



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN
RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

(Direttore Prof. Giovanni Garippa)

INDIRIZZO IV: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXII CICLO)

(Coordinatore Prof. Sergio Ledda)

STUDIO SULL'ESPRESSIONE E DISTRIBUZIONE
DELLA P450 AROMATASI NELL'IPOTALAMO OVINO
A DIFFERENTI STADI DI SVILUPPO FETALE

Docente Guida
Dott. Sergio Gadau

Tesi Di Dottorato Della
Dott.ssa Arcadia Mura

ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009

INDICE

Scopo della tesi	3
Anatomia del diencefalo	4
▪ Conformazione esterna	
▪ Terzo ventricolo	
▪ Talamencefalo	
▪ Diencefalo ventrale	
▪ Rapporti anatomici dell'ipotalamo	
▪ Divisioni e struttura dell'ipotalamo	
Fisiologia dell'Ipotalamo	25
▪ Controllo ipotalamico della funzione riproduttiva	
L'aromatasi	41
▪ Distribuzione	
▪ Regolazione	
▪ Implicazioni dell'aromatasi nella regolazione della plasticità del Sistema Nervoso Centrale	
▪ Ruolo dell'aromatasi nella neuroprotezione	
▪ Aromatasi nei pesci	
Materiali e Metodi	67
▪ Campionamento	
▪ Immunoistochimica	
▪ Ibridazione <i>in situ</i>	
▪ Immunofluorescenza	
▪ Western blot	
▪ PCR	
▪ Analisi statistica	
Risultati e Discussione	80
Conclusioni	107
Bibliografia	110

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni il concetto di benessere animale è stato ampiamente dibattuto e questo dibattito ha fornito lo spunto per molte riflessioni e ricerche di carattere etico e scientifico. Nonostante le motivazioni alla base degli studi sul benessere animale siano soprattutto di ordine etico gli studiosi hanno cercato di elaborare definizioni e parametri di valutazione il più possibile indipendenti da giudizi morali. Una definizione di benessere espressa è la seguente: "*Il benessere di un individuo è la sua condizione rispetto alla sua capacità di adattarsi all'ambiente*". Il benessere animale è un sfera complessa che include aspetti fisici, comportamentali e psicologici. Condizioni fisiche come un buon stato di nutrizione e la mantenuta capacità di riprodursi possono, ad esempio, essere considerate prove di benessere. E' indubbio che un corretto funzionamento di organi

e apparati sia alla base del benessere animale, al fine del mantenimento di funzioni fisiologiche importantissime e di una giusta interazione con l'ambiente circostante. Uno degli apparati di notevole importanza in questo senso, viste le capacità di elaborare risposte di elevata complessità agli stimoli provenienti dall'esterno/interno dell'organismo animale è il sistema nervoso. In particolare una sua regione anatomica come l'ipotalamo, sede di numerosi aggregati neuronali in grado di regolare le più disparate funzioni. L'ipotalamo rappresenta infatti uno dei principali centri di controllo del sistema nervoso autonomo o vegetativo; controlla cioè, attraverso le vie nervose e in parte attraverso le secrezioni dell'ipofisi, la motilità viscerale, i riflessi, il bilancio idro-salino, il mantenimento della temperatura corporea, l'appetito e l'espressione degli stati emotivi. Altri ruoli fondamentali svolti dall'ipotalamo sono la regolazione della riproduzione attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, la

regolazione del controllo dell'alimentazione, attraverso i cosiddetti "centri della fame, della sazietà e della sete". L'ipotalamo è anche in grado di controllare emozioni, stati d'animo e umore, nonché anche il comportamento sessuale. Questo è possibile grazie alla connessione anatomica dell'ipotalamo con il talamo e il sistema limbico. D'altra parte, l'ipotalamo sembra essere una delle parti più "antiche" dal punto di vista evoluzionistico; in questa accezione, si può affermare che l'ipotalamo funge da "connessione" tra i due sistemi suddetti e la relativa risposta corporea.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di approfondire alcune conoscenze neuroanatomiche sull'ipotalamo, in particolare rivolgendo la nostra attenzione all'area ipotalamica anteriore, attraverso lo studio dell'espressione e localizzazione di un enzima molto presente in questa regione anatomica, l'aromatasi, coinvolto in numerose

attività di cruciale importanza per l'animale, come la differenziazione sessuale del cervello (determinante poi per il comportamento sessuale nel soggetto adulto), la neurogenesi, la plasticità neuronale, la neuroprotezione. La specie scelta per questa ricerca è stata l'ovino, vista la sua ampia diffusione nella nostra regione e considerando il fatto che si tratta di una specie a lunga gestazione, dove il periodo critico di differenziazione sessuale del cervello è compreso in un preciso arco di tempo, nella fase di sviluppo prenatale. Inoltre la possibilità di lavorare con materiale (feti) prelevato dai vari stabilimenti di macellazione della Sardegna, ha consentito l'allestimento di un protocollo sperimentale rigoroso che non ha richiesto il sacrificio di animali da esperimento

ANATOMIA DEL DIENCEFALO

Il diencefalo deriva dalla divisione della parte caudale della vescicola prosencefalica dell'embrione e ne rappresenta la parte più cospicua prima dello sviluppo del telencefalo. Occupa così l'estremità rostrale del tronco cerebrale e si trova strettamente associato al telencefalo, che lo copre precocemente ed estesamente. È visibile solo in corrispondenza della base, mentre la parte dorsale e le sue porzioni laterali possono essere studiate solo dopo l'asportazione della massa telencefalica, in quanto i due emisferi raggiungono uno sviluppo tale da sormontare la quasi totalità del diencefalo.

Come l'insieme del prosencefalo, sembra derivato dalle sole lamine dorsale e alari del tubo neurale, poiché il solco limitante s'incurva ventralmente e si esaurisce raggiungendo la sua estremità caudale. Tuttavia una nuova depressione lineare, //

solco ipotalamico, compare su ciascuna parete, destra e sinistra, della sua cavità o *terzo ventricolo*. Come il solco limitante, questo solco segna il limite tra due parti molto differenti per struttura, funzione e connessione. Una parte dorsale, o *talamencefalo*, che deriverebbe dalla lamina alare e deputata all'integrazione delle afferenze che verranno avviate alla corteccia cerebrale; l'altra ventrale o *ipotalamo*, derivato dalla lamina basale, sede del controllo della regolazione di diverse funzioni vegetative. Entrambe le due parti sono costituite principalmente da sostanza grigia suddivisa in numerosi nuclei, ciascuno dei quali possiede connessioni e funzioni ben definite ed inoltre ad ognuna è annessa una ghiandola endocrina: *l'epifisi* alla parte dorsale e *l'ipofisi* alla parte ventrale.

CONFORMAZIONE ESTERNA

Il diencefalo, mediano e simmetrico, con forma di piramide tronca, è intercalato tra i centri assiali inferiori (midollo spinale, tronco encefalico) e quelli superiori (telencefalo). Al suo interno si ritrova la cavità del terzo ventricolo. Il diencefalo è situato rostralmente rispetto al mesencefalo, con il quale condivide alcune formazioni nucleari, ed è completamente rivestito dal telencefalo, ad eccezione della sua superficie ventrale, che affiora liberamente sulla superficie encefalica.

Il diencefalo si trova al centro della scatola cranica ed è delimitato rispetto al telencefalo dalla capsula interna. Per la sua descrizione si usa suddividerlo in una faccia ventrale o ipotalamica, una faccia dorsale, due facce laterali, una faccia anteriore e una faccia posteriore.

La **faccia ventrale** o **ipotalamica** è l'unica porzione del diencefalo ad affiorare sulla superficie encefalica e pertanto

risulta visibile ad occhio nudo senza bisogno di demolire nessun'altra formazione. Essa è delimitata posteriormente dal tronco encefalico (e precisamente dai peduncoli cerebrali), rostralmente dal chiasma ottico che la separa dai lobi frontali, e lateralmente dai poli temporali dei due emisferi. In direzione anteroposteriore, si riconoscono nella faccia ventrale tre strutture fondamentali assegnate all'ipotalamo, e cioè il *chiasma ottico*, il *tuber cinereum* o *peduncolo ipofisario* ed i *corpi mammillari*.

Il chiasma ottico è formato dalla giunzione dei due nervi ottici, di cui una parte delle fibre si decussano a questo livello. Il chiasma copre una piccola parte relativa al telencefalo a cui è annesso l'ipotalamo: è la parte preottica di quest'ultimo. Il principale costituente di questa parte è la lamina terminale grigia, che chiude l'estremità rostrale del terzo ventricolo. Da ciascun lato, il chiasma ottico si continua con il tratto ottico

obliquo in direzione caudolaterale.

La **faccia dorsale** del diencefalo è ricoperta dalla *tela corioidea* del terzo ventricolo che contribuisce alla costituzione dei ventricoli laterali: questa si riflette nel punto in cui viene a contatto con la superficie diencefalica, dando luogo ad una linea molto spessa, orientata in senso sagittale, che prende il nome di *tenia del talamo*. All'estremo posteriore della faccia dorsale del diencefalo troviamo due formazioni, l'*epifisi* e l'*abenula*.

La faccia laterale è percorsa obliquamente dal tratto ottico, che si allarga in direzione dorso caudale dividendosi in due radici: laterale e mediale. La prima è rostrale ed è di gran lunga più larga; si continua nel corpo genicolato laterale. La radice mediale, più stretta e caudale, passa attraverso la parte profonda del corpo genicolato mediale, al di là del quale le sue fibre si portano al collicolo rostrale. Rostralmente al tratto ottico, le fibre del *crus cerebri*, che hanno incrociato la faccia

profonda della radice, raggiungono quelle che uniscono il talamo alla corteccia cerebrale. Esse entrano, con quest'ultime, nella costituzione della capsula interna, lamina larga ed ispessita di sostanza bianca la cui parte caudale copre la faccia rostro laterale del talamo e lo separa dal corpo striato. Ne risulta che la faccia rostro laterale del talamo, unita al braccio caudale della capsula interna, è visibile soltanto dopo ablazione di quest'ultima. In superficie si rende evidente, rostralmente ai corpi genicolati, il rilievo del *pulvinar*, che appartiene alla faccia dorsale del talamo. Dorso-caudalmente al tratto ottico, tra questo e i collicoli, si estende il *metatalamo* formato essenzialmente dal corpo genicolato mediale e laterale.

La **faccia anteriore** comprende anch'essa i poli anteriori dei soli talami, ed ha un'estensione abbastanza modesta. I suoi limiti possono essere individuati dal chiasma ottico, in basso, e dai forami interventricolari (di Monro), in alto.

La **faccia posteriore** del diencefalo non ha una vera e propria connotazione anatomica, e può essere individuata come un piano virtuale che si estende dalla commessura posteriore fino al limite posteriore dei corpi mammillari ipotalamici.

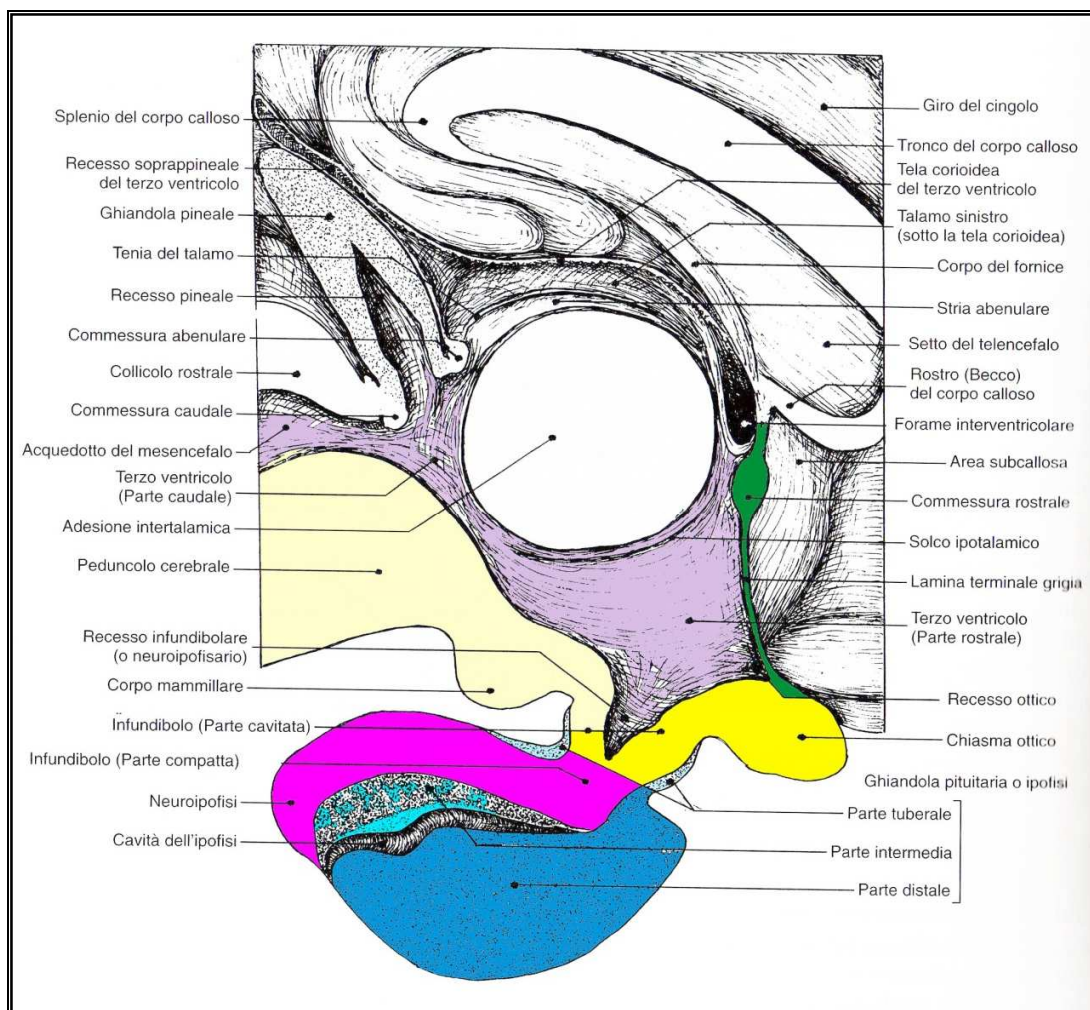


Fig. 1. Rappresentazione schematica della struttura macroscopica del diencefalo di ruminante. Sezione sagittale. (Da R. Barone, VI vol., Neurologia, modificato).

TERZO VENTRICOLO

Il terzo ventricolo deriva dalla primitiva cavità del diencefalo.

Nel suo complesso si presenta come una cavità appiattita assai irregolare, che comunica caudalmente con l'acquedotto del Silvio e rostralmente con i ventricoli laterali mediante i forami interventricolari. Il III ventricolo presenta a considerare un pavimento, due pareti laterali, una volta e due estremità.

Il pavimento è stretto e assai irregolare ad eccezione di un brevissimo tratto rostrale telencefalico formato dalla lamina terminale grigia e rostralmente inizia col chiasma ottico che dorsalmente da attacco a quest'ultima.

Le pareti laterali consistono essenzialmente della parte dorsale dell'ipotalamo e sono lisce e leggermente concave.

La volta si estende dal forame interventricolare alla commissura caudale. Al suo livello, l'ependima si unisce direttamente alla pia madre con la quale forma la tela corioidea.

Quando la faccia dorsale del diencefalo è messa a nudo, l'asportazione di questa tela apre la volta del ventricolo e ne rimane da ciascun lato soltanto il vestigio della tenia del talamo. La pia madre corioidea s'invagina lungo ciascuno dei margini nella cavità ventricolare assieme ai suoi vasi. Rivestita dall'ependima, essa forma con questo un *plesso corioideo del terzo ventricolo*. La volta si solleva in un diverticolo stretto e profondo, *il recesso soprappineale*, che precede l'attacco della ghiandola omonima (epifisi), caudalmente al quale è presente un altro diverticolo, piccolo e stretto, *il recesso pineale*.

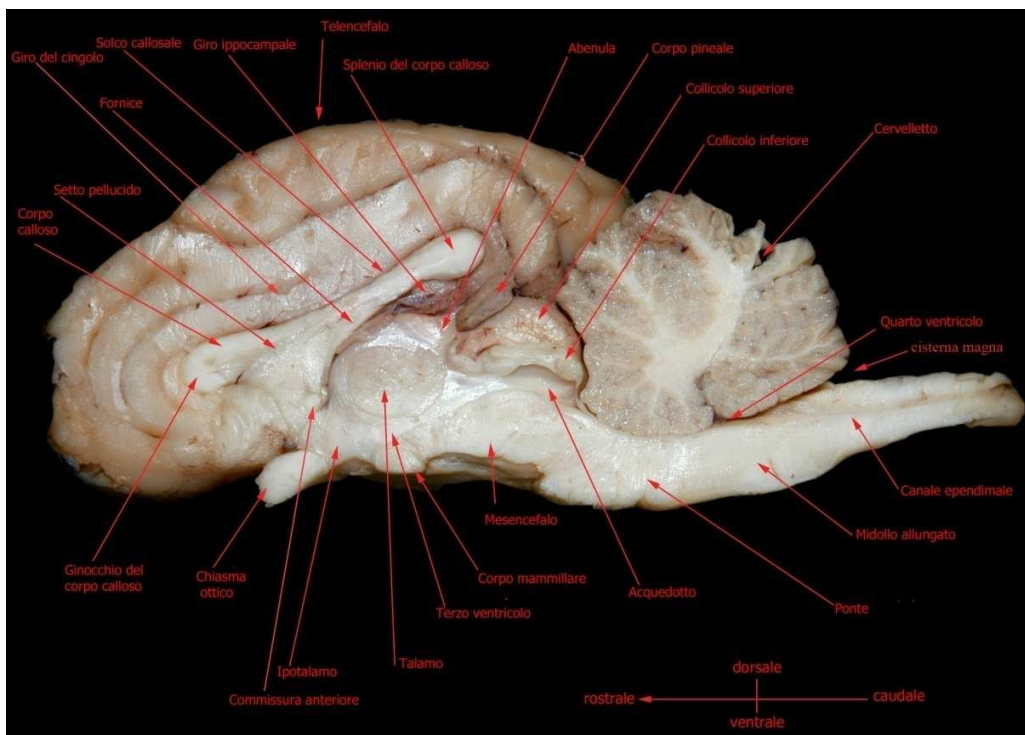


Fig. 2 . Encefalo di pecora in sezione sagittale.

TALAMENCEFALO

Il talamencefalo è un insieme di strutture importanti che occupa la parte dorsale e laterale del diencefalo ed è costituito da tre principali formazioni: *talamo, epitalamo, metatalamo*.

La sua parte più voluminosa è rappresentata dal **talamo**, formazione pari ed è un ispessimento di sostanza grigia. Con il suo controlaterale si incunea nella base del cervello tra i due corpi striati, con i quali stabilisce strette connessioni. Il talamo è rivestito dorsalmente da un sottile strato di sostanza bianca, lo strato zonale. Al talamo sono assegnate importantissime funzioni di ricezione e trasmissione delle informazioni di provenienza sia periferica che centrale.

L'**epitalamo** è una stretta bandella nervosa paramediana, in posizione arretrata rispetto al talamo. Comprende le *strie abenulari*, i *trigoni delle abenule*, la *commessura abenulare* e l'*epifisi*. Prende parte alle vie olfattive e soprattutto alle attività

del sistema limbico.

Il **metatalamo** si trova all'estremità caudale della faccia laterale di ciascun talamo ed è costituito dall'insieme dei corpi genicolati, laterale e mediale. È una parte funzionalmente specializzata del talamencefalo e si compone di due masse adiacenti di sostanza grigia, i *collicoli* mediale e laterale, connessi rispettivamente alle vie uditive e alle vie visive, controllate anche dalla corteccia cerebrale, con la quale possiedono connessioni, come i nuclei specifici del talamo.

DIENCEFALO VENTRALE

Come già detto, il diencefalo contiene al suo interno la cavità del terzo ventricolo, che permette di suddividere con un piano sagittale l'intera struttura in due metà pari e simmetriche.

Ciascuna di queste due metà può essere ulteriormente

suddivisa in una porzione ventrale ed in una dorsale, grazie all'esistenza di un solco che attraversa in senso trasversale tutta la cavità del terzo ventricolo, e che viene denominato *solco ipotalamico*. La porzione ventrale, ossia quella parte di diencefalo che rimane al di sotto di tale solco, cioè il diencefalo ventrale, contrariamente al talamencefalo, che controlla le vie ascendenti, agisce essenzialmente sulle vie discendenti della conduzione nervosa. Si compone di due parti che hanno una diversa importanza funzionale. una è l'*ipotalamo*, formazione impari e mediana che si estende dal chiasma ottico, anteriormente, fino al corpo mammillare, che ne rappresenta il limite posteriore, controlla i comportamenti e, con l'intervento del sistema nervoso "autonomo", l'attività dei visceri e dell'apparato circolatorio.

L'altra formazione è caudale e agisce principalmente sulla motilità somatica: è il *subtalamo*, dorsalmente delimitato dalla

parte laterale del talamo, mentre ventralmente è delimitato dalla capsula interna. La sua faccia caudale non è delineata in maniera netta perché la sostanza nera e il nucleo rosso vi penetrano e vi terminano.

RAPPORTI ANATOMICI DELL'IPOTALAMO

L'ipotalamo costituisce il pavimento del terzo ventricolo, ha rapporti anatomici superiormente col talamo, posteriormente con i peduncoli cerebrali, anteriormente col chiasma ottico e inferiormente con l'ipofisi, con la quale è a stretto contatto non solo anatomicamente ma anche funzionalmente. Il rapporto tra queste due strutture è detto "asse ipotalamo-ipofisario" e collega il sistema nervoso al sistema endocrino o, per meglio dire, permette al primo di svolgere azioni di regolazione sul secondo. Osservando la sua porzione ventrale, troviamo il *tuber*

cinereum, col quale si unisce all'ipofisi per mezzo di un peduncolo denominato *peduncolo ipofisario*, e posteriormente i *corpi mammillari*.

DIVISIONI E STRUTTURA

L'ipotalamo è costituito da cellule della sostanza grigia raggruppate in numerosi nuclei, la maggior parte piccoli, ma di grande importanza funzionale, distinti topograficamente, a cui corrisponde una reale ripartizione delle funzioni. Si riconoscono così tre regioni: **caudale o mammillare, intermedia e rostrale**, questa ultima incentrata sul chiasma ottico. Sono collegate con la corteccia cerebrale, i centri del telencefalo, con il talamo e l'epitalamo, con il mesencefalo e il bulbo, da cui arrivano o ai quali giungono impulsi sensoriali vari e fibre nervose efferenti.

La regione ipotalamica caudale è formata dal corpo mammillare e dalle parti adiacenti della sostanza grigia ipotalamica. La sua parte caudale si prolunga medialmente al subtalamo per continuarsi senza limite preciso con la formazione reticolare del mesencefalo. Da ciascun lato, questa regione comprende due nuclei caratteristici, che appartengono al corpo mammillare: il *nucleo mammillare mediale* e il *nucleo mammillare laterale*, un po' più rostrale rispetto al precedente.

L'area ipotalamica dorso-caudale presenta i seguenti nuclei: *nucleo premammillare*, *nucleo mammillare cinereo*, *nucleo ipotalamico perifornicale* e il *nucleo periventricolare caudale*. I nuclei mammillari ricevono per mezzo del fornice le loro afferenze più importanti, che provengono dall'ippocampo.

La regione ipotalamica intermedia ha come centro il *tuber cinereum* e perciò anche detta tuberale. Questa regione dell'ipotalamo presenta, oltre a rapporti col sistema nervoso

autonomo, un'importante funzione neurosecernente: controlla l'attività dell'adenoipofisi mediante il tratto tuberoinfundibolare e attraverso il sistema portale ipotalamo ipofisario. La regione ipotalamica intermedia può essere distinta in una parte mediale e una laterale a cui sono annessi diversi nuclei; la parte mediale presenta tre nuclei, il più importante dei quali è il *nucleo ipotalamico ventromediale*, più denso e meglio delimitato, mentre il *nucleo ipotalamico dorsomediale* è meno delimitato e meno denso. Infine, il *nucleo infundibolare* è formato da neuroni piccoli o medi che per la maggior parte sono addossati all'ependima. La parte laterale è più estesa, ma i suoi nuclei sono piuttosto diffusi e mal delimitati. Sono presenti i nuclei laterali del tuber e più caudalmente il *nucleo tuberomammillare*.

La regione ipotalamica rostrale è composta da tre regioni: soprachiasmatica, sopraottica e preottica, quest'ultima di

origine telencefalica, ma funzionalmente integrata alla precedente. La regione sopraottica comprende due nuclei principali, ben definiti: il *nucleo sopraottico*, situato dorsalmente al chiasma e alla parte adiacente del tratto ottico; il *nucleo paraventricolare*, un po' più rostrale che si estende pure, a contatto con l'ependima, fino in vicinanza della commessura rostrale. Questi due nuclei sono formati da neuroni di medie e grandi dimensioni, intensamente colorabili e raggruppati piuttosto densamente. I neuroni sintetizzano due peptidi: gli uni ossitocina, gli altri vasopressina. Legati a una proteina trasportatrice, questi peptidi sono veicolati mediante flusso assonico fino alla neuroipofisi, dove vengono liberati, passando nel sangue.

Un altro nucleo presente in quest'area è il nucleo soprachiasmatico, formato da piccoli neuroni rotondeggianti ed è situato dorsalmente al chiasma ottico.

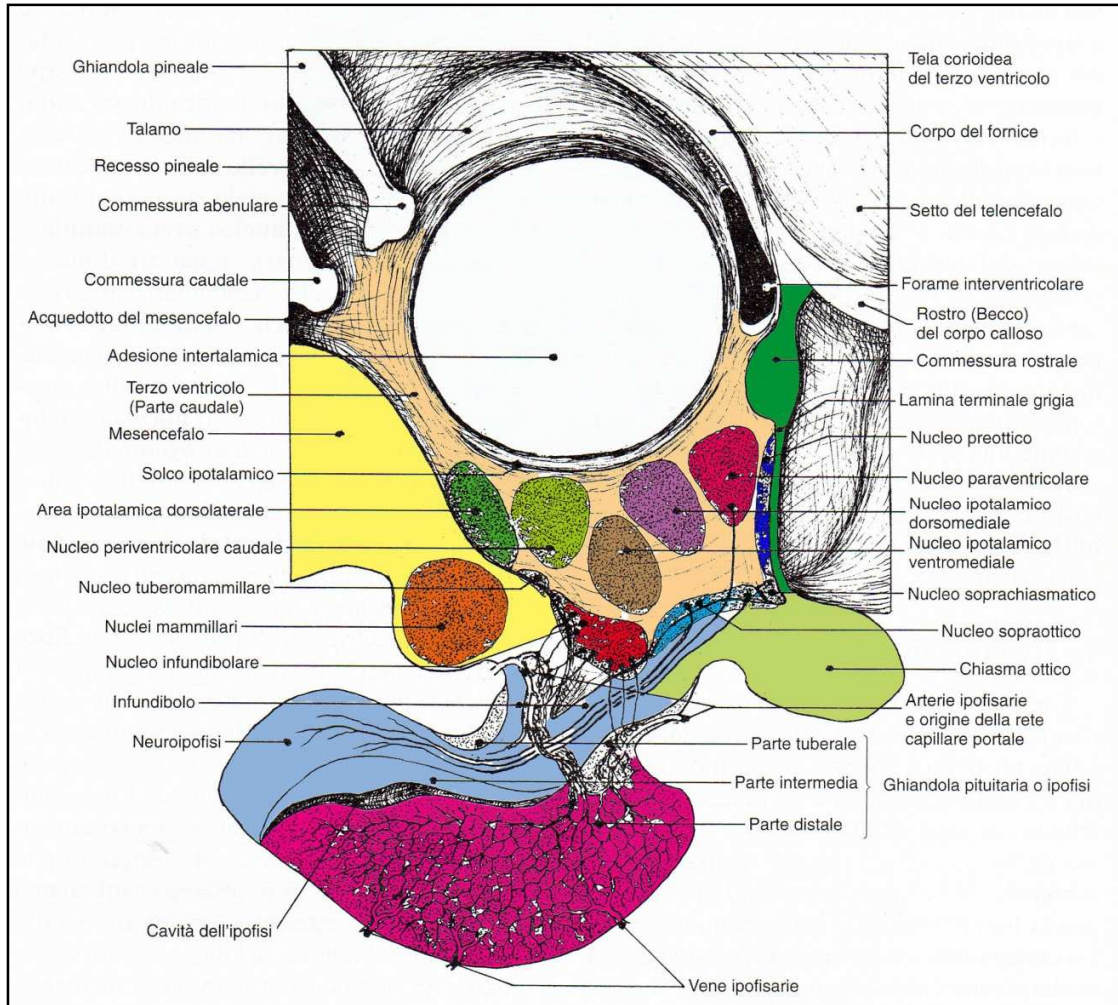


Fig.3. Rappresentazione schematica della struttura del diencefalo e della disposizione topografica dei più importanti nuclei ipotalamici. (Da R. Barone, VII vol., Neurologia, modificato).

FISIOLOGIA DELL'IPOTALAMO

Nell'ipotalamo sono state individuate zone circoscritte (centri) che assolvono funzioni ben precise nell'organismo. L'ipotalamo rappresenta infatti uno dei principali centri di controllo del sistema nervoso autonomo o vegetativo, controlla cioè, sia attraverso il sistema ipofisario che il sistema endocrino, diverse attività organiche come: la motilità viscerale (apparato digerente), i riflessi, il ritmo sonno-veglia (ritmi biologici), il bilancio idrosalino, il mantenimento della temperatura corporea, l'appetito e l'espressione degli stati emotivi. Le varie aree ipotalamiche hanno funzioni antagoniste, infatti le regioni rostrale e intermedia fanno intervenire il sistema parasimpatico e il sistema endocrino, mentre le regioni caudali agiscono sul simpatico, assicurando il mantenimento dell'omeostasi, indispensabile per la sopravvivenza dell'individuo.

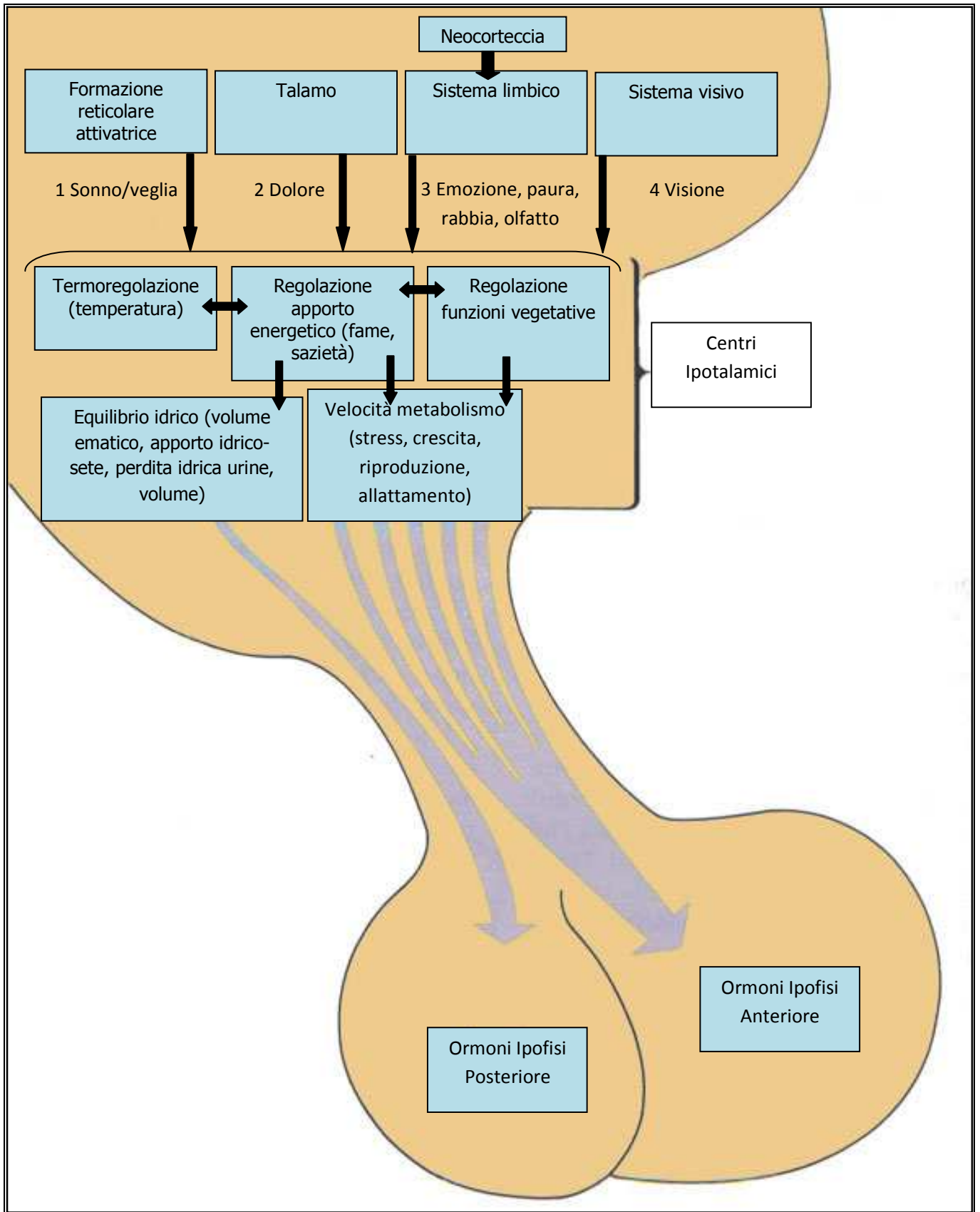


Fig. 4. Rappresentazione schematica delle principali funzioni ipotalamiche.

L'ipotalamo è una struttura specializzata del sistema nervoso centrale nella quale avviene la fusione tra il sistema endocrino e quello nervoso: nel suo contesto stimoli nervosi si trasformano in secrezioni ormonali. L'elemento anatomico-funzionale caratteristico di questa fusione è il neurone peptidergico, cellula nervosa specializzata che sintetizza polipeptidi con funzione ormonale.

Informazioni di natura ambientale, ormonale, nervosa e metabolica giungono al SNC dai nuclei ipotalamici. Tali informazioni determinano un'eccitazione dei neuroni presenti nell'ipotalamo che reagiscono in due maniere: producendo neurotrasmettitori (norepinefrina, dopamina, serotonina), e polipeptidi capaci di controllare le funzioni dell'ipofisi o in maniera diretta (neuroipofisi) o in maniera indiretta (adenoipofisi).

Due dei nuclei ipotalamici (sopraottico e paraventricolare)

collegano direttamente l'ipotalamo all'ipofisi tramite neuroni (magno cellulari) che, partendo dall'ipotalamo terminano con i loro assoni nei capillari della neuroipofisi (porzione posteriore dell'ipofisi, minore per dimensioni), formando un fascio ipotalamo-neuroipofisario che unisce i due organi e forma così il suddetto asse ipotalamo-ipofisario. Questi neuroni producono due ormoni, la vasopressina e l'ossitocina che vengono accumulati in vescicole e rilasciati a seguito di uno stimolo adeguato. I neuroni magno cellulari contraggono intimi rapporti con una ricca rete di capillari sanguiferi che sono caratterizzati dal fatto di possedere un'avventizia reticolare invece che, come tutti gli altri capillari del sistema nervoso, una membrana limitante gliale perivascolare. Tali rapporti con i capillari hanno il compito, soprattutto, di controllare la pressione osmotica del sangue circolante. I neuroni di questi nuclei sarebbero dei recettori (osmocettori) che reagiscono all'aumento della

pressione osmotica con una scarica d'impulsi che libera il neurosecreto a livello della neuroipofisi. Il neurosecreto è costituito da una proteina, la neurofisina, e da un ormone, la vasopressina. La vasopressina aumenta la permeabilità all'acqua dei tubuli contorti distali del rene, con riassorbimento consecutivo di acqua, per cui la sua azione riduce la perdita di questa con le urine (azione antidiuretica). Inoltre, attraverso la contrazione della muscolatura liscia dei vasi, riduce l'afflusso di sangue al rene potenziando l'effetto antidiuretico dell'ormone. Naturalmente la costrizione vascolare, che può essere non soltanto limitata al rene, porta ad un aumento generale della pressione arteriosa dell'organismo.

L'altro ormone è l'ossitocina, che chimicamente è simile alla vasopressina, ha un'azione specifica sul miometrio, che contrae durante il coito e il parto. Anche le cellule mioepiteliali degli adenomeri mammari sono interessate dall'azione dell'ossitocina

che ne provoca la contrazione, facilitando l'escrezione del latte.

L'ossitocina inoltre ha un'azione regolatrice sull'andamento del parto.

Altri nuclei ipotalamici presentano dei neuroni detti parvocellulari, dai quali si dipartono i relativi assoni che vanno a terminare con bottoni sinaptici su capillari infundibolari, e permettono in tal modo il controllo della adenoipofisi (ipofisi anteriore). Questo meccanismo di tipo vascolare è detto *sistema portale ipotalamo-ipofisario*, che è costituito da una branca dell'arteria ipofisaria che si ramifica in un letto capillare nell'ipotalamo inferiore, il sangue di questi capillari va nel sistema portale ipofisario che a sua volta si ramifica in un ulteriore letto capillare nell'adenoipofisi. A questo livello vengono riversati i cosiddetti "fattori di rilascio RH" (ad esempio il TRH per la tireotropina, il GnRH per la gonadotropina, l'ACRH per l'ormone adenocorticotropo, e il GHRH per il fattore della

crescita), ma anche di "fattori di inibizione IF" prodotti a livello ipotalamico. Intercettati dall'ipofisi, essi controllano la produzione e il rilascio dei corrispondenti ormoni ipofisari, i quali agiscono a loro volta sulla secrezione degli ormoni da parte degli organi bersaglio.

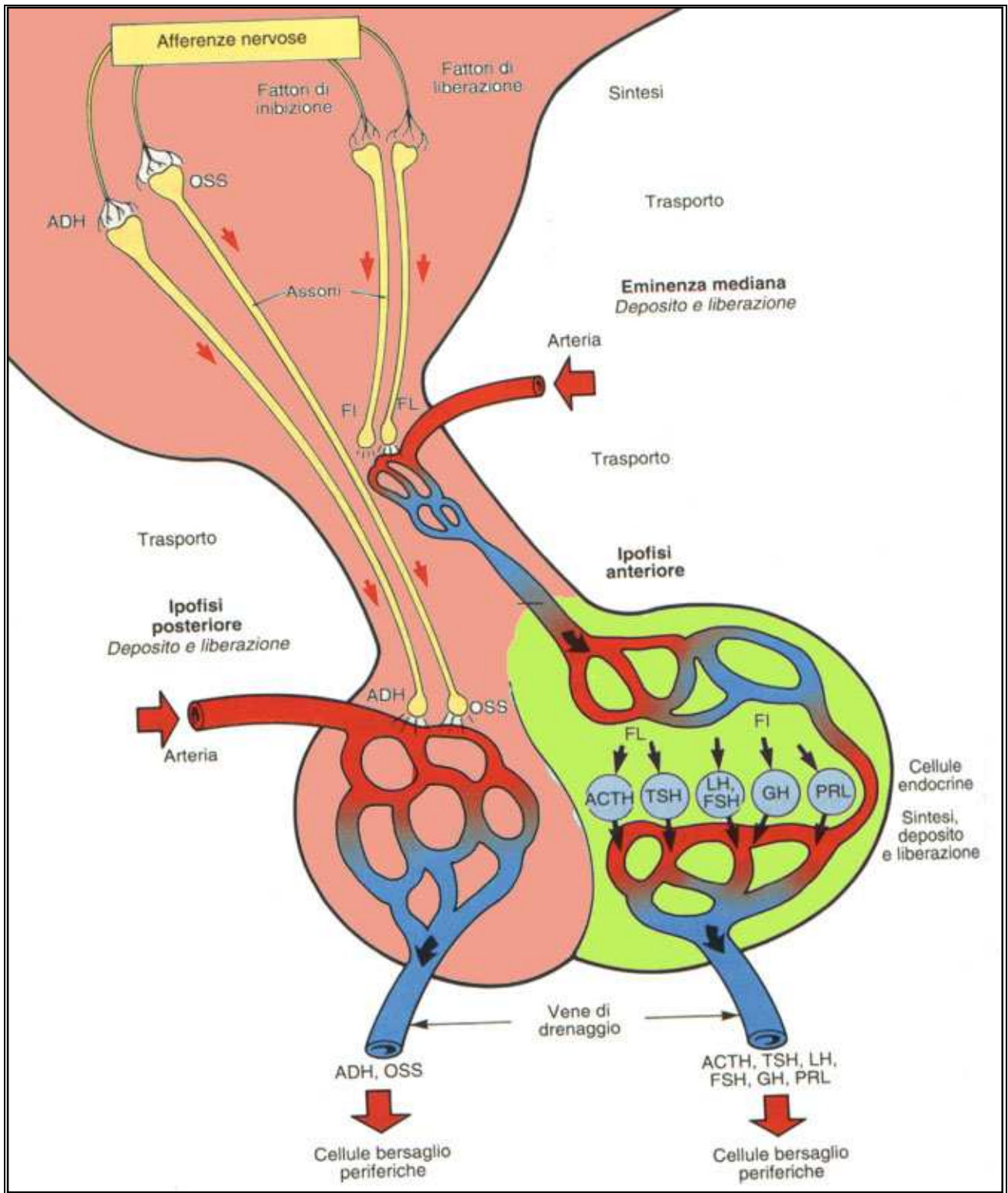


Fig. 5. Disegno schematico raffigurante il sistema portale ipotalamo-ipofisario.

Il rilascio dei fattori RH o IF è controllata da uno tipo di regolazione a "feedback negativo". Infatti, una diminuzione della concentrazione ematica degli specifici ormoni secreti dagli organi bersaglio farà aumentare il rilascio dei fattori RH; al contrario, un loro aumento provocherà una diminuzione del rilascio degli stessi fattori. Questo tipo di regolazione è molto importante e il suo malfunzionamento crea squilibri anche gravi nell'organismo.

I nuclei anteriore e preottico sono detti "centri del raffreddamento"; viceversa il nucleo posteriore è detto "centro del riscaldamento". Le cellule di cui sono composti sono sensibili alla variazione di temperatura corporea, parametro che ricavano dalla temperatura del sangue che arriva al cervello. Se la temperatura è al di sotto dei 36° C, l'ipotalamo anteriore reagisce liberando serotonina, la quale attiva il nucleo posteriore che, stimolando il simpatico, crea un innalzamento

della temperatura. Viceversa se la temperatura è elevata, il nucleo posteriore libera noradrenalina o dopamina, che stimolano i nuclei situati nella zona anteriore dell'ipotalamo, i quali agiscono aumentando la sudorazione e la vasodilatazione periferica. Questi meccanismi favoriscono la dispersione di calore e, quindi, l'abbassamento della temperatura corporea.

Un nucleo altrettanto importante è quello ventromediale che costituisce un vero "centro della sazietà" la sua stimolazione in un animale che sta mangiando determina l'arresto immediato dell'assunzione del cibo e il disinteresse per qualsiasi alimento.

Al contrario, la sua distruzione bilaterale provoca iperfagia e rapidamente una notevole obesità. Inversamente l'area ipotalamica laterale rappresenta un "centro della fame", la cui stimolazione provoca forte iperfagia, mentre la sua distruzione un rifiuto alimentare. Fisiologicamente questo controllo è reso possibile grazie agli impulsi derivanti da alcuni ormoni implicati

nella regolazione del metabolismo (in particolare quello del glucosio, per cui gli ormoni più importanti che regolano questa attività sono insulina e leptina) ma anche dalle informazioni ricavate dagli enterocettori relative alla concentrazione di zuccheri e acqua nel sangue che, se troppo bassa, stimola il desiderio di mangiare e di bere, mentre viceversa alte concentrazioni ematiche inibiscono l'assunzione di cibo.

Per quanto riguarda il controllo del sistema vascolare, la stimolazione dell'ipotalamo caudale determina vasocostrizione periferica, innalzamento della pressione arteriosa e accelerazione dei battiti cardiaci. Al contrario la stimolazione delle aree rostrali, in particolare dell'area preottica, ha come effetto la vasodilatazione, la caduta della pressione arteriosa ed il rallentamento cardiaco. Questi interventi mettono in attività il sistema simpatico nel primo caso, nel secondo attivano il parasimpatico.

L'ipotalamo interviene anche nel controllo dei cicli circadiani le cui variazioni dipendono dall'illuminazione (fotoperiodo). Infatti è riconosciuto che il nucleo soprachiasmatico ne è il principale centro di controllo. Esso riceve direttamente le fibre retino-ipotalamiche dai nervi ottici. L'attività di questo nucleo aumenta quando aumenta l'illuminazione attivando anche i nuclei ventromediale, dorsomediale e infundibolare; allo stesso tempo rallenta l'attività dei pinealociti per via simpatica.

L'ipotalamo è anche in grado di controllare emozioni, stati d'animo e umore, nonché anche il comportamento sessuale. Questo è possibile grazie alla connessione anatomica dell'ipotalamo con il talamo e il sistema limbico (il quale è un insieme funzionale di zone del cervello che regola impulsi e comportamenti emotivi, ma è anche legato alle funzioni organiche vegetative. D'altra parte, sembra essere una delle parti più "antiche" dal punto di vista evolucionistico). In questa

accezione, si può affermare che l'ipotalamo funge da "connessione" tra i due sistemi suddetti e la relativa risposta corporea. Infatti, stimolazioni di diversi centri dell'ipotalamo, danno luogo anche in questo caso a risposte diverse. La stimolazione dell'ipotalamo laterale nel gatto evoca le risposte caratteristiche della rabbia, quali il rizzarsi del pelo, l'arcuarsi del dorso e l'aumento della pressione arteriosa. Oppure il corpo amigdaloidale, può a seconda delle condizioni sperimentali fare iniziare o inibire l'intervento dell'ipotalamo nelle manifestazioni di paura o di rabbia e di aggressività. Tutte queste manifestazioni, a cui si accompagnano cambiamenti dell'omeostasi (accelerazione cardiaca, aumento pressione sanguigna, midriasi, erezione del pelo, etc.) richiedono un intervento del sistema simpatico e parasimpatico. Qualunque sia l'importanza della sua funzione nelle manifestazioni emotive, l'ipotalamo mostra la capacità di integrare le risposte del

sistema nervoso autonomo e del sistema endocrino con il comportamento e dunque di agire anche in stretta coordinazione con altre strutture nervose.

CONTROLLO IPOTALAMICO DELLA FUNZIONE

RIPRODUTTIVA

Il modo episodico della secrezione del GnRH dall'ipotalamo e l'attivazione pulsatile dei recettori per il GnRH a livello ipofisario sono essenziali per un'ottimale sintesi e secrezione della gonadotropina e per una normale attività riproduttiva. La genesi della generazione pulsatile del GnRH nell'ipotalamo è ancora un po' sconosciuta, comunque la secrezione episodica del neuro peptide è un'intrinseca proprietà dei neuroni GnRH ed è dipendente da meccanismi intracellulari che portano a coordinate ondate di rilascio di GnRH.

Studi effettuati nella scimmia Rhesus definiscono l'importanza di

stimolazioni ipofisarie episodiche per un'ottimale secrezione della gonadotropine così come la relazione del rilascio di GnRH con l'attività elettrica nell'ipotalamo e il ruolo essenziale degli estrogeni nel promuovere il picco di LH.

Il controllo neuroendocrino delle funzioni riproduttive è espresso attraverso l'episodica secrezione degli ormoni gonadici dell'ipofisi anteriore in risposta alla stimolazione pulsatile del GnRH, esso stesso prodotto da una rete di neuroni peptidergici nell'ipotalamo. La caratteristica secrezione pulsatile del GnRH dei neuroni ipotalamici dipende da un'interazione autocrina tra il GnRH e i suoi recettori espressi nei neuroni GnRH secernenti. È degno di nota che l'espressione dei recettori GnRH Ca dipendenti e la regolazione autocrina del rilascio di GnRH sono già evidenti nei precoci neuroni GnRH di feto.

Quest'attività probabilmente fornisce un meccanismo per la regolazione dell'espressione genica e della secrezione di GnRH

durante la migrazione embrionale. La riproduzione nei mammiferi è controllata da interazioni tra ipotalamo, ipofisi e gonadi. Ogni componente del sistema riproduttivo è regolato da meccanismi di feedback che coordinano processi che conducono alla secrezione delle gonadotropine, gametogenesi e mantenimento della specie. I neuroni a GnRH nella maggior parte sono distribuiti nell'area preottica e nei siti adiacenti alla regione rostrale dell'ipotalamo piuttosto che essere concentrati in nuclei discreti. Questi neuroni sparsi si crede che formino una diffusa rete neurale che funziona in modo coordinato come un generatore di impulsi per il GnRH. La generazione del rilascio pulsatile di GnRH nell'eminenza mediana è l'elemento centrale ed essenziale che governa la funzione riproduttiva e dipende dalle attività coordinate di 1500 o più neuroni a GnRH localizzati nell'ipotalamo. Di questi il 34% sono richiesti per il controllo del ciclo ovarico.

L'AROMATASI

L'aromatasi è anche conosciuta come CYP19A1, CYP XIX, P-450_{arom} e ARO, è un complesso citocromo enzima P450 responsabile della biosintesi degli estrogeni in quanto converte il testosterone in estradiolo e l'androstenedione in estrone.

L'aromatasi catalizza la conversione degli steroidi C₁₉ in estrogeni. Per la sua attività enzimatica sono necessarie due proteine: un citocromo P450, il prodotto del gene CYP19 e una flavo proteina ubiquitaria, NADPH- citocromo reduttasi. Questo complesso enzimatico è localizzato nel reticolo endoplasmatico liscio delle cellule che sintetizzano gli estrogeni. L'aromatasi è espressa in un certo numero di cellule e tessuti, come la placenta, tessuto mammario, tessuti fetali, pelle, ossa, cartilagine, tessuto adiposo, muscolo, cellule della granulosa, cellule del Sertoli e del Leydig, tessuto nervoso.

Il cervello è un importante sito della sintesi degli estrogeni nei vertebrati. Questo fatto fu dimostrato nei Mammiferi per la prima volta da Naftolin, con prove dirette su tessuti neuroendocrini centrali, evidenziando che essi erano in grado di convertire gli androgeni in estrogeni. Questi risultati costituirono le fondamenta della classica ipotesi dell'aromatasi nel cervello, che negli anni si evolse suggerendo che molti, ma non la maggior parte, degli effetti degli androgeni sulle funzioni cerebrali nervose sono mediate dal metabolismo locale degli estrogeni attraverso l'azione dell'aromatasi.

L'aromatizzazione è una fase importante nel meccanismo con il quale il testosterone mascolinizza il cervello durante lo sviluppo prenatale/perinatale, in relazione al fatto che si tratti di una specie a breve o lunga gestazione. Infatti, quando il cervello fetale è esposto al testosterone secreto dai testicoli in via di sviluppo, va incontro a due trasformazioni, mascolinizzazione e

defemminizzazione. La prima forma implica azioni permanenti che sostengono il comportamento sessuale tipico del maschio e gli schemi per la secrezione delle gonadotropine. La defemminizzazione invece comporta la soppressione permanente del comportamento sessuale tipico femminile e dei meccanismi che portano al picco di LH. Nel caso in cui non ci sia l'esposizione al testosterone avviene una differenziazione verso un comportamento sessuale femminile.

Come propose originariamente Beach, il comportamento sessuale maschile può essere suddiviso in un minimo di due comportamenti: un meccanismo di eccitazione/appetito che porta il maschio a cercare ed avvicinare una femmina recettiva e una componente copulatoria/performance che indirizza il maschio ad un contatto sessuale che si manifesta con la monta, la penetrazione e l'eiaculazione.

Il controllo neuroendocrino del comportamento dell'atto

sessuale è stato ben studiato nei ratti sottoposti a castrazione e non. Partendo dal fatto che è necessario il testosterone per attivare tutti gli aspetti dell'accoppiamento, la castrazione è seguita da un declino della monta, penetrazione ed eiaculazione, ma questi aspetti vengono poi contrastati con la somministrazione del testosterone. Lesioni bilaterali dell'area preottica ipotalamica impediscono le manifestazioni dei comportamenti tipici dell'accoppiamento, inoltre la castrazione ha dimostrato la diminuzione della preferenza verso le femmine sessualmente recettive piuttosto che verso quelle non recettive inibendo perciò la libido. La somministrazione di testosterone e di estradiolo ristabiliscono la preferenza verso le femmine recettive suggerendo che l'aromatizzazione può mediare gli effetti positivi dell'androgeno sulla libido.

Recentemente si è scoperto che l'estradiolo può essere sintetizzato ex novo a partire dal colesterolo e, in quanto

derivato dal cervello, può giocare un ruolo importante nella biologia delle cellule neuronali e gliali. In altre parole, l'aromatasi può agire sulla conversione degli androgeni circolanti in metaboliti estrogenici attivi su specifici bersagli del sistema nervoso o può servire come parte del meccanismo dei neurosteroidi endogeni in grado di fornire estrogeni direttamente a regioni cerebrali ben specifiche. Sebbene l'aromatasi sia ben caratterizzata come prodotto dell'attività neuroendocrina, diversi dati suggeriscono che l'induzione dell'aromatasi può seguire a danni cerebrali o ischemia come parte di un programma innescato dal tessuto nervoso per superare gli insulti neurodegenerativi.

DISTRIBUZIONE

La distribuzione dell'aromatasi nel cervello dell'adulto e del feto, è stata studiata in diverse specie e a diversi livelli, includendo

attività enzimatica, proteina e mRNA. I siti dove predomina l'espressione aromatasica a tutte le età sono l'ipotalamo e il sistema limbico, cioè le aree cerebrali implicate nel controllo delle funzioni riproduttive.

Studi condotti su ratti adulti hanno dimostrato che l'attività aromatasica è più alta in specifiche aree del cervello, inclusa l'area preottica, ipotalamo medio-basale, l'amigdala mediale, e la stria terminale. L'ipotalamo ventromediale, anteriore e altre regioni ipotalamiche ed extraipotalamiche presentano bassi livelli di aromatasi, ma rintracciabili.

Nell'ariete la maggior distribuzione è presente a livello dell'amigdala mediale, amigdala corticale e nella stria terminale, mentre livelli intermedi sono stati rilevati nell'area periventricolare, area preottica mediale, area preottica laterale (ipotalamo anteriore), ipotalamo ventromediale e laterale. Bassi livelli nel nucleo infundibolare/eminenza mediana, ipotalamo

dorsomediale e nel setto.

Studi neuranatomici condotti mediante tecniche di immunocitochimica ed *ibridazione in situ*, hanno confermato il modello generale della distribuzione aromatasica nel cervello ulteriormente confinandolo entro un campo di nuclei interconnessi che includono i nuclei dell'amigdala posteromediale, regioni incapsulate della stria terminale, porzione ventrolaterale dei nuclei ipotalamici ventromediali e la componente centrale del nucleo preottico. Questo circuito principale contiene la maggior parte delle cellule che hanno recettori per gli androgeni e per gli estrogeni ed è notoriamente coinvolta negli aspetti fisiologici comportamentali della riproduzione maschile. Altre regioni come l'ippocampo, corteccia cerebrale, neuroni sensitivi afferenti e midollo spinale rivelano un discreto contenuto in aromatasi, suggerendo che gli estrogeni derivanti dal cervello sono coinvolti in altre funzioni

cerebrali come cognizione, memoria e percezione sensoriale.

Durante la vita adulta, l'aromatasi controlla anche i livelli di estrogeni locali all'interno di aree cerebrali implicate nella regolazione della riproduzione; la sua attività può anche modulare gli stati d'animo e l'umore.

Spostandosi in altre specie come gli uccelli, è stato osservato che l'aromatizzazione locale del testosterone in estradiolo nel sistema nervoso centrale migliora la funzioni dell'ippocampo, incluso il rendimento della memoria spaziale. Al contrario nei ratti maschi l'inibizione dell'aromatasi neutralizza l'indebolimento dell'apprendimento spaziale indotto dall'iniezione di testosterone direttamente nell'ippocampo.

L'aromatasi può perciò migliorare o indebolire modalità cognitive specifiche, probabilmente con una sottile regolazione dei livelli di estradiolo in precisi momenti e in specifiche regioni cerebrali, in quanto l'estradiolo esercita un'attività dose e

regione specifica.

L'aromatasi è espressa solo da neuroni in condizioni normali nel SNC dei Mammiferi. Nei neuroni l'aromatasi è stata localizzata nei corpi cellulari, processi e terminazioni sinaptiche di diversi Mammiferi e specie aviarie. Il riconoscimento che l'aromatasi sia presente in diversi compartimenti cellulari, sostiene l'idea che questo enzima agisca nel produrre estrogeni localmente, capaci di agire non solo attraverso la classica via del recettore mediata da un meccanismo trascrizionale, ma anche da effetti diretti e rapidi sulle membrane plasmatiche neuronali.

REGOLAZIONE

L'aromatasi gioca un ruolo importante nella differenziazione sessuale del cervello in molte specie di mammiferi.

Transitoriamente livelli più alti di attività aromatasica e di

testosterone sono presenti più nei maschi che nelle femmine durante il periodo perinatale, suggerendo che in un momento critico i maschi sono esposti a più alti livelli di estrogeni rispetto alle femmine. Il testosterone e i suoi metaboliti come l'estradiolo agiscono nel cervello in parte contenendo la morte cellulare durante lo sviluppo e dall'altra stimolando la crescita dei prolungamenti nervosi guidando allo stabilimento delle vie che portano al dimorfismo sessuale.

Ancora non è ben noto quali siano i fattori che regolino l'espressione dell'aromatasi nel cervello fetale, ma non sembrano androgeno-dipendenti. Infatti, feti di primati non umani trattati con testosterone e castrati, non presentano alterazioni dell'attività aromatasica. L'espressione aromatasica nel cervello diminuisce dopo la nascita e durante l'adolescenza, al contrario del feto, nei mammiferi adulti l'attività aromatasica è regolata in primo luogo dagli androgeni, mentre negli uccelli e

nei pesci dagli estrogeni. Nei ratti, a livello dell'area preottica e dell'ipotalamo, gli androgeni regolano l'mRNA dell'aromatasi attraverso la via dei recettori per gli androgeni. Al contrario gli steroidi gonadici non regolano l'aromatasi nella maggior parte delle aree cerebrali inclusa l'amigdala e l'ippocampo. Questa osservazione suggerisce che esistono almeno due popolazioni di cellule aromatasi-positive: una steroido-dipendente e l'altra non steroido-dipendente. L'aromatasi esibisce differenti modelli come promotori in differenti aree del cervello, sostenendo la prova che fattori supplementari, inclusi neurotrasmettitori e neuropeptidi sono coinvolti nella regolazione dell'espressione aromatasica nel cervello, in relazione all'età, sesso e tipi cellulari di specifiche zone interessate.

***IMPLICAZIONI DELL'AROMATASI NELLA REGOLAZIONE
DELLA PLASTICITA' DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE***

Il ruolo dell'aromatasi sulla cognizione può essere collegata con la sua azione regolatrice sulla plasticità neuronale. Si sono fornite solide prove che indicano che la sintesi locale di estradiolo nell'ippocampo regola i contatti sinaptici nei neuroni piramidali CA1, mostrando che l'inibizione farmacologica dell'attività aromatasica nell'ippocampo provoca una diminuzione del numero delle spine dendritiche e delle sinapsi dendritiche. Inoltre l'inibizione dell'aromatasi riduce i processi neuritici nei neuroni dell'ippocampo in via di sviluppo. Perciò l'estradiolo sintetizzato dai neuroni ippocampali attraverso l'aromatasi non è altro che un regolatore endogeno delle formazioni sinaptiche e quindi della plasticità sinaptica.

Questo ruolo di regolatore della plasticità neuronale svolto

dall'aromatasi è stato evidenziato in studi che, impiegando il testosterone e il diidrotestosterone non aromatizzabile, hanno dimostrato un incremento del numero di sinapsi a livello delle spine dendritiche delle cellule piramidali CA1; inoltre femmine ovariectomizzate trattate con inibitori dell'aromatasi mostrano riduzioni significative degli effetti del testosterone sul numero di spine dendritiche in CA1. D'altro canto, nei maschi, il testosterone non ha bisogno di essere convertito in estradiolo per esercitare un effetto sulle spine dendritiche suggerendo un ruolo sesso-specifico dell'aromatasi sulla plasticità sinaptica.

L'enzima può anche influire sullo sviluppo delle sinapsi e della plasticità in altre aree del SNC non destinate alla regolazione dell'attività riproduttiva. Infatti le cellule del Purkinjia di ratti knock-out per l'enzima aromatasi mostrano un decremento della crescita dendritica, della formazione delle spine dendritiche e delle sinapsi.

Un altro importante fenomeno in cui interviene una regolazione da parte dall'estradiolo è la neurogenesi dell'adulto. Nuovi neuroni sono generati durante la vita in diverse regioni del cervello dei vertebrati. Questi neuroni generati ex-novo migrano fino alla loro destinazione finale e sono incorporati in circuiti sinaptici funzionali. Alcuni studi indicano che la neurogenesi nell'adulto è d'importanza funzionale. Per esempio, cambiamenti nel tasso della neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo di specie aviarie canterine adulte sono correlati con la manifestazioni del comportamento canoro, mentre nei mammiferi sono correlati con modificazioni della cognizione e dell'umore. Il ruolo della neurogenesi nell'adulto non è un evento semplice, visto che l'aggiunta di nuovi neuroni a quelli preesistenti fa sì che ci sia una riorganizzazione di questi circuiti con la sostituzione di elementi cellulari. Questa riorganizzazione può essere transitoria perché molti neuroni appena generati

possono morire. Comunque questi circuiti sinaptici transitori possono essere funzionalmente rilevanti e c'è una prova che indica che sia l'aggiunta che la rimozione di nuovi neuroni ippocampali è necessaria per l'apprendimento spaziale. L'estradiolo è conosciuto come regolatore della neurogenesi nell'ippocampo e recenti studi suggeriscono che l'aromatasi può essere coinvolta nelle divisione di cellule progenitrici dei mammiferi. Inoltre, l'espressione dell'aromatasi nella glia radiale del cervello dei teleostei si presume che sia legata ai continui processi di neurogenesi che avvengono nel cervello di questi animali durante tutta la loro vita.

Sono state fornite ulteriori prove sul ruolo dell'aromatasi nella neurogenesi attraverso colture di cellule ippocampali. Trattamenti con letrozolo, un inibitore dell'enzima aromatasi, su queste cellule decresce il numero di cellule proliferative e aumenta il numero di cellule apoptotiche.

Gli effetti dell'aromatasi sul comportamento e sulla plasticità cerebrale suggeriscono che l'enzima può intervenire sulla funzione sinaptica. Alcuni studi hanno dimostrato che l'aromatasi è modulata rapidamente da input sinaptici afferenti, incluse le afferenze glutammatergiche, e da meccanismi che dipendono da: depolarizzazione del K, livelli aumentati del Ca intracellulare e meccanismi con fosforilazione Ca-dipendente. Inoltre a questa rapida modulazione dell'aromatasi, consegue una rapida fluttuazione della concentrazione degli estrogeni e cambiamenti del comportamento sessuale maschile.

Dato che il testosterone può essere sintetizzato nel cervello a partire dal colesterolo endogeno, il ruolo di neuromodulatore dell'aromatasi può essere almeno in parte indipendente dal testosterone esogeno. Comunque l'aromatasi può essere soggetta ad una regolazione endocrina e recenti studi indicano che il GnRH regola in maniera dose dipendente la sintesi di

estradiolo e la densità delle spine dendritiche delle cellule ippocampali con un meccanismo mediato dall'aromatasi.

La localizzazione subcellulare dell'aromatasi nel cervello suggerisce che la sua funzione come neuromodulatore può essere esercitata, almeno in parte, direttamente sulle sinapsi.

Nel cervello degli uccelli e dei mammiferi, l'immunoreattività dell'aromatasi è localizzata nel citoplasma del pericario neuronale e nei processi nervosi, inoltre è stata trovata anche nelle terminazioni pre-sinaptiche. Perciò l'estrogeno formato in queste terminazioni può essere potenzialmente rilasciato per attivare i recettori per gli estrogeni localizzati nelle strutture post-sinaptiche o può anche potenzialmente agire nelle terminazioni pre-sinaptiche bersagliando le vescicole sinaptiche che esprimono i recettori per gli estrogeni in modo tale da regolare il rilascio dei neurotrasmettitori.

RUOLO DELL'AROMATASI NELLA NEUROPROTEZIONE

Un'altra dato interessante sull'aromatasi è il suo ruolo durante le condizioni patologiche che possono interessare il sistema nervoso. Oltre alla regolazione fisiologica della sua attività in associazione a modificazioni nella funzione sinaptica e del comportamento, l'espressione dell'aromatasi può subire modificazioni a seguito di danni cerebrali di varia origine. Differenti forme neurodegenerative e lesioni ischemiche sperimentalmente indotte sul sistema nervoso centrale di zebra finch, ratti e topi, hanno evidenziato un incremento dell'attività aromatasica, inducendo l'espressione ex novo dell'enzima nell'astroglia. L'induzione dell'espressione dell'aromatasi negli astrociti dopo un danno cerebrale è accompagnato da un significativo incremento della sua attività aumentando così anche i livelli di estradiolo nel cervello.

Gli astrociti che esprimono aromatasi sono osservati i entrambi i

sessi e in tutte le aree danneggiate, incluse la corteccia cerebrale, il corpo calloso, il corpo striato, l'ippocampo, il talamo e l'ipotalamo. Ciò indica che gli astrociti di molte, se non tutte, le regioni cerebrali possono potenzialmente esprimere l'aromatasi e perciò possono produrre estradiolo in risposta al danno. Diversi studi hanno analizzato il ruolo dell'aromatasi dopo un danno utilizzando topi *knock-out* per l'aromatasi o inibitori dell'aromatasi. Questi studi hanno mostrato che i topi maschi ArKO e maschi di ratti intatti cronicamente trattati con fadrozolo hanno un incremento della vulnerabilità dei neuroni ippocampali ai danni tossici. Risultati simili sono stati ottenuti quando il fadrozolo era somministrato sistematicamente e quando era infuso dai ventricoli laterali per inibire specificatamente l'aromatasi nel cervello. Il fadrozolo incrementa anche la morte neuronale nei ratti ovariectomizzati indicando che l'aromatasi extra-gonadica è coinvolta anche

nella neuroprotezione dei soggetti di sesso femminile. Inoltre gli effetti neuroprotettivi del testosterone e di altri steroidi suoi derivati, sembrano diminuire anche nell'ippocampo, corteccia cerebrale e bulbo olfattivo degli animali trattati con fadrozolo. L'incremento dell'espressione dell'aromatasi nel cervello danneggiato è anche accompagnato da una *upregulation* nell'espressione di altri steroidi, suggerendo che il tessuto nervoso risponde al danno con un incremento della steroidogenesi e che l'aromatizzazione degli steroidi precursori dell'estradiolo può essere parte di un meccanismo endogeno attivato nel tessuto nervoso per far fronte alla neurodegenerazione.

L'azione neuroprotettiva dell'aromatasi è stata valutata anche mediante l'impiego di altri modelli sperimentali. In femmine di topo wilde-type ovariectomizzate trattate cronicamente con fadrozolo e femmine di topo ArKO, è stata indotta un'ischemia

da occlusione dell'arteria cerebrale media. Entrambi hanno mostrato danni cerebrali, ma più i ArKO, indicando che la sintesi extragonadica di estradiolo è coinvolta nella neuroprotezione anche in questi modelli.

Altri dati relativi all'azione neuroprotettiva dell'aromatasi si sono ottenuti da studi sperimentali sullo zebra finch. Partendo dal fatto che danni meccanici provocati a livello cerebrale inducono l'espressione dell'aromatasi a livello dell'astroglia, si sono fatti esperimenti su questi animali iniettando fadrozolo nel lato del danno in un solo emisfero, e si è dimostrato un incremento del numero delle cellule apoptotiche e un danno maggiore nell'emisfero trattato con l'inibitore dell'aromatasi. Inoltre questo tipo di iniezioni aumentano la reattività delle cellule gliali con conseguente gliosi.

Ciò indica che l'aromatasi endogena esercita un ruolo neuroprotettivo modulando la gliosi e prevenendo la morte

cellulare secondaria. Un'altra importante informazione è che l'aromatasi regola la proliferazione cellulare dopo un danno cerebrale. Lesioni meccaniche dell'ippocampo inducono un accumulo di cellule generate ex novo intorno al sito danneggiato. Queste nuove cellule sono generate nell'ippocampo e in regioni neuroproliferative come la zona subventricolare. Le cellule neo-generate sono associate con i processi delle cellule della glia radiale che esprimono l'aromatasi e sembra esserci una correlazione positiva tra il numero degli astrociti aromatasi-positivi e il numero di cellule neo-generate. Inoltre la somministrazione di fadrozolo riduce la proliferazione cellulare dopo il danno. Queste scoperte suggeriscono che l'estradiolo rilasciato dalle cellule gliali dopo l'insulto può sostenere la proliferazione e la migrazione delle nuove cellule e può perciò giocare un ruolo essenziale nella riorganizzazione e il riparo del danno cerebrale. In più, in tutti i modelli sperimentali

studiati l'effetto neurodegenerativo da deficienza di aromatasi era controbilanciato dalla somministrazione di estradiolo indicando che le proprietà neuroprotettive dell'enzima risiedono nella sua abilità di catalizzare la formazione di estradiolo piuttosto che nel ridurre i livelli dei precursori dell'estradiolo. Per quanto riguarda le differenze di sesso relative alla neuroprotezione, è stato riportato che sebbene l'espressione dell'aromatasi negli astrociti dopo un danno sia presente in entrambi i sessi, gli astrociti delle femmine sono meno suscettibili di quelli maschili alla privazione ossigeno/glucosio. Questa protezione endogena è associata ad un'attività aromatasica migliorata. Le differenze di sesso nei livelli di estrogeni sono state osservate nei cervelli post-mortem di pazienti affetti di Alzheimer. Perciò è possibile che le differenze di sesso nell'abilità degli astrociti riguardo alla produzione di estradiolo e alla vulnerabilità da privazione di aromatasi può

essere coinvolta nell'espressione dimorfica sessuale di alcune patologie del cervello.

AROMATASI NEI PESCI

Il bilancio ormonale tra estrogeni ed androgeni è di fondamentale importanza per la differenziazione sessuale nei pesci. Ciò dipende dalla disponibilità e dall'attività degli enzimi implicati nella steroidogenesi, con particolare riferimento all'aromatasi, che nei pesci ha un ruolo particolare, infatti le femmine evolvono fenotipicamente in maschi se è inibita l'attività aromatasica durante lo sviluppo. Sebbene gli estrogeni siano reputati ormoni circolanti che derivano dalle gonadi, l'aromatasi è espressa nel cervello e in altri tessuti estrogenici, in cui regola la quantità spazio-temporale degli estrogeni disponibili per attivare vie steroidogeniche.

I vertebrati superiori possiedono solo un gene *cyp19* per l'aromatasi con diversi elementi promotori che regolano

l'espressione tessuto-specifica, dunque possiedono solo un tipo di aromatasi che è espressa sia a livello delle gonadi che del cervello. Nei teleostei invece, l'espressione gonadica e cerebrale di *cyp19* è regolata da due distinte isoforme di aromatasi: *cyp19a* e *cyp19b*, che rispettivamente sono le isoforme espresse nelle gonadi e nel cervello. Studi condotti sulla carpa comune hanno dimostrato che ogni isoforma è prevalentemente espressa nei rispettivi tessuti, ma non in modo esclusivo. Inoltre, si può affermare che il cervello è la sede di maggior espressione aromatasi, nel senso che nel tessuto nervoso è espresso sia il gene *cyp19a* che *cyp19b*, mentre nelle gonadi solo *cyp19a*. Le differenze di espressione dei due geni sono state riscontrate anche tra diverse regioni cerebrali e tra i due sessi. Per esempio, *cyp19b* sia nei maschi che nelle femmine di carpa è espresso maggiormente a livello del telencefalo, piuttosto che a livello cerebellare e del midollo allungato. Nelle

femmine, però, l'espressione a livello del talamo, cervelletto e del midollo allungato è maggiore che nei maschi. Per quanto riguarda *cyp19a*, nelle femmine è altamente espresso nelle ovaie e nel cervelletto, con bassi livelli nel telencefalo e nel talamo. Anche nei maschi è presente nelle gonadi e nel cervelletto, ma i valori sono molto più bassi in confronto a quelli delle femmine. L'alta espressione di *cyp19a* nelle femmine probabilmente contribuisce allo sviluppo delle ovaie dovuto alla conseguente sintesi di estrogeni. Mentre nel maschio bassi livelli di *cyp19a* potrebbero essere richiesti nello sviluppo dei testicoli per minimizzare l'inibizione estrogeno-dipendente della sintesi degli androgeni che è necessaria per lo sviluppo delle cellule germinative. In generale l'aromatasi è molto espressa nei teleostei ed in particolar modo nel sistema nervoso, e ciò ha suggerito un suo importante ruolo nella neurogenesi, nella migrazione, nella plasticità neuronale e nella rigenerazione

cerebrale.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO

Il presente lavoro è stato realizzato su encefalo di feti ovini a differenti stadi di sviluppo. Una prima fase si è svolta su soggetti prelevati a *random* di cui non si conosceva il sesso. In un secondo momento, a seguito dei risultati della prima fase, la ricerca è stata approfondita effettuando lo studio su feti su cui si è provveduto ad effettuare il sessaggio.

I campioni di embrioni e di feti utilizzati per il nostro lavoro sono stati prelevati presso i mattatoi e aziende zootecniche sarde, in base anche alla disponibilità di pecore gravide presso tali strutture. Alle femmine gravide, una volta macellate, è stato asportato l'utero in toto e poi trasportato presso i nostri laboratori in contenitori a bassa temperatura per evitare la colliquazione dell'encefalo. Una volta prelevati, gli embrioni e i

feti sono stati misurati e attraverso le tavole riportate da McGeady (2006), in cui viene espressa la relazione tra *crown-rump length* (lunghezza testa-groppa) e i giorni di gestazione, è stato possibile determinare l'età del feto.

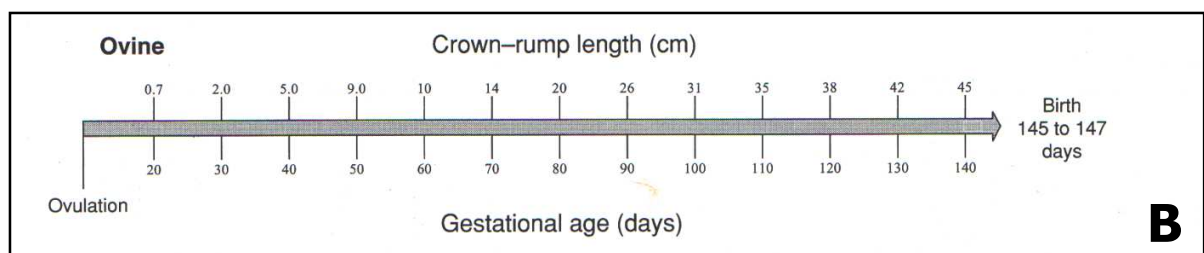


Fig. 6. L'immagine in A, mostra la metodologia impiegata per la stima dell'età dei feti ovini utilizzati. Una volta effettuata la misurazione, il dato espresso in cm è stato convertito in giorni di gestazione mediante la tabella in B (da McGeady, Embriology, modificato).

In totale sono stati raccolti 65 feti, di cui: 1 di 25 gg; 6 di 30gg; 8 di 35 gg; 20 di 40gg; 21 di 55gg; 8 di 60gg; 1 di 70gg; 3 di 80gg; 5 di 115gg; 2 di 130 gg. L'attività della P450arom è stata valutata in tutti gli stadi di età, coprendo così l'intero periodo critico di differenziazione sessuale.

Nei feti in cui non erano ancora visibili gli organi genitali esterni, oltre l'encefalo è stato asportato una parte del corpo che, immerso in etanolo, è stato utilizzato per la determinazione del sesso mediante PCR.

Una volta effettuato il prelievo, i campioni di encefalo sono stati immersi in una soluzione al 4% di paraformaldeide per 3-4 ore e successivamente trasferiti in una soluzione al 30% di saccarosio/PBS fino alla saturazione e congelati a -80°C in un medium di crioprotezione. Le sezioni coronali di diencefalo, di 10um di spessore, sono state montate su vetrini a carica positiva, al fine di migliorarne l'adesione, per poi essere

sottoposte ad indagini mediante le metodiche di immunoistochimiche ed ibridazione *in situ*. Di alcuni feti di cui si è proceduto al sessaggio, sono stati raccolti i campioni di ipotalamo non sottoposti a fissazione in paraformaldeide. Questi sono stati immediatamente omogenati in un buffer di lisi e congelati a -80°C al fine di essere processati mediante la tecnica di Western Blot.



Fig. 6. Criostato impiegato per l'ottenimento di sezioni da materiale congelato.

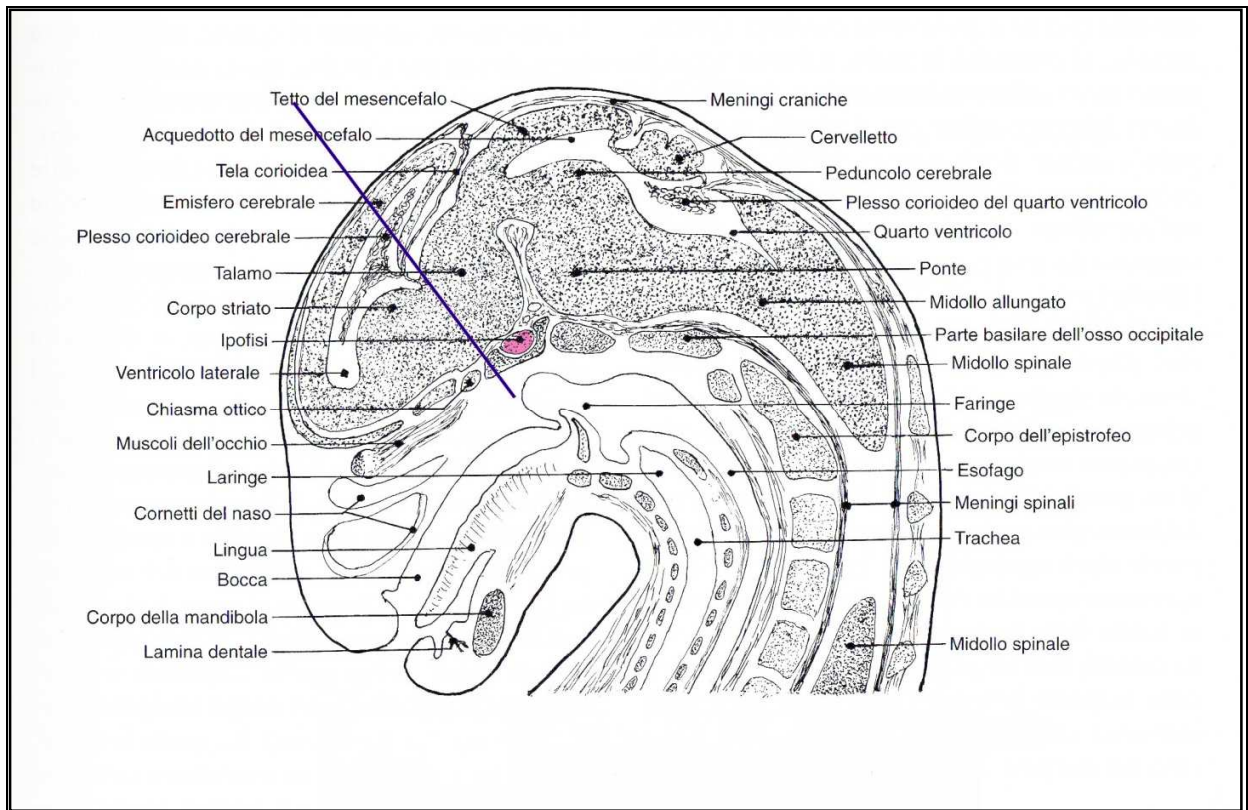


Fig. 7. Sezione sagittale della testa di un feto di pecora. La linea colorata indica approssimativamente l'area (ipotalamo anteriore) a livello della quale sono state condotte le sezioni istologiche impiegate. (da R. Barone, VI vol., Neurologia, modificato).

Immunoistochimica

Le sezioni di tessuto tagliate al criostato a 10um di spessore sono state sottoposte alla tecnica immunoperossidasi che utilizza il complesso streptavidina-biotina perossidasi, un metodo che consente di amplificare il segnale. Il protocollo sperimentale utilizzato è il seguente. Per lo smascheramento antigenico è stata utilizzata la tripsina (0,1% di tripsina e 0,1% di cloruro di calcio di

in TRIS/HCL 0.005 M) (pH 7.6-8.00) a 37°C per 20'. Per ovviare al reperimento di falsi positivi è stato eseguito il blocco delle perossidasi endogene con acqua ossigenata al 7,5% per 5', mentre per evitare la cross reattività è stato utilizzato il siero dell'ospite in cui è stato prodotto il secondario, in questo caso siero di capra. In seguito si è proceduto all'incubazione overnight con i seguenti anticorpi primari: anti-aromatasi policlonale (Sigma, diluizione 1:250), la cui specificità è stata preventivamente saggiata mediante il Western Blot; anticorpo anti-androgen receptor monoclonale (Sigma, diluizione 1:100) e anti-tubulina β III monoclonale (Sigma, diluizione 1:100).

Per il secondario e il complesso avidina- biotina è stato utilizzato un kit (ABC, Vectastain, Kit Elite, Vector). L'attività perossidasi è stata rilevata utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina (Vector). In aggiunta, controlli specifici sono stati effettuati sostituendo l'anticorpo primario con siero di coniglio non immune (controllo negativo).

Ibridazione in situ

Le sezioni di tessuto tagliate al criostato a 10µm di spessore sono state sottoposte alla tecnica dell'ibridazione in situ con il seguente protocollo. Permeabilizzazione del tessuto mediante trattamento con Proteasi K, fissaggio in alcoli crescenti, preibridazione con soluzione d'ibridazione e formamide a 38°C per 2 ore a cui è seguito la denaturazione della sonda a cDNA a 96° per 10' e con la soluzione d'ibridazione e formamide e successiva incubazione overnight a 38°C. Sono seguiti i lavaggi e l'incubazione con il complesso streptavidina perossidasi e la diaminobenzidina come cromogeno.

Immunofluorescenza

Per il protocollo sperimentale della presente tesi di dottorato sono state allestite doppie immunofluorescenze. Le sezioni di

tessuto congelate sono state immerse in PBS 1X. Prima della permeabilizzazione si è provveduto ad effettuare un lavaggio con una soluzione di 0,1M di glicina in PBS per ridurre l'eventuale autofluorescenza dovuta all'utilizzo della paraformaldeide come fissativo. Successivamente le sezioni sono state immerse in una soluzione permeabilizzante (PBS+1% BSA+0,1% Tryton X100) per 5'. Dopo tale trattamento si è provveduto ad applicare gli anticorpi, diluiti nella stessa soluzione di permeabilizzazione, sulle fette. Dapprima sono stati impiegati i seguenti anticorpi primari monoclonali: anti-tubulina β III anti-GFAP e anti-PCNA (Sigma, diluizione 1:1000) in camera umida per quattro ore a temperatura ambiente. Di seguito, dopo diversi lavaggi in PBS+TrytonX100 si è impiegato l'anticorpo secondario anti mouse Alexa Fluor 594-TRITC (Invitrogen, diluizione 1:400) per un'ora a 37°C. Dopo un'altra serie di lavaggi sulle fette è stato applicato l'anticorpo primario policlonale anti aromatasi (Sigma,

diluizione 1:200) *overnight* a +4°C. Trascorso questo periodo di incubazione, dopo una serie di lavaggi, è stato applicato sulle fette l'anticorpo secondario anti-rabbit Alexa Fluor 488-FITC (Invitrogen, diluizione 1:400) per un'ora a 37°C; alla fine di quest'ultimo passaggio, sono stati effettuati ulteriori lavaggi e si è proceduto al montaggio del vetrino in glicerolo e acqua distillata. Le sezioni così trattate sono state successivamente analizzate mediante l'utilizzo del microscopio confocale.

Western Blot

I campioni sono stati diluiti in tampone di lisi (tris HCl 5mM, EGTA 2mM, fenilmetil-sulfonilfluoruro 0,1mM, pH 8) addizionati con un inibitore delle proteasi (Complete Mini, Roche), omogenati meccanicamente e sonicati. Il lisato è stato centrifugato a 15,000 rpm per 15 min, dopo di che i è prelevato

il surnatante. Una volta determinata la concentrazione proteica dei campioni (DC Protein Assay, BioRad), sono state preparate aliquote con un contenuto proteico di 40ug ciascuna. Queste sono state sottoposte a corsa elettroforetica in gel di acrilamide-bisacrilamide al 10% utilizzando un sistema Mini Protean 2 e poi, tramite un Trans-blot semi-dry (BioRad) trasferite su membrane di nitrocellulosa con pori di 0,45 um. Dopo una agitazione di tre ore in una soluzione di PBS-skim milk al 5% e Tween20 al 0,1% le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-aromatasi (Sigma, 1:500) overnight a 4°C. Le nitrocellulose poi sono state incubate con un anticorpo secondario anti-rabbit per 1 ora a 37°C. Le bande sono state evidenziate impiegando come cromogeno il nitro-blu-tetrazolio/5bromo-4cloro-3fosfato-indolo (NBT/BCIP, Roche), bloccando poi la reazione con il calore. Al fine di quantificare i risultati dei blot, è stata effettuata la lettura della densità ottica

della bande usando il software freeware Scion Image.



Fig. 8. Strumentazione utilizzata per il Western Blot.

PCR

Il DNA è stato estratto dai tessuti fetali utilizzando il kit di estrazione del DNA (Genomic DNA miniprep kit, Sigma-Aldrich).

Nella fase successiva è stata fatta la PCR allo scopo di determinare il sesso, amplificando la regione del cromosoma Y relativa ai primers SRYA specifici per la pecora. Il protocollo

utilizzato è il seguente: la PCR è stata eseguita su un volume totale di 40ul contenente 1X PCR buffer (20mM Tris HCl, pH8.4; 50mM KCl), 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U di Taq DNA polimerasi e 0,5 uM di ogni primer. Il thermal cycler è stato programmato per 30 cicli a 95 °C per 30 sec, 58,5 °C per 30 sec e 72 °C per 30 sec. Durante il primo ciclo la denaturazione è stata fatta a 95 °C per 5 min. in seguito, nell'ultimo ciclo i campioni sono incubati a 72 °C per 5 min.

I prodotti dell'amplificazione sono stati fatti migrare in un gel di agarosio all'1,8% in TBE buffer (Tris 45mM, acido borico 45mM, EDTA 10mM). La corsa è stata condotta a voltaggio costante (50V per 120'), in seguito i campioni sono stati visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio e le immagini sono state acquisite con Gel Doc Analysis (Bio-Rad).

Analisi statistica

I dati ottenuti nel presente protocollo sperimentale sono stati elaborati statisticamente mediante il software Excel e analizzati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) ed espressi graficamente come medie dei valori \pm la deviazione standard.

Nel confronto di dati accoppiati si è fatto ricorso al test t di Student. I valori sono stati considerati significativi quando $p < 0,05$. Per quanto riguarda la stima delle cellule immunopositive nelle immunoistochimiche, si è proceduto nel seguente modo. Per ogni età sono state valutate quattro aree periventricolari, per ognuna delle quali sono stati contati, mediante apposizione di una griglia sull'immagine, un totale di 70 campi da tre operatori differenti e riportati poi su grafico i risultati totali ottenuti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La pecora è considerata una specie a lunga gestazione, in cui la differenziazione sessuale del cervello avviene nel periodo prenatale a partire dai 30 giorni sino ai 100 giorni (Short, 1974 e Clarke et al. 1978). Recenti studi (Roselli et al. 2003) hanno dimostrato la presenza dell'aromatasi nel cervello fetale ovino solo a 64 giorni, riscontrando un'alta attività aromatasica a livello ipotalamico.

I risultati emersi dalla prima parte di questo lavoro evidenziano che l'aromatasi è presente nel cervello fetale ovino lungo tutto il periodo di differenziazione sessuale. Infatti, l'attività enzimatica è abbastanza costante a tutti gli stadi di gestazione presi in esame rivelando che l'aromatasi è ampiamente distribuita in varie aree del cervello, ma in particolar modo nell'area periventricolare sia dorso-mediale che ventro-mediale a tutti gli

stadi di età. Negli stadi più precoci (35gg e 55gg) si evidenzia una maggiore immunopositività all'aromatasi, come anche confermato dai grafici relativi alla stima delle cellule positive/negative. I neuroblasti oltre a possedere un citoplasma fortemente positivo si presentano anche molto numerosi. Questa positività decresce leggermente, mentre ci si allontana dalla zona periventricolare (Figg. 9 e 10). Negli stadi più avanzati, a 80gg e 115gg, si assiste ad un leggero calo dell'immunopositività; rispetto agli stadi più precoci sono evidenti meno cellule positive a favore di un tessuto più complicato ricco di cellule con una forma più vicina a quella di un tessuto nervoso maturo, con già evidenti diversi prolungamenti. Anche in questo caso il dato visivo è stato confermato dalla stima delle cellule positive/negative riportate nel grafico relativo (Figg. 11 e 12). Il calo della immunopositività per aromatasi ad 80 e 115gg potrebbe essere

imputato alla variazione della concentrazione del testosterone nel feto durante la gestazione. Infatti alcuni studi hanno dimostrato che c'è un picco dello steroide approssimativamente intorno ai 60 giorni e 70 giorni, ma un rapido decremento tra gli 80 giorni e i 90 giorni, per poi aumentare di nuovo in tarda gestazione (Attal et al. 1969 e Pomerantz et al. 1975). Inoltre il fatto che i nostri dati rivelino un'alta attività aromatasica soprattutto intorno ai 55gg ci suggerisce che l'aromatizzazione del testosterone probabilmente sia fondamentale nella prima metà del periodo di differenziazione sessuale nel feto ovino come input e inizializzazione del processo di mascolinizzazione. I risultati dell'immunocitochimica per tubulina β III sembrano confermare l'effettiva identità delle cellule aromatasi-positivo come neuroblasti (Fig. 13). La presenza dell'aromatasi già in epoca precoce è confermata anche dai dati emersi dalla ibridazione *in situ*, dove l'espressione genica è rilevabile già a

35 giorni e 55 giorni (Fig. 14). Inoltre i dati delle immunostochimiche per aromatasi sembrano essere perfettamente sovrapponibili ai dati scaturiti dalle immunostochimiche per i recettori per gli androgeni. Questi ultimi infatti seguono ampiamente lo stesso andamento dell'attività aromatasica a tutti gli stadi fetali esaminati (Fig. 15). Questa convergenza temporale suggerisce che i neuroblasti hanno effettivamente la capacità di captare il testosterone per convertirlo in metaboliti estrogenici grazie all'aromatasi, come già hanno dimostrato studi su feti ovini a 64 giorni, ma questa attività crociata che si presenta per tutto l'arco del periodo di differenziazione sessuale del feto ovino (dai 30 ai 100giorni) sembra confermare che l'aromatasi agisca in simbiosi con il testosterone per tutto il periodo studiato probabilmente per un suo coinvolgimento preponderante nella mascolinizzazione cerebrale. Inoltre i pattern di distribuzione aromatasica nel feto

implicano che probabilmente l'enzima interviene nella stabilizzazione di circuiti neuronali che saranno importanti per la coordinazione centrale del comportamento riproduttivo e delle funzioni neuroendocrine. Un altro dato interessante è emerso dalle immunostochimiche dei feti di età precoce. Infatti in questi, date le loro dimensioni, per poter indagare l'ipotalamo è stata prelevata e fissata l'intera testa. Nelle sezioni ottenute da questi campioni abbiamo osservato che la teca cranica si presentava costantemente e fortemente positiva all'aromatasi (Fig.17). Data l'alta e costante attività aromatasica a tutti gli stadi studiati, nella seconda fase dell'esperimento si è ritenuto opportuno evidenziare possibili differenze tra i sessi ad uno stadio precoce (35gg di gestazione) ed uno invece più vicino a quello in cui Roselli e collaboratori hanno evidenziato l'attività aromatasica nel feto ovino (55gg di gestazione), utilizzando sia l'immunostochimica che il Western Blot su campioni provenienti

da feti per i quali la PCR aveva dato indicazioni circa il relativo sesso (Fig. 18). Le immunistochemiche hanno sempre evidenziato un'alta attività dell'enzima di nostro interesse, ma grazie ai grafici in cui è espresso il rapporto tra cellule positive con quelle negative, si è evidenziato che le femmine in entrambe le età presentano una più alta positività cellulare all'aromatasi rispetto ai soggetti maschi (Figg. 19, 20, 21, 22, 23 e 24). Questi risultati sono stati confermati dal Western Blot, infatti le bande localizzate ad un peso molecolare di 55kd (cioè il peso dell'aromatasi), di campioni di ipotalamo di feti femminili sia di 35gg che di 55g, hanno presentato delle bande più evidenti rispetto ai soggetti maschi della stessa età (Figg. 25 e 26). Le differenze riscontrate tra i due sessi, possono essere ricondotte al fatto che nelle femmine una più alta attività aromatasica con una conseguente produzione di estrogeni favorisce e contribuisce allo sviluppo delle gonadi femminili,

mentre nel maschio bassi livelli estrogenici evitano il feedback negativo sulla sintesi degli androgeni, che nel feto ovino sono prodotti dai testicoli già da 30 giorni di età (Laurel et al. 2001), e che sono indispensabili per lo sviluppo delle cellule germinali.

I risultati dell'ultima parte del protocollo sperimentale della presente tesi, ottenuti tramite l'impiego della microscopia confocale, hanno rivelato dati di un certo interesse. Gli esperimenti, condotti su soggetti di sesso maschile e femminile di 55 gg di gestazione, hanno fornito risultati con un andamento sovrapponibile. Per quanto riguarda le doppie immunofluorescenze, anche in questo caso l'aromatasi si presenta molto positiva, soprattutto a livello delle stesse aree cerebrali evidenziate con l'immunoistochimica. Visto il risultato scaturito dalla immunoistochimica per la tubulina β III, abbiamo voluto confermare questo dato mediante una doppia immunofluorescenza tubulina β III/aromatasi. La

sovrapposizione grafica ha denotato una certa corrispondenza tra cellule positive all'aromatasi e alla beta III, confermando i dati della letteratura e cioè che l'aromatasi è prodotta essenzialmente dai neuroni (Fig. 27). Un'altra indagine condotta in immunofluorescenza è stata effettuata mediante una doppia marcatura per GFAP/aromatasi. I risultati hanno mostrato una alta reattività per GFAP e aromatasi e la sovrapposizione nel merge mostra che una certa popolazione cellulare risulta discretamente positiva per entrambi gli anticorpi (Fig. 28). Ciò potrebbe far supporre che nel cervello fetale ovino ci sia una certa attività aromatasica anche nelle cellule gliali, in condizioni normali, non solo dopo stress e insulti patologici. Inoltre se consideriamo che la migrazione dei neuroni postmitotici avviene lungo i processi della glia radiale che funge da impalcatura a partire dalla zona ependimale verso la sede definitiva, si potrebbe considerare che l'aromatasi contribuisca all'ontogenesi

della struttura del sistema nervoso.

L'immunofluorescenza per PCNA/aromatasi ha evidenziato una notevole sovrapposizione tra cellule in attiva divisione mitotica e cellule aromatasi positive (Fig. 29). Questo dato sembrerebbe di notevole interesse. Infatti la sovrapposizione PCNA/aromatasi sembra indicare un coinvolgimento di tale enzima nelle cellule in attiva divisione mitotica, di cui sono ricche le regioni ventricolari e sub-ventricolari di un cervello fetale. Questo dato propone un pattern che non è tipico dei mammiferi, ma dei vertebrati inferiori come i teleostei, che presentano una forte attività aromatasica, soprattutto nell'area preottica e ipotalamica, probabilmente da imputare al continuo processo di neurogenesi che avviene nel cervello di questi animali per tutta la loro vita.

Immunoistochimica aromatasi 35 gg gestazione

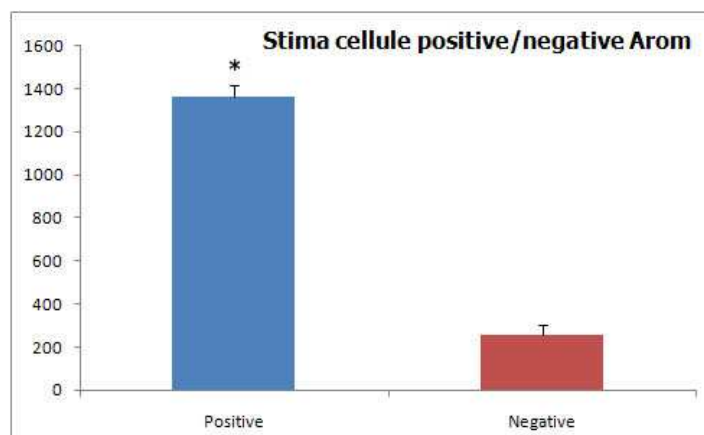
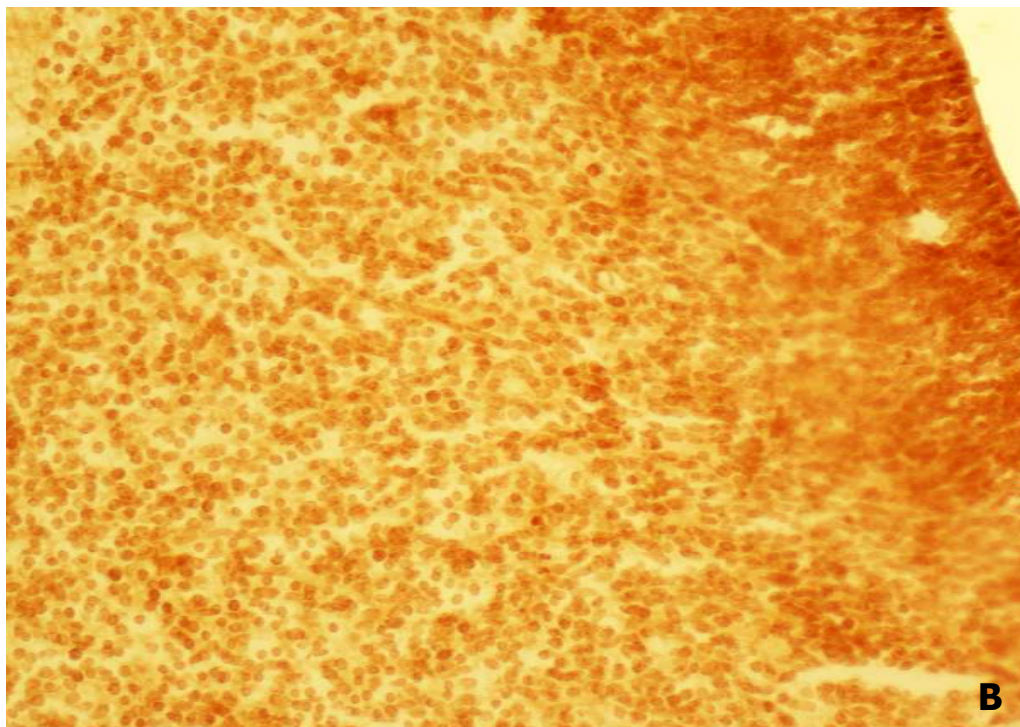


Fig. 9. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore, in cui è ben visibile il terzo ventricolo. Ingr. 2X. (B) Partecore di un'area periventricolare in cui si può notare una diffusa positività, ingr. 20X. Il grafico quantifica il grado di positività delle cellule nell'area anatomica di interesse. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 55 gg gestazione

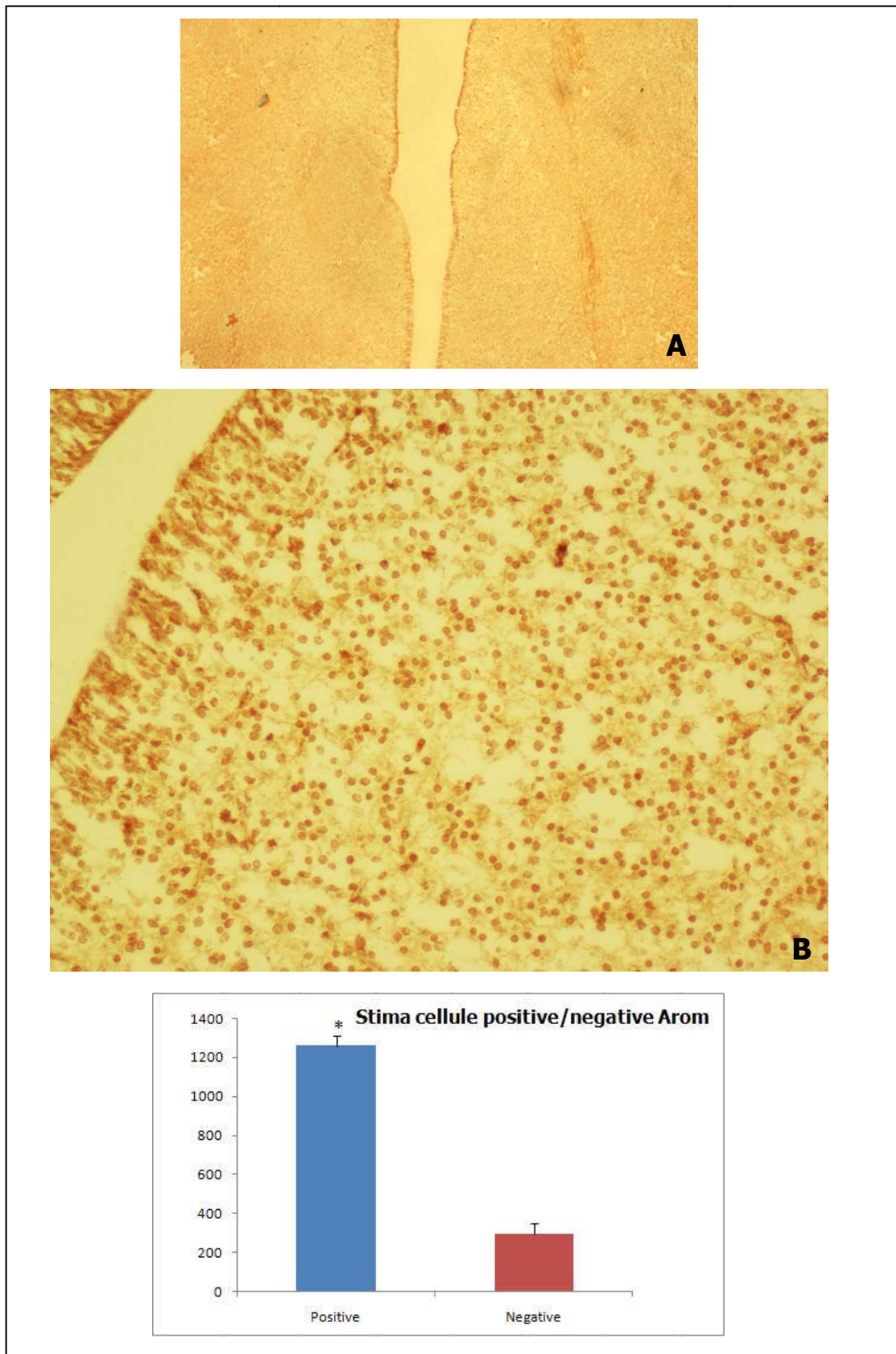


Fig. 10. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore, in cui è ben visibile il terzo ventricolo. (B) Particolare di un'area periventricolare in cui si può notare un elevato numero di cellule positive all'anticorpo anti-aromatasi, ingr 20X. Il grafico quantifica il numero di cellule positive nell'area anatomica di interesse. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 80 gg gestazione

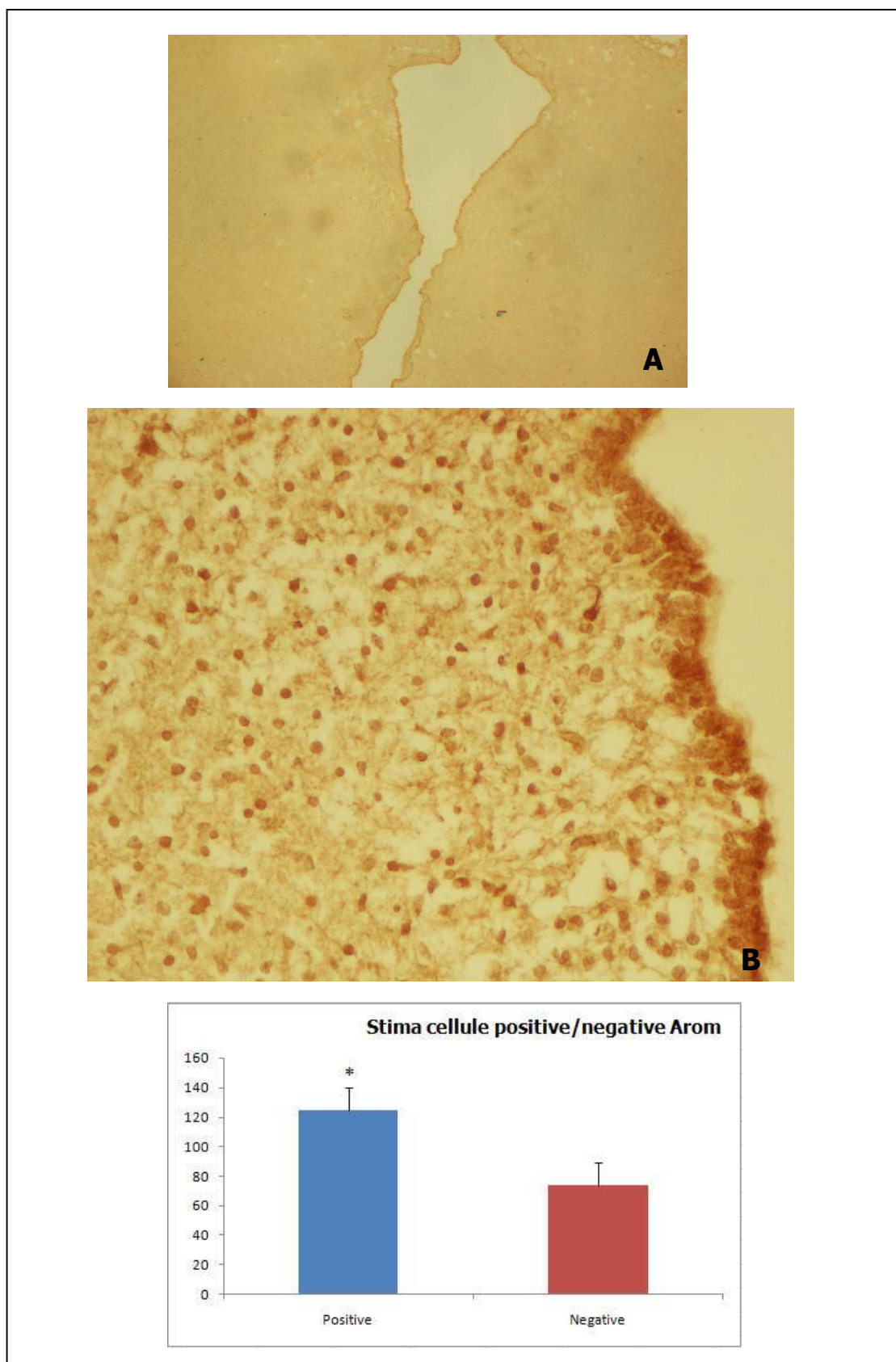


Fig. 11. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore, ingr. 2X. (B) Area periventricolare in cui si può notare una diffusa positività (ingr 20X), quantificata tramite il grafico sottostante. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 115 gg gestazione

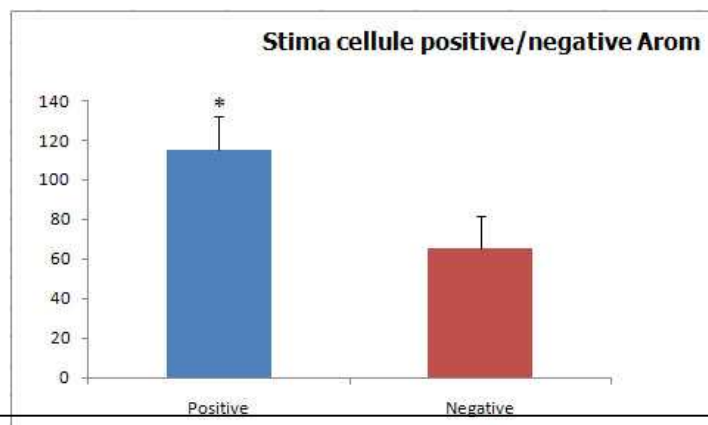
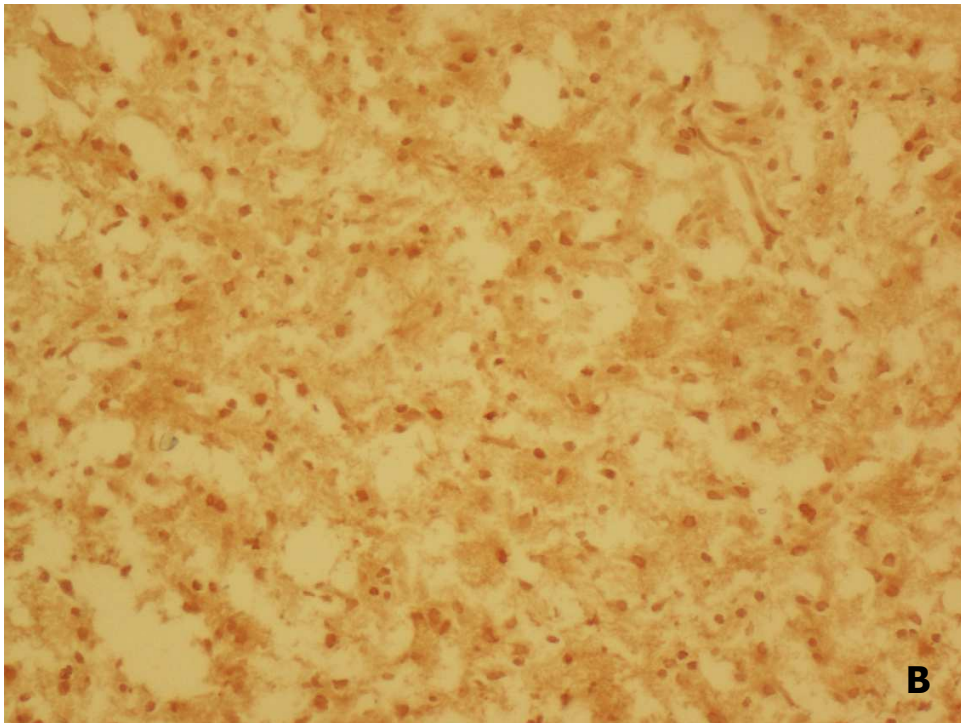
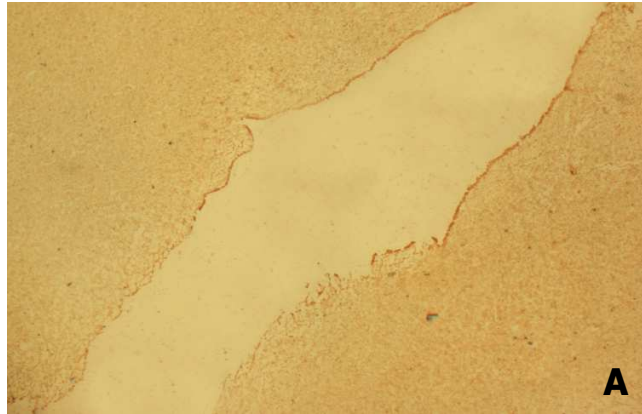


Fig. 12. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore, in cui è ben visibile il terzo ventricolo. (B) Particolare di un'area periventricolare in cui si può notare una positività sempre presente ma inferiore ai quadri precedenti (Ingr 20X). Il grafico quantifica il grado di positività delle cellule nell'area anatomica di interesse. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

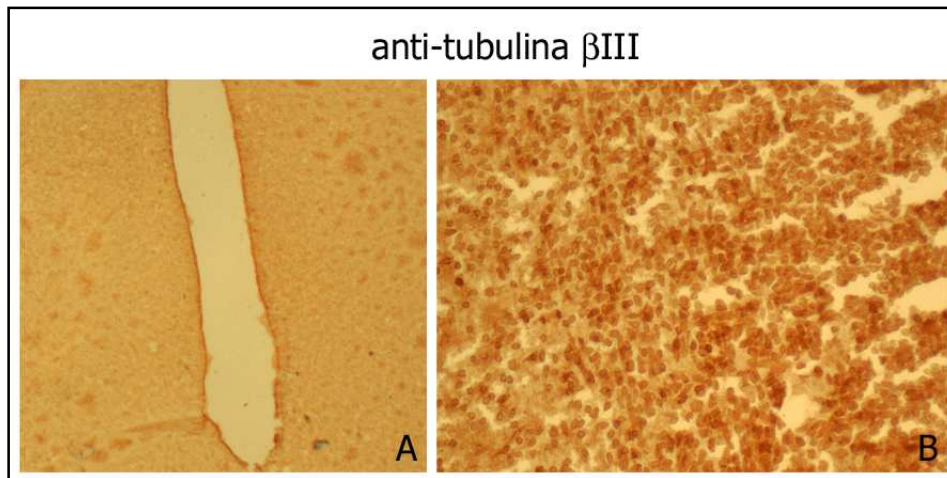


Fig. 13. Immunocitochimica per tubulina β III. Si può notare un intensa e diffusa positività in tutta l'area periventricolare.

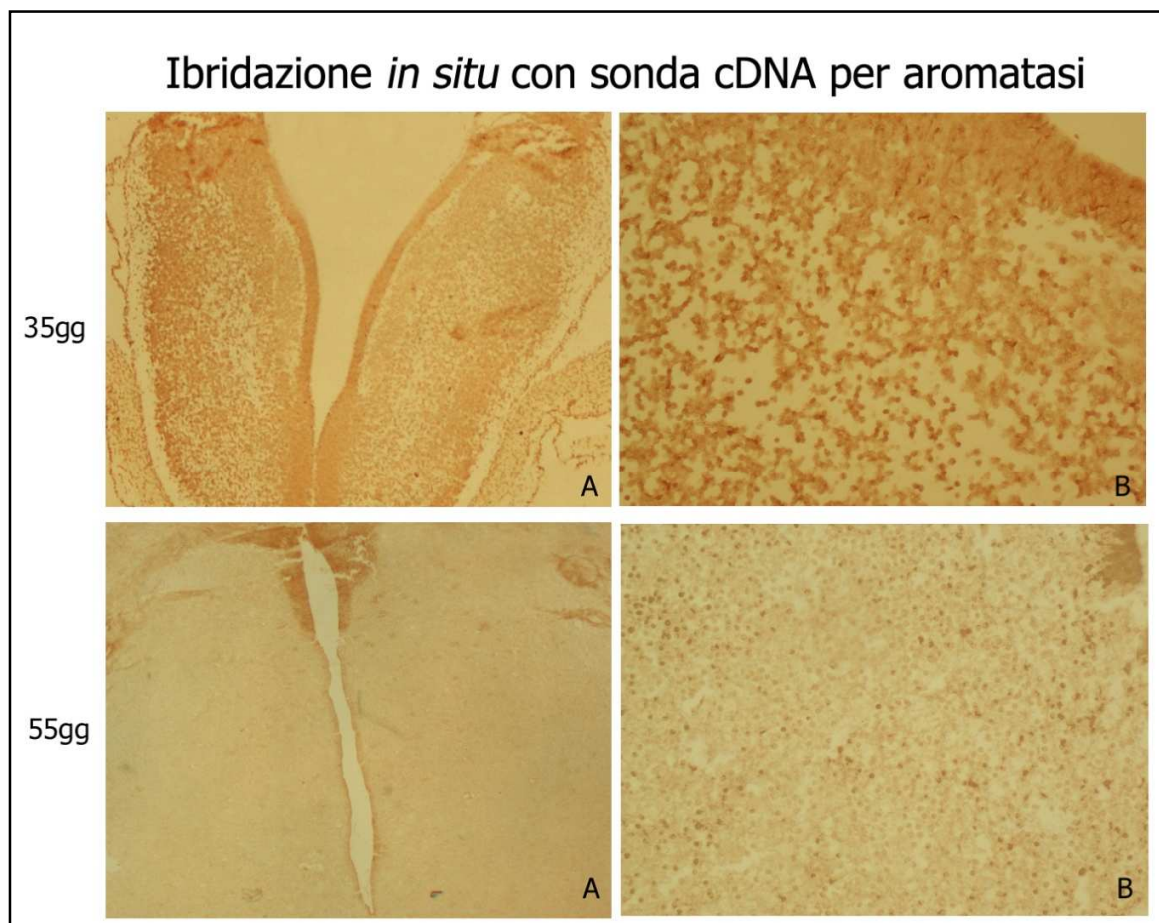


Fig. 14. Ibridazione *in situ* con sonda cDNA per aromatasi. In **A** e **B** si può notare una diffusa immunoreattività a conferma dell'espressione genica dell'aromatasi in epoche sensibili (35 e 55gg di gestazione). Ingr 2X e 20X.

Immunocitochimica Recettore per Androgeni

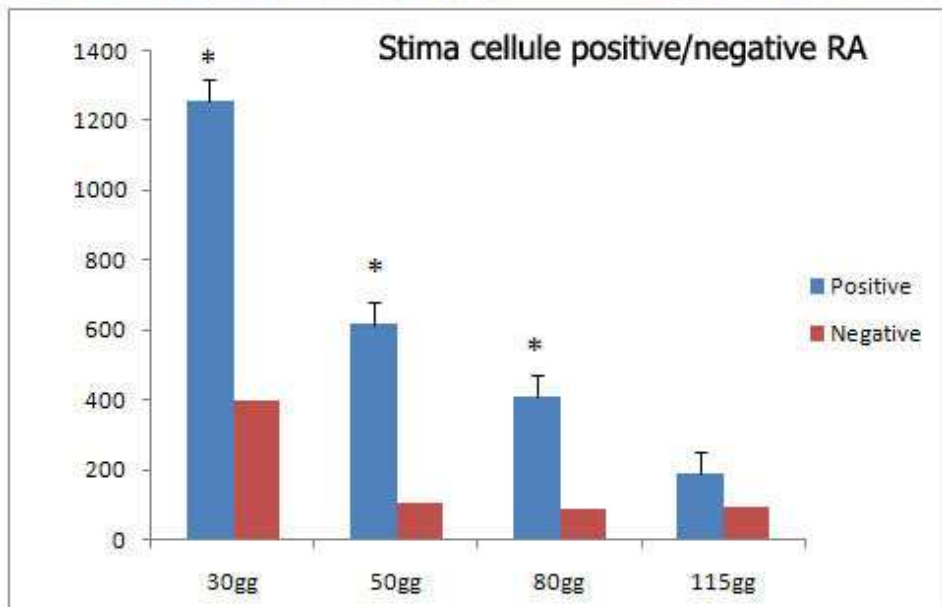
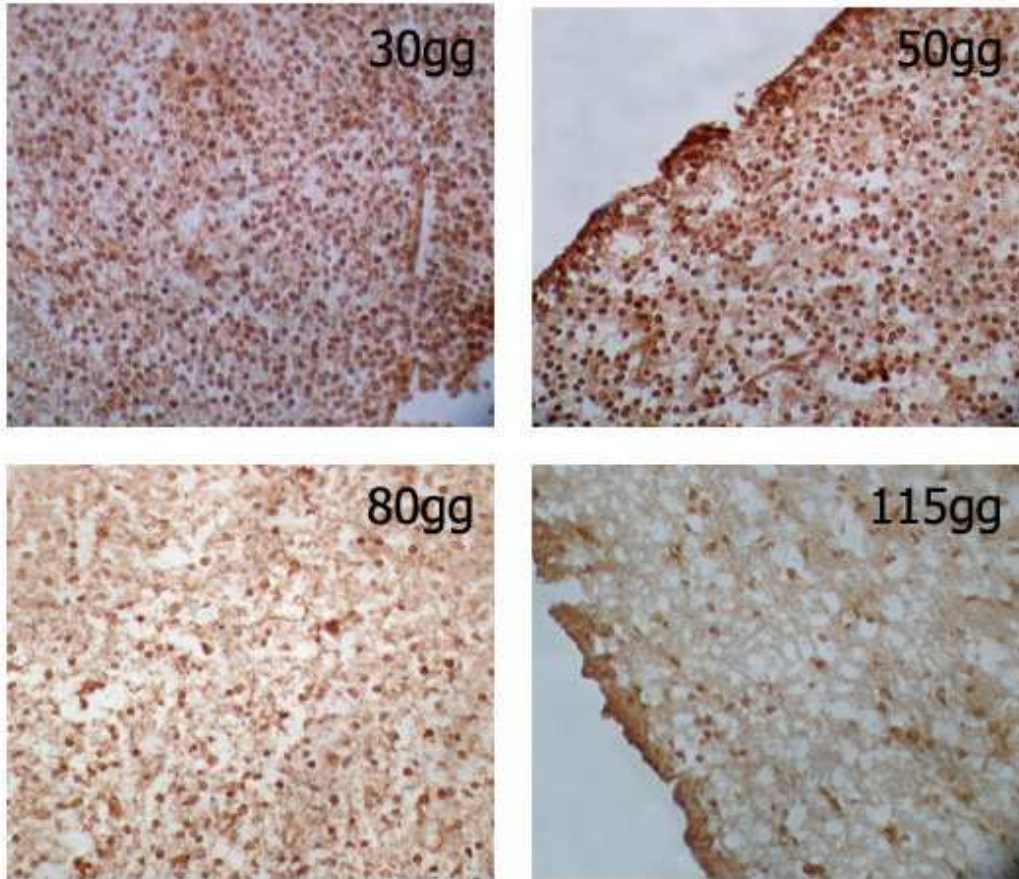


Fig. 15. Immunocitochimica con anticorpo anti recettore per gli androgeni in sezioni di ipotalamo fetale a differenti giorni di gestazione. Come si può notare, sia nelle immagini che nel grafico, il numero di cellule positive segue un andamento del tutto sovrapponibile a quello visto nelle immunocitochimiche con l'anticorpo anti-aromatasi (ingr. 20X). *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Omissione primario

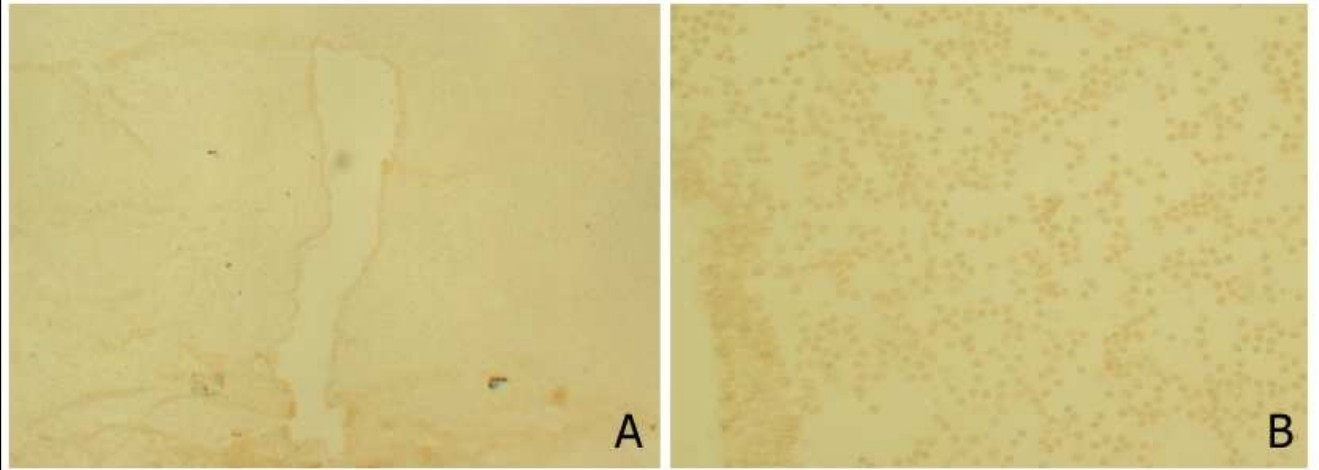


Fig. 16. Le immagini sovrastanti illustrano l'aspetto le fette di tessuto in esame quando viene omissa l'anticorpo anti-aromatasi. Ingr. 20X.

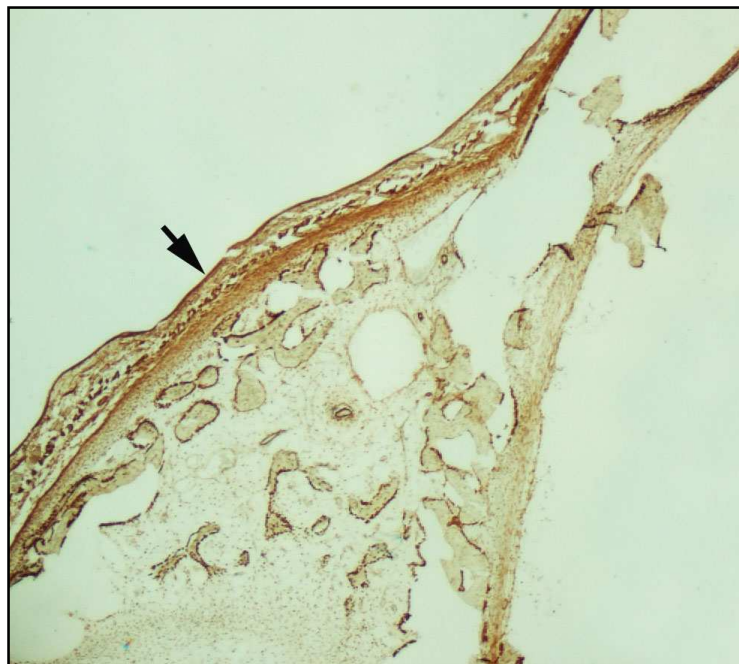


Fig. 17. L'immagine mostra una parte della teca cranica di un feto allo stadio di 35gg. La freccia indica la positività all'aromatasi delle cellule cartilaginee. Ingr. 20X.

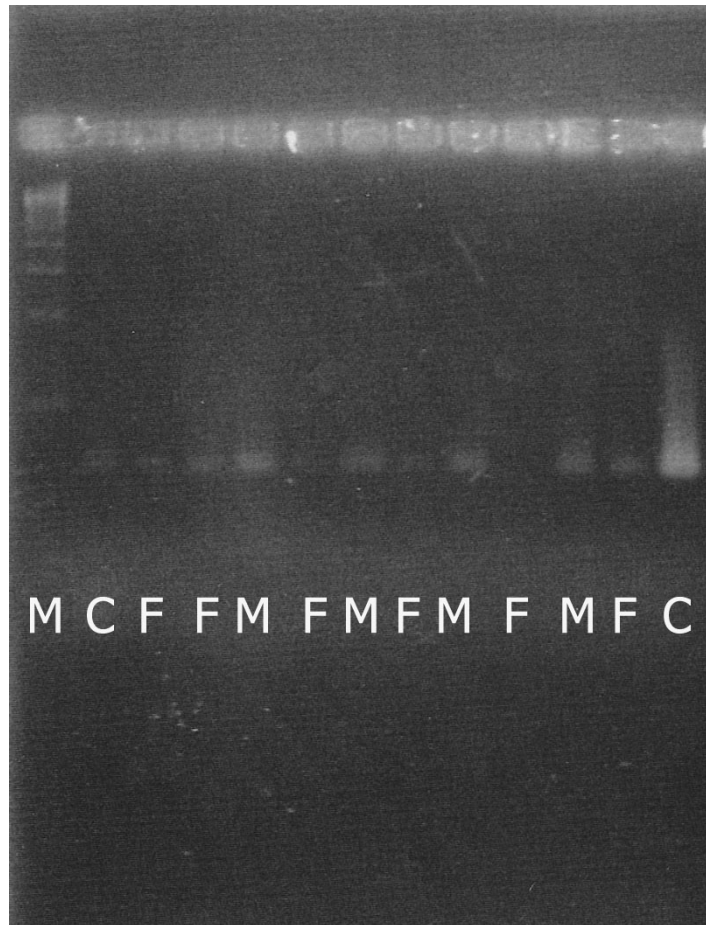


Fig. 18. PCR. M=marker; C=controllo; FFM= primers; F/M=campioni di sesso maschile e femminile.

Immunoistochimica aromatasi 35gg gestazione (feto di sesso femminile)

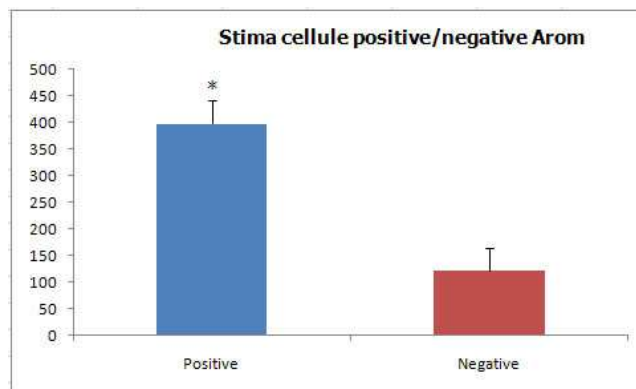
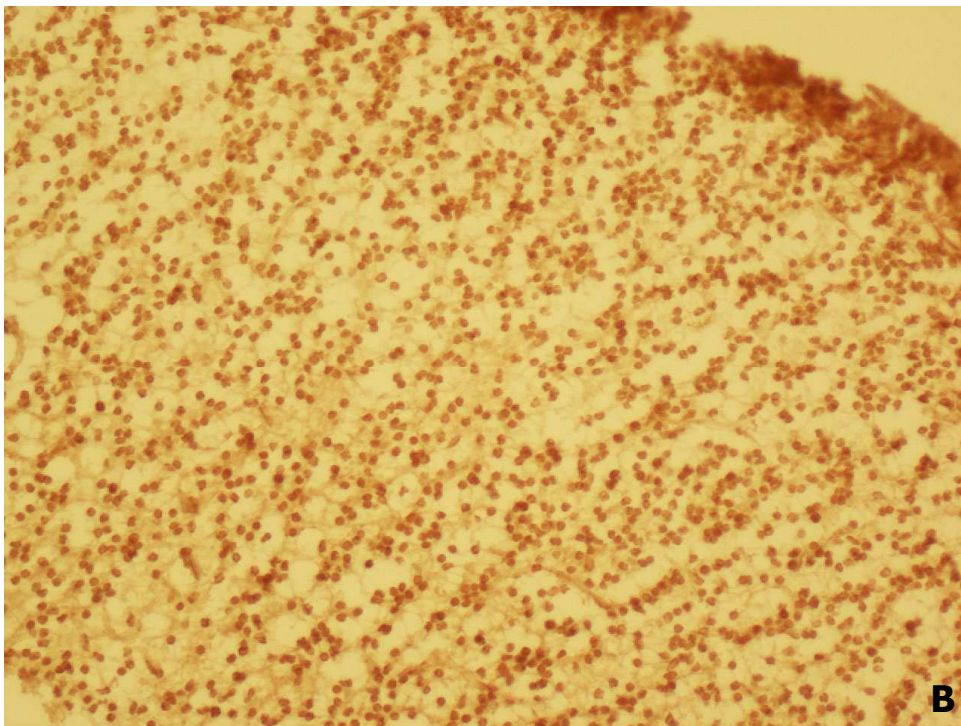
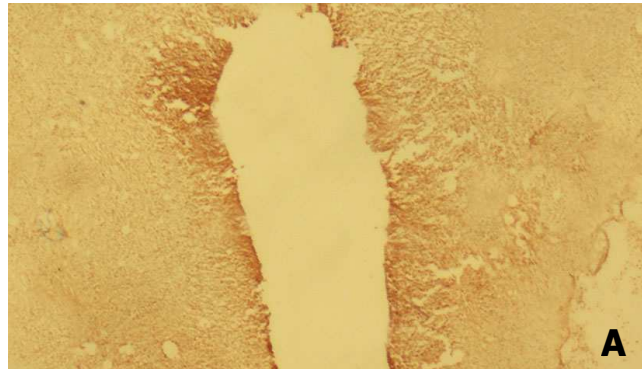
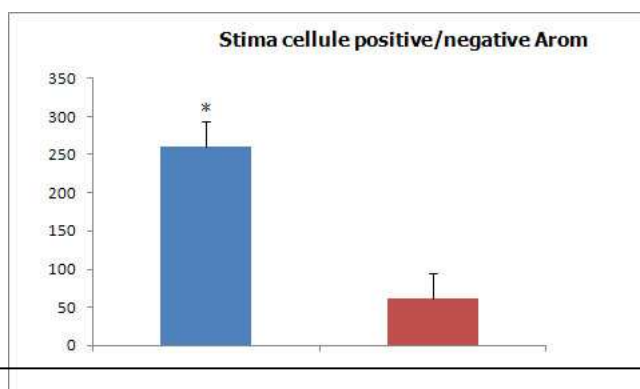
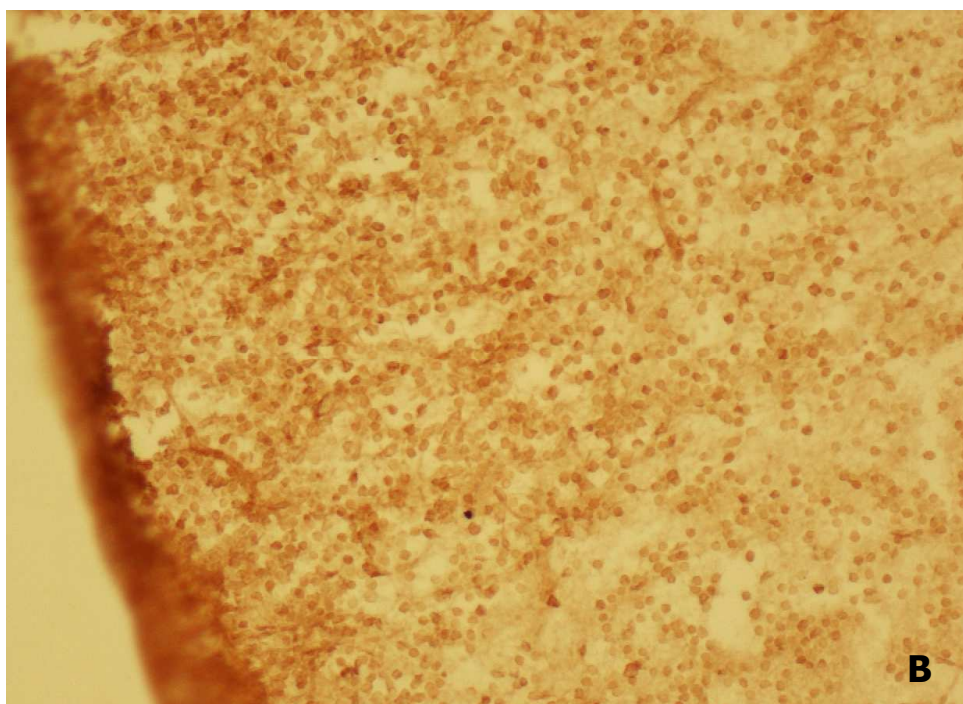


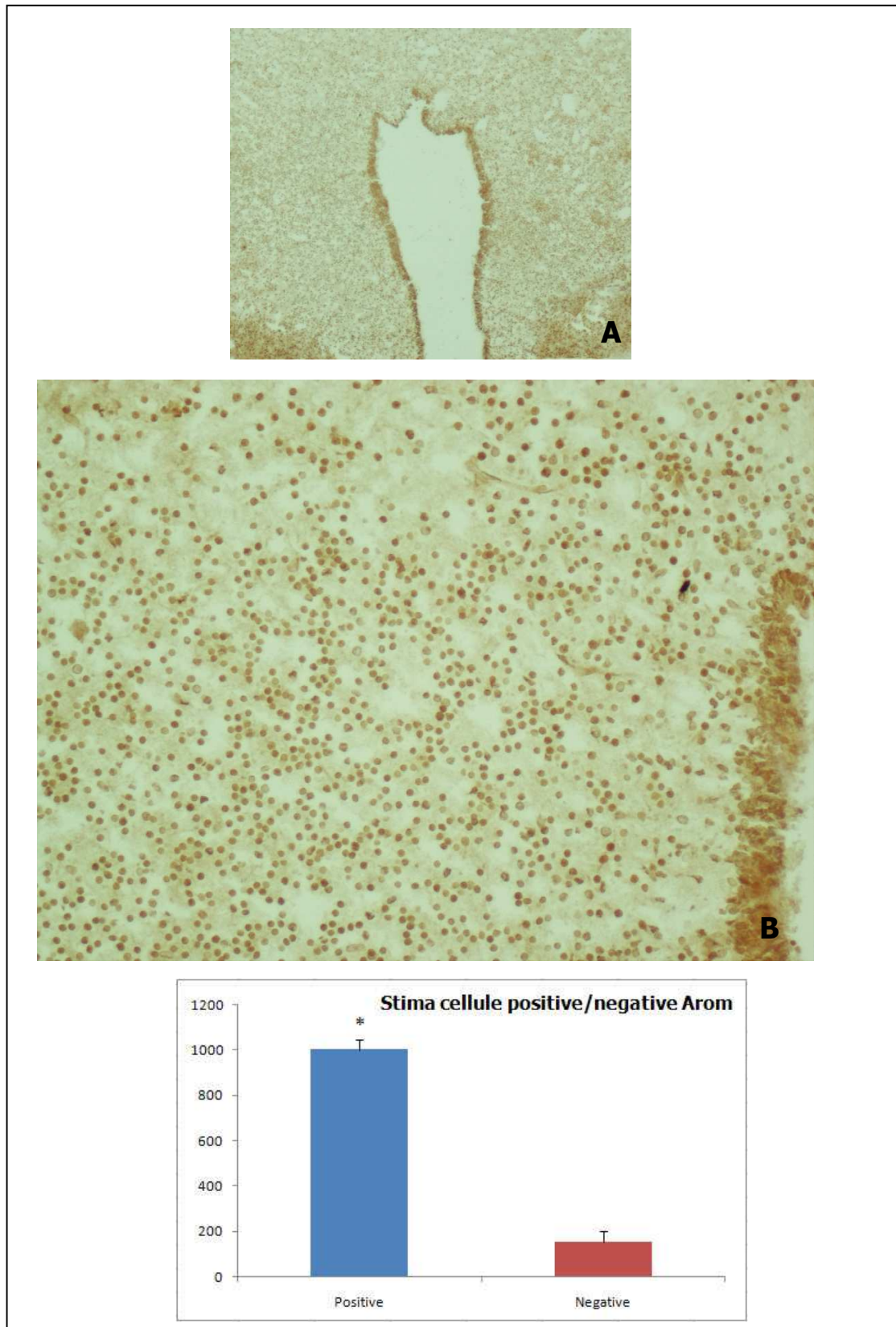
Fig. 19. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore, di un feto di sesso femminile in cui è ben visibile il terzo ventricolo, ingr. 2X. **(B).** Particolare di un'area periventricolare in cui si può notare una positività elevata (ingr. 20X) del grafico quantifica il grado di positività delle cellule nell'area anatomica di interesse. *=significatività ($p < 0.05$) fra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 35gg gestazione (feto di sesso maschile)



Arcadia Mura, Studio **Fig. 26. (A)** Sezione coronale H&E della regione dell'ipotalamo anteriore di un feto di sesso maschile (ingr. 100X). **(B)** Area periventricolare che si può notare una buona positività (ingr 20X). Il grafico quantifica il grado di positività all'aromatasi. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 55 gg gestazione (feto di sesso femminile)



Arcadia Mura, Studio sull'espressione e distribuzione della P450 aromatasi nell'ipotalamo svino a differenti stadi di sviluppo fetale. Tesi di Dottorato, la Riproduzione, 101
Fig. 21. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore di un feto di sesso femminile a 55gg di gestazione, ingr. 2X. (B) Particolare di un'area periventricolare in cui si può notare una diffusa immunoreattività, ingr 20X. Nel grafico, *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

Immunoistochimica aromatasi 55 gg gestazione (feto di sesso maschile)

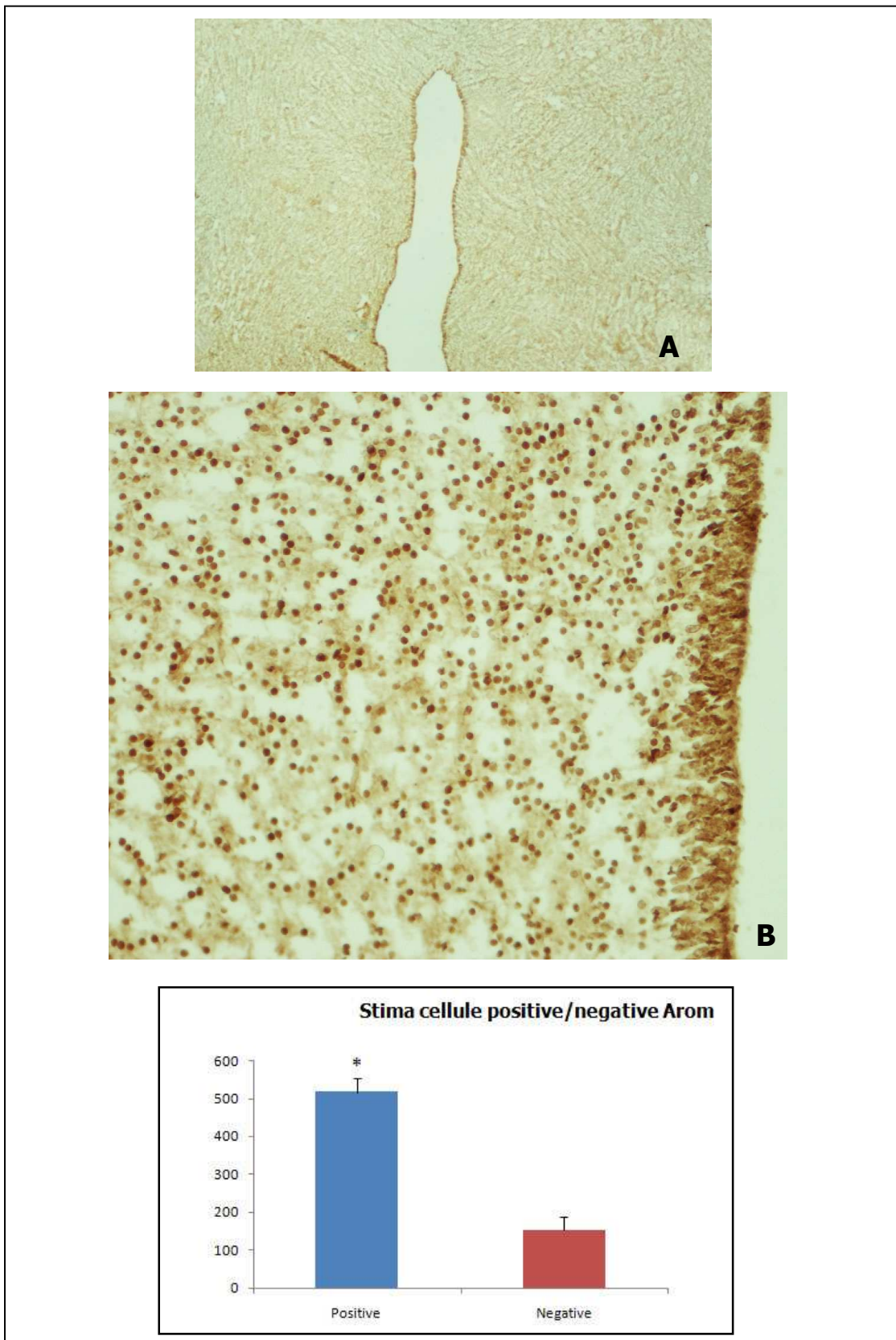


Fig. 22. (A) Sezione coronale della regione dell'ipotalamo anteriore di un feto di sesso maschile a 55gg di gestazione, ingr. 2X. (B) Particolare di un'area periventricolare in cui si può notare una diffusa immunoreattività, ingr 20X. Nel grafico, *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative.

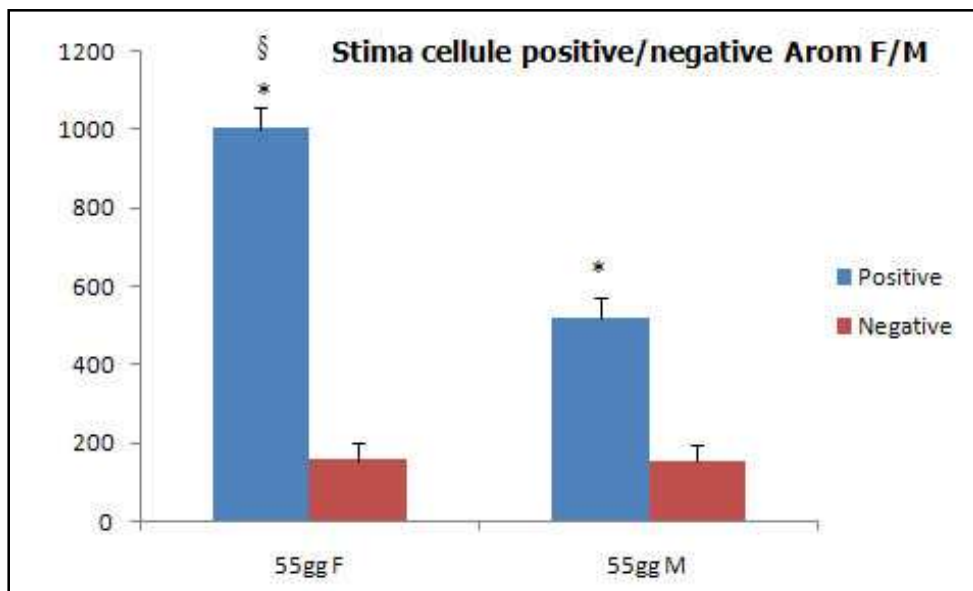
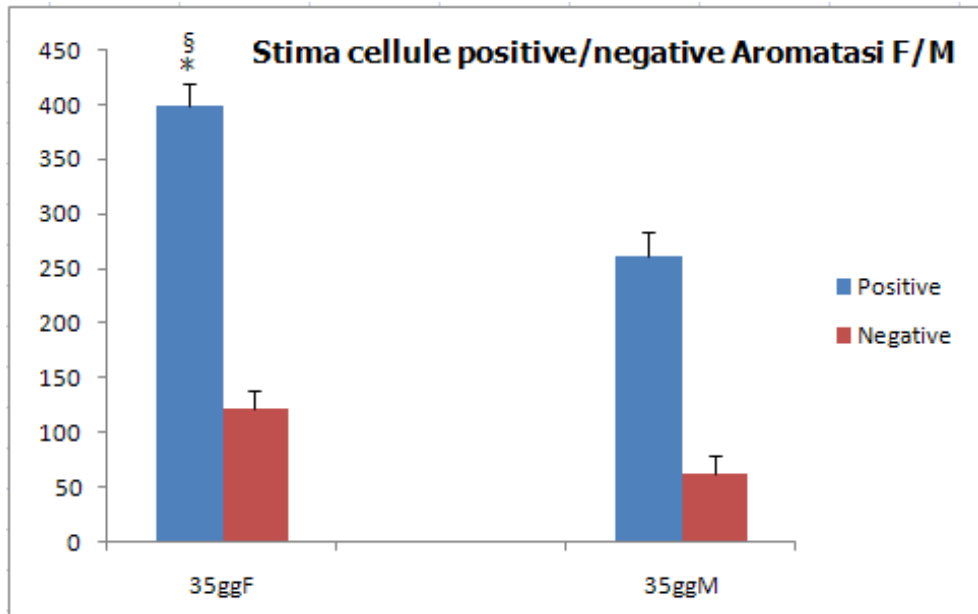


Fig. 24. Grafico riassuntivo illustrante le differenze nel grado di immunopositività all'anticorpo anti aromatasi nelle aree ipotalamiche periventricolari di encefali fetali ovini, maschi e femmine, al **55°** giorno di gestazione. *=significatività ($p < 0.05$) tra cellule positive e cellule negative. §= significatività ($p < 0.05$) tra soggetti maschi e soggetti

Western blot aromatasi (35gg di gestazione)

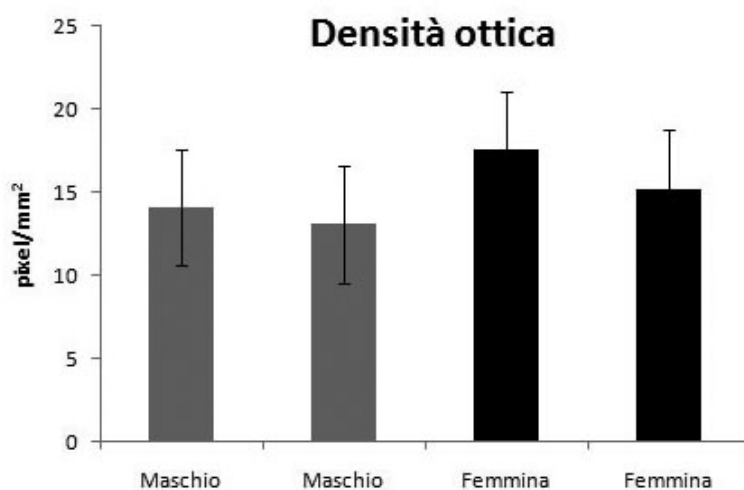
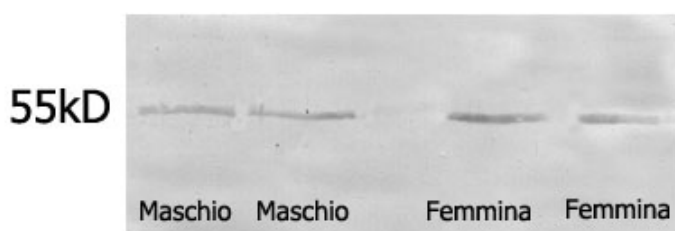


Fig. 25. Il Western blot mostra una singola banda all'altezza di 55kD. La quantificazione delle bande evidenzia una certa differenza nei livelli dell'enzima aromatasi tra i soggetti maschi e i soggetti femmine.

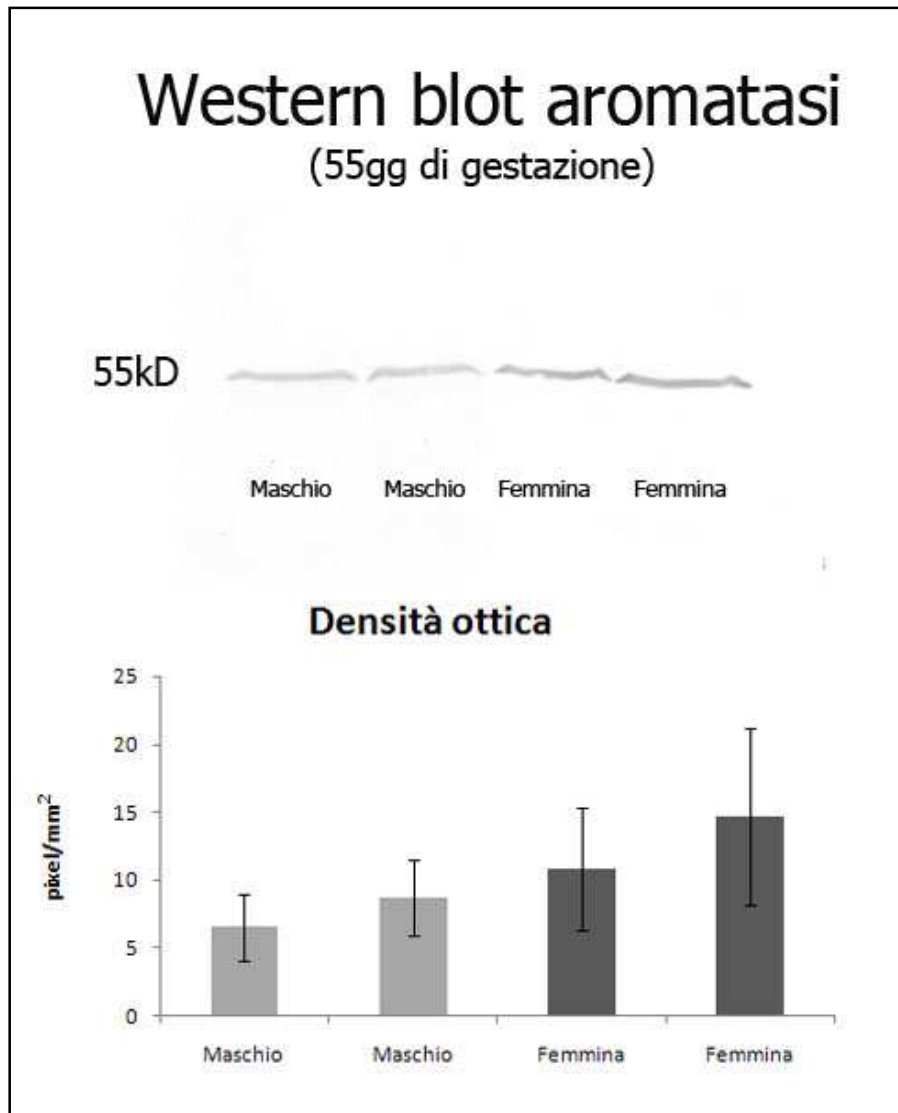


Fig. 26. Il Western blot mostra una singola banda all'altezza di 55kD. La quantificazione delle bande evidenzia una certa differenza nei livelli dell'enzima aromatasi tra i soggetti maschi e i soggetti femmine.

Doppia immunofluorescenza tubulina β III/Aromatasi

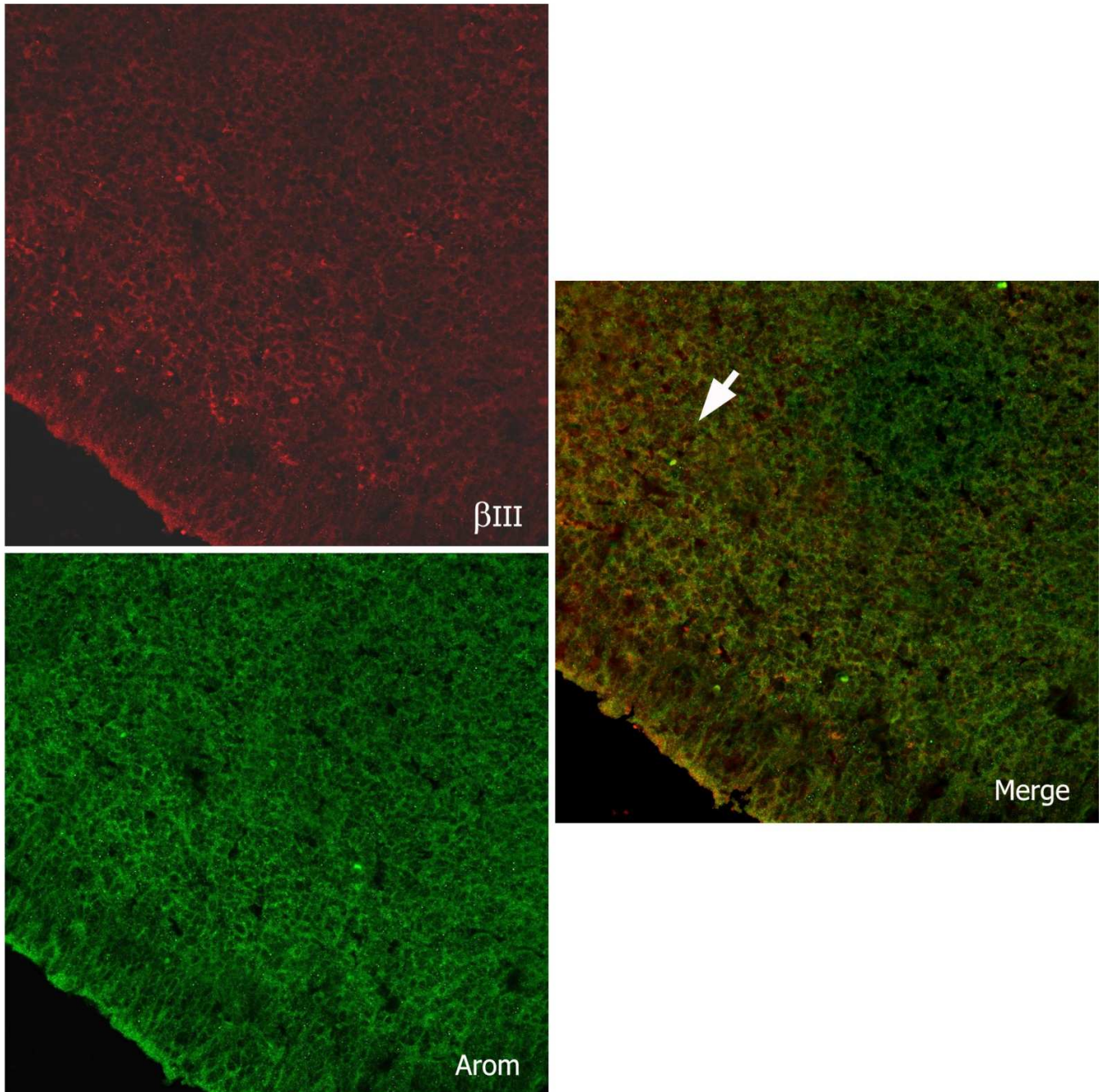


Fig. 27. Doppia immunofluorescenza tubulina β III/Aromatasi. E' evidente una intensa immunoreattività per la tubulina e, ancora più marcata per l'aromatasi. Nella sovrapposizione dei due fluorocromi è evidente un colore arancione (freccia) a testimonianza della completa sovrapposizione delle cellule marcate con i due anticorpi. Ingr. 40X.

Doppia immunofluorescenza GFAP/Aromatasi

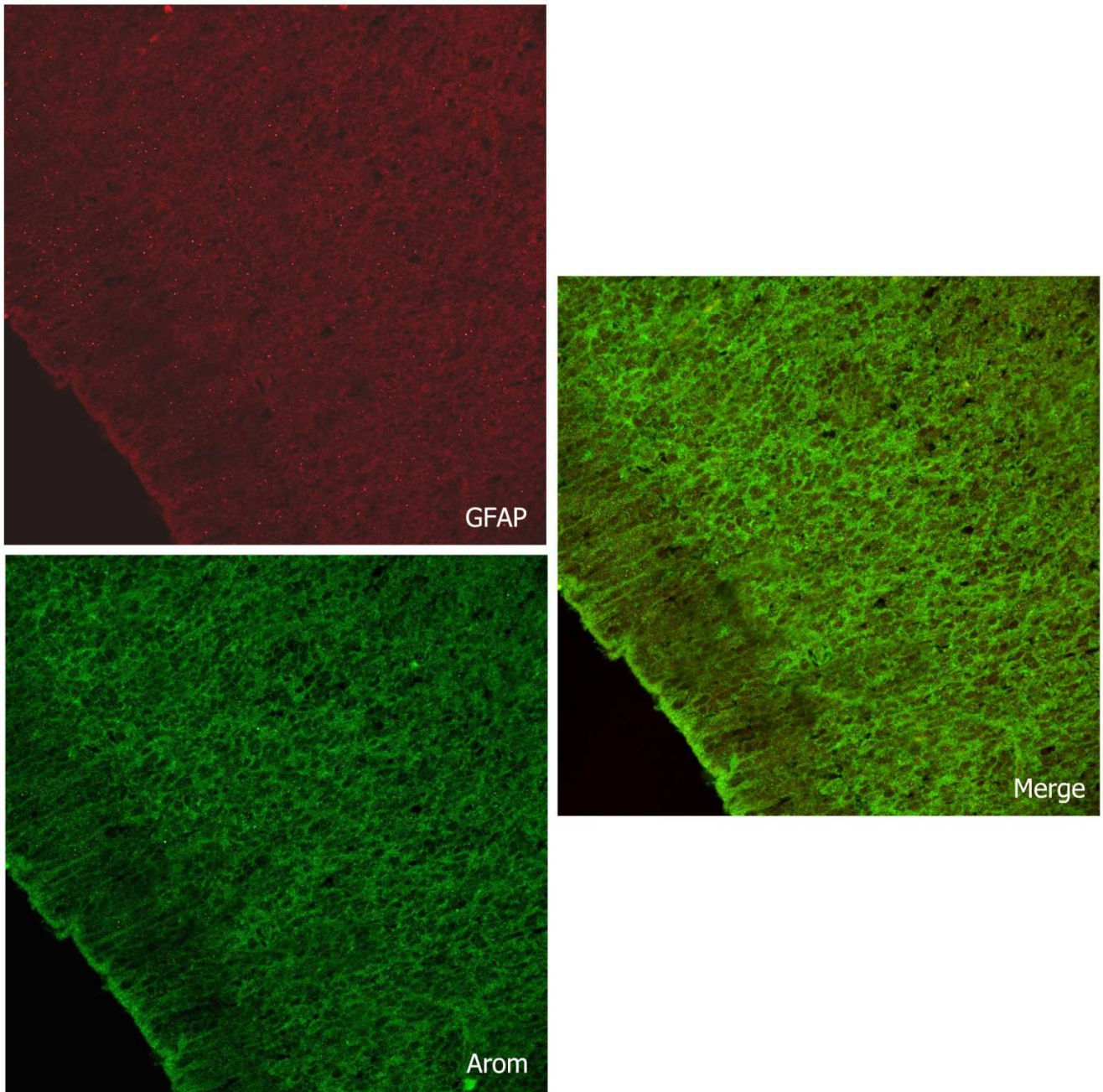


Fig. 28. Doppia immunofluorescenza GFAP/Aromatasi. Intensa immunoreattività per GFAP e, ancora più marcata per l'aromatasi. Nel merge dei due fluorocromi si può notare in alcune aree sub-ventricolari, una completa sovrapposizione delle cellule marcate con i due anticorpi. Ingr. 40X.

Doppia immunofluorescenza PCNA/Aromatasi

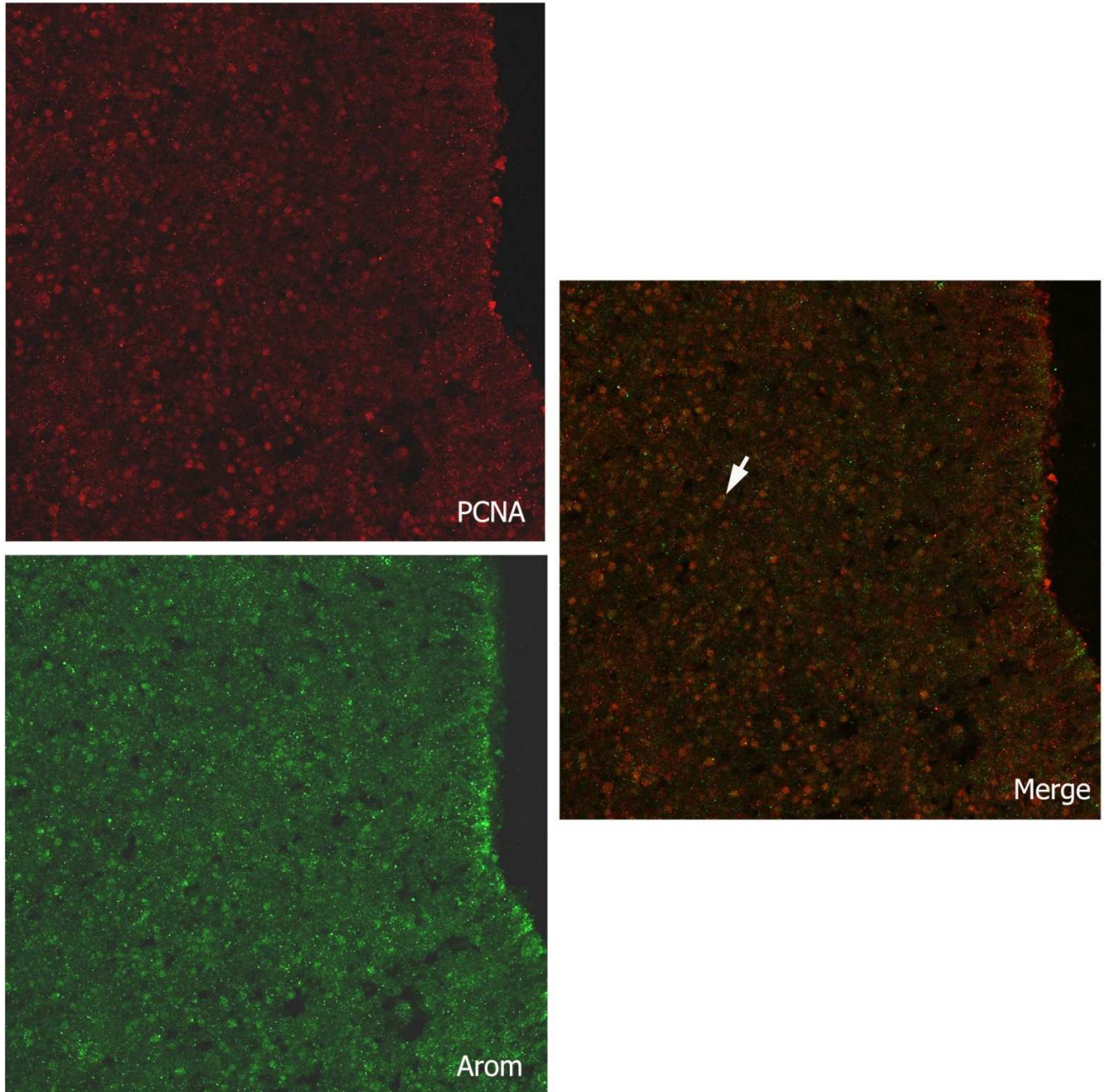


Fig. 29. Doppia immunofluorescenza PCNA/Aromatasi. Intensa immunoreattività per PCNA e Aromatasi. Sono ben visibili i contorni cellulari. Nel merge è notevolmente evidente una completa sovrapposizione delle cellule marcate con i due anticorpi. Ingr. 40X.

CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro possono essere riassunti nelle seguenti conclusioni:

- L'attività dell'aromatasi è stata evidenziata sia prima che dopo i 64 giorni (come dato accertato dal Roselli), sia a partire dal 35° giorno che è lo stadio più precoce del periodo di differenziazione sessuale che a 80 e 115 giorni. Negli stadi più precoci l'immunocitochimica mostra un'elevata attività aromatasica che decresce negli ultimi stadi studiati presentando un trend differente nel numero di cellule aromatasi-positive.
- Per quanto concerne le differenze sessuali, le immunoistochimiche e il Western blot eseguiti su campioni a 35 e a 55 giorni hanno rivelato una significativa differenza tra i sessi a favore dei soggetti di sesso femminile, probabilmente legato in questi ultimi a fattori ormonali che permettono un

adeguato sviluppo ovarico.

- L'immunocitochimica e la doppia immunofluorescenza della beta III, hanno confermato che l'elevata positività aromatasica riscontrata nel tessuto nervoso è da imputare a cellule neuronali (neuroblasti). Infatti la sovrapposizione al confocale mostra vaste aree condivise sia dall'aromatasi che dalla tubulina betaIII.
- La sovrapposizione dell'attività aromatasica con il GFAP, suggerisce che l'enzima è prodotto da una certa quota di cellule gliali. Considerando il fatto che le cellule della glia radiale, numerose nelle zone implicate nelle neurogenesi, possono in un momento successivo alla migrazione neuronale differenziarsi in neuroni, questo dato potrebbe suggerire che la glia possiede già un corredo recettoriale-enzimatico che gli consente di sintetizzare aromatasi;

- La doppia immunofluorescenza PCNA/aromatasi ha rivelato una forte sovrapposizione tra le cellule marcate con il PCNA e quelle positive all'aromatasi, nella zona endimale e periventricolare. Ciò si potrebbe spiegare con un ruolo inaspettato anche nel feto riguardo l'implicazione dell'aromatasi nella regolazione della neurogenesi. Questo dato risulta interessante in quanto in un mammifero, quindi un vertebrato superiore come l'ovino si riproporrebbe un pattern dell'aromatasi tipico di classi di animali inferiori come ad esempio i pesci. In questi il sistema nervoso centrale possiede alti livelli di aromatasi associati ad una elevata neurogenesi per tutta la vita, suggerendo un ruolo regolatore dell'enzima nelle divisioni cellulari. Quindi riscontrare un dato simile nel cervello fetale ovino può far pensare al mantenimento di un aspetto dell'aromatasi perfettamente conservato durante l'evoluzione.

BIBLIOGRAFIA

Barone R. Anatomia comparata degli mammiferi domestici. Neurologia, vol. VI, Edagricole, 2006.

Barney ML, Patil JG, Gunasekera RM, Carter CG. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenetic expression. Gen Comp Endocr, 156: 499-508, 2008.

Clarke IJ. The sexual behavior of prenatally androgenized ewes observed in the field. J Reprod Fertil, 52:313-323, 1978.

Garcia-Segura L.M. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. J Neuroendocrinol, 20: 705-712, 2008.

George FW, Ojeda SR. Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal and infantile development. Endocrinology, 111: 522-529, 1982.

Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, Ronacher K. Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. J Neuroendocrinol, 17: 619-638, 2005.

Krsmanovic LZ, Hu L, Leung P, Feng H, Catt KJ. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, 20: 402-408, 2009.

Laurel D Quirke., Jennifer L. Juengel, David J. Tisdall, Stan Lun, Derek A. Heath, and Kenneth P. McNatty. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biology Of Reproduction*, 65, 216–228, 2001.

Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 135-141, 2007.

Lu Q, Nakamura J, Savinov A, Yue W, Weisz J, Dabbs DJ, Wolz G, Brodie A. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology*, 137: 3061-3068, 1996.

MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 211: 1294-1302, 1981.

Marsh DA, Brodie HJ, Garrett W, Tsai-Morris CH, Brodie AM. Aromatase inhibitors. Synthesis and biological activity of androstenedione derivatives. *J Med Chem*, 28: 788-795, 1985.

Negri-Cesi P, Melcangi RC, Celotti F, Martini L. Aromatase activity in cultured brain cells: difference between neurons and glia. *Brain Research*, 598: 327-332, 1992.

Negri-Cesi P, Colciago A, Motta M, Martini L, Celotti F. Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamus neurons: effect of androgens. *Mol Cell Endocrin*, 178: 1-10, 2001.

Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, Casati L, Conti L, Celotti F. Sexual differentiation on the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences. *J Ster Biochem Mol Biol*, 109: 294-299, 2008.

Pereyra-Martinez AC, Roselli CE, Stadelman H, Resko JA. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. *Endocrine*, 16: 15-19, 2001.

Perkins A, Roselli CE. The rams as a model for behavioral neuroendocrinology. *Horm behave*, 52: 70-77, 2007.

Portillo W, Castillo CG, Retana-Marquez S, Roselli CE, Paredes RG. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol*, 19: 139-141. 2006.

Resko JA, Pereyra-Martinez AC, Stadelman HL, Roselli CE. Region-specific regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid by androgen in brains of male Rhesus monkeys. *Biol reprod*, 62: 1818-1822, 2000.

Roselli CE, Stormshak F. The neurobiology of sexual partner preferences in rams. *Horm Behav*, 55: 611-620, 2009.

Roselli CE, Liu M, Hurn PD. Brain aromatization: classic roles and new perspectives. *Biol Reprod*, 27: 207-217, 2009.

Roselli CE, Stadelman H, Reeve R, Bishop CV, Stormshak F. The ovine sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area is organized prenatally by testosterone. *Endocrinology*, 148: 4450-4457, 2007.

Roselli CE, Schrunk JM, Stadelman HL, Resko JA, Stormshak F. The effects of aromatase inhibition on the sexual differentiation of the sheep brain. *Endocrine*, 29: 501-511, 2006.

Roselli CE, Resko JA, Stormshak F. Expression of steroid hormone receptors in the fetal sheep brain during the critical period for sexual differentiation. *Brain Res*, 1110: 76-80, 2006.

Roselli CE, Larkin K, Schrunk JM, Stormshak F. Sexual partner preference, hypothalamic morphology and aromatase in rams. *Physiol Behav*, 83: 233-245, 2004.

Roselli CE, Larkin K, Resko JA, Stellflug JN, Stormshak F. The volume of sexually dimorphic nucleus in the ovine medial preoptic area/anterior hypothalamus varies with sexual partner preference. *Endocrinology*, 145: 478-483, 2004.

Roselli CE, Cross E, Poonyagariyagorn HK, Stadelman HL. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behaviour in male rats. *Horm Behav*, 44: 146-151, 2003.

Roselli CE, Resko JA, Stormshak F. Estrogen synthesis in fetal sheep brain: effects of maternal treatment with an aromatase inhibitor. *Biol Reprod*, 68: 370-374, 2003.

Roselli CE, Resko JA. Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation, and functional significance. *J Steroid Biochem*, 79: 247-253, 2001.

Roselli CE, Klosterman S, Resko JA. Anatomic relationships between aromatase and androgen receptor mRNA expression in the hypothalamus and amygdala of adult male cynomolgus monkeys. *J Comp Neurol*, 439: 208-223, 2001.

Roselli CE, Stormshak F, Resko JA. Distribution of aromatase mRNA in the ram hypothalamus: an in situ hybridization study. *J Neuroendocrinol*, 12: 656-664, 2000.

Roselli CE, Stormshak F, Resko JA. Distribution and regulation of aromatase activity in the ram hypothalamus and amygdala. *Brain Res*, 811: 105-110, 1998.

Roselli CE, Klosterman SA. Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*, 139: 3193-3201, 1998.

Roselli CE, Abdelgadir SE, Ronnekleiv OK, Klosterman SA. Anatomic distribution and regulation of aromatase gene expression in the rat brain. *Biol Reprod*, 58: 79-87, 1998.

Roselli CE, Resko JA. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex difference. *J Steroid Biochem*, 44: 499-508, 1993.

Roselli CE, Resko JA. The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. *Steroids*, 50: 495-508, 1987.

Roselli CE, Horton Le, Resko JA. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*, 117: 2471-2477, 1985.

Ryan KJ. Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem*, 234: 931-941, 1959.

Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Reviews*, 30: 343-375, 2009.

Scallet AC, Divine RL, Newbold RR, Delclos KB. Increased volume of the calbindin D28k-labeled sexually dimorphic hypothalamus in genistein and nonylphenol-treated male rats. *Toxicol Sciences*, 82: 570-576, 2004.

Sharma TP, Blache D, Roselli CE, Martin GB. Distribution of aromatase activity in brain and peripheral tissues of male sheep: effect of nutrition. *Reprod Fertil Dev*, 16: 709-715, 2004.

Short RV. Sexual differentiation of the brain of the sheep. *INSERM*, 32: 121-142, 1974.

Sickel MJ, McCarthy. Calbindin- D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. *J Neuroendocrinol*, 12: 397-402, 2000.

Whalen Re, Olsen Kl. Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ADT treatment and neonatal castration. *Horm Behav*, 15: 107-122, 1981.

Wood RI, Foster DL. Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev Reprod*, 3: 130-140, 1998.