoria ipofisaria di GH indotta dalla concomitante infusione di AG.

Mail: gramagliaelena@libero.it

STIMOLAZIONE ESTROGENICA E IPEROSMOTICA: EFFETTI SULL'ESPRESSIONE DELLA VASOPRESSINA NEL NUCLEO SUPRAOTTICO DELL'IPOTALAMO.

Daniela Grassi^{1,2}, Miguel Augusto de Amorim², GianCarlo Panzica¹, Luis Miguel Garcia Segura²

¹ Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dipartimento Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università degli Studi di Torino, Italia, ² Instituto Ramon y Cajal, CSIC, Madrid, Spagna
e-mail: daniela.grassi@unito.it

La vasopressina (AVP) è un nonapeptide che agisce come ormone neuroipofisario coinvolto nell'osmoregolazione e nella regolazione della pressione sanguigna e anche come neurotrasmettitore o neuromodulatore nel sistema nervoso centrale. I neuroni secernenti vasopressina sono classificati in 2 sistemi: neuroni magnocellulari e parvocellulari. I magnocellulari sono localizzati nel nucleo supraottico (SON) e nel nucleo paraventricolare (PVN) dell'ipotalamo e proiettano alla neuroipofisi. L'espressione della vasopressina è regolata da ormoni steroidei come gli estrogeni mediante l'azione dei recettori per gli estrogeni alfa e beta i quali agiscono come fattori trascrizionali. È stato dimostrato che i due recettori svolgono azione regolatoria opposta sulla sua espressione: il recettore alfa, in seguito a stimolazione estrogenica, attiva la trascrizione del gene della AVP, svolgendo quindi un'azione di tipo stimolatorio sulla sua produzione, mentre il recettore beta attiva la trascrizione del gene della AVP in modo costitutivo ma, in seguito a stimolazione estrogenica, provoca invece una diminuzione dell'attività del suo promotore, svolgendo quindi un'azione di tipo inibitorio.

Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'azione degli estrogeni *in vivo* usando ratti femmine Sprague-Dawley di 3 mesi ovariectomizzate. Al fine di definire l'azione degli estrogeni in sistemi fisiologici e in sistemi osmoticamente attivati, gli animali sono stati sottoposti ad una iniezione intraperitoneale al giorno di estradiolo 50µg/Kg per 3 giorni ed è stata fornita loro acqua arricchita con NaCl 2% (*salt load*) per 4 giorni al termine dei quali sono stati sottoposti a sacrificio. Gli animali sono stati divisi in 4 gruppi sperimentali: solo estradiolo, estradiolo più NaCl 2%, solo NaCl 2%, controlli. Le sezioni sono state trattate per evidenziare l'espressione della proteina c-fos (marcatore di attività cellulare) e di AVP. Le sezioni sono state poi analizzate quantitativamente.

I risultati mostrano:

- un aumento statisticamente significativo dell'espressione della proteina c-Fos nel gruppo NaCl 2% (*salt loading*), nessun effetto nel gruppo sottoposto a stimolazione estrogenica ma un aumento statisticamente significativo più marcato nel gruppo sottoposto a stimolazione estrogenica e *salt loading*. Si può quindi dedurre che è necessaria la stimolazione iperosmotica per aumentare l'espressione di c-Fos, che l'effetto della stimolazione iperosmotica è incrementato dall'estradiolo e che quindi alla base dell'espressione di c-Fos possa esserci un meccanismo che sinergizza le due azioni;
- una diminuzione statisticamente significativa dell'area cellulare e nucleare dei neuroni ad AVP nel gruppo sottoposto a stimolazione estrogenica, nessun effetto nel gruppo sottoposto a *salt loading* ed una diminuzione statisticamente significativa nel gruppo estrogeni e *salt loading*. La diminuzione dell'area cellulare e nucleare di tali neuroni può essere spiegata come una diminuzione dell'attività cellulare in seguito ad inibizione della produzione di AVP.

In conclusione, dal momento che i neuroni magnocellulari ad AVP sono caratterizzati dalla presenza esclusiva del recettore beta per gli estrogeni, i nostri risultati possono essere interpretati come la conseguenza dell'azione specifica dell'esposizione agli estrogeni che, in condizioni di *salt loading*, da un lato riduce la produzione di AVP per cellula, mentre aumenta il numero di cellule coinvolte nella risposta.

EFFETTI COMPORTAMENTALI DEL KNOCK-OUT CONDIZIONALE DEL RECETTORE Y1 PER IL NEUROPEPTIDE Y NEI NEURONI DELL'ENCEFALO DI TOPO CHE COESPRIMONO I RECETTORI Y1 E Y5.

Angela Longo^a, Alessandra Oberto^a, Ilaria Bertocchi^a, Paolo Mele^a, Paola Palanza^b, Rolf Sprengel^c, Carola Eva^a

a Università di Torino, Dip. Anatomia, Farmacologia e Med. Leg. Laboratorio Prof.ssa Carola Eva

b Università di Parma, Dip. di Biologia Evolutiva e Funzionale

c Max Planck Institute for Medical Research, Heidelberg, Germany

Il neuropeptide Y (NPY) è un polipeptide abbondantemente distribuito a livello del sistema nervoso centrale e periferico dei mammiferi e svolge le sue funzioni attraverso l'attivazione dei recettori accoppiati alle proteine G: Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e y6. In particolare l'NPY è localizzato a livello dell'ippocampo, dove svolge un ruolo oressigenico attraverso il legame con i recettori Y1 e Y5; nell'amigdala, dove svolge un ruolo ansiolitico tramite il legame con il Y1; nell'ippocampo, nel nucleo del tratto solitario, nel locus coeruleus, nel nucleo accumbens e nella corteccia cerebrale (Eva et al. 2006).

Per definire il ruolo specifico di Y1R e di Y5R nel mediare gli effetti farmacologici di NPY sono stati generati modelli di knockout germinale per entrambi i recettori. Tuttavia l'impiego di questi animali non ha prodotto differenze significative con i rispettivi controlli a causa probabilmente dell'instaurarsi di meccanismi compensatori.

Per superare queste limitazioni nel nostro laboratorio sono stati generati i topi transgenici $Tg^{Y5RhtTA/Y1RVenus}$, nei quali il transattivatore dipendente da tetraciclina (tTA) e la proteina fluorescente Venus sono controllati dall'attività dei promotori di Y5R e di Y1R, rispettivamente. Questi animali sono stati utilizzati per generare un modello murino di knockout condizionale, $Y1R^{Y5R-/-}$, nel quale abbiamo ottenuto la delezione, a partire da P40, di Y1R selettivamente nei neuroni che esprimono Y5R di alcune regioni del proencefalo, grazie al controllo doxiciclina-dipendente della ricombinasi CRE (Oberto et al. 2007).

Sui topi $Y1R^{Y5R-/-}$ è stata eseguita l'analisi del comportamento emozionale (test del labirinto sopraelevato, test dell'open field) e quella del comportamento alimentare (test del digiuno, misurazione del peso corporeo e del consumo giornaliero di cibo).

I nostri risultati dimostrano che sia i maschi che le femmine $Y1R^{Y5R-/-}$ presentano un fenotipo più ansioso, calcolato come frequenza di entrata nelle braccia aperte e tempo speso nelle braccia aperte, rispetto ai controlli, probabilmente dovuto alla delezione del Y1R nell'amigdala.

Al contrario non abbiamo registrato differenze di peso o di consumo giornaliero di cibo tra knock out e controlli. Questo suggerisce una possibile ridondanza biologica tra Y1R e Y5R nel controllo del comportamento alimentare.

EFFETTI DELL' ESPOSIZIONE AMBIENTALE A XENOESTROGENI SUL DIFFERENZIAMENTO SESSUALE DEL SISTEMA NERVOSO

Paola Materazzi¹, Francesco Dessì-Fulgheri¹, Leonida Fusani²

¹Dip. Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze; ²Dip. Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara

Introduzione. Il differenziamento sessuale del sistema nervoso nei mammiferi è guidato principalmente dall'azione degli ormoni androgeni ed estrogeni. Studi condotti negli anni novanta hanno mostrato che sostanze con azione di tipo estrogenica presenti nell'ambiente – xenoestrogeni - possono interferire con l'azione degli estrogeni endogeni e produrre alterazioni nel dimorfismo cerebrale. La rilevanza biologica dei risultati di tali studi è stata però messa in discussione perchè le modalità del trattamento si distanziavano notevolmente da quelle tipiche di una esposizione ambientale. Inoltre la maggior parte degli xenoestrogeni ha effetti tossici addittivi che rendono difficile l'identificazione di meccanismi di interferenza endocrina.

Metodi. Scopo del nostro studio era quello di verificare se uno xenoestrogeno puro somministrato con un trattamento di tipo ambientale, cioè esposizione alimentare a dosi molto basse per l'intero periodo dello sviluppo, è capace di alterare il dimorfismo sessuale neurale. Maschi e femmine di ratto appartenenti al ceppo outbred Spargue-Dawley sono stati esposti dal concepimento fino al 30 giorno di vita a due differenti dosi di 17alfa-etinilestradiolo (EE): un primo gruppo ha ricevuto 4ng/kg/giorno di EE, una dose molto bassa equivalente alla concentrazione riscontrata in numerosi corsi d'acqua contaminati dell'Europa e degli Stati Uniti; il secondo gruppo ha invece ricevuto 400ng/kg/giorno di EE, equivalente alla concentrazione presente nella pillola contraccettiva. Un terzo gruppo è stato trattato con il solo veicolo alimentare - olio di arachidi. Nel periodo dal concepimento allo svezzamento l'EE è stato somministrato alle madri con il cibo ed è passato ai figli tramite la placenta ed il latte; dopo lo svezzamento l'EE è stato somministrato direttamente per via orale agli animali sperimentali. Gli animali sono stati sacrificati a 42 giorni di vita e gli encefali sono stati fissati, congelati e tagliati in fette dello spessore di 40µm. Sono state quindi misurate la densità dei recettori alfa per gli estrogeni (ERα) in una serie di nuclei preottico-ipotalamici e le dimensioni di questi ultimi.

Risultati e conclusioni. Lo studio della morfologia dei nuclei sessualmente dimorfici ha mostrato le attese differenze tra i sessi ma nessun effetto significativo del trattamento con lo xenoestrogeno. Quindi la somministrazione di xenoestrogeni a dosi e modalità simili a quelle riscontrate in natura, capaci di produrre effetti notevoli sul comportamento cognitivo e sessuale e sulla fisiologia riproduttiva, non sembra produrre alterazioni macroscopiche del dimorfismo sessuale neurale in maschi e femmine di ratto. Ulteriori studi sono in corso per verificare questi risultati su un campione sperimentale più ampio.

EFFETTI ORGANIZZAZIONALI DEL BISFENOLO-A SULL'ESPRESSIONE DELLA KISSPEPTINA NELL'IPOTALAMO DI TOPI CD-1

Désirée Miceli¹, Isabelle Franceschini³, Paola Palanza³, GianCarlo Panzica¹

¹ Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino, Italia; ² UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours/Harras Nationaux, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France; ³ Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma, Italy
e-mail: desiree.miceli@unito.it

La pubertà è un complesso e coordinato processo biologico che presenta numerosi livelli di controllo guidati a monte dai neuroni secernenti GnRH (*gonadotropin-releasing hormon*), la cui secrezione è regolata dagli ormoni sessuali in maniera indiretta data l'assenza dei recettori per gli estrogeni alfa ($ER\alpha$) e per gli androgeni (AR), suggerendo così l'esistenza di altri neuroni steroidi-sensibili capaci di inviare i segnali prodotti dagli ormoni sessuali all'asse riproduttivo a cui i neuroni GnRH fanno capo. La kisspeptina, o metastina, è un peptide di 54 aminoacidi codificato dal gene *kiss-1* capace di legare in modo specifico un recettore di membrana associato a proteine G, GPR54. Il legame kisspeptina-GPR54 è essenziale per il mantenimento dell'attività secretoria dei neuroni a GnRH, ed i neuroni a kisspeptina sono considerati uno dei fattori chiave nel controllo steroide-dipendente dei circuiti a GnRH.

Molti composti chimici presenti nell'ambiente e ai quali sia l'uomo che gli animali sono costantemente esposti, classificati come "distruttori endocrini" (EDCs), possono indurre alterazioni del sistema neuroendocrino e agire come agonisti o antagonisti degli ormoni, alterandone la sintesi e il metabolismo. Il bisfenolo-A (BPA) è un composto chimico industriale capace di indurre, anche a basse concentrazioni, numerosi effetti biologici negativi dovuti alla sua capacità di mimare l'attività degli estrogeni endogeni, e viene inserito nel gruppo di sostanze chimiche indicate come xenoestrogeni (XE).

Femmine di topo del ceppo CD1 sono state esposte, a partire dal giorno 11 di gestazione fino al giorno 8 post parto, a quattro differenti concentrazioni di BPA (controllo, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporeo al giorno) somministrato per via orale. Noi abbiamo analizzato la distribuzione del sistema a kisspeptina, nella prole di entrambi i sessi che è stata esposta indirettamente alle diverse dosi di BPA. Gli animali sono stati sacrificati all'età di due mesi e il sistema a kisspeptina è stato evidenziato con tecniche immunohistochimiche utilizzando l'anticorpo 564 anti-Kp10 prodotto in coniglio.

Nei controlli, l'osservazione delle sezioni di ipotalamo corrispondenti ai nuclei anteroventrale periventricolare (AVPe) e arcuato (Arc) ha confermato la presenza di uno spiccato dimorfismo sessuale del sistema a kisspeptina con una maggiore immunoreattività in entrambi nuclei nelle femmine sia a livello di numero di cellule sia a livello di densità di fibre. Il trattamento perinatale con BPA altera in maniera evidente la distribuzione del sistema positivo per la kisspeptina, in particolare si è osservato un notevole incremento del segnale nel maschio in entrambi i nuclei esaminati con una tendenza alla scomparsa del dimorfismo sessuale. In conclusione, i nostri dati suggeriscono che la demascolinizzazione del comportamento riproduttivo di roditori esposti nel periodo prenatale a BPA possa essere legata ad una profonda alterazione del circuito a kisspeptina e dei meccanismi di controllo del circuito a GnRH.

Ringraziamenti. Questa ricerca è stata finanziata dalla Regione Piemonte (GCP).

STUDIO MULTIGENERAZIONALE DEGLI EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL METOSSICLORO TRAMITE LA DIETA SUL SISTEMA PARVOCELLULARE A VASOTOCINA DELLA *BOBWHITE QUAIL*

Elena Mura¹, Viola Sacchi¹, Nikki Thompson², Mary Ann Ottinger², GianCarlo Panzica¹, Carla Viglietti-Panzica¹

¹ Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dip. Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino, Italia; ² Dept. Animal and Avian Science, Univ. Maryland, College Park, MD, USA

Il metossiclolo (MXC) è un pesticida sviluppato allo scopo di rimpiazzare il DDT da quando, nel 1972, ne è stato interdetto l'uso. L'esposizione a questa sostanza può avvenire per inalazione, per via alimentare o per contatto dermico. Tuttavia, studi su animali indicano che il MXC è assorbito efficacemente nel tratto gastrointestinale e meno dalla pelle. Gli effetti tossici dell'esposizione a questa sostanza sono riscontrabili a livello di tutti gli apparati; in particolare è stato dimostrato che il MXC è in grado di agire come agonista del recettore alfa degli estrogeni e come antagonista del recettore beta e del recettore degli androgeni. Il MXC è quindi a tutti gli effetti uno xenoestrogeno, ovvero una sostanza in grado di mimare l'azione degli estrogeni endogeni alterando quindi lo sviluppo e il normale funzionamento dell'organismo.

Il sistema parvocellulare a vasotocina (VT) della quaglia giapponese è caratterizzato da un forte dimorfismo sessuale: la somministrazione di estradiolo benzoato durante il periodo critico embrionale provoca un effetto organizzazionale sul sistema, determinando maschi con un fenotipo cerebrale e comportamentale femminile. Questo sistema e la quaglia giapponese sono stati quindi ampiamente utilizzati per lo studio dell'azione degli xenoestrogeni sullo sviluppo embrionale delle aree encefaliche correlate al controllo del comportamento sessuale. La quaglia giapponese (*Coturnix japonica*) deriva dalla quaglia selvatica (*Coturnix coturnix*) in seguito a incroci e selezioni, ha quindi perso parte delle caratteristiche selvatiche della specie. Per questo motivo in questo lavoro è stato scelto come modello sperimentale la *Bobwhite quail* (*Colinus virginianus*), un particolare tipo di quaglia diffusa nel nord America che conserva ancora le caratteristiche selvatiche della specie, presenta anch'essa uno spiccato dimorfismo sessuale a livello del sistema a VT, è ampiamente usata in ambito scientifico soprattutto per lo studio dei distruttori endocrini (e quindi degli xenoestrogeni) in quanto rappresenta un ottimo modello sperimentale per determinare l'impatto ambientale di queste sostanze. Per simulare al meglio l'esposizione al MXC presente in natura, si è scelto di somministrarlo tramite la dieta, inoltre sono state studiate tre generazioni successive di animali (parental, F1, F2) per determinare il trasferimento della sostanza dalla madre all'uovo. Tutte le generazioni sono state suddivise in tre gruppi sperimentali: controllo (C), 5 ppm MXC (L), 10 ppm MXC (H), ma solo la parental e la F1 hanno ricevuto la sostanza tramite la dieta.

Per determinare gli effetti del MXC sul sistema parvocellulare a VT, abbiamo analizzato quantitativamente l'immunoreattività per la VT nel nucleo preottico mediale (POM), nel nucleo della stria terminale (BST) e nel setto laterale (SL). I risultati hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'immunoreattività alla VT a livello del POM negli animali F1 e F2 trattati con la dose L di MXC; a livello del SL è presente un aumento dell'immunoreattività nel gruppo L della F2; a livello del BST non sono state riscontrate differenze statisticamente significative.

Questi dati mostrano che il MXC somministrato nella dieta può avere un effetto organizzazionale sullo sviluppo del sistema nervoso delle generazioni successive. Si può quindi ipotizzare che sono necessari la metabolizzazione e l'accumulo della molecola per rilevarne le conseguenze sullo sviluppo dell'encefalo. Possiamo inoltre considerare il sistema parvocellulare a VT della *Bobwhite quail* un buon marker per lo studio degli effetti dei distruttori endocrini sulle specie animali selvatiche, nonostante risulti sensibile in modo leggermente diverso rispetto a quello della quaglia giapponese.

Ringraziamenti: Questo studio è stato condotto con finanziamenti della Regione Piemonte.

EFFETTI PROTETTIVI DEL TESTOSTERONE E DEI SUOI DERIVATI NELLA NEUROPATIA DIABETICA SPERIMENTALE.

Marzia Pesaresi^{#1}, Ilaria Roglio¹, Silvia Giatti¹, Roberto Bianchi², Guido Cavaletti³, Donatella Caruso⁴, Samuele Scurati⁴, Luis M. Garcia-Segura⁵, Giuseppe Lauria⁶, Roberto C. Melcangi¹
¹Istituto di Endocrinologia e Centro di Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Università di Milano, Italia, marzia.pesaresi@unimi.it; ²Dipartimento di Biochimica Molecolare e Farmacologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano, Italia; ³Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomedicali, Università di Milano "Bicocca", Monza, Italia; ⁴Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, Milano, Italia; ⁵Istituto Cajal, C.S.I.C., Madrid, Spagna; ⁶Unità di Malattie Neuromuscolari, Istituto Neurologico Nazionale "Carlo Besta", Milano, Italia.

La neuropatia periferica rappresenta una delle maggiori complicanze croniche del diabete mellito con un'incidenza pari al 50% nei pazienti affetti da questa patologia.

Nella fase precoce della malattia si può evidenziare una ridotta attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi, ridotto flusso sanguigno endoneurale ed ipossia neurale che si riflettono, poi, nella riduzione della velocità di conduzione nervosa (NCV), perdita assonale, demielinizzazione e disfunzione nervosa. Inoltre, da studi condotti nel nostro laboratorio, è stato recentemente dimostrato che la neuropatia diabetica causa anche la diminuzione dell'espressione genica della glicoproteina P0 e della proteina della mielina periferica PMP22, che sono due proteine coinvolte nella formazione e mantenimento della guaina mielinica (Leonelli et al., 2007). Gli approcci terapeutici fino ad ora disponibili si basano principalmente sul controllo della glicemia e dello stress ossidativo, ma non sono in grado di prevenire completamente la comparsa e la progressione della malattia. In questo contesto, risultano quindi particolarmente interessanti nostre recenti osservazioni che hanno evidenziato come gli steroidi neuroattivi possono rappresentare un possibile approccio terapeutico per la neuropatia diabetica. In particolare abbiamo osservato che il trattamento con il progesterone (P) e i suoi metaboliti (diidroprogesterone e tetraidroprogesterone), di ratti maschi affetti da neuropatia diabetica (ratti resi diabetici mediante trattamento con streptozotocina, STZ), è in grado di ripristinare diversi parametri molecolari, biochimici e funzionali che vengono alterati dalla patologia (Leonelli et al., 2007). Sulla base di queste osservazioni, è stato quindi analizzato il possibile effetto neuroprotettivo di altri steroidi neuroattivi, come ad esempio gli androgeni. In particolare, ratti maschi diabetici sono stati trattati a giorni alterni per un mese con il testosterone (T) o con i suoi metaboliti, diidrotestosterone (DHT) e 5alfa-androstan-3alfa, 17beta-diolo (3 α -diolo) e parametri molecolari e funzionali sono stati analizzati. I dati da noi ottenuti (Roglio et al., 2007) hanno dimostrato che il trattamento con DHT o con 3 α -diolo è in grado di contrastare le alterazioni indotte dal diabete sulla NCV, di far diminuire parzialmente la soglia di percezione del calore e di ripristinare la densità delle fibre intraepidermiche (IENF). Inoltre il trattamento con DHT è anche in grado di aumentare i livelli di espressione genica della P0 e di riportare alla norma l'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi. Il trattamento con il T, invece, risulta efficace solo sulla densità delle IENF. Nel loro insieme queste osservazioni suggeriscono che anche steroidi neuroattivi come il T ed i suoi derivati possono rappresentare un interessante approccio terapeutico per la neuropatia diabetica.

(PRIN-2005060584_004 and FIRST - Università degli studi di Milano)

Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience*. 2007 Feb 23;144(4):1293-304.

Roglio I, Bianchi R, Giatti S, Cavaletti G, Caruso D, Scurati S, Crippa D, Garcia-Segura L.M., Camozzi F., Lauria G., Melcangi R.C. Testosterone derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci*. 2007 May;64(9):1158-68.

NELL'UOMO L'ATTIVITA' GH LIBERATRICE DI GHRELIN E' SENSIBILE AL FEEDBACK INIBITORIO DI IGF-I MA NON DEL GH STESSO

Elisa Pomero, Elena Gramaglia, Fabrizio Riganti, Ilaria Olivetti, Barbara Lucatello, Andrea Benso, Ezio Ghigo, Fabio Broglio
elisa_pomero@hotmail.com

Divisione di Endocrinologia e Metabolismo, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino, Italia

La secrezione di GH è regolata dalla complessa interazione tra GHRH, somatostatina e numerosi altri neurotrasmettitori ed ormoni centrali e periferici. Ghrelin è stato ipotizzato essere un amplificatore della fisiologica pulsatilità del GH e pare agire attraverso meccanismi parzialmente indipendenti da GHRH e somatostatina. La secrezione di GH in risposta alla somministrazione di GHRH risulta fortemente inibita durante somministrazione di GH ricombinante (rhGH), compatibilmente con un feedback negativo mediato da somatostatina sul GH. Ad oggi, tuttavia, la presenza di un feedback negativo dell'asse GH/IGF-I sulla risposta somatotropa a ghrelin non è stata mai indagata. Al fine di descrivere tali possibili relazioni di feedback negativo, la risposta somatotropa alla somministrazione acuta di ghrelin acilato (1,0 µg/kg e.v. a bolo a 0') è stata studiata: 1) durante infusione continua di soluzione salina; 2) durante infusione di rhGH (4 µg/kg/h i.v. da -180' a +60'); 3) dopo 4 giorni di trattamento con rhGH (10 µg/kg/die s.c. alle h 21.00). I livelli medi di GH durante infusione di salina sono risultati: 0.65 ± 0.08 µg/l. Come atteso, l'infusione di rhGH ha indotto un incremento significativo dei livelli medi di GH (23.6 ± 1.7 µg/l; $p < 0.01$). Durante infusione di salina, la somministrazione acuta di ghrelin ha indotto un marcato incremento dei livelli di GH (Δ picco: 53.0 ± 5.8 µg/l; Δ AUC: 2054 ± 161 µg/l/h; $p < 0.01$ vs basale). La risposta di GH a ghrelin non è risultata significativamente modificata dalla contemporanea infusione di rhGH (Δ picco: 55.6 ± 10.0 µg/l; Δ AUC: 1962 ± 319 µg/l/h). Al contrario, dopo 4 giorni di pretrattamento con rhGH tale da incrementare significativamente i livelli circolanti di IGF-I (giorno 1: 212.2 ± 15.6 ; giorno 5: 289.5 ± 46.8 µg/l/h; $p < 0.01$), la risposta di GH a ghrelin è risultata significativamente ridotta (Δ picco: 19.0 ± 4.1 µg/l; Δ AUC: 753 ± 174 µg/l/h; $p < 0.01$ vs condizioni basali). In conclusione, questi risultati suggeriscono che l'attività GH liberatrice di ghrelin acilato è sensibile a una regolazione retrograda inibitoria mediata dalle IGF-I ma non è influenzata dal GH stesso.

STEROIDI NEUROATTIVI E NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA TRAUMA: EFFETTI PROTETTIVI ESERCITATI DAL PROGESTERONE E DAL DIIDROPROGESTERONE

Ilaria Roglio^{#1}, Roberto Bianchi², Silvia Giatti¹, Marzia Pesaresi¹, Samuele Scurati³, Donatella Caruso³, Roberto C. Melcangi¹

¹Ist. di Endocrinologia e Centro di Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Università di Milano, Milano, Italia, ilaria.roglio@unimi.it; ²Dip. di Biochimica Molecolare e Farmacologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, Italia; ³Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, Milano, Italia

La neuropatia periferica conseguente a trauma del nervo è una delle più comuni cause di deficit funzionali negli incidenti stradali o domestici. Gli approcci terapeutici oggi disponibili in clinica per promuovere la rigenerazione del nervo danneggiato presentano ancora numerosi limiti in quanto non assicurano il completo recupero della funzionalità del nervo e non prevengono la comparsa dei disturbi neurologici associati alla neuropatia periferica causata da un trauma del nervo. Negli ultimi anni, studi condotti dal nostro e da altri laboratori hanno indicato che gli steroidi neuroattivi esercitano effetti protettivi e rigenerativi in diversi modelli sperimentali di neuropatia periferica di tipo acquisito (Roglio et al., 2007). Su questa base abbiamo quindi valutato l'azione protettiva del progesterone (P) e del suo derivato 5alfa-ridotto, il diidroprogesterone (DHP), sui parametri molecolari e funzionali alterati in seguito allo schiacciamento del nervo. La lesione del nervo in animali non trattati con gli steroidi neuroattivi induce numerose alterazioni biochimiche e funzionali a livello del sistema nervoso periferico. In particolare, l'espressione delle principali proteine della mielina (la P0, la PMP22, la MAG, la MAL e la Cx32) risulta ridotta dopo l'induzione del danno, mentre i livelli delle isoforme da 18.5 e da 21.5 kDa della proteina MBP vengono stimolati. Inoltre, l'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi aumenta in risposta al danno probabilmente a causa di un effetto post-trascrizionale sull'espressione delle isoforme della subunità alfa della pompa stessa. La funzionalità nocicettiva e motoria del nervo, valutata mediante alcuni test comportamentali, risulta gravemente compromessa. Infine, i livelli degli steroidi neuroattivi presenti nel nervo sciatico in seguito alla lesione vengono significativamente diminuiti. Ulteriori nostre osservazioni hanno dimostrato che il trattamento con steroidi neuroattivi è in grado di contrastare alcune di queste complicanze periferiche indotte dal trauma del nervo. In particolare, abbiamo osservato che il P ed il suo metabolita, DHP, sono in grado di: (1) riportare i livelli di messaggero delle proteine della mielina a valori prossimi alla normalità, sebbene con modalità e tempi differenti; (2) ripristinare totalmente l'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi; (3) indurre un completo recupero della sensibilità nocicettiva, ma non della capacità motoria. In conclusione, dato l'interesse della ricerca biomedica nel trovare molecole atte a prevenire le complicanze conseguenti ad un trauma del nervo, i risultati da noi ottenuti mediante somministrazione di steroidi neuroattivi risultano particolarmente promettenti nell'ambito di nuove strategie terapeutiche per questo tipo di neuropatia periferica.

(PRIN-2005060584_004 e FIRST dell'Università degli Studi di Milano).

Roglio I., Giatti S., Pesaresi M., Bianchi R., Cavaletti G., Lauria G., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. Neuroactive steroids and peripheral neuropathy. *Brain Res. Rev.* 2007, doi:10.1016/j.brainresrev.2007.04.010

Pubblicato a Torino, 11 febbraio 2008

Copyright GISNe