

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Facoltà di Scienze del Farmaco**  
*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari*



**Corso di Dottorato di Ricerca in**  
**SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE**  
**ciclo XXVI**

**Settori scientifico-disciplinari: BIO/09 – BIO/13 – MED/13**

**MODELLI SPERIMENTALI DI SOVRACCARICO  
DIETETICO DI FERRO: EFFETTI CENTRALI E  
PERIFERICI SU METABOLISMO E FUNZIONE  
RIPRODUTTIVA**

**Tesi di dottorato presentata da:**

**Dott. Liliana STEFFANI**

**Matricola n. R09118**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Roberto C. MELCANGI**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Angelo POLETTI**

**Anno Accademico: 2012/2013**

# INDICE

<b>1. RIASSUNTO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUZIONE .....</b>	<b>12</b>
2.1 ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-GONADI (ASSE HPG): ANATOMIA.....	12
2.1.1 Ipotalamo.....	14
2.1.2 Ipofisi .....	16
2.1.2.1 Neuroipofisi.....	16
2.1.2.2 Adenoipofisi .....	17
2.1.2.3 Irrorazione sanguigna e sistema portale ipotalamo-ipofisario .....	18
2.1.3 Gonadi .....	18
2.1.3.1 Testicolo.....	19
<b>3. NEURONI GnRH-SECERNENTI .....</b>	<b>21</b>
3.1 ORIGINE, SVILUPPO E MIGRAZIONE .....	21
3.2 REGOLAZIONE DELLA MIGRAZIONE.....	22
3.3 IL PEPTIDE GnRH .....	27
3.3.1 Forme molecolari di GnRH .....	28
3.3.2 Sintesi, secrezione e attività del GnRH.....	29
3.4 REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE DEL GnRH.....	31
3.4.1 Secrezione pulsatile del GnRH: "GnRH pulse generator" .....	31
3.4.2 Kisspeptina: ruolo nei meccanismi di secrezione del GnRH .....	32
3.4.3 Neuroni KNDy: ipotetico ruolo nei meccanismi di secrezione del GnRH .....	33
3.4.4 Pulsatilità intrinseca dei neuroni GnRH.....	36
<b>4. GONADOTROPINE: LH E FSH .....</b>	<b>38</b>
4.1 REGOLAZIONE DIFFERENZIALE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI LH E FSH IN RELAZIONE ALLA FREQUENZA DI PULSATILITÀ DEL GnRH.....	39
4.2 VIE DI SEGNALE ATTIVATE DAL RILASCIO PULSATILE DEL GnRH .....	40
4.3 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELLE SUBUNITÀ DI FSH E LH .....	42
<b>5. METABOLISMO PERIFERICO E CENTRALE DEL FERRO .....</b>	<b>44</b>
5.1 FUNZIONI BIOLOGICHE DEL FERRO.....	44
5.2 PROPRIETA' CHIMICHE DEL FERRO .....	45

5.3 LOCALIZZAZIONE E CONCENTRAZIONE DEL FERRO .....	45
5.4 OMEOSTASI DEL FERRO A LIVELLO PERIFERICO .....	46
5.4.1 Assorbimento del ferro attraverso le cellule della mucosa intestinale.....	46
5.4.2 Trasporto del ferro in circolo .....	48
5.4.3 Trafficking cellulare del ferro .....	48
5.5 REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI CELLULARE DEL FERRO A LIVELLO PERIFERICO .....	50
5.6 OMEOSTASI DEL FERRO NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE (SNC) .....	52
5.6.1 Ingresso del ferro nel SNC .....	52
5.6.1.1 Barriere del SNC .....	52
5.6.1.2 Trasporto del ferro attraverso la barriera emato-encefalica (BEE) .....	53
5.6.1.3 Trasporto del ferro attraverso la barriera emato-liquorale (BEL) .....	55
5.6.2 Espressione cerebrale dei geni associati al ferro .....	57
5.7 REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI CELLULARE DEL FERRO NEL SNC.....	60
<b>6. TOSSICITA' DEL SOVRACCARICO DI FERRO A LIVELLO CENTRALE.....</b>	<b>62</b>
6.1 ACCUMULO FISILOGICO DEL FERRO NEL CERVELLO .....	62
6.2 MECCANISMI DI TOSSICITÀ DA SOVRACCARICO DI FERRO A LIVELLO CENTRALE .....	63
6.2.1 Ferro e stress ossidativo .....	64
6.2.2 Ferro e specie reattive dell'azoto .....	66
6.3 SUSCETTIBILITÀ DELLE CELLULE CEREBRALI ALLO STRESS OSSIDATIVO.....	66
6.4 ALTRI MECCANISMI DI TOSSICITA' DEL SOVRACCARICO DI FERRO NEL SNC...	67
6.5 SINDROMI DA SOVRACCARICO DI FERRO .....	68
6.5.1 Sovraccarico di ferro primitivo .....	68
6.5.2 Sovraccarico di ferro secondario .....	68
6.6 PATOLOGIA DEL SISTEMA GnRH SECERNENTE: IPOGONADISMO.....	70
6.6.1 Ipogonadismo ipogonadotropo associato a sovraccarico di ferro .....	74
<b>7. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>77</b>
<b>8. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>80</b>
8.1 REAGENTI .....	80
8.2 ANIMALI .....	80
8.3 COLTURE CELLULARI .....	81
8.4 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO TISSUTALE E CELLULARE DI FERRO	

TRAMITE SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO .....	82
8.5 SAGGIO DI VITALITA' CELLULARE .....	83
8.5.1 ATPlite™ 1step .....	83
8.5.2 Contatore di cellule automatizzato Luna™ .....	84
8.6 ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA TESSUTI E DA CELLULE.....	84
8.6.1 Ipotalamo.....	84
8.6.2 Ipofisi, Gonadi, cellule GN-11 e GT1-7.....	85
8.6.3 Quantizzazione spettrofotometrica dell'RNA totale.....	86
8.7 RETROTRASCRIZIONE – REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (RT-PCR; Reverse Transcription – Polymerase chain reaction).....	86
8.8 PCR QUANTITATIVA IN TEMPO REALE (qPCR; Real-time quantitative PCR) .....	89
8.8.1 SYBR Green .....	89
8.8.2 TaqMan.....	89
8.9 STUDIO DELLA MIGRAZIONE DELLE CELLULE GN-11 (CAMERA DI BOYDEN).....	91
8.10 ESTRAZIONE DI PROTEINE DALL'IPOTALAMO E DALLE CELLULE GN-11 .....	92
8.10.1 Ipotalamo.....	92
8.10.2 GN-11 .....	93
8.11 SEPARAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA CITOPLASMATICA DA QUELLA NUCLEARE .....	93
8.12 ANALISI WESTERN BLOT .....	94
8.13 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA.....	96
8.14 ANALISI STATISTICA DEI DATI .....	97
<b>9. RISULTATI.....</b>	<b>98</b>
9.1 MODELLI SPERIMENTALI: MESSA A PUNTO E CRITICITÀ .....	98
9.1.1 Scelta del modello murino di sovraccarico marziale .....	98
9.1.1.1 Fenotipo metabolico .....	100
9.1.1.2 Parametri morfometrici .....	101
9.1.2 Scelta del modello <i>in vitro</i> di sovraccarico marziale .....	104
9.2 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO CELLULARE DI FERRO.....	105
9.2.1 Ipotalamo.....	105
9.2.2 GN-11 e GT1-7 .....	106
9.2.3 Ipofisi .....	106
9.2.4 Gonadi .....	106
9.3 TOSSICITÀ DEL FERRO A LIVELLO CELLULARE .....	108
9.3.1 GN-11.....	108

9.4 ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TfR), DELLA FERRITINA H (FtH) E DI EPCIDINA .....	110
9.4.1 Ipotalamo.....	110
9.4.2 GN-11 e GT1-7 .....	110
9.4.3 Gonadi .....	111
9.5 MODULAZIONE DEI GENI SENSIBILI AL FERRO (TFR, FTH E, NELLE GONADI, EPCIDINA) .....	111
9.5.1 Ipotalamo.....	112
9.5.2 GN-11 e GT1-7 .....	113
9.5.3 Gonadi .....	114
9.6 EFFETTO DELL'ACCUMULO MARZIALE SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE GN-11 .....	116
9.7 EFFETTO DEL SOVRACCARICO MARZIALE SULLA MODULAZIONE DEL SIGNALING NELLE CELLULE GN-11 .....	119
9.8 VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELL'INIBIZIONE FERRO-DIPENDENTE DELLA CHEMOMIGRAZIONE DELLE CELLULE GN-11 .....	121
9.9 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A DOSI ECCESSIVE DI FERRO SUL PATHWAY INFIAMMATORIO <i>IN VIVO</i> E NELLE CELLULE GN-11 .....	123
9.9.1 Ipotalamo.....	123
9.9.2 GN-11.....	125
9.10 EFFETTO DELLA MANIPOLAZIONE DELLO STATO DEL FERRO SULLO STRESS OSSIDATIVO E DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO <i>IN VIVO</i> E NELLE CELLULE GN-11 .....	128
9.10.1 Ipotalamo.....	129
9.10.2 GN-11 .....	130
9.11 EFFETTO DEL SOVRACCARICO MARZIALE SUI MECCANISMI NEUROENDOCRINI COINVOLTI NEL CONTROLLO DELLA RIPRODUZIONE E DEL COMPORTAMENTO ALIMENTARE .....	132
9.11.1 Ipotalamo.....	132
9.11.2 GN-11 e GT1-7.....	135
9.11.3 Ipofisi .....	136
9.12 EFFETTO DEL SOVRACCARICO DIETETICO DI FERRO SULLA MODULAZIONE DEL SIGNALING NELL'IPOTALAMO.....	137
<b>10. DISCUSSIONE.....</b>	<b>140</b>

**11. BIBLIOGRAFIA ..... 155**

# 1. RIASSUNTO

Il ferro rappresenta un metallo cardine nella complessa biochimica degli esseri viventi poiché interviene come cofattore in processi biochimici fondamentali per l'organismo e riveste un ruolo essenziale per il normale sviluppo e funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC). Tuttavia, l'accumulo nei tessuti di quantità eccessive di ferro libero è potenzialmente tossico per l'ambiente cellulare poiché può catalizzare la generazione e la propagazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente danno ossidativo a carico di lipidi di membrana, proteine e acidi nucleici. In diverse condizioni patologiche quali diabete mellito di tipo 2 (T2D), sindrome metabolica (MetS), emocromatosi ereditaria, talassemie e sindrome dismetabolica da sovraccarico di ferro (DIOS) è emerso un parallelismo tra perturbazione della funzione metabolica e compromissione dell'asse riproduttivo con insorgenza d'ipogonadismo prevalentemente ipogonadotropo (HH). In tali situazioni patologiche, il ferro è l'elemento principale che perturba l'asse ipotalamo - ipofisario in modo dose - dipendente.

Studi precedentemente condotti dal nostro gruppo di lavoro hanno evidenziato come il sovraccarico dietetico di ferro (IED - "Iron Enriched Diet") in topi C57BL/6J riproduca la DIOS e influenzi negativamente il metabolismo glucidico e lipidico con un'azione primaria a livello del tessuto adiposo viscerale (VAT), sede d'origine di insulino - resistenza (IR), ma anche del fegato, probabile sede della compromissione dell'omeostasi lipidica [1].

Scopo principale di tale lavoro di tesi è stato lo studio della capacità del sovraccarico marziale di compromettere, oltre alla già indagata funzione metabolica [1], anche quella riproduttiva, unitamente all'analisi dei meccanismi molecolari alla base della fisiopatologia dell'eccesso marziale. Tra le probabili sedi anatomiche oggetto della perturbazione (asse HPG: ipotalamo - ipofisi - gonadi), la nostra attenzione si è focalizzata prevalentemente sull'ipotalamo poiché, a differenza dell'ipofisi, il suo ruolo primario ed esclusivo nell'insorgenza di HH non è stato ancora del tutto chiarito. Poiché l'ipotalamo non è ovviamente esplorabile nell'uomo, per perseguire il nostro scopo, ci siamo avvalsi di due modelli sperimentali in logica traslazionale: il modello murino di DIOS già precedentemente caratterizzato a livello metabolico [1] e, come ulteriore lente di ingrandimento, le cellule GN-11, rappresentative di neuroni GnRH immaturi e migratori e le cellule GT1-7, neuroni maturi e GnRH secernenti.

Accanto alla caratterizzazione degli effetti centrali e periferici del sovraccarico marziale in un modello murino adulto, abbiamo quindi indagato il potenziale

contributo dell'eccesso di ferro sui meccanismi molecolari e fisiologici (migrazione dei neuroni GnRH dal placode olfattorio all'ipotalamo) che, durante la vita embrionale, pongono le basi per l'acquisizione della corretta competenza riproduttiva in età adulta. L'alimentazione di topi C57BL/6J con dieta IED ha determinato, a livello macroscopico, un ridotto incremento ponderale, a cui ha sicuramente contribuito la diminuita assunzione di cibo, e una riduzione nel peso e nel diametro maggiore testicolare. Sebbene la dieta IED abbia comportato un accumulo marziale nel fegato e nel VAT comparabile a quello dei pazienti affetti da DIOS, non ha aumentato lo specifico contenuto di ferro nell'ipotalamo, come è emerso dall'analisi mediante spettrometria di assorbimento atomico. Il sovraccarico alimentare di ferro non ha indotto modificazioni nell'espressione genica ipotalamica del recettore della transferrina (TfR) e della ferritina H (FtH), geni responsivi al ferro. Anche nei testicoli, nonostante si sia registrato un incremento, seppur modesto, del contenuto marziale, l'analisi RT-qPCR non ha mostrato variazioni nei livelli dell'mRNA di TfR, FtH e epcidina. Sebbene la dieta IED non abbia comportato un accumulo centrale di ferro, si sono comunque registrate variazioni nell'espressione ipotalamica di geni correlati a specifiche funzioni biologicamente rilevanti in cui è riconosciuto il coinvolgimento di tale metallo. In merito alla funzione riproduttiva, i topi IED, caratterizzati macroscopicamente da atrofia gonadica, hanno mostrato un aumento nei livelli del trascritto ipotalamico del GnRH (apparentemente in contrasto con le nostre aspettative di un HH) senza effetti sull'espressione dell'mRNA di Kiss-1 e GPR54. La tendenza all'aumento, seppur in modo non significativo, della trascrizione del GnRH è stata osservata anche nei neuroni GnRH-secernenti *in vitro* (cellule GT1-7). Bisogna però tener presente che è frequente la dicotomia tra espressione genica e proteica ipotalamica; inoltre l'aumentata espressione del trascritto del GnRH potrebbe essere ascrivibile ad un "effetto rebound" della ridotta secrezione del decapeptide. A conferma di tale considerazione, si collocherebbe anche la tendenza alla riduzione dell'espressione genica ipofisaria di LH $\beta$ . Ulteriori indagini, quali il dosaggio dei livelli sierici di LH, FSH e testosterone libero, sono necessarie per definire l'effettiva sede anatomica della disfunzione riproduttiva nell'asse HPG e i meccanismi fisiopatologici coinvolti. La diminuzione dei livelli sierici di leptina, ascrivibile al ridotto incremento ponderale e alla condizione di lipodistrofia osservata nel VAT dei topi IED, ha promosso uno stato oreogigenico centrale, come indicato dall'aumento dell'espressione genica ipotalamica del neuropeptide Y (NPY) e dalla riduzione di quella della proopiomelanocortina (POMC). Una condizione d'infiammazione ipotalamica ma non sistemica dopo IED è suggerita dall'incremento dell'mRNA di TNF $\alpha$  ("Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ")

esclusivamente nell'ipotalamo di topi IED, sebbene non vi siano modulazioni nel gene per interleuchina-6 (IL-6). Analogamente al VAT e al fegato, la IED ha stimolato la sintesi ipotalamica dell'mRNA di CHOP (C/EBP homologous protein) (risposta allo stress del reticolo endoplasmatico), senza però modificare quella di SOD2 (superossido dismutasi 2) (stress ossidativo) e lo splicing di XBP-1 (X-box binding protein-1). L'analisi nell'ipotalamo del signaling associato al sovraccarico dietetico di ferro si è incentrata sulle vie di segnale di ERK1/2 (Extracellular-Signal-Regulated Kinase 1/2), di PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase) e di AMPK (5'-AMP Protein Kinase). Accanto all'attivazione della via di AMPK, abbiamo registrato una stimolazione di quella di PI3K/Akt e un effetto neutrale su quella di ERK1/2. Tale indagine è stata però condotta su ipotalami interi ed è quindi il risultato dei contributi di diversi nuclei e tipi cellulari, neuronali o meno. Indagini future verteranno sull'isolamento dei nuclei preposti al controllo della funzionalità riproduttiva per meglio comprendere quali vie di segnale siano effettivamente coinvolte nella modulazione dell'asse HPG da parte del ferro.

La disponibilità di modelli *in vitro* di neuroni ipotalamici immortalizzati, ovviamente privi di barriera emato-encefalica (BEE), ci ha consentito di realizzare un fenotipo estremo di sovraccarico marziale ipotalamico e, in particolare, di indagare i reali meccanismi molecolari attivati dall'eccesso di ferro nei neuroni ipotalamici coinvolti nella funzionalità riproduttiva. La condizione di sovraccarico marziale è stata indotta dall'incubazione con il citrato di ammonio ferrico (FAC), una fonte di ferro ferrico ( $Fe^{3+}$ ). L'analisi mediante spettrometria di assorbimento atomico ha rivelato come il trattamento con FAC 200  $\mu M$ , per un periodo di 24 ore, abbia aumentato il contenuto marziale delle cellule GN-11 e GT1-7. Tale incremento, più sostenuto nelle GN-11 (circa 10 volte) rispetto alle GT1-7 (circa 5 volte), non ha indotto alterazioni nella vitalità e nella morfologia delle GN-11 anche dopo aumento del dosaggio a 500  $\mu M$ . L'analisi RT-PCR ha confermato come l'assenza di tossicità sia ascrivibile alla presenza, in entrambe le linee cellulari, dei meccanismi preposti alla captazione e all'immagazzinamento del ferro in forma sicura e non reattiva ovvero, rispettivamente, il TfR e la FtH. L'aumento dell'espressione genica della FtH e la contemporanea riduzione di quella del TfR, dopo trattamento con FAC 200 e 500  $\mu M$  per 24 ore, denotano la capacità delle cellule GN-11 e GT1-7 di attivare i meccanismi necessari per proteggere l'ambiente intracellulare dalla tossicità dell'eccesso marziale. Studi di chemomigrazione, condotti nelle cellule GN-11 mediante camera di Boyden, hanno evidenziato l'effetto inibitorio di FAC, dose - (200 - 1000  $\mu M$  per 1 - 24 ore) e tempo - dipendente (24 - 72 ore con FAC 200  $\mu M$ ), sulla migrazione FBS-indotta delle

cellule GN-11. L'effettivo coinvolgimento di FAC nella riduzione della migrazione stimolata da FBS è stato confermato dal ripristino della motilità basale delle GN-11 dopo co-trattamento per 24 ore con deferoxamina mesilato (DFO), uno specifico chelante del ferro. Esperimenti di cinetica seguiti da analisi Western Blotting dell'estratto proteico totale hanno evidenziato come il trattamento con FAC alla dose di 200  $\mu\text{M}$  per 5, 10, 20, 30, 60, 180 minuti e 24 ore moduli la fosforilazione (p) delle vie di segnale di ERK1/2, PI3K/Akt e AMPK nelle cellule GN-11. In particolare, pERK1/2 è aumentata nell'intervallo 5 - 30 minuti con un massimale a 20 minuti; Akt è attivata a 10, 20 e 60 minuti; pAMPK diminuisce nell'intervallo 20 - 180 minuti e l'effetto inibitorio si mantiene anche dopo 24 ore. Per valutare se le suddette vie di segnale fossero effettivamente coinvolte nella riduzione della migrazione delle cellule GN-11 indotta da FAC, è stata condotta un'altra serie di saggi di chemomigrazione in presenza degli inibitori selettivi di MEK1/2 (U0126 10  $\mu\text{M}$ ), di PIK3/Akt (LY-294,002 10  $\mu\text{M}$ ) e di AMPK (composto C 10  $\mu\text{M}$ ) in associazione o meno con FAC alla dose di 200  $\mu\text{M}$ . E' emerso come tutte le suddette vie agiscano di per sé come segnali promigratori per le cellule GN-11; solo la via di PI3K/Akt contribuirebbe, in associazione ad altre non ancora identificate, all'inibizione della chemomigrazione FBS-indotta da parte di FAC. L'accumulo di ferro nei neuroni immaturi, conseguente al trattamento con FAC alla dose di 200  $\mu\text{M}$  per 24 ore, oltre a non compromettere la vitalità cellulare, non ha promosso uno stato infiammatorio come indicato da: i) assenza di traslocazione nucleare e di attivazione della subunità p65 del fattore di trascrizione NF-kB, evidenziata tramite analisi Western Blotting delle frazioni proteiche citoplasmatiche e nucleari di un unico campione e analisi in immunofluorescenza (IFL); ii) invariata espressione genica dell'interleuchina-6 (IL-6) e del TNF $\alpha$  in RT-qPCR. Solo aumentando il dosaggio di FAC a 500  $\mu\text{M}$  si è ottenuto l'aumento dell'mRNA di IL-6.

Per quanto concerne l'effetto di FAC alle dosi di 200 e 500  $\mu\text{M}$  sui marker di stress ossidativo e di risposta allo stress del reticolo endoplasmatico, si è osservato: i) un aumento dose-dipendente dei livelli di mRNA di SOD2; ii) la mancata induzione della sintesi di CHOP; iii) l'assenza di variazione nello splicing di XBP-1.

In conclusione, il sovraccarico dietetico di ferro in topi C57BL/6J riproduce il fenotipo clinico e biochimico di pazienti affetti da DIOS in termini di modulazione dei parametri associati al ferro, alterazione del metabolismo gluco-lipidico e, parallelamente, compromissione della funzionalità riproduttiva. Sebbene i nostri risultati ci inducano ad ipotizzare una condizione di HH, è necessario condurre ulteriori indagini per identificare l'effettiva sede anatomica dell'asse HPG primariamente danneggiata

dall'eccesso marziale. L'ipotalamo appare protetto dal carico di ferro sistemico: le lievi modificazioni osservate sono probabilmente un epifenomeno delle perturbazioni marziali e metaboliche periferiche oppure derivano dall'effetto locale di mediatori indiretti dell'azione del ferro. Dagli studi *in vitro* è emerso come dosi sovra-fisiologiche di ferro si accumulino nelle cellule neuronali ipotalamiche e siano potenzialmente in grado di compromettere i sistemi di difesa. In particolare, l'esposizione dei neuroni GnRH immaturi in età pre-natale a dosi eccessive di ferro, che non compromettono la vitalità cellulare, potrebbe perturbare il loro fisiologico processo di migrazione dal placode olfattorio all'ipotalamo con induzione di HH terziario (ipotalamico). Se si considerano le cellule GN-11 come modello di migrazione neuronale a prescindere dal loro ruolo nella funzione riproduttiva, l'inibizione mediata dal ferro della migrazione potrebbe essere estesa anche al processo di neurogenesi che si verifica in specifiche aree cerebrali in età adulta.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1. ASSE IPOTALAMO–IPOFISI–GONADI (ASSE HPG): ANATOMIA

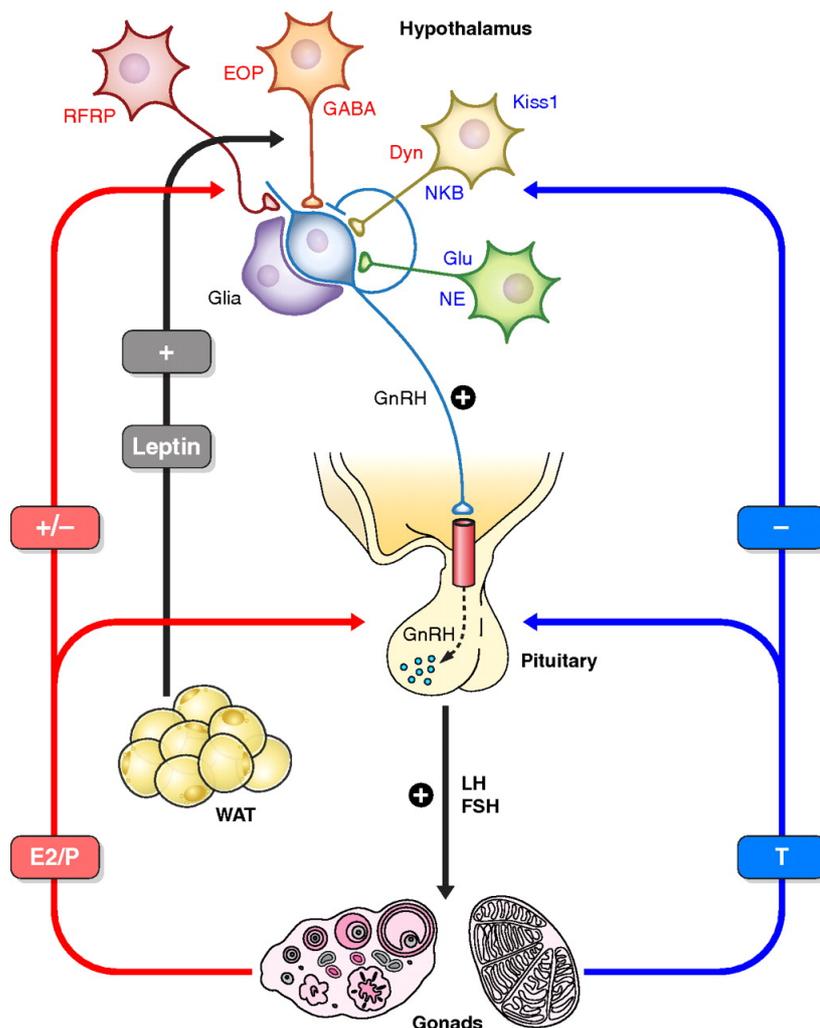
La riproduzione è indispensabile per la perpetuazione della specie e, per tale ragione, è soggetta alla fine regolazione di una complessa rete di segnali centrali e periferici, che sono sensibili a numerosi fattori endogeni e ambientali. In particolare, il controllo neuroendocrino della riproduzione si basa sulla dinamica interazione tra segnali che originano da tre principali fonti:

- 1) l'ipotalamo, dove un piccolo gruppo di neuroni sparsi (circa 1000 nei mammiferi più evoluti) sintetizza e secerne l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH);
- 2) l'adenoipofisi (ipofisi anteriore), in cui le cellule gonadotrope (meno del 10% di tutte le cellule ipofisarie), sono stimulate dal GnRH a sintetizzare e rilasciare l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH), definiti con il termine gonadotropine;
- 3) le gonadi, che oltre a generare i gameti a partire dalla pubertà, rispondono alle azione trofiche delle gonadotropine con un aumentata sintesi e immissione in circolo di steroidi sessuali e ormoni peptidici. A loro volta, gli ormoni gonadici modulano la secrezione di GnRH e di gonadotropine mediante un meccanismo a feed-back sull'ipotalamo e sull'ipofisi.

Tutti questi elementi costituiscono l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), definito anche asse gonadotropo (**Figura 2.1**).

Oltre alla suddetta regolazione dinamica in età adulta, gli elementi chiave dell'asse HPG subiscono sostanziali modificazioni anatomiche e funzionali durante lo sviluppo fetale nell'ambito del processo di differenziazione cerebrale sessuale e dopo la nascita per lo sviluppo puberale e, in relazione alla specie, la senescenza riproduttiva.

La maturazione e la funzionalità del sistema riproduttivo sono strettamente correlati con altre funzioni essenziali per l'organismo, quali la regolazione del peso corporeo e l'omeostasi energetica, come testimoniato dalle complesse interazioni tra molteplici segnali neuroendocrini che controllano sia il metabolismo energetico che la funzionalità riproduttiva. Evidenze di tale fenomeno si riscontrano in condizioni di stress metabolico e sbilancio energetico, in cui si osservano anche alterazioni dello sviluppo puberale e della fertilità oppure in patologie gonadiche o riproduttive correlate a perturbazioni metaboliche gravi come nella sindrome dell'ovaio policistico [2, 3, 4].



Pinilla L et al. *Physiol Rev* 2012;92:1235-1316

**Figura 2.1** Rappresentazione schematica dei principali elementi dell'asse neuroendocrino che controlla la riproduzione: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). I neuroni GnRH ipotalamici, che ricevono segnali transinaptici e gliali, rilasciano l'ormone GnRH nel sistema portale ipotalamo-ipofisario. Da qui il GnRH raggiunge le cellule gonadotrope dell'adenipofisi dove promuove la secrezione pulsatile delle gonadotropine LH e FSH che, a loro volta, stimolano la steroidogenesi e la spermatogenesi nelle gonadi. La funzionalità dell'asse HPG è regolata da diversi segnali periferici, quali gli steroidi sessuali, responsabili del controllo retroattivo: il testosterone prodotto dai testicoli (T) svolge un'azione inibitoria sulla secrezione di GnRH (nell'ipotalamo) e/o delle gonadotropine (nell'ipofisi) (meccanismo a feedback negativo); gli steroidi ovarici, soprattutto l'estradiolo (E2) e il progesterone (P), veicolano segnali sia inibitori che stimolatori in base alla fase del ciclo ovarico. Altri regolatori periferici dell'asse HPG sono gli ormoni metabolici quali la leptina, sintetizzata dal tessuto adiposo bianco, (WAT) che ricopre un ruolo stimolatorio/permessivo sulla riproduzione. Tale figura riporta anche i principali regolatori centrali dell'asse HPG. I fattori inibitori sono rappresentati in rosso e comprendono: acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), peptidi oppioidi endogeni (EOP), dinorfina (Dyn) e il peptide correlato a RF (RFRP). I segnali stimolatori, in blu, includono: Kiss1, glutammato (Glu), noradrenalina (NE) e neurochinina B (NKB).

### 2.1.1 IPOTALAMO

In un cervello adulto dal peso medio di 1300 g, l'ipotalamo, costituito da cellule della sostanza grigia, rappresenta solo 4 g di tessuto. Tale organo si localizza nella porzione ventrale del diencefalo e contribuisce a formare le pareti laterali del terzo ventricolo. Visto dalla sua base, l'ipotalamo si estende dal chiasma ottico ai corpi mammillari, con al centro l'eminenza mediana e il peduncolo ipofisario. Più precisamente, il confine superiore, che lo separa dal talamo, è segnato da un solco poco profondo, il solco ipotalamico. Posteriormente, l'ipotalamo si continua gradatamente nel grigio periventricolare e tegmentale del mesencefalo. Comunque, è consuetudine definire il margine posteriore dell'ipotalamo come il piano ventrale passante caudalmente ai corpi mammillari, due piccoli rilievi pari sulla superficie basale dell'encefalo. Il confine anteriore dell'ipotalamo corrisponde a un piano verticale diretto dal forame di Monro alla parte media del chiasma ottico. Il limite inferiore è delimitato da una sottile parete a forma d'imbuto, il tuber cinereum, che si estende verso il basso nel peduncolo ipofisario e nel processo infundibulare della neuroipofisi.

È una delle strutture filogeneticamente più antiche e primitive del sistema nervoso centrale.

L'ipotalamo ha un'organizzazione strutturale molto complessa poiché è composto da una gran varietà di neuroni, di diverse dimensioni, raccolti in nuclei ben definiti o sparsi in tutto il tessuto nervoso. I nuclei, ciascuno con un proprio pattern di connessioni e funzioni e strettamente interconnessi tra loro, hanno la funzione di produrre e rilasciare i vari fattori coinvolti nella modulazione della sintesi e della secrezione di ormoni dall'ipofisi anteriore. Dal punto di vista funzionale, in direzione rostro-caudale, l'ipotalamo può essere suddiviso in tre regioni principali:

- 1) anteriore, rostrale o sopraottica a livello del chiasma ottico
- 2) intermedia o tuberale in corrispondenza del tuber cinereum
- 3) posteriore, caudale o mammillare a livello dei corpi mammillari

L'ipotalamo **anteriore** comprende:

*l'area preottica (POA) mediale e laterale, l'area ipotalamica anteriore, i nuclei sopraottico, paraventricolare (PVN), soprachiasmatico e parvocellulare periventricolare.* Il PVN riceve numerosi input da altre aree o nuclei ipotalamici, quali il soprachiasmatico e l'arcuato, ed in esso coesistono due tipi cellulari. Il primo controlla il sistema nervoso autonomo e regola le vie efferenti simpatiche e parasimpatiche che innervano gli organi viscerali. Il secondo tipo cellulare è costituito dai neuroni neurosecretori, che modulano la secrezione ormonale ipofisaria. A sua volta, quest'ultima tipologia di cellule si suddivide in due categorie. La prima è quella

dei neuroni neurosecretori magnocellulari, presenti anche nel *nucleo supraottico*, i cui assoni si estendono attraverso il peduncolo ipofisario fino al lobo posteriore dell'ipofisi (neuroipofisi), dove rilasciano i neuroormoni ossitocina e vasopressina (ADH, ormone antidiuretico) direttamente nel circolo ematico. Tali assoni costituiscono il tratto supraottico-paraventricolo-ipofisario. La seconda categoria comprende i neuroni neurosecretori parvocellulari, i cui assoni terminano con bottoni sinaptici a livello dei capillari dell'eminenza mediana dove secernono gli ormoni ipofisiotropi. Tali ormoni scorrono nel sistema portale ipotalamo-ipofisario dei vasi lunghi, raggiungendo le rispettive cellule bersaglio nel lobo anteriore dell'ipofisi (adenoipofisi). Il PVN regola quindi le condizioni generali dell'organismo, quali il volume e la composizione dei fluidi corporei, la crescita corporea, la riproduzione e la risposta allo stress, stimolando il sistema nervoso autonomo e inducendo il rilascio di diversi ormoni dall'adenoipofisi. La POA si estende trasversalmente all'interno della regione anteriore e riveste un ruolo cruciale nel controllo dell'asse riproduttivo sia nell'uomo che nei roditori. In tale area sono infatti presenti i neuroni secernenti GnRH, i cui assoni rilasciano il decapeptide GnRH nei capillari dell'eminenza mediana, da dove tale ormone raggiunge le cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore mediante il sistema portale ipotalamo-ipofisario. Il nucleo soprachiasmatico, situato subito sopra al chiasma ottico, riceve l'innervazione diretta dalla retina. Tale nucleo svolge il ruolo di "orologio biologico" dell'organismo regolando alcune funzioni che variano, in relazione al ciclo sonno-veglia, in diversi momenti della giornata (temperatura corporea, secrezione ormonale, fame) o nell'arco di più giorni (ciclo mestruale) secondo un ritmo circadiano.

La **regione intermedia** dell'ipotalamo è comunemente suddivisa in due sezioni, mediale e laterale, da un piano passante per il fornice. La parte mediale comprende l'*area ipotalamica dorsale (DHA)*, il *nucleo infundibolare o arcuato (ARC)*, il *nucleo ventromediale (VMN)* e il *nucleo dorsomediale (DMN)*, mentre la porzione laterale è costituita dall'*area ipotalamica laterale (LHA)*. I neuroni di ARC, VMN e DMN sono le componenti più importanti di tale regione ipotalamica e i loro assoni si proiettano fino ai capillari dell'eminenza mediana. L'ARC, situato lateralmente alla porzione inferiore del terzo ventricolo, è di notevole importanza per il controllo dell'asse riproduttivo poiché in esso si sintetizzano diversi ormoni, neuropeptidi e amine, che intervengono nella regolazione dell'asse HPG. L'LHA e il VMN hanno ampie connessioni nervose con il tronco encefalico e il telencefalo e svolgono ruoli opposti ed integrativi per il controllo del peso corporeo. In particolare, LHA invia segnali nervosi

parasimpatici agli organi periferici agendo come centro della fame mentre il VMN è coinvolto nell'innervazione simpatica fungendo da centro della sazietà.

L'ipotalamo **posteriore** è formato dall'*area ipotalamica posteriore (PHA)* e dai *corpi mammillari*. I corpi mammillari costituiscono il nucleo più importante della regione caudale e le loro funzioni endocrine e autonome sono poco conosciute. Si ritiene che svolgano un ruolo nella memoria [5, 6, 7].

## **2.1.2 IPOFISI**

L'ipofisi, o ghiandola pituitaria, situata entro la scatola cranica alla base dell'encefalo, è una struttura neuroendocrina con un diametro massimo di circa 1,5 cm e dal peso di 0,4 – 1 g. Nella sua parte distale, è appoggiata sopra la sella turcica dello sfenoide mentre, nella porzione prossimale, è collegata alla base del diencefalo, ovvero all'ipotalamo, mediante il peduncolo ipofisario.

L'ipofisi è una ghiandola composita poiché è formata da due lobi differenti per origine embrionale, per struttura e per funzione [8,9]. La prima, di derivazione epiteliale, è definita *ipofisi anteriore o adenoipofisi*, la seconda invece, una formazione nervosa dipendente dall'ipotalamo, è denominata *ipofisi posteriore o neuroipofisi*. Le due porzioni sono strettamente legate in modo da costituire un unico organo.

### **2.1.2.1 Neuroipofisi**

Durante lo sviluppo embrionale, origina da un'invaginazione dell'ipotalamo ventrale e del terzo ventricolo dell'ectoderma neurale che si accresce verso il basso formando un diverticolo [6]. E' composta dall'eminanza mediana, che la collega all'ipotalamo, dal peduncolo ipofisario o tronco/processo infundibolare e della pars nervosa. L'unione di pars infundibolare e pars nervosa forma il lobo posteriore. Le tipologie cellulari che costituiscono la neuroipofisi sono fondamentalmente tre:

- una componente vascolare rappresentata da capillari sanguigni fenestrati;
- una componente nervosa costituita da un intreccio di fibre nervose amieliniche. Si tratta dei terminali distali degli assoni dei neuroni magnicellulari dell'ipotalamo (fascio sopraottico-paraventricolo-ipofisario) che discendono compatti e paralleli lungo il peduncolo e le cui terminazioni assoniche giungono a contatto con i capillari fenestrati nei quali riversano gli ormoni vasopressina e ossitocina. Tali peptidi, prodotti a livello dei pirenofori dei neuroni ipotalamici, scorrono lungo il fascio di fibre nervose, legati ad una proteina di trasporto, la neurofisina, sotto

forma di gocce o rigonfiamenti (corpi di Herring), intensamente colorabili con metodi specifici.

- una componente gliale modificata formata da cellule (pituociti) con lunghi prolungamenti citoplasmatici la cui funzione principale è quella di servire da sostegno per la componente nervosa e vascolare.

### **2.1.2.2 Adenoipofisi**

Deriva embriologicamente dalla tasca di Rathke, un'evaginazione ectodermica dell'orofaringe che migra fino a raggiungere l'adenoipofisi [6]. E' composta da tre sezioni: la *pars tuberalis*, collocata nella zona più prossima all'ipotalamo, avvolge parzialmente il peduncolo ipofisario della neuroipofisi, è molto vascolarizzata e non secerne ormoni; la *pars distalis*, appoggiata sopra la sella turcica dello sfenoide; la *pars intermedia* a contatto con il lobo posteriore e contenente cellule produttrici dell'ormone melanostimolante (MSH).

La *pars distalis* è costituita da nidi e cordoni di cellule parenchimali, circondati da capillari sinusoidi fenestrati, attraverso cui giungono una serie di ormoni ipotalamici che regolano la sintesi e la secrezione ormonale dai differenti tipi cellulari della *pars distalis*. Un delicato stroma reticolare sostiene il parenchima endocrino. Mediante esami istologici, istochimici e ultrastrutturali, si distinguono diversi tipi cellulari:

- le cellule cromofile o granulari, che presentano nel citoplasma granuli di secrezione, differenti per morfologia, dimensioni e distribuzione e contenenti ormoni glicoproteici. Sulla base dell'affinità tintoriale per le colorazioni più semplici, tali cellule secernenti sono a loro volta distinte in:
  - acidofile comprendenti le cellule somatotrope produttrici dell'ormone della crescita o somatotropo (GH) e le cellule lattotrope che sintetizzano la prolattina o ormone luteotropo (PRL);
  - basofile di cui fanno parte le cellule corticotrope produttrici dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH), le cellule tireotrope che sintetizzano l'ormone tireotropo o tireostimolante (TSH) e le cellule gonadotrope da cui originano le gonadotropine ovvero l'ormone follicolostimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH).
- le cellule cromofobe o agranulari, costituite da cellule prive di granuli di secrezione e quindi non colorabili con i comuni coloranti istologici. Si tratta di cellule che hanno già scaricato i propri ormoni nel sangue (cellule cromofile degranulate) al momento del prelievo dell'organo o giovani cellule di riserva non ancora differenziate e incapaci di sintetizzare ormoni.

- le cellule follicolo-stellate, non secretorie e con funzione sconosciuta.

### **2.1.2.3 Irrorazione sanguigna e sistema portale ipotalamo- ipofisario**

Il sistema portale ipotalamo – ipofisario (vasi venosi tra due letti capillari) è un distretto vascolare che permette all’ipotalamo di controllare la secrezione ormonale dall’ipofisi anteriore senza connessioni nervose ma mediante ormoni ipotalamici RH (ormoni di rilascio o liberine) e IH (ormoni inibitori o statine) che raggiungono direttamente l’adenoipofisi.

L’ipofisi riceve sangue arterioso da due arterie ipofisarie superiori e da due arterie ipofisarie inferiori. Le superiori si ramificano in un letto capillare nell’eminenza mediana dell’ipotalamo, dove i neuroni dei nuclei parvicellulari rilasciano i propri ormoni. La rete capillare dell’eminenza mediana si converte quindi nelle vene portali lunghe del sistema portale ipotalamo – ipofisario che drenano il peduncolo ipofisario e raggiungono l’adenoipofisi. In tale distretto, le vene portali lunghe si aprono in un’altra rete di capillari o sinusoidi (rete mirabile venosa), dove gli ormoni ipotalamici inducono (RH) o inibiscono (IH) il rilascio di ormoni dalle cellule endocrine dell’ipofisi anteriore. Questo secondo letto capillare si converte infine in strutture venose di drenaggio che raggiungono la circolazione sistemica e veicolano gli ormoni dell’adenoipofisi ai rispettivi tessuti bersaglio.

La neuroipofisi è irrorata direttamente da ramificazioni delle arterie ipofisarie inferiori che raggiungono poi il peduncolo ipofisario. Nel lobo posteriore, tali arteriole formano un sistema di capillari sui quali terminano gli assoni dei neuroni magnicellulari. Da qui il sangue raggiunge le vene di drenaggio e quindi la circolazione sistemica e le cellule bersaglio [5].

### **2.1.3 GONADI**

Le strutture anatomiche e i meccanismi di controllo del sistema riproduttivo assicurano la sopravvivenza della specie umana. L’apparato riproduttivo è composto nei due sessi da strutture di origine embriologica comune, i cui abbozzi (dotti del Wolff per il maschio e dotti del Müller per la donna) sono entrambi presenti nell’embrione nelle fasi precoci dello sviluppo ed evolvono negli organi specifici di uno dei due sessi in risposta a segnali differenziativi dipendenti dal sesso cromosomico. Gli organi

riproduttivi sono composti dalle gonadi (testicolo e ovaio), dalle strutture genitali interne e dalle strutture genitali esterne.

Le gonadi sono le unità funzionali del sistema riproduttivo. Sono ghiandole sessuali preposte ad una duplice funzione: 1) la gametogenesi, ovvero la generazione e il rilascio dei gameti maturi (spermatozoo e ovulo) a partire da cellule germinali; 2) la steroidogenesi, ovvero la sintesi e la secrezione di ormoni che regolano anche la produzione di tali gameti [10].

In questa tesi sarà presa in considerazione solo la gonade maschile poichè gli studi *in vivo* da noi condotti hanno previsto solo topi maschi.

### **2.1.3.1 Testicolo**

Il testicolo (o didimo) è la gonade maschile ed è organizzato schematicamente in due differenti compartimenti cellulari [11]:

- il compartimento interstiziale comprendente le cellule steroidogenetiche o del Leyding o interstiziali, i macrofagi, i linfociti, i fibroblasti dello stroma e le cellule endoteliali [11]. Mediante l'utilizzo di vie biosintetiche comuni tra loro e con le cellule della corticale del surrene, le cellule del Leyding sono responsabili della sintesi di un gruppo di steroidi denominati globalmente androgeni (testosterone, diidrotestosterone e androstenedione). La biosintesi degli steroidi testicolari è stimolata soprattutto dall'LH adenoipofisario che si lega al proprio recettore situato sulla membrana delle cellule del Leyding, attivando il signaling adenilato ciclasi/cAMP/PKC (protein kinase C). La fosforilazione della PKC attiva numerosi bersagli della cascata enzimatica della steroidogenesi con conseguente incremento della sintesi degli androgeni.
- il compartimento tubulare in cui coesistono le cellule nutrici o del Sertoli, le cellule germinali o i gameti (spermatozoi) che insieme costituiscono l'epitelio seminifero e le cellule peritubulari [11]. Le cellule del Sertoli costituiscono la parete dei tubuli seminiferi, entro cui avviene la maturazione e il trasporto dei gameti e fungono quindi da sostegno alle cellule germinali [12]. L'epitelio seminifero presenta una distribuzione cellulare molto organizzata che subisce modificazioni cicliche nelle varie fasi del ciclo spermatogenico [13]. Due tipologie di segnali sono principalmente coinvolte nell'attivazione e nel mantenimento della spermatogenesi: segnali endocrini (fondamentalmente l'FSH adenoipofisario) e paracrini (soprattutto il testosterone sintetizzato nelle cellule del Leyding sotto stimolazione dell'LH). Tali segnali agiscono prevalentemente sulle cellule del

Sertoli che, con un meccanismo paracrino, sovrintendono alla corretta maturazione dei gameti [14]. Le cellule del Sertoli inoltre producono l'inibina, un ormone proteico il cui ruolo sembra essere l'inibizione specifica dell'FSH. Le cellule peritubulari, localizzate lungo il perimetro dei tubuli seminiferi, sono in contatto con la membrana basale delle cellule del Sertoli [11] dove, oltre a fornire sostegno strutturale, partecipano al controllo paracrino degli altri elementi cellulari del testicolo [15].

Gli androgeni gonadici controllano quindi la secrezione ipotalamica del GnRH (feedback negativo lungo), il rilascio ipofisario delle gonadotropine (feedback negativo corto), la funzionalità delle cellule del Sertoli (e indirettamente la maturazione dei gameti), lo sviluppo, il trofismo e la funzionalità di tutto il sistema riproduttivo. Questi ormoni, inoltre, sono responsabili della comparsa in epoca puberale e del mantenimento nell'adulto delle caratteristiche sessuali secondarie che determinano il fenotipo maschile.

Tra le distinte popolazioni cellulari testicolari opera un complesso sistema d'interazioni paracrine costituito da un numero molto elevato di segnali, che comprendono citochine, fattori di crescita, neuropeptidi e ormoni. Pertanto, le funzioni testicolari dipendono non solo dalla regolazione endocrina da parte di segnali di diversa origine (ipofisaria e altro) ma anche dalle interazioni dinamiche tra le diverse popolazioni cellulari testicolari mediante segnali prodotti localmente.

## **3. NEURONI GnRH-SECERNENTI**

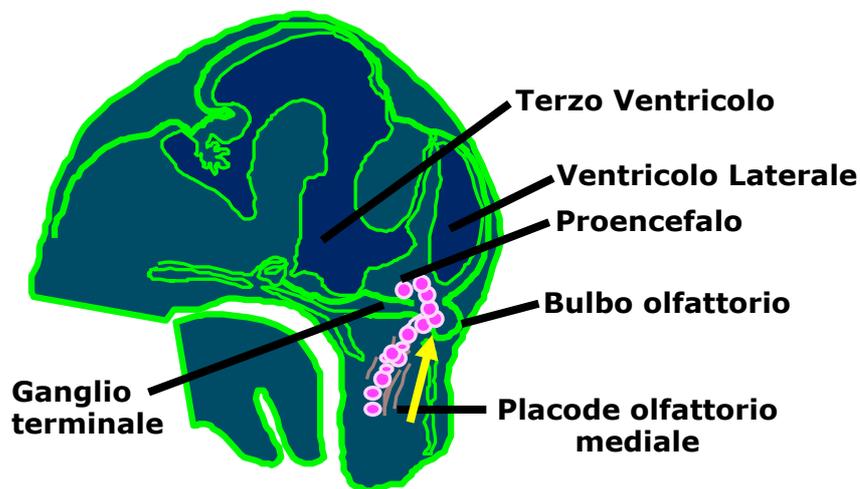
### **3.1 ORIGINE, SVILUPPO E MIGRAZIONE**

Cellule immunoreattive per il GnRH sono state identificate nei placodi olfattivi di embrioni di diverse specie, suggerendo che tali strutture embrionali primitive, da cui deriva l'epitelio olfattivo, siano il sito d'origine dei neuroni GnRH [16]. Ne consegue che tali neuroni debbano migrare prima di assumere la loro definitiva localizzazione nell'ipotalamo. Durante lo sviluppo embrionale, dall'invaginazione dei placodi olfattivi si formano due cavità separate dal setto nasale, dalle quali origina l'organo vomero-nasale. I neuroni GnRH derivano dall'epitelio della parte mediale del placode olfattivo, sito d'origine anche dei nervi olfattorio, vomero-nasale e terminale, oltre che di una popolazione di cellule gliali. I nervi olfattori originano dalla porzione laterale dell'epitelio del placode e terminano nel bulbo olfattorio principale. Il nervo vomero-nasale segue il percorso degli olfattori ma raggiunge il bulbo olfattorio accessorio. Il nervo terminale, un nervo cranico, corre, assieme al vomero-nasale e mediale agli olfattori, attraverso il setto nasale e la lamina cribrosa dell'etmoide, da dove penetra, insieme a branche dell'arteria cerebrale anteriore, nel proencefalo medio-basale, fino ai nuclei del setto e della zona preottica.

Durante lo sviluppo embrionale di numerosi vertebrati quali il topo, il ratto [17, 18], la rana, la tartaruga, il delfino, la balena, il maiale, il pollo [19, 20], la scimmia [21] e l'uomo [22] è stata osservata la migrazione dei neuroni GnRH dalla parte mediale del placode olfattorio al proencefalo, in direzione rostro-caudale lungo gli assoni dei nervi vomero-nasale e terminale [23, 24]. Tali nervi fungono da guida per la migrazione dei neuroni GnRH verso l'encefalo e in mancanza di un "ponte", formato da tali nervi, tra la cavità nasale ed il proencefalo [23] non si osservano neuroni GnRH-immunoreattivi nell'ipotalamo. Una volta attraversata la regione del piatto cribriforme, una regione di confine tra naso ed encefalo, i neuroni GnRH seguono un sottotipo di assoni olfattivi che divergono verso il proencefalo basale ed infine dirigono i propri assoni verso l'organo vascoloso della lamina terminale e quindi nell'eminenza mediana.

Appare evidente come i fattori in grado di modulare l'organizzazione dei nervi olfattorio, vomero-nasale e terminale possano influenzare anche la migrazione dei neuroni GnRH [25, 26], che, a loro volta, devono interpretare diversi segnali ambientali per potersi muovere, inizialmente, nel compartimento nasale e, infine, per dirigersi centralmente nel proencefalo.

Nel topo, al giorno 11 di vita embrionale (E11), si osservano cellule GnRH-immunoreattive, con una morfologia ovale o fusiforme, nell'epitelio della parte mediale del placode olfattorio, in corrispondenza del nascente organo vomero-nasale. Al giorno E11.5, si assiste alla migrazione dei primi neuroni GnRH-immunoreattivi dall'epitelio olfattorio, contemporaneamente all'allungamento dei nervi terminale e vomero-nasale. Ai giorni E12 ed E13, i neuroni GnRH-secernenti a morfologia polarizzata sono disposti uno dietro l'altro a formare una sorta di catena diretta verso il setto nasale, che, al giorno E14 entra nel proencefalo medio-basale caudalmente ai bulbi olfattori in via di sviluppo. Il percorso di migrazione dal naso al proencefalo da E11 a E14 è di circa 1320  $\mu\text{m}$ . L'aumento della presenza di neuroni GnRH-immunoreattivi nel setto e successivamente nell'area preottica e nell'ipotalamo tra E14 e E20 indica la fine del processo di migrazione (**Figura 3.1**) [23].



● **Neuroni GnRH-secernenti**

Schwanzel-Fukuda, M and Pfaff, D.W. *Experientia*, 1990;46(9):956-52

**Figura 3.1** Rappresentazione schematica del percorso di migrazione dei neuroni GnRH in un feto murino di 14 giorni.

### 3.2 REGOLAZIONE DELLA MIGRAZIONE

Lo sviluppo dell'intero SNC e, in particolare, della componente riproduttiva ipotalamica, necessita del processo di migrazione cellulare. Da un punto di vista funzionale, la migrazione consente l'identificazione di specifici neuroni, la definizione delle loro proprietà funzionali e l'individuazione delle connessioni che stabiliranno nelle successive fasi di sviluppo.

In generale, per migrazione s'intende il movimento delle cellule dalle zone di origine e proliferazione ai siti definitivi di differenziamento e specializzazione funzionale. Tale

processo si articola lungo percorsi specifici, in precisi periodi di tempo e con una sequenza temporale definita e termina solo quando ogni singolo neurone ha assunto il proprio corretto posizionamento in un determinato sito anatomico dove instaurerà connessioni sinaptiche fondamentali per le proprie funzioni fisiologiche [27]. Esistono due tipologie di migrazione, che si differenziano per direzionalità e modalità di orientamento del movimento cellulare. La prima, definita migrazione radiale, è il movimento che procede dalla superficie ventricolare verso quella piaie (in-out) ed è resa possibile, generalmente, dall'interazione glia-neuroni (migrazione gliofilica). La seconda, conosciuta come migrazione tangenziale, avviene parallelamente alla superficie dell'encefalo ed è, in genere, una migrazione neurofilica, cioè prevede l'adesione specifica dei neuroni su fasci di assoni [28]. Tale meccanismo consente la formazione degli strati della corteccia cerebrale, cerebellare e dell'ippocampo [29]. Anche i neuroni GnRH raggiungono la loro localizzazione definitiva nell'ipotalamo tramite migrazione tangenziale neurofilica e, data la loro origine esterna al SNC, costituiscono un ottimo modello per lo studio dello sviluppo neuronale, dei meccanismi e delle molecole coinvolte in questo tipo di migrazione.

Il processo migratorio dei neuroni GnRH è scandito dal susseguirsi, in tempi ben definiti, di 3 fasi fondamentali:

- 1) spostamento attraverso il compartimento nasale;
- 2) attraversamento della regione del piatto cribriorme (una zona di confine tra naso e encefalo);
- 3) migrazione verso il proencefalo basale con invio degli assoni nell'eminenza mediana.

Il ruolo guida delle fibre olfattorie periferiche in tale processo è emerso dall'evidenza che variazioni nella disposizione di tali fibre si ripercuotono anche su quella dei neuroni GnRH [25, 26, 30]. Sebbene i meccanismi e i segnali molecolari in grado di modulare la migrazione e di facilitare il passaggio dei neuroni GnRH dalla regione nasale all'encefalo siano ancora poco conosciuti, negli ultimi anni è stato riconosciuto il coinvolgimento di numerosi fattori (**Tabella 3.1**) [31].

<b>MOLECOLE SECRETE</b>	GABA
	NOREPINEPHRINE AND SEROTONIN
	CHOLECYSTOKININ
	FGF
	NETRIN-1
	Gas-6
	HEPATOCTE GROWTH FACTOR
	BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR-1
	STROMAL-DERIVED FACTOR-1
	VEGF
<b>PROTEINE DI SUPERFICIE</b>	GABA A RECEPTOR
	GLUTAMATE RECEPTOR
	cMET (receptor for hepatocyte growth factor)
	EPHRIN A-5 TYROSINE KINASE
	FGFR
	NOREPINEPHRINE AND SEROTONIN RECEPTORS
	CHOLECYSTOKININ RECEPTOR
	Ark (adesion related kinase)
	DCC (receptor for netrin-1)
	NELF (nasal embryonic LHRH)
	ANOSMIN
<b>FATTORI NUCLEARI</b>	Oct1, Dlx, Msx, NSCL2, Ebf2, GATA4, SCIP, Brn2, Pax6, AP2

**Tabella 3.1** Geni e proteine che regolano lo sviluppo e la migrazione dei neuroni GnRH.

E' stato ipotizzato che ciascuna fase del processo migratorio sia controllata da specifici fattori la cui espressione avviene solo in precise finestre temporali e con una specifica distribuzione regionale. Le molecole di adesione sfruttate dai neuroni GnRH per muoversi lungo gli assoni dei nervi vomero-nasale e terminale potrebbero essere espresse solo nella fase attiva di migrazione ed essere poi spente quando i neuroni si distaccano dagli assoni per acquisire la loro posizione finale nell'ipotalamo. E' noto come i neuroni GnRH siano provvisti di per sé delle proteine citoscheletriche e delle funzioni motorie necessarie per migrare, ma non è ancora chiaro quali molecole

stimolino tale apparato migratorio nelle diverse tratte del cammino verso l'ipotalamo. Inoltre, tali neuroni dovrebbero essere in grado di modulare l'espressione recettoriale per specifiche chemochine e sostanze chemoattrattive, distribuite secondo un gradiente di concentrazione, in funzione del tipo presente lungo il cammino in un dato momento.

Un altro aspetto da chiarire è l'identificazione di quali molecole regolino la determinazione dei fenotipi dei neuroni GnRH. Alcuni lavori supportano l'esistenza di diversi fattori di trascrizione, la cui espressione spazio-temporale potrebbe contribuire, almeno in parte, all'avvio di programmi genetici. Di questi fattori, alcuni appaiono presenti prima che l'espressione di GnRH possa essere rilevata in modo significativo (OTX-1 e -2 [32, 33], Pax-6 [34], Eya-1 e -2 [35], six-3 [36]), altri invece sono espressi proprio dai neuroni GnRH (Olf-1 [37], GATA-4 [38], AP-2a [39], Ebf-2 [40]).

Anche l'esatto percorso seguito dai neuroni GnRH è ancora oggetto di studio. Il tentativo di utilizzare una serie di molecole espresse lungo i nervi olfattori come markers per tracciare la via migratoria dei neuroni GnRH non ha portato ad alcuna conclusione. Purtroppo, nessuna delle molecole analizzate è risultata esclusiva del percorso specifico dei neuroni GnRH. La possibilità di marcare gli assoni olfattori, che proiettano verso i bulbi olfattori principali e accessori [41], con un anticorpo anti-periferina, una proteina associata ai filamenti intermedi [42], e l'osservazione che i neuroni GnRH sono in grado di migrare su fibre periferina-positive sembra indicare che:

- i neuroni GnRH possiedano una motilità intrinseca o controllata da molecole chemotattiche, a corto raggio di diffusione, prodotte localmente lungo la via di migrazione e non in altre aree del SNC;
- le molecole di adesione giocano un ruolo chiave nei meccanismi molecolari che controllano la migrazione dei neuroni GnRH nelle regioni nasali.

I meccanismi che controllano lo sviluppo e la migrazione dei neuroni GnRH lungo la via di fibre periferina-positive che si estende bilateralmente in direzione caudale verso l'eminenza mediana non sono ancora noti ma è certo il contributo di molecole chemoattrattive derivanti dalle aree coinvolte in tale processo. L'associazione dei neuroni GnRH con queste fibre assonali ha suggerito il coinvolgimento di molecole di adesione cellulare, in particolare N-CAM ("Neural-cell adhesion molecule"), una proteina la cui espressione cambia durante lo sviluppo e il movimento cellulare, e che è espressa dai nervi terminale e vomero-nasale [43]. Studi condotti durante lo

sviluppo embrionale hanno infatti evidenziato come i neuroni GnRH migrino associati ad assoni N-CAM positivi [20, 44].

Nella regione nasale sono state identificate varie molecole che potrebbero influenzare, positivamente o negativamente, la migrazione dei neuroni GnRH. Le semaforine e le proteine slits, espresse con i loro recettori nel sistema olfattivo [45, 46] potrebbero stabilire e mantenere connessioni tra le varie parti dello stesso sistema. Le netrine, proteine di secrezione con effetti sia attrattori che repellenti, interagiscono con il prodotto del gene DCC ("Deleted in Colorectal Cancer" [30]) espresso anche a livello degli assoni periferina-positivi e con un ruolo apparentemente importante nel processo di migrazione. Animali knockout per DCC presentano infatti i neuroni GnRH posizionati in maniera non corretta, fuori dal proencefalo e in associazione con le fibre periferina-positivo [30].

Come già ricordato, lo sviluppo del sistema neuroendocrino del GnRH è intimamente correlato e dipendente dalla formazione del sistema olfattivo. Gli assoni dei nervi olfattori sono condotti dall'epitelio sensoriale verso il bulbo olfattivo sotto la guida di vari fattori tra i quali rientrano probabilmente le proteine TAG-1, galectina-1, proteoglicano 6B4, i glicconiugati CC e i recettori olfattori [47-51]. Rimane tuttavia ancora da stabilire se qualcuna di queste molecole intervenga in modo rilevante anche nella migrazione dei neuroni GnRH.

L'espressione genica dei neuroni GnRH subisce delle variazioni in momenti distinti del processo di migrazione attraverso il sistema olfattorio. Le fasi iniziali del processo migratorio sembrano influenzate dal fattore NELF ("Nasal Embryonic GnRH Factor") [26], mentre il recettore ad attività tirosino-chinasica Ark appare coinvolto nelle modifiche del citoscheletro fondamentali per il processo di migrazione [52, 53]. I neuroni GnRH esprimono il gene Ebf2 ("Early B-Cell Factor 2") appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione HLH ("Helix-Loop-Helix") che sono coinvolti in diversi aspetti dello sviluppo neuronale. Topi knockout per Ebf2 hanno evidenziato come tale fattore non sia necessario per le fasi iniziali del processo migratorio neuronale ma sia fondamentale per le tappe terminali. In questi animali, infatti, i neuroni GnRH raggiungono facilmente la regione del piatto cribriforme, ma poi, invece di deflettere caudalmente nel proencefalo ventrale migrano dorsalmente attraverso il telencefalo e mostrano segni di degenerazione [40]. Dato che il gene Ebf2 è espresso dai neuroni GnRH, si è ipotizzato che il difetto di migrazione interessi in modo specifico i neuroni GnRH e non la via di migrazione. L'effetto anti-migratorio ottenuto con il muscimolo, un agonista recettoriale del GABA, ha suggerito come la popolazione di neuroni GABA localizzata nel placode embrionale potrebbe rallentare la migrazione

dei neuroni GnRH dalla regione nasale al SNC [54]. Il GABA potrebbe quindi agire come segnale di arresto per i neuroni GnRH, con lo scopo di ritardarne l'ingresso nel SNC [55]. Sebbene la motivazione di tale rallentamento non sia nota, si potrebbe ipotizzare che questa pausa consenta la maturazione dei neuroni GnRH, garantisca lo stabilirsi di un pathway migratorio adeguato alle regioni centrali e permetta adattamenti al nuovo ambiente extracellulare.

Il fattore anosmina-1, così chiamato per il suo ruolo aggiuntivo nello sviluppo del sistema olfattorio, riveste una funzione importante per la corretta migrazione dei neuroni GnRH nel SNC come emerge dall'identificazione nella sindrome di Kallmann, associata al cromosoma X, di mutazioni a livello del gene KAL1, codificante per anosmina-1. Tali mutazioni portano ad alterazioni della via di migrazione con conseguenze sul movimento dei neuroni GnRH [56].

Negli ultimi anni, tra i fattori di controllo della migrazione neuronale ha assunto un certo rilievo la proteina reelina, studiata per le sue funzioni nel controllo della migrazione radiale dei neuroni a livello della corteccia cerebrale [57]. Reelina è espressa lungo la via di migrazione dei neuroni GnRH [58, 59] e agisce come segnale per guidare la migrazione dei neuroni GnRH a livello del SNC; topi reeler, mutanti per reelina, presentano infatti una riduzione del numero di questi neuroni che potrebbe spiegare la ridotta fertilità di questi animali [60, 61].

### **3.3 IL PEPTIDE GnRH**

L'ipotalamo regola l'attività riproduttiva dei mammiferi mediante la secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine o GnRH (chiamato anche ormone di rilascio dell'ormone luteinizzante, LHRH). Tale ormone peptidico è rilasciato dai terminali dei neuroni GnRH a livello dell'eminenza mediana nel circolo portale ipotalamo-ipofisario, attraverso cui raggiunge le cellule gonadotrope dell'adenoipofisi per stimolare la produzione e il rilascio delle gonadotropine LH e FSH [62]. I neuroni GnRH, data la loro localizzazione centrale, sono considerati l'elemento gerarchicamente più importante dell'asse HPG poiché veicolano segnali centrali e periferici, soprattutto per via indiretta, nel sistema gonadotropo. L'ormone GnRH agisce quindi come l'effettore finale per la regolazione ipotalamica degli elementi a valle dell'asse riproduttivo [2].

### **3.3.1      *Forme molecolari di GnRH***

Sebbene l'esistenza di tale molecola fosse già nota dal 1950 [63], solo negli anni settanta Guillemin e Schally ne identificarono simultaneamente la sequenza aminoacidica (decapeptide: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) in seguito al suo isolamento dall'ipotalamo ovino e suino [64, 65]. Per molti anni si ritenne che questa fosse l'unica forma molecolare esistente di GnRH nei vertebrati. Successivamente, la ricerca di tale neuropeptide in altre specie ha portato all'identificazione di 14 diverse forme di GnRH, anche se, in ogni specie, ne sono state individuate fino a un massimo di tre (GnRH-1, GnRH-2 e GnRH-3), ciascuna codificata da un gene diverso [66, 67]. La forma GnRH-1, identificata solo nei vertebrati superiori, è responsabile dello sviluppo e del controllo neuroendocrino della funzione riproduttiva in quanto stimola il rilascio delle gonadotropine dalle cellule gonadotrope dell'adenipofisi [68]. L'isoforma GnRH-2, implicata probabilmente nella regolazione del comportamento sessuale, dell'assunzione di cibo e del bilancio energetico [69-72] è presente in tutti i vertebrati anche se, solo di recente, è stata individuata nei mammiferi [66, 73]. La variante GnRH-3, identificata esclusivamente nei pesci teleostei [74], svolge un possibile ruolo come ormone ipofisiotropo oltre ad essere coinvolta nel controllo del comportamento sessuale [75, 76]. Le tre forme di GnRH differiscono tra loro per sequenza, sito d'origine e localizzazione finale. I neuroni GnRH-1 originano a livello del placode olfattivo e migrano fino all'ipotalamo medio-basale (nuclei arcuato e ventromediale) e all'area preottica anteriore [77]. Anche i neuroni GnRH-3 sono sintetizzati nel placode olfattivo ma raggiungono le aree anteriori del cervello e il sistema olfattorio [66]. I neuroni GnRH-2 originano, invece, nel cervello e si differenziano nel mesencefalo. Sono inoltre stati scoperti neuroni GnRH-1 con funzione "non endocrina", il cui ruolo specifico resta tuttavia ancora da comprendere. Nel topo, si tratta di gruppi neuronali che originano direttamente nel cervello ed esprimono il GnRH in modo transiente durante lo sviluppo [78]; nella scimmia, invece, tali neuroni sintetizzano un peptide GnRH-1 tronco in aree extraipotalamiche [79].

Nell'ambito di questo studio saranno presi in considerazione solo i neuroni GnRH-1, fondamentali per il controllo della funzione riproduttiva e che, per semplicità, saranno indicati come neuroni GnRH. Nel cervello dei mammiferi, tale popolazione cellulare, che non raggiunge le 1000 unità, non è raggruppata in nuclei ipotalamici ben definiti ma è distribuita in gruppi dispersi con una maggiore concentrazione in specifiche aree. Nel ratto, nella pecora, nella capra e nelle scimmie, la maggior parte dei corpi

cellulari di tali neuroni si localizza nelle aree rostrali del cervello, in particolare nel setto mediale, nella banda diagonale di Broca e nell'area preottica ipotalamica (POA) [80]. Nei primati e nei roditori, si è identificata una regione di nuclei immunoreattivi per il GnRH anche nella porzione caudale dell'area retrochiasmatica, nell'ipotalamo medio-basale e nell'arcuato (ARC) [81, 80]. Nonostante i neuroni GnRH abbiano un'ampia distribuzione neuroanatomica, la quasi totalità dei loro assoni termina a livello del letto capillare dell'eminenza mediana in cui il neuropeptide maturo viene liberato con una pulsatilità altamente sincronizzata per poi raggiungere l'ipofisi anteriore tramite la circolazione portale [82-84]. I neuroni che non prendono contatti svolgono probabilmente la funzione di neurotrasmissione e/o neuromodulazione [85].

### **3.3.2 Sintesi, secrezione e attività del GnRH**

L'espressione genica del GnRH ipotalamico avviene in modo intermittente e dipende da una regione promotore di 300-bp chiamata NSE (neuron specific enhancer) [86]. Il GnRH viene sintetizzato come precursore polipeptidico denominato prepro-GnRH (proormone) [87, 88] ed è composto da un peptide segnale di 23 aa, dal decapeptide GnRH seguito da un sito di processamento proteolitico (Gly-Lys-Arg) e dal peptide associato al GnRH (GAP) di 56 aa. Nei mammiferi, il proormone è codificato da un gene costituito da 3 introni e da 4 esoni, di cui il primo contiene la sequenza della regione 5' non tradotta, il secondo quella del peptide segnale, del GnRH e dei primi 11 aminoacidi del GAP, il terzo quella degli aminoacidi 12-45 del GAP ed il quarto quella degli aminoacidi 46-56 del GAP e della regione 3' non tradotta [89].

La conformazione biologicamente attiva del GnRH contiene un ripiegamento nella regione centrale della molecola, a livello della glicina in posizione 6 (Gly<sup>6</sup>) [447]. Tale ormone esplica le proprie azioni biologiche mediante l'interazione con un recettore di superficie accoppiato alle proteine G (GPCR) denominato GnRH-R. Quest'ultimo possiede sette eliche transmembrana connesse tra loro per mezzo di tre domini extracellulari e tre legami intracellulari [448]. I domini extracellulari e le regioni superficiali delle porzioni transmembrana sono responsabili dell'unione con il GnRH che avviene a livello dei residui amino-terminali dell'ormone, mentre le eliche transmembrana sembrano implicate nella configurazione e nel cambio conformazionale del recettore come conseguenza della sua attivazione. La specificità e l'unione ad alta affinità ( $K_d=0.5$  nM) con il GnRH-R sono garantite dalle sequenze carbossi-terminali dell'ormone GnRH [447].

Sebbene la principale funzione del GnRH sia incentrata sulla stimolazione del rilascio delle gonadotropine dall'adenipofisi, tale ormone agisce anche in numerosi siti extraipotalamici e extraipofisari, quali altre regioni cerebrali [90-92], le gonadi [93, 94], la placenta [95], la vescica [96-100], la prostata [95], le ghiandole mammarie, la milza [101], le isole pancreatiche [102], il timo e il cuore [103], ma il suo ruolo fisiologico e farmacologico in tali regioni extraipofisarie è tuttora poco conosciuto. Le azioni del GnRH a livello ipofisario sono classificabili in tre tipologie in base all'intervallo temporale con cui avvengono:

- rilascio immediato di LH e FSH nell'arco di pochi minuti (azione acuta)
- induzione della sintesi di LH e FSH nell'arco di alcune ore (azione a medio termine)
- cambiamenti morfologici a lungo termine della durata di diversi giorni (azione a lungo termine) [104].

Numerosi segnali centrali e periferici modulano l'attività neuronale del GnRH. Alcuni, quali noradrenalina, kisspeptina e neuropeptide Y (NPY) sono di tipo stimolatorio, altri, tra cui beta-endorfina, progesterone, androgeni e interleuchina-1 (IL-1) hanno un'azione inibitoria ed altri ancora, ad esempio l'estradiolo, possono svolgere un ruolo sia stimolatorio che inibitorio sul rilascio di GnRH. In particolare, gli ormoni gonadici steroidei regolano l'espressione del GnRH e delle gonadotropine agendo a livello ipotalamico e ipofisario con un classico circuito a feedback negativo [105].

Nella specie femminile, il GnRH viene rilasciato dall'ipotalamo con due diverse modalità: "pulse" and "surge" [106], che sono regolate in modo indipendente e da diversi set di neuroni [105]. La secrezione "pulse" (pulsatile o tonica) del GnRH è responsabile del rilascio pulsatile delle gonadotropine che si osserva durante la maggior parte del ciclo ovarico per la regolazione della follicologenesi e, in molte specie, del corpo luteo. Tale modalità di rilascio è controllata, mediante meccanismi a feedback negativo, dall'estradiolo ( $E_2$ ) e dal progesterone ovarici che inibiscono, rispettivamente, l'ampiezza e la frequenza di pulsatilità [107]. La modalità "surge" genera il picco preovulatorio di LH che innesca l'ovulazione ed è regolata, mediante meccanismi a feedback positivo, dall'aumento in circolo della concentrazione di  $E_2$  [108].

## 3.4 REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE DEL GnRH

### 3.4.1 *Secrezione pulsatile del GnRH: "GnRH pulse generator"*

Il controllo neuroendocrino della funzionalità riproduttiva avviene mediante il rilascio episodico dell'ormone GnRH dall'ipotalamo, che si riflette nell'attivazione tonica del GnRH-R nelle cellule gonadotrope dell'adenipofisi ed infine nella sintesi e nel rilascio pulsatile delle gonadotropine LH e FSH [109-114]. Tale natura pulsatile è un aspetto caratteristico del sistema HPG [112, 113] ed è essenziale per regolare la gametogenesi, la sintesi degli ormoni gonadici e quindi per una corretta funzionalità riproduttiva. Infatti, l'esposizione continua delle cellule gonadotrope al GnRH inibisce sia la trascrizione che la secrezione di LH e FSH [115].

I siti e i meccanismi molecolari d'azione degli estrogeni non sono stati ancora pienamente compresi, anche se è certo il coinvolgimento diretto dell'ipotalamo e dell'ipofisi [62]. Secondo Moenter e collaboratori, il feedback negativo degli estrogeni sulla secrezione di GnRH/LH sfrutterebbe multipli meccanismi, quali l'azione diretta sui neuroni GnRH a livello del recettore di membrana GPR30 e del recettore estrogenico  $\beta$  (tali neuroni non esprimono  $ER\alpha$ , sottotipo essenziale per il feedback dell' $E_2$  [116]) e l'azione indiretta su neuroni afferenti ai neuroni GnRH mediante il recettore estrogenico  $\alpha$  [117].

La secrezione pulsatile del GnRH è il risultato dell'attivazione sincronizzata dei neuroni GnRH che sono raramente interconnessi tra loro a livello dei corpi cellulari e dei processi neuronali poiché sono distribuiti in modo sparso nell'ipotalamo [62]. Il rilascio sincronizzato degli impulsi di GnRH è il risultato dell'integrazione effettuata dal così detto generatore di pulsabilità del GnRH ("GnRH pulse generator"). Si tratta di una rete ipotalamica, originariamente proposta da Knobil [118], che comprende i neuroni GnRH così come altri sistemi afferenti che consentono la secrezione pulsatile del decapeptide ipotalamico [2]. La localizzazione e l'anatomia di tale network rimangono ampiamente sconosciute sebbene siano state postulate due ipotesi. La prima suggerisce l'esistenza di neuroni ipotalamici non GnRH secernenti, e probabilmente collocati nell'MBH, che attiverrebbero elettricamente il rilascio di tale neuropeptide. Tale ipotesi è stata avvalorata da esperimenti di deafferentazione dell'MBH dal resto del cervello, da espianti di MBH e dal trapianto di MBH fetale nell'ipotalamo di ratti anziani o lesionati a livello dell'ARC. In tutti questi casi, l'MBH ha consentito la permanenza o il ripristino del rilascio pulsatile di GnRH/LH. La seconda ipotesi sostiene invece che i neuroni GnRH potrebbero contenere al loro interno meccanismi

autonomi di eccitazione ad intervalli regolari e quindi un'attività intrinseca, come dimostrato da esperimenti *in vitro* con la linea cellulare immortalizzata GT1 o da studi di elettrofisiologia in singoli neuroni GnRH di topi transgenici GnRH-GFP [62]. I neuroni GnRH formerebbero quindi una diffusa rete neurale che funzionerebbe come un generatore della pulsatilità coordinata del GnRH [119].

In ogni caso, la sincronizzazione tra i neuroni GnRH potrebbe avvenire a livello dei corpi cellulari, dei dendriti o dei terminali assonali.

### **3.4.2 Kisspeptina: ruolo nei meccanismi di secrezione del GnRH**

Nel 2003, s'identificò la presenza di mutazioni a carico del recettore della kisspeptina (GPR54) in uomini affetti da ipogonadismo ipogonadotropo [120, 121]. Tale scoperta ha aperto una nuova era nella ricerca dei meccanismi responsabili della generazione della pulsatilità del GnRH e, in tale contesto, la kisspeptina ha assunto un ruolo considerevole. Tale peptide possiede infatti una potente azione stimolatrice sulla secrezione di GnRH/LH in numerose specie e la sua pulsatilità è in associazione temporale con quella del GnRH [62]. Inoltre, antagonisti di kisspeptina bloccano il rilascio tonico di GnRH/LH in diverse specie [122].

Nei mammiferi sono state identificate due popolazioni di neuroni produttori di kisspeptina, differenti per localizzazione e funzioni:

- i neuroni dell'ipotalamo anteriore o rostrale: il nucleo AVPV (anteroventrale periventricolare) nei roditori, la POA (area preottica) nella pecora e il PVN (periventricolare) nei maiali [123-126].

Sono molto più numerosi nelle femmine rispetto ai maschi (differenza di sesso) e sono la sede dei meccanismi di feedback positivo estrogenico [62]. Sono quindi implicati esclusivamente nel controllo della secrezione "surge" del GnRH.

- i neuroni dell'ipotalamo intermedio: nucleo ARC (arcuato).

Studi di deafferentazione nel ratto femmina, la presenza nei neuroni Kiss1 dell'ARC dei recettori degli estrogeni e degli androgeni [124, 125] e la constatazione che l'espressione di Kiss1 nell'ARC rispecchia il rilascio di LH in diverse condizioni fisiologiche (pubertà, allattamento, stress, inibizione durante il feedback negativo di E<sub>2</sub> e testosterone) suggeriscono che tali neuroni siano target diretti del feedback negativo degli steroidi sessuali e che siano quindi coinvolti nella generazione del rilascio "pulse" del GnRH.

In alcune specie mammifere, quali la pecora e la scimmia [62], i neuroni Kiss1 dell'ARC sarebbero anche coinvolti nell'induzione del picco preovulatorio di LH.

### **3.4.3 Neuroni KNDy: ipotetico ruolo nei meccanismi di secrezione del GnRH**

A partire dal 2007, quattro distinti gruppi di ricerca [127-129, 108] hanno identificato uno specifico gruppo di neuroni dell'ARC (concentrati nella regione più posteriore) che co-esprimono i neuropeptidi kisspeptina, neurochinina B (NKB) e dinorfina (Dyn) da cui ne deriva il nome "KNDy neurons" [108]. Tale popolazione neuronale è stata descritta in ratti, topi, capre e scimmie e numerose evidenze supportano la sua esistenza anche nell'uomo e nella donna, sebbene esista una marcata differenza tra i due sessi e il ruolo nel maschio sia ancora questione di dibattito. Le componenti peptidiche dei neuroni KNDy sono diverse per espressione e regolazione nelle diverse specie, e le maggiori diversità si riscontrano nei roditori soprattutto per quanto concerne l'attività della NKB [130]. Un crescente interesse per lo studio sulla NKB è nato nel 2009 in seguito all'identificazione di mutazioni nel gene che codifica per tale peptide (*TAC3*) o per il suo recettore (*TAC3R*) in uomini affetti da ipogonadismo ipogonadotropo [131, 132]. Numerose evidenze supportano il ruolo chiave delle vie di segnale di NKB/NK3 e Dyn/KOR nella sincronizzazione dell'attività secretoria dei neuroni GnRH, sebbene non siano stati ancora pienamente compresi i meccanismi coinvolti anche a causa di notevoli differenze di specie [108, 62].

I neuroni KNDy dell'ARC presentano alcune caratteristiche peculiari:

- sebbene kisspeptina, NKB e Dyn siano espressi anche in altre regioni cerebrali, la loro colocalizzazione è prerogativa dell'ARC ed è conservata in numerose specie di mammiferi quali ratto, topo, pecora e capra.
- esprimono ER $\alpha$  (97%) [133, 124, 134], il recettore del progesterone (PR) (90%) [135] e degli androgeni (AR) [134, 136], il che suggerisce un ruolo integrale di tale popolazione neuronale nel mediare gli effetti degli steroidi sessuali.
- nella pecora, nel ratto e nella capra, formano una rete reciprocamente interconnessa [133, 135, 137], le cui innervazioni si estendono a connessioni bilaterali tra i nuclei dell'ARC su ogni lato del terzo ventricolo, molto probabilmente tramite fibre che passano sotto il ventricolo nella zona interna dell'eminenza mediana [130]. Questa reciproca innervazione suggerisce la capacità dei neuroni KNDy di sincronizzare/amplificare le risposte a segnali interni ed esterni a cui sono sensibili, quali gli steroidi sessuali [108]. Tale supposizione è avvalorata

dall'identificazione del recettore ad alta affinità per la NKB (NK3R) nei neuroni KNDy di ratto [138], topo [128] e pecora, nonché del sottotipo recettoriale degli oppioidi con la più alta specificità per DYN (KOR) nelle cellule KNDy del topo [128]. Studi condotti nel topo, non hanno rilevato l'espressione del GPR54 in tale popolazione neuronale [139].

- interagiscono direttamente con i corpi cellulari o i dendriti dei neuroni GnRH del POA e del MBH nei roditori [140, 123], nelle scimmie [108], nelle pecore [141] e nell'uomo [142] e con i terminali neurosecretori GnRH secernenti nell'eminenza mediana nei roditori, nelle scimmie e nelle pecore [130]. Questo aspetto non preclude però l'esistenza di proiezioni delle cellule KNDy verso interneuroni nel POA [127].
- contengono altri neurotrasmettitori e recettori quali il glutammato nei topi [143] e nelle pecore [141], la galanina e il vGAT (un marker dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico, GABA) in piccola percentuale nel topo [141, 143].
- nelle pecore, estendono proiezioni verso altri neuroni non KNDy dell'ARC quali i corpi cellulari di POMC (7%) e di NPY (20%). I neuroni NPY (13-30%) e POMC (32-44%) invierebbero a loro volta innervazioni ai neuroni KNDy permettendo in tal modo a segnali metabolici, quali la leptina, di modularne l'attività [130].
- ricevono innervazioni reciproche da altri neuroni KNDy, segnali glutamatergici e varicosità contenenti vGlut2 [130];

Studi condotti in diverse specie di mammiferi attribuiscono ai neuroni KNDy dell'ARC il ruolo chiave di mediatori del feedback negativo degli ormoni sessuali e quindi del rilascio tonico di GnRH. Le diverse componenti peptidiche di tali neuroni medierebbero differenti tipologie di feedback steroideo:

- kisspeptina funge da target del feedback negativo di  $E_2$  [144] che, nel topo, interagisce con  $ER\alpha$  [145] attivando meccanismi non classici ovvero non associati al signaling degli elementi di risposta agli estrogeni (ERE) [146]. La riduzione dell'espressione di kisspeptina da parte degli estrogeni determina un'inibizione dell'ampiezza di pulsatilità di GnRH/LH.
- l'espressione di NKB [128, 147] e di NK3R [128] sono inibite dagli estrogeni con conseguente attenuazione del signaling stimolatorio di NKB/NK3R sul rilascio pulsatile del GnRH.
- nella pecora e nell'uomo [148], Dyn è coinvolta nell'inibizione della frequenza di pulsatilità del GnRH/LH da parte del progesterone [107], che agisce aumentando

l'espressione di Dyn e potenziando il signaling inibitorio di Dyn/KOR [149]. Nei roditori, il ruolo di Dyn nei confronti del progesterone è meno chiaro [128].

Sun e collaboratori [117] hanno inoltre ipotizzato che il feedback negativo degli steroidi gonadici possa essere veicolato dalla variazione dell'eccitabilità dei neuroni KNDy dell'ARC attraverso meccanismi mediati da canali ionici.

Il sistema neurale responsabile della mediazione del feedback positivo dell'E<sub>2</sub> e quindi dell'induzione del picco preovulatorio di GnRH/LH ("surge") è specie specifico [108].

Nei roditori, E<sub>2</sub> agisce a livello dei neuroni Kiss1 dell'AVPV e nelle aree adiacenti [144, 150]. Nei primati, il feedback positivo di E<sub>2</sub> avviene nel MBH, probabilmente nel VMN o nell'ARC. Nella pecora, i neuroni KNDy permangono una delle sedi del controllo estrogenico positivo (oltre a quello negativo), come avvalorato anche dall'espressione del gene precoce Fos [108]. In tale specie, la mediazione del feedback sia positivo che negativo dell'E<sub>2</sub> potrebbe avvenire in due sottopopolazioni differenti dei neuroni KNDy oppure nella stessa popolazione neuronale che risponderebbe diversamente a basse (controllo negativo) e elevate (regolazione positiva) concentrazioni di estradiolo [151].

Non è da escludere anche il possibile coinvolgimento di altri sistemi neurali, prevalentemente noradrenergici e somatostatinerfici [106].

Navarro [128] nel topo, Lehman [108] nella pecora e Wakabayashi [129] nella capra hanno proposto un plausibile modello per spiegare il ruolo dei neuroni KNDy nella generazione della secrezione "pulse" del GnRH. I neuroni KNDy dell'ARC inviano i propri assoni verso i neuroni GnRH mentre i loro collaterali e dendriti formano un circuito neurale bilaterale interconnesso. All'interno di tale rete neurale, il signaling di NKB/NK3R facilita l'attivazione sincronizzata dei neuroni KNDy, mentre il signaling di Dyn/KOR, in ritardo rispetto a quello di NKB/NK3R, pone termine a tale stimolo attivatorio. Tali meccanismi generano oscillazioni ritmiche nell'attività del circuito neurale e ciascuna di queste oscillazioni si traduce in un impulso per il rilascio di kisspeptina verso i neuroni GnRH del POA o nell'eminenza mediana evocando infine il rapido aumento della secrezione pulsatile del GnRH nella circolazione portale [62].

Il ruolo di kisspeptina come effettore finale per i neuroni GnRH è avvalorato dalla presenza in tali neuroni del GPR54, dall'assenza di KOR, dalla presenza nulla o comunque scarsa di NK3R e dall'osservazione che la distruzione genetica o farmacologica [130] del signaling di kisspeptina blocca l'azione stimolatrice della NKB nei topi e nelle scimmie. Secondo Ducret e collaboratori [152], i neuroni KNDy sarebbero caratterizzati da un'attività spontanea probabilmente dovuta a canali ionici di depolarizzazione lenti che si traduce nell'aumento della NKB. Le attività casuali di

ciascun neurone KNDy si propagherebbero tra le altre cellule interconnesse del circuito neurale dell'ARC mediante il signaling di NKB/NK3R stimolando il rilascio di altra NKB. Il risultante circuito a feedback positivo evocherebbe impulsi attivatori sincronizzati dei neuroni KNDy che risponderrebbero rilasciando kisspeptina. L'aumento iniziale della NKB stimolerebbe anche il rilascio della Dyn che provocherebbe l'inibizione ritardata dei neuroni KNDy mediante il signaling di Dyn/KOR (feedback negativo) e imporrebbe una quiescenza prolungata impedendo la generazione temporanea di un altro impulso attivatorio. L'azione di Dyn sui neuroni KNDy sopprimerebbe infine anche il rilascio di Dyn che consentirebbe quindi l'inizio di un nuovo impulso attivatorio e di un nuovo rilascio pulsatile di Kisspeptina e di GnRH. [62, 108, 130]. Riassumendo, kisspeptina è l'effettore finale, NKB è il peptide che scatena l'eccitazione sincronizzata dei neuroni KNDy aumentando la frequenza di pulsatilità del GnRH/LH mentre Dyn spegne il firing neuronale inibendo l'attività delle cellule KNDy e mantendo sotto controllo la frequenza di rilascio pulsatile. Tuttavia, ad oggi, non sono stati chiariti i meccanismi responsabili del rilascio controllato di Dyn dai neuroni KNDy e neppure se Dyn venga rilasciata contemporaneamente o con leggero ritardo dopo NKB. È ancora questione di dibattito se tale neuropeptidi siano presenti nelle stesse o in differenti vescicole secretorie all'interno dei terminali presinaptici [130].

Goodman e collaboratori hanno inoltre dimostrato l'esistenza di proiezioni dei neuroni GnRH verso i neuroni KNDy dell'ARC sollevando l'ipotesi di reciproche connessioni nervose per il controllo della secrezione episodica di GnRH (possibile feedback negativo del GnRH sull'attività dei neuroni KNDy). In realtà tale innervazione non interviene nella regolazione della frequenza di pulsatilità del GnRH/LH [141].

#### **3.4.4 Pulsatilità intrinseca dei neuroni GnRH**

La secrezione episodica del GnRH dai neuroni ipotalamici è una proprietà intrinseca del neurone GnRH e dipende dall'interazione autocrina (loop autocrino) di tale decapeptide con i propri recettori (espressi nei neuroni produttori di GnRH) e quindi dall'attivazione dei meccanismi di segnale intracellulare che conducono a picchi sincronizzati di rilascio di GnRH [114]. Tali processi sono già evidenti nei neuroni GnRH fetali e quindi potrebbero regolare l'espressione genica e il rilascio del decapeptide durante la migrazione embrionale [153-155].

Oltre all'ipotalamo, altre sedi periferiche della produzione del GnRH sono le cellule ovariche della granulosa [156], le cellule testicolari [157], la placenta umana [158], il sistema immunitario [159] la tasca del Rathke [160] e l'ipofisi [161].

Il sistema GnRH ipofisario potrebbe comunicare con quello ipotalamico mediante il sistema portale ipotalamo-ipofisario e il flusso ematico neuroipofisario retrogrado [162, 163]. Tale organizzazione vascolare, che connette due sistemi in cui il GnRH interagisce con il GnRH-R in modo autocrino, fornisce un meccanismo regolatorio addizionale (feedback corto) che controlla la secrezione di LH e GnRH [164]. Le azioni coordinate dei due sistemi individuali contribuiscono alla pulsatilità sincronizzata del GnRH che innesca il rilascio di LH dall'ipofisi [114].

L'espressione genica di kisspeptina e GPR54 nei neuroni GnRH ipotalamici e l'etero-oligomerizzazione costitutiva o indotta da agonista del GnRH-R e del GPR54 indicano che entrambi i recettori sono coinvolti nella regolazione dei neuroni GnRH ipotalamici. Inoltre, la stimolata secrezione del GnRH da parte di kisspeptina e l'inibito rilascio di kisspeptina da parte del GnRH mostrano che come i sistemi autoregolatori GnRH-R/GnRH e GPR54-kisspeptina siano integrati da meccanismi a feedback negativo per controllare la secrezione di GnRH e kisspeptina [114].

## 4. GONADOTROPINE: LH E FSH

Le gonadotropine LH e FSH sono ormoni glicoproteici costituiti da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ , unite tra loro mediante interazioni non covalenti. La subunità  $\alpha$ , costituita da 90 – 100 aa in base alla specie, è comune ad entrambe le gonadotropine, mentre la subunità  $\beta$ , delle dimensioni di 105 – 121 aa, è la componente esclusiva di ciascuna gonadotropina in quanto è responsabile della sua specificità biologica [165-167]. Entrambe le subunità si caratterizzano per la presenza di oligosaccaridi uniti principalmente a residui di asparagina (Asn). Il loro assemblaggio avviene a livello del reticolo endoplasmatico e tale fase è un fattore limitante nel processo di secrezione degli eterodimeri [168]. Sia il legame al recettore che la trasduzione del segnale necessitano della dimerizzazione delle subunità [166, 449].

La secrezione delle gonadotropine avviene in modo pulsatile e i livelli medi circolanti di tali ormoni subiscono notevoli cambiamenti nelle prime fasi dello sviluppo postnatale fino alla pubertà. Nel ratto maschio, i livelli di FSH aumentano progressivamente dal 15° giorno dalla nascita fino al 45° (raggiungimento della pubertà), mentre i livelli di LH sono caratterizzati da un profilo di secrezione più variabile [169]. Nella ratta femmina, i livelli sierici di FSH aumentano progressivamente dalla nascita fino al 15° giorno, per poi ridursi e quindi incrementarsi leggermente al giorno 35 in concomitanza con il periodo puberale. Al contrario, l'LH aumenta tra i giorni 5 e 10 postnatali, diminuisce fino al giorno 25 per poi incrementarsi bruscamente fino al raggiungimento dei valori massimi con l'arrivo della pubertà (in media il giorno 35 dopo la nascita) [170, 449].

Le gonadotropine esercitano le proprie molteplici funzioni in seguito all'interazione con recettori di membrana accoppiati alla proteina G [171], costituiti da un dominio NH<sub>2</sub>-terminale extracellulare e glicosilato, da sette eliche transmembrana interconnesse tra loro mediante tre anse extracellulari e tre legami intracellulari e da un dominio C-terminale intracellulare ricco in residui di serina e treonina [449].

Il gene da cui deriva il recettore dell'LH (LHR) è composto da 10 introni e 11 esoni [172], di cui i primi 10 codificano per il dominio NH<sub>2</sub>-terminale mentre l'esone 11 per il dominio C-terminale e per le sette eliche transmembrana. Il recettore dell'FSH (FSHR) origina da un gene che consta di 9 introni e 10 esoni, di cui i primi 9 contengono la sequenza del dominio NH<sub>2</sub>-terminale mentre l'esone 10 tutto il rimanente della struttura recettoriale [173]. Sia LHR che FSHR, in seguito all'interazione con le

proteine G, attivano diversi isoenzimi adenilatociclasici con conseguente aumento dei livelli dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP). In aggiunta, è stata comprovata la capacità di tali recettori di attivare altre vie di segnale, incrementando il ricambio di fosfatidilinositoli, elevando i livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulare e attivando proteine chinasi dipendenti da mitogeni [174-176, 449].

I recettori delle gonadotropine si localizzano prevalentemente a livello delle gonadi dal momento che le principali azioni biologiche di LH e FSH si esplicano a tale livello. Nell'ovaio, FSHR è necessario per lo sviluppo follicolare ed è espresso prevalentemente nelle cellule della granulosa [177] mentre, nei testicoli, è stato identificato soprattutto nelle cellule del Sertoli con un ruolo critico per la spermatogenesi [178, 449].

L'LHR è essenziale nell'ovaio per la maturazione follicolare, l'ovulazione e la funzione luteale e si localizza di prevalenza nelle cellule della granulosa, della teca, luteali e interstiziali [179] e tale espressione richiede una stimolazione ormonale appropriata mediata da FSH e estradiolo. Nel testicolo, l'LHR è stato identificato principalmente nelle cellule del Leyding in quanto svolge un ruolo critico nella sintesi di testosterone e nella spermatogenesi. Studi recenti hanno evidenziato la presenza dell'LHR in tessuti extragonadici, inclusi l'utero di diverse specie, le vescicole seminali umane, la prostata umana e di ratto, la ghiandola surrenalica umana, la ghiandola mammaria di ratto in allattamento, la retina neurale, le cellule neuroendocrine e il cervello della ratto [180]. Quest'ultimo è piuttosto interessante vista la capacità dell'LH di attraversare la barriera ematoencefalica [181]. Il possibile ruolo fisiologico della presenza extragonadica di recettori delle gonadotropine è tuttora poco conosciuto [449].

#### **4.1 REGOLAZIONE DIFFERENZIALE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI LH E FSH IN RELAZIONE ALLA FREQUENZA DI PULSATILITÀ DEL GnRH**

La sintesi e la secrezione intermittenti di LH e FSH dalle cellule gonadotrope dell'adenipofisi sono strettamente regolate da numerosi fattori endocrini, paracrini e autocrini, inibitori (steroidi gonadici) e stimolatori [115, 182], come evidenziato dalle variazioni prevedibili e riproducibili dei livelli circolanti delle gonadotropine durante il ciclo estrale. Nei primi momenti della fase follicolare e di quella luteale, l'FSH predomina sull'LH, mentre l'LH supera l'FSH nella tarda fase follicolare. Il GnRH ipotalamico e il ritmo pulsatile con cui tale ormone raggiunge l'ipofisi anteriore sono sicuramente due requisiti imprescindibili per la biosintesi e il rilascio di LH e FSH, che

sono invece soppressi dall'esposizione continua al decapeptide [115, 165, 183-185]. Il rilascio episodico del GnRH varia per frequenza e intensità durante diverse condizioni fisiologiche quali l'insorgenza della pubertà e il ciclo estrale [182]. Queste variazioni nel pattern di pulsatilità del GnRH hanno effetti differenziali sulla trascrizione della subunità comune  $\alpha$  e di quella specifica  $\beta$  di FSH (FSH $\beta$ ) e LH (LH $\beta$ ) [185,186] e sui profili di rilascio delle gonadotropine biologicamente attive [187]. In particolare, un incremento nella frequenza di pulsatilità del GnRH ipotalamico (> 1 pulsazione all'ora) favorisce la trascrizione di LH $\beta$  e determina un preferenziale rilascio di LH (aumenta il rapporto LH/FSH). Al contrario, ridotte frequenze di impulsi secretori di GnRH (< 1 pulsazione all'ora) comportano una più consistente trascrizione di FSH $\beta$  e quindi un più marcato rilascio di FSH [115, 182, 183, 185]. Tale meccanismo consente ad un singolo neuropeptide ipotalamico di indurre cambiamenti differenziali su due distinti ormoni rilasciati dallo stesso tipo cellulare ipofisario ed è reso possibile dall'abilità delle cellule gonadotrope di decifrare i diversi input di rilascio episodico del GnRH [182]. Contrariamente alla maggior parte dei recettori accoppiati a proteine G, il GnRH-R non va mai incontro ad un processo di desensitizzazione a causa dell'assenza dell'estremità C-terminale [188]. Altri meccanismi intervengono quindi nella modulazione della risposta cellulare alla pulsatilità del GnRH quali l'internalizzazione del recettore mediata da ligando, il cambiamento nel numero dei recettori o nell'attività delle vie di segnale a valle del GnRH-R. Studi *in vitro* condotti da Kaiser e collaboratori [186, 189] hanno dimostrato che le cellule gonadotrope rispondono in modo differenziale alla pulsatilità del GnRH tramite il cambiamento nel numero di GnRH-R. Nel dettaglio, gli impulsi di GnRH aumentano l'espressione dell'mRNA del GnRH-R in quantità maggiori all'aumentare della velocità di frequenza. Tuttavia, non sono stati ancora chiariti i meccanismi con cui le cellule gonadotrope convertono il segnale pulsatile del GnRH nella sintesi e nella secrezione preferenziale di FSH e LH.

## **4.2 VIE DI SEGNALE ATTIVATE DAL RILASCIO PULSATILE DEL GnRH**

A seconda del tipo cellulare considerato, ipotalamico o ipofisario, il GnRH-R è accoppiato alle proteine  $G_{\alpha_q/11}$ ,  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_s}$  [190] e probabilmente  $G_{12/13}$ , il che implica il coinvolgimento di numerose vie di segnale nella mediazione della sintesi di LH e FSH in risposta alla pulsatilità del GnRH. Le proteine  $G_{\alpha_q/11}$  inducono la fosfolipasi C a generare inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) provocando il rilascio del calcio intracellulare e l'attivazione del signaling delle proteina chinasi C (PKC) [191].

Le proteine  $G\alpha_s$  e  $G\alpha_i$  agiscono sull'adenilato ciclastasi per modulare i livelli di AMP ciclico (cAMP) [192].

La cascata di MAPK (mitogen-activated protein kinase) che include ERK (extracellular signal related kinase), JNK (jun N-terminal kinase) e p38 è stimolata dal GnRH. I differenti pattern di attivazione di ERK in risposta alla variazione della frequenza di pulsatilità del GnRH potrebbero essere responsabili dei distinti profili di espressione di FSH $\beta$  e LH $\beta$  nelle cellule gonadotrope [193]. Armstrong e collaboratori [194] hanno posto la mancata desensitizzazione della traslocazione di ERK nel nucleo dopo stimolazione a frequenze diverse con GnRH come una prova che ERK non sia il decodificatore della pulsatilità del decapeptide. Potrebbero però essere coinvolti dei meccanismi a valle della traslocazione di ERK.

Il gruppo di Haisenleder [195, 196] ha attribuito un possibile ruolo come decodificatore della frequenza di pulsatilità del GnRH al signaling del calcio e quindi all'attivazione di CamK1/2 (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases).

Il fattore di trascrizione NFAT (nuclear factor of activated T-cells) potrebbe mediare gli effetti del GnRH sulla trascrizione di FSH e LH, in seguito all'attivazione da parte della calcineurina, una fosfatasi proteica [197]. Tuttavia, la traslocazione reversibile [197] di tale fattore nel nucleo subisce una desensitizzazione indipendentemente dalla frequenza di pulsatilità del GnRH e quindi non darebbe credito all'ipotesi del coinvolgimento della via Ca<sup>2+</sup>/NFAT nella decodificazione del segnale pulsatile del GnRH [198].

Studi recenti avvalorano la capacità di PKA (protein kinase A) di mediare la trascrizione di FSH $\beta$  in seguito a pulsatilità di GnRH sia lente che veloci [199]. Alcuni sostengono che l'attività di tale chinasi aumenterebbe con frequenze di pulsatilità basse, mentre altri ritengono che tale aumento non sarebbe dipendente dal tipo di frequenza di pulsatilità [200].

Tsutsumi e Webster hanno proposto un modello per la regolazione del signaling del GnRH-R in risposta al rilascio di GnRH tonico o pulsatile. La stimolazione tonica da parte del GnRH causa un aumento transiente nel signaling di  $G_s$ /cAMP/PKA che ritorna rapidamente ai valori basali nonostante la continua presenza di GnRH. Al contrario, il signaling di  $G_{q/11}$ /DAG/Ca<sup>2+</sup> rimane elevato durante tutto il periodo di stimolazione tonica del GnRH. Il rilascio pulsatile del decapeptide ipotalamico provoca una rapida attivazione di  $G_s$ /cAMP/PKA, un effetto cumulativo di multipli impulsi e una mancanza di desensitizzazione. Ne derivano impulsi regolari e d'intensità costante nel tempo che mimano la pulsatilità del GnRH. La via di segnale di  $G_{q/11}$ /DAG/Ca<sup>2+</sup> mostra un'iniziale attivazione che correla con il picco di GnRH ma ciascun impulso successivo

ha intensità sempre più bassa fino all'abbattimento del segnale dopo due ore di stimolazione pulsatile del GnRH. Questa desensitizzazione del signaling di  $G_q$  potrebbe riflettere un feedback negativo indotto a valle da PKC o CaMK [105].

### **4.3 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELLE SUBUNITÀ DI FSH E LH**

La trascrizione di  $FSH\beta$  è la fase limitante della sintesi di FSH. Una volta che la via di segnale del GnRH è stata avviata, la sintesi di FSH è direttamente accoppiata al suo rilascio mediante la via secretoria costitutiva [201]. Al contrario, LH è immagazzinato in granuli secretori fino allo stimolo secretorio [202].

Nel promotore di  $FSH\beta$  è stato identificato un elemento responsivo al GnRH, [203] conservato nella specie umana, [204] e contenente un parziale sito CRE (cAMP response element)/AP1. In tale regione, sotto stimolazione di frequenze di pulsatilità lente del GnRH, si lega CREB (cAMP response element binding protein) che, dopo fosforilazione a livello della  $Ser^{133}$  mediata dalla PKA, recluta e lega CBP (CREB binding protein) per indurre la trascrizione di  $FSH\beta$  ([199]). ICER (inducibile cAMP early repressor) è sintetizzato ed espresso preferibilmente a seguito di frequenze di pulsatilità veloci del GnRH e compete con CREB per il sito CRE sul promotore di  $FSH\beta$  per ridurre la trascrizione di tale subunità [182]. Le vie di segnale di ERK e del calcio rispondono diversamente alla frequenza del GnRH e sono potenziali candidati per la regolazione di ICER [193]. Gli omo- ed etero-dimeri di AP1, composti da una combinazione di c-Fos, c-Jun, Jun B e Jun D, sono stimolati da frequenze di pulsatilità più lente rispetto agli effettori negativi della trascrizione di  $FSH\beta$ , chiamati SKIL e TGIF1. In presenza di frequenza di pulsatilità alte, questi repressori si legano al promotore e inibiscono qualsiasi potenziale azione di c-Fos e c-Jun [105]. pERK, JNK e p38 potrebbero mediare l'aumentata espressione delle proteine AP1 [203]. Tuttavia non è stato ancora compreso come il GnRH induca l'espressione di CREB, ICER e AP1 in modo integrato per decodificare la frequenza di pulsatilità e controllare la sintesi di FSH.

Nella parte prossimale del promotore di  $LH\beta$  avviene il legame di due EGR1 (early growth response 1), due SF1 (steroidogenic factor 1) e un elemento omeodominio [193]. Frequenze di pulsatilità del GnRH veloci favoriscono la stabilità e livelli elevati di EGR1 che aumentano la trascrizione di LH, mentre frequenze lente inducono maggiormente i corepressori della famiglia EGR, chiamati NAB1/2 (Ngfi-A binding protein) che riducono la trascrizione di  $LH\beta$  [205]. Inoltre, anche il corepressore di

SF1, chiamato Dax1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X-chromosome gene 1) è stimolato a basse frequenze e ridotto ad alte frequenze di pulsatilità del GnRH. ERK media sia l'aumento della trascrizione di EGR1 che, l'induzione, a basse frequenze di GnRH, di NAB1/2. EGR1 contribuisce ad indurre MKP2 (MAPK phosphatases 2) fornendo un potenziale meccanismo tramite cui un classico regolatore di LH $\beta$  potrebbe anche influenzare la trascrizione di FSH $\beta$ . L'aumentata espressione di EGR1 e poi di MKP2 a frequenze alte di pulsatilità del GnRH potrebbe ridurre la fosforilazione di ERK e quindi l'attività degli induttori della trascrizione di FSH $\beta$ , come AP1 [193].

Nelle cellule gonadotrope, frequenze di pulsatilità alte e basse del GnRH stimolano vie di segnali comuni (ad esempio ERK) e quindi la decodificazione del tipo di pulsatilità del GnRH si potrebbe basare sull'ampiezza, la durata e la frequenza di attivazione di tali vie di segnale che coinvolgerebbero multipli fattori di trascrizione [193].

## 5. METABOLISMO PERIFERICO E CENTRALE DEL FERRO

### 5.1 FUNZIONI BIOLOGICHE DEL FERRO

Il ferro è un microelemento d'importanza vitale per la maggior parte delle forme di vita conosciute perché agisce da cofattore in numerose reazioni metaboliche che sostengono la divisione cellulare, il trasporto d'ossigeno nell'emoglobina e nella mioglobina [206], la funzionalità dei citocromi, della citocromo ossidasi, della perossidasi e della catalasi, la produzione di energia nei mitocondri, la sintesi e il riparo di DNA. Le proteine Fe-S nella catena respiratoria mitocondriale trasferiscono gli elettroni, generati dal ciclo dell'acido tricarbossilico, alle molecole di ADP per la produzione di energia, soddisfacendo in tal modo all'elevata richiesta energetica delle cellule neuronali. In mancanza di ferro, gli eritrociti non potrebbero veicolare ai tessuti l'ossigeno legato all'emoglobina (gruppo heme) e la fosforilazione ossidativa da parte dei complessi della catena respiratoria mitocondriale non sarebbe possibile (clusters Fe-S) [207].

Nel cervello, il ferro è richiesto non solo per la sintesi di DNA e ATP e per la respirazione mitocondriale ma anche per la biosintesi di neurotrasmettitori, la sintesi di mielina, la crescita assonale e la trasduzione del segnale postsinaptico mediato da recettore [208]. Tale metallo è quindi di fondamentale importanza per una corretta embriogenesi in età fetale e per il mantenimento di una corretta funzionalità del SNC nelle prime fasi dello sviluppo neonatale e durante la vita adulta. La **Tabella 5.1** [209] elenca i principali ruoli fisiologici del ferro nel cervello.

---

#### Physiologic Roles of Iron in the Brain

---

##### Embryonic Neuronal Development

- Cofactor for Ribonucleotide reductase

##### Myelin Formation

##### Neurotransmitter Synthesis and Metabolism

- Serotonin
- Dopamine
- Norepinephrine
- $\gamma$ -aminobutyric acid

##### Oxidative Phosphorylation/ATP synthesis

- Cofactor for cytochromes a, b, and c, and cytochrome oxidase
- 

Gaasch, J.A. et al., Neurochem Res 2007;32:1196-1208

**Tabella 5.1** Ruolo del ferro nello sviluppo del cervello e nel mantenimento della sua funzionalità.

## 5.2 PROPRIETÀ CHIMICHE DEL FERRO

Il ferro partecipa ai diversi processi metabolici mediante reazioni reversibili di ossidazione del  $\text{Fe}^{2+}$  e di riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$  che permettono il trasferimento di singoli elettroni. Il ferro è un metallo di transizione del blocco *d* e i suoi orbitali *d* liberi consentono alle specie ioniche del ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{4+}$ ) di legare diverse biomolecole mediante atomi di ossigeno, azoto e zolfo. Il potenziale redox biologico, lo stato di spin elettronico e quindi la reattività del ferro derivano dalla natura della molecola a cui è legata la specie ionica del ferro. Tale configurazione, in aggiunta allo stato di ossidazione del ferro stesso, detta la tipologia di reazione chimica e biologica di cui è responsabile una biomolecola associata al ferro. In particolare, le reazioni che coinvolgono il trasporto e il deposito di ferro, il trasferimento elettronico o l'ossidazione/riduzione di altre molecole nell'organismo sono prevalentemente di tipo redox e idrolitico o coinvolgono la formazione di complessi polinucleari [210].

La necessità del ferro per le normali funzioni fisiologiche ha reso indispensabile un meccanismo finemente regolato per assicurare un effetto netto neutrale del ferro assunto con la dieta [211]. Tale aspetto è di fondamentale importanza soprattutto per il cervello, uno dei siti dell'organismo in cui si mantengono le concentrazioni più elevate di ferro [212].

## 5.3 LOCALIZZAZIONE E CONCENTRAZIONE DEL FERRO

Il corpo umano contiene una media di 4 - 5 g di ferro, di cui la maggior parte costituisce il gruppo eme delle proteine preposte al trasporto di ossigeno (65% emoglobina e 4% mioglobina) ed è definito "ferro eme". La quota rimanente forma il ferro "non-eme" che è legato alle proteine plasmatiche (soprattutto alla transferrina (Tf) ma anche debolmente all'albumina, ad aminoacidi a basso peso molecolare, all'ATP e al citrato [213]) oppure è immagazzinato sotto forma di ferritina [212] (Ft, la principale proteina di deposito intracellulare di ferro), nel sistema reticoloendoteliale e nelle cellule parenchimali epatiche [208]. La concentrazione media di ferro nel siero è 9-30  $\mu\text{M}$  (soprattutto legato alla Tf), mentre quella ematica (principalmente sotto forma di emoglobina) è circa 8.5 mM [214].

Dopo il fegato, il cervello contiene la più elevata quantità di ferro (circa 60 mg di "ferro non-eme" in un uomo normale adulto) [215, 216] diversamente distribuito nelle varie strutture cerebrali [215]. Nel SNC di un uomo adulto e sano, il ferro è sequestrato soprattutto nei gangli della base, nell'ippocampo, in alcuni nuclei

cerebellari e in altre regioni cerebrali subcorticali [217]. La substantia nigra e il globus pallidus possono contenere livelli di ferro che eccedono quelli epatici (3.3-3.8 mM in un cervello umano normale e adulto) mentre la concentrazione di "ferro non-eme" nella corteccia parietale umana è circa 0.65 mM [216]. Tali elevate concentrazioni marziali nel cervello potrebbero essere giustificate dalla sostenuta richiesta di metabolismo ossidativo, necessario per mantenere i gradienti ionici di membrana, per il trasporto assonale e per la trasmissione sinaptica [209, 218, 219].

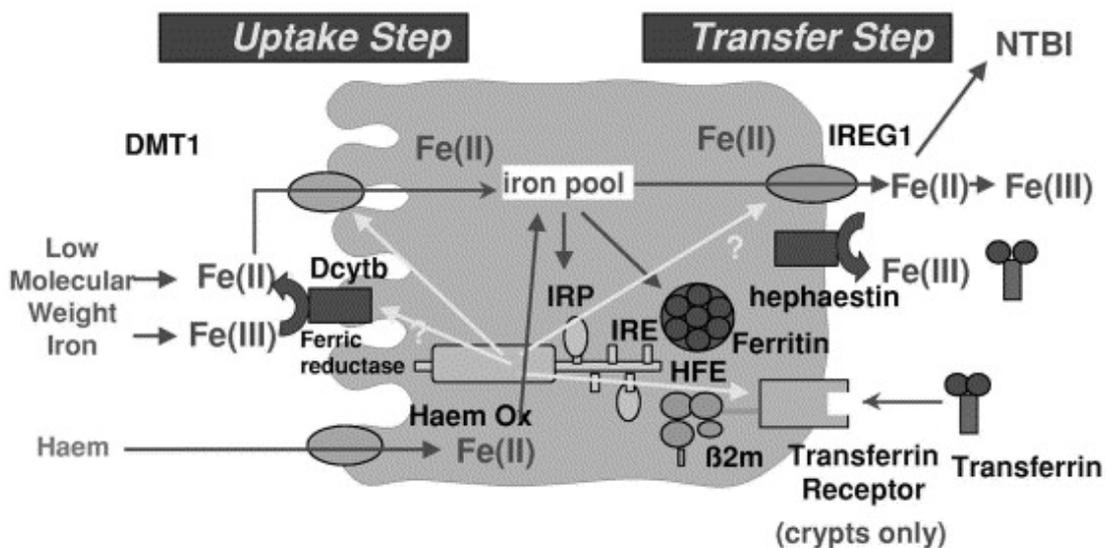
## **5.4 OMEOSTASI DEL FERRO A LIVELLO PERIFERICO**

### **5.4.1 *Assorbimento del ferro attraverso le cellule della mucosa intestinale***

Ogni giorno, un soggetto sano ingerisce circa 12 - 18 mg di ferro eme e non-eme (ferro inorganico -  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) con la dieta e di questi solo 1 - 2 mg sono assorbiti esclusivamente nella forma ridotta  $\text{Fe}^{2+}$ . Sulla membrana apicale dell'enterocita coesistono due sistemi per la captazione delle due forme di ferro dietetico: il ferro eme è trasportato nel citoplasma da un putativo recettore eme e diventa il substrato dell'ossigenasi eme microsomiale che rilascia  $\text{Fe}^{2+}$ , porfobilinogeno e CO [220]; il  $\text{Fe}^{3+}$ , dopo riduzione a  $\text{Fe}^{2+}$  da agenti riducenti nel tratto gastrointestinale (ascorbato) o dalla reduttasi ferrica duodenale (Dcytb) [221] sulla membrana apicale dell'enterocita, e direttamente il  $\text{Fe}^{2+}$  sono internalizzati mediante il DMT1 (divalent metal transporter 1, conosciuto anche come DCT1, divalent cation transporter 1 o Nramp2, natural resistance associated macrophage protein 2) [222]. Il DMT1 trasporta nella stessa direzione un protone e un atomo di  $\text{Fe}^{2+}$ , oppure, non selettivamente, altri metalli divalenti, quali manganese (Mn), rame (Cu), cobalto (Co), zinco (Zn), cadmio (Cd) e piombo (Pb) [222]. Oltre che nell'epitelio duodenale, il DMT1 è stato identificato anche negli eritrociti, nelle cellule epiteliali renali, nei cardiomiociti, nell'epitelio placentale umano e nel cervello [208]. All'interno dell'enterocita, il pool di  $\text{Fe}^{2+}$  può subire due diversi destini: quando i suoi livelli eccedono le necessità dell'organismo, è incorporato in una molecola di ferritina; se invece è richiesto per le normali funzioni fisiologiche, è trasportato verso la membrana basolaterale e quindi nella circolazione sistemica mediante la ferroportina 1 (FPN1, chiamata anche IREG1), un trasportatore transmembrana del ferro [221]. L'esportazione mediata da FPN1 è facilitata dalla ferrossidasi legata alla membrana eferstina, che ossida il  $\text{Fe}^{2+}$  appena rilasciato

dall'enterocita in  $\text{Fe}^{3+}$  e ne facilita quindi il legame con l'apo-transferrina (apo-Tf, transferrina libera e non legata a ferro), la principale proteina per il trasporto in circolo del ferro ferrico [223]. Nelle condizioni di saturazione della capacità di legame della transferrina (Tf), il  $\text{Fe}^{3+}$  può legarsi ad altre molecole, costituendo il pool di ferro non legato alla Tf (NTBI – non-Tf bound iron) [224] (**Figura 5.1**).

La regolazione dell'uptake duodenale di ferro e quindi dei livelli di tale metallo nell'organismo è coordinata dall'epcidina, un ormone peptidico di piccole dimensioni (25 aa) sintetizzato soprattutto dagli epatociti [225]. Il sovraccarico di ferro e l'infiammazione aumentano l'espressione dell'epcidina che limita l'esportazione cellulare di ferro (e quindi l'assorbimento di ferro dietetico) mediante il legame con la FPN che subisce internalizzazione e degradazione intracellulare [225, 226]. Inoltre, l'espressione di DMT1 è controllata dal fattore indotto da ipossia  $2\alpha$  (HIF- $2\alpha$ ), che coordina la trascrizione di tale proteina in risposta all'ipossia e al deficit marziale nella mucosa duodenale [227].



Crichton, R. et al., Journal of Inorganic Biochemistry 2002;91:9-18

**Figura 5.1** Rappresentazione schematica dell'assorbimento di ferro attraverso una cellula della mucosa intestinale sana. A livello della membrana apicale dell'enterocita, il ferro dietetico non eme è assorbito come  $\text{Fe}^{2+}$  tramite il DMT1 mentre il ferro eme è internalizzato da un recettore specifico e degradato per liberare  $\text{Fe}^{2+}$ . L'enterocita rilascia in circolo solo la quota di ferro necessaria per l'organismo mentre l'eccesso marziale è trattenuto all'interno della ferritina. La liberazione del ferro coinvolge il trasportatore IREG1 e l'ossidasi efestina collocati sulla membrana basolaterale a cui fa seguito l'incorporazione del  $\text{Fe}^{3+}$  nella apotransferrina. Gli ioni  $\text{Fe}^{2+}$  possono essere rilasciati in circolo anche liberi (NTBI) per una successiva ossidazione da parte della ceruloplasmina sierica.

### **5.4.2      *Trasporto del ferro in circolo***

In soggetti normali, Il ferro raggiunge una concentrazione sierica di 3, 5  $\mu\text{g/ml}$  [224]. La Tf, una glicoproteina a singola catena polipeptidica di 78 kDa, è la principale proteina di trasporto del ferro nella circolazione sanguigna. Ciascuna molecola bilobata di Tf, costituita da due unità globulari alle estremità N- e C- terminali, presenta due siti di legame reversibile per il  $\text{Fe}^{3+}$  con cui forma una struttura tetradentata a 4 atomi mediante un residuo aminoacidico di istidina, uno di aspartato e due di tirosina [206]. La Tf legata a due ioni  $\text{Fe}^{3+}$  è anche chiamata transferrina diferrica ( $\text{Fe}_2\text{Tf}$ ) o olo-transferrina (holo-Tf). In un individuo adulto e sano, circolano nel sangue circa 3 – 4 mg di ferro legati alla Tf e generalmente solo il 30% di tutta la Tf circolante è saturata da tale metallo [209]. Solo in condizioni di severo sovraccarico corporeo di ferro (concentrazioni plasmatiche di ferro maggiori di 42  $\mu\text{M}$ ), come nell'emocromatosi, si registra la saturazione di Tf [210]. Studi pionieristici condotti da Katz nel 1961 [228] hanno dimostrato che  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  è rapidamente eliminata dalla circolazione sanguigna (emivita dell'ordine di 1.7h), mentre Tf subisce un centinaio di cicli di legame, trasporto e rilascio del ferro prima della definitiva eliminazione dal circolo (emivita dell'ordine di 7.6 giorni). Nella maggior parte delle cellule di mammifero, la captazione del ferro è mediata dai recettori della transferrina (TfRs), omodimeri collegati da ponti disolfuro e costituiti da due subunità glicosilate identiche di 90 kDa [224].

Una quota molto esigua di ferro (meno dell'1%) non è veicolata alla Tf (NTBI – Non-Tf bound iron) bensì a ligandi a basso peso molecolare (LMW), quali gli ioni citrato e ascorbato e, in piccola percentuale, alle proteine albumina e ferritina [229] e all'ATP.

### **5.4.3      *Trafficking cellulare del ferro***

Il TfR1 è una proteina di membrana ubiquitaria con una struttura dimerica e, a valori di pH neutri, presenta un'affinità elevata per  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  e bassa per apo-Tf. Tale affinità selettiva non consente alla Tf libera di agire da inibitore competitivo della holo-Tf per il legame con TfR1 [230]. L'interazione della  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  con TfR1 comporta la formazione di un complesso che è internalizzato per endocitosi all'interno di vescicole rivestite di clatrina, che, una volta internalizzate, perdono il proprio rivestimento e si fondono con gli endosomi. Una pompa protonica ATP-dipendente acidifica (pH 5.5) il lume dell'endosoma e provoca un cambiamento conformazionale della  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  e del TfR1 con conseguente rilascio di  $\text{Fe}^{3+}$  dalla sua proteina chaperone all'interno del compartimento endosomiale [231]. Lo ione  $\text{Fe}^{3+}$  libero è rapidamente ridotto a  $\text{Fe}^{2+}$

dalla reduttasi ferrica STEAP1-4 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1-4) e quindi esportato nel citoplasma dalla proteina transmembrana DMT1 (divalent metal transporter-1) [232]. Nell'endosoma acidificato, apo-Tf è ancora legata con forte affinità al TfR1 e tale interazione previene la degradazione della Tf libera quando l'endosoma si fonde con il lisosoma prima dell'esocitosi. Durante tale processo, il pH ritorna a valori neutri provocando la dissociazione di apo-Tf dal TfR1 con conseguente riciclaggio in circolo della Tf che può nuovamente legare due ioni  $Fe^{3+}$  [233] e ripristino del TfR sulla membrana cellulare. Nel 1999 è stato identificato un recettore omologo della Tf, denominato TfR2 [234], espresso preferenzialmente in alcuni distretti (epatociti, eritrociti, cellule della cripta duodenali e neuroni dopaminergici) e con un'affinità molto più bassa del TfR1 per la holo-Tf.

Nel citoplasma gli ioni ferro costituiscono un pool dinamico a basso peso molecolare o "pool di ferro labile" (LIP – labile iron pool) o "pool di ferro chelabile" e sono coinvolti in diversi processi cellulari in base alle necessità della cellula, quali il legame a chaperones che donano ferro a specifiche proteine target [235], il sequestro nella ferritina ed emosiderina e l'ingresso nei mitocondri. La ferritina è un eteropolimero di 24 subunità, solubile in acqua e ad elevato peso molecolare. Il ruolo principale di tale molecola consiste nel riciclaggio del ferro per la sintesi dell'eme e nella compartimentalizzazione in una forma non reattiva del ferro libero che quindi non può raggiungere elevate concentrazioni nel citoplasma e nel nucleo [236]. La ferritina è raramente saturata poiché è in grado di trattenere da 2000 a 4500 ioni  $Fe^{3+}$  [237]. È composta da catene leggere (ferritina L) e catene pesanti (ferritina H) che si assemblano in diversi rapporti per formare una sfera cava in cui vengono inglobati gli atomi di ferro essenzialmente come ferridriti. La ferritina H contiene un centro ferrossidasico ed è coinvolta nell'ossidazione del  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , necessaria per l'incorporazione del ferro nella ferritina, mentre la ferritina L è responsabile della mineralizzazione del ferro e della sua conservazione [209]. In condizioni di sovraccarico di ferro, la ferritina è degradata nei lisosomi e trasformata in depositi ricchi in ferro disorganizzati conosciuti come emosiderina [211, 238]. In tale struttura il ferro è conservato in forma insolubile e può quindi eccedere la quantità di ferro legato alla Tf [209]. Sebbene alcuni studi dimostrino la possibile mobilitazione del ferro dall'emosiderina [239], il ruolo fisiologico di tale molecola e del ferro in essa contenuto è ancora poco conosciuto [215]. L'incremento del contenuto intracellulare di ferro non è necessariamente immagazzinato nella ferritina o nell'emosiderina ma può anche aumentare le dimensioni del LIP, sebbene in modo molto più transiente [240].

Il ferro è importante per la corretta funzionalità dei mitocondri, dove è incorporato in cluster Fe-S e nelle proteine heme [231]. I meccanismi dell'uptake mitocondriale di ferro non sono stati ancora confermati, sebbene sia stata ipotizzata la diffusione del NTBI o la traslocazione della  $Fe_2Tf$  extracellulare mediante i trasportatori mitocondriali mitoferrina 1 o 2 con formazione di endosoma [241]. All'interno di tale organello cellulare, la proteina fratassina agirebbe come chaperone del ferro intramitocondriale [242].

Nelle cellule di mammiferi, l'esportazione di ferro, nella forma di  $Fe^{2+}$ , è resa possibile solo dalla ferroportina [243]. Tale proteina transmembrana è accoppiata ad una ferrossidasi che ossida il  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  per renderlo immediatamente disponibile al legame con Tf.

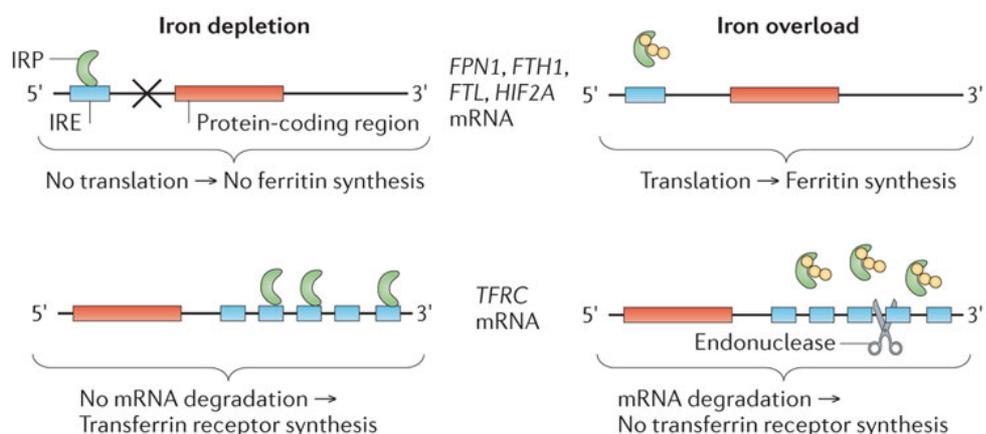
## **5.5 REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI CELLULARE DEL FERRO A LIVELLO PERIFERICO**

Nelle cellule di mammifero, l'omeostasi marziale è regolata dall'equilibrio tra assorbimento, deposito intracellulare e utilizzo di ferro ed è perseguita prevalentemente nella fase della sintesi proteica (traslazione dell'mRNA in proteina) piuttosto che in fase trascrizionale (sintesi di mRNA). L'esistenza di una regolazione post-trascrizionale dell'omeostasi del ferro comporta che non sempre i livelli del trascritto genico correlano con quelli della proteina [244]. Le sequenze regolatrici dell'omeostasi del ferro (IREs – iron responsive elements) sono localizzate alle estremità 5' e 3' della sequenza codificante di un mRNA, ovvero in corrispondenza di regioni non codificanti o non tradotte (UTRs). Gli IREs al 5'-UTR sono solitamente responsabili dell'inizio della trascrizione, ovvero del legame del ribosoma, mentre quelli al 3'-UTR controllano la stabilità e la degradazione da parte delle ribonucleasi dell'mRNA [224]. Nella maggior parte dei tipi cellulari conosciuti, sono state identificate due proteine di legame degli IREs, denominate IRP-1 e IRP-2 (iron regulatory protein 1 e 2) [245]. Tali proteine citoplasmatiche e strettamente correlate agiscono come sensori del ferro convertendosi in due diverse forme [224] e regolando l'omeostasi del ferro post-trascrizionale. Gli IREs sono presenti nell'mRNA di proteine coinvolte nell'uptake (TfR e DMT1), nel deposito (Ft) e nell'esportazione di ferro (FPN). Poiché i trascritti contenenti gli IREs non sempre subiscono dei cambiamenti nei loro livelli in risposta a diversi stati di ferro, è necessario confrontare l'espressione

genica con i livelli proteici di tali trascritti per capire se le risposte ai diversi stati di ferro siano regolate a livello genetico o post-trascrizionale [244].

In condizioni di bassa concentrazione cellulare di ferro, IRP1 e IRP2 si legano direttamente e con alta affinità alla struttura a stelo ed ansa ("stem-loop") degli IREs. Nel dettaglio, il legame di IRP1/2 a livello della regione 3' non tradotta dell'mRNA del TfR1 protegge e stabilizza tale mRNA promuovendo la trascrizione di TfR1. Al contrario, l'interazione di IRP1/2 con la regione 5' non tradotta dell'mRNA della Ft ne previene la traslazione riducendo l'espressione della Ft citoplasmatica e quindi la capacità di deposito cellulare di ferro [210]. Si verifica quindi un aumento del ferro disponibile a causa del simultaneo incremento dell'uptake di ferro tramite TfR1 e della prevenzione del sequestro di ferro da parte della Ft. Quando i livelli cellulari di ferro sono elevati, il ferro libero lega IRP1/2 impedendone il legame con gli IREs. Ne consegue una risposta cellulare opposta rispetto a quella osservata nei casi di deficit di ferro, ovvero l'aumento della sintesi della Ft citoplasmatica e la degradazione del TfR1 (**Figura 5.2**). I meccanismi dell'inibizione del legame IRP/IRE dipendono dalle proteine coinvolte: IRP1-Fe subisce un cambio conformazionale che previene il legame dell'IRE, mentre il complesso IRP2-Fe va incontro a degradazione mediante la via ubiquitina-proteasoma [246]. Esistono due principali trascritti di mRNA di DMT1, di cui uno contiene una sequenza IRE nella regione 3' non tradotta che è disponibile al legame con le proteine cellulari. L'mRNA di DMT1 è regolato in modo analogo al trascritto di TfR ovvero mediante il controllo della stabilizzazione del sistema IRE/IRP [208].

Sia IRP1 che IRP2 sono presenti nel cervello di ratto e umano [206].



Rouault, T.A., Nat Rev Neurosci, 2013;14(8):551-64

**Figura 5.2** Regolazione post-trascrizionale dell'omeostasi marziale cellulare da parte del sistema IRE/IRP.

L'omeostasi dell'ossigeno cellulare regola il metabolismo del ferro a livello trascrizionale mediante i fattori indotti dall'ipossia (HIFs) costituiti da una subunità proteina citosolica HIF-1 $\alpha$  ed una nucleare HIF-1 $\beta$  che insieme formano un eterodimero di legame del DNA a livello della sequenza CREB. In condizioni di normossia, HIF-1 $\alpha$  è idrolizzato con una reazione che richiede Fe<sup>2+</sup> come cofattore e subisce ubiquitinazione. In caso d'ipossia, HIF-1 $\alpha$  trasloca nel nucleo, forma un dimero con HIF-1 $\beta$  e lega CREB inducendo la trascrizione di geni target tra cui quelli codificanti per Tf, TfR1 and DMT1. Poiché il ferro è necessario per l'idrolisi di HIF-1 $\alpha$ , la riduzione dei livelli cellulari marziali aumenta la dimerizzazione di HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  e quindi la trascrizione delle proteine coinvolte nell'uptake e nell'esportazione del ferro [206].

## **5.6 OMEOSTASI DEL FERRO NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE (SNC)**

### **5.6.1 *Ingresso del ferro nel SNC***

#### **5.6.1.1 *Barriere del SNC***

Nel SNC sono presenti due tipi di barriere: la prima è la barriera emato-encefalica (BEE o BBB – blood-brain barrier) che impedisce ai nutrienti presenti nel sangue arterioso di passare nel fluido interstiziale cerebrale e quindi di raggiungere il tessuto nervoso; la seconda è la barriera emato-liquorale (BEL) o emato-fluido cerebrospinale (BCB – blood-cerebrospinal fluid barrier) che ostacola il passaggio delle sostanze dai capillari cerebrali di tipo arterioso al liquor cerebrospinale [207]. Poiché non esistono barriere strutturali tra il fluido cerebrospinale (CSF) e quello interstiziale, è possibile uno scambio libero di materiali tra questi due liquidi [208].

La base strutturale della BEE sono le cellule endoteliali che ricoprono i capillari cerebrali ed esprimono le principali proteine delle giunzioni strette, quali occludina, claudine e ZO1, che sigillano tra loro cellule adiacenti. Il lato abluminale delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali è circondato da tre strati cellulari: 1) una membrana basale; 2) i periciti (30%); 3) i pedicelli astrocitari (90%) [247]. Questo complesso sistema di giunzioni strette e di molteplici strati cellulari non consente la diffusione e

la migrazione di nutrienti e macromolecole di piccole dimensioni e di natura polare. Pertanto, esiste un sistema di recettori e trasportatori che media il trasporto di tali sostanze attraverso le membrane luminale e abluminale delle cellule endoteliali polarizzate della BEE verso il SNC. Le sostanze che attraversano la BEE dalla circolazione sanguigna entrano poi nel fluido interstiziale cerebrale.

La BEL è localizzata nel plesso coroideo, una struttura riccamente vascolarizzata e polarizzata all'interno dei quattro ventricoli cerebrali e composta da tre strati cellulari: 1) le cellule epiteliali apicali che confinano con il CSF; 2) il sottostante tessuto connettivo di supporto; 3) lo strato più interno di cellule endoteliali a contatto diretto con il sangue [248]. Le cellule endoteliali del plesso coroideo presentano delle fenestrature e quindi permettono alla holo-Tf circolante nei capillari cerebrali di attraversare rapidamente le cellule endoteliali e di raggiungere la membrana basolaterale dell'epitelio coroidale polarizzato, dove le giunzioni strette tra le cellule rendono necessario il passaggio del solo ferro. La BEL ostacola l'accesso di molecole, proteine, ioni e macromolecole idrosolubili dal sangue al CSF ma è nota la sua capacità di rimuovere sostanze dal CSF al sangue. Le funzioni principali della BEL consistono nella produzione attiva e nella secrezione nel cervello del CSF e di molecole critiche quali la transtiretina e la transferrina [208].

La rigida regolazione del traffico tra sangue e tessuti cerebrali da parte della BEE e della BEL limita lo scambio di ferro e delle proteine associate tra i due compartimenti, proteggendo così il cervello dalle fluttuazioni potenzialmente dannose dei livelli di ferro sistemico [249]. Inoltre, tali sistemi di barriere consentono al cervello, mediante meccanismi regolatori propri, di mantenere il controllo sulla propria omeostasi marziale indipendentemente dallo stato di ferro periferico [244].

### **5.6.1.2 *Trasporto del ferro attraverso la barriera emato-encefalica (BEE)***

In condizioni fisiologiche normali, il cervello regola l'omeostasi del ferro mediante tre sistemi ben coordinati: 1) l'internalizzazione di ferro, mediata o meno da TfR, attraverso le barriere del SNC; 2) l'immagazzinamento di ferro dipendente dalla disponibilità cellulare di ferritina; 3) l'esportazione di ferro la cui entità è correlata al flusso di CSF o al meccanismo di ritorno delle sostanze dal CSF al sangue [249]; [208].

Il ferro legato alla Tf è la specie principale internalizzata dal cervello. La holo-Tf, circolante nei capillari cerebrali, è internalizzata per endocitosi nell'endotelio dei

capillari cerebrali dal recettore della transferrina 1 (TfR1), espresso con elevata densità [209] sul lato luminale della BEE [250]. Nell'endotelio, la  $Fe_2Tf$  dissocia: apo-Tf è riciclata nella circolazione sanguigna mentre il ferro è trasportato, probabilmente da FPN, nel fluido interstiziale del compartimento cerebrale, attraverso la membrana abluminale delle cellule endoteliali. Tuttavia, studi differenti non sono concordi sull'effettiva presenza di tale trasportatore nell'endotelio dei capillari cerebrali [207]. In prossimità delle cellule endoteliali si proiettano i pedicelli astrocitari che esprimono la ceruloplasmina (Cp) legata alla membrana dal glicosil fosfatidil inositolo (GPI). Tale molecola con attività ferrossidasica ed antiossidante non è in grado di oltrepassare la BEE e necessita quindi della sintesi cerebrale [251]. La Cp potrebbe facilitare sia l'attività di esportazione del ferro da parte della FPN che il legame del  $Fe^{3+}$  ad apo-Tf, sintetizzata e secreta prevalentemente dagli oligodendrociti e dall'epitelio del plesso coroideo [252]. La holo-Tf neosintetizzata diffonde nel fluido del parenchima cerebrale verso i neuroni e le cellule gliali esprimenti TfRs. Apo-Tf e holo-Tf ritornano quindi nella circolazione sistemica mediante i villi aracnoidei e le vene cerebrali [250].

L'assorbimento di ferro non mediato da Tf potrebbe costituire un'altra via significativa per l'uptake cerebrale di tale metallo come si evince dalla rilevante presenza di ferro nel cervello di animali trattati con anticorpi anti-TfR, di topi transgenici ipotransferrinomici o di modelli murini di saturazione della Tf in seguito ad iniezione endovena di  $^{59}FeCl_3$  [208]. Fisiologicamente, meno dell'1% del ferro circola nel sangue non è legato a Tf. Di conseguenza, nella microcircolazione cerebrale locale, il ferro libero potrebbe derivare dalla dissociazione da Tf in seguito al legame della holo-Tf con TfR e potrebbe essere internalizzato nella BEE da DMT1 o altri trasportatori. E' anche possibile che il ferro non legato a Tf nel parenchima cerebrale locale origini dal rilascio cellulare di ferro. Sebbene Siddapa e collaboratori [253] abbiano dimostrato la presenza di DMT1 nelle cellule endoteliali dei capillari cerebrali, l'espressione di tale trasportatore nella BEE non è stata ancora pienamente confermata. Studi condotti su ratti con una mutazione in DMT1 hanno infatti dimostrato che DMT1 non svolge un ruolo essenziale nel trasporto di ferro attraverso la BEE [254]. Inoltre, Moos e collaboratori [255] non sono stati in grado di identificare tale trasportatore nelle cellule endoteliali cerebrali, che quindi potrebbero esprimere DMT1 solo a livelli molto bassi. Quale meccanismo, oltre a DMT1, sia eventualmente utilizzato dalla BEE per trasportare il ferro non legato a Tf rimane ancora una questione di dibattito [208].

Durante lo sviluppo, quando la BBB non è ancora completamente formata, avviene un rapido ingresso di ferro nel sistema nervoso probabilmente derivante dal NTBI. Studi

condotti su cervelli di ratto in via di sviluppo hanno evidenziato un rapido afflusso di ferro in linea con l'aumentata espressione di TfR1 nei BCECs. Tale meccanismo d'internalizzazione del ferro diventa il principale quando la BBB è completamente sigillata e da tale momento in poi la captazione del ferro subisce un rallentamento [206]. Tuttavia, l'assorbimento cerebrale di ferro non è regolato probabilmente solo dai BCECs ma, come molte altre vie metaboliche, è caratterizzato da vie ridondanti che interverrebbero nel caso in cui quella principale fosse interrotta [206].

### 5.6.1.3 **Trasporto del ferro attraverso la barriera emato-liquorale (BEL)**

Oltre alle cellule endoteliali della BEE, un'altra via di accesso del ferro all'interno SNC sono le cellule epiteliali del plesso corioideo [256], in cui sono presenti i trasportatori (TfR1, DMT1 e FPN1), le proteine di deposito (Ft) e le proteine di regolazione del ferro (IRPs e hepcidina) (**Tabella 5.2**).

	Fe Species bound	Presence in				Function
		BBB	BCB	CSF	Blood	
Transferrin (Tf)	Fe(III)			+	+	Fe carrier
Transferrin receptor (TfR)	Fe(II)	+	+	?	+	Cell surface Fe uptake
Ferritin (Ft)	Fe(II)	+	+	?	+	Fe storage
Iron regulatory proteins (IRPs)		+	+	?	+	Regulates the expression of Tf, TfR, DMT1, FPN
Divalent metal transporter (DMT1)	Fe(II)	?	+			Cell surface Fe uptake
Ferroportin (FPN, MTP1)	Fe(II)	+	+			Cellular Fe exporter
Hephaestin	Fe(II)	+	+			Oxidize Fe(II) to Fe(III)
Steap3	Fe(III)	+	?			Reduce Fe(III) to Fe (II)
Hepcidin		+	+			Regulate FPN expression

+: identified; ?: uncertain.

Zheng, W. and Monnot, A.D., *Pharmacology & Therapeutics*, 2012;13:177-188

**Tabella 5.2** Principali proteine coinvolte nella regolazione del ferro: presenza nella BEE (BBB), BEL (BCB), nel fluido cerebrospinale (CSF) e nel sangue e relative funzioni.

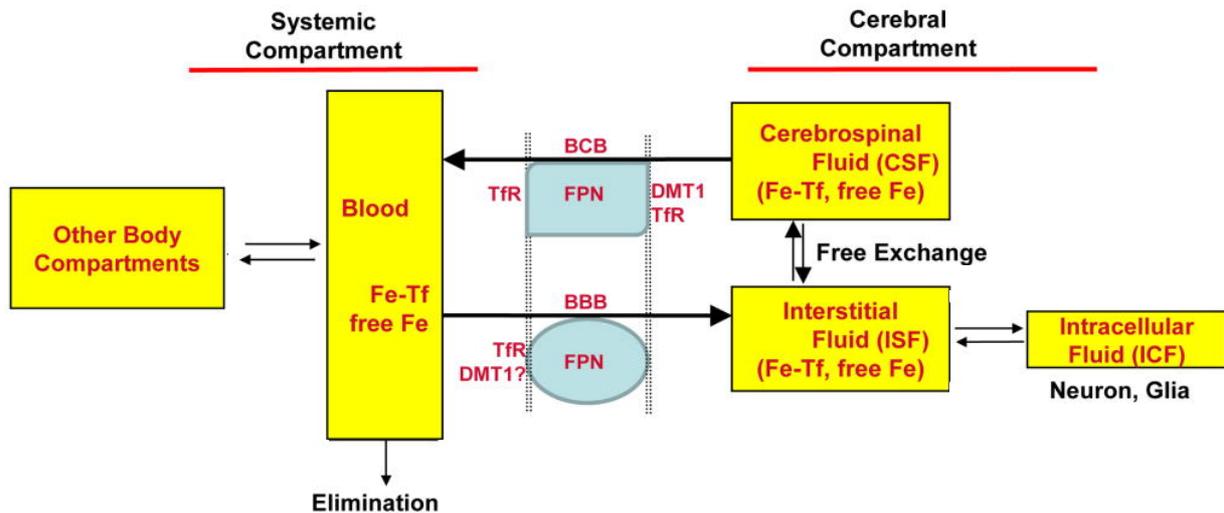
DMT1, FPN e TfR hanno una diversa localizzazione subcellulare nel tessuto del plesso corioideo [257], il che potrebbe indicare come i tre trasportatori ricoprano distinti ruoli

nel trasporto di ferro tra i compartimenti sangue e CSF. DMT1 è distribuito in modo polarizzato verso la membrana plasmatica apicale, mentre FPN è meno polarizzata e presenta un profilo di espressione più diffuso nel citoplasma. TfR è localizzato soprattutto attorno ai nuclei in forma di clusters, il che sembra suggerire un'immediata disponibilità di TfR sia sulla membrana apicale che su quella abluminale. È interessante notare che DMT1, FPN e TfR non esistono nel nucleo.

Una volta raggiunti i capillari del plesso coroideo, la  $Fe_2Tf$  e il ferro libero provenienti dalla circolazione sistemica attraversano liberamente l'endotelio fenestrato per entrare in contatto con la membrana abluminale dell'epitelio coroidale. A tale livello, la  $Fe_2Tf$  è assorbita mediante il processo classico di endocitosi mediata da TfR ed è trasportata nel CSF dalla FPN. A differenza di TfR, disponibile su entrambi i lati della membrana della superficie cellulare coroidale (sia verso il sangue che verso il CSF), DMT1 è localizzato prevalentemente sulla membrana apicale a contatto con il CSF e tale distribuzione polarizzata potrebbe suggerire una direzione preferenziale del flusso di ferro attraverso la BEL. Poiché il ferro libero è presente sulla superficie cellulare di entrambi i lati della membrana coroidale, DMT1 potrebbe veicolare selettivamente il ferro libero dal CSF al sangue. L'efflusso di ferro mediato da DMT1 nella BEL potrebbe quindi costituire un meccanismo di clearance tramite cui la concentrazione di ferro nel fluido extracellulare cerebrale è mantenuta relativamente stabile. A causa del gradiente di concentrazione del ferro tra il sangue ( $\approx 1.150$  mg/L) e il CSF (0.02 mg/L), l'efflusso di ferro mediato da DMT1 è un processo attivo che richiede energia [208].

La **Figura 5.3** riassume l'ipotetico meccanismo di trasporto marziale nel cervello. Gli ioni ferro presenti nella circolazione sistemica sono trasportati nel parenchima cerebrale soprattutto attraverso la BEE. La correlazione tra la maggiore densità di TfRs a livello dell'endotelio cerebrale nello striato e nell'ippocampo e la più elevata concentrazione marziale in tali regioni [258] avvalorava l'ipotesi che il trasporto di ferro mediato da TfR nelle cellule endoteliali della BEE sia il principale responsabile della regolazione dell'entità di ferro che entra nel parenchima cerebrale. Tuttavia, anche una piccola percentuale di ferro libero è veicolata al SNC mediante DMT1 o altre proteine carrier espresse sul lato luminale endoteliale della BEE. Una volta raggiunto il fluido interstiziale mediante la FPN, il ferro, libero o legato alla Tf cerebrale, è trasportato ai neuroni e alle cellule gliali oppure è rilasciato all'interno del CSF nei ventricoli cerebrali. La concentrazione di ferro è mantenuta in equilibrio tra il fluido interstiziale, il fluido intracellulare neuronale o gliale e il fluido cerebrospinale.

L'eccesso marziale nel CSF è catturato da DMT1 o da TfR nei microvilli apicali dell'epitelio coroidale e trasportato nuovamente nel sangue. Complessivamente, è probabile quindi che il ferro entri nel cervello attraverso la BEE ed esca dal SNC mediante la BEL [208].



Zheng, W. and Monnot, A.D., *Pharmacology & Therapeutics*, 2012;13:177-188

**Figura 5.3** Trasporto di ferro attraverso la BEE (BBB) e la BEL (BCB). La maggior parte delle molecole di ferro nella circolazione sistemica è legata a Tf. A livello della BEE, il complesso Fe-Tf è internalizzato nelle cellule endoteliali cerebrali tramite il TfR; una quota di ioni ferro liberi è invece assorbita mediante DMT1 o altri trasportatori non ancora identificati. FPN esporta il ferro nel fluido interstiziale dove è utilizzato dalle cellule cerebrali. Gli ioni ferro in eccesso nel fluido cerebrospinale sono captati da DMT1 localizzato sui microvilli dell'epitelio coroidale e riportato nel sangue.

### 5.6.2 *Espressione cerebrale dei geni associati al ferro*

Diversamente dal fegato, il cervello non costituisce un deposito di ferro per l'organismo ma immagazzina tale metallo solo per le proprie necessità. Approcci di genetica molecolare hanno confermato l'espressione cerebrale endogena dei geni associati al ferro e forniscono evidenze della probabile esistenza nel cervello di meccanismi intrinseci di regolazione dell'omeostasi cerebrale di ferro. Sebbene siano coinvolte molte proteine preposte anche alla regolazione dell'omeostasi marziale periferica, il cervello potrebbe aver sviluppato meccanismi addizionali di regolazione del ferro che coinvolgerebbero anche proteine non ancora caratterizzate [244].

Analisi mediante ibridazione *in situ*, Northern Blotting, RT-PCR e hanno fornito prove evidenti in merito all'espressione endogena cerebrale dei trascritti genici di Tf, TfR1, DMT1, Ft e FPN [244, 256, 259]. Sebbene la maggior parte delle cellule nell'organismo, incluso il cervello, esprima tali proteine, la quantità di ciascuna varia ampiamente in base al tipo cellulare e al suo stato di ferro. Nel cervello, analisi immunostochimiche hanno evidenziato una prevalente espressione di Tf negli oligodendrociti, di ferritina

nella microglia e di TfR1 nei neuroni. In generale, la maggior parte delle cellule del SNC acquisisce il ferro mediante TfR1 e DMT1, lo accumula nella ferritina e lo esporta tramite FPN1 [207]. Tuttavia, il metabolismo del ferro probabilmente differisce tra neuroni, astrociti, oligodendrociti e microglia poiché ciascuno di questi tipi cellulari possiede distinte caratteristiche metaboliche e architetturiche e regola l'omeostasi del ferro, distribuendo e accumulando tale metallo in base alle specifiche necessità e funzioni [207, 259]. Inoltre, le diverse componenti del SNC hanno acquisito una specializzazione nella sintesi preferenziale dei geni associati al ferro:

- i neuroni esprimono TfR1 [260], sebbene con una densità più bassa rispetto alle cellule endoteliali della BEE [218] e quindi assorbono il ferro soprattutto per endocitosi mediata da recettore. L'espressione di DMT1 [260] e del recettore della lattoferrina [209] suggerisce anche l'uptake di una piccola minoranza di NTBI. L'elevata presenza di DMT1 nei nuclei del ganglio basale, in particolare il nucleo caudato, putamen e la substantia nigra, giustificherebbe gli alti livelli di ferro in tali regioni [208].
- Gli astrociti sono privi o presentano livelli molto bassi di TfR1 [209, 261], internalizzano il ferro principalmente come NTBI [262] e sono i principali produttori di Cp [251] legata da GPI. La Cp solubile, presente nel CSF a basse concentrazioni (1,5 µg/mL, circa 100 volte meno della concentrazione sierica), potrebbe derivare dalla rottura del legame di GPI sugli astrociti.
- Gli oligodendrociti maturi, a differenza degli analoghi immaturi, non esprimono TfR1. Si è quindi ipotizzato che tali cellule acquisiscano il ferro dalla catena pesante della ferritina o mediante molecole LMW [263]. Nel citoplasma, il ferro è poi incorporato nella apo-Tf prodotta all'interno degli oligodendrociti dove è immediatamente utilizzato per la sintesi di mielina o immagazzinato nella ferritina [256]. La holo-Tf non è secreta dagli oligodendrociti [206] che costituiscono quindi un sistema chiuso di regolazione del ferro. L'efestina, una ferrossidasi espressa in tutto il SNC, è sintetizzata soprattutto dagli oligodendrociti [207].
- I neuroni [255] e gli astrociti esprimono FPN che è affiancata dalla proteina precursore amiloide (APP) e dalla ceruloplasmina (Cp) entrambi con attività ferrossidasica [206, 244].

La FPN è presente con maggiore densità nei tessuti a contatto con sangue e CSF ma è anche ampiamente espressa in tutto il SNC e all'interno delle vescicole presinaptiche permettendo al ferro di essere trasportato dal citoplasma fino allo spazio sinaptico e consentendo alle membrane pre- e post-sinaptiche di essere esposte agli ioni ferrosi

liberi. Il ruolo del ferro all'interno delle vescicole sinaptiche è ancora sconosciuto ma potrebbe essere coinvolto, almeno in parte, nei meccanismi di trafficking del ferro nel SNC [263].

Diversamente dal plasma, la capacità di legame del ferro nel CSF è minima a causa della ridotta concentrazione di Tf (0.21 – 0.28  $\mu\text{M}$ ) e Cp (5.8 – 6.8 nM) e degli elevati livelli di acido ascorbico (78  $\mu\text{M}$ ) (che mantiene il ferro nella sua forma ridotta) e di citrato (175  $\mu\text{M}$ ). In condizioni normali, le concentrazioni di ferro nel CSF eccedono la capacità di legame di Tf che è completamente saturata nel ratto e nell'uomo con un rapporto molare ferro:Tf di 2.07. Poiché l'affinità di legame di Tf per  $\text{Fe}^{3+}$  diminuisce all'aumentare dell'acidità, il pH del fluido extracellulare cerebrale (pH 7.3) favorisce la dissociazione del ferro dalla Tf, aumentando la percentuale di NTBI potenzialmente internalizzabile da neuroni e cellule gliali [209].

Nel cervello, un'elevata percentuale di ferro è conservata nelle cellule gliali e prevalentemente nella sostanza bianca, dove è legata alla ferritina nella sua forma solubile. Il CSF presenta livelli molto più bassi rispetto a quelli plasmatici di ferritine circolanti (6.67 pM), molecole prevalentemente non glicosilate che potrebbero essere rilasciate da cellule morte oppure sintetizzate e secrete nel cervello dove sono espressi anche i recettori della ferritina [209].

La **Tabella 5.3** compara le concentrazioni di ferro e delle sue proteine di legame nel siero e nel CSF.

	<b>CONCENTRAZIONE DEL FLUIDO CEREBROSPINALE</b>	<b>CONCENTRAZIONE SIERICA</b>
Ferro non eme	0,4-1,2 $\mu\text{M}$ o 0,3-0,75 $\mu\text{M}$	9-30 $\mu\text{M}$ o 54-89 $\mu\text{M}$
Ferro libero	0,01-0,1 $\mu\text{M}$	Negativo
Transferrina	0,21 $\mu\text{M}^*$ o 0,28 $\mu\text{M}^{**}$	25 $\mu\text{M}^{***}$
Ferritina	6,67 pM	0,3-0,7 nM
Citrato	175 $\mu\text{M}$	$\approx$ 90 $\mu\text{M}$
Ascorbato	$\approx$ 78 $\mu\text{M}$	$\approx$ 25 $\mu\text{M}$
Ceruloplasmina	5,8-6,8 nM	1,6-3,4 $\mu\text{M}$
Lattoferrina	0,075 nM	5 nM o 16 nM
Albumina	2,5 $\mu\text{M}$	0,7 mM

Gasch, J.A. et al., Neurochem Res, 2007;32:1196-1208

**Tabella 5.3** Concentrazione di ferro e delle sue molecole di legame nel fluido cerebrospinale e nel siero. Nota: ciascuna molecola di Tf può legare 2 ioni ferro e quindi le concentrazioni effettive dei siti di legame del ferro sono: \*0,42  $\mu\text{M}$ , \*\*0,56  $\mu\text{M}$ , \*\*\* 50  $\mu\text{M}$ .

## 5.7 REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI CELLULARE DEL FERRO NEL SNC

Numerosi tipi cellulari nell'organismo sono in grado di ridurre il loro contenuto marziale mediante divisione cellulare. Le cellule neuronali non possono però sfruttare tale processo poiché sono post mitotiche e devono affidarsi rigidamente a meccanismi di omeostasi marziale per prevenire il danno ossidativo indotto dall'eccesso di ferro [209].

Tutte le cellule del SNC esprimono sia IRP-1 che IRP-2, sebbene IRP-2 sia presente in maggior quantità [207]. Il sovraccarico sistemico di ferro regola l'espressione cerebrale delle proteine chiave per l'omeostasi marziale principalmente a livello post-trascrizionale come confermato dalla mancata o lieve variazione dell'espressione genica di TfR1, Ft H, IRP2 e Cp in cuccioli di ratto dopo supplementazione diretta [264] o indiretta (tramite la madre) di ferro [265, 266]. Il cervello, analogamente alla periferia, risponde al sovraccarico di ferro riducendo i livelli proteici di TfR1, con conseguente restrizione dell'assorbimento marziale, e aumentando quelli della Ft, da cui ne deriva l'incremento dei depositi di ferro [267]. Sono state anche osservate delle variazioni nei livelli proteici di Cp e nell'espressione genica e proteica dell'efestina ma l'entità e la direzione dei cambiamenti differiscono tra le varie regioni cerebrali [244]. Sebbene una variante di DMT1 contenga un IRE, tale trasportatore nel cervello non subisce una variazione nell'espressione genica e proteica in seguito a supplementazione di ferro dietetico, diversamente da quanto accade nell'intestino e nel fegato. È probabile che la regolazione di DMT1 richieda, oltre al sistema IRE/IRP, fattori cellula- o tessuto-specifici che non sono presenti nel SNC [268]. L'eccesso di ferro comporta inoltre un aumento dell'espressione di FPN negli astrociti e nei neuroni [209], con conseguente incremento dell'efflusso di ferro da tali cellule.

L'ipotetico ruolo dell'epcidina nella regolazione dei depositi cerebrali di ferro non è stato ancora chiarito. Studi di espressione genica (real-time RT-PCR, ibridazione *in situ*) hanno rivelato un'ampia distribuzione dei trascritti dell'epcidina nel cervello umano e murino, sebbene tali livelli siano più bassi rispetto a quelli epatici [269, 270]. E' ancora questione di dibattito se la BEE e la BEL limitino l'accesso dell'epcidina periferica ma numerose evidenze suggeriscono che il cervello potrebbe possedere meccanismi omeostatici intrinseci per l'up-regolazione dell'epcidina endogena in risposta ad agenti stressogeni [244]. L'aumentata espressione di epcidina potrebbe ridurre i livelli di FPN nei neuroni e negli astrociti, con conseguente diminuzione sia del rilascio di ferro dai neuroni che dell'uptake cerebrale di tale metallo. Tale

meccanismo contribuirebbe a proteggere il cervello dall'aumento dei livelli extracellulari di ferro in presenza di stimoli infiammatori e agenti stressogeni [244]. Studi di espressione genica e proteica hanno sollevato dei dubbi in merito all'esistenza nel cervello di meccanismi regolatori della trascrizione dell'epcidina. La proteina emojuelina è stata identificata, seppur a concentrazioni molto basse, nel cervello di topo mentre l'analisi RT-PCR ha escluso la presenza del trascritto per tale proteina nel cervello murino e umano [270]. Il trascritto per il TfR2 è stato invece osservato solo nel cervelletto [270]. L'espressione genica e proteica di HFE è confinata negli astrociti e nelle cellule endoteliali capillari di cervelletto, corteccia e talamo, nel plesso coroidale e nelle cellule ependimali, dove HFE co-localizza con TfR1 [244]. Tale profilo d'espressione ha suggerito l'ipotetico contributo di HFE nella regolazione fisiologica dell'uptake cerebrale di ferro, sebbene studi condotti su un modello murino knockout per *Hfe* [271] o in topi deficienti per la  $\beta$ 2-microglobulina, che indirizza HFE sulla superficie cellulare [272], abbiano evidenziato l'esistenza di meccanismi compensatori in assenza di HFE. Dalla letteratura non emergono studi in merito all'eventuale capacità di un processo infiammatorio di aumentare l'espressione di HFE e TfR2 nel cervello con conseguente incremento dei livelli di epcidina cerebrale endogena [244]. La **Tabella 5.4** elenca le funzioni fisiologiche delle proteine responsabili del trasporto e del deposito di ferro e le modificazioni dei loro livelli indotte dal sovraccarico marziale.

Iron-binding proteins/molecules	Function	Iron overload
Transferrin (Fe <sup>3+</sup> )	Iron chelation and transport	↓ synthesis/↓TfR synthesis
Ferritin (Fe <sup>3+</sup> )	Ferroxidase, iron storage, possible role in transport	↑ synthesis
Citrate (Fe <sup>3+</sup> )	Iron chelation	-
Ascorbate (Fe <sup>2+</sup> )	Iron chelation	-
Ferroportin (Fe <sup>2+</sup> )	Iron efflux	↑ expression
Ceruloplasmin	Ferroxidase; iron import and export	-
Lactoferrin (Fe <sup>3+</sup> )	Iron chelation and transport      iron scavenger and antioxidant	-
DMT-1 (Fe <sup>2+</sup> )	Iron import	-

\* Valence of bound iron indicated in parentheses

Gaasch, J.A. et al., *Neurochem Res*, 2007;32:1196-1208

**Tabella 5.4** Funzione delle molecole di legame del ferro e variazione nella loro concentrazione in risposta al sovraccarico marziale.

## **6. TOSSICITÀ DEL SOVRACCARICO DI FERRO A LIVELLO CENTRALE**

### **6.1 ACCUMULO FISIOLÓGICO DEL FERRO NEL CERVELLO**

Nell'uomo, il contenuto cerebrale di ferro è basso in tutte le regioni cerebrali alla nascita e aumenta progressivamente con l'età. L'invecchiamento comporta un accumulo progressivo di ferro nel cervello [273] e principalmente in aree associate ad attività motoria, quali il nucleo rosso, il nucleo dentato, la substantia nigra e il globus pallidus [207, 216]. Nel corpo striato, il ferro è accumulato negli oligodendrociti, negli astrociti, e nella microglia. Le concentrazioni di ferro presenti nei gangli della base, paragonabili a quelle epatiche, sono le più elevate di tutto l'organismo [249]. Tali regioni cerebrali si arricchiscono anche in Ft [274] che, nell'uomo, tende ad accumularsi dalla terza decade di vita e a co-localizzare con il ferro [273]. I fattori che favoriscono l'accumulo regionale di ferro e la funzione di tale deposito non sono ancora noti. E' possibile che alcuni tipi di neuroni e/o oligodendrociti specializzati, di astrociti o di microglia siano programmati per sintetizzare quote elevate di Ft e per creare quindi un deposito di ferro sequestrato da Ft nel SNC. L'accumulo marziale dipendente dall'età non è unicamente associato a patologie neurodegenerative e quindi tali cellule ricche in ferro legato a Ft non sono dannose per l'organismo [207].

La degenerazione di un'area cerebrale ricca in ferro comporta una variazione della composizione cellulare e del contenuto marziale di quella regione. Quando tali cellule ricche in ferro muoiono, la microglia e/o i macrofagi provenienti dalla circolazione periferica fagocitano i detriti cellulari aumentando quindi il loro contenuto in ferro. Inoltre, la microglia attivata esprime elevate quantità di ferritina [207].

L'accumulo di quantità eccessive di ferro in tessuti, cellule e organelli è associato a disordini patologici. Oltre alle classiche sindromi da sovraccarico di ferro primario o genetico (emocromatosi) e secondario (quali le talassemie), esistono molte altri disordini associati a livelli elevati di ferro. Numerose patologie neurodegenerative, quali il morbo di Alzheimer, di Parkinson, di Huntington, l'encefalopatia da HIV, le malattie dei gangli della base, la sindrome di Hallervorden Spatz e l'atassia di Friedrich sono caratterizzate da alterazioni dell'omeostasi centrale di ferro [224]. L'accumulo cerebrale di ferro in tali patologie è stato evidenziato da colorazioni istochimiche per il ferro, da tecniche spettroscopiche e tomografiche e dall'imaging a risonanza magnetica (MRI), mentre analisi biochimiche hanno dimostrato il contributo

del ferro nella patogenesi di tali malattie [244]. Studi di genetica molecolare condotti su modelli di patologie neurodegenerative hanno identificato dei cambiamenti nell'espressione di geni associati al ferro [244]. Tuttavia, nessuna delle tecniche suddette ha chiarito se le alterazioni dell'omeostasi marziale, riscontrabili nelle patologie neurodegenerative, siano la causa primaria della degenerazione neuronale e quindi abbiano un ruolo primario nella patogenesi di tali malattie o se insorgano come risposta secondaria alla morte neuronale o ad altri processi tipici della patologia degenerativa [207].

L'accumulo di ferro nel cervello potrebbe essere migliorato dal trattamento con agenti chelanti che ridurrebbero le ossidazioni catalizzate dal ferro di DNA, proteine e lipidi [273]. Tuttavia, le terapie più comunemente utilizzate per il trattamento di disordini sistemici associati a livelli eccessivi di ferro (flebotomia, agenti chelanti, modificazione della dieta) non sono ugualmente efficaci nella correzione delle alterazioni centrali [244].

## **6.2 MECCANISMI DI TOSSICITÀ DA SOVRACCARICO DI FERRO A LIVELLO CENTRALE**

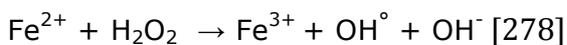
Il mantenimento dei livelli marziali in un intervallo innocuo per l'organismo è necessario per ovviare all'insorgenza di neurotossicità che può manifestarsi come danno ossidativo ma anche come morte cellulare e tumorigenesi [210, 275]. Nonostante il cervello possieda rigidi meccanismi intrinseci per la regolazione dei livelli di ferro libero, tale metallo si accumula progressivamente nel SNC dei mammiferi in seguito ad invecchiamento o in presenza di un sovraccarico marziale corporeo e una quota presente nel parenchima cerebrale e nel CSF rimane attivo nelle reazioni redox. In particolare, in condizioni patologiche di sovraccarico marziale, il LIP diventa troppo esteso da poter essere sequestrato nella Ft e i sistemi di controllo dell'omeostasi marziale cerebrale sono sopraffatti [209]. L'eccesso di ferro può indurre danno neuronale poiché il  $Fe^{2+}$ , rilasciato da Ft e Tf ai valori di pH acido del fluido extracellulare [214], unitamente al ferro del LIP, è disponibile all'interazione con molecole quali i radicali superossido [276] e l'ascorbato [277]. Il danno cellulare indotto dal ferro è quindi dipendente dall'incorporazione di tale metallo nella Ft [209]. Molte caratteristiche biochimiche e fisiologiche rendono il cervello dei mammiferi particolarmente vulnerabile ai danni indotti dal ferro e dalle sue reazioni redox. Tra le principali rientrano:

- il consumo di elevati livelli di ossigeno;
- l'eccessiva generazione di ROS (reactive oxygen species) da parte dei mitocondri poco efficienti dei neuroni post-mitotici invecchiati;
- la suscettibilità del SNC alla perossidazione lipidica a causa dell'elevato contenuto cerebrale di colesterolo e di acidi grassi polinsaturi facilmente ossidabili;
- l'abbondanza di neurotrasmettitori ossidabili (ad es. dopamina) e potenzialmente tossici (glutammato);
- la scarsa quantità di enzimi e composti antiossidanti [217]

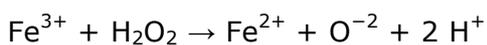
L'entità della tossicità marziale è determinata dalla localizzazione cellulare di tale metallo (citoplasmatica o lisosomiale), dalla sua forma biochimica (ferritina o emosiderina) e dall'abilità della cellula di prevenire la generazione e la propagazione dei ROS mediante l'attivazione di meccanismi di difesa [224]. Diversamente dal fegato, i danni causati dall'eccesso di ferro a livello cerebrale hanno una bassa probabilità di reversibilità poiché il cervello ha una capacità limitata di riparo e rigenerazione cellulare [244].

### **6.2.1 Ferro e stress ossidativo**

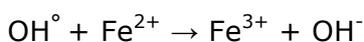
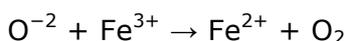
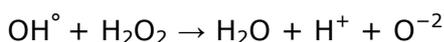
L'efficienza della reazione redox tra  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  è fondamentale per le numerose reazioni biochimiche che coinvolgono il ferro. Tuttavia, tale abilità di scambio elettronico rappresenta un potenziale rischio biologico all'interno della cellula, perché in condizioni di aerobiosi il ferro può catalizzare la genesi di radicali nocivi, attraverso la reazione di Fenton [209]. Nel dettaglio, una quantità catalitica di  $\text{Fe}^{2+}$  (un pro-ossidante 5 volte più potente del  $\text{Fe}^{3+}$ ) è sufficiente a reagisce con intermedi reattivi dell'ossigeno, inclusi il perossido d'idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e l'anione superossido ( $\text{O}_2^-$ ) per generare specie radicaliche libere molto reattive quali il radicale idrossilico ( $\text{OH}^\circ$ ):



Tracce di  $\text{Fe}^{3+}$  possono reagire con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , anche se questa reazione procede lentamente a pH fisiologico:



Sono possibili anche le seguenti reazioni:



La riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$  da parte dell'ascorbato o altri agenti riducenti cellulari rigenera lo ione  $\text{Fe}^{2+}$ , ovvero la forma di ferro attiva nella reazione di Fenton ( $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ ) che entra nuovamente nel ciclo di ossidazione-riduzione, chiamato ciclo redox.

La quantità di  $\text{OH}^\circ$  prodotta è direttamente proporzionale all'entità di ferro reattivo [278]. I ROS sono prodotti inevitabili della respirazione aerobica, possono essere generati durante reazioni enzimatiche nei perossisomi, nel reticolo endoplasmico e nel citoplasma, o dal complesso, legato alla membrana, della NADPH ossidasi, espresso primariamente nei fagociti neutrofili e nei macrofagi ed importante per la difesa antimicrobica dell'organismo. In un SNC in cui c'è un eccessivo accumulo di ferro, i ROS derivanti dal ferro potrebbero facilitare: (I) la bio-attivazione di pro-tossine, come la conversione di MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina) a MPP+ che provoca la morte dei neuroni dopaminergici mediante l'inibizione della respirazione mitocondriale [279]; (II) l'attivazione di un signaling cellulare aberrante; (III) scompensi bio-energetici; (IV) disfunzioni dei proteosomi; (V) aggregazione proteica e formazione di inclusioni; (VI) alterazioni elettrofisiologiche; (VII) sinaptolisi, apoptosi e necrosi [217]. Il danno tissutale da eccessiva produzione di ROS deriva dalla capacità di tali specie di reagire con un'ampia gamma di costituenti cellulari: i residui aminoacidici, promuovendone l'ossidazione; il DNA, provocando la rottura dei filamenti o favorendo la modificazione delle basi puriniche e pirimidiniche; i lipidi di membrana, innescando una reazione a catena di radicali liberi conosciuta come perossidazione lipidica che promuove danno e stress ossidativo severo. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'esposizione dei neuroni al ferro induce un aumento dose-dipendente della perossidazione lipidica con conseguente morte cellulare per apoptosi e tale effetto è risultato attenuato dall'utilizzo dell'agente chelante deferoxamina [209]. Nel cervello [280], i principali bersagli del danno ossidativo da sovraccarico di ferro sono i complessi respiratori della membrana mitocondriale interna. La morte degli astrociti indotta dai perossidi coinvolge la generazione dei radicali di  $\text{O}_2^-$  all'interno dei mitocondri con conseguente perdita del potenziale di membrana mitocondriale e deplezione di ATP [209, 281].

Livelli fisiologici di ROS sono indispensabili per meccanismi cellulari quali il controllo d'infezioni o la coordinazione di processi infiammatori [282]. Sebbene le cellule siano adeguatamente fornite di un'ampia gamma di enzimi citoprotettivi e antiossidanti, condizioni patologiche quali la flogosi cronica, il danno da ischemia-riperfusion e la neurodegenerazione sovrappongono tali meccanismi cellulari endogeni con conseguente generazione incontrollata di radicali liberi [224]. Un eccesso di ferro aggrava lo stato di stress ossidativo e conseguentemente accelera la degenerazione tissutale. Gli antiossidanti quali la superossido dismutasi, che accelera le reazioni neutralizzanti  $\text{O}_2^-$ , la catalasi e la glutatone perossidasi, che decompongono direttamente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cooperano per contrastare il danno da radicali liberi. Per contrastare gli effetti deleteri

dei ROS, le cellule eucariote attivano inoltre dei meccanismi di risposta, quali la modulazione dell'espressione genica tramite stimolazione del fattore trascrizionale NFκB. In cellule non soggette a danno ossidativo, i dimeri di NFκB (p50/p65 o p50/c-rel) sono sequestrati nel citoplasma da una famiglia di inibitori proteici chiamati IκB. L'aumento cellulare dei ROS induce la rimozione per fosforilazione di IκB, con conseguente traslocazione nel nucleo di NFκB che si lega a sequenze consenso di DNA. Ne deriva la trascrizione di numerosi geni importanti dal punto di vista immunologico, di citochine e dei loro recettori, di fattori di crescita e di molecole di adesione cellulare [224].

L'eme ossigenasi 1 (HO-1) è un enzima inducibile che catalizza lo stadio cineticamente limitante della degradazione dell'eme a biliverdina, monossido di carbonio e ferro. HO-1 è attivato in modo ubiquitario nelle risposte cellulari di protezione contro lo stress ossidativo e la sua espressione è stata descritta in microglia, astrociti e neuroni in diverse alterazioni patologiche cerebrali quali la scrapie, il morbo di Parkinson e di Alzheimer [224].

### **6.2.2 Ferro e specie reattive dell'azoto**

L'ossido nitrico (NO), prodotto dalla sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), è un potente agente antimicrobico endogeno e la sua reazione con  $O_2^-$  porta alla formazione dell'anione perossinitrito ( $ONOO^-$ ), una specie estremamente tossica per la cellula. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la trascrizione di iNOS è controllata dal ferro libero intracellulare: quote elevate di ferro riducono l'espressione di tale enzima, mentre la deplezione di tale metallo mediante chelanti del ferro (Deferoxamina) o livelli marziali ridotti sortiscono l'effetto opposto [283]. Tale effetto è probabilmente attribuibile alla presenza di un sito sensibile al ferro a monte del gene iNOS, definito NF-IL6 [284].

## **6.3 SUSCETTIBILITÀ DELLE CELLULE CEREBRALI ALLO STRESS OSSIDATIVO**

Le cellule cerebrali, neuroni, astrociti e microglia, sono più suscettibili allo stress ossidativo catalizzato dall'eccesso di ferro poiché possiedono meccanismi antiossidanti relativamente bassi [285], soprattutto per quanto concerne l'attività di catalasi [209] e i livelli di glutazione e di glutazione perossidasi.

L'incremento dei depositi cerebrali di ferro con l'invecchiamento [286] avviene principalmente in regioni spesso associate a disordini neurodegenerativi [224] e potrebbe quindi contribuire alla patogenesi di tali disturbi.

Anche gli astrociti, che forniscono protezione e supporto trofico ai neuroni, sono suscettibili allo stress ossidativo indotto dai perossidi aumentati dal sovraccarico di ferro con conseguente riduzione della loro funzionalità. L'induzione di NO limita gli effetti negativi del ferro negli astrociti suggerendo l'esistenza di un'interazione tra ferro e NO [287].

#### **6.4 ALTRI MECCANISMI DI TOSSICITÀ DEL SOVRACCARICO DI FERRO NEL SNC**

Dixon e collaboratori [288] hanno coniato il termine "ferroptosi" per indicare una via di morte cellulare correlata a RAS e dipendente dai livelli intracellulari di ferro. Tale via non presenta gli elementi tipici dei processi apoptotici (attivazione di caspasi e rilascio del citocromo c mitocondriale), non è innescata dopo chelazione del ferro o inibizione del suo assorbimento, non è indotta dalla reazione di Fenton ma è correlata alle attività enzimatiche ferro dipendenti. In effetti, l'accumulo inappropriato di ferro potrebbe danneggiare una serie di proteine quali la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi, il trasportatore del glutammato, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e il recettore NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) e ossidare lipidi tra cui il colesterolo, le ceramidi e la sfingomieline con conseguente disfunzione sinaptica e morte neuronale [206].

Nelle malattie neurodegenerative, il ferro interagisce con le proteine correlate alle varie patologie, quali la  $\beta$ -amiloide, la tau, il prione e la  $\alpha$ -sinucleina, accelerando, *in vitro*, la loro aggregazione e aggravando, *in vivo*, l'induzione di stress ossidativo e l'attivazione delle vie di morte cellulare da parte di tale proteine. Recentemente è anche emerso il ruolo delle proteine associate alle malattie neurodegenerative nella regolazione del metabolismo marziale: il trascritto di APP (amyloid- $\beta$  precursor protein) presenta un IRE nel suo 5'-UTR e facilita l'esportazione di ferro *in vitro* e *in vivo*; la proteina tau media il trafficking di APP e la sua riduzione blocca l'efflusso marziale con conseguente accumulo intracellulare di ferro; l'mRNA della  $\alpha$ -sinucleina mostra un IRE all'estremità 5' non tradotta e, analogamente al prione, agisce come una ferreduttasi per modulare l'uptake cellulare di ferro; la mancanza della proteina huntingtina provocherebbe una riduzione dei livelli di ferro e di produzione di emoglobina [206].

## **6.5 SINDROMI DA SOVRACCARICO DI FERRO**

Qualsiasi condizione che determina un aumentato ingresso di ferro nell'organismo conduce inevitabilmente allo sviluppo di un sovraccarico di ferro. Con il termine "sindrome da sovraccarico di ferro" oggi s'intende una condizione derivante da un aumento del contenuto di ferro totale nell'organismo indipendentemente dalla presenza di danno tissutale. Il sovraccarico di ferro può essere suddiviso secondo diversi criteri: la causa del sovraccarico, la via di accesso del ferro all'interno dell'organismo e la sede principale di accumulo del ferro [289].

Da un punto di vista generale il sovraccarico di ferro può essere classificato come primitivo o secondario. In alcuni casi, la causa specifica responsabile del sovraccarico di ferro è ben definita, mentre in altri, il meccanismo che conduce al suo sviluppo è ancora incerto e queste forme di sovraccarico di ferro restano ignote nella loro origine. Infine, il sovraccarico di ferro può anche essere il risultato di una combinazione di fattori geneticamente determinati ed acquisiti.

### **6.5.1 Sovraccarico di ferro primitivo**

Il sovraccarico di ferro primitivo è causato da mutazioni in geni primariamente preposti alla regolazione del metabolismo marziale e del suo equilibrio (**Tabella 6.1**). E' caratterizzato da ridotti livelli di epcidina con conseguente aumento dell'assorbimento intestinale del ferro assunto tramite la dieta e quindi dei depositi corporei di tale metallo.

L'esempio meglio conosciuto di sovraccarico di ferro primitivo è l'emocromatosi ereditaria, in cui il ferro è assorbito in quantità eccessiva per un difetto nel controllo del passaggio del ferro dalla cellula intestinale al sangue.

Secondo l'OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) sono state identificate 5 forme di emocromatosi: emocromatosi classica (HH: HFE-related hemochromatosis), o di tipo 1; emocromatosi giovanile (JH: Juvenile Hemochromatosis) o di tipo 2, della quale esistono due forme; emocromatosi di tipo 3 e di tipo 4 [290].

### **6.5.2 Sovraccarico di ferro secondario**

Il termine sovraccarico di ferro secondario definisce un gruppo eterogeneo di condizioni croniche, genetiche o acquisite, in cui l'eccesso marziale non è dovuto a un difetto primario nel sistema di regolazione del metabolismo del ferro ma è secondario ad altre patologie, prevalentemente l'anemia [291] (**Tabella 6.2**). L'accumulo tissutale di ferro potrebbe essere dovuto o associato a difetti nella produzione di globuli rossi (anemie diseritropoietiche), ad epatopatie croniche di varia eziologia, alla

somministrazione eccessiva di ferro per via parenterale (trasfusioni, iniezioni di preparati contenenti ferro per via venosa o intramuscolare) oppure all'aumentata assunzione di ferro per via orale (dieta, composti contenenti ferro, aumentato assorbimento di ferro per eritropoiesi inefficace o patologia epatica) [291]. Come già menzionato, in alcune di queste condizioni è possibile che vi siano interazioni e sinergismi con le cause primitive di accumulo di ferro.

<b>HFE RELATED HEMOCHROMATOSIS (TYPE1):</b>	C282Y/C282Y
	C282Y/H63D
	Other HFE related Hemochromatosis
<b>NON HFE RELATED HEMOCHROMATOSIS</b>	
<b>JUVENILE HEMOCHROMATOSIS (TYPE2):</b>	Type2A-Hemojuvelin mutations
	Type2B-Hepcidin mutations
<b>TRANSFERRIN RECEPTOR 2 HEMOCHROMATOSIS (TYPE3)</b>	
<b>FERROPORTIN DISEASES (TYPE4):</b>	Classical
	Nonclassical

Siddique, A. and Kowdley, K.V., *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2012; 35: 876-893.

**Tabella 6.1** Sindromi da sovraccarico di ferro primitive

<b>IRON-LOADING ANEMIA:</b>	Thalassemic syndrome (β-Thalassaemia)
	Sideroblastic Anemia
	Chronic Hemolytic Anemia
	Aplastic Anemia
	Pyruvate Kinase Deficiency
<b>CHRONIC LIVER DISEASES</b>	Hepatitis C Infection
	NAFLD
	Alcoholic liver disease
	Porphyria Cutanea Tarda
<b>IATROGENIC</b>	Red Blood Cell Transfusion
	Long-term hemodialysis
<b>MISCELLANEOUS</b>	Aceruloplasminemia
	African iron overload
	Neonatal iron overload

Siddique, A. and Kowdley, K.V., *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2012; 35: 876-893.

**Tabella 6.2** Sindromi da sovraccarico di ferro secondarie

## 6.6 PATOLOGIA DEL SISTEMA GnRH-SECERNENTE: IPOGONADISMO

L'integrità dell'asse HPG è fondamentale per garantire la normale differenziazione sessuale durante la vita fetale, l'insorgenza della pubertà e il mantenimento della capacità riproduttiva nell'adulto.

Con il termine ipogonadismo s'intende una condizione caratterizzata da un'alterata funzione gonadica che influenza negativamente la gametogenesi e/o la steroidogenesi [4]. La disfunzione che porta all'ipogonadismo può localizzarsi a vari livelli nell'asse HPG:

- se interessa le gonadi, si classifica come *ipogonadismo primario o ipergonadotropo*, caratterizzato da una ridotta produzione di testosterone che comporta un aumento nei livelli sierici delle gonadotropine LH e FSH [292];
- se coinvolge primariamente l'ipotalamo o l'ipofisi, si parla di *ipogonadismo secondario o ipogonadotropo* (HH), in cui il deficit comporta, rispettivamente, un'assente o inappropriata secrezione di GnRH, con conseguente diminuito rilascio

di LH ed FSH dall'ipofisi, o direttamente una mancata o inadeguata biosintesi delle gonadotropine ipofisarie [292, 293].

*L'ipogonadismo ipergonadotropo* è la forma d'ipogonadismo più frequente nell'uomo adulto [294] e può essere una patologia congenita, come nella sindrome di Klinefelter o acquisita in seguito ad invecchiamento o all'esposizione ad agenti gonadotossici (chemioterapia e radioterapia) [295].

Anche *l'ipogonadismo ipogonadotropo* può essere di tipo congenito o acquisito. L'HH congenito può essere a sua volta suddiviso in due categorie in base alla presenza di un senso intatto dell'olfatto: HH anosmico (Sindrome di Kallmann) e HH isolato normosmico congenito (o HH idiopatico (IHH)) [4, 296]. Tra le cause più comuni di HH acquisito rientrano: a livello ipotalamico, lesioni organiche (come un tumore) oppure modificazioni funzionali non associate ad un danno visibile, come nell'iperprolattinemia, e, soprattutto nelle donne, perdita di peso, esercizio fisico estenuante e/o stress di origine psichica [297]; nell'ipofisi, lesioni invasive (adenomi) infiltrative o infettive, radiazioni, malformazioni anatomo-congenite o una resistenza all'azione del GnRH legata a una mutazione del gene per il suo recettore [298]; più in generale, farmaci (quali steroidi sessuali, analoghi del GnRH), trauma encefalico, radiazioni al cervello, abuso d'alcool, assunzione illecita di droghe e patologie sistemiche quali emocromatosi, sarcoidosi e istiocitosi X [292, 299]. La **Tabella 6.3** riassume le principali cause di HH [292]. Tali patologie, congenite o acquisite, in base all'età d'insorgenza, possono configurare un quadro di mancato, ritardato, interrotto sviluppo puberale o una perdita dell'attività gonadica nell'adulto.

<b>EZIOLOGIE DI IPOGONADISMO IPOGONADOTROPO</b>
<b>CONGENITO</b>
Sindrome di Kallmann
Ipogonadismo Ipogonadotropo idiopatico
Altre mutazioni genetiche
Sindrome di Prader Willi
<b>ACQUISITO</b>
Iperprolattinemia
Lesioni ipofisarie (tumore, granuloma, ascesso)
Sindrome di Cushing
Abuso di droghe (oppiacei) e alcool
Uso di steroidi anabolizzanti
Malattie gravi o croniche
Irradiazioni all'ipofisi, traumi, interventi chirurgici
<b>SOVRACCARICO DI FERRO</b>

La sindrome di Kallmann è la forma di HH congenito più comune. Tale malattia genetica è caratterizzata da anosmia e da un deficit prepuberale di GnRH che comporta la mancata produzione ipotalamica di GnRH e quindi di gonadotropine da parte dell'adenipofisi [300, 301]. Nel dettaglio, tale patologia deriva da un difetto embrionale di base che consiste nella mancata migrazione dei neuroni GnRH dal placode olfattivo all'ipotalamo e al lobo olfattorio. Esistono tre differenti forme di sindrome di Kallmann: quelle ereditate come forme legate al cromosoma X, le autosomiche dominanti e quelle recessive. La forma legata al cromosoma X causa il 10-15% delle sindromi di Kallmann mentre la maggior parte dei casi sono caratterizzati da ereditarietà di tipo autosomico, indicando un'eterogeneità genetica della patologia. Il gene KAL-1 è responsabile della forma di sindrome di Kallmann

ereditaria, recessiva e legata al cromosoma X. KAL-1 codifica per anosmina-1, una proteina di adesione extracellulare di 840 aa con un ruolo centrale nell'adesione e nella migrazione assonale dei neuroni GnRH e dei nervi olfattori verso l'ipotalamo. La maggior parte delle mutazioni nel gene KAL-1 consiste in inserzioni o delezioni di nucleotidi che risultano in mutazioni "frameshift" o in un codone prematuro di terminazione. Ne deriva un'alterata migrazione dei neuroni GnRH-secernenti che, a causa della mancata penetrazione nel telencefalo, si trovano addensati tra la lamina cribrosa dell'etmoide e le meningi [302-304]. In tali pazienti si evidenzia, inoltre, un'agenesia del bulbo olfattorio dovuta a un ridotto sviluppo degli assoni dei neuroni olfattori utilizzati dai neuroni GnRH come via migratoria. Anche i geni FGR1, GNRHR, NELF, GPRS54, PROK-2, PROKR-2, CHD-7 e FGF-8 sono stati associati alla sindrome di Kallmann: mutazioni a carico di uno o più di questi geni può alterare la sintesi di GnRH [305].

Altre malattie genetiche quali la sindrome di Prader-Willi, la sindrome di Laurence-Moon-Biedl e la sindrome di Moebius sono caratterizzate da HH [299].

Nei pazienti con IHH si registrano bassi livelli di gonadotropine e di steroidi sessuali in mancanza di anomalie anatomiche o funzionali dell'asse HPG o di mutazioni nel gene del GnRH [4, 306]. Il meccanismo patogenetico dell'IHH coinvolge l'incapacità dei neuroni GnRH localizzati nell'ipotalamo di differenziarsi e di svilupparsi, comportando una secrezione di GnRH nulla o apulsatile [4].

Il trattamento ideale di pazienti con deficit di GnRH consiste nella terapia sostitutiva mediante somministrazione pulsatile dell'ormone attraverso una pompa.

Nel 2003, due gruppi di lavoro indipendenti hanno documentato l'associazione tra il sistema Kiss-1/GPR54 e la funzione riproduttiva, sulla base di evidenze da studi clinici [120, 121]. Pazienti con mutazioni inattivanti nel gene GPR54, codificante per il recettore dei peptidi del gene Kiss-1, hanno manifestato una condizione di HH con mancata insorgenza di pubertà e infertilità e lo stesso fenotipo è stato riprodotto in topi privi di geni funzionanti per GPR54 e Kiss-1 [307-310]. Studi molecolari e farmacologici hanno contribuito a caratterizzare il ruolo fisiologico dei peptidi di Kiss-1 e di GPR54 nel controllo della riproduzione [311, 312]. Le principali caratteristiche "riproduttive" del sistema Kiss-1/GPR54, emerse da tali studi, possono essere riassunte come segue: (i) i peptidi di Kiss-1 sono stimolatori estremamente potenti dell'asse HPG; (ii) il sistema Kiss-1 è fondamentale per l'insorgenza della pubertà; (iii) i peptidi di Kiss-1 esplicano la propria azione stimolatrice sull'asse riproduttivo interagendo direttamente con i GPR54 espressi dai neuroni GnRH nell'ipotalamo; (iv) i neuroni Kiss-1 mediano sia gli effetti di feedback positivo e negativo degli steroidi

sessuali, che controllano l'espressione genica ipotalamica di Kiss-1, sia i segnali ambientali e metabolici [3, 313]. Esistono almeno tre possibili spiegazioni della correlazione tra mutazioni di GPR54 e il mancato sviluppo sessuale: l'alterazione della migrazione dei neuroni GnRH, la riduzione della funzione ipofisaria e di quella ipotalamica. Le osservazioni che topi knockout per GPR54 presentano un corretto posizionamento dei neuroni GnRH nell'ipotalamo e che mutazioni con perdita della funzione del recettore non modificano la responsività dell'ipofisi al GnRH suggeriscono che il problema risieda principalmente a livello ipotalamico [120]. Questa ipotesi è al momento quella maggiormente avvalorata ed è anche sostanziata dalla presenza di neuroni Kiss-1 a livello ipotalamico [314], dall'espressione di GPR54 a livello dei neuroni GnRH [315, 316], dalla stretta comunicazione tra le due popolazioni neuronali e dalla funzionalità del sistema Kiss-1/GPR54 nel modulare la secrezione di GnRH [316].

Al momento sembra che la frequenza di mutazioni del GPR54 come causa di HH non sia elevata, tuttavia il chiarimento del ruolo del sistema Kiss-1/GPR54 come regolatore della fisiologia della funzione riproduttiva e della pubertà potrebbe portare all'identificazione di altri geni coinvolti nel controllo della funzione riproduttiva.

### **6.6.1 *Ipogonadismo ipogonadotropo associato a sovraccarico di ferro***

L'ipogonadismo è frequente nella sindrome dismetabolica da sovraccarico di ferro (DIOS) osservata in circa il 10-20% di individui obesi europei e definita come condizione caratterizzata da iperferritinemia, lieve sovraccarico di ferro a livello epatico e vari lineamenti della sindrome metabolica. Più nel dettaglio si è notato come la concentrazione del ferro a livello epatico (HIC, Hepatic Iron Concentration) sia positivamente correlata con i livelli di SHBG (Sex Hormone Binding Globuline), una globulina avente come principali funzioni quelle di trasportare gli ormoni steroidei nel circolo sanguigno verso i tessuti bersaglio, di regolare la concentrazione di steroidi biodisponibili e di influenzare il bilancio tra estrogeni ed androgeni biodisponibili. In particolare, si è dimostrata l'esistenza di una correlazione indiretta tra HIC e livelli di LH e testosterone biodisponibili. Questo fornisce una prova indiretta dell'associazione tra un moderato sovraccarico di ferro e ipogonadismo [317].

Il sovraccarico di ferro solo occasionalmente comporta una disfunzione primaria delle gonadi e quindi un ipogonadismo ipergonadotropo; nella maggior parte dei casi

l'eccesso di ferro si accumula a livello ipotalamico e ipofisario con conseguente danno e induzione di HH [318].

La ferritina sierica è un prezioso indice del deposito di ferro a livello dell'ipofisi come lo sono anche il contenuto di ferro epatico e pancreatico poiché fegato e pancreas sono due organi con una cinetica di accumulo marziale simile a quella ipofisaria [319]. Bisogna però anche considerare che elevati livelli di ferritina non sono sempre indicativi di uno stato di sovraccarico di ferro dato che questo parametro aumenta anche in molte situazioni infiammatorie, nelle epatiti e patologie epatiche [318]. Non esiste inoltre una vera e propria correlazione diretta tra la quantità di ferro accumulato e la disfunzione d'organo [318] anche se deficienze ormonali possono essere presenti anche nei primi stadi di alcune patologie senza che ci siano evidenze di un avanzato sovraccarico marziale [320]. In generale, pazienti con ferritinemia superiore di 2,500 mg/L hanno una probabilità di sviluppare ipogonadismo 2,75 volte più alta rispetto a pazienti con ferritina sierica minore di 1,000 mg/L [321].

L'ipofisi anteriore è particolarmente predisposta agli effetti tossici da sovraccarico marziale. Peillon e Racadot insieme a Bergeron e Kovacs sono stati i primi a dimostrare che il ferro si deposita principalmente nelle gonadotrope piuttosto che in altri tipi cellulari adenoipofisari. Questo spiega perché, in caso di sovraccarico marziale, si osserva una deficienza di gonadotropine ma livelli normali degli altri ormoni ipofisari [320, 322, 323]. I depositi di ferro nell'ipofisi portano ad un'inefficiente produzione di gonadotropine che è dimostrata da una scarsa risposta alla stimolazione tramite somministrazione pulsatile di GnRH [324]. Ciò distingue la disfunzione ipofisaria da quella ipotalamica che è invece caratterizzata da un ripristino dei livelli di gonadotropine a seguito del trattamento pulsatile con GnRH [325].

Nella patogenesi dell'HH rientra anche il possibile effetto tossico indotto dal sovraccarico di ferro a livello del VAT, il che comporta modificazioni nella funzione fisiologica della leptina, un ormone peptidico prodotto dalle cellule adipose che ha un ruolo permissivo nella maturazione sessuale e nella fertilità [324].

Originariamente l'HH era considerata una patologia irreversibile determinata da un danno d'organo permanente. Sono poi stati osservati casi di regressione sia parziale che totale della malattia soprattutto in pazienti in cui l'HH è stato precocemente diagnosticato e l'eccesso di ferro è stato contrastato tramite un'opportuna terapia. Una diagnosi precoce di HH è quindi essenziale per limitare danni irreversibili anche se è difficile da ottenere a causa di un'incompleta maturazione dell'asse HPG nei bambini prima della pubertà [326, 327]. Il ferro inizia ad accumularsi nella prima decade di vita

subendo un aumento notevole durante la seconda decade ma i sintomi vengono osservati generalmente appena prima dei 30 anni.

L'Imaging a Risonanza Magnetica (MRI) è un potente strumento in grado di caratterizzare il volume e la concentrazione di ferro dell'ipofisi. E' una tecnica che si sta cercando di estendere anche a bambini con meno di 10 anni affinché si possano prevenire le disfunzioni endocrine da sovraccarico di ferro [328].

A seconda della tipologia di sindrome da sovraccarico di ferro, in presenza di HH, la terapia consiste in flebotomia, terapia chelante il ferro o sostituzione ormonale. Bisogna avere particolare riguardo nell'iniziare la terapia chelante troppo precocemente (2-5 anni di età) perché si potrebbero avere effetti deleteri sulla crescita del bambino [324].

## 7. SCOPO DEL LAVORO

Il ferro è un micronutriente indispensabile per l'organismo poiché interviene come cofattore in processi biochimici fondamentali quali il trasporto di ossigeno, il metabolismo energetico, la sintesi e il riparo di DNA [329]. Inoltre, il suo contributo alla sintesi di neurotrasmettitori, alla formazione di mielina e ad altre funzioni neuronali cruciali conferisce al ferro un ruolo essenziale per il normale sviluppo e funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) [250, 259]. Tuttavia, l'accumulo nei tessuti di quantità eccessive di ferro libero, non opportunamente sequestrato in forma non reattiva da chaperones o all'interno della ferritina, è potenzialmente tossico per l'ambiente cellulare [330]. Infatti, in condizioni aerobiche, tale metallo catalizza la generazione e la propagazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediante la reazione di Fenton con conseguente danno ossidativo a carico di lipidi di membrana, proteine e acidi nucleici [276, 331]. Gli organi maggiormente colpiti dal sovraccarico marziale sono il fegato, il pancreas, la tiroide, il cuore, le gonadi, le articolazioni, il sistema endocrino, la cute e il SNC, le cui cellule (neuronali o meno) sono notoriamente carenti di difese antiossidanti [332]. In particolare, un aumento del contenuto di ferro in specifiche regioni cerebrali può favorire l'insorgenza di malattie neurodegenerative [273, 333, 334] e di endocrinopatie, inclusi l'ipogonadismo ipogonadotropo (HH), il deficit di crescita e il ritardo dello sviluppo puberale.

Studi precedentemente condotti dal nostro gruppo di lavoro [1] hanno evidenziato come il sovraccarico dietetico di ferro (IED - "Iron-Enriched Diet") in topi C57BL/6J riproduca la sindrome dismetabolica da sovraccarico di ferro (DIOS) per quanto concerne l'aumentato rilascio di epcidina e l'influenza negativa sul metabolismo glucidico (iperglicemia a digiuno, insulino-resistenza) e lipidico (ipertrigliceridemia a digiuno) con un'azione primaria a livello del tessuto adiposo viscerale (VAT). L'accumulo di ferro in tale sito ha ridotto la massa e la dimensione adipocitaria, ha compromesso l'attivazione del signaling insulinico (aumento di resistina, induzione di Socs3, "Suppressor of Cytokine Signaling 3", e riduzione del rapporto pAkt/Akt) e ha indotto uno stato di stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico [1].

In diverse condizioni patologiche quali il diabete mellito di tipo 2 (T2D), la sindrome metabolica (MetS) [335-341], l'emocromatosi ereditaria [342], le talassemie [328] e la DIOS [317] è emerso un parallelismo tra perturbazione della funzione metabolica e

compromissione dell'asse riproduttivo con insorgenza di ipogonadismo prevalentemente ipogonadotropo.

Per tale ragione, scopo principale di questo lavoro di tesi è stato lo studio della capacità del sovraccarico marziale di compromettere, oltre alla già indagata funzione metabolica, anche quella riproduttiva, unitamente all'analisi dei meccanismi molecolari alla base della fisiopatologia dell'eccesso marziale. Tra le probabili sedi anatomiche oggetto della perturbazione (asse HPG: ipotalamo-ipofisi-gonadi), la nostra attenzione si è focalizzata prevalentemente, ma non esclusivamente, sull'ipotalamo poiché, a differenza dell'ipofisi, il suo ruolo primario ed esclusivo nell'insorgenza di HH non è stato ancora del tutto chiarito [343-345]. Poiché l'ipotalamo non è ovviamente esplorabile nell'uomo, per perseguire il nostro scopo, ci siamo avvalsi di due modelli sperimentali in logica traslazionale: il modello murino di DIOS già precedentemente caratterizzato [1] e, come ulteriore lente di ingrandimento, le cellule GN-11, rappresentative di neuroni GnRH immaturi e migratori e le cellule GT1-7, neuroni maturi e GnRH secernenti.

Poiché dalla letteratura non emergono evidenze in merito all'analisi dell'accumulo selettivo di ferro nell'ipotalamo, ci siamo approcciati allo studio sul modello *in vivo* ponendoci degli obiettivi intermedi. Nello specifico, abbiamo indagato:

- la capacità delle cellule ipotalamiche (neuronalì o meno) di accumulare ferro di origine alimentare e di rispondere al sovraccarico marziale sistemico mediante modulazione dei geni responsivi al ferro; tali analisi sono state condotte anche nei testicoli;
- l'abilità dell'eccesso ferro di attivare il pathway infiammatorio e di indurre stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico nell'ipotalamo *in toto*;
- l'effetto del sovraccarico marziale sui meccanismi neuroendocrini ipotalamici coinvolti nel controllo della riproduzione e del comportamento alimentare; l'indagine della compromissione della funzione riproduttiva è stata condotta anche nell'ipofisi;
- la modulazione da parte dell'eccesso di ferro di specifiche vie di segnale (MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt e AMPK) nell'ipotalamo.

I modelli cellulari *in vitro* ci hanno consentito di realizzare un fenotipo estremo di sovraccarico marziale ipotalamico che esclude l'impedimento al libero passaggio di ferro da parte della barriera emato-encefalica (BEE). Tali sistemi sono stati creati al fine di comprendere i reali meccanismi molecolari attivati dall'eccesso di ferro nei neuroni ipotalamici coinvolti nella regolazione della funzione riproduttiva. Inoltre, abbiamo deciso di avvalerci di neuroni immortalizzati, immaturi e migratori, o

neuroblasti, con l'obiettivo di indagare l'ipotetico ruolo dell'eccesso di ferro nella perturbazione della migrazione dei neuroni GnRH dal placode olfattorio all'ipotalamo durante la vita embrionale. Tali considerazioni potrebbero essere traslate al processo di neurogenesi che avviene nel cervello di mammiferi adulti in due determinate regioni cerebrali: la zona sottogranulare del giro dentato verso lo strato di cellule granulari dell'ippocampo e dalla zona sottoventricolare del ventricolo laterale fino ai bulbi olfattori attraverso un cosiddetto flusso migratorio rostrale [346].

Nello specifico, gli studi *in vitro* sono stati condotti allo scopo di investigare:

- l'efficienza di captazione neuronale del ferro, l'impatto sulla vitalità cellulare e la risposta al sovraccarico marziale mediante modulazione dei geni sensibili al ferro;
- l'influenza del sovraccarico di ferro sull'abilità migratoria dei neuroni GnRH immaturi;
- l'abilità dei chelanti del ferro di antagonizzare e/o prevenire il fenotipo patologico determinato dal sovraccarico marziale;
- la modulazione di specifiche vie di segnale (MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt e AMPK) da parte del ferro e il loro effettivo coinvolgimento nel processo migratorio;
- la promozione di uno stato infiammatorio o l'induzione di stress ossidativo o del reticolo endoplasmatico da parte delle condizioni sperimentali utilizzate.

## 8. MATERIALI E METODI

### 8.1 REAGENTI

Il citrato di ammonio ferrico (FAC), il lipopolisaccaride (LPS) e il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia), mentre la Deferoxamina Mesilato (Desferal<sup>®</sup>, DFO) da Biofutura Pharma (Milano, Italia). U0126, inibitore potente, specifico e non-competitivo della via di segnale di MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase (MAPK/ERK1/2) kinase 1/2), utilizzato *in vitro* alla dose di 10  $\mu$ M, è stato comprato da Tocris Biosciences (Bristol, UK) analogamente al Composto C (Dorsomorphin dihydrochloride), inibitore potente, selettivo, reversibile e ATP-competitivo della via di AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), utilizzato in coltura alla concentrazione di 10  $\mu$ M. LY-294,002, inibitore potente, altamente specifico e reversibile di PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase), impiegato alla dose di 10, è stato acquistato da Sigma-Aldrich.

### 8.2 ANIMALI

Tutte le procedure condotte su animali sono state effettuate in ottemperanza alle normative, nazionali e internazionali, vigenti in materia (Decreto Legislativo n. 116 del 27 gennaio 1992 attuativo della direttiva comunitaria, Direttiva C.E.E. n. 86/609 del 24 novembre 1986 *"in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici"*; Legge 6 agosto 2013, n. 96, articolo 13 in materia di *"Delega al Governo per il recepimento delle direttive europee e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea - Legge di delegazione europea 2013"*). Topi maschi del ceppo C57BL/6J (C57black6J) dell'età di 5 settimane e dal peso medio di 17 g sono stati acquistati dalla Charles River (Charles River, Calco, Italia). Al loro arrivo, gli animali sono stati suddivisi in sei gabbie, contenenti ognuna 5 topi, e mantenuti nello stabulario del DISFeB (Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano) in condizioni standard di temperatura (22-24°C) e luce (cicli luce/buio di 12 ore) e con accesso *ad libitum* ad acqua e cibo per tutta la durata del trattamento. Dopo una settimana di acclimatazione alle condizioni dello stabulario, per escludere eventuali contaminazioni nell'assegnazione ai diversi gruppi di trattamento dietetico, i 30 topi sono stati associati casualmente, mediante un metodo di randomizzazione, a 2 diversi regimi alimentari per un periodo di 9 (primo esperimento) e 11 (secondo esperimento) settimane. Nello specifico:

- un gruppo è stato alimentato con una dieta in pellet a normale contenuto di ferro: topi controllo (n=15);
- un gruppo è stato nutrito con una dieta in pellet contenente il 3% di ferro carbonile (IED – “Iron Enriched Diet”): topi IED (n=15).

Il peso di ciascun topo e l’assunzione di cibo per gabbia sono stati registrati settimanalmente.

La misurazione della glicemia basale è stata effettuata tramite glucometro (Accu-Chek, Roche Diagnostics AVIVA, Mannheim, Germania) dopo prelievo di sangue dal plesso venoso retro-orbitale con un capillare di vetro. A tal fine, i topi, mantenuti a digiuno dalla sera precedente, sono stati anestetizzati in una gabbia di induzione mediante una miscela di ossigeno e isoflurano (anestesia gassosa) che non influisce sui parametri biochimici analizzati. L’analisi è stata condotta dopo 5 e 8 settimane di dieta IED.

Al termine del periodo di trattamento alimentare previsto (9 e 11 settimane), i topi sono stati sacrificati mediante decapitazione sotto anestesia (miscela ossigeno/isoflurano) tra le ore 10:00 e le ore 12:00 del mattino. Il sangue è stato raccolto dopo decapitazione dal tronco dell’animale e, trascorse 2 ore a temperatura ambiente, il siero è stato separato mediante centrifugazione (15 minuti a 2000 rpm a temperatura ambiente) e stoccato a -80°C fino all’esecuzione dei dosaggi ormonali. Dal cervello sono stati isolati gli ipotalami e le ipofisi, mentre dalla periferia, sono state raccolte le gonadi. L’ipotalamo è stato estratto considerando i seguenti limiti: un taglio coronale in prossimità del margine posteriore del chiasma ottico, in modo da includere l’area preottica (POA) (rostralmente), un taglio coronale a livello del margine posteriore dei corpi mammillari (caudalmente) e tagli parasagittali lungo le fessure ipotalamiche. Tutti i tessuti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al processamento. I cervelli di 3 topi controllo e 3 topi IED sono stati prelevati interi dal cranio, congelati su ghiaccio secco e quindi conservati a -80°C fino al sezionamento per l’ibridazione *in situ*.

### **8.3 COLTURE CELLULARI**

Le linee cellulari immortalizzate di origine murina GN-11 (gentilmente fornite da Dr. S. Radovick, Children's Hospital, Division of Endocrinology, Boston, MA) e GT1-7 (gentilmente fornite da Dr. R. I. Weiner, Reproductive Endocrinology Center, University of California, San Francisco, CA), rappresentative, rispettivamente, di neuroni GnRH immaturi e maturi, sono state coltivate in monostrato in un incubatore a 37°C con atmosfera umidificata e in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura

utilizzato per tali linee cellulari è il DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium; Sigma-Aldrich) arricchito in D-glucosio (4,5 g/L) e addizionato con rosso fenolo (0,0159 g/L), L-glutamina (0,584 g/L), piruvato di sodio (1 mM; Biochrom KG, Berlino, Germania), streptomina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich), penicillina (100 UI/mL; Sigma-Aldrich) e siero fetale bovino (FBS) (10%) (Gibco, Grand Island, NY). Tale terreno di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni fino al raggiungimento della confluenza cellulare. A questo punto, le cellule sono state raccolte con tripsina/EDTA allo 0.05/0.02% in PBS (tampone fosfato salino) senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma-Aldrich) e sono state seminate per propagazione in piastre Petri con diametro di 100 mm e contenenti 12 mL di terreno di coltura alle densità di  $0.1 \times 10^6$  per le cellule GN-11 e  $3.5 \times 10^6$  per le cellule GT1-7.

#### **8.4 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO TISSUTALE E CELLULARE DI FERRO TRAMITE SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO**

Il contenuto di ferro nell'ipotalamo, nelle gonadi e nelle cellule GN-11 e GT1-7 è stato quantificato mediante spettrometria di assorbimento atomico. Tale tecnica analitica, usata per l'analisi degli elementi in tracce (soprattutto metalli) in diverse matrici, si basa sul principio dell'assorbimento atomico: l'elemento in esame viene atomizzato e bersagliato con radiazioni di lunghezza d'onda opportuna; per effetto dell'assorbimento atomico, l'intensità del raggio diminuisce e l'attenuazione può essere correlata alla concentrazione dell'elemento nel campione.

L'accumulo di ferro nell'ipotalamo e nelle gonadi di topi IED in confronto a topi controllo è stato determinato dopo 11 settimane di trattamento. Prima del processamento i suddetti campioni, mantenuti a  $-80^\circ\text{C}$ , sono stati seccati in stufa a  $100^\circ\text{C}$  per 2 ore.

L'accumulo marziale nelle cellule GN-11 e GT1-7 è stato determinato dopo incubazione con FAC alla dose di 200 µM nel medium di crescita (DMEM + 10% FBS). Al termine del trattamento, le cellule sono state lavate 3 volte con PBS, raccolte mediante scraper in PBS e contate al microscopio ottico con il metodo di esclusione del Trypan Blue. Le cellule vive che, contrariamente a quelle morte, hanno una membrana citoplasmatica intatta, escludono i coloranti quali il Trypan Blue, l'eosina e lo ioduro di propidio, che non penetrano nel citoplasma. Per questo motivo, in presenza di Trypan Blue, le cellule vive mantengono il citoplasma chiaro mentre quelle morte, permeabili al colorante, si colorano interamente di blu. Le cellule raccolte sono state quindi centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e, una volta aspirato il surnatante, si è congelato il pellet secco a  $-20^\circ\text{C}$ .

I campioni tissutali e cellulari sono stati quindi sottoposti ad un'analisi quantitativa del ferro totale intracellulare utilizzando lo spettrometro di assorbimento atomico.

La concentrazione di ferro totale è stata espressa come  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco per ipotalamo e gonadi e come  $\mu\text{g}/10^6$  cellule per le GN-11 e le GT1-7.

## 8.5 SAGGIO DI VITALITA' CELLULARE

L'effetto del ferro (FAC) sulla vitalità delle cellule GN-11 è stato determinato mediante due tecniche:

- il sistema ATPlite™ 1step (Luminescence ATP Detection Assay System) (PerkinElmer, Monza, Italia) che consente di quantificare le cellule vitali in coltura basandosi sulla quantificazione indiretta dell'ATP (Adenosina Trifosfato) presente;
- metodo di esclusione del Trypan Blue tramite il contatore di cellule automatizzato Luna™ (Logos Biosystems, Inc., Annandale, VA, USA).

### 8.5.1 ATPlite™ 1step

L'ATP è un marker di vitalità cellulare perché si trova in tutte le cellule metabolicamente attive e la sua concentrazione cala rapidamente quando le cellule vanno incontro a necrosi o apoptosi. ATPlite™ 1step è un saggio in luminescenza che sfrutta la capacità dell'enzima luciferasi di ossidare, in presenza di ATP, la luciferina generando luce.

Luciferasi ( $\text{Mg}^{2+}$ )

$\text{ATP} + \text{D-Luciferina} + \text{O}_2 \xrightarrow{\hspace{2cm}} \text{Ossiluciferina} + \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{CO}_2 + \text{luce}$

Per poter eseguire il saggio, le GN-11 sono state seminate in una micropiastra da 96 pozzetti (20000 cellule per pozzetto) e, il giorno seguente, FAC è stato aggiunto o meno al terreno di crescita alle concentrazioni di 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  per 4 e 24 ore. Al termine del trattamento, la micropiastra è stata portata a temperatura ambiente e la soluzione contenente l'enzima Luciferasi e la D-Luciferina è stata aggiunta a ciascun pozzetto. Dopo opportuna miscelazione al riparo dalla luce, si è proceduto alla misurazione della luminescenza emessa (espressa in CPS, Counts per Second), che è direttamente proporzionale al contenuto di ATP. Confrontando i valori di CPS delle cellule trattate con quello delle cellule controllo (no FAC) è stato quindi possibile evidenziare l'eventuale effetto del ferro sulla vitalità delle cellule GN-11.

### **8.5.2 Contatore di cellule automatizzato Luna™**

Il contatore di cellule automatizzato Luna™ è uno strumento che misura la concentrazione (espressa in cellule/mL) delle cellule totali, delle cellule vive e di quelle morte in un dato campione. Tale apparecchio effettua direttamente una stima della vitalità cellulare, visualizza un'immagine del campione cellulare oggetto della conta (le cellule vive vengono cerchiare in verde, quelle morte in rosso) e rappresenta un istogramma della distribuzione delle dimensioni cellulari. Il riconoscimento delle cellule vive da quelle morte si basa sull'utilizzo del colorante Trypan Blue.

Per indagare l'eventuale compromissione della vitalità cellulare da parte di FAC, le cellule GN-11 sono state seminate in multiwell da 6 pozzetti a una densità di 0,3 M per pozzetto e, dopo 24 ore, sono state esposte a FAC 200 µM o 500 µM per 3 o 24 ore. Trascorso il periodo d'incubazione, le cellule sono state raccolte con 200 µL di tripsina/EDTA allo 0.05/0.02% in PBS senza Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, inattivata con 600 µL di DMEM 10% FBS. Sono stati poi miscelati 10 µL di tale sospensione cellulare con 10 µL di trypan blue, avendo cura di non mantenere le cellule a contatto con trypan blue più di 3 minuti prima della conta. 10/12 µL della sospensione così ottenuta sono stati quindi rapidamente introdotti nella cameretta di conta, che è stata poi inserita nell'apposita fessura dell'apparecchio. L'immagine del campione cellulare visualizzata sul display dello strumento è stata messa a fuoco in modo da mettere in risalto il contrasto tra il citoplasma chiaro e la membrana blu delle cellule vive. Si è proceduto quindi con conta automatizzata delle cellule e con la lettura della vitalità espressa dallo strumento come percentuale delle cellule vive rispetto alle cellule totali.

## **8.6 ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA TESSUTI E DA CELLULE**

### **8.6.1 Ipotalamo**

L'estrazione dell'RNA totale dall'ipotalamo intero è stata effettuata mediante il kit commerciale NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Germania). La peculiarità di questo kit è la possibilità di isolare sia RNA che proteine da un'unica porzione di campione ed è quindi utile nel processamento di tessuti di ridotte dimensioni, quali appunto gli ipotalami.

I campioni di ipotalamo intero (6–11 mg), conservati a -80°C in All-Protect® Tissue Reagent (Quiagen) o a secco, sono stati omogeneizzati mediante TissueLyser II (Quiagen) per 3 minuti a 30 Hertz in 350 µl di buffer RP1, contenente guanidina tiocianato e inibitori specifici di RNasi e proteasi, con l'aggiunta di 3,5 µL di β-mercaptoetanololo (condizioni denaturanti e riducenti). Successivamente, ciascun campione è stato trasferito in colonnine munite di membrana e filtrato per

centrifugazione a 11000 x g per 1 minuto. Al filtrato sono stati aggiunti 350 µL di etanolo al 70% in modo da consentire, mediante ulteriore centrifugazione a 11000 x g per 30 secondi, il legame selettivo degli acidi nucleici (RNA e DNA) alla membrana di ulteriori colonnine fornite dal kit e il rilascio della soluzione etanolica contenente la componente proteica del campione. Considerata la maggiore degradabilità dell'RNA, si è proceduto dapprima con la sua purificazione, mantenendo le proteine in ghiaccio. Innanzitutto, la membrana è stata privata dei sali mediante aggiunta del buffer MDB (Membrane Desalting Buffer, contenente meno del 10% di guanidina tiocianato e di etanolo) per facilitare la successiva digestione del DNA con una soluzione contenente rDNasi. La membrana è stata quindi lavata con due diversi buffer: RA2, contenente guanidina tiocianato con meno del 25% di etanolo, in grado di inattivare le rDNasi; RA3, una soluzione di lavaggio. Infine, l'RNA puro è stato eluito in condizioni ioniche blande con 40 µl di acqua RNasi-free.

### **8.6.2 *Ipofisi, gonadi, cellule GN-11 e GT1-7***

L'RNA totale è stato estratto e purificato da gonadi, ipofisi e da cellule mediante il kit RNeasy Mini (Qiagen, Milano, Italia). Questa tecnologia combina la selettività di legame di una membrana a base di silice, che trattiene molecole di RNA più lunghe di 200 nucleotidi (mRNA), con la velocità della tecnologia microspin. A seconda del campione biologico analizzato sono state utilizzate diverse procedure per la fase iniziale di lisi e omogeneizzazione nel buffer RLT addizionato di β-mercaptoetanololo, una soluzione contenente guanidina-tiocianato, con forte potere denaturante e riducente, che inattiva eventuali RNasi assicurando così la purificazione di RNA intatto. I tessuti animali sono stati mantenuti a -80°C fino all'aggiunta del buffer di lisi (350 µL buffer RLT + 3,5 µL di β-mercaptoetanololo) al campione ancora congelato in modo da prevenire la degradazione dell'RNA. Le ipofisi, processate interamente, sono state disgregate e omogeneizzate mediante sonicatore (4 cicli, power 60%). Frazioni da 30 mg di gonadi, tagliate su una lastra di ghiaccio secco, sono state invece frantumate e omogeneizzate mediante TissueLyser II (Qiagen) per 3,30 minuti a 30 Hertz. Il lisato del tessuto ipofisario e gonadico è stato quindi centrifugato per 3 minuti alla massima velocità per rimuovere eventuali sostanze insolubili.

Entrambe le linee cellulari, seminate in Petri da 60 mm, sono state lisate direttamente tramite raccolta con scraper nel buffer RLT (600 µL + 6 µL di β-mercaptoetanololo). Il lisato cellulare così ottenuto è stato omogeneizzato mediante passaggio per almeno 5 volte attraverso un ago da 20 gauge adattato su una siringa libera da RNasi.

Le fasi successive sono state utilizzate indistintamente per cellule e tessuti animali. Per creare le condizioni di legame ottimali per gli acidi nucleici alla membrana di silice delle colonnine fornite dal kit (RNeasy Spin Column), un volume di etanolo al 70% (350 o 600  $\mu$ L) è stato aggiunto al lisato. Tale soluzione, opportunamente miscelata, è stata trasferita nelle colonnine e quindi centrifugata per 15 secondi a 10.000 rpm. Tramite centrifugazione, gli acidi nucleici (più lunghi di 200 nucleotidi) sono stati trattenuti dalla membrana che ha invece rilasciato una soluzione etanolica contenente proteine ed impurezze. Dopo un lavaggio con 350  $\mu$ L di Buffer RW1, il DNA è stato digerito tramite aggiunta di una soluzione contenente DNasi (Qiagen). I lavaggi successivi con i buffer RW1 (350  $\mu$ L) e RPE (500  $\mu$ L per 2 volte) hanno consentito rispettivamente di inattivare la DNasi e di purificare l'RNA rimasto legato alla membrana. Per rimuovere eventuali residui di buffer RPE e di etanolo, le colonnine sono state centrifugate per tempi e velocità maggiori prima di eluire l'RNA in 30  $\mu$ L (o più a seconda del campione) di acqua RNasi-free (condizioni ioniche blande).

### **8.6.3 *Quantizzazione spettrofotometrica dell'RNA totale***

L'RNA è stato quantizzato mediante un biofotometro (Eppendorf, Milano, Italia) misurando il valore dell'assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda a cui assorbono gli acidi nucleici) e a 280 nm (lunghezza d'onda a cui assorbono sia gli acidi nucleici che le proteine). La concentrazione di RNA è stata stimata assumendo che un'assorbanza a 260 nm pari a 1 corrisponda a 40  $\mu$ g/mL di RNA. La purezza dell'RNA isolato è stata apprezzata grazie al rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm: un valore compreso tra 1.7 e 2 rappresenta un buon grado di purezza.

I campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

## **8.7 RETROTRASCRIZIONE – REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (RT-PCR; Reverse Transcription – Polymerase chain reaction)**

La tecnica RT-PCR è stata utilizzata per la valutazione dell'espressione genica del recettore della transferrina (TfR) e della ferritina H (FtH) nelle cellule GN-11 e GT1-7, per l'analisi dello splicing alternativo di XBP-1 (X-box binding protein-1) nell'ipotalamo e nelle GN-11 ed infine per la determinazione delle temperature di appaiamento ottimali per i primers impiegati nella PCR quantitativa in tempo reale (vedi in seguito). L'amplificazione mediante PCR del gene ad espressione costitutiva 18S (subunità ribosomiale 18S) è stata effettuata come controllo del buon esito di ciascuna RT.

Il cDNA (DNA complementare) per ogni campione è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale mediante la reazione di RT con il kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Milano, Italia). La RT è stata condotta in un volume totale di 20 µL contenenti, oltre all'RNA, la "RT supermix" (5X), a sua volta composta da:

- trascrittasi inversa: iScript MMLV-RT, RNaseH<sup>+</sup>
- inibitore delle RNasi: utilizzato al fine di bloccare l'azione degli enzimi responsabili della degradazione dell'RNA
- dNTPs: desossiribonucleotidi trifosfato
- random primers: primers formati da sequenze di sei nucleotidi che legandosi all'RNA permettono l'aggancio e dunque l'attività della trascrittasi inversa
- buffer: tampone che garantisce le condizioni ottimali per la reazione di RT
- MgCl<sub>2</sub>: catalizzatore dell'attività enzimatica
- stabilizzatori.

Per la reazione sono stati preparati due set di campioni di RNA:

- nel primo è stata aggiunta la "RT supermix" descritta sopra (+ RT)
- nel secondo è stata utilizzata la "RT Supermix no-RT control", contenente tutte le componenti della "RT supermix" eccetto la trascrittasi inversa, al fine di constatare l'eventuale contaminazione da DNA genomico (- RT).

In tutte le RT è stato anche introdotto un campione di acqua come controllo interno negativo.

1 µL di cDNA o DNA templatato è stato quindi sottoposto alla reazione di PCR (PCR tempo finale) con il kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, Milano, Italia). La PCR è stata condotta in un volume totale di 25 µL contenenti, oltre al cDNA (50 ng), i primers senso e antisense (1 µM ciascuno) (Sigma-Aldrich), l'acqua priva di nucleasi e la GoTaq® Green Master Mix (2X), a sua volta composta da:

- l'enzima DNA *Taq* polimerasi di derivazione batterica (*Thermus Aquaticus*)
- dNTPs
- buffer di reazione (pH 8.5): tampone che garantisce le condizioni ottimali per la reazione di PCR
- MgCl<sub>2</sub>
- due coloranti (blu e giallo): consentono di monitorare la corsa elettroforetica su gel d'agarosio (loading dyes)
- composto che aumenta la densità del campione e permette il caricamento diretto in gel d'agarosio.

Le condizioni specifiche per le reazioni di RT-PCR, effettuate in un termociclatore (GeneAmp PCR System 2700 e 9700; Applied Biosystem, Monza, Italia), sono indicate nelle **Tabella 8.1** e **8.2**. Le sequenze dei primers e le relative temperature di appaiamento sono riportate in **Tabella 8.3**.

I prodotti amplificati di ciascuna PCR sono stati risolti mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% (4% per XBP-1) in tampone TBE 1X e successivamente visualizzati, per la presenza di etidio bromuro, mediante l'utilizzo di un transilluminatore UV.

Ci si è inoltre avvalsi di un DNA-marker (Sigma-Aldrich) con un ambito dimensionale compreso tra 50 e 3000 bp, scelto in base alla dimensioni dei prodotti amplificati di nostro interesse.

<b>STEP</b>	IBRIDAZIONE	TRASCRIZIONE INVERSA	INATTIVAZIONE ENZIMA
<b>TEMPERATURA</b>	25°C	42°C	85°C
<b>TEMPO</b>	5 minuti	30 minuti	5 minuti

**Tabella 8.1** Condizioni per la reazione di RT

<b>STEP</b>	DENATURAZIONE INIZIALE		
<b>TEMPERATURA</b>	95°C		
<b>TEMPO</b>	5 minuti		
<b>STEP</b>	CICLI PCR: 13 per 18S, 40 per tutti gli altri geni		
	DENATURAZIONE	APPAIAMENTO	ESTENSIONE
<b>TEMPERATURA</b>	94°C	<b>Tabella 8.3</b>	72°C
<b>TEMPO</b>	1 minuto	1 minuto	1 minuto
<b>STEP</b>	ESTENSIONE FINALE		
<b>TEMPERATURA</b>	72°C		
<b>TEMPO</b>	10 minuti		

**Tabella 8.2** Condizioni per la reazione di PCR

## **8.8 PCR QUANTITATIVA IN TEMPO REALE (qPCR; Real-time quantitative PCR)**

1  $\mu\text{L}$  di cDNA è stato sottoposto alla reazione di qPCR mediante intercalanti fluorescenti (metodo SYBR Green) o reporter a sonde fluorescenti (metodo TaqMan) con il sistema CFX96 C1000 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad). Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato e in piastre da 96 pozzetti. Per ogni set di primer o per ciascuna sonda, sono stati inclusi un controllo negativo privo di cDNA (acqua) e i campioni – RT, in modo da escludere ogni possibile fonte di contaminazione. Il gene codificante per la proteina ribosomiale 18S è stata utilizzata come controllo interno. Il calcolo dei livelli di espressione relativa degli mRNA di interesse è stata effettuata con il metodo  $\Delta\Delta C_t$ .

### **8.8.1 SYBR Green**

Le reazioni sono state eseguite in un volume totale di 10  $\mu\text{L}$  contenenti, oltre al template di DNA (50 ng), i primers senso e antisense (300 nM per il gene di espressione costitutiva 18S o 500 nM per tutti gli altri geni) (Sigma-Aldrich), l'acqua priva di nucleasi e la iTaq™ Universal SYBR® Green supermix (2X) (Bio-Rad), a sua volta composta da: antibody-mediated hot-start iTaq™ DNA polimerasi, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , colorante SYBR® Green I, potenziatori, stabilizzanti e coloranti passivi interni di riferimento (ROX e fluoresceina). Le sequenze dei primers e le relative temperature di appaiamento sono elencati in **Tabella 8.3**.

### **8.8.2 TaqMan**

Le reazioni sono state condotte in un volume totale di 20  $\mu\text{L}$  contenenti, oltre a 1  $\mu\text{L}$  di cDNA (50 ng):

- 10  $\mu\text{L}$  di SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad) composta da antibody-mediated hot-start Sso7d-fusion polymerase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , potenziatori e stabilizzanti
- 1  $\mu\text{L}$  della sonda specifica (20X) costituita da un fluorocromo reporter (6-carbossi-fluoresceina, FAM) all'estremità 5' e da un quencher non fluorescente al terminale 3' con un minor groove binder (MGB) (custom TaqMan MGB probes, Life Technologies, Inc., Milano, Italia). Le sonde disegnate e comprate sono state: GnRH1 Mm01315605\_m1, IL-6 Mm00446180\_m1, Kiss1 Mm03058560\_m1, NPY Mm03048253\_m1, POMC Mm00435874\_m1, TNF $\alpha$  Mm00443258\_m1, 18S Hs99999901\_s1.
- 8  $\mu\text{L}$  di acqua priva di nucleasi.

Le condizioni specifiche per le reazioni di qPCR con il metodo TaqMan sono state: attivazione della polimerasi e denaturazione del DNA a 95°C per 2 minuti, 40 cicli di amplificazione suddivisi in denaturazione a 95°C per 10 secondi e in appaiamento/estensione a 60°C per 30 secondi.

<b>GENE</b>	<b>T°</b>	<b>PRIMERS</b>
18S	57°C	FOR: 5'-CTCGCTCCTCTCCTACTTGG-3' REV: 5'-CCATCGAAAGTTGATAGGGC-3'
TfR	57°C	FOR: 5'-TCGCTTATATTGGGCAGACC-3' REV: 5'-CCATGTTTTGACCAATGCTG-3'
FtH	57°C	FOR: 5'-CGAGATGATGTGGCTCTGAA-3' REV: 5'-GTGCACACTCCATTGCATTC-3'
Epcidina	57°C	FOR: 5'-CAGCAGAACAGAAGGCATGA-3' REV: 5'-AGATGCAGATGGGGAAGTTG-3'
CHOP	57°C	FOR: 5'-GTCCCTAGCTTGGCTGACAGA-3' REV: 5'-TGGAGAGCGAGGGCTTTG-3'
SOD2	57°C	FOR: 5'-TCTGGCCAAGGGAGATGTTA-3' REV: 5'-CCTCCAGCAACTCTCCTTTG-3'
XBP-1	64°C	FOR: 5'-TGAGAACCAGGAGTTAAGAACACGC-3' REV: 5'-TTCTGGGTAGACCTCTGGGAGTTCC-3'
GnRH	57°C	FOR: 5'-GGCCGGCATTCTACTGCTG-3' REV: 5'-CTGCCTGGCTTCTCTTCA-3'
Kiss1	54°C	FOR: 5'-AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT-3' REV: 5'-GCATACCGCGATTCTTTT-3'
GPR54	55°C	FOR: 5'-CAGTCCCAGGACACAATCCT-3' REV: 5'-ACCAATGAGTTTCCGACCAG-3'
LH $\beta$	59°C	FOR: 5'-TGGCCGCAGAGAATGAGTTC-3' REV: 5'-CTCGGACCATGCTAGGACAGTAG-3'
FHS $\beta$	59°C	FOR: 5'-ATGGATTGTTCCAGGCAGAC-3' REV: 5'-TCACTGCATGTGAGGGAAAG-3'

**Tabella 8.3** Sequenze e temperature di appaiamento dei primers per RT-PCR e per qPCR

## **8.9 STUDIO DELLA MIGRAZIONE DELLE CELLULE GN-11 (CAMERA DI BOYDEN)**

Gli esperimenti di migrazione cellulare sono stati condotti utilizzando la camera di Boyden (Neuro Probe, Gaithersburg, MD). Nel presente lavoro si è analizzata solo la chemiotassi (migrazione direzionata delle cellule verso regioni a più elevata concentrazione di fattori chemotattici) delle GN-11.

La camera di Boyden consta di tre componenti distinte:

- La porzione inferiore, in materiale acrilico, presenta 48 pozzetti chiusi sul fondo in cui è stato inserito l'agente chemoattrattore in esame (FBS 1%) (28  $\mu$ L)
- La porzione intermedia è costituita da una membrana porosa di policarbonato con pori di 8  $\mu$ m di diametro e distribuiti casualmente su tutta la superficie (Neuro Probe, Gaithersburg, MD). Prima dell'utilizzo, tale membrana è stata lavata una volta in acido acetico 0,5 M e quindi due volte in PBS senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Per migliorare l'adesività delle cellule durante il processo migratorio, la membrana è stata lasciata a contatto con una soluzione di gelatina sterile (0,2 mg/mL in PBS senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) per almeno 72 ore a 4°C. Per garantire la tenuta delle varie parti della camera, un separatore di silicone, sempre con 48 pozzetti, è stato posizionato sulla membrana.
- La porzione superiore, anch'essa in materiale acrilico, presenta 48 pozzetti aperti sul fondo in cui è stata aggiunta la sospensione cellulare (50  $\mu$ L) opportunamente trattata.

Per studiare gli effetti del trattamento con FAC, a diverse concentrazioni e per tempi diversi, sulla migrazione cellulare, le cellule GN-11, dopo opportuno trattamento, sono state raccolte in tripsina/EDTA allo 0.05/0.02% in PBS senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sottoposte ad un lavaggio in DMEM privo di FBS e con lo 0,1% di BSA (albumina di siero bovino; Sigma – Aldrich) e risospese nello stesso terreno alla densità di  $0.1 \cdot 10^6$  cellule/50  $\mu$ L prima di essere introdotte nella parte superiore della camera di Boyden. Per indagare se le vie di segnale di MAPK/ERK1/2, AMPK e Akt, la cui attivazione è modulata dal ferro, fossero effettivamente coinvolte nell'inibizione ferro-dipendente della migrazione stimolata dall'1% di FBS, le GN-11, mantenute in terreno completo di crescita fino a confluenza, sono state raccolte, lavate e risospese come indicato sopra. La sospensione ( $0.1 \cdot 10^6$  cellule/50  $\mu$ L in DMEM/BSA 0,1%) è stata aliquotata in tubini sterili, incubata per 30 minuti con gli inibitori descritti sopra (sezione "Sostanze"), tutti alla concentrazione di 10  $\mu$ M, trattata con FAC 200  $\mu$ M per 1 ora e quindi caricata nella parte superiore della camera di Boyden.

Una volta assemblata, la camera è stata chiusa con delle viti e quindi posta in incubatore a 37°C con atmosfera umidificata e in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> per 1 ora e 45 minuti. Al termine dell'incubazione, la camera è stata smontata e la membrana di policarbonato è stata recuperata con delle pinze. Le cellule, che sono rimaste adese al lato della membrana direttamente a contatto con l'agente chemiotattico e che quindi rappresentano le cellule migrate attraverso i pori, sono state fissate in metanolo assoluto freddo per 1 minuto. Le cellule rimaste sul lato della membrana a contatto con la porzione superiore della camera, rappresentative di cellule non migrate, sono state bagnate con PBS senza Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e quindi eliminate tramite strofinamento con uno scraper. Le cellule fissate sono state quindi colorate con due soluzioni contenute nel kit Diff-Quick (Biomap, Milano, Italia) e l'eccesso di colorante è stato rimosso con acqua milliQ prima di collocare la membrana su un vetrino da istologia. Per l'analisi quantitativa, le cellule sono state osservate con un obiettivo 20X o 40X al microscopio ottico in campo chiaro. Per ciascun pozzetto si sono contate le cellule presenti in tre campi casuali e si è calcolato il numero medio di cellule migranti per mm<sup>2</sup>, espresso come percentuale rispetto al controllo positivo (FBS 1% posto uguale a 100%).

## **8.10 ESTRAZIONE DI PROTEINE DALL'IPOTALAMO E DALLE CELLULE GN-11**

### **8.10.1 *Ipotalamo***

Per precipitare e purificare le proteine da campioni ipotalamici interi è stata conservata la soluzione etanolica del primo eluato ottenuto con il kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein (Macherey-Nagel) (vedi sopra). Nel dettaglio, 150 µL di tale eluato sono stati prelevati e addizionati di un egual volume di buffer PP (protein precipitator). Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, il pellet ottenuto per centrifugazione è stato lavato in 500 µL di etanolo al 50%, ricentrifugato e, dopo rimozione del surnatante, lasciato essiccare a temperatura ambiente per 30 minuti. Il pellet è stato quindi risospeso in 100 µL di PSB-TCEP (protein solving buffer – tris(2-carboxyethyl)phosphine) e scaldato a 95 – 98°C per 3 minuti al fine di ottenere una completa riduzione e denaturazione delle proteine.

La concentrazione delle proteine così ottenute è stata quantificata mediante il kit Protein Quantification Assay (Macherey-Nagel). La curva standard è stata costruita preparando diluizioni seriali di BSA in H<sub>2</sub>O a partire da uno stock di BSA in PSB a concentrazione nota (1 mg/mL). Dopo aggiunta del reagente di quantificazione (QR) fornito dal kit, la densità ottica degli standard e dei campioni è stata letta mediante

uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm (Wallac Victor 3 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer).

### **8.10.2 GN-11**

Per studiare l'effetto di FAC sulle vie di trasduzione del segnale di ERK1/2, AMPK e Akt, le cellule GN-11 sono state seminate in Petri da 60 mm. Una volta raggiunto l'80% circa di confluenza, le cellule sono state mantenute per tutta la notte in DMEM privo di FBS (starvation), trattate con FAC 200  $\mu$ M per 5 – 180 minuti e per 24 ore e quindi raccolte per le seguenti analisi.

Dopo due lavaggi con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  caldo (37°C), le cellule sono state lisate con 200  $\mu$ L di M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL) contenente l'1% di inibitore di proteasi (Complete Mini EDTA-free, Proteasi Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) e fosfatasi (PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics) per 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente. La sospensione cellulare è stata quindi centrifugata per 10 minuti a 14,000 rcf a 4°C ed il surnatante, contenente l'estratto proteico citoplasmatico e nucleare, è stato recuperato per le seguenti analisi. La concentrazione proteica dei campioni è stata quantificata con il metodo dell'acido bicinconinico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) utilizzando concentrazioni note di BSA in M-PER (stock 2 mg/mL) per la costruzione di una curva standard. La densità ottica degli standard e dei campioni è stata letta ad una lunghezza d'onda di 550 nm utilizzando un lettore di micropiastre (ELX 800, BioTek, Winooski, VT). Le concentrazioni dei campioni sono state poi interpolate secondo un'equazione polinomiale quadratica del tipo  $y=a+bx+cx^2$ .

## **8.11 SEPARAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA CITOPLASMATICA DA QUELLA NUCLEARE**

L'estrazione e la separazione della frazione proteica citoplasmatica da quella nucleare di uno stesso campione di cellule GN-11 è stata effettuata tramite il kit commerciale NE-PER™ (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; Thermo Scientific) secondo le istruzioni riportate dal produttore. Nello specifico, le cellule GN-11 sono state seminate in Petri da 100 mm e, raggiunto l'80% di confluenza, incubate o meno per 24 ore in presenza di FAC (200  $\mu$ M),  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) o LPS (1  $\mu$ g/ml). Al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte in tripsina/EDTA allo 0.05/0.02% in PBS senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e centrifugate a 1200 rcf per 5 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato sospeso in PBS, centrifugato a 500 rcf per 5 minuti a 4°C e quindi solubilizzato e

omogeneizzato in una quantità, dipendente dal suo volume, di CER I freddo addizionato dell'1% di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich). Dopo un'incubazione di 15 minuti in ghiaccio è stato aggiunto un opportuno volume di CER II freddo e la soluzione così ottenuta è stata miscelata e incubata per 2 minuti in ghiaccio. L'aggiunta di CER I e CER II ha consentito la distruzione della membrana cellulare e il rilascio selettivo del contenuto proteico citoplasmatico. Tramite centrifugazione a circa 16000 rcf per 8 minuti a 4°C è stato possibile precipitare i nuclei ancora intatti ed isolare il surnatante rappresentativo dell'estratto citoplasmatico. Il pellet insolubile contenente i nuclei è stato quindi risospeso in NER freddo, un reagente in grado di liberare il contenuto nucleare, addizionato dell'1% di inibitore delle proteasi (Sigma-Aldrich). La sospensione è stata lasciata in ghiaccio per 60 minuti, miscelata con il vortex alla massima velocità ogni 10 minuti e quindi centrifugata a circa 16000 rcf per 10 minuti a 4°C al fine di recuperare l'estratto proteico nucleare contenuto nel surnatante.

La concentrazione proteica delle frazioni così ottenute è stata quantificata con il kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Mediante analisi Western Blotting è stata valutata la capacità di FAC e TNF $\alpha$  di indurre la traslocazione e l'attivazione di NF- $\kappa$ B nel nucleo.

## **8.12 ANALISI WESTERN BLOT**

La preparazione del campione, la corsa elettroforetica su gel e il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa è stato effettuato mediante il sistema di elettroforesi NuPAGE® (Invitrogen™, Life Technologies). Gli estratti proteici (20  $\mu$ g) sono stati risospesi in acqua SALF, nel NuPAGE® Reducing Agent (10X) (Novex®, Life Technologies) contenente ditionitrotolo (DTT, 500 mM) e nel NuPAGE® LDS (lithium dodecyl sulfate) Sample Buffer (4X) (Novex®, Life Technologies) e quindi riscaldati per 10 minuti a 70°C. In questo modo l'elettroforesi è stata condotta in condizioni denaturanti e riducenti e la separazione è avvenuta in base al peso molecolare. I campioni e un marker di peso molecolare (7  $\mu$ L) (Novex® Sharp Protein Standard, Novex®, Life Technologies) sono stati risolti mediante elettroforesi su gel pre-cast di acrilamide-bisacrilamide (SDS-PAGE) in gradiente 4-12% e dello spessore di 1,5 mm (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gels, Novex®, Life Technologies). La corsa elettroforetica è stata effettuata in un tampone salino (NuPAGE® MES SDS Running Buffer; Novex®, Life Technologies) con l'aggiunta, solo nella camera più interna (spazio delimitato tra due gel o tra un gel e l'adattatore di plastica) della cella elettrolitica o catodo, di un'antiossidante (NuPAGE® Novex®, Life Technologies) con la funzione di mantenere

le proteine in uno stato ridotto. L'elettroforesi è stata condotta applicando un voltaggio costante di 200 Volt per 35 minuti. Le proteine sono state quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa con porosità di 0.2  $\mu\text{m}$  (iBlot<sup>®</sup> Transfer Stacks, Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies) mediante il sistema a secco dell'iBlot (iBlot<sup>®</sup> Gel Transfer Device; Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies) utilizzando il programma numero 3 per 7 minuti e 40 secondi. Dopo opportuni lavaggi in TBST/0.1% Tween 20 (tris-buffered tween-20) (NaCl, Tris base, HCl e 0.1% di tween 20) e il bloccaggio con una soluzione al 5% di BSA in TBST per 1 ora e 30 minuti, per evitare che l'anticorpo leggesse siti di legame aspecifici, si è proceduto all'incubazione, per tutta la notte a 4°C, con l'anticorpo primario diluito nella soluzione di BSA o latte al 5%. Il giorno successivo, dopo opportuni lavaggi in TBST, la membrana è stata incubata, per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano in una soluzione di latte al 5%. Dopo ulteriori lavaggi, si è proceduto alla visualizzazione delle regioni immunoreattive mediante esposizione della membrana ai substrati chemiluminescenti Clarity Western ECL (Bio-Rad) per 5 minuti. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata tramite il sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad). L'intensità ottica delle bande ottenute è stata calcolata tramite il programma Image Lab 3.0 (Bio-Rad).

Per analizzare i livelli di espressione di diverse proteine negli stessi campioni caricati sul medesimo gel, la stessa membrana è stata processata con più anticorpi dopo stripping per 10 minuti a temperatura ambiente con la soluzione Newblot<sup>®</sup> Nitro Stripping Buffer (LI-COR; Carlo Erba Reagents, Milano, Italia) e procedendo con le fasi di bloccaggio, di immunoblotting e di rilevazione del segnale.

Le caratteristiche degli anticorpi utilizzati sono riportate in **Tabella 8.4**.

NOME	kDa	ANTICORPO 1°	ANTICORPO 2°
pERK1/2°	42 - 44	1:150	1:6000 (anti-mouse)
ERK1/2°	42 - 44	1:1000	1:9000 (anti-rabbit)
pAkt*	60	1:1000	1:8000 (anti-rabbit)
Akt*	60	1:1000	1:8000 (anti-rabbit)
pAMPK*	62	1:1000	1:8000 (anti-rabbit)
AMPK*	62	1:1000	1:8000 (anti-rabbit)
pNF-κB p65*	65	1:1000	1:8000 (anti-rabbit)
NF-κB p65*	65	1:2000	1:8000 (anti-rabbit)
Istone H3*	17	1:1000	1:5000 (anti-rabbit)
Tubulina <sup>+</sup>	55	1:2000	1:8000 (anti-mouse)

**Tabella 8.4** Diluizioni degli anticorpi utilizzati in WB (°Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA; \*Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA; <sup>+</sup>Sigma-Aldrich)

### 8.13 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA

La localizzazione di NF-κB nelle cellule GN-11 è stata anche valutata tramite immunofluorescenza (IFL). Le cellule sono state seminate su vetrini poli-L-lisinati (Sigma-Aldrich) del diametro di 12 mm alla densità di  $0.15 \times 10^5$  cellule/pozzetto e sono state cresciute in multiwell da 4 pozzetti fino al raggiungimento della confluenza ottimale. Dopo trattamento con FAC alla dose di 200 μM per 24 ore, le cellule sono state lavate rapidamente con PBS (senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,01M pH 7,4) e immediatamente fissate in paraformaldeide al 4% per 5 minuti a 4°C. Le cellule fissate sono state permeabilizzate per 20 minuti con una soluzione allo 0,2% di Triton X100 in PBS, bloccate per 20 minuti con una soluzione di siero normale al 10% in PBS e 0,1% di Triton X100 (siero normale di asino, Santa Cruz Biotechnology, Inc), e incubate con una soluzione diluita dell'anticorpo primario (1:50 anti-NF-κB-p65 in una soluzione allo 0,1% di Triton X100 e 0,5% di BSA in PBS, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) per tutta la notte a 4°C. Dopo opportuni lavaggi, le cellule sono state incubate per un'ora in una soluzione diluita dell'anticorpo secondario specifico (1:200 anticorpo di asino anti-IgG di ratto, marcato con Alexa Fluor 488F (ab')<sub>2</sub>, Molecular Probes, Eugene, OR). Dopo ulteriori lavaggi, le cellule sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con il 4'-6-diammino-2-fenilindolo (DAPI, 1:5000, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), un colorante nucleare. I vetrini sono stati quindi montati su

vetrini coprioggetto con Mowiol® (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza mediante fotocamera digitale.

#### **8.14 ANALISI STATISTICA DEI DATI**

L'analisi statistica è stata condotta con il programma GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). I dati sono espressi come media dei valori ottenuti  $\pm$  deviazione standard (DS) o errore standard della media (SEM). La lettera "n" indica il numero di replicati in ciascun esperimento. La significatività delle differenze tra i gruppi oggetto di analisi è stata valutata con il test t di Student non appaiato, in caso di coppie di parametri indipendenti, o con l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita dal post-test di Dunnet o di Tukey, per comparazioni multiple. La significatività è stata attribuita per valori di  $p < 0,05$ .

## 9. RISULTATI

### 9.1 MODELLI SPERIMENTALI: MESSA A PUNTO E CRITICITÀ

#### 9.1.1 *Scelta del modello murino di sovraccarico marziale*

Dalla letteratura emerge l'utilizzo di tre principali tipologie di modelli animali, in particolare murini, per riprodurre le sindromi da sovraccarico di ferro:

- 1) animali con depositi marziali patologici dovuti a quantità eccessive di ferro esogeno, rappresentativi di un sovraccarico secondario;
- 2) animali geneticamente modificati, per mimare le sindromi primarie da eccesso marziale;
- 3) modelli naturali con insorgenza spontanea di sovraccarico marziale, (non identificati nei roditori) [347].

Il nostro studio, focalizzato sugli effetti dell'eccesso di ferro sulle diverse componenti dell'asse riproduttivo (ipotalamo - ipofisi - gonadi), con particolare attenzione all'ipotalamo, nasce come estensione sperimentale della caratterizzazione periferica e metabolica di un modello murino di sindrome dismetabolica da sovraccarico di ferro (DIOS - "Dysmetabolic Iron Overload Syndrome") [1]. Poiché la DIOS è una condizione associata a sovraccarico secondario di ferro, si è deciso di utilizzare topi appartenenti alla prima delle suddette categorie. A loro volta, i modelli murini con sovraccarico esogeno di ferro sono raggruppabili in due categorie in base alla via di somministrazione di tale metallo:

- 1) i modelli di eccesso marziale dietetico o enterale, ottenuti mediante l'aggiunta di ferro carbonile, ferrocene o citrato di ammonio ferrico alla dieta standard;
- 2) i modelli di sovraccarico marziale parenterale, generati tramite l'iniezione di chelati del ferro, quali il ferro-destrano, il ferro-sorbitolo o il nitrilotriacetato ferrico.

Sebbene tali modelli differiscano per l'entità di accumulo di ferro e per le conseguenti caratteristiche fisiopatologiche, essi costituiscono dei sistemi sperimentali validi per l'indagine dei meccanismi molecolari alla base della fisiopatologia dell'eccesso marziale [348].

Dalla letteratura non emerge la prevalenza di un particolare ceppo murino wild-type per lo studio delle sindromi da sovraccarico di ferro. Poiché il nostro primo obiettivo è stato l'identificazione degli effetti dell'eccesso marziale sul fenotipo biochimico e metabolico, la nostra scelta è ricaduta su topi wild-type del ceppo C57BL/6J (C57 black 6J), animali "inbred" altamente suscettibili allo sviluppo di insulino-resistenza

(IR) e obesità. Tutti gli esperimenti condotti fino ad oggi hanno previsto l'utilizzo di soli topi maschi adulti al fine di caratterizzare un iniziale quadro fisiopatologico escludendo le variabilità derivanti dalle fluttuazioni cicliche della funzione riproduttiva nella femmina adulta [313]. Non sono stati presi in considerazione topi in età pre-puberale.

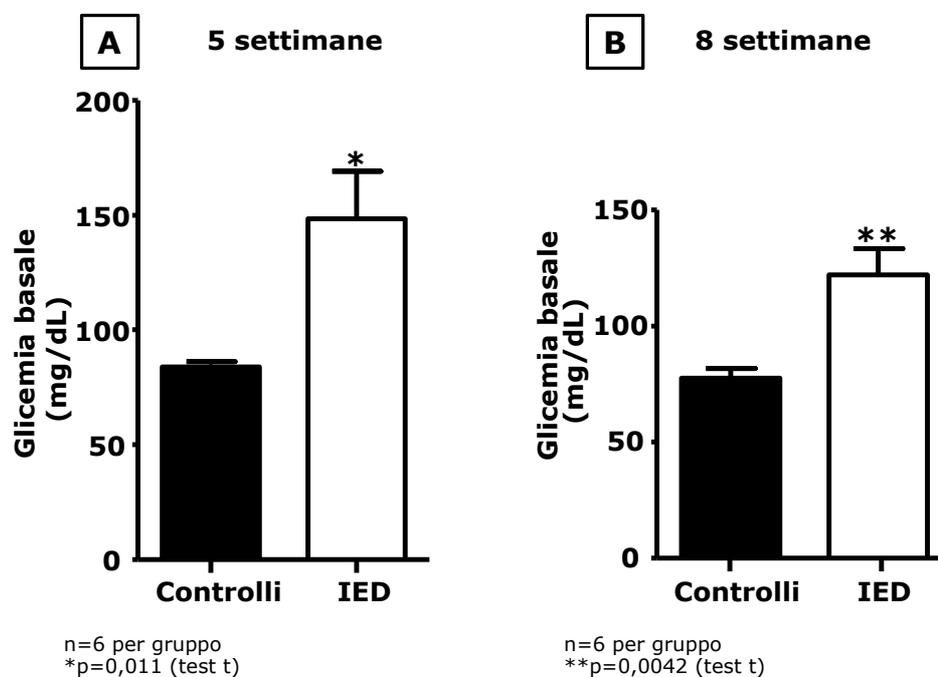
Per indurre un sovraccarico marziale cronico di entità paragonabile a quello dei pazienti affetti da DIOS [349], abbiamo replicato il modello proposto da Pigeon e collaboratori [350]. Nel dettaglio, i topi sono stati alimentati con una dieta in pellets arricchita con 3% di ferro carbonile (IED - "Iron Enriched Diet"), una polvere di ferro elementare (ridotto), prodotta mediante il processo di carbonilazione, virtualmente pura e costituita da particelle di dimensioni molto piccole e uniformi con elevata biodisponibilità [351]. La bassa tossicità del ferro carbonile deriva dal suo particolare profilo di assorbimento. Per essere assorbito, il ferro carbonile necessita della preventiva ossidazione e solubilizzazione da parte dell'acido cloridrico dello stomaco; di conseguenza, la percentuale assorbita è limitata dalla velocità di produzione dell'acido gastrico e dal rilascio del ferro solubilizzato dallo stomaco all'intestino. Diversamente dal ferro ferroso, assorbito rapidamente dopo l'assunzione, la bassa velocità di solubilizzazione del ferro carbonile comporta un suo più graduale assorbimento e minimizza la sua tossicità [352-354]. I pazienti che assumono ferro carbonile tollerano una dose 10 - 150 volte più elevata della dose standard del solfato ferroso e presentano effetti collaterali pressoché analoghi [354, 355]. Studi di tossicità del ferro carbonile condotti nei ratti hanno mostrato che la dose a cui tutti gli animali sopravvivono ( $LD_0$ ) è di 10000 - 15000 mg Fe/kg, mentre la dose letale ( $LD_{100}$ ) è di 50000 - 60000 mg Fe/kg [352]. Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che la somministrazione cronica di una dieta arricchita con il 3% di ferro carbonile comporta nei roditori una notevole siderosi epatica, senza fibrosi, cirrosi [356-358] e lesioni tumorali [350] e riproduce l'aspetto di un fegato umano con emocromatosi [359]. L'incremento dei depositi di ferro nel fegato è positivamente correlato sia alla quantità di ferro carbonile introdotto con la dieta che alla durata del trattamento [350].

Una prima serie di esperimenti, volti alla caratterizzazione del fenotipo biochimico e metabolico di tale modello murino di sovraccarico marziale, ha previsto la somministrazione della dieta IED a partire dalla VI settimana di vita dell'animale per un periodo di 16 settimane. A supporto della validità di tale modello sperimentale si collocano la sideremia, il dosaggio di ferro intraepatico (HIC - "Hepatic Iron Concentration"), che sono risultati paragonabili a quelli di pazienti affetti da DIOS, i

livelli sierici ed epatici di epcidina e l'analisi semiquantitativa e qualitativa istologica del ferro tramite colorazione di Perls nel fegato e nel tessuto adiposo viscerale (VAT) [1]. Poiché è emerso che il fenotipo patologico, in termini di alterazione dell'omeostasi marziale, s'instaura nell'animale già dopo 2 mesi di dieta arricchita con il 3% di ferro carbonile [1], in analogia agli studi condotti da Pigeon [350], gli esperimenti successivi, incentrati sulla caratterizzazione degli effetti marziali sull'asse riproduttivo, si sono protratti per 9 o 11 settimane.

### 9.1.1.1 Fenotipo metabolico

I primi studi condotti sul modello murino di sovraccarico marziale qui illustrato hanno evidenziato una correlazione tra elevati depositi tissutali di ferro e l'alterazione del metabolismo glucidico e lipidico [1]. L'induzione di un fenotipo dismetabolico da parte della dieta IED è stata confermata mediante misurazione dei valori di glicemia basale dopo digiuno prolungato per tutta la notte. Dopo 5 settimane di IED, i topi hanno mostrato un aumento del 76% dei valori di glicemia a digiuno rispetto ai controlli (controlli:  $84,00 \pm 2,18$  mg/dL; IED:  $147,70 \pm 20,39$  mg/dL;  $p=0,011$ ) e tale divario si è mantenuto anche dopo 8 settimane di IED (controlli:  $77,50 \pm 4,16$  mg/dL; IED:  $122,00 \pm 11,31$  mg/dL;  $p=0,0042$ ) (**Figura 9.1, A. B.**).



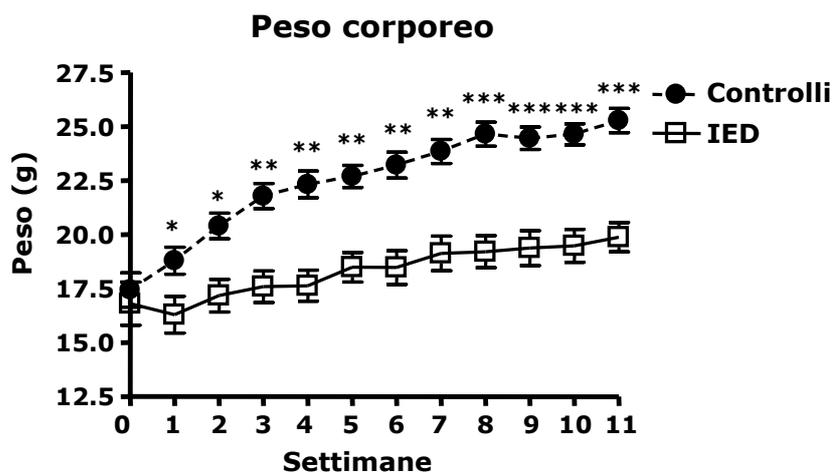
**Figura 9.1** Glicemia basale misurata dopo digiuno prolungato per tutta la notte in topi controllo e IED dopo 5 (**pannello A**) e 8 (**pannello B**) settimane di trattamento. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Il numero di animali e il valore di p, determinato tramite test t, sono riportati sotto a ciascun grafico.

### 9.1.1.2 Parametri morfometrici

La IED è stata ben tollerata dal nostro modello animale e non ha provocato evidenti anomalie anatomiche o di sviluppo ad eccezione del peso. Si è infatti registrata una riduzione significativa del peso corporeo dei topi IED rispetto ai topi controllo già dopo la I settimana di dieta (**Tabella 9.1**). La differenza ponderale è aumentata progressivamente nel corso del trattamento fino a raggiungere un massimale di 5,41 g dopo 11 settimane di IED (**Tabella 9.1, Figura 9.2**). Questo effetto della dieta arricchita con il 3% di ferro carbonile era già stato documentato da altri studi [350, 360]. Nel nostro caso, la minore assunzione di cibo da parte dei topi IED (5,85 g in media in meno rispetto ai controlli) ha sicuramente contribuito al ridotto incremento di peso (**Tabella 9.2**).

Settimane (dall'inizio della dieta)	Peso corporeo (g)		$\Delta$ (Controlli - IED) (g)	Valore di p
	Controlli (Media $\pm$ DS) (g) (n=5)	IED (Media $\pm$ DS) (g) (n=5)		
1	18,79 $\pm$ 1,406	16,29 $\pm$ 1,891	2,50	0,04493
2	20,40 $\pm$ 1,324	17,18 $\pm$ 1,697	3,22	0,01009
3	21,79 $\pm$ 1,300	17,59 $\pm$ 1,637	4,19	0,00204
4	22,32 $\pm$ 1,378	17,63 $\pm$ 1,612	4,69	0,00113
5	22,69 $\pm$ 1,148	18,49 $\pm$ 1,530	4,20	0,00117
6	23,22 $\pm$ 1,352	18,48 $\pm$ 1,745	4,74	0,00135
7	23,85 $\pm$ 1,247	19,13 $\pm$ 1,787	4,72	0,00129
8	24,66 $\pm$ 1,244	19,21 $\pm$ 1,660	5,45	0,00037
9	24,46 $\pm$ 1,168	19,38 $\pm$ 1,795	5,09	0,00072
10	24,64 $\pm$ 1,080	19,48 $\pm$ 1,706	5,16	0,00045
11	25,29 $\pm$ 1,256	19,88 $\pm$ 1,519	5,41	0,00028

**Tabella 9.1** Peso corporeo di topi controllo e IED registrato settimanalmente dalla prima settimana di dieta fino al termine del trattamento. La tabella riporta anche la differenza ponderale tra topi controllo e IED ad ogni settimana e il valore di p associato (test t).



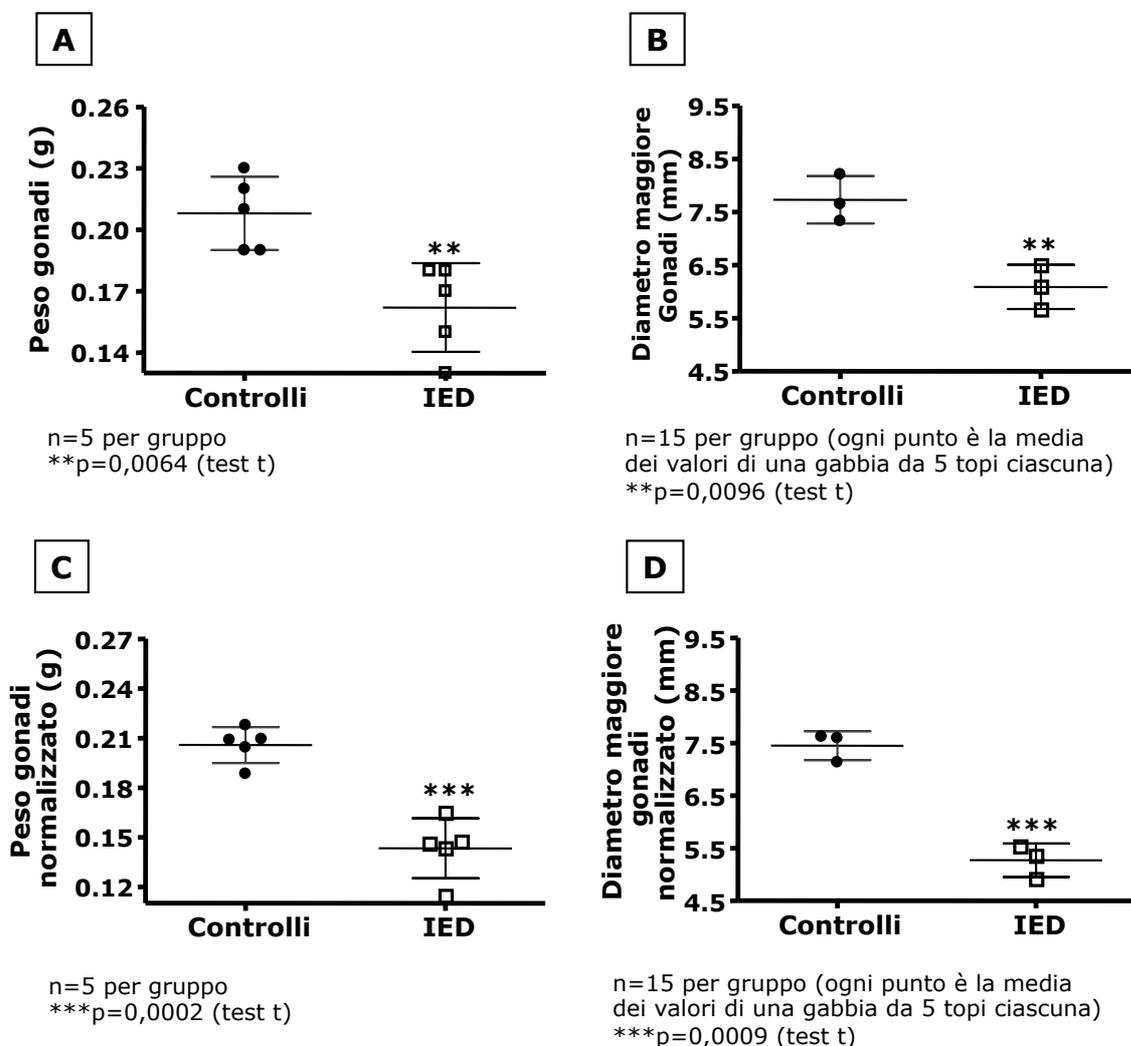
**Figura 9.2** Peso corporeo di topi controllo e IED misurato settimanalmente. La settimana 0 indica il peso dei topi all'arrivo in stabulario. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS (n=5 per gruppo); \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs i rispettivi Controlli (test t).

Settimane (dall'inizio della dieta)	Controlli (n=5)		IED (n=5)		Valore di p
	Cibo assunto per topo (g)	Media $\pm$ DS (g)	Cibo assunto per topo (g)	Media $\pm$ DS (g)	
1	22,46	23,84 $\pm$ 0,972	17,43	17,99 $\pm$ 0,976	p<0,0001
2	23,17		19,03		
3	23,56		19,08		
4	24,13		19,73		
5	23,69		18,08		
6	22,55		17,93		
7	23,74		17,45		
8	23,62		17,18		
9	24,58		16,42		
10	25,23		17,35		
11	25,48		18,23		

**Tabella 9.2** Cibo assunto in media da ciascun topo settimanalmente e complessivamente durante tutta la durata del trattamento. Il valore di p è riferito alla differenza tra le quantità di cibo assunte complessivamente tra i due gruppi (test t).

Per indagare se la dose e la durata del trattamento con ferro potessero indurre delle alterazioni anatomiche e macroscopiche sull'asse riproduttivo, abbiamo innanzitutto valutato la presenza di un'eventuale ipotrofia gonadica. Al momento del sacrificio (dopo 11 settimane di IED), si è proceduto all'isolamento dei testicoli e alla determinazione del peso e della lunghezza del diametro maggiore di tali organi. Se

considerati in modo assoluto, sia il peso (controlli:  $0,21 \pm 0,018$  g; IED:  $0,16 \pm 0,022$  g;  $p=0,0064$ ) che la lunghezza (controlli:  $7,73 \pm 0,45$  mm; IED:  $6,1 \pm 0,42$  mm;  $p=0,0096$ ) delle gonadi sono stati significativamente ridotti dalla dieta IED dopo 11 settimane di trattamento (**Figura 9.3, A. B.**). Poiché la riduzione del peso corporeo nei topi IED non è ascrivibile a una restrizione dietetica ma solo ad una spontanea minore assunzione di cibo, abbiamo normalizzato i valori assoluti dei parametri testicolari per il peso corporeo dell'animale a sua volta rapportato alla quantità di cibo assunta. In questo modo, si è mantenuta una riduzione significativa nel peso (controlli:  $0,21 \pm 0,011$  g; IED:  $0,14 \pm 0,018$  g;  $p=0,0002$ ) e nella lunghezza del diametro medio (controlli:  $7,45 \pm 0,28$  mm; IED:  $5,27 \pm 0,32$  mm;  $p=0,0009$ ) dei testicoli nei topi IED rispetto ai controlli (**Figura 9.3, C. D.**).



**Figura 9.3** Parametri testicolari in topi controllo e IED dopo 11 settimane di trattamento: i **pannelli A e B** rappresentano, rispettivamente, i valori assoluti di peso (g) e lunghezza del diametro maggiore (mm); i **pannelli C e D** illustrano, rispettivamente, il peso (g) e lunghezza del diametro maggiore (mm) normalizzati per il rapporto tra il peso di ciascun animale e il cibo assunto. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. La numerosità degli animali e il valore di p, calcolato mediante test t, sono riportati sotto a ciascun grafico.

### **9.1.2 Scelta del modello *in vitro* di sovraccarico marziale**

La creazione di due linee cellulari di neuroni GnRH immortalizzati, le GN e le GT1, ha facilitato l'approccio allo studio della biologia di tali neuroni *in vivo*. Questa indagine è stata a lungo ostacolata dalle caratteristiche peculiari dei neuroni GnRH, quali la differenza tra il sito di origine e quello di differenziazione e proliferazione, il processo migratorio durante le prime fasi di sviluppo embrionale, la bassa numerosità e la distribuzione sparsa a livello ipotalamico [361]. Questi due modelli cellulari derivano da un tumore indotto dopo trasfezione con un gene ibrido costituito dalla regione codificante per l'oncogene T-antigen del virus SV-40 (simian virus-40) sotto il controllo del promotore del gene umano (le GN) o di ratto (le GT) per il GnRH. In particolare, le GN sono generate da un tumore sviluppatosi a livello del placode olfattorio di topo [362], il sito di partenza della migrazione dei neuroni GnRH attraverso il bulbo olfattorio [24, 300]; diversamente, le GT1 originano da una dispersione di cellule di un tumore ipotalamico di topo [363, 364], la sede definitiva dei neuroni GnRH al termine del processo migratorio.

Nei nostri studi, abbiamo utilizzato rispettivamente i subcloni GN-11 e GT1-7. Queste due linee cellulari sono distinte per morfologia e fenotipo funzionale:

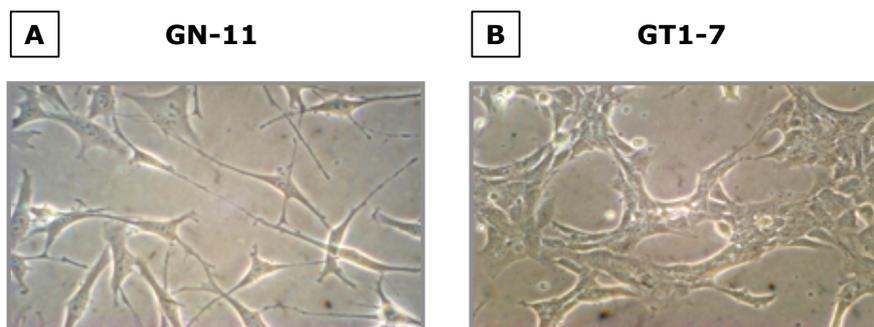
- le GN-11 presentano una forma bipolare e crescono in modo omogeneo senza formare cluster; poiché sono cellule del bulbo olfattorio corrispondono a neuroni immaturi e con spiccata abilità migratoria [24, 300, 365, 366] (**Figura 9.4, A.**);
- le GT1-7 sono cellule poligonali, ramificate e crescono in colonie interconnettendosi mediante i processi neuritici durante la crescita in coltura; la loro origine ipotalamica ne conferisce i requisiti tipici dei neuroni completamente differenziati, post-migratori, e GnRH-secernenti [365, 366], i cui corpi cellulari presentano strutture citoplasmatiche ben sviluppate, granuli secretori di GnRH ed alti livelli di mRNA codificante per tale ormone [364] (**Figura 9.4, B.**).

Le differenti caratteristiche biochimiche ed elettrofisiologiche di queste due linee cellulari permettono quindi di avere a disposizione due modelli di neuroni GnRH immortalizzati a due stadi evolutivi differenti e sfruttabili per scopi distinti:

- le GN-11, "GnRH-committed", per lo studio della migrazione neuronale;
- le GT1-7, "GnRH-secreting", per l'analisi della secrezione dell'ormone decapeptidico GnRH [366].

Entrambe le linee cellulari possono essere anche considerate come modelli di neuroni ipotalamici indipendentemente dalla loro capacità di secernere o meno il GnRH [367].

Per generare un modello ipotalamico *in vitro* di sovraccarico marziale, le GN-11 e le GT1-7 sono state trattate con il Citrato di Ammonio Ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ , FAC - "Ferric Ammonium Citrate"), un complesso di ferro ferrico solubile, a basso peso molecolare [368] e rapidamente internalizzabile dalle cellule [369]. FAC rappresenta un buon surrogato di accumulo marziale, nella forma di NTBI ("Non-Transferrin Bound Iron"), nelle cellule in coltura [368, 369] e nelle cellule cerebrali *in vivo* [214]. Il NTBI è la forma potenzialmente tossica per l'ambiente cellulare poiché è libero di partecipare alla reazione di Fenton con conseguente generazione e propagazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) [330]. L'intervallo di concentrazioni marziali a cui potrebbero essere sottoposte le cellule ipotalamiche in diverse condizioni fisiologiche e patologiche *in vivo* è di  $10 \mu\text{M}$  -  $1 \text{mM}$  [370]. In effetti, le concentrazioni di ferro legato alla transferrina (Tf) nel plasma sono comprese nell'intervallo  $9 - 30 \mu\text{M}$  mentre quelle nella corteccia cerebrale sono circa  $650 \mu\text{M}$  e possono raggiungere  $1 - 8.5 \text{mM}$  in condizioni patologiche severe [214]. Per tale ragione, le dosi di FAC utilizzate nel nostro modello sperimentale *in vitro* sono comprese tra  $100 \mu\text{M}$  e  $1 \text{mM}$ .



**Figura 9.4** Cellule GN-11 (**pannello A**) e GT1-7 (**pannello B**) mantenute nel terreno di crescita (DMEM + 10% FBS)

## 9.2 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO CELLULARE DI FERRO

### 9.2.1 *Ipotalamo*

Dall'analisi mediante spettrometria di assorbimento atomico è emerso come il contenuto di ferro totale nell'ipotalamo di topi IED ( $6,37 \pm 1,91 \mu\text{g}/100 \text{mg}$  di tessuto secco) non abbia subito variazioni rispetto a quello di topi controllo ( $6,37 \pm 2,28 \mu\text{g}/100 \text{mg}$  di tessuto secco) dopo 11 settimane di dieta IED (**Figura 9.5, A.**). Lo

stesso regime alimentare aveva provocato un sostanziale incremento nei livelli marziali epatici (controlli:  $27 \pm 21 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco; IED:  $501 \pm 277 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco;  $p=0,0004$ ) e del VAT (controlli:  $1,2 \pm 0,38 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco; IED:  $13,9 \pm 1,2 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco;  $p<0,0001$ ) negli esperimenti condotti a livello periferico sullo stesso modello sperimentale dal nostro gruppo di lavoro (grafici non mostrati) [1].

### **9.2.2 GN-11 e GT1-7**

Il contenuto di ferro totale nelle colture cellulari ipotalamiche in condizioni basali è stato determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico. I valori intracellulari marziali delle GN-11 dopo mantenimento per 24 ore nel loro medium di crescita (DMEM + 10% FBS - "Fetal Bovine Serum") sono circa due volte più elevati rispetto a quelli delle GT1-7 nelle stesse condizioni, come indicato dal loro specifico contenuto di ferro:  $0,013 \pm 0,018 \mu\text{g}/10^6$  cellule ( $203,7 \mu\text{g}/\text{L}$ ) per le GN-11 e  $0,0077 \pm 0,46 \mu\text{g}/10^6$  cellule ( $103,5 \mu\text{g}/\text{L}$ ) per le GT1-7 (**Figura 9.5, B. C.** barre nere).

Per determinare la capacità di queste cellule di accumulare ferro, FAC è stato aggiunto al terreno di crescita alla dose di  $200 \mu\text{M}$  per 24 ore. In entrambe le linee cellulari si è assistito a un aumento significativo del ferro totale intracellulare sebbene l'accumulo sia stato molto più marcato nelle cellule GN-11. Infatti, le concentrazioni marziali nelle GN-11 hanno subito un aumento di 10 volte ( $0,13 \pm 0,52 \mu\text{g}/10^6$  cellule o  $3043,2 \mu\text{g}/\text{L}$ ;  $p<0,0001$ ) mentre nelle GT1-7 di circa 5 volte ( $0,042 \pm 0,46 \mu\text{g}/10^6$  cellule o  $382,7 \mu\text{g}/\text{L}$ ;  $p<0,001$ ) (**Figura 9.5, B. C.** barre bianche).

L'accumulo marziale selettivo in entrambi i modelli cellulari suggerisce che tali sistemi *in vitro* siano in grado di soddisfare i meccanismi fisiologici alla base della captazione del ferro [371].

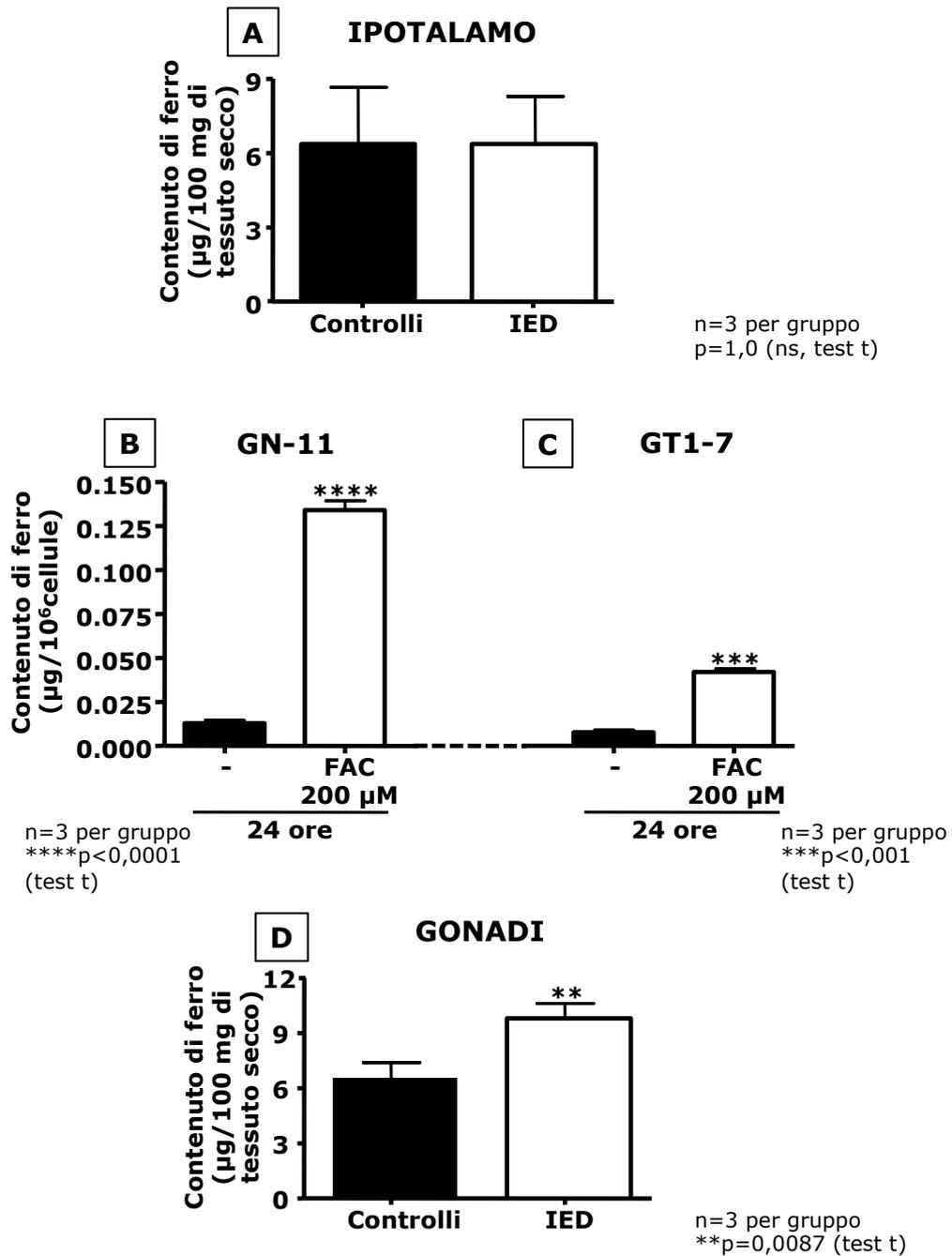
### **9.2.3 Ipofisi**

Le ridotte dimensioni delle ipofisi di topo e la necessità di conservare tale tessuto per analisi di espressione genica (vedi in seguito) non hanno consentito di dosare il contenuto intracellulare di ferro mediante spettrometria di assorbimento atomico.

### **9.2.4 Gonadi**

Le gonadi dei topi IED hanno evidenziato la capacità di accumulare il ferro di origine alimentare come emerge dall'aumento dello specifico contenuto marziale dopo 11

settimane di dieta IED ( $9,80 \pm 0,82 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco) rispetto ai topi controllo ( $6,57 \pm 0,83 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$  di tessuto secco;  $p=0,0087$ ) (**Figura 9.5, D.**).



**Figura 9.5** Dosaggio del contenuto di ferro mediante spettrometria di assorbimento atomico: (**A**) nell'ipotalamo di topi controllo e IED dopo 11 settimane di dieta; in cellule (**B**) GN-11 e (**C**) GT1-7 incubate o meno con FAC 200  $\mu\text{M}$  per 24 ore; (**D**) nelle gonadi di topi controllo e IED dopo 11 settimane di dieta. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. La numerosità e il valore di p, calcolato mediante test t sono riportati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

## 9.3 TOSSICITÀ DEL FERRO A LIVELLO CELLULARE

Gli studi di tossicità cellulare sono stati condotti solo nelle GN-11 poiché è emerso che tali cellule contengono livelli basali di ferro più elevati delle GT1-7 e ne assorbono una maggiore quantità dopo trattamento con FAC. Le GN-11 sono quindi potenzialmente più a rischio di tossicità derivante dalla maggior quota di ferro captato.

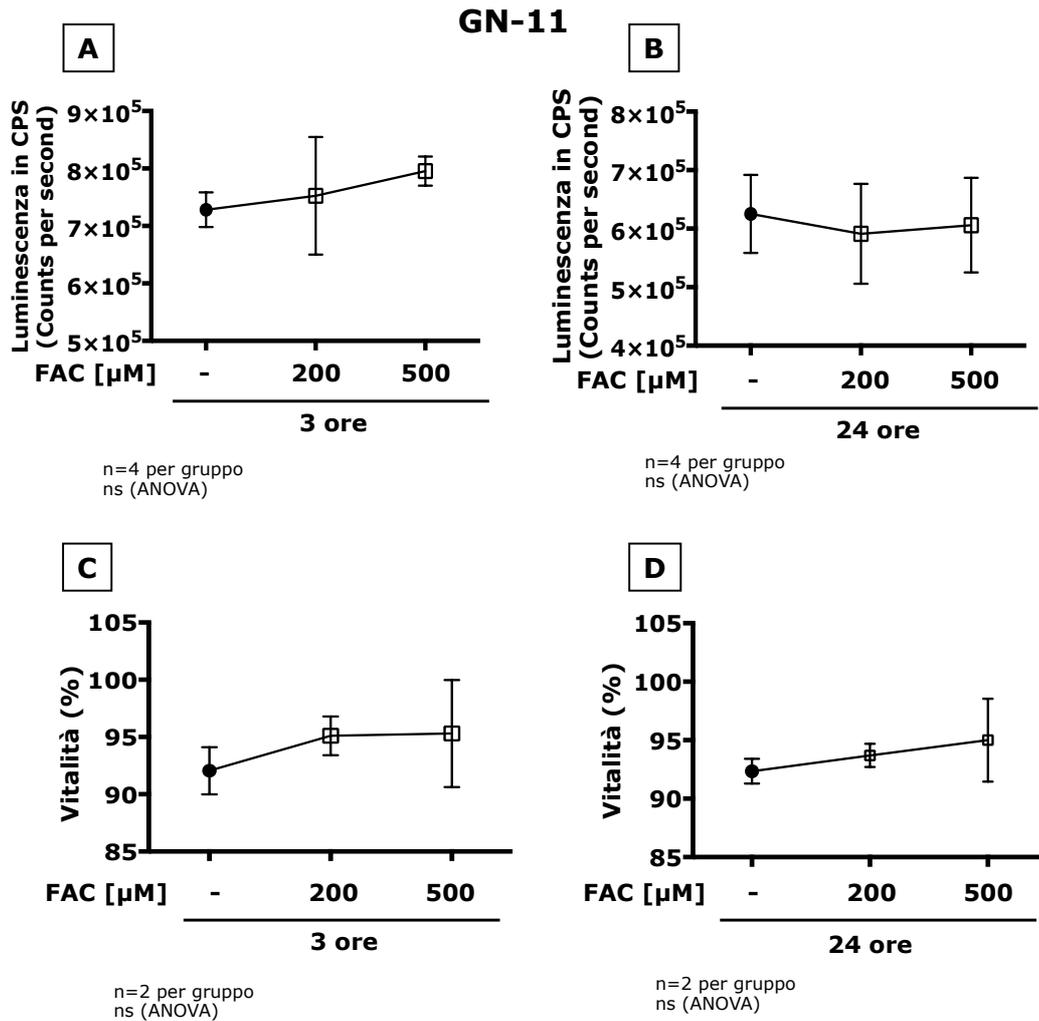
### 9.3.1 GN-11

Per determinare se l'accumulo di NTBI potesse indurre alterazioni nella vitalità delle cellule GN-11, queste ultime sono state incubate per 3 e 24 ore con FAC alle concentrazioni di 200 e 500  $\mu\text{M}$ . La vitalità è stata misurata con due diversi metodi:

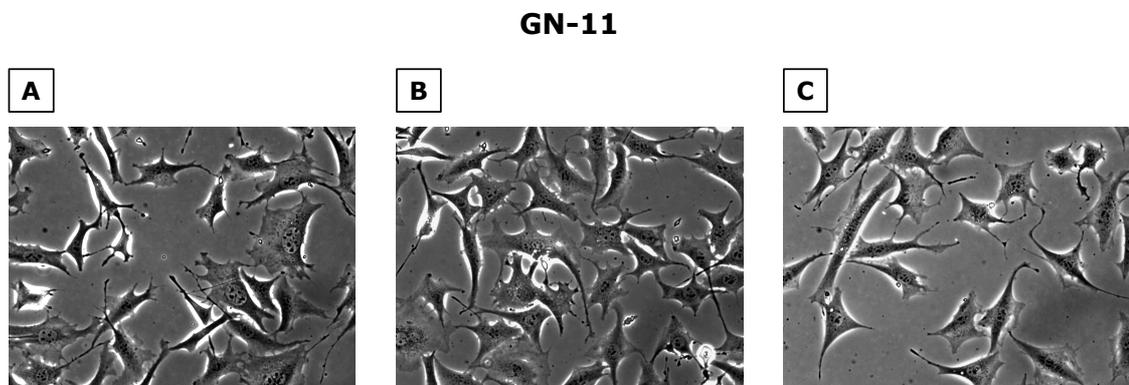
- il sistema ATPlite™ 1step (Luminescence ATP Detection Assay System) che consente di quantificare le cellule vitali in coltura basandosi sulla quantificazione indiretta dell'ATP presente;
- metodo di esclusione del Trypan Blue tramite il contatore di cellule automatizzato Luna™.

L'accumulo cellulare di ferro non è stato accompagnato da una riduzione della vitalità come indicato, con il primo dei suddetti metodi, dall'assenza di variazioni nel contenuto di ATP (**Figura 9.6, A. B.**) e, con il secondo test, dal numero invariato di cellule vive e morte (**Figura 9.6, C. D.**) a tutte le dosi e le tempistiche di FAC testate in rapporto alle rispettive cellule controllo (no FAC).

Per apportare un'ulteriore prova dell'assenza di tossicità del FAC nelle GN-11, è stata analizzata la morfologia di tali cellule al microscopio ottico dopo trattamento con FAC 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  per 24 ore nel terreno di crescita. Come si evince dalla **Figura 9.7, A. B. C**, la presenza di FAC nel medium non ha indotto cambiamenti di morfologia né segni di sofferenza rispetto alle analoghe cellule non trattate.



**Figura 9.6** Determinazione della vitalità delle cellule GN-11 dopo esposizione a FAC 200  $\mu\text{M}$  o 500  $\mu\text{M}$  per 3 ore (**pannelli A, C**) o 24 ore (**pannelli B, D**) mediante due diverse tecniche: il sistema ATPlite™ 1step (Luminescence ATP Detection Assay System) (**pannelli A, B**) o il metodo di esclusione del Trypan Blue con il contatore di cellule automatizzato Luna™ (**pannelli C, D**). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. La numerosità e il valore di p, determinato mediante ANOVA, sono riportati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.



**Figura 9.7** Valutazione mediante microscopio ottico della morfologia delle cellule GN-11 in condizioni basali (**pannello A**) e dopo trattamento con FAC alla dose di 200  $\mu\text{M}$  (**pannello B**) e 500  $\mu\text{M}$  (**pannello C**) per 24 ore. Le immagini riportate sono un esempio rappresentativo di 3 diversi esperimenti.

## 9.4 ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TfR), DELLA FERRITINA H (FtH) E DI EPCIDINA

### 9.4.1 *Ipotalamo*

La sintesi dell'mRNA del recettore della transferrina (TfR), della ferritina H (FtH) e di epcidina nell'ipotalamo è stata accertata mediante RT-qPCR ed i livelli di espressione sono stati rapportati a quelli epatici. Come si evince dalla **Tabella 9.3**, la quantità di mRNA del TfR e della FtH nell'ipotalamo è paragonabile a quella nel fegato mentre, a conferma di studi in letteratura condotti sul topo [225, 269], la sintesi ipotalamica di epcidina è notevolmente ridotta rispetto a quella epatica. Per tale ragione si è deciso di focalizzare la nostra attenzione solo su TfR e FtH.

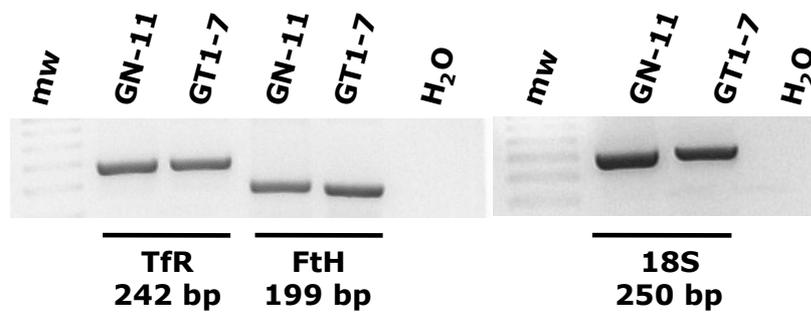
GENE	FEGATO	IPOTALAMO
<b>TfR</b>	100 ± 1,20	107,6 ± 3,4
<b>FtH</b>	100 ± 1,06	93,4 ± 1,9
<b>Epcidina</b>	100 ± 0,08	6,9 ± 1,9

**Tabella 9.3** Livelli di espressione degli mRNA di TfR, FtH e epcidina nell'ipotalamo e nel fegato. I dati (media ± SEM, n=3 per gruppo) sono espressi come differenza tra i cicli (Ct) dei geni di interesse e i Ct del gene costitutivo 18S. L'espressione genica ipotalamica è rapportata a quella epatica posta uguale a 100%.

### 9.4.2 *GN-11 e GT1-7*

Poiché dalla letteratura non emergono evidenze in merito all'utilizzo delle linee cellulari GN-11 e GT1-7 per lo studio degli effetti del sovraccarico marziale, abbiamo indagato se vi fossero i presupposti molecolari per l'utilizzo di tali modelli cellulari per il nostro studio con il ferro. Nello specifico, mediante analisi RT-PCR, è stata valutata l'espressione genica del TfR e della FtH nelle cellule GN-11 e GT1-7 mantenute nel consueto medium di crescita (DMEM + 10% FBS). I campioni contenenti gli RNA totali sono stati sottoposti, inizialmente, a reazione di trascrizione inversa (RT) e, successivamente, ad amplificazione del cDNA ottenuto. L'espressione del gene costitutivo 18S, indicata da un prodotto amplificato di 250 paia di basi (bp), è stata utilizzata per confermare il buon esito della reazione di retrotrascrizione. In tutti i campioni analizzati, l'espressione di TfR e di FtH è stata dimostrata dalla presenza di prodotti amplificati rispettivamente di 242 e 199 bp. Il corretto funzionamento della reazione RT-PCR e l'assenza di contaminazioni sono stati accertati dalla mancata presenza di bande nel controllo negativo, ovvero privo di cDNA (H<sub>2</sub>O) (**Figura 9.8**).

Sulla base dei presenti risultati, si è quindi dedotto che, da un punto di vista genico, le cellule GN-11 e GT1-7 esprimono le proteine essenziali per l'internalizzazione (TfR) e il deposito intracellulare di ferro (FtH). Tali linee cellulari rappresentano quindi dei buoni "tools" traslazionali per lo studio degli effetti centrali (ipotalamo) del sovraccarico marziale.



**Figura 9.8** Analisi RT-PCR dell'espressione genica del TfR e della FtH nelle cellule GN-11 e GT1-7. L'immagine mostra anche il trascritto del gene costitutivo 18S. Mw: marker di peso molecolare. H<sub>2</sub>O: campione contenente la miscela di reazione ad eccezione del campione di cDNA (controllo negativo).

### 9.4.3 *Gonadi*

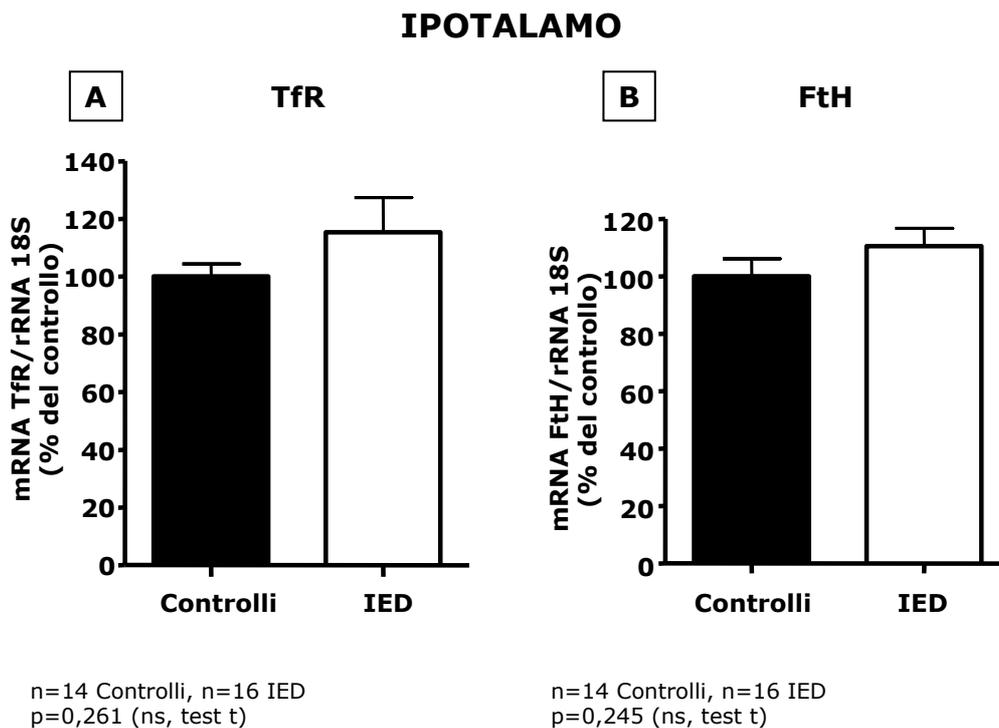
Mediante RT-qPCR è stata anche confermata l'espressione genica di TfR, FtH e epcidina nel tessuto testicolare (vedi sezione seguente Figura 12, A. B. C.)

## 9.5 MODULAZIONE DEI GENI SENSIBILI AL FERRO (TfR, FtH e, nelle gonadi, epcidina)

Quando i livelli marziali eccedono le necessità cellulari e tissutali, il sistema IRE/IRP ("Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein") minimizza la captazione di ferro mediante riduzione dell'espressione del TfR e favorisce l'immagazzinamento dell'eccesso di ferro nella Ft (Ferritina) incrementandone la sintesi. L'organismo risponde al sovraccarico marziale anche aumentando la concentrazione di epcidina che, a sua volta, degrada la ferroportina con conseguente riduzione dell'assorbimento di ferro dietetico e promozione della ritenzione di ferro nei macrofagi [329].

### 9.5.1 *Ipotalamo*

In analogia con studi in letteratura incentrati sugli effetti del sovraccarico di ferro sull'espressione cerebrale di geni specifici correlati al metabolismo marziale [264-266, 372], nel nostro modello murino, non si sono osservati cambiamenti nei livelli dei trascritti ipotalamici per il TfR ( $p=0,261$ ) e la FtH ( $p=0,245$ ) nei topi IED rispetto ai controlli (**Figura 9.9, A. B.**). L'analisi RT-qPCR è stata condotta su campioni di RNA totale estratto da ipotalami interi di topi alimentati con IED per 9, 11 e 16 settimane (questi ultimi sono gli animali su cui sono stati condotti i primi esperimenti per la caratterizzazione del fenotipo metabolico) [1]. In tal modo è stata esclusa l'eventualità che il trattamento per 9 e 11 settimane non fosse stato sufficiente per indurre modificazioni centrali dello stato di ferro. Poiché i 3 diversi periodi di trattamento hanno mostrato il medesimo andamento si è deciso di riunirli in un unico gruppo rispettivamente per i topi controllo e per i topi IED.

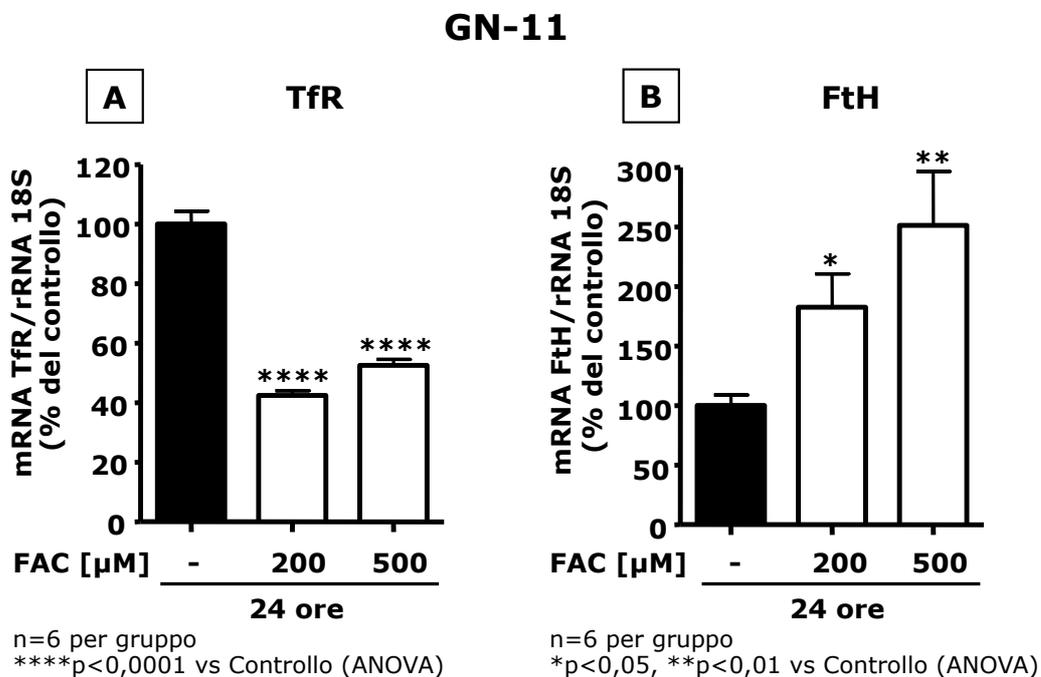


**Figura 9.9** Effetti della manipolazione dietetica del ferro sul metabolismo marziale ipotalamico. Analisi RT-qPCR dell'espressione genica del TfR (**pannello A**) e della FtH (**pannello B**) in ipotalami interi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9, 11 e 16 settimane di trattamento. I 3 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene d'interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali per ciascun gruppo e il valore di  $p$ , ottenuto mediante test  $t$ , sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

### 9.5.2 GN-11 e GT1-7

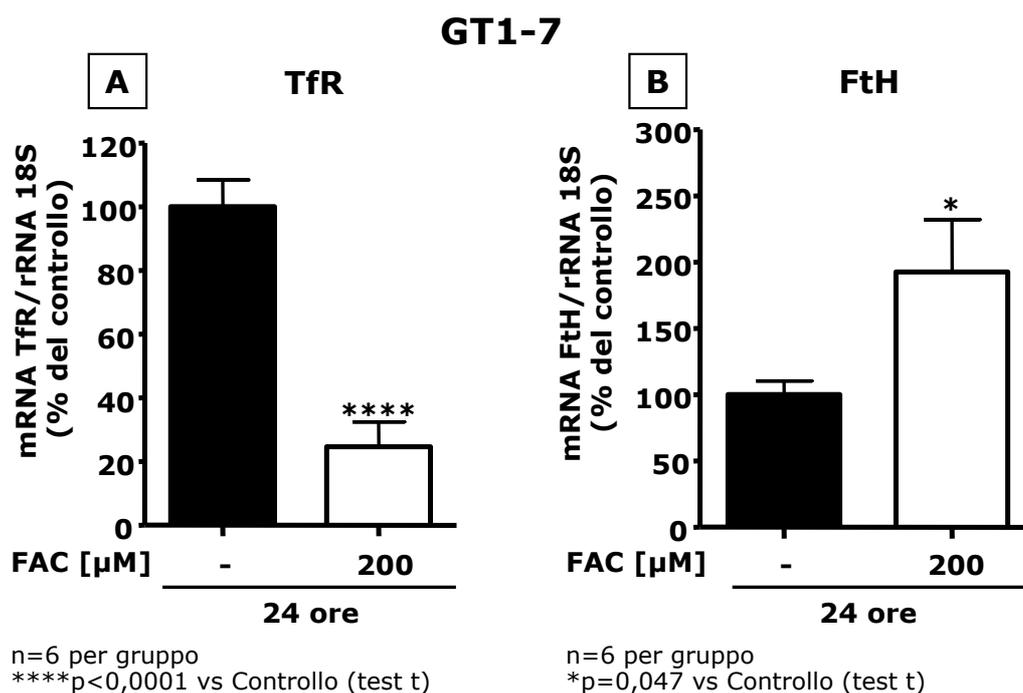
Mediante analisi RT-qPCR, è stata indagata la capacità delle cellule GN-11 e GT1-7 di rispondere alla variazione della concentrazione di ferro nel medium di crescita tramite la modulazione della trascrizione genica delle proteine coinvolte nella regolazione dell'omeostasi marziale (TfR e FtH).

L'aggiunta di FAC alle dosi di 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  nel medium delle cellule GN-11 per 24 ore ha determinato una riduzione dell'espressione genica del TfR (FAC 200  $\mu\text{M}$ : -58%,  $p < 0,0001$ ; FAC 500  $\mu\text{M}$ : -47%,  $p < 0,0001$ ) e, al contrario, un incremento dei livelli di mRNA della FtH (FAC 200  $\mu\text{M}$ : +83%,  $p < 0,05$ ; FAC 500  $\mu\text{M}$ : +151%,  $p < 0,01$ ) (**Figura 9.10, A. B.**).



**Figura 9.10** Effetti dell'aumento della concentrazione di ferro sull'omeostasi marziale delle cellule GN-11. Analisi RT-qPCR della modulazione dell'mRNA del TfR (**pannello A**) e della FtH (**pannello B**) nelle cellule GN-11 dopo trattamento (barre bianche) o meno (barre nere) con FAC alle dosi di 200 e 500  $\mu\text{M}$  per 24 ore. I livelli di ciascun gene d'interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate), posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e il valore di p, determinato tramite ANOVA, sono indicati sotto a ciascun grafico.

L'aggiunta di FAC 200  $\mu\text{M}$  al medium delle GT1-7 per 24 ore ha portato ad un notevole calo nell'espressione dell'mRNA del TfR (-75,32%,  $p < 0,0001$ ) e un contemporaneo aumento di quello della FtH (+92,5%,  $p = 0,047$ ) (**Figura 9.11, A. B.**). A parità di dose di ferro (FAC 200  $\mu\text{M}$ ), le GT1-7 si sono mostrate più responsive delle GN-11 nella modulazione dei geni del TfR e della FtH.

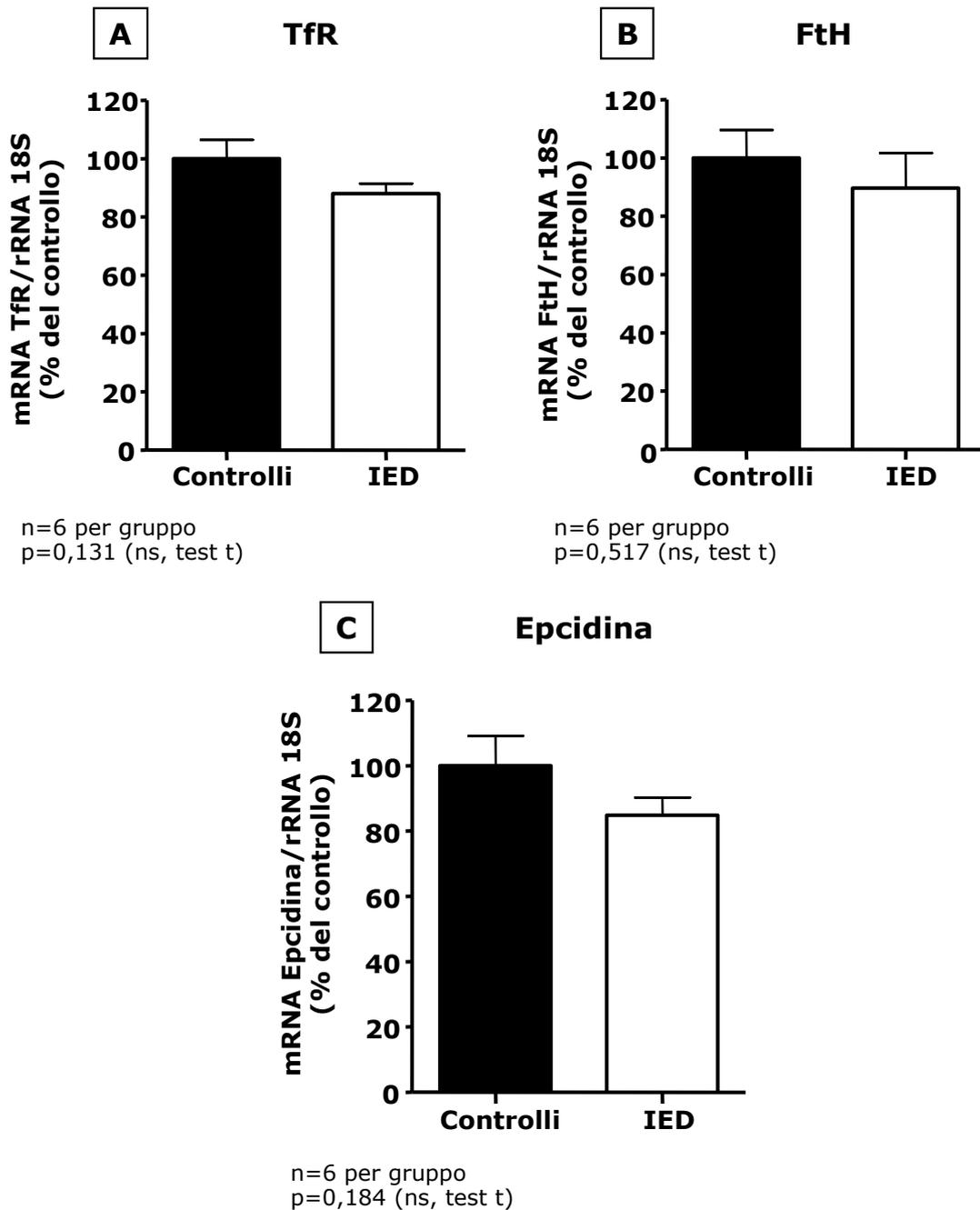


**Figura 9.11** Effetti dell'aumento della concentrazione di ferro sull'omeostasi marziale delle cellule GT1-7. Analisi RT-qPCR dell'espressione genica del TfR (**pannello A**) e della FtH (**pannello B**) nelle cellule GT1-7 dopo trattamento (barre bianche) o meno (barre nere) con FAC alla concentrazione di 200 µM per 24 ore. I livelli di ciascun gene d'interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media ± SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate), posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e il valore di p, determinato mediante test t, sono indicati sotto a ciascun grafico.

### 9.5.3 *Gonadi*

L'analisi RT-qPCR condotta sull'RNA estratto dalle gonadi dopo 9 e 11 settimane di trattamento non ha mostrato variazioni nell'espressione genica di TfR ( $p=0,131$ ), FtH ( $p=0,517$ ) ed epcidina ( $p=0,184$ ) tra topi IED e controllo (**Figura 9.12, A. B. C**), analogamente a quanto osservato nell'ipotalamo.

## GONADI



**Figura 9.12** Effetti della manipolazione dietetica del ferro sul metabolismo marziale nelle gonadi. Analisi RT-qPCR dell'espressione genica del TfR (**pannello A**), della FtH (**pannello B**) e di epcidina (**pannello C**) nei testicoli di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9 e 11 settimane di trattamento. I 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene d'interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e il valore di p, determinato tramite test t, sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

## 9.6 EFFETTO DELL'ACCUMULO MARZIALE SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE GN-11

Il GnRH è l'ormone ipotalamico chiave nel controllo della funzione riproduttiva. L'iniziazione della cascata riproduttiva in tutte le specie di mammiferi richiede il completamento, durante l'età embrionale, di un complesso programma di sviluppo che consiste nella migrazione dei neuroni GnRH dai placodi olfattori, lungo i nervi olfattori e attraverso il compartimento nasale, nel prosencefalo ed infine nell'ipotalamo dove promuovono la competenza riproduttiva [23, 24, 373, 374].

Mediante il saggio di microchemiotassi della camera di Boyden, è stato testato l'effetto del ferro sulla capacità migratoria delle cellule GN-11, un validato modello per studi di migrazione cellulare [373, 375]. In assenza di fattori chemiotattici, le GN-11 hanno mostrato una motilità spontanea molto esigua (dati non mostrati). Al contrario, una maggiore risposta migratoria è stata indotta dall'esposizione di tali cellule all'1% di FBS, un potente agente chemiotattico [365, 366]. Per tale ragione, la migrazione delle GN-11 indotta dall'1% di FBS è stata considerata come controllo interno positivo, in termini di percentuale di cellule migrate.

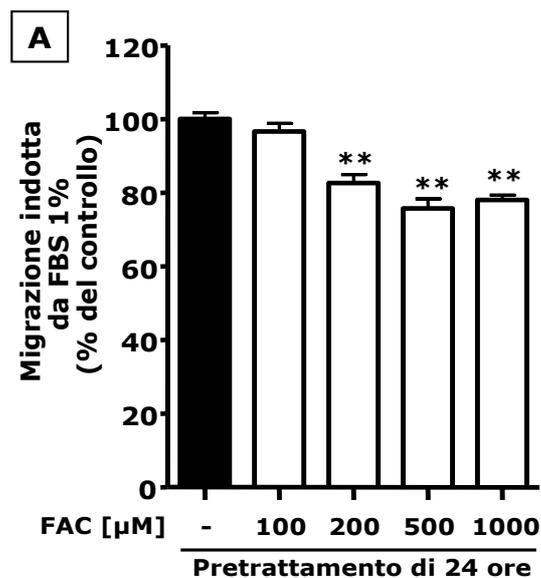
Le cellule GN-11 sono state pretrattate per 24 ore con diverse concentrazioni (100, 200, 500, 1000  $\mu$ M) di FAC e quindi esposte per 1 ora e 45 minuti all'1% di FBS nella camera di Boyden. L'aggiunta di FAC ha determinato una riduzione dose-dipendente della chemomigrazione indotta da FBS a partire da una concentrazione pari a 200  $\mu$ M (-17%,  $p < 0,01$ ) raggiungendo il massimo di inibizione alla dose di 500  $\mu$ M (-24%,  $p < 0,01$ ). Il trattamento con concentrazioni più elevate di FAC non ha comportato un'ulteriore diminuzione della migrazione stimolata dall'1% di FBS (**Figura 9.13, A.**).

Poiché tale lavoro di tesi ha previsto l'indagine del contributo di specifiche vie di segnale sull'inibizione, FAC-dipendente, delle cellule GN-11 esposte all'1% di FBS (vedi in seguito), si è reso necessario valutare l'effetto di dosi crescenti di FAC con tempi d'incubazione più brevi prima del caricamento nella camera di Boyden. Il pretrattamento delle cellule GN-11 per 1 ora con FAC alle concentrazioni di 200, 500 e 1000  $\mu$ M, prima del caricamento nella camera di Boyden a contatto con l'1% di FBS, ha comportato un'inibizione della migrazione FBS-indotta con un profilo analogo rispetto a quello ottenuto dopo pretrattamento per 24 ore con FAC alle medesime dosi (FAC 200  $\mu$ M vs Controllo: -34%,  $p < 0,001$ ; FAC 500  $\mu$ M vs Controllo: -38%,  $p < 0,001$ ; FAC 1000  $\mu$ M vs Controllo: -14%,  $p < 0,01$ ) (**Figura 9.13, B.**).

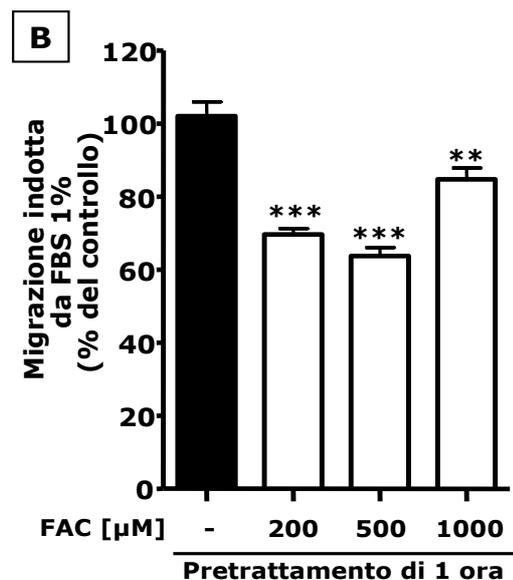
Successivamente, le GN-11 sono state pretrattate per 24, 48 e 72 ore con FAC 200  $\mu$ M e quindi esposte per 1 ora e 45 minuti all'1% di FBS, come chemoattrattore. FAC

ha inibito la chemomigrazione stimolata da FBS in modo tempo-dipendente e tale riduzione è risultata significativa a partire da 24 ore (-23%,  $p < 0,01$ ), per raggiungere la massima percentuale di inibizione a 72 ore (-36%,  $p < 0,001$ ) (**Figura 9.13, C.**).

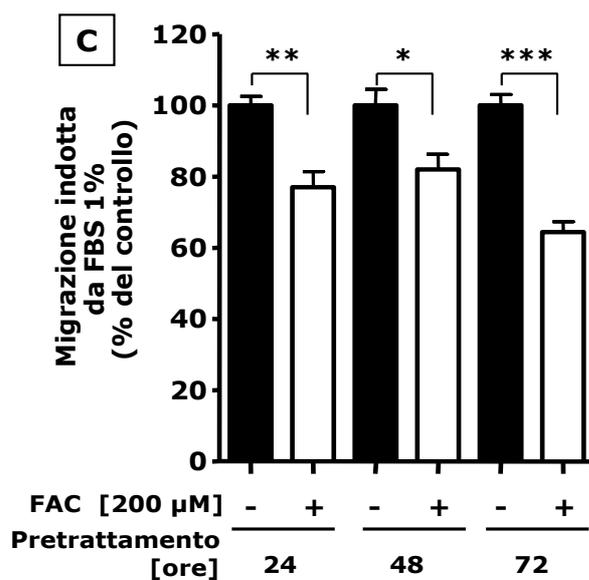
L'effetto antimigratorio indotto dal trattamento con ferro è stato confermato dall'associazione in rapporto molare 1:1 del FAC (200  $\mu\text{M}$ ) con un agente chelante del ferro esadentato, il DFO (deferossamina mesilato) (200  $\mu\text{M}$ ), per 24 ore. Tale associazione ha annullato l'effetto inibitorio del ferro sulla migrazione FBS-indotta delle cellule GN-11, ripristinando livelli migratori simili a quelli delle cellule controllo non trattate. Come atteso, la deprivazione del contenuto di ferro normale delle cellule GN-11, mediante incubazione con solo DFO alla dose di 200  $\mu\text{M}$  per 24 ore, ha dimezzato la migrazione basale, indotta da 1% di FBS, delle cellule GN-11 (-49%;  $p < 0,001$ ) (**Figura 9.13, D.**).



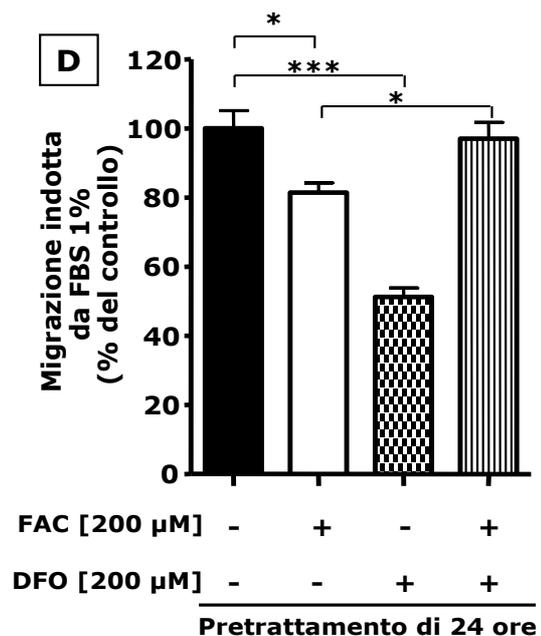
n=8 per gruppo  
\*\*p<0,01 vs Controllo (ANOVA)



n=10 per gruppo  
\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs Controllo (ANOVA)



n=6 per gruppo  
\*p<0,05, \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 (ANOVA)



n=6 per gruppo  
\*p<0,05, \*\*\*p<0,001 (ANOVA)

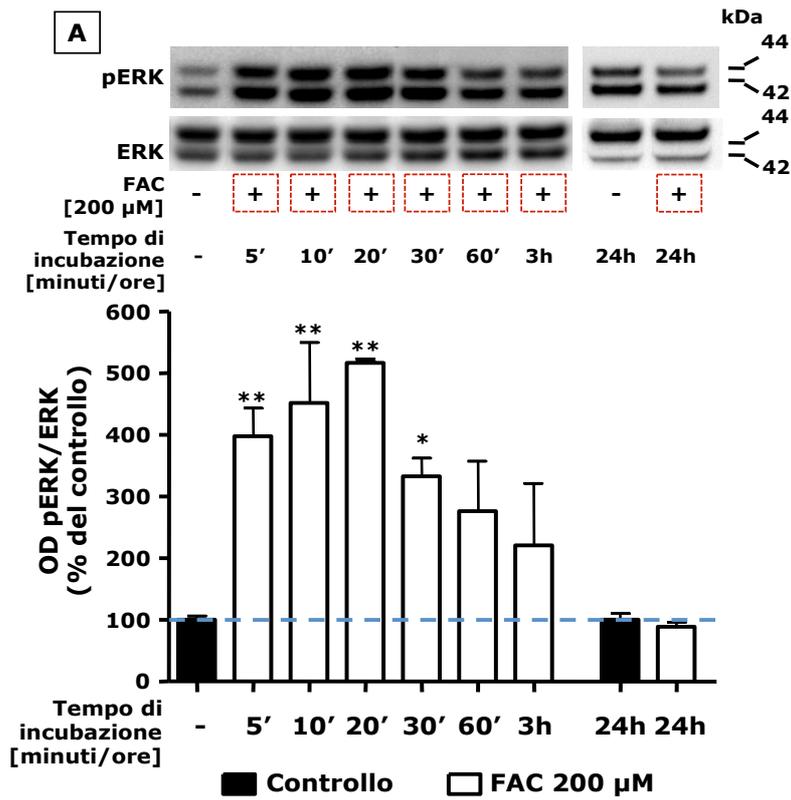
**Figura 9.13** Analisi mediante camera di Boyden della risposta chemiotattica delle cellule GN-11 al trattamento con FAC. Le cellule GN-11 sono state sottoposte ai seguenti trattamenti: dosi crescenti di FAC (100 – 1000  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore (**pannello A**) o per 1 ora (**pannello B**); FAC 200  $\mu\text{M}$  per tempi crescenti (24 – 72 ore) (**pannello C**); DFO (200  $\mu\text{M}$ ) da solo o in associazione con FAC (200  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore (**pannello D**). Successivamente le cellule GN-11 sono state esposte nella camera di Boyden all'agente chemioattrattore (DMEM con l'1% di FBS) per 1 ora e 45 minuti. I dati (media  $\pm$  SEM in 3 diversi esperimenti) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate esposte a DMEM 1% FBS, barre nere) posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e i valori di p, determinati mediante ANOVA, sono riportati sotto a ciascun grafico.

## 9.7 EFFETTO DEL SOVRACCARICO MARZIALE SULLA MODULAZIONE DEL SIGNALING NELLE CELLULE GN-11

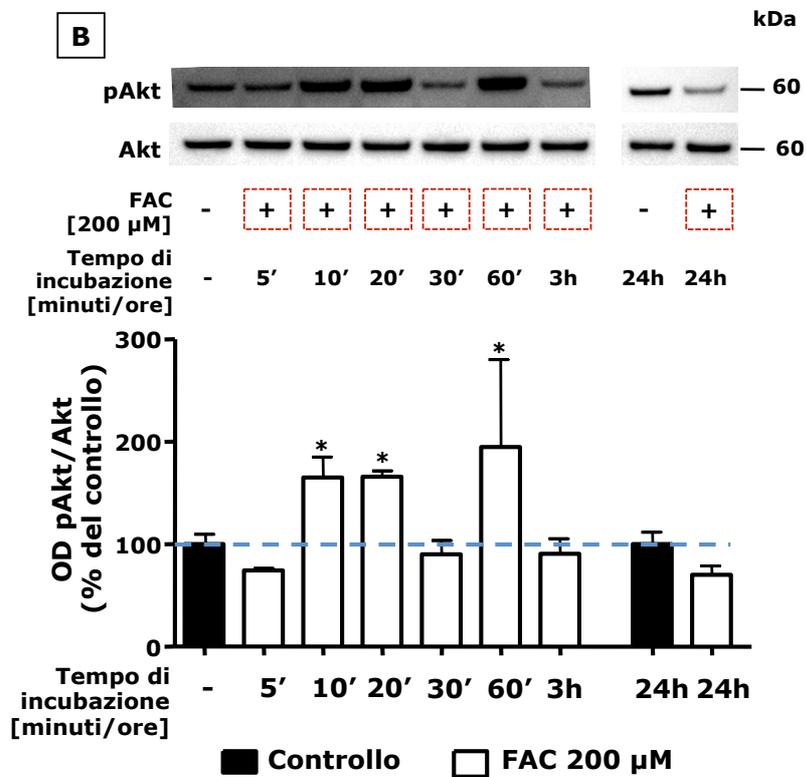
Poiché il ferro ha mostrato un effetto inibitorio sulla chemomigrazione stimolata da FBS delle cellule GN-11, si è voluto indagare il concomitante pattern di attivazione di specifiche vie intracellulari di trasduzione del segnale. In particolare, tale analisi si è focalizzata sulla cinetica di attivazione delle vie di ERK1/2 (Extracellular-Signal-Regulated Kinase 1/2), Akt e AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) poiché, da nostri precedenti studi, era emerso il diverso coinvolgimento di tali vie nel processo migratorio delle cellule GN-11 [373, 375].

Le cellule GN-11 sono state mantenute in medium deprivato di siero per 15 ore e, successivamente, trattate con FAC (200  $\mu$ M) per tempi compresi tra 5 minuti e 24 ore. Ai tempi indicati, le cellule sono state raccolte e gli estratti proteici totali sono stati immunoblottati con anticorpi anti-fosfo (p) ERK1/2, anti-pAkt e anti-pAMPK e quindi con anticorpi anti-ERK1/2, anti-Akt e anti-AMPK. I valori ottenuti per le proteine fosforilate sono stati normalizzati rispetto a quelli registrati per le corrispondenti proteine basali che sono risultate costitutivamente espresse in tale linea cellulare. L'analisi Western Blotting ha evidenziato la capacità di FAC di modulare la fosforilazione e quindi l'attivazione di ERK1/2, Akt e AMPK con profili differenti. Nello specifico:

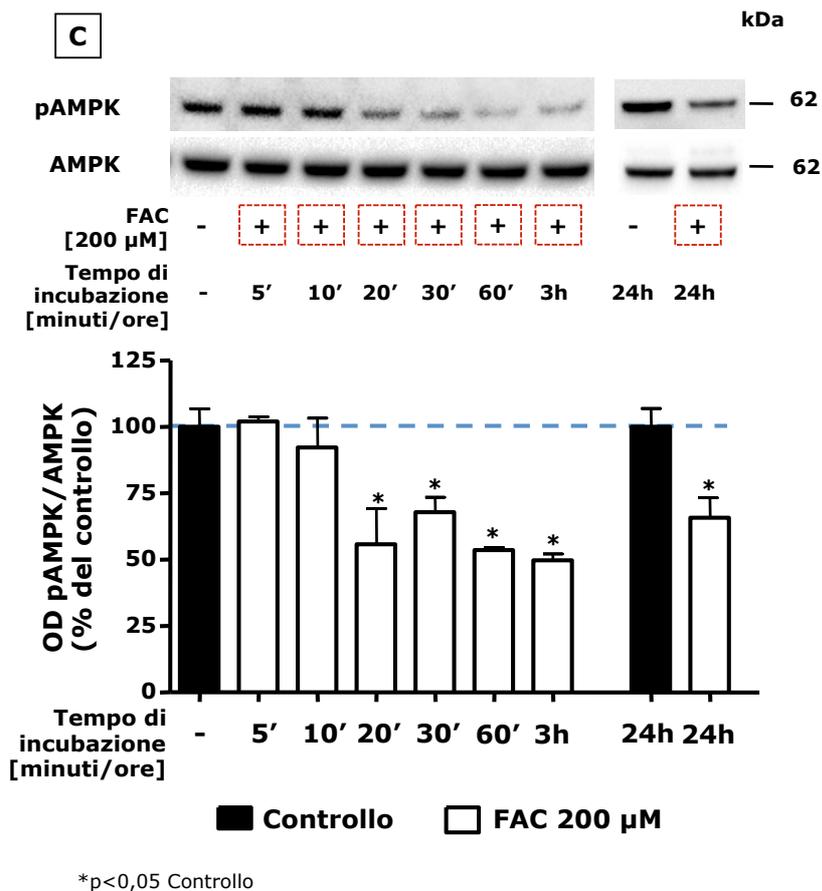
- ERK1/2 ha subito una rapida (5 minuti) fosforilazione che è aumentata gradualmente dopo 10 e 20 minuti di incubazione con FAC. Nei tempi successivi (30, 60 e 180 minuti) i livelli di pERK si sono progressivamente ridotti fino al ritorno a valori basali a 24 ore. Non sono stati identificati cambiamenti significativi nei livelli basali di ERK1/2 (**Figura 9.14, A.**).
- pAkt aumenta dopo 10, 20 e 60 minuti di trattamento con FAC e non subisce variazioni significative negli altri tempi di incubazione analizzati (5, 30, 180 minuti e 24 ore). Non è stata osservata alcuna modificazione nei livelli basali di Akt (**Figura 9.14, B.**).
- La fosforilazione di AMPK ha mostrato un profilo di attivazione diverso rispetto a ERK1/2 e Akt: si è registrata una diminuzione dei valori di pAMPK dopo 20, 30, 60 e 180 minuti di incubazione con FAC e tale effetto si è mantenuto anche dopo 24 ore. I livelli basali di espressione di AMPK non sono stati modificati (**Figura 9.14, C.**).



\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs Controllo



\*p<0,05 Controllo



**Figura 9.14** Effetto del trattamento con FAC 200 μM sulla fosforilazione (p) di ERK1/2 (**pannello A**), Akt (**pannello B**) e AMPK (**pannello C**) nelle cellule GN-11. Tutti gli esperimenti e le analisi statistiche descritte in questa figura sono state condotte come segue: le cellule sono state deprivate di siero per 15 ore e quindi esposte o meno a FAC 200 μM per 5 – 60 minuti, 3 ore e 24 ore. 20 μg di estratto proteico di ciascun campione sono stati analizzati mediante Western Blotting. L'analisi densitometrica è relativa a 5 esperimenti indipendenti di cui è mostrato un blot rappresentativo. I dati (media ± SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate, barre nere) posto uguale a 100%. I valori di p, ottenuti tramite ANOVA, sono indicati sotto a ciascun grafico. I livelli di pERK1/2 (**pannello A**), pAkt (**pannello B**) e pAMPK (**pannello C**) sono stati normalizzati, rispettivamente, su quelli di ERK1/2, Akt e AMPK.

## 9.8 VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELL'INIBIZIONE FERRO-DIPENDENTE DELLA CHEMOMIGRAZIONE DELLE CELLULE GN-11

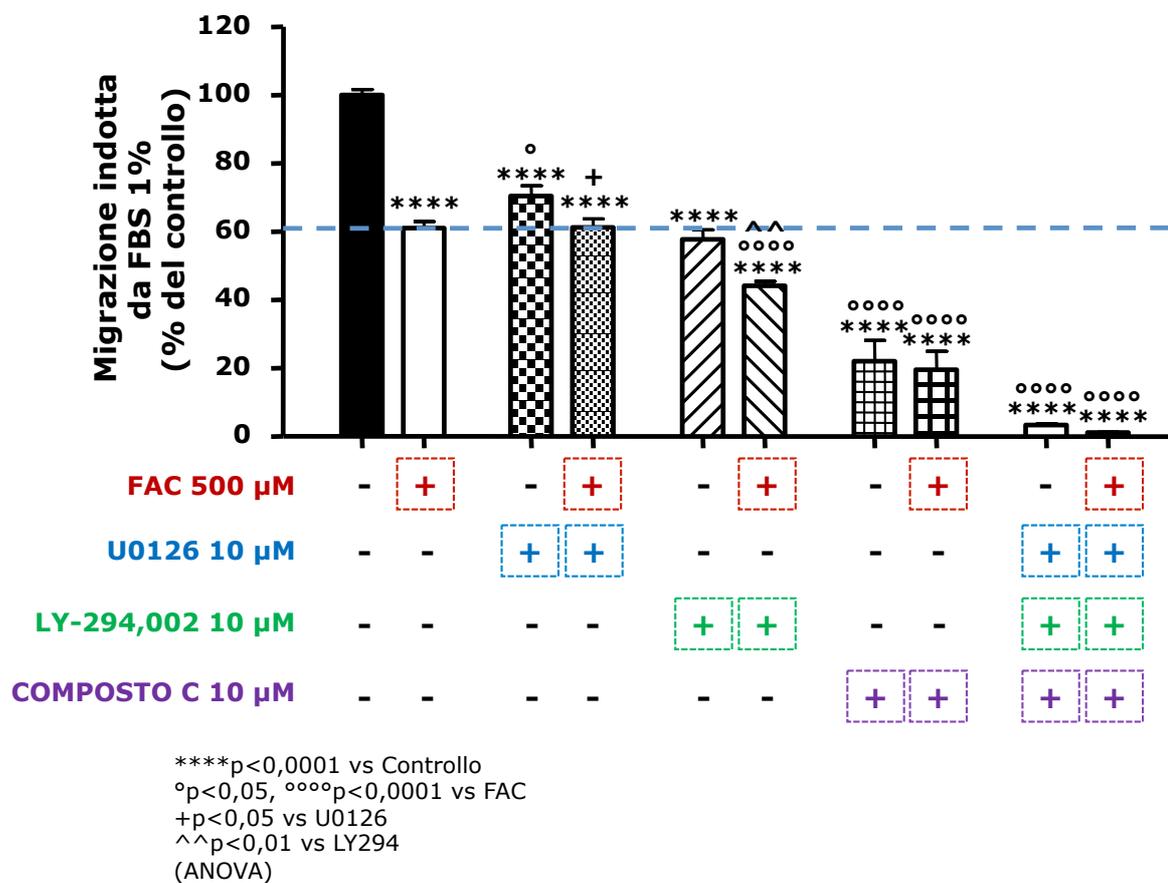
Abbiamo quindi valutato se effettivamente le vie di segnale di ERK1/2, Akt e AMPK, che abbiamo dimostrato essere modulate dal ferro, fossero coinvolte nella riduzione della migrazione delle cellule GN-11 indotta da FAC. A tal scopo è stata condotta un'altra serie di saggi di chemomigrazione in presenza degli inibitori selettivi di MEK1/2 (U0126 10 μM), di PIK3/Akt (LY-294,002 10 μM) e di AMPK (Composto C 10 μM) in associazione o meno con FAC alla dose di 200 μM.

Nel dettaglio, le cellule GN-11 sono state pretrattate o meno con i suddetti inibitori per 30 minuti, incubate con FAC 200  $\mu$ M in associazione o meno con gli stessi inibitori per 1 ora, e successivamente caricate nella camera di Boyden a contatto con l'1% di FBS per 1 ora e 45 minuti.

I risultati ottenuti sono riassunti in **figura 9.15**:

- L'esposizione al solo inibitore di ERK1/2 ha ridotto significativamente la migrazione delle GN-11 stimolata da FBS (-30% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ) anche se in modo minore rispetto al solo FAC (-39% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ). Il trattamento delle GN-11 con U0126 in associazione a FAC ha inibito la migrazione FBS-indotta delle GN-11 (-39% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ) analogamente al solo FAC.
- L'incubazione con il solo inibitore di Akt ha diminuito la migrazione FBS-indotta delle GN-11 (-42% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ) in modo simile al solo FAC (-39% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ). L'associazione di FAC con LY-294,002 ha amplificato ulteriormente l'inibizione della migrazione FBS-indotta delle GN-11 (-56% vs controllo,  $p < 0,0001$ ) rispetto al trattamento con solo FAC. In particolare, tale riduzione è risultata essere del 28% in meno rispetto al trattamento con solo FAC ( $p < 0,0001$ ) e del 24% in meno rispetto al solo LY-294,002 ( $p < 0,01$ ).
- Il trattamento con il solo inibitore della via di AMPK ha determinato un calo consistente della migrazione FBS-indotta delle GN-11 (-78% vs Controllo;  $p < 0,0001$ ) e della stessa entità di quello provocato dall'associazione di FAC con il Composto C (-80% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ). L'aggiunta dell'inibitore di AMPK sia da solo sia con FAC ha ridotto la migrazione stimolata da FBS delle GN-11 in modo più consistente rispetto al solo FAC (-39% vs Controllo,  $p < 0,0001$ ; Composto C vs FAC: -64%,  $p < 0,0001$ ; FAC + Composto C vs FAC: -68%,  $p < 0,0001$ ).
- L'associazione di U0126, LY-294,002 e Composto C ha diminuito drasticamente la migrazione rispetto al controllo (-97%;  $p < 0,0001$ ) e al solo FAC (-95%;  $p < 0,0001$ ). Tale riduzione è stata ulteriormente amplificata dal co-trattamento degli inibitori con FAC (-99% vs Controllo;  $p < 0,0001$ ; -98% vs FAC;  $p < 0,0001$ ).

Gli inibitori utilizzati, sia da soli che in combinazione, non hanno portato a morte cellulare, come indicato dal saggio di colorazione con trypan-blue (dato non mostrato).



**Figura 9.15** Coinvolgimento delle vie di segnale di ERK1/2, Akt e AMPK nell'inibizione FAC-dipendente della migrazione FBS-indotta delle GN-11. Il saggio è stato condotto mediante camera di Boyden. Le cellule GN-11 sono state pretrattate o meno per 30 minuti con U0126 (inibitore selettivo di MEK1/2), LY-294,002 (inibitore selettivo di PI3K/Akt) o Composto C (inibitore selettivo di AMPK) (tutti alla dose di 10 μM), trattate o meno con FAC 200 μM per 1 ora prima dell'esposizione al chemoattrattore (DMEM con 1% di FBS) nella camera di Boyden per 1 ora e 45 minuti. I dati (media ± SEM di 10 determinazioni in 3 diversi esperimenti) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate esposte a DMEM 1% FBS, barra nera) posto uguale a 100%. I valori di p, determinati mediante ANOVA, sono riportati sotto al grafico.

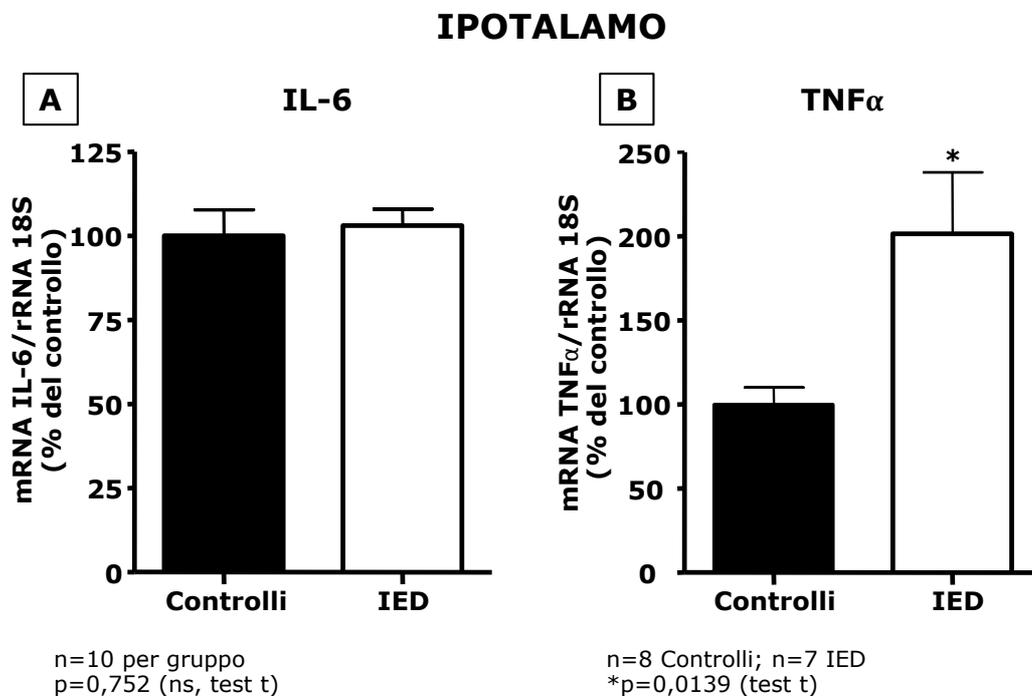
## 9.9 EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A DOSI ECCESSIVE DI FERRO SUL PATHWAY INFIAMMATOARIO *IN VIVO* E NELLE CELLULE GN-11

### 9.9.1 *Ipotalamo*

I primi studi volti alla caratterizzazione degli effetti periferici e sistemici del sovraccarico dietetico di ferro non hanno evidenziato la presenza d'inflammation nel fegato e nel VAT sebbene tali organi abbiano mostrato accumulo selettivo di ferro e

danno ossidativo (dati non mostrati) [1]. La mancata attivazione del signaling infiammatorio a livello sistemico è stata anche confermata da invariati livelli sierici di TNF $\alpha$  ("Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ") nei topi IED rispetto ai controlli (dati non mostrati) [1].

Nell'ipotalamo, l'analisi mediante RT-qPCR non ha evidenziato alcun cambiamento nell'espressione genica della citochina pro-infiammatoria interleuchina-6 (IL-6) ( $p=0,752$ ) dopo 9 e 16 settimane di dieta IED (i 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento). Lo stesso trattamento ha invece provocato un incremento significativo nei livelli dell'mRNA del TNF $\alpha$  (+102%,  $p=0,0139$ ) (**Figura 9.16, A. B.**).



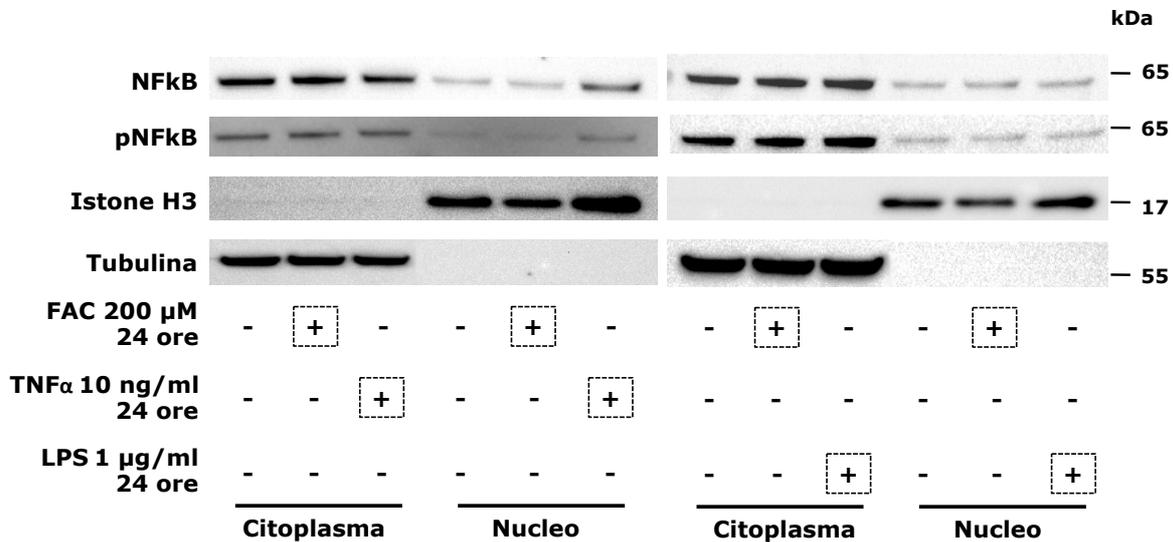
**Figura 9.16** Effetto della manipolazione dietetica dello stato di ferro sull'espressione genica ipotalamica di citochine pro-infiammatorie. Analisi RT-qPCR dei livelli di mRNA di IL-6 (**pannello A**) e TNF $\alpha$  (**pannello B**) in ipotalami interi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9 e 16 settimane di trattamento. I 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e il valore di  $p$ , determinato tramite test  $t$ , sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

### 9.9.2 GN-11

In assenza di uno stimolo pro-infiammatorio, il fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B è sequestrato nel citoplasma dall'interazione con le proteine inibitorie I $\kappa$ B che, mascherando il segnale di localizzazione nucleare, impediscono la sua traslocazione nel nucleo. La fosforilazione e la degradazione della proteina inibitoria I $\kappa$ B sono necessarie per l'attivazione di NF- $\kappa$ B a cui fa seguito il rilascio e la omoe- eterodimerizzazione dei cinque membri della famiglia NF- $\kappa$ B. In questo modo, i dimeri di NF- $\kappa$ B sono in grado di traslocare nel nucleo e stimolare la trascrizione di numerosi geni tra cui quelli coinvolti nel processo infiammatorio. L'eterodimero tra le subunità p50 e p65 è quello più frequentemente riscontrato. La fosforilazione di p65 a livello della serina in posizione 536 (Ser536) è indotta da una serie di stimoli pro-infiammatori e favorisce l'aumentata trascrizione dei geni target di NF- $\kappa$ B.

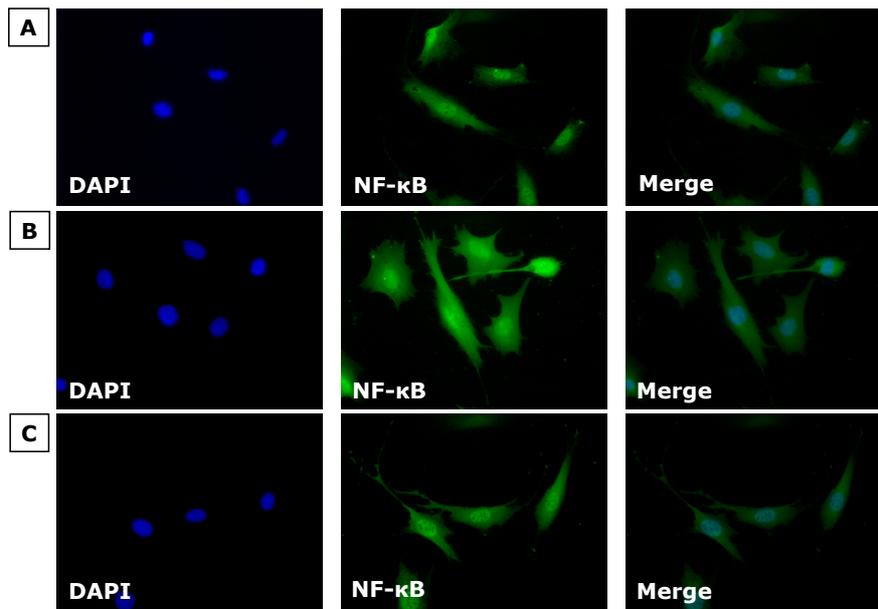
Per verificare che la linea cellulare ipotalamica scelta per tale studio attivasse la via di IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B in risposta a noti stimoli pro-infiammatori, le cellule GN-11 sono state trattate per 24 ore con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o LPS (1  $\mu$ g/ml) aggiunti nel medium di crescita (DMEM 10% FBS). Al termine delle 24 ore, le cellule sono state processate in modo da separare la frazione proteica citoplasmatica da quella nucleare tramite il kit NE-PER. Gli estratti proteici del compartimento nucleare e citoplasmatico sono stati immunoblottati con l'anticorpo anti-pNF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (p-p65Ser-536), e successivamente con l'anticorpo anti-NF- $\kappa$ B p65, entrambi specifici per la subunità p65 dei dimeri di NF- $\kappa$ B. L'efficienza di separazione della frazione citoplasmatica da quella nucleare è stata accertata mediante la presenza delle bande corrispondenti alla tubulina solo nel citoplasma e di quelle specifiche per l'istone H3 esclusivamente nel nucleo. L'analisi Western Blotting ha mostrato come TNF $\alpha$ , ma non LPS, abbia indotto la traslocazione della subunità p65 dal citoplasma al nucleo (**Figura 9.17**). Lo stesso risultato è stato ottenuto in uno studio condotto sull'analogo maturo delle GN-11, le cellule neuronali ipotalamiche GT1-7 [367]. Poiché esistono evidenze secondo cui p65 potrebbe traslocare nel nucleo senza promuovere l'attivazione trascrizionale, abbiamo anche indagato se TNF $\alpha$  inducesse l'attivazione post-trascrizionale di p65 mediante fosforilazione. L'aumentata presenza nel nucleo della subunità p65 fosforilata a livello della serina 536 dopo trattamento con TNF $\alpha$  è stata indicativa della capacità di tale fattore di promuovere sia la traslocazione di p65 dal citoplasma al nucleo che la sua attivazione (**Figura 9.17**). Una volta accertato che le cellule GN-11 sono in grado di rispondere a noti stimoli pro-infiammatori mediante attivazione della via di IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B, il passo successivo è stato quello di valutare il medesimo processo dopo trattamento per 24 ore con FAC alla concentrazione di 200  $\mu$ M nel medium di crescita

(DMEM 10% FBS). Come emerge dalla **Figura 9.17**, l'incubazione con FAC non ha indotto la traslocazione della subunità p65 nel nucleo e, di conseguenza, non ha promosso la sua attivazione nucleare mediante fosforilazione su Ser536.



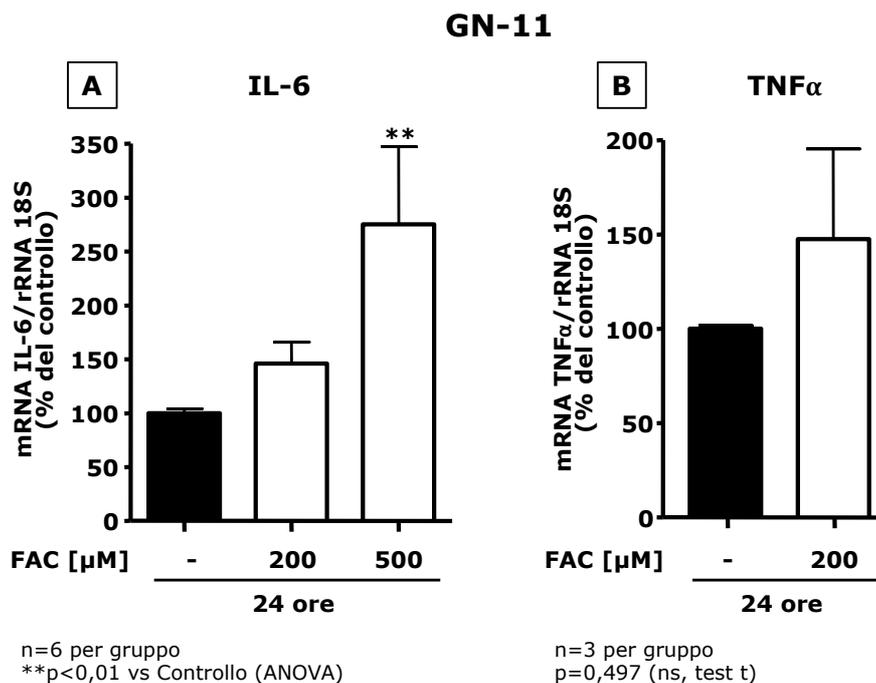
**Figura 9.17** Effetto di FAC, TNF $\alpha$  e LPS sulla traslocazione nucleare e sull'attivazione per fosforilazione di NF- $\kappa$ B nelle cellule GN-11. Le cellule sono state trattate o meno con FAC 200  $\mu$ M o con TNF $\alpha$  10 ng/ml o con LPS 1  $\mu$ g/ml per 24 ore. La localizzazione subcellulare della subunità p65 di NF- $\kappa$ B e la sua attivazione per fosforilazione (pNF- $\kappa$ B) sono state esaminate mediante Western Blotting dopo separazione della frazione proteica citoplasmatica da quella nucleare. La qualità della separazione dei due compartimenti è stata confermata mediante la presenza delle bande specifiche per la tubulina (55 kDa) solo nella frazione citoplasmatica e di quelle specifiche per l'istone H3 (17 kDa) solo nel nucleo. I blot riportati sono un esempio rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti.

L'incapacità del sovraccarico marziale di attivare NF- $\kappa$ B nelle cellule GN-11 è stata confermata mediante analisi immunocitochimica (immunofluorescenza, IFL) condotta su cellule intatte. Nelle GN-11 trattate con FAC alla dose di 200  $\mu$ M per 24 ore nel consueto medium di crescita (DMEM 10% FBS) (**Figura 9.18, B.**), l'intesa colorazione corrispondente all'IFL di NF- $\kappa$ B non presenta una localizzazione prevalentemente nucleare, bensì è analoga a quella osservabile nelle cellule non trattate (**Figura 9.18, A.**). Il medesimo risultato è stato osservato aumentando il dosaggio del ferro a 500  $\mu$ M (**Figura 9.18, C.**). Omettendo l'anticorpo primario non si è osservato alcun segnale (dati non mostrati).



**Figura 9.18** Analisi immunocitochimica (immunofluorescenza, IFL) della traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B nelle cellule GN-11. Le cellule sono state trattate (**pannelli B e C**) o meno (**pannello A**, cellule non trattate) con FAC 200  $\mu$ M (**pannello B**) o con FAC 500  $\mu$ M (**pannello C**) per 24 ore. La localizzazione subcellulare della subunità p65 di NF- $\kappa$ B è stata esaminata mediante IFL. In assenza dell'anticorpo primario non è stato osservato alcun segnale (dato non mostrato).

Nel nostro modello *in vitro* di sovraccarico di ferro, abbiamo anche indagato i segnali a valle dipendenti dal signaling di NF- $\kappa$ B e, in particolare, l'espressione dell'mRNA codificante per IL-6 e TNF $\alpha$ . L'analisi RT-qPCR ha mostrato una tendenza all'aumento nei livelli di espressione genica di IL-6 dopo incubazione per 24 ore con FAC 200  $\mu$ M nel medium di crescita (DMEM 10% FBS). Tale incremento si è rivelato statisticamente significativo con una dose di FAC di 500  $\mu$ M (+175%,  $p < 0,01$ ) (**Figura 9.19, A.**). Il trattamento per 24 ore con FAC 200  $\mu$ M nel terreno di crescita (DMEM 10% FBS) non ha indotto modificazioni nell'mRNA di TNF $\alpha$  ( $p = 0,497$ ) (**Figura 9.19, B.**).



**Figura 9.19** Effetto del sovraccarico marziale sull'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie nelle cellule GN-11. I livelli di mRNA di IL-6 (**pannello A**) e TNFα (**pannello B**) sono stati determinati mediante RT-qPCR dopo trattamento (barre bianche) o meno (barre nere) delle cellule GN-11 con FAC alle dosi di 200 µM (per entrambe le citochine) o 500 µM (solo per IL-6) per 24 ore. I livelli di ciascun gene d'interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media ± SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate), posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e il valore di p, determinato tramite ANOVA (per IL-6) o test t (per TNFα), sono indicati sotto a ciascun grafico.

## 9.10 EFFETTO DELLA MANIPOLAZIONE DELLO STATO DEL FERRO SULLO STRESS OSSIDATIVO E DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO *IN VIVO* E NELLE CELLULE GN-11

Come ampiamente documentato dalla letteratura, il ferro è un metallo di transizione in grado di promuovere la generazione dei ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) che reagiscono con lipidi e proteine inducendo danno tissutale.

Abbiamo quindi voluto indagare se il sovraccarico marziale inducesse stress ossidativo e/o del reticolo endoplasmatico (RE). Il primo è valutabile mediante incremento dell'espressione genica di SOD2 (Superossido Dismutasi 2), un enzima della matrice mitocondriale interna deputato alla neutralizzazione del radicale superossido (prodotto durante la fosforilazione ossidativa nel mitocondrio) mediante sua conversione a perossido d'idrogeno [376]. Il secondo tipo di stress, derivante dall'accumulo e

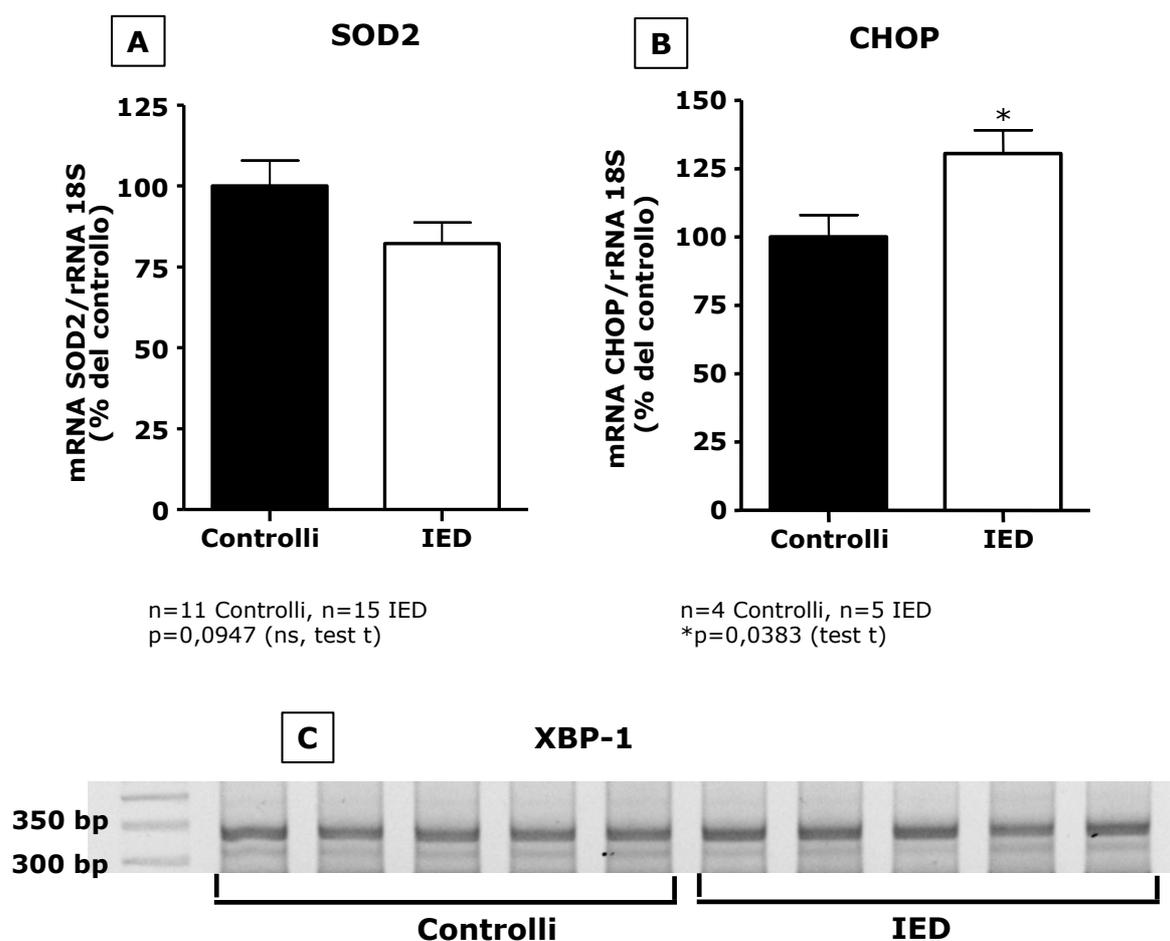
dall'aggregazione di proteine non ripiegate (*misfolded*) o mal ripiegate (*unfolded*) nel lume del RE, scatena una serie di processi cellulari denominati collettivamente come "risposta delle proteine mal ripiegate" (unfolded protein response, UPR) [377]. La fase iniziale dell'UPR, in cui la cellula attiva meccanismi atti a ripristinare la capacità del RE di ripiegare le proteine (segnali di sopravvivenza cellulare), è identificabile sia mediante aumento dell'mRNA di XBP-1 (X-box binding protein-1) che tramite incremento dello splicing endoribonucleasico di 26 nucleotidi intronici dall'mRNA di XBP-1 ad opera di IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1) [378]. La variante di splicing generata (sXBP-1) trasloca nel nucleo dove determina la trascrizione di geni indispensabili per il ripristino dell'omeostasi del RE, quali le proteine *chaperones* [379]. Una condizione persistente di stress del RE, in cui l'UPR promuove l'attivazione di segnali pro-apoptotici, è ricavabile dall'aumentata trascrizione genica di CHOP (CAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein), il principale fattore di trascrizione che promuove la morte cellulare per apoptosi [380].

### **9.10.1 Ipotalamo**

I primi studi condotti sul nostro modello murino di sovraccarico dietetico di ferro hanno evidenziato la capacità di tale metallo di accumularsi nel fegato e nel VAT promuovendo stress ossidativo e del RE (dati non mostrati) [1].

Abbiamo quindi indagato se anche l'ipotalamo potesse essere soggetto a tali perturbazioni da parte della IED. Mediante analisi RT-qPCR non è stata osservata alcuna variazione nell'espressione genica di SOD2 ( $p=0,0947$ ) tra topi IED e controllo, il che denota la mancata induzione di stress ossidativo a livello centrale dopo 9 e 16 settimane di IED (i 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dallo stesso andamento) (**Figura 9.20, A.**). Al contrario, la dieta IED ha aumentato in modo significativo i livelli di mRNA di CHOP (+31%,  $p=0,0383$ ), senza però modificare lo splicing alternativo dell'mRNA di XBP-1 (**Figura 9.20, B. C.**), indicando la capacità del ferro di promuovere stress del RE e, più specificamente, di attivare segnali pro-apoptotici nell'ipotalamo.

## IPOTALAMO

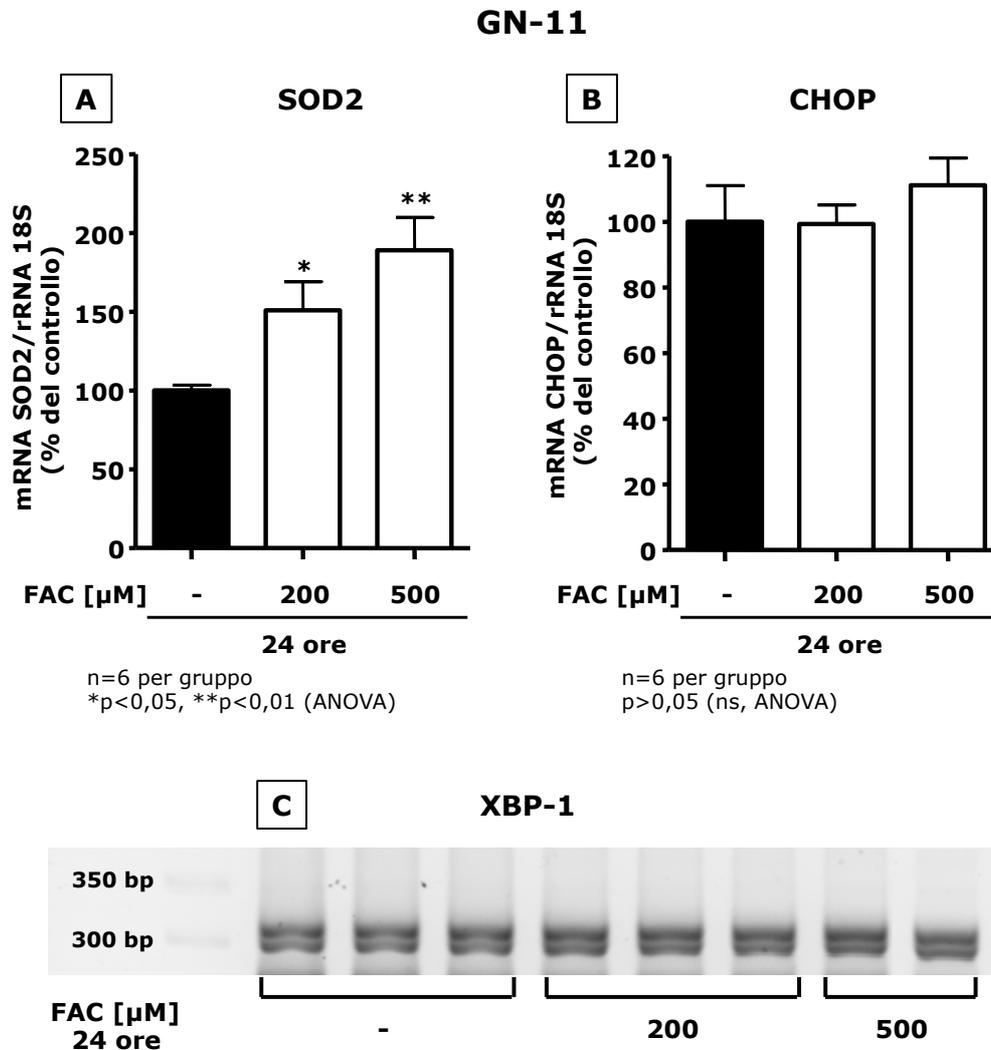


**Figura 9.20** Effetto della dieta IED sui segnali di stress ossidativo (SOD2) e del RE (CHOP e XBP-1) in ipotalami interi. Analisi RT-qPCR dell'espressione genica di SOD2 (**pannello A**) e di CHOP (**pannello B**) in ipotalami interi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9 e 16 settimane di trattamento. I 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media ± SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e il valore di p, determinato tramite test t, sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo. Il **pannello C** rappresenta l'analisi RT-PCR dello splicing dell'mRNA di XBP-1. La separazione elettroforetica è stata condotta su gel d'agarosio al 4%: una banda a 326 bp rappresenta la forma priva di splicing mentre la banda a 300 bp è la forma che ha subito splicing. L'immagine della corsa elettroforetica è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti.

### 9.10.2 GN-11

Le condizioni sperimentali impiegate per indurre sovraccarico marziale hanno comportato un incremento dose-dipendente dello stress ossidativo, come indicato dall'aumentata espressione genica di SOD2 dopo incubazione con FAC alle concentrazioni di 200  $\mu$ M (+51%,  $p < 0,05$ ) e 500  $\mu$ M (+89%,  $p < 0,01$ ) per 24 ore nel medium di crescita (**Figura 9.21, A**).

Il medesimo trattamento non ha mostrato alcuna variazione nell'espressione dell'mRNA di CHOP e nell'entità di splicing alternativo dell'mRNA di XBP-1 (**Figura 9.21, B. C.**). Tale effetto neutrale denota l'incapacità di FAC, alle dosi da noi utilizzate di 200 – 500  $\mu\text{M}$  per 24 ore, di generare uno stato di stress a livello del RE e quindi di attivare l'UPR.



**Figura 9.21** Effetto dell'aumento della concentrazione di ferro nel medium delle GN-11 sui marker di stress ossidativo (SOD2) e del reticolo endoplasmatico (CHOP e XBP-1).

Analisi RT-qPCR dell'espressione genica di SOD2 (**pannello A**) e CHOP (**pannello B**) nelle cellule GN-11 dopo trattamento (barre bianche) o meno (barre nere) con FAC alle dosi di 200 e 500  $\mu\text{M}$  per 24 ore. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate), posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e il valore di  $p$ , ottenuto tramite ANOVA, sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo. Il **pannello C** rappresenta l'analisi RT-PCR dello splicing dell'mRNA di XBP-1. La separazione elettroforetica è stata condotta su gel d'agarosio al 4%: una banda a 326 bp rappresenta la forma priva di splicing mentre la banda a 300 bp è la forma che ha subito splicing. L'immagine della corsa elettroforetica è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti.

## **9.11 EFFETTO DEL SOVRACCARICO MARZIALE SUI MECCANISMI NEUROENDOCRINI COINVOLTI NEL CONTROLLO DELLA RIPRODUZIONE E DEL COMPORTAMENTO ALIMENTARE**

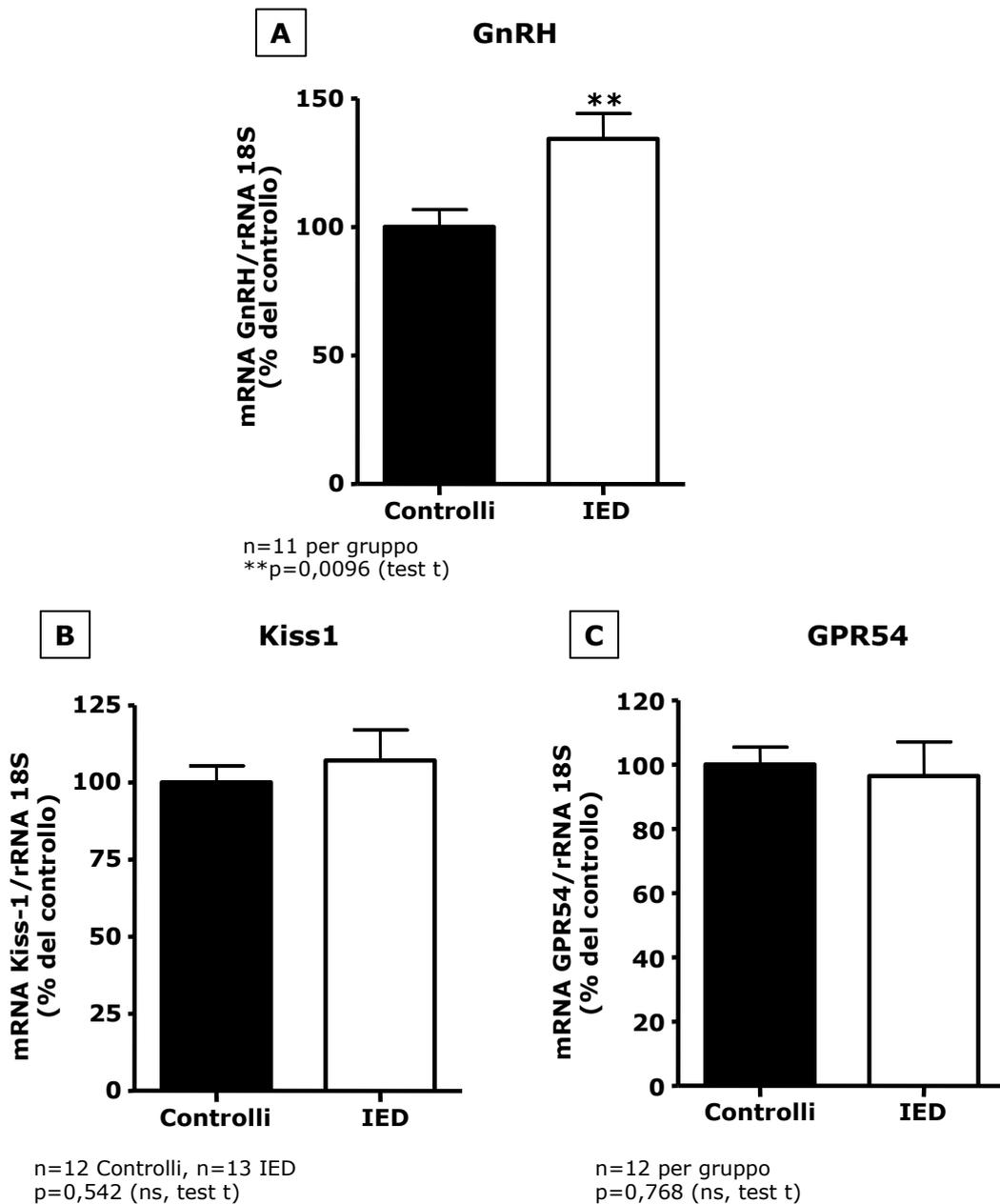
Il sovraccarico cronico di ferro potrebbe comportare un accumulo di tale metallo nella porzione ipotalamo-ipofisaria dell'asse riproduttivo, con conseguente danno o alterazione della funzionalità dei neuroni GnRH (Ormone di Rilascio delle Gonadotropine) e/o delle cellule gonadotrope. Tale deposito selettivo di ferro potrebbe contribuire all'insorgenza d'ipogonadismo ipogonadotropo (HH) [381], una delle endocrinopatie più frequentemente riscontrate in pazienti con talassemia e con emocromatosi ereditaria [328, 342, 382]. Dalla letteratura emergono poche evidenze in merito al rapporto di causalità primaria ed esclusiva tra una disfunzione ipotalamica indotta dall'eccesso di ferro e l'ipogonadismo [344, 345]. Per tale ragione abbiamo voluto indagare l'eventuale presenza di un'alterazione ipotalamica a livello del sistema Kiss1-GPR54 (Recettore Accoppiato a Proteina G 54) e dei neuroni GnRH nel nostro modello murino di sovraccarico alimentare di ferro.

### **9.11.1 *Ipotalamo***

L'analisi mediante RT-qPCR dell'RNA estratto da ipotalami interi ha evidenziato un aumento significativo (+34%;  $p=0,0096$ ) dei livelli di mRNA del GnRH dopo dieta IED per 9, 11 e 16 settimane (i 3 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento) (**Figura 9.22, A.**).

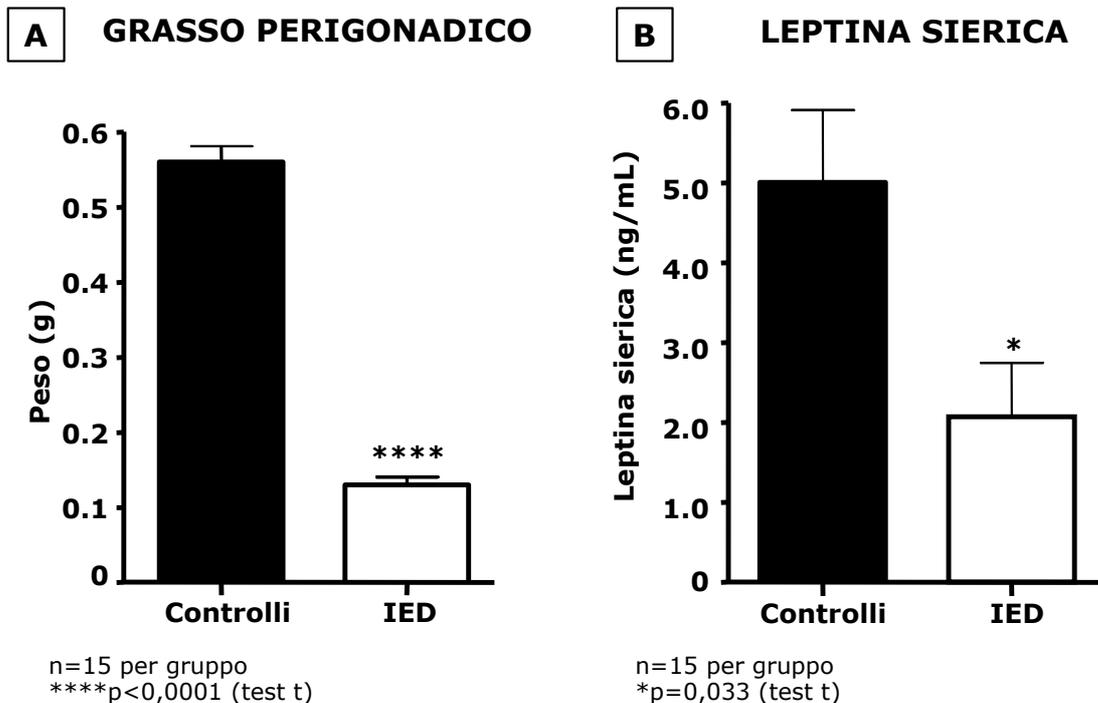
La kisspeptina, peptide prodotto dal gene Kiss-1, e il suo recettore GPR54 sono dei componenti chiave nella regolazione neuroendocrina della riproduzione in quanto promuovono l'attivazione della secrezione del GnRH. Tale ruolo cruciale del signaling Kiss1/GPR54 è stato avvalorato dalla recente (2003) identificazione di delezioni o mutazioni inattivanti nel gene GPR54 in pazienti affetti da forme familiari o sporadiche di ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico (o isolato) (IHH) [120, 121]. Nel nostro modello murino di sovraccarico alimentare di ferro, non è stata osservata alcuna variazione nell'espressione genica di Kiss1 ( $p=0,542$ ) e GPR54 ( $p=0,768$ ) analizzata mediante RT-qPCR su ipotalami interi (**Figura 9.22, B. C.**).

## IPOTALAMO



**Figura 9.22** Valutazione della perturbazione della componente ipotalamica dell'asse riproduttivo e dei suoi principali stimolatori da parte del sovraccarico alimentare di ferro. L'espressione genica ipotalamica di GnRH (**pannello A**), Kiss-1 (**pannello B**) e GPR54 (**pannello C**) è stata determinata mediante RT-qPCR in ipotalami interi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9, 11 e 16 settimane di trattamento. I 3 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e i valori di p, ottenuti tramite test t, sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

L'iniziale caratterizzazione periferica del nostro modello animale aveva evidenziato come la dieta IED comportasse un ridotto incremento ponderale (**Figura 9.2**), una diminuita massa di VAT, stimata dal minor peso di grasso perigonadico (controlli:  $0,56 \pm 0,08$  g; IED:  $0,13 \pm 0,04$  g;  $p < 0,0001$ ), [1] e un calo dei livelli sierici di leptina (controlli:  $5,4 \pm 3$  ng/mL; IED:  $2,4 \pm 2$  ng/mL;  $p = 0,033$ ) [1] (**Figura 9.23, A. B.**).



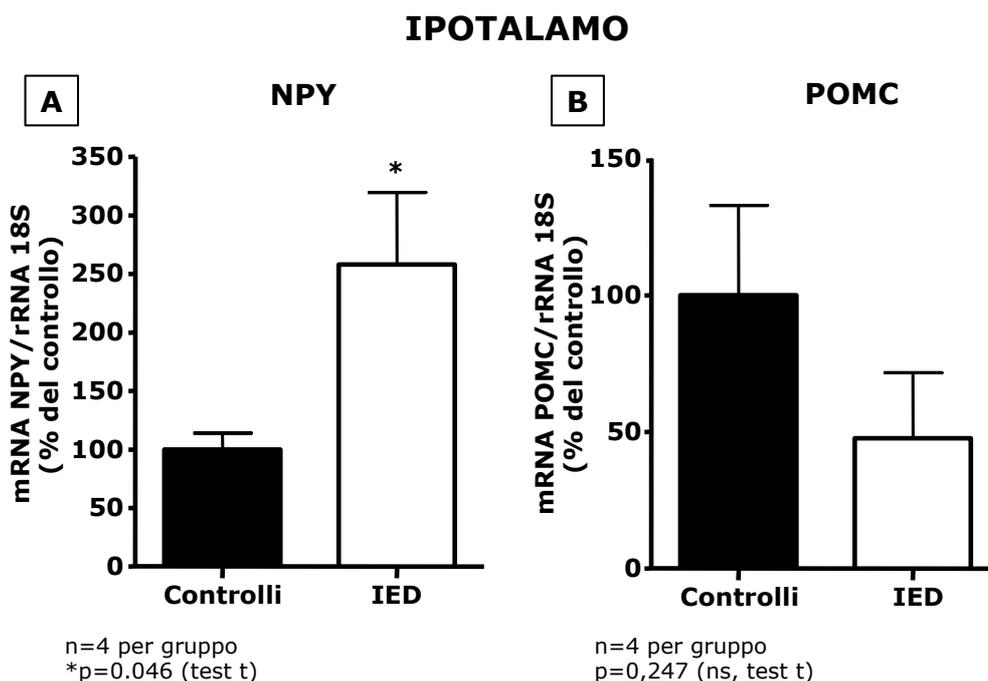
*Am J Pathol.* 2013 Jun;182(6):2254-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.019. Epub 2013 Apr 8.

**Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance.**

Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R, Recalcati S, Steffani L, Gatti S, Girelli D, Cairo G, Magni P, Fargion S, Valenti L.

**Figura 9.23** Variazione di peso (g) del grasso perigonadico (**pannello A**) e dei livelli di leptina sierica (ng/mL) (**pannello B**) in topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 16 settimane di trattamento [1]. Il numero di animali utilizzati e il valore di p, determinato mediante test t, sono indicati sotto a ciascun grafico.

Alla luce di tali risultati, unitamente alla presenza di un fenotipo dismetabolico e di una condizione di IR che insorge primariamente a livello del VAT [1], è parso utile anche valutare l'espressione genica ipotalamica del Neuropeptide Y (NPY) e della Proopiomelanocortina (POMC), peptidi bifunzionali preposti al controllo del metabolismo energetico, dell'appetito e della funzionalità riproduttiva. Come atteso, la dieta IED ha aumentato i livelli di espressione genica ipotalamica di NPY (+ 158%,  $p = 0,046$ ) e, al contrario, ha ridotto, seppur in modo non significativo, quelli di POMC (-52%,  $p = 0,247$ ), il che è indicativo dell'attivazione di uno stato oressigenico nell'ipotalamo (**Figura 9.24, A. B.**).



**Figura 9.24** Effetto della manipolazione alimentare dello stato di ferro sulla sintesi ipotalamica dei neuropeptidi preposti alla regolazione del metabolismo energetico e della funzione riproduttiva. L'espressione genica di NPY (**pannello A**) e POMC (**pannello B**) in ipotalami interi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) è stata condotta tramite RT-qPCR dopo 16 settimane di trattamento. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e il valore di  $p$ , ottenuto tramite test  $t$ , sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

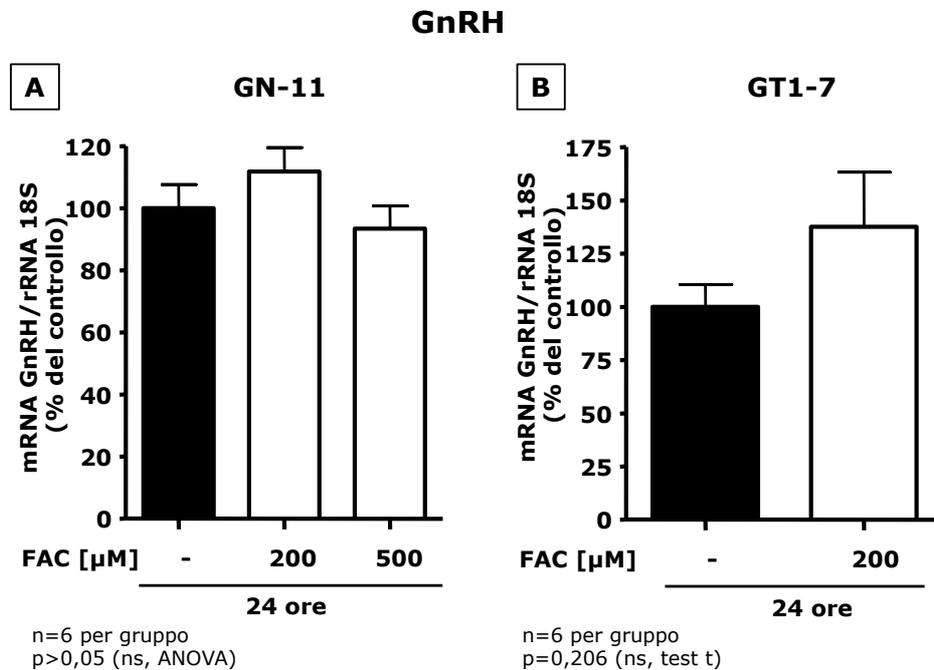
### 9.11.2 GN-11 e GT1-7

Sebbene le cellule GN-11 siano rappresentative di neuroni GnRH immaturi, esistono evidenze in letteratura in merito al loro utilizzo per studi di espressione genica e secrezione dell'ormone decapeptidico. La quota di GnRH secreto dalle GN-11 è ovviamente molto più bassa rispetto a quella osservata nelle GT1-7 [383, 384].

Per confermare i risultati ottenuti *in vivo* in merito all'espressione genica del GnRH, la stessa analisi è stata quindi condotta su entrambi i nostri modelli traslazionali *in vitro* di neuroni GnRH. Nel dettaglio, le linee cellulari sono state incubate con FAC per 24 ore e l'RNA totale estratto è stato sottoposto a reazione di trascrizione inversa e, successivamente, ad amplificazione del c-DNA ottenuto.

Nessuna variazione nei livelli dell'mRNA del GnRH è stata osservata nelle cellule GN-11 dopo trattamento con FAC (200  $\mu$ M) per 24 ore, neppure aumentando la dose a 500  $\mu$ M (**Figura 9.25, A.**).

L'applicazione di FAC 200  $\mu\text{M}$  al medium delle GT1-7 per 24 ore ha portato invece ad un aumento, seppur non significativo, dell'espressione genica del GnRH (+37,6%,  $p=0,206$ ) (**Figura 9.25, B.**).

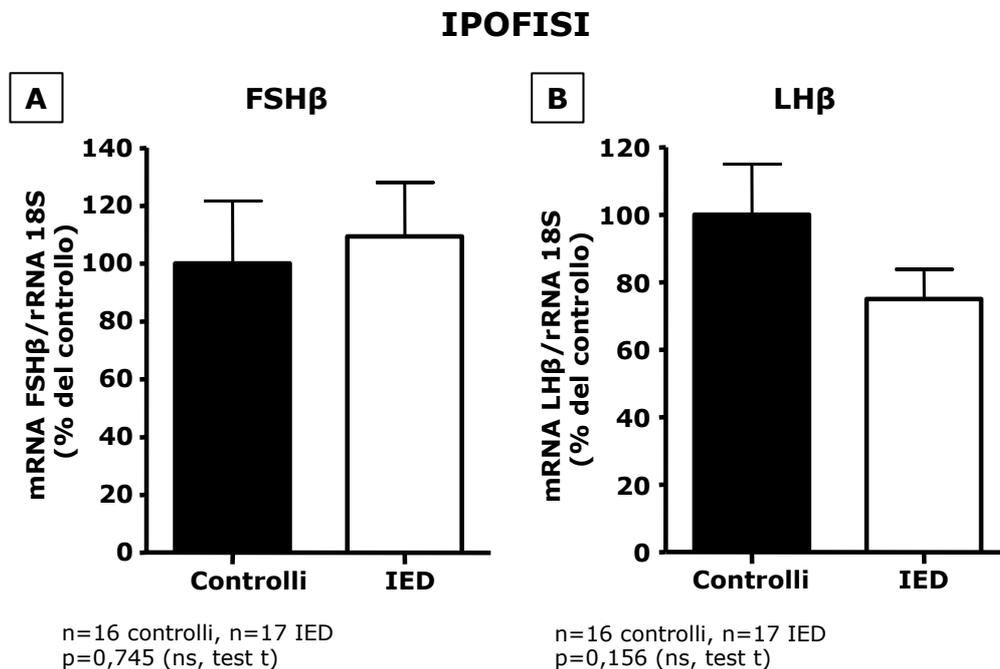


**Figura 9.25** Analisi RT-qPCR dell'espressione genica del GnRH nelle cellule GN-11 (**pannello A**) e GT1-7 (**pannello B**) dopo trattamento (barre bianche) o meno (barre nere) per 24 ore con FAC alle dosi di 200  $\mu\text{M}$  in entrambe le linee cellulari e 500  $\mu\text{M}$  solo nelle GN-11. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate), posto uguale a 100%. Il numero di campioni per ciascun trattamento e il valore di  $p$ , calcolato tramite test ANOVA (per le GN-11) e il test  $t$  (per le GT1-7) sono indicati sotto a ciascun grafico.

### 9.11.3 Ipofisi

Per indagare se le nostre condizioni sperimentali fossero in grado di compromettere l'asse riproduttivo a livello dell'ipofisi, abbiamo valutato l'espressione genica ipofisaria delle subunità  $\beta$  degli ormoni follicolo-stimolante (FSH) e luteinizzante (LH). A differenza della  $\alpha$ , che è comune alle due gonadotropine, la subunità  $\beta$  è quella che le contraddistingue. Il sovraccarico dietetico di ferro per un periodo di 9 e 11 settimane non ha indotto variazioni nei livelli del trascritto dell'FSH ( $p=0,745$ ), gonadotropina notoriamente meno responsiva dell'LH alla pulsatilità del GnRH (**Figura 9.26, A.**) Si è invece osservata una tendenza alla riduzione, seppur non significativa ( $p=0,156$ ), nell'espressione genica dell'LH in risposta al carico marziale (**Figura 9.26, B.**) I 2

diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento.



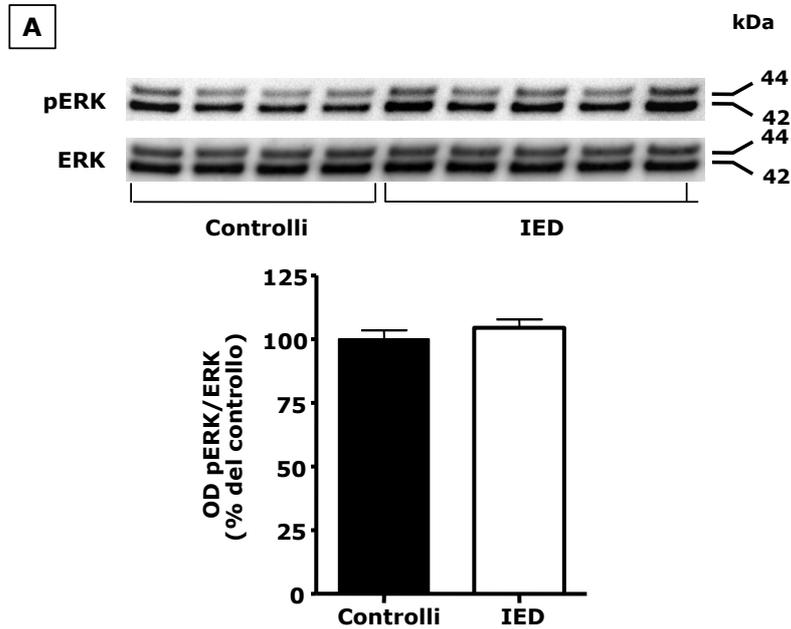
**Figura 9.26** Valutazione della perturbazione della componente ipofisaria dell'asse riproduttivo da parte del sovraccarico alimentare di ferro. I livelli di mRNA di FSH $\beta$  (**pannello A**) e LH $\beta$  (**pannello B**) in ipofisi di topi controllo (barre nere) e IED (barre bianche) dopo 9 e 11 settimane di trattamento sono stati analizzati tramite RT-qPCR. I 2 diversi periodi di trattamento sono stati riuniti in un solo gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED poiché caratterizzati dal medesimo andamento. I livelli di ciascun gene di interesse sono normalizzati su quelli della subunità ribosomiale 18S (gene costitutivo). I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (topi controllo), posto uguale a 100%. Il numero di animali usati in ciascun gruppo e il valore di p, ottenuto tramite test t, sono indicati sotto a ciascun grafico. ns: non significativo.

## 9.12 EFFETTO DEL SOVRACCARICO DIETETICO DI FERRO SULLA MODULAZIONE DEL SIGNALING NELL'IPOTALAMO

L'analisi delle vie intracellulari di trasduzione del segnale è stata condotta mediante Western Blotting sull'estratto proteico totale di ipotalami interi dopo 9, 11 e 16 settimane di IED. Poiché si sono ottenuti risultati sovrapponibili nei 3 diversi periodi di trattamento, si è deciso di unirli in un unico gruppo rispettivamente per i topi controllo e IED. È necessario tener presente che i risultati ottenuti sono un insieme dei contributi dei vari nuclei ipotalamici e delle diverse popolazioni, neuronali o meno, che coesistono a livello ipotalamico. Indagini future verteranno sull'analisi del signaling di

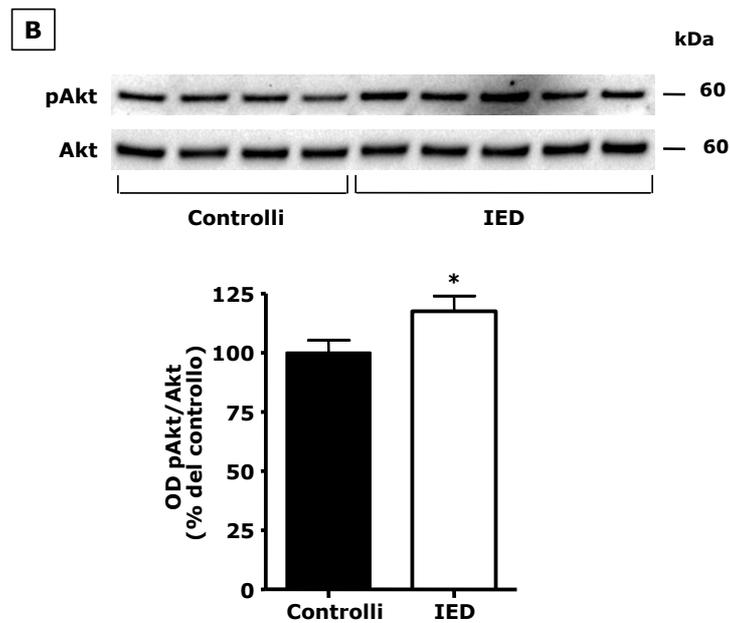
specifici nuclei ipotalamici isolati mediante tecniche specifiche quali la "Laser capture microdissection".

La IED non ha influenzato la via di ERK1/2 ( $p=0,351$ ) (**Figura 9.27, A.**).



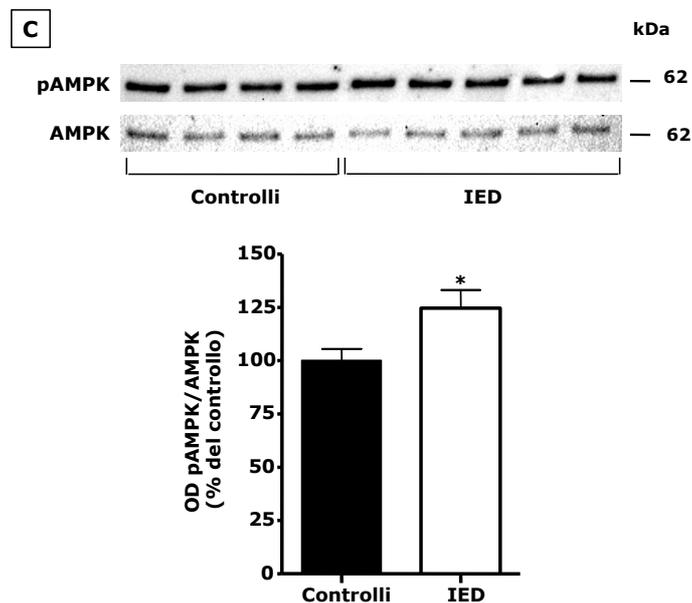
n=8 controlli; n=9 IED  
 $p=0,351$  (ns, test t)

Si è invece registrato un aumento significativo del rapporto pAkt/Akt (+18%,  $p=0,0472$ ), contrariamente a quanto osservato nel VAT (**Figura 9.27, B.**).



n=12 controlli; n=13 IED  
\* $p=0,0472$  (test t)

Anche la via di trasduzione del segnale di AMPK è attivata dalla IED (+25%,  $p=0,0241$ ) a differenza di quanto avviene nel fegato (**Figura 9.27, C.**).



n=12 controllii; n=13 IED  
\* $p=0,0241$  (test t)

**Figura 9.27** Effetto del sovraccarico dietetico di ferro di 9, 11 e 16 settimane sulla fosforilazione (p) di ERK1/2 (**pannello A**), Akt (**pannello B**) e AMPK (**pannello C**) in ipotalami interi. 20  $\mu$ g di estratto proteico di ciascun campione sono stati analizzati mediante Western Blotting. L'analisi densitometrica è relativa a 3 esperimenti indipendenti di cui è mostrato un blot rappresentativo. I dati (media  $\pm$  SEM) sono espressi come percentuale del controllo (cellule non trattate, barre nere) posto uguale a 100%. Il numero di animali utilizzati e i valori di  $p$ , ottenuti tramite test t, sono indicati sotto a ciascun grafico. I livelli di pERK1/2 (**pannello A**), pAkt (**pannello B**) e di pAMPK (**pannello C**) sono stati normalizzati, rispettivamente, su quelli di ERK1/2, Akt e AMPK.

## 10. DISCUSSIONE

### **ASSOCIAZIONE TRA SOVRACCARICO MARZIALE, FENOTIPO DISMETABOLICO E ALTERAZIONE DELLA FUNZIONE RIPRODUTTIVA**

Evidenze epidemiologiche nell'uomo e studi sperimentali in modelli animali e *in vitro* hanno evidenziato una chiara associazione tra aumento dei depositi tissutali di ferro di origine dietetica e sviluppo di un fenotipo dismetabolico in termini di intolleranza al glucosio, insulino-resistenza (IR), sindrome metabolica (MetS) e diabete mellito di tipo 2 (T2D) [385, 386, 387]. L'insieme di tali condizioni è riassunto nella sindrome dismetabolica da sovraccarico di ferro (DIOS - "Dysmetabolic Iron Overload Syndrome") recentemente caratterizzata a livello periferico e metabolico dal nostro gruppo di lavoro [1]. Il ruolo causale del ferro in tali alterazioni metaboliche è dimostrato dall'effetto benefico della deplezione di ferro sulla sensibilità all'insulina e sulla glicemia [385, 387, 388].

Nel 2004 è stata descritta la prima correlazione tra T2D e concentrazioni subnormali di testosterone libero in associazione a livelli bassi di ormone luteinizzante (LH) e follicolo-stimolante (FSH) derivanti probabilmente da una disfunzione ipotalamica, come suggerito dalla risposta normale di LH e FSH all'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) e dall'analisi MRI (Magnetic Resonance Imaging) [335]. Tale associazione tra ipogonadismo ipogonadotropo (HH) e fenotipo dismetabolico è stata poi confermata in diversi studi condotti su uomini affetti da T2D (prevalenza del 25-40%) e MetS [336-341]. La parallela compromissione dell'omeostasi metabolica e della funzionalità riproduttiva denota il contemporaneo coinvolgimento di diverse componenti molecolari e funzionali nel controllo della sfera metabolica e riproduttiva [2]. Anche in pazienti affetti da emocromatosi ereditaria (prevalenza del 10-100%) o da sovraccarico di ferro trasfusionale (nella talassemia maggiore supera il 50% in studi multicentrici) l'ipogonadismo, prevalentemente ipogonadotropo, è l'endocrinopatia più frequentemente riscontrata, oltre al T2D. Per entrambe le suddette patologie, è stato ampiamente descritto un deposito tossico dell'eccesso di ferro nelle cellule gonadotrope ipofisarie con conseguente riduzione del loro volume, della loro funzionalità ed insorgenza di HH (ipogonadismo secondario) [328, 342, 389]. Esistono evidenze in letteratura, seppur minoritarie e non ben definite, di un possibile ruolo causale dell'ipotalamo, esclusivo o combinato con l'ipofisi, nell'alterazione dell'asse riproduttivo (ipogonadismo terziario) [343-345]. La compromissione dell'asse ipotalamo-ipofisi è proporzionale all'entità di sovraccarico marziale: elevata

iperferritinemia e disfunzione d'organo multipla comportano un difetto più completo (HH irreversibile); livelli intermedi di ferritina consentono la reversibilità della sintomatologia dopo deplezione dell'eccesso di ferro mediante flebotomia o intensa chelazione [382, 390]. Per tale ragione, è recentemente emersa la necessità di accertare l'eventuale deposizione ipofisaria di ferro il più precocemente possibile. Fino ad oggi è stato pubblicato solo un lavoro in merito alla prevalenza e alla natura della disfunzione gonadica in uomini affetti da DIOS [317]. Da tale studio è emerso come l'accumulo epatico di ferro (HIC, "Hepatic Iron Concentration"), meno consistente rispetto a quello caratteristico dell'emocromatosi ereditaria, e la ferritinemia siano associati positivamente ai livelli plasmatici delle globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG, "Sex Hormone-Binding Globulin") e negativamente alla concentrazione di LH e di testosterone biodisponibile (non legato a SHBG). La ridotta funzione gonadotropica indotta dal ferro in tali pazienti è indipendente dal quadro dismetabolico in termini di iper-insulinemia a digiuno, IR, elevato BMI ("Body Mass Index") o circonferenza dell'addome. Il mancato ripristino delle normali concentrazioni ormonali dopo deplezione di ferro per flebotomia è indicativo dell'elevata suscettibilità dell'ipofisi al danno permanente o della necessità di tempi più lunghi per ripristinare una normale funzionalità riproduttiva [317].

### **ASPETTI INNOVATIVI E MODELLI SPERIMENTALI**

Questo lavoro di tesi, focalizzato sulla disfunzione dell'asse gonadico indotta dall'eccesso di ferro dietetico, nasce come estensione sperimentale della caratterizzazione periferica e metabolica del nostro modello murino di DIOS [1]. Nello specifico, topi maschi C57BL/6J di 6 settimane sono stati sottoposti ad una dieta controllo a normale contenuto di ferro o a una dieta arricchita con il 3% di ferro carbonile (IED, "Iron Enriched Diet") per 9 o 11 settimane. L'aspetto innovativo di tale studio risiede nel tentativo di apportare nuove evidenze in merito al controverso coinvolgimento primario ed esclusivo dell'ipotalamo nell'alterazione dell'asse riproduttivo indotta dal ferro. Inoltre, gli studi riportati in letteratura in merito ai processi neurodegenerativi ferro-dipendenti sono principalmente incentrati sull'analisi dell'accumulo marziale in tutto il cervello e non selettivamente nell'ipotalamo. Poiché quest'ultimo nell'uomo è esplorabile solo per via indiretta, ci siamo avvalsi del modello traslazionale *in vivo* già caratterizzato dal punto di vista metabolico [1] e, come ulteriore lente di ingrandimento del fenomeno, di due modelli *in vitro* di neuroni GnRH immortalizzati: le GN-11, rappresentative di neuroni immaturi e migratori e le GT1-7, l'analogo maturo, post-migratorio e GnRH secernente. Tale studio è inoltre il primo ad

indagare se e come l'esposizione a dosi eccessive di ferro in età pre-natale possa compromettere il fisiologico processo migratorio dei neuroni GnRH dal placode olfattorio all'ipotalamo e quali vie di segnale possano essere coinvolte in tale perturbazione.

### **CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SULLO STUDIO DELLA FISIOPATOLOGIA DEL FERRO NEL CERVELLO**

Lo studio della fisiopatologia del ferro nel sistema nervoso centrale (SNC) ha suscitato un crescente interesse poiché l'accumulo anomalo di ferro nel cervello è stato associato a varie patologie neurodegenerative [217]. L'indagine degli effetti delle perturbazioni marziali nel SNC rende necessario effettuare alcune considerazioni preliminari:

1. Il libero passaggio del ferro dalla circolazione sistemica al cervello è strettamente regolato dalla barriera emato-encefalica (BEE) e dalla barriera emato-liquorale (BEL) [208]. Tuttavia, è stato dimostrato che elevati livelli sistemici di ferro aumentano il contenuto marziale in specifiche regioni cerebrali sia nei roditori [267] che nell'uomo [271].
2. Alcune aree cerebrali, definite organi circumventricolari (CVO), sono prive di BEE e contengono corpi cellulari con libero accesso alle sostanze circolanti. In tale categoria rientra l'eminenza mediana dell'ipotalamo mediobasale [391]. Anche i vasi della porzione ventromediale del nucleo arcuato (ARC), in prossimità dei neuroni preposti alla regolazione dell'assunzione di cibo e del peso corporeo, sarebbero privi di una BEE intatta [392].
3. Il cervello è un organo eterogeneo che comprende diverse regioni anatomiche e tipi cellulari (neuroni, astrociti, oligodendrociti e microglia) ciascuno con le proprie caratteristiche metaboliche e architettoneiche [207] e quindi con il proprio specifico contenuto e utilizzo di ferro [393].

### **CARATTERIZZAZIONE DI UN MODELLO ANIMALE ADULTO DI SOVRACCARICO DIETETICO DI FERRO:**

- **Alterazione del fenotipo metabolico [1]**

Studi precedentemente condotti dal nostro gruppo di lavoro [1] hanno evidenziato come la dieta IED influenzi negativamente il metabolismo glucidico (iperlipidemia a digiuno, insulino-resistenza) e lipidico (ipertrigliceridemia a digiuno) in seguito a compromissione, rispettivamente, del tessuto adiposo viscerale (VAT) e del fegato. In

particolare, l'accumulo di ferro nel VAT ha ridotto la massa e la dimensione adipocitaria, ha compromesso l'attivazione del signaling insulinico (aumento di resistenza, induzione di Socs3, "Suppressor of Cytokine Signaling 3", e riduzione del rapporto pAkt/Akt) e ha indotto uno stato di stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico [1].

- **Alterazione della funzione riproduttiva: parametri morfometrici**

La prima evidenza macroscopica della compromissione della funzionalità riproduttiva da parte della dieta IED è stata l'osservazione di una riduzione significativa del peso e delle dimensioni testicolari. Abbiamo quindi voluto indagare se tale atrofia gonadica fosse correlata a perturbazioni a livello molecolare nelle sedi anatomiche dell'asse HPG (ipotalamo, ipofisi o gonadi) con particolare attenzione all'ipotalamo.

- **Metabolismo marziale periferico e centrale**

Da nostri precedenti studi [1] era emerso come le condizioni sperimentali da noi utilizzate aumentassero la sideremia, il contenuto di ferro intraepatico (HIC) e i livelli sierici ed epatici di epacina (ormone che inibisce l'assorbimento e il riciclaggio marziale mediante il legame e l'inattivazione della ferroportina [394]) fino a valori paragonabili a quelli riscontrabili clinicamente in pazienti affetti da DIO [1, 349]. Anche i testicoli hanno manifestato un aumento sostanziale del loro contenuto di ferro totale, sebbene l'entità di tale deposito sia inferiore rispetto a quella epatica e del VAT [1]. Alla luce di dati recentemente pubblicati [395], possiamo ipotizzare che la maggior parte del ferro captato dai testicoli sia confinato nello spazio interstiziale, sede delle cellule steroidogenetiche o del Leydig.

Nonostante l'elevato sovraccarico marziale periferico indotto dalla IED, non è stato registrato un aumento nella quantità di ferro totale nell'ipotalamo. Possiamo quindi ipotizzare che nel nostro modello animale di manipolazione alimentare dello stato di ferro, l'ipotalamo sia protetto dall'aumento di ferro sistemico probabilmente grazie alla rigida regolazione della BEE o della BEL o mediante altri meccanismi. Sarebbe quindi interessante dosare l'effettivo contenuto marziale nelle regioni notoriamente prive di una BEE intatta, in particolare, il nucleo ARC e l'eminenza mediana. Analogamente a studi riportati in letteratura [272, 372, 396], condotti su cervello intero, non sono stati registrati cambiamenti sostanziali nei livelli dei trascritti ipotalamici per il recettore della transferrina (TfR, il principale recettore per il complesso circolante transferrina - ferro) e per la ferritina H (FtH - la principale proteina di deposito intracellulare del ferro) in risposta agli elevati depositi di ferro

sistemico. Anche nei testicoli, l'analisi RT-qPCR non ha mostrato una modulazione ferro-dipendente di TfR, FtH ed epcidina. La mancata risposta testicolare al sovraccarico marziale è probabilmente ascrivibile al ridotto accumulo di ferro in tale distretto.

- **Modulazione dell'espressione genica nell'ipotalamo**

I risultati ottenuti a livello ipotalamico nel nostro studio rispecchiano quanto osservato da Johnstone e Milward in una simile serie di esperimenti [372]. Secondo tali ricercatori, l'assenza di variazioni significative nell'accumulo cerebrale di ferro e nei livelli delle proteine preposte alla regolazione dell'omeostasi marziale non esclude la possibilità che il sovraccarico di ferro sistemico possa comunque indurre cambiamenti nell'espressione ipotalamica di altri geni. L'eccesso marziale sistemico potrebbe modulare indirettamente alcune funzioni ipotalamiche mediante l'attivazione di fattori periferici che invierebbero segnali all'ipotalamo [372]. Tali considerazioni sono state dimostrate in tre diversi modelli animali, ratti sottoposti a dieta arricchita in ferro [397], topi *Hfe*<sup>-/-</sup> [271] e topi knockout per *Irf2* [398, 399], in cui si sono osservate anomalie comportamentali o motorie senza un apparente aumento nei livelli marziali cerebrali. Anche nel nostro modello animale di manipolazione alimentare dello stato di ferro, l'analisi RT-qPCR ha mostrato delle variazioni significative nell'espressione ipotalamica di geni correlati a specifiche "pathways" o funzioni biologicamente rilevanti e in cui è riconosciuto il coinvolgimento del ferro.

- **Funzione riproduttiva: basi molecolari della perturbazione ipotalamo-ipofisaria**

Innanzitutto, la nostra attenzione si è focalizzata sull'identificazione di eventuali perturbazioni a carico dell'asse riproduttivo e principalmente a livello dei neuroni GnRH. La dieta IED ha indotto un aumento nell'mRNA del GnRH, contrariamente alle nostre aspettative di un HH centrale (ipotalamico o terziario). Tuttavia, sarebbe necessario integrare questo dato con l'effetto del sovraccarico marziale sulla secrezione dell'ormone decapeptidico, non effettuato in tale lavoro di tesi. Infatti, dalla letteratura emerge come l'espressione genica di un ormone ipotalamico non sia sempre in analogia con la sua secrezione e, in tale contesto, potrebbero influire diversi fattori quali il tipo o la durata della stimolazione [400]. L'aumentata espressione del trascritto del GnRH potrebbe essere ascrivibile ad un "effetto rebound" della ridotta secrezione del decapeptide. Inoltre, i livelli di mRNA del GnRH non correlano con l'espressione genica delle gonadotropine ipofisarie. Sebbene non

siano state osservate variazioni nel trascritto dell'FSH, notoriamente meno responsivo dell'LH alla pulsatilità del GnRH, i livelli dell'mRNA dell'LH tendono a ridursi nei topi IED, suggerendo che effettivamente potrebbe sussistere una disfunzione centrale. Negli ultimi anni è emerso il ruolo cruciale del sistema Kiss-1 (neuroni secernenti kisspeptina) /GPR54 (recettore di kisspeptina) nell'attivazione dei neuroni GnRH e quindi dell'asse riproduttivo [311, 401] e nella mediazione della regolazione a feedback degli steroidi sessuali sulla secrezione del GnRH e delle gonadotropine [402]. Nel 2003, due indipendenti gruppi di lavoro hanno identificato la presenza di mutazioni inattivanti o delezioni del gene GPR54 in rare forme di HH [120, 121]. Nei nostri topi IED, le alterazioni delle componenti dell'asse riproduttivo non sono ascrivibili a variazioni nei livelli di espressione genica dei neuroni Kiss-1 o del recettore GPR54. Anche dalla letteratura non emergono studi in merito agli effetti dell'eccesso di ferro sul sistema Kiss-1/GPR54.

Per meglio comprendere quale effettivamente sia la sede anatomica della disfunzione riproduttiva nell'asse HPG e quali siano i meccanismi fisiopatologici coinvolti sono in corso analisi del profilo endocrino dei topi IED, in termini di dosaggio dei livelli sierici di LH, FSH e testosterone libero. Inoltre, per chiarire l'effettivo contributo del sistema Kiss1-GPR54 e dei neuroni GnRH nella perturbazione ferro-indotta dell'asse riproduttivo, saranno condotti esperimenti d'ibridazione *in situ* su sezioni ipotalamiche di topi IED.

- **Lieve attivazione ipotalamica del pathway infiammatorio e dello stress**

Complessivamente, i modelli di sovraccarico marziale, genetico o dietetico, presenti in letteratura, hanno mostrato variazioni irrilevanti nei sistemi preposti alla regolazione dello stress ossidativo nel cervello *in toto* [393]. In realtà, l'esplorazione degli stessi nell'ipotalamo dei nostri topi IED ha evidenziato un incremento nell'mRNA di CHOP (proteina omologa di CAAT/enhancer binding protein (C/EPB); marker dell'attivazione della risposta allo stress nel reticolo endoplasmatico), come nel VAT [1], ma nessuna variazione nell'espressione genica di SOD2 (Superossido Dismutasi 2; marker di stress ossidativo) e nello splicing di XBP-1 (Proteina di Legame di X-box 1; marker dell'attivazione della risposta allo stress nel reticolo endoplasmatico). L'aumentata espressione genica ipotalamica di CHOP è probabilmente da considerarsi come un epifenomeno del sovraccarico periferico di ferro.

Inoltre, dalla letteratura sono emersi pochi cambiamenti in merito all'espressione cerebrale di geni correlati a processi infiammatori e apoptotici, spesso implicati nel danno o morte neuronale in risposta ad elevati livelli marziali [372]. Nel nostro

modello, la dieta IED non ha aumentato l'espressione di citochine pro-infiammatorie nel siero, nel fegato e nel VAT [1] mentre nell'ipotalamo si è registrato un incremento nell'espressione genica del TNF $\alpha$ . In numerosi studi, l'attivazione ipotalamica del pattern infiammatorio è stata associata alla promozione di un bilancio energetico negativo. Sebbene i topi IED abbiano manifestato un ridotto incremento ponderale, non è ad oggi possibile correlare i due fenomeni. Infatti, per comprendere il reale significato di questo stato pro-infiammatorio è necessario identificare quale tipo cellulare sviluppi tale condizione (neuroni, astrociti, oligodendrociti, microglia, cellule endoteliali ed ependimali), in quali nuclei ipotalamici avvenga l'aumentata sintesi di TNF $\alpha$  e quali circuiti neuronali siano coinvolti [403].

- **Promozione di uno stato oressigenico**

Nel nostro modello murino di sovraccarico marziale, la dieta IED ha comportato un minor incremento ponderale in parte giustificabile con una spontanea riduzione dell'assunzione di cibo da parte dei topi IED. Tale calo è associato alla riduzione della massa del VAT stimata dal peso del grasso perigonadico. Come atteso, si è osservato un minor rilascio di leptina dal VAT che ha modificato i livelli di mRNA dei neuropeptidi ipotalamici regolatori dell'appetito favorendo l'attivazione del pathway oressigenico (aumento dell'espressione genica del peptide oressizzante NPY/AGRP e riduzione di quella del peptide anoressante POMC). L'asse ipotalamo-tessuto adiposo viscerale è coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi energetica mediante la regolazione dell'assunzione di cibo e della spesa energetica. A livello ipotalamico, tale funzione è esercitata prevalentemente dall'ARC preposto all'integrazione di segnali circolanti periferici quali ormoni (insulina e grelina), adipochine (leptina) e nutrienti (glucosio, acidi grassi liberi) e al conseguente rilascio di specifici neuropeptidi. A sua volta, ARC controlla l'attività di altri nuclei ipotalamici: il ventromediale (VMN), il dorsomediale (DMN) e il paraventricolare (PVN), considerati i "centri della sazietà"; l'area ipotalamica laterale (LHA), definita "centro della fame". L'ipotalamo, soprattutto il PVN, risponde ai segnali endocrini periferici modulando, attraverso il nucleo del tratto solitario del tronco encefalico, l'attività del sistema nervoso autonomo simpatico che regola la spesa energetica tramite lipolisi e/o termogenesi nel VAT [404-406].

- **Modulazione delle vie di segnale di MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt e AMPK nell'ipotalamo**

La preliminare caratterizzazione degli effetti centrali del sovraccarico di ferro sistemico è proseguita con l'indagine delle possibili vie di segnale coinvolte nelle variazioni,

seppur di lieve entità, osservate a livello ipotalamico. Tale analisi è stata però condotta su ipotalami interi ed è quindi il risultato dei contributi di diversi nuclei e tipi cellulari, neuronali o meno. Indagini future verteranno sull'isolamento dei nuclei preposti al controllo della funzionalità riproduttiva per meglio comprendere quali vie di segnale siano effettivamente coinvolte nella modulazione dell'asse HPG da parte del ferro. I componenti della famiglia MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), ERK1/2 (Extracellular-Signal-Regulated Kinase 1/2), JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> Terminal Kinase) e p38, svolgono un ruolo chiave nelle difese antiossidanti e nelle risposte pro- e anti-infiammatorie [407] e sono coinvolti nella regolazione di una grande varietà di processi tra cui l'adesione cellulare, la progressione del ciclo cellulare, la migrazione cellulare, la sopravvivenza, la differenziazione, il metabolismo, la proliferazione e la trascrizione [408]. Fattori di crescita, citochine, agenti stressogeni pro-ossidanti quali il ferro e altri metalli neurotossici attivano e inducono la traslocazione nucleare di ERK1/2 [407, 409-415]. E' stato dimostrato che lo stress ossidativo indotto dall'eccesso marziale provoca morte cellulare mediante l'attivazione, ERK-dipendente, delle vie di segnale apoptotiche o necrotiche [416]. L'eccessiva attivazione della via di MAPK è quindi uno dei segnali più importanti di morte cellulare neuronale [408, 417]. Nel nostro modello sperimentale, la IED non ha modificato i livelli di fosforilazione di ERK1/2 nell'ipotalamo, suggerendo che l'entità di sovraccarico di ferro sistemico non è stata sufficiente per indurre stress ossidativo e danno cellulare nell'ipotalamo.

La serina-treonina protein chinasi Akt, conosciuta anche come PKB (protein chinasi B) è uno dei principali effettori a valle di PI3K (fosfatidilinositol-3-chinasi) [418]. La via di PI3K/Akt controlla una serie molto ampia di funzioni cellulari tra cui la crescita, la sopravvivenza, la proliferazione cellulare e il metabolismo glucidico [419]. Nei neuroni, l'attivazione di PI3K/Akt in risposta ad uno stato di debole stress ossidativo indotto dall'eccesso di ferro è stata associata all'attivazione di meccanismi di plasticità sinaptica e di sopravvivenza neuronale. Nello specifico, PI3K/Akt agirebbe riducendo l'espressione di SOD1 e SOD2 e bilanciando la perdita di tali enzimi antiossidanti mediante regolazione del contenuto di GSH (glutazione ridotto) [420]. In effetti, i topi IED hanno mostrato un'aumentata fosforilazione di Akt unitamente alla riduzione, seppur non significativa, dell'espressione genica di SOD2. Tale dato deve però essere necessariamente supportato da indagini aggiuntive.

AMPK (proteina chinasi attivata da AMP) è un sensore dei livelli energetici cellulari ed è attivata da stati di deficit energetico fisiologico e patologico a livello sistemico o in un singolo tessuto. Tale chinasi promuove l'attivazione delle vie cataboliche del metabolismo glucidico e lipidico e spegne i processi che consumano energia al fine di

contrastare il bilancio energetico negativo. Nel SNC, AMPK stimola l'assunzione di cibo e la produzione epatica di glucosio ed inibisce la spesa energetica e l'ossidazione degli acidi grassi [420-424]. L'attivazione ipotalamica di AMPK è uno stimolo oressigeno e, se in eccesso, contribuisce al processo d'infiammazione centrale [425]. Nel nostro modello di sovraccarico marziale, l'aumento della fosforilazione di AMPK potrebbe derivare dalla ridotta stimolazione da parte dell'ormone anoressizzante leptina ed essere associata all'aumento di TNF $\alpha$ .

### **CARATTERIZZAZIONE DI MODELLI *IN VITRO* DI NEURONI GnRH IMMATURI E MATURI SOTTOPOSTI A SOVRACCARICO DI FERRO**

Oltre alla via enterale (ferro eme e non-eme nella dieta) e parenterale (trasfusioni o iniezioni di composti contenenti ferro), il ferro può entrare nell'organismo attraverso la placenta durante la vita prenatale [426]. In particolare, tutto il ferro necessario per la crescita e lo sviluppo fetale è trasportato in modo unidirezionale dalla circolazione materna al feto contro gradiente di concentrazione [427]. I sinciziotrofoblasti placentari possiedono un sistema di "trafficking" del ferro simile a quello dell'epitelio duodenale, ma, diversamente dall'enterocita, la placenta regola l'espressione delle proteine preposte all'omeostasi marziale in risposta a segnali sia materni che fetali [428]. Sebbene la carenza di ferro nelle donne in gravidanza sia un problema molto più comune rispetto al sovraccarico marziale, l'eccesso di ferro è stato associato a complicanze quali la variazione di peso alla nascita [429] e lo sviluppo di diabete gestazionale [430]. Qualsiasi difetto genetico o metabolico che causa un aumento nell'accumulo di ferro nel feto, prevalentemente nel fegato, è probabilmente caratterizzato da un anomalo trasferimento placentare di ferro dalla madre al feto [431, 432]. Per realizzare un modello sperimentale di sovraccarico marziale nel feto è necessario aumentare il contenuto di ferro nella dieta materna. Tale approccio è però limitato dalla difficoltà di ottenere un elevato carico marziale nel feto e di determinare gli effettivi livelli di esposizione di ciascun feto al ferro dietetico [431]. La disponibilità nel nostro laboratorio di modelli cellulari *in vitro* di neuroni GnRH immaturi immortalizzati ci ha consentito di effettuare delle indagini preliminari sulla capacità del ferro di perturbare tale sistema.

- **Compromissione della capacità migratoria di neuroni GnRH immaturi**

Gli studi condotti sui neuroni GN-11 immaturi hanno evidenziato il potenziale effetto inibitorio di dosi sovra-fisiologiche di ferro sulla migrazione *in vivo* dei neuroni GnRH

durante la vita embrionale dal placode olfattorio all'ipotalamo. Nei mammiferi, tale processo migratorio è un pre-requisito essenziale per lo sviluppo del compartimento riproduttivo ipotalamico e per l'acquisizione della competenza riproduttiva in età adulta. Numerosi segnali genetici e locali, presenti lungo il percorso migratorio, quali fattori di adesione, diffusivi o connessi alla matrice extracellulare, influenzano la migrazione nei neuroni GnRH; l'identità di molecole e meccanismi che perturbano negativamente tale processo è ancora poco conosciuta [31, 374]. Questo lavoro di tesi aggiunge un elemento di novità in tale ambito poiché ha evidenziato la capacità dell'eccesso di ferro di inibire la chemiotassi, indotta da FBS, delle cellule GN-11 in modo dose- e tempo-dipendente. Il minor effetto anti-migratorio ottenuto con dosi molto elevate di Citrato di Ammonio Ferrico (FAC) (1000  $\mu\text{M}$ ) rispetto a dosaggi più bassi (200 e 500  $\mu\text{M}$ ) è probabilmente ascrivibile alla saturazione o down-regolazione del recettore e/o delle vie di segnale associate. Degna di nota è l'osservazione che dosi sovra-fisiologiche di ferro non comportano un abbattimento della migrazione dei neuroni GnRH immaturi, come avviene nella sindrome di Kallman [4], ma possono comunque alterare negativamente il normale processo fisiologico con conseguente HH. L'effettivo contributo negativo del ferro sulla chemomigrazione delle GN-11 è stato confermato dal ripristino della motilità basale dopo chelazione dell'eccesso di FAC mediante Deferoxamina Mesilato (DFO), un siderofooro che forma complessi esadentati in rapporto molare 1:1 con gli ioni ferrici liberi (NTBI - "Non-Transferrin Bound Iron") [433]. DFO è un farmaco attualmente impiegato in clinica per ridurre il carico di ferro nell'organismo [434] e la sua efficacia nel sequestro del NTBI è stata ampiamente dimostrata [435]. Come atteso, l'incubazione delle cellule GN-11 con il solo chelante ha inibito in modo più marcato rispetto al solo ferro la chemiotassi FBS-indotta, poiché DFO ha deprivato le cellule del contenuto marziale necessario per le normali funzioni biologiche. L'eccesso, e ancora di più, il deficit marziale hanno quindi un impatto negativo sulla migrazione neuronale.

- **Metabolismo marziale**

Il primo approccio allo studio degli effetti del ferro sui neuroni immortalizzati immaturi GN-11 ha previsto la caratterizzazione della risposta di tali sistemi al sovraccarico marziale. L'analisi è stata estesa anche all'analogo maturo GT1-7, utilizzato solo marginalmente in questo lavoro di tesi.

Le cellule GN-11 e GT1-7 hanno aumentato fortemente il proprio specifico contenuto marziale dopo opportuno trattamento con FAC, il che è indicativo della capacità di tali sistemi *in vitro* di soddisfare i meccanismi fisiologici alla base della captazione del

ferro [371]. E' interessante notare come i neuroni GnRH immaturi, in condizioni basali, contengano livelli intracellulari di ferro due volte più elevati rispetto agli analoghi maturi e come siano in grado di accumularne quantità molto maggiori dopo esposizione a FAC. Tale comportamento potrebbe rispecchiare quanto osservato *in vivo* da Piñero e collaboratori, sebbene i sistemi *in vitro* siano ovviamente un modello semplicistico dei neuroni GnRH *in vivo* poiché sprovvisti della protezione fisica fornita dalla BEE. Secondo tali ricercatori, il cervello di ratti adulti alimentati con dieta arricchita in ferro è meno suscettibile all'accumulo marziale rispetto a quello di ratti non ancora svezzati e nutriti da madri con elevati livelli sistemici di ferro [267].

Gli studi di tossicità cellulare sono stati condotti esclusivamente nelle cellule GN-11 poiché la maggior quota di ferro captato le rende potenzialmente più a rischio di tossicità. L'accumulo intracellulare di ferro nelle GN-11 non è stato accompagnato da una riduzione della vitalità o dall'alterazione della loro normale morfologia. Si è quindi ipotizzato che tali modelli *in vitro* possedessero i meccanismi necessari per l'immagazzinamento del ferro in forma non tossica e non reattiva [371] (come già descritto in culture primarie neuronali [330]) e che tali sistemi fossero modulati dalle condizioni sperimentali impiegate per indurre sovraccarico marziale. In effetti, tale ipotesi è stata avvalorata dall'identificazione in entrambe le linee cellulari del trascritto genico della FtH, i cui livelli sono stati significativamente aumentati dopo opportuna incubazione con FAC. Il ferro può essere trasportato nelle cellule mediante meccanismi dipendenti o meno dalla transferrina (Tf), la principale proteina di legame del ferro in circolo [436]. Poiché molti degli esperimenti descritti nella sezione "Risultati" sono stati condotti in terreno completato con siero fetale bovino (FBS), è plausibile che gran parte del FAC introdotto nel medium fosse legato dalla Tf sierica e quindi internalizzabile nelle cellule solo per endocitosi mediata dal TfR [371]. Abbiamo quindi accertato l'espressione genica di tale recettore in entrambe le linee cellulari in oggetto. Le condizioni sperimentali impiegate per indurre accumulo intracellulare di ferro hanno contemporaneamente ridotto l'mRNA del TfR, un meccanismo attivato dalle cellule allo scopo di minimizzare la captazione di altre molecole di FAC [329].

La modulazione inversa dell'espressione genica della FtH e del TfR, coordinata dal sistema IRE/IRP ("Iron Responsive Element-Iron Regulatory Protein") allo scopo di proteggere l'ambiente intracellulare dalla tossicità marziale [437], è stata dimostrata anche nelle cellule GT1-7 dopo analogo trattamento con FAC.

- **Modulazione delle vie di MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt e AMPK nelle cellule GN-11: solo PI3K/Akt è coinvolta nell'effetto inibitorio del ferro sul processo di migrazione**

Il trattamento con ferro è accompagnato dall'attivazione delle vie di segnale di MAPK/ERK1/2 e di PI3K/Akt e dalla contemporanea inibizione di quella di AMPK, vie che in nostri precedenti studi [373, 375] e in lavori riportati in letteratura sono state variamente associate con il processo di migrazione cellulare. In particolare, ERK1/2 è stato descritto come segnale pro-migratorio in cellule GN-11 [373, 375], in cellule T e negli eosinofili [438-441]; parimenti la via di PI3K/Akt promuove la migrazione in cellule GN-11 [373, 375], in cellule infiammatorie, quali eosinofili, macrofagi, neutrofilii e linfociti T [442] e in cellule endoteliali [443]. Al contrario, AMPK influenza negativamente la migrazione di monociti umani, di cellule stellate epatiche e di cellule della muscolatura liscia vascolare [444-446] mentre la sua azione, inibitoria o neutrale, sulle cellule GN-11 è dipendente dalla sua attivazione, rispettivamente, a monte o a valle di segnali pro-migratori [375]. Dal nostro studio è emerso come il ferro inibisca la migrazione FBS-indotta delle GN-11 coinvolgendo la via di PI3K/Akt in associazione ad altre non ancora identificate e senza alcun contributo di MAPK/ERK1/2 e AMPK. Più specificamente, la via di ERK1/2 è coinvolta nella migrazione delle GN-11 di per sé, sebbene con un contributo minore rispetto ad Akt e AMPK, ma non dopo attivazione da parte del ferro. AMPK è fondamentale per la chemiotassi basale delle GN-11 di per sé, come atteso dal ruolo specifico di tale chinasi nel controllo dell'omeostasi energetica e della riproduzione, ma non partecipa alla riduzione della migrazione indotta da FAC. L'attivazione della via di Akt è necessaria di per sé, seppur in modo meno evidente rispetto a quella di AMPK, per la completa migrazione delle GN-11, che è ulteriormente ridotta dall'associazione di FAC con l'inibitore di PI3K. Considerati nel loro insieme, questi risultati indicano come il ferro inibisca la migrazione FBS-indotta delle GN-11 coinvolgendo solo la via di Akt, tra quelle analizzate, in associazione ad altre vie non ancora identificate. L'azione pro-migratoria delle vie di ERK1/2, Akt e AMPK di per sé si evince anche dall'effetto additivo sull'inibizione della migrazione ottenuto con la loro associazione; tale riduzione è stata ulteriormente amplificata dalla contemporanea aggiunta di ferro confermando come tale metallo agisca necessariamente attraverso altre vie, oltre a quella di Akt.

- **Attivazione del pathway infiammatorio e induzione di stress ossidativo nelle cellule GN-11**

L'accumulo intracellulare della percentuale di ferro libero è potenzialmente tossico per l'ambiente cellulare poiché può partecipare alla reazione di Fenton generando specie radicaliche dell'ossigeno (ROS). Un'eccessiva produzione di radicali liberi potrebbe danneggiare i lipidi di membrana, le proteine e gli acidi nucleici alterando la funzionalità neuronale e inducendo morte cellulare. I neuroni sono particolarmente suscettibili al danno ossidativo ed hanno sviluppato numerosi meccanismi di protezione per contrastare gli effetti deleteri dei ROS.

Le condizioni impiegate per indurre sovraccarico marziale non sono state sufficienti per promuovere la traslocazione nucleare del fattore NF- $\kappa$ B e l'attivazione del suo signaling neppure dopo incubazione con concentrazioni più elevate di FAC. La sola evidenza d'induzione del pathway infiammatorio è stata riscontrata nell'aumento dose-dipendente dei livelli di mRNA di IL-6. Le perturbazioni del processo migratorio potrebbero essere ascrivibili all'induzione di stress ossidativo (aumento dell'mRNA di SOD2) senza però il coinvolgimento del reticolo endoplasmatico (nessuna variazione nel trascritto di CHOP e nello splicing di XBP-1).

## **LIMITAZIONI DELLO STUDIO**

Il nostro approccio analitico si è basato solo sull'analisi dell'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi marziale (TfR, FtH, epcidina), nella regolazione della funzione riproduttiva (Kiss1, GPR54, GnRH, LH, FSH), nei processi infiammatori (TNF $\alpha$ , IL-6) e nello stress ossidativo (SOD2) o del RE (CHOP, XBP-1). Abbiamo scelto di utilizzare l'analisi RT-qPCR perché ci ha consentito di valutare, più velocemente e in via preliminare, diversi geni in due distinti modelli sperimentali (*in vivo* e *in vitro*). Studi futuri prenderanno in considerazione altri livelli di potenziale regolazione, come i cambiamenti nell'espressione o nell'attività delle rispettive proteine.

Inoltre, la nostra esplorazione in campioni d'ipotalamo intero delle variazioni nell'espressione di geni e proteine d'interesse non tiene in considerazione la possibilità di fluttuazioni divergenti e compensatorie nei livelli d'espressione nei diversi nuclei.

Il modello *in vitro* di neuroni GnRH immaturi rappresenta un fenotipo estremo di sovraccarico marziale ipotalamico e necessita di conferme in modelli *in vivo*.

## CONCLUSIONI

1. Il sovraccarico dietetico di ferro in topi C57BL/6J riproduce il fenotipo clinico e biochimico di pazienti affetti da DIOS in termini di:
  - a) modulazione dei parametri associati al ferro nella circolazione sanguigna e nel fegato (incremento del contenuto marziale sierico ed epatico, aumentata sintesi e rilascio di epcidina) [1];
  - b) compromissione del metabolismo glucidico con un'azione primaria a livello del VAT (iperiperglicemia a digiuno ascrivibile a IR per alterata attivazione del signaling insulinico nel VAT) [1];
  - c) perturbazione del metabolismo lipidico (ipertrigliceridemia a digiuno) a causa di modificazioni indotte dallo stress ossidativo nel fegato [1];
  - d) alterazioni della funzione riproduttiva a livello molecolare (variazione nell'espressione genica del GnRH ipotalamico e delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH) e macroscopico (atrofia gonadica) che suggeriscono la presenza di ipogonadismo ipogonadotropo.
2. Tutte le componenti dell'asse riproduttivo, ovvero ipotalamo, ipofisi e gonadi, sono diversamente perturbate dalla dieta IED ma ulteriori indagini quali l'analisi del profilo ormonale (LH, FSH e testosterone) e il dosaggio del decapeptide ipotalamico sono necessarie per accertare la sede anatomica primaria della disfunzione riproduttiva e i meccanismi fisiopatologici coinvolti.
3. Il sovraccarico alimentare di ferro induce variazioni di lieve entità nell'espressione genica ipotalamica probabilmente a causa del mancato accumulo marziale in tale distretto anatomico. Le alterazioni osservate potrebbero essere un epifenomeno delle perturbazioni marziali e metaboliche periferiche (leptina) oppure l'effetto locale di mediatori indiretti dell'azione del ferro o l'unione di entrambi.
4. I modelli neuronali *in vitro* ci hanno consentito di realizzare un fenotipo estremo di sovraccarico marziale ipotalamico che non tiene in considerazione dell'ostacolo fornito dalla BEE al libero passaggio di ferro. E' emerso come i neuroni, immaturi e maturi, contengano i sistemi di captazione e regolazione dell'omeostasi marziale e come questi siano in grado di rispondere al sovraccarico di ferro. Un'effettiva esposizione dei neuroni a livelli eccessivi di ferro è potenzialmente in grado di sovrastare i meccanismi di difesa cellulare e di indurre stress ossidativo e infiammazione.
5. Dosi di ferro che si accumulano nei neuroni GnRH immaturi senza comprometterne la vitalità influiscono negativamente sulla migrazione di tali neuroblasti che avviene fisiologicamente dal placode olfattorio all'ipotalamo durante la vita

embrionale. L'esposizione a dosi eccessive di ferro potrebbe quindi compromettere il corretto sviluppo della componente riproduttiva ipotalamica.

6. La ridotta migrazione di neuroni immaturi esposti a un carico marziale potrebbe essere estesa, in senso generale, al processo di neurogenesi che avviene in mammiferi adulti in specifiche regioni cerebrali: dalla zona sottogranulare del giro dentato verso lo strato di cellule granulari dell'ippocampo e dalla zona sottoventricolare del ventricolo laterale fino ai bulbi olfattori attraverso il flusso migratorio rostrale [346]. Un aumento del contenuto marziale in tali regioni potrebbe indurre delle modificazioni nel processo di generazione e rifornimento di nuovi neuroni funzionanti e in zone più sensibili quali l'ippocampo potrebbe contribuire, nel lungo periodo, allo sviluppo di neurodegenerazione.

# 11. BIBLIOGRAFIA

1. Dongiovanni, P., et al., *Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2254-63.
2. Pinilla, L., et al., *Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms*. Physiol Rev, 2012. **92**(3): p. 1235-316.
3. Navarro, V.M. and M. Tena-Sempere, *Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(1): p. 40-53.
4. Fraietta, R., D.S. Zylberstejn, and S.C. Esteves, *Hypogonadotropic hypogonadism revisited*. Clinics (Sao Paulo), 2013. **68 Suppl 1**: p. 81-8.
5. *Apparato Endocrino in Anatomia dell'uomo* a cura di Castano, P. and Donato, R.F., 2001, Edi-Ermes
6. Aron, D.C., Findling, J.W., Tyrrell, J.B., *Ipotalamo e Ipofisi*, in *Endocrinologia Generale e Clinica*, Greenspan, F.S. and Strewler, G.J. (eds), 2000, Piccin.
7. Uyama, N., A. Geerts, and H. Reynaert, *Neural connections between the hypothalamus and the liver*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 808-20.
8. Chi, J.G. and M.H. Lee, *Anatomical observations of the development of the pituitary capsule*. J Neurosurg, 1980. **52**(5): p. 667-70.
9. Kawamura, K. and S. Kikuyama, *Morphogenesis of the hypothalamus and hypophysis: their association, dissociation and reassociation before and after "Rathke"*. Arch Histol Cytol, 1998. **61**(3): p. 189-98.
10. Negri-Cesi, P., Celotti, F., *Le malattie del sistema endocrino* in *Patologia Generale e Fisiopatologia*, Celotti, F. (ed), 2013, EdiSes.
11. de Kretser, D. and Kerr, J.B., et al., *The cytology of the testis and intrinsic control mechanisms.*, in *Physiology of Reproduction*, Knobil, E. y Neill, J., Editor 1988, Raven Press: New York. p. 837-932.
12. Bardin, C., et al., *The Sertoli Cell.* , in *Physiology of Reproduction*, E.y.N. Knobil, J. , Editor 1988, Raven Press: New York. p. 933-974.
13. Leblond, C.P. and Y. Clermont, *Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*. Ann N Y Acad Sci, 1952. **55**(4): p. 548-73.
14. Saez, J.M., *Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation*. Endocr Rev, 1994. **15**(5): p. 574-626.
15. Skinner, M.K., *Cell-cell interactions in the testis*. Endocr Rev, 1991. **12**(1): p. 45-77.
16. Schwanzel-Fukuda, M., et al., *Biology of normal luteinizing hormone-releasing hormone neurons during and after their migration from olfactory placode*. Endocr Rev, 1992. **13**(4): p. 623-34.
17. Witkin, J.W. and A.J. Silverman, *Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in rat olfactory systems*. J Comp Neurol, 1983. **218**(4): p. 426-32.
18. Schwanzel-Fukuda, M., J.I. Morrell, and D.W. Pfaff, *Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat*. J Comp Neurol, 1985. **238**(3): p. 348-64.
19. Norgren, R.B., Jr. and M.N. Lehman, *Neurons that migrate from the olfactory epithelium in the chick express luteinizing hormone-releasing hormone*. Endocrinology, 1991. **128**(3): p. 1676-8.
20. Murakami, S., et al., *The ontogeny of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) producing neurons in the chick embryo: possible evidence for migrating LHRH neurons from the olfactory epithelium expressing a highly polysialylated neural cell adhesion molecule*. Neurosci Res, 1991. **12**(3): p. 421-31.
21. Ronnekleiv, O.K. and J.A. Resko, *Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of rhesus macaques*. Endocrinology, 1990. **126**(1): p. 498-511.
22. Schwanzel-Fukuda, M., et al., *Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos*. J Comp Neurol, 1996. **366**(3): p. 547-57.
23. Schwanzel-Fukuda, M. and D.W. Pfaff, *Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons*. Nature, 1989. **338**(6211): p. 161-4.
24. Wray, S., A. Nieburgs, and S. Elkabes, *Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode*. Brain Res Dev Brain Res, 1989. **46**(2): p. 309-18.
25. Gao, C., D.M. Noden, and R.B. Norgren, Jr., *LHRH neuronal migration: heterotypic transplantation analysis of guidance cues*. J Neurobiol, 2000. **42**(1): p. 95-103.

26. Kramer, P.R. and S. Wray, *Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons*. *Genes Dev*, 2000. **14**(14): p. 1824-34.
27. Rakic, P., *Principles of neural cell migration*. *Experientia*, 1990. **46**(9): p. 882-91.
28. Goldman, S.A. and M.B. Luskin, *Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain*. *Trends Neurosci*, 1998. **21**(3): p. 107-14.
29. Hatten, M.E., *The role of migration in central nervous system neuronal development*. *Curr Opin Neurobiol*, 1993. **3**(1): p. 38-44.
30. Schwarting, G.A., et al., *Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain*. *J Neurosci*, 2001. **21**(3): p. 911-9.
31. Tobet, S.A. and G.A. Schwarting, *Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration*. *Endocrinology*, 2006. **147**(3): p. 1159-65.
32. Simeone, A., et al., *A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo*. *EMBO J*, 1993. **12**(7): p. 2735-47.
33. Suda, Y., et al., *Functional equivalency between Otx2 and Otx1 in development of the rostral head*. *Development*, 1999. **126**(4): p. 743-57.
34. Grindley, J.C., D.R. Davidson, and R.E. Hill, *The role of Pax-6 in eye and nasal development*. *Development*, 1995. **121**(5): p. 1433-42.
35. Xu, P.X., et al., *Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode*. *Development*, 1997. **124**(1): p. 219-31.
36. Bovolenta, P., et al., *Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors*. *Mech Dev*, 1998. **70**(1-2): p. 201-3.
37. Davis, J.A. and R.R. Reed, *Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment*. *J Neurosci*, 1996. **16**(16): p. 5082-94.
38. Lawson, M.A. and P.L. Mellon, *Expression of GATA-4 in migrating gonadotropin-releasing neurons of the developing mouse*. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. **140**(1-2): p. 157-61.
39. Kramer, P.R., et al., *Ectopic expression of luteinizing hormone-releasing hormone and peripherin in the respiratory epithelium of mice lacking transcription factor AP-2alpha*. *Mech Dev*, 2000. **94**(1-2): p. 79-94.
40. Corradi, A., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice*. *Development*, 2003. **130**(2): p. 401-10.
41. Gorham, J.D., E.B. Ziff, and H. Baker, *Differential spatial and temporal expression of two type III intermediate filament proteins in olfactory receptor neurons*. *Neuron*, 1991. **7**(3): p. 485-97.
42. Wray, S., et al., *A subset of peripherin positive olfactory axons delineates the luteinizing hormone releasing hormone neuronal migratory pathway in developing mouse*. *Dev Biol*, 1994. **166**(1): p. 349-54.
43. Miragall, F., G. Kadmon, and M. Schachner, *Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system*. *Dev Biol*, 1989. **135**(2): p. 272-86.
44. Schwanzel-Fukuda, M., et al., *Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice*. *J Comp Neurol*, 1992. **321**(1): p. 1-18.
45. Pasterkamp, R.J., M.J. Ruitenber, and J. Verhaagen, *Semaphorins and their receptors in olfactory axon guidance*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1999. **45**(6): p. 763-79.
46. Nguyen Ba-Charvet, K.T., et al., *Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons*. *Neuron*, 1999. **22**(3): p. 463-73.
47. Nishizuka, M., et al., *Cell surface-associated extracellular distribution of a neural proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan, in the olfactory epithelium, olfactory nerve, and cells migrating along the olfactory nerve in chick embryos*. *Neurosci Res*, 1996. **24**(4): p. 345-55.
48. Tobet, S.A., J.E. Crandall, and G.A. Schwarting, *Relationship of migrating luteinizing hormone-releasing hormone neurons to unique olfactory system glycoconjugates in embryonic rats*. *Dev Biol*, 1993. **155**(2): p. 471-82.
49. Yoshida, K., et al., *The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve*. *J Neurosci*, 1995. **15**(12): p. 7769-77.
50. Puche, A.C., et al., *Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system*. *Dev Biol*, 1996. **179**(1): p. 274-87.
51. Mombaerts, P., *Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors*. *Science*, 1999. **286**(5440): p. 707-11.
52. Allen, M.P., et al., *Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark)*

- signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt.* Mol Endocrinol, 1999. **13**(2): p. 191-201.
53. Allen, M.P., et al., *Myocyte enhancer factors-2B and -2C are required for adhesion related kinase repression of neuronal gonadotropin releasing hormone gene expression.* J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39662-70.
  54. Wray, S., et al., *GABAergic neurons in the embryonic olfactory pit/vomeronasal organ: maintenance of functional GABAergic synapses in olfactory explants.* Dev Biol, 1996. **180**(2): p. 631-45.
  55. Fueshko, S.M., S. Key, and S. Wray, *GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants.* J Neurosci, 1998. **18**(7): p. 2560-9.
  56. Cariboni, A., et al., *The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons.* Hum Mol Genet, 2004. **13**(22): p. 2781-91.
  57. D'Arcangelo, G. and T. Curran, *Reeler: new tales on an old mutant mouse.* Bioessays, 1998. **20**(3): p. 235-44.
  58. Ikeda, Y. and T. Terashima, *Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse.* Dev Dyn, 1997. **210**(2): p. 157-72.
  59. Alcantara, S., et al., *Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse.* J Neurosci, 1998. **18**(19): p. 7779-99.
  60. Caviness, V.S., Jr., D.K. So, and R.L. Sidman, *The hybrid reeler mouse.* J Hered, 1972. **63**(5): p. 241-6.
  61. Goffinet, A.M., *Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice.* Brain Res, 1984. **319**(3): p. 261-96.
  62. Maeda, K., et al., *Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus.* Brain Res, 2010. **1364**: p. 103-15.
  63. Harris, G.W., *Oestrous rhythm. Pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat.* J Physiol, 1950. **111**(3-4): p. 347-60.
  64. Burgus, R., et al., *Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation).* Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(1): p. 278-82.
  65. Matsuo, H., et al., *Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence.* Biochem Biophys Res Commun, 1971. **43**(6): p. 1334-9.
  66. Fernald, R.D. and R.B. White, *Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions.* Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(3): p. 224-40.
  67. Montaner, A.D., et al., *Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains.* Neuroendocrinology, 2001. **74**(3): p. 202-12.
  68. Okubo, K. and Y. Nagahama, *Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates.* Acta Physiol (Oxf), 2008. **193**(1): p. 3-15.
  69. Temple, J.L., R.P. Millar, and E.F. Rissman, *An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior.* Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 13-9.
  70. Kauffman, A.S. and E.F. Rissman, *A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: mediation of energy status and female sexual behavior.* Endocrinology, 2004. **145**(8): p. 3639-46.
  71. Kauffman, A.S. and E.F. Rissman, *The evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II modifies food intake.* Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 686-91.
  72. Barnett, D.K., et al., *Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys.* Endocrinology, 2006. **147**(1): p. 615-23.
  73. Kasten, T.L., et al., *Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: first direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal.* Gen Comp Endocrinol, 1996. **104**(1): p. 7-19.
  74. Sherwood, N., et al., *Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(9): p. 2794-8.
  75. Yamamoto, N., Y. Oka, and S. Kawashima, *Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis.* Neuroendocrinology, 1997. **65**(6): p. 403-12.
  76. Gonzalez-Martinez, D., et al., *Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (Dicentrarchus labrax) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides.* J Comp Neurol, 2002. **446**(2): p. 95-113.
  77. Merchantlaler, I., et al., *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain.* Cell Tissue Res, 1984. **237**(1): p. 15-29.

78. Wu, T.J., M.J. Gibson, and A.J. Silverman, *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons of the developing tectum of the mouse*. J Neuroendocrinol, 1995. **7**(12): p. 899-902.
79. Quanbeck, C., et al., *Two populations of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the forebrain of the rhesus macaque during embryonic development*. J Comp Neurol, 1997. **380**(3): p. 293-309.
80. Song, T., et al., *GnRH-prohormone-containing neurons in the primate brain: immunostaining for the GnRH-associated peptide*. Peptides, 1987. **8**(2): p. 335-46.
81. Dudas, B. and I. Merchenthaler, *Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1842-8.
82. Clarke, I.J. and J.T. Cummins, *Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1987. **1**(1): p. 1-21.
83. Silverman, A.J., J. Jhamandas, and L.P. Renaud, *Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence*. J Neurosci, 1987. **7**(8): p. 2312-9.
84. Merchenthaler, I., *Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: a retrograde tracing study with fluoro-gold*. Neuroscience, 1991. **44**(3): p. 655-62.
85. Merchenthaler, I., et al., *Immunocytochemical localization of the gonadotropin-releasing hormone-associated peptide portion of the LHRH precursor in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the rat central nervous system*. Cell Tissue Res, 1989. **255**(1): p. 5-14.
86. Clark, M.E. and P.L. Mellon, *The POU homeodomain transcription factor Oct-1 is essential for activity of the gonadotropin-releasing hormone neuron-specific enhancer*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(11): p. 6169-77.
87. Seeburg, P.H. and J.P. Adelman, *Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone*. Nature, 1984. **311**(5987): p. 666-8.
88. Adelman, J.P., et al., *Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(1): p. 179-83.
89. Gore, A.C., et al., *Post-transcriptional regulation of the gonadotropin-releasing hormone gene in GT1-7 cells*. J Neuroendocrinol, 1997. **9**(4): p. 271-7.
90. Wirsig-Wiechmann, C.R. and A.F. Wiechmann, *Vole retina is a target for gonadotropin-releasing hormone*. Brain Res, 2002. **950**(1-2): p. 210-7.
91. Wirsig-Wiechmann, C.R., *Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction*. Keio J Med, 2001. **50**(2): p. 81-5.
92. Khan, M.A., V.A. Ferro, and W.H. Stimson, *Use of a highly specific monoclonal antibody against the central variable amino acid sequence of mammalian gonadotropin releasing hormone to evaluate GnRH-I tissue distribution compared with GnRH-I binding sites in adult male rats*. Am J Reprod Immunol, 2003. **49**(4): p. 239-48.
93. Hsueh, A.J. and P.B. Jones, *Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone*. Endocr Rev, 1981. **2**(4): p. 437-61.
94. Marchetti, B., et al., *Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone-releasing hormone and beta-adrenergic receptors during puberty: a biochemical and autoradiographic study*. Endocrinology, 1987. **121**(1): p. 219-26.
95. Khodr, G.S. and T. Siler-Khodr, *Localization of luteinizing hormone-releasing factor in the human placenta*. Fertil Steril, 1978. **29**(5): p. 523-6.
96. Reichler, I.M., et al., *The effect of GnRH analogs on urinary incontinence after ablation of the ovaries in dogs*. Theriogenology, 2003. **60**(7): p. 1207-16.
97. Reichler, I.M., et al., *Urodynamic parameters and plasma LH/FSH in spayed Beagle bitches before and 8 weeks after GnRH depot analogue treatment*. Theriogenology, 2006. **66**(9): p. 2127-36.
98. Reichler, I.M., et al., *Effect of a long acting GnRH analogue or placebo on plasma LH/FSH, urethral pressure profiles and clinical signs of urinary incontinence due to Sphincter mechanism incompetence in bitches*. Theriogenology, 2006. **66**(5): p. 1227-36.
99. Reichler, I.M., et al., *Comparative quantitative assessment of GnRH- and LH-receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs*. Theriogenology, 2007. **67**(6): p. 1134-42.
100. Coit, V.A., F.J. Dowell, and N.P. Evans, *Neutering affects mRNA expression levels for the LH- and GnRH-receptors in the canine urinary bladder*. Theriogenology, 2009. **71**(2): p. 239-47.
101. Weesner, G.D., B.A. Becker, and R.L. Matteri, *Expression of luteinizing hormone-releasing hormone and its receptor in porcine immune tissues*. Life Sci, 1997. **61**(17): p. 1643-9.
102. Wang, L., et al., *Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its mRNA in rat pancreas*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **172**(1-2): p. 185-91.

103. Dong, F., et al., *The heart: a novel gonadotrophin-releasing hormone target*. J Neuroendocrinol, 2011. **23**(5): p. 456-63.
104. Clayton, R.N., *Mechanism of GnRH action in gonadotrophs*. Hum Reprod, 1988. **3**(4): p. 479-83.
105. Tsutsumi, R. and N.J. Webster, *GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction*. Endocr J, 2009. **56**(6): p. 729-37.
106. Goodman RL, I.E., *Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, N. JD, Editor 2006, Elsevier: Amsterdam. p. pp. 2389-2447.
107. Karsch, F.J., *Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone*. Annu Rev Physiol, 1987. **49**: p. 365-82.
108. Lehman, M.N., L.M. Coolen, and R.L. Goodman, *Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3479-89.
109. Catt, K.J., et al., *GnRH receptors and actions in the control of reproductive function*. J Steroid Biochem, 1985. **23**(5B): p. 677-89.
110. Rasmussen, D.D., *Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence in vitro*. Neuroendocrinology, 1993. **58**(5): p. 511-8.
111. Krsmanovic, L.Z., S.S. Stojilkovic, and K.J. Catt, *Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation*. Trends Endocrinol Metab, 1996. **7**(2): p. 56-9.
112. Terasawa, E., *Cellular mechanism of pulsatile LHRH release*. Gen Comp Endocrinol, 1998. **112**(3): p. 283-95.
113. Moenter, S.M., et al., *Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion*. Front Neuroendocrinol, 2003. **24**(2): p. 79-93.
114. Krsmanovic, L.Z., et al., *The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(8): p. 402-8.
115. Belchetz, P.E., et al., *Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophysial gonadotropin-releasing hormone*. Science, 1978. **202**(4368): p. 631-3.
116. Herbison, A.E., *Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons*. Endocr Rev, 1998. **19**(3): p. 302-30.
117. Sun, J., Z. Chu, and S.M. Moenter, *Diurnal in vivo and rapid in vitro effects of estradiol on voltage-gated calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons*. J Neurosci, 2010. **30**(11): p. 3912-23.
118. Knobil, E., *The neuroendocrine control of the menstrual cycle*. Recent Prog Horm Res, 1980. **36**: p. 53-88.
119. Knobil, E., *The GnRH pulse generator*. Am J Obstet Gynecol, 1990. **163**(5 Pt 2): p. 1721-7.
120. Seminara, S.B., et al., *The GPR54 gene as a regulator of puberty*. N Engl J Med, 2003. **349**(17): p. 1614-27.
121. de Roux, N., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10972-6.
122. Roseweir, A.K., et al., *Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation*. J Neurosci, 2009. **29**(12): p. 3920-9.
123. Clarkson, J. and A.E. Herbison, *Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5817-25.
124. Franceschini, I., et al., *Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha*. Neurosci Lett, 2006. **401**(3): p. 225-30.
125. Adachi, S., et al., *Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats*. J Reprod Dev, 2007. **53**(2): p. 367-78.
126. Tomikawa, J., et al., *Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig*. Biol Reprod, 2010. **82**(2): p. 313-9.
127. Goodman, R.L., et al., *Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B*. Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5752-60.
128. Navarro, V.M., et al., *Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse*. J Neurosci, 2009. **29**(38): p. 11859-66.
129. Wakabayashi, Y., et al., *Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat*. J Neurosci, 2010. **30**(8): p. 3124-32.
130. Goodman, R.L., L.M. Coolen, and M.N. Lehman, *A Role for Neurokinin B in Pulsatile GnRH Secretion in the Ewe*. Neuroendocrinology, 2013.
131. Topaloglu, A.K., et al., *TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic*

- hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction.* Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 354-8.
132. Guran, T., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(10): p. 3633-9.
  133. Burke, M.C., et al., *Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus.* J Comp Neurol, 2006. **498**(5): p. 712-26.
  134. Smith, J.T., et al., *Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse.* Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3686-92.
  135. Foradori, C.D., et al., *Colocalization of progesterone receptors in parvocellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus.* Endocrinology, 2002. **143**(11): p. 4366-74.
  136. Ciofi, P., et al., *Presence of nuclear androgen receptor-like immunoreactivity in neurokinin B-containing neurons of the hypothalamic arcuate nucleus of the adult male rat.* Neurosci Lett, 1994. **182**(2): p. 193-6.
  137. Krajewski, S.J., et al., *Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat.* Neuroscience, 2010. **166**(2): p. 680-97.
  138. Krajewski, S.J., et al., *Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence.* J Comp Neurol, 2005. **489**(3): p. 372-86.
  139. Herbison, A.E., et al., *Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons.* Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 312-21.
  140. Ciofi, P., D. Leroy, and G. Tramu, *Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area.* Neuroscience, 2006. **141**(4): p. 1731-45.
  141. Goodman, R.L., et al., *Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes.* Endocrinology, 2013. **154**(11): p. 4259-69.
  142. Dahl, S.K., et al., *Dynorphin immunoreactive fibers contact GnRH neurons in the human hypothalamus.* Reprod Sci, 2009. **16**(8): p. 781-7.
  143. Cravo, R.M., et al., *Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models.* Neuroscience, 2011. **173**: p. 37-56.
  144. Oakley, A.E., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Kisspeptin signaling in the brain.* Endocr Rev, 2009. **30**(6): p. 713-43.
  145. Smith, J.T., et al., *Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse.* Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 2976-84.
  146. Gottsch, M.L., et al., *Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways.* J Neurosci, 2009. **29**(29): p. 9390-5.
  147. Rance, N.E. and T.R. Bruce, *Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats.* Neuroendocrinology, 1994. **60**(4): p. 337-45.
  148. Ferin, M., D. Van Vugt, and S. Wardlaw, *The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides.* Recent Prog Horm Res, 1984. **40**: p. 441-85.
  149. Foradori, C.D., et al., *Progesterone increases dynorphin concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic Acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep.* Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1835-42.
  150. Herbison, A.E., *Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V).* Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 277-87.
  151. Glidewell-Kenney, C., et al., *Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8173-7.
  152. Ducret, E., G. Gaidamaka, and A.E. Herbison, *Electrical and morphological characteristics of anteroventral periventricular nucleus kisspeptin and other neurons in the female mouse.* Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2223-32.
  153. Pronina, T., et al., *Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurons in rat fetuses.* J Neuroendocrinol, 2003. **15**(6): p. 549-58.
  154. Romanelli, R.G., et al., *Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration.* J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 117-26.
  155. Martinez-Fuentes, A.J., et al., *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression*

- and membrane signaling in early embryonic GnRH neurons: role in pulsatile neurosecretion.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(7): p. 1808-17.
156. Peng, C., et al., *Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells.* Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 1740-6.
  157. Di Matteo, L., M. Vallarino, and R. Pierantoni, *Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary, and testis of the frog, Rana esculenta.* J Exp Zool, 1996. **274**(1): p. 33-40.
  158. Gohar, J., M. Mazor, and J.R. Leiberman, *GnRH in pregnancy.* Arch Gynecol Obstet, 1996. **259**(1): p. 1-6.
  159. Jacobson, J.D., et al., *Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs.* Neuroendocrinology, 1998. **67**(2): p. 117-25.
  160. Van Bael, A., et al., *Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) mRNA in Rathke's pouch and effect of the GnRH-antagonist ORG 30276 on lactotroph development in vitro.* J Neuroendocrinol, 1998. **10**(6): p. 437-45.
  161. Bauer, T.W., C.M. Moriarty, and G.V. Childs, *Studies of immunoreactive gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the rat anterior pituitary.* J Histochem Cytochem, 1981. **29**(10): p. 1171-8.
  162. Porter, J.C., et al., *Hypothalamic peptide and catecholamine secretion: roles for portal and retrograde blood flow in the pituitary stalk in the release of hypothalamic dopamine and pituitary prolactin and LH.* Clin Obstet Gynaecol, 1978. **5**(2): p. 271-82.
  163. Porter, J.C., et al., *Hypothalamic-hypophysial vasculature and its relationship to secretory cells of the hypothalamus and pituitary gland.* Vitam Horm, 1983. **40**: p. 145-74.
  164. Krsmanovic, L.Z., et al., *Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone.* Endocrinology, 2000. **141**(3): p. 1187-95.
  165. Gharib, S.D., et al., *Molecular biology of the pituitary gonadotropins.* Endocr Rev, 1990. **11**(1): p. 177-99.
  166. Pierce, J.G. and T.F. Parsons, *Glycoprotein hormones: structure and function.* Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 465-95.
  167. Fiddes, J.C. and K. Talmadge, *Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones.* Recent Prog Horm Res, 1984. **40**: p. 43-78.
  168. Garcia-Campayo, V. and I. Boime, *Novel recombinant gonadotropins.* Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(2): p. 72-7.
  169. Zapatero-Caballero, H., et al., *Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats.* Biol Reprod, 2003. **68**(5): p. 1764-70.
  170. Zapatero-Caballero, H., et al., *Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats.* Biol Reprod, 2004. **70**(2): p. 348-55.
  171. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective.* Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 141-74.
  172. Segaloff, D.L. and M. Ascoli, *The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later.* Endocr Rev, 1993. **14**(3): p. 324-47.
  173. Ulloa-Aguirre, A. and C. Timossi, *Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor.* Hum Reprod Update, 1998. **4**(3): p. 260-83.
  174. Herrlich, A., et al., *Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C.* J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16764-72.
  175. Gudermann, T., M. Birnbaumer, and L. Birnbaumer, *Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4479-88.
  176. Gudermann, T., et al., *Ca<sup>2+</sup> mobilization by the LH receptor expressed in Xenopus oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways.* Mol Endocrinol, 1992. **6**(2): p. 272-8.
  177. Simoni, M., J. Gromoll, and E. Nieschlag, *The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology.* Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 739-73.
  178. Asatiani, K., et al., *Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men.* Andrologia, 2002. **34**(3): p. 172-6.
  179. Dufau, M.L., *The luteinizing hormone receptor.* Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 461-96.
  180. Lei, Z.M., et al., *Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(1): p. 184-200.
  181. Lukacs, H., et al., *Peripheral and intracerebroventricular administration of human chorionic gonadotropin alters several hippocampus-associated behaviors in cycling female rats.* Horm Behav, 1995. **29**(1): p. 42-58.
  182. Ciccone, N.A., et al., *Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone beta by*

- pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors.* Mol Cell Biol, 2010. **30**(4): p. 1028-40.
183. Weiss, J., et al., *Divergent responses of gonadotropin subunit messenger RNAs to continuous versus pulsatile gonadotropin-releasing hormone in vitro.* Mol Endocrinol, 1990. **4**(4): p. 557-64.
184. Burger, L.L., et al., *Regulation of gonadotropin subunit gene transcription.* J Mol Endocrinol, 2004. **33**(3): p. 559-84.
185. Haisenleder, D.J., et al., *A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo.* Endocrinology, 1991. **128**(1): p. 509-17.
186. Kaiser, U.B., et al., *Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro.* Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 1224-31.
187. Savoy-Moore, R.T. and K.H. Swartz, *Several GnRH stimulation frequencies differentially release FSH and LH from isolated, perfused rat anterior pituitary cells.* Adv Exp Med Biol, 1987. **219**: p. 641-5.
188. Willars, G.B., et al., *Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization.* J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30146-53.
189. Kaiser, U.B., et al., *A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12280-4.
190. Krsmanovic, L.Z., et al., *An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2969-74.
191. Stojilkovic, S.S. and K.J. Catt, *Novel aspects of GnRH-induced intracellular signaling and secretion in pituitary gonadotrophs.* J Neuroendocrinol, 1995. **7**(10): p. 739-57.
192. Liu, F., et al., *Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32099-108.
193. Thompson, I.R., *GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression.* MCE, 2013.
194. Armstrong, S.P., et al., *Pulsatile and sustained gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor signaling: does the ERK signaling pathway decode GnRH pulse frequency?* J Biol Chem, 2010. **285**(32): p. 24360-71.
195. Haisenleder, D.J., et al., *Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CAMK II) activation in rat pituitaries.* Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 2768-74.
196. Haisenleder, D.J., H.A. Ferris, and M.A. Shupnik, *The calcium component of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone subunit gene transcription is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II.* Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2409-16.
197. Armstrong, S.P., et al., *Pulsatile and sustained gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor signaling: does the Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling pathway decode GnRH pulse frequency?* J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35746-57.
198. Washington, T.M., et al., *A mathematical model for LH release in response to continuous and pulsatile exposure of gonadotrophs to GnRH.* Theor Biol Med Model, 2004. **1**: p. 9.
199. Thompson, I.R., et al., *GnRH pulse frequency-dependent stimulation of FSHbeta transcription is mediated via activation of PKA and CREB.* Mol Endocrinol, 2013. **27**(4): p. 606-18.
200. Tsutsumi, R., D. Mistry, and N.J. Webster, *Signaling responses to pulsatile gonadotropin-releasing hormone in LbetaT2 gonadotrope cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 20262-72.
201. Nicol, L., et al., *Differential secretion of gonadotrophins: investigation of the role of secretogranin II and chromogranin A in the release of LH and FSH in LbetaT2 cells.* J Mol Endocrinol, 2004. **32**(2): p. 467-80.
202. Crawford, J.L., et al., *Promotion of intragranular co-aggregation with LH by enhancement of secretogranin II storage resulted in increased intracellular granule storage in gonadotrophs of GnRH-deprived male mice.* Reproduction, 2002. **124**(2): p. 267-77.
203. Coss, D., et al., *A novel AP-1 site is critical for maximal induction of the follicle-stimulating hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone.* J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 152-62.
204. Wang, Y., et al., *Activator protein-1 and smad proteins synergistically regulate human follicle-stimulating hormone beta-promoter activity.* Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5577-91.

205. Lawson, M.A., et al., *Pulse sensitivity of the luteinizing hormone beta promoter is determined by a negative feedback loop Involving early growth response-1 and Ngfi-A binding protein 1 and 2*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(5): p. 1175-91.
206. Hare, D., et al., *A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain*. *Front Aging Neurosci*, 2013. **5**: p. 34.
207. Rouault, T.A., *Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(8): p. 551-64.
208. Zheng, W. and A.D. Monnot, *Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(2): p. 177-88.
209. Gaasch, J.A., et al., *Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells*. *Neurochem Res*, 2007. **32**(7): p. 1196-208.
210. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**(10): p. 940-59.
211. Crichton, R.R. and R.J. Ward, *Iron metabolism--new perspectives in view*. *Biochemistry*, 1992. **31**(46): p. 11255-64.
212. Gerlach, M., et al., *Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?* *J Neurochem*, 1994. **63**(3): p. 793-807.
213. Mulligan, M., B. Althaus, and M.C. Linder, *Non-ferritin, non-heme iron pools in rat tissues*. *Int J Biochem*, 1986. **18**(9): p. 791-8.
214. Bishop, G.M. and S.R. Robinson, *Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke*. *Brain Res*, 2001. **907**(1-2): p. 175-87.
215. Schenck, J.F. and E.A. Zimmerman, *High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker?* *NMR Biomed*, 2004. **17**(7): p. 433-45.
216. Hallgren, B. and P. Sourander, *The effect of age on the non-haemin iron in the human brain*. *J Neurochem*, 1958. **3**(1): p. 41-51.
217. Schipper, H.M., *Neurodegeneration with brain iron accumulation - clinical syndromes and neuroimaging*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(3): p. 350-60.
218. Hulet, S.W., et al., *Characterization and distribution of ferritin binding sites in the adult mouse brain*. *J Neurochem*, 1999. **72**(2): p. 868-74.
219. Beal, M.F., *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1366**(1-2): p. 211-23.
220. Beale, S.I. and J.I. Yeh, *Deconstructing heme*. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(10): p. 903-5.
221. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. *Mol Cell*, 2000. **5**(2): p. 299-309.
222. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. *Nature*, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
223. Steere, A.N., et al., *Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(3): p. 326-33.
224. Crichton, R.R., et al., *Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells*. *J Inorg Biochem*, 2002. **91**(1): p. 9-18.
225. Pigeon, C., et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 7811-9.
226. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
227. Mastrogiannaki, M., et al., *HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(5): p. 1159-66.
228. Katz, J.H., *Iron and protein kinetics studied by means of doubly labeled human crystalline transferrin*. *J Clin Invest*, 1961. **40**: p. 2143-52.
229. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. *Transfus Sci*, 2000. **23**(3): p. 185-92.
230. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
231. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. *Cell*, 2004. **117**(3): p. 285-97.
232. De Domenico, I., D. McVey Ward, and J. Kaplan, *Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 72-81.
233. Dautry-Varsat, A., A. Ciechanover, and H.F. Lodish, *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(8): p. 2258-62.
234. Kawabata, H., et al., *Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 20826-32.
235. Philpott, C.C., *Coming into view: eukaryotic iron chaperones and intracellular iron delivery*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(17): p. 13518-23.

236. Arosio, P., R. Ingrassia, and P. Cavadini, *Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(7): p. 589-99.
237. Theil, E.C., *Iron, ferritin, and nutrition*. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 327-43.
238. Cohen, L.A., et al., *Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway*. *Blood*, 2010. **116**(9): p. 1574-84.
239. Iancu, T.C., *Ferritin and hemosiderin in pathological tissues*. *Electron Microsc Rev*, 1992. **5**(2): p. 209-29.
240. Breuer, W., S. Epsztejn, and Z.I. Cabantchik, *Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells*. *FEBS Lett*, 1996. **382**(3): p. 304-8.
241. Horowitz, M.P. and J.T. Greenamyre, *Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **20 Suppl 2**: p. S551-68.
242. Richardson, D.R., et al., *Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(24): p. 10775-82.
243. Ganz, T., *Cellular iron: ferroportin is the only way out*. *Cell Metab*, 2005. **1**(3): p. 155-7.
244. Johnstone, D. and E.A. Milward, *Molecular genetic approaches to understanding the roles and regulation of iron in brain health and disease*. *J Neurochem*, 2010. **113**(6): p. 1387-402.
245. Anderson, C.P., et al., *Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(9): p. 1468-83.
246. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 1-13.
247. Cecchelli, R., et al., *Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(8): p. 650-61.
248. Speake, T. and P.D. Brown, *Ion channels in epithelial cells of the choroid plexus isolated from the lateral ventricle of rat brain*. *Brain Res*, 2004. **1005**(1-2): p. 60-6.
249. Bradbury, M.W., *Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system*. *J Neurochem*, 1997. **69**(2): p. 443-54.
250. Moos, T., *Brain iron homeostasis*. *Dan Med Bull*, 2002. **49**(4): p. 279-301.
251. Jeong, S.Y. and S. David, *Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(29): p. 27144-8.
252. Zakin, M.M., B. Baron, and F. Guillou, *Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene*. *Dev Neurosci*, 2002. **24**(2-3): p. 222-6.
253. Siddappa, A.J., et al., *Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain*. *J Neurosci Res*, 2002. **68**(6): p. 761-75.
254. Moos, T., et al., *Brain capillary endothelial cells mediate iron transport into the brain by segregating iron from transferrin without the involvement of divalent metal transporter 1*. *J Neurochem*, 2006. **98**(6): p. 1946-58.
255. Moos, T. and T. Rosengren Nielsen, *Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron*. *Semin Pediatr Neurol*, 2006. **13**(3): p. 149-57.
256. Moos, T., et al., *Iron trafficking inside the brain*. *J Neurochem*, 2007. **103**(5): p. 1730-40.
257. Wang, X., G.J. Li, and W. Zheng, *Efflux of iron from the cerebrospinal fluid to the blood at the blood-CSF barrier: effect of manganese exposure*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008. **233**(12): p. 1561-71.
258. Deane, R., W. Zheng, and B.V. Zlokovic, *Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain*. *J Neurochem*, 2004. **88**(4): p. 813-20.
259. Rouault, T.A. and S. Cooperman, *Brain iron metabolism*. *Semin Pediatr Neurol*, 2006. **13**(3): p. 142-8.
260. Burdo, J.R., et al., *Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat*. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(6): p. 1198-207.
261. Moos, T., *Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system*. *J Comp Neurol*, 1996. **375**(4): p. 675-92.
262. Moos, T. and E.H. Morgan, *The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into the Belgrade rat brain*. *J Neurochem*, 2004. **88**(1): p. 233-45.
263. Todorich, B., X. Zhang, and J.R. Connor, *H-ferritin is the major source of iron for oligodendrocytes*. *Glia*, 2011. **59**(6): p. 927-35.
264. Dornelles, A.S., et al., *mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period*. *Neurochem Res*, 2010. **35**(4): p. 564-71.
265. Moos, T., P.S. Oates, and E.H. Morgan, *Iron-independent neuronal expression of transferrin*

- receptor mRNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. **72**(2): p. 231-4.
266. Moos, T., P.S. Oates, and E.H. Morgan, *Expression of transferrin mRNA in rat oligodendrocytes is iron-independent and changes with increasing age*. *Nutr Neurosci*, 2001. **4**(1): p. 15-23.
267. Pinero, D.J., et al., *Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats*. *J Nutr*, 2000. **130**(2): p. 254-63.
268. Gunshin, H., et al., *Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter*. *FEBS Lett*, 2001. **509**(2): p. 309-16.
269. Zechel, S., K. Huber-Wittmer, and O. von Bohlen und Halbach, *Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system*. *J Neurosci Res*, 2006. **84**(4): p. 790-800.
270. Hanninen, M.M., et al., *Expression of iron-related genes in human brain and brain tumors*. *BMC Neurosci*, 2009. **10**: p. 36.
271. Golub, M.S., et al., *Movement disorders in the Hfe knockout mouse*. *Nutr Neurosci*, 2005. **8**(4): p. 239-44.
272. Moos, T., D. Trinder, and E.H. Morgan, *Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000. **46**(3): p. 549-61.
273. Zecca, L., et al., *Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(11): p. 863-73.
274. Connor, J.R., et al., *Iron and iron management proteins in neurobiology*. *Pediatr Neurol*, 2001. **25**(2): p. 118-29.
275. Chua, A.C., et al., *The regulation of cellular iron metabolism*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2007. **44**(5-6): p. 413-59.
276. Siesjo, B.K., C.D. Agardh, and F. Bengtsson, *Free radicals and brain damage*. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1989. **1**(3): p. 165-211.
277. Baader, S.L., et al., *Ascorbic-acid-mediated iron release from cellular ferritin and its relation to the formation of DNA strand breaks in neuroblastoma cells*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994. **120**(7): p. 415-21.
278. Nunez-Millacura, C., et al., *An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells*. *J Neurochem*, 2002. **82**(2): p. 240-8.
279. Schipper, H.M., *Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing*. *Ageing Res Rev*, 2004. **3**(3): p. 265-301.
280. Calabrese, V., et al., *Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia*. *J Neurol Sci*, 2005. **233**(1-2): p. 145-62.
281. Robb, S.J., et al., *Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes*. *J Neurosci Res*, 1999. **55**(6): p. 674-86.
282. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* *J Neurochem*, 2006. **97**(6): p. 1634-58.
283. Weiss, G., C. Bogdan, and M.W. Hentze, *Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13*. *J Immunol*, 1997. **158**(1): p. 420-5.
284. Dlaska, M. and G. Weiss, *Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression*. *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 6171-7.
285. Ward, R.J., et al., *Control of cellular iron homeostasis by iron-responsive elements in vivo*. *Eur J Biochem*, 1994. **220**(3): p. 927-31.
286. Zecca, L., et al., *Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes*. *J Neurochem*, 2001. **76**(6): p. 1766-73.
287. Robb, S.J., et al., *Influence of nitric oxide on cellular and mitochondrial integrity in oxidatively stressed astrocytes*. *J Neurosci Res*, 1999. **56**(2): p. 166-76.
288. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. *Cell*, 2012. **149**(5): p. 1060-72.
289. Siddique, A. and K.V. Kowdley, *Review article: the iron overload syndromes*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012. **35**(8): p. 876-93.
290. Santos, P.C., J.E. Krieger, and A.C. Pereira, *Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(2): p. 1497-511.
291. Piga Antonio, S.R., Filomena Longo, Olivier Ernst, Christian Rose, *Evaluation and treatment of secondary iron overload - ESH IRON2009\_CAP.25(584-605):EBMT2008 4-12-2009 16:44 Pagina 584*, 2009.
292. Darby, E. and B.D. Anawalt, *Male hypogonadism : an update on diagnosis and treatment*. *Treat Endocrinol*, 2005. **4**(5): p. 293-309.

293. Han, T.S. and P.M. Bouloux, *What is the optimal therapy for young males with hypogonadotropic hypogonadism?* Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(6): p. 731-7.
294. Araujo, A.B., et al., *Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 5920-6.
295. Zitzmann, M. and E. Nieschlag, *Hormone substitution in male hypogonadism.* Mol Cell Endocrinol, 2000. **161**(1-2): p. 73-88.
296. Bianco, S.D. and U.B. Kaiser, *The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.* Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(10): p. 569-76.
297. Kalantaridou, S.N., et al., *Stress and the female reproductive system.* J Reprod Immunol, 2004. **62**(1-2): p. 61-8.
298. Beranova, M., et al., *Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1580-8.
299. Hayes, F.J., S.B. Seminara, and W.F. Crowley, Jr., *Hypogonadotropic hypogonadism.* Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. **27**(4): p. 739-63, vii.
300. Schwanzel-Fukuda, M., D. Bick, and D.W. Pfaff, *Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome.* Brain Res Mol Brain Res, 1989. **6**(4): p. 311-26.
301. Crowley, W.F., Jr. and J.L. Jameson, *Clinical counterpoint: gonadotropin-releasing hormone deficiency: perspectives from clinical investigation.* Endocr Rev, 1992. **13**(4): p. 635-40.
302. Waldstreicher, J., et al., *The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(12): p. 4388-95.
303. Georgopoulos, N.A., et al., *Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 213-7.
304. Viswanathan, V. and E.A. Eugster, *Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents.* Pediatr Clin North Am, 2011. **58**(5): p. 1181-200, x.
305. Raivio, T., et al., *Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.* N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 863-73.
306. Weiss, J., W.F. Crowley, Jr., and J.L. Jameson, *Normal structure of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in patients with GnRH deficiency and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.* J Clin Endocrinol Metab, 1989. **69**(2): p. 299-303.
307. Semple, R.K., et al., *Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1849-55.
308. Colledge, W.H., *Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology.* Peptides, 2009. **30**(1): p. 34-41.
309. Funes, S., et al., *The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1357-63.
310. d'Anglemont de Tassigny, X., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10714-9.
311. Tena-Sempere, M., *GPR54 and kisspeptin in reproduction.* Hum Reprod Update, 2006. **12**(5): p. 631-9.
312. Tena-Sempere, M., *KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility.* Neuroendocrinology, 2006. **83**(5-6): p. 275-81.
313. Luque, R.M., R.D. Kineman, and M. Tena-Sempere, *Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line.* Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4601-11.
314. Brailoiu, G.C., et al., *KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain.* J Comp Neurol, 2005. **481**(3): p. 314-29.
315. Messager, S., et al., *Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1761-6.
316. Seminara, S.B., *Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: critical pathway modulating GnRH secretion.* Front Neuroendocrinol, 2005. **26**(3-4): p. 131-8.
317. Gautier, A., et al., *Liver iron overload is associated with elevated SHBG concentration and moderate hypogonadotropic hypogonadism in dysmetabolic men without genetic haemochromatosis.* Eur J Endocrinol, 2011. **165**(2): p. 339-43.
318. Merchant, R.H., A. Shirodkar, and J. Ahmed, *Evaluation of growth, puberty and endocrine dysfunctions in relation to iron overload in multi transfused Indian thalassemia patients.* Indian J Pediatr, 2011. **78**(6): p. 679-83.
319. Noetzli, L.J., et al., *Pituitary iron and volume predict hypogonadism in transfusional iron overload.* Am J Hematol, 2012. **87**(2): p. 167-71.
320. Wlazlo, N., W. Peters, and B. Bravenboer, *Hypogonadism in a patient with mild hereditary*

- haemochromatosis*. Neth J Med, 2012. **70**(7): p. 318-20.
321. Belhoul, K.M., et al., *Serum ferritin levels and endocrinopathy in medically treated patients with beta thalassaemia major*. Ann Hematol, 2012. **91**(7): p. 1107-14.
  322. Gillardin, P., et al., *Effect of iron overload on the pituitary gland and associated imaging findings*. J Neurol, 2013. **260**(9): p. 2403-4.
  323. Buretic-Tomljanovic, A., et al., *The impact of hemochromatosis mutations and transferrin genotype on gonadotropin serum levels in infertile men*. Fertil Steril, 2009. **91**(5): p. 1793-800.
  324. Kyriakou, A. and N. Skordis, *Thalassaemia and aberrations of growth and puberty*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2009. **1**(1): p. e2009003.
  325. Roth, C., et al., *Short stature and failure of pubertal development in thalassaemia major: evidence for hypothalamic neurosecretory dysfunction of growth hormone secretion and defective pituitary gonadotropin secretion*. Eur J Pediatr, 1997. **156**(10): p. 777-83.
  326. Angelopoulos, N.G., et al., *Reversibility of hypogonadotropic hypogonadism in a patient with the juvenile form of hemochromatosis*. Fertil Steril, 2005. **84**(6): p. 1744.
  327. Kelly, T.M., et al., *Hypogonadism in hemochromatosis: reversal with iron depletion*. Ann Intern Med, 1984. **101**(5): p. 629-32.
  328. Wood, J.C., et al., *Predicting pituitary iron and endocrine dysfunction*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1202**: p. 123-8.
  329. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism*. Biochem J, 2011. **434**(3): p. 365-81.
  330. Bishop, G.M., et al., *Accumulation of non-transferrin-bound iron by neurons, astrocytes, and microglia*. Neurotox Res, 2011. **19**(3): p. 443-51.
  331. Koppenol, W.H., *The centennial of the Fenton reaction*. Free Radic Biol Med, 1993. **15**(6): p. 645-51.
  332. Sorce, S. and K.H. Krause, *NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2481-504.
  333. Berg, D., et al., *Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease*. J Neurochem, 2001. **79**(2): p. 225-36.
  334. Altamura, S. and M.U. Muckenthaler, *Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis*. J Alzheimers Dis, 2009. **16**(4): p. 879-95.
  335. Dhindsa, S., et al., *Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5462-8.
  336. Kapoor, D., et al., *Clinical and biochemical assessment of hypogonadism in men with type 2 diabetes: correlations with bioavailable testosterone and visceral adiposity*. Diabetes Care, 2007. **30**(4): p. 911-7.
  337. Rhoden, E.L., et al., *Diabetes mellitus is associated with subnormal serum levels of free testosterone in men*. BJU Int, 2005. **96**(6): p. 867-70.
  338. Grossmann, M., et al., *Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 1834-40.
  339. Corona, G., et al., *Association of hypogonadism and type II diabetes in men attending an outpatient erectile dysfunction clinic*. Int J Impot Res, 2006. **18**(2): p. 190-7.
  340. Laaksonen, D.E., et al., *Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study*. Eur J Endocrinol, 2003. **149**(6): p. 601-8.
  341. Dandona, P. and S. Dhindsa, *Update: Hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes and obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. 2643-51.
  342. McDermott, J.H. and C.H. Walsh, *Hypogonadism in hereditary hemochromatosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2451-5.
  343. Williams, T.C. and L.A. Frohman, *Hypothalamic dysfunction associated with hemochromatosis*. Ann Intern Med, 1985. **103**(4): p. 550-1.
  344. Piperno, A., et al., *Preclinical hypogonadism in genetic hemochromatosis in the early stage of the disease: evidence of hypothalamic dysfunction*. J Endocrinol Invest, 1992. **15**(6): p. 423-8.
  345. Siminoski, K., M. D'Costa, and P.G. Walfish, *Hypogonadotropic hypogonadism in idiopathic hemochromatosis: evidence for combined hypothalamic and pituitary involvement*. J Endocrinol Invest, 1990. **13**(10): p. 849-53.
  346. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
  347. Klopffleisch, R. and P. Olias, *The pathology of comparative animal models of human haemochromatosis*. J Comp Pathol, 2012. **147**(4): p. 460-78.
  348. Ramm, G.A., *Animal models of iron overload based on excess exogenous iron in Hemochromatosis - Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment 2000*, Cambridge University Press.
  349. Dongiovanni, P., et al., *Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising*

- therapeutic target*. J Hepatol, 2011. **55**(4): p. 920-32.
350. Pigeon, C., et al., *Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ male mice*. J Hepatol, 1999. **30**(5): p. 926-34.
351. Hallberg, L., M. Brune, and L. Rossander, *Low bioavailability of carbonyl iron in man: studies on iron fortification of wheat flour*. Am J Clin Nutr, 1986. **43**(1): p. 59-67.
352. Huebers, H.A., et al., *Absorption of carbonyl iron*. J Lab Clin Med, 1986. **108**(5): p. 473-8.
353. Brittenham, G.M., et al., *Preserving the national blood supply*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2001: p. 422-32.
354. Gordeuk, V.R., et al., *Carbonyl iron therapy for iron deficiency anemia*. Blood, 1986. **67**(3): p. 745-52.
355. Gordeuk, V.R., et al., *High-dose carbonyl iron for iron deficiency anemia: a randomized double-blind trial*. Am J Clin Nutr, 1987. **46**(6): p. 1029-34.
356. Park, C.H., et al., *Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats*. Lab Invest, 1987. **57**(5): p. 555-63.
357. Pietrangelo, A., et al., *Enhanced hepatic collagen type I mRNA expression into fat-storing cells in a rodent model of hemochromatosis*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 714-21.
358. Ramm, G.A., et al., *Chronic iron overload causes activation of rat lipocytes in vivo*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 1): p. G451-8.
359. Arezzini, B., et al., *Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(4): p. 486-95.
360. Troadec, M.B., et al., *Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes*. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 391-9.
361. Wetsel, W.C., *Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: a new tool for dissecting the molecular and cellular basis of LHRH physiology*. Cell Mol Neurobiol, 1995. **15**(1): p. 43-78.
362. Radovick, S., et al., *Migratory arrest of gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3402-6.
363. Mellon, P.L., et al., *Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis*. Neuron, 1990. **5**(1): p. 1-10.
364. Weiner, R.I., et al., *Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines*. Front Neuroendocrinol, 1992. **13**(2): p. 95-119.
365. Maggi, R., et al., *Immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons show a different migratory activity in vitro*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2105-12.
366. Pimpinelli, F., et al., *Depolarization differentially affects the secretory and migratory properties of two cell lines of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1410-8.
367. Choi, S.J., et al., *Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(6): p. E1122-30.
368. Parkes, J.G., et al., *Effects of iron loading on uptake, speciation, and chelation of iron in cultured myocardial cells*. J Lab Clin Med, 1993. **122**(1): p. 36-47.
369. Hirsh, M., A.M. Konijn, and T.C. Iancu, *Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 30-8.
370. Hoepken, H.H., et al., *Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate*. J Neurochem, 2004. **88**(5): p. 1194-202.
371. Hohnholt, M., M. Geppert, and R. Dringen, *Effects of iron chelators, iron salts, and iron oxide nanoparticles on the proliferation and the iron content of oligodendroglial OLN-93 cells*. Neurochem Res, 2010. **35**(8): p. 1259-68.
372. Johnstone, D. and E.A. Milward, *Genome-wide microarray analysis of brain gene expression in mice on a short-term high iron diet*. Neurochem Int, 2010. **56**(6-7): p. 856-63.
373. Magni, P., et al., *Leukemia inhibitory factor induces the chemomigration of immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons through the independent activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(5): p. 1163-74.
374. Cariboni, A., R. Maggi, and J.G. Parnavelas, *From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons*. Trends Neurosci, 2007. **30**(12): p. 638-44.
375. Ruscica, M., et al., *Role of the energy sensor adenosine monophosphate-activated protein kinase in the regulation of immature gonadotropin-releasing hormone neuron migration*. J Endocrinol Invest, 2011. **34**(10): p. e362-8.
376. Flynn, J.M. and S. Melov, *SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 4-12.

377. Rutishauser, J. and M. Spiess, *Endoplasmic reticulum storage diseases*. Swiss Med Wkly, 2002. **132**(17-18): p. 211-22.
378. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
379. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
380. Wang, X.Z., et al., *Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4273-80.
381. Salenave, S., et al., *Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment*. Ann Endocrinol (Paris), 2012. **73**(2): p. 141-6.
382. Chatterjee, R. and M. Katz, *Reversible hypogonadotropic hypogonadism in sexually infantile male thalassaemic patients with transfusional iron overload*. Clin Endocrinol (Oxf), 2000. **53**(1): p. 33-42.
383. Novaira, H.J., et al., *Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **311**(1-2): p. 126-34.
384. Ng, Y., et al., *Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **303**(1-2): p. 25-33.
385. Simcox, J.A. and D.A. McClain, *Iron and diabetes risk*. Cell Metab, 2013. **17**(3): p. 329-41.
386. Swaminathan, S., et al., *The role of iron in diabetes and its complications*. Diabetes Care, 2007. **30**(7): p. 1926-33.
387. Escobar-Morreale, H.F., *Iron metabolism and the polycystic ovary syndrome*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(10): p. 509-15.
388. Valenti, L., et al., *Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(6): p. 1251-8.
389. Duranteau, L., et al., *Non-responsiveness of serum gonadotropins and testosterone to pulsatile GnRH in hemochromatosis suggesting a pituitary defect*. Acta Endocrinol (Copenh), 1993. **128**(4): p. 351-4.
390. Cundy, T., et al., *Reversibility of hypogonadotropic hypogonadism associated with genetic haemochromatosis*. Clin Endocrinol (Oxf), 1993. **38**(6): p. 617-20.
391. Ganong, W.F., *Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(5-6): p. 422-7.
392. Norsted, E., B. Gomuc, and B. Meister, *Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus*. J Chem Neuroanat, 2008. **36**(2): p. 107-21.
393. Elizabeth Milward, B.A., Brianna Bassett, Evan Williams, Ross Graham, Roheeth Delima, Deborah Trinder, John Olynyk, and Daniel Johnstone, *Brain changes in iron loading disorders*, in *Metal Ions in Neurological Systems*, W.L.a.H. Kozlowski, Editor 2012, Springer-Verlag Wien.
394. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
395. Leichtmann-Bardoogo, Y., et al., *Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(12): p. E1519-30.
396. Lykkesfeldt, J., et al., *Oxidative stress and damage in liver, but not in brain, of Fischer 344 rats subjected to dietary iron supplementation with lipid-soluble [(3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene]*. J Biochem Mol Toxicol, 2007. **21**(3): p. 145-55.
397. Sobotka, T.J., et al., *Neurobehavioral dysfunctions associated with dietary iron overload*. Physiol Behav, 1996. **59**(2): p. 213-9.
398. LaVaute, T., et al., *Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 209-14.
399. Galy, B., et al., *Iron homeostasis in the brain: complete iron regulatory protein 2 deficiency without symptomatic neurodegeneration in the mouse*. Nat Genet, 2006. **38**(9): p. 967-9; discussion 969-70.
400. Glidewell-Kenney, C.A., et al., *Neurokinin B causes acute GnRH secretion and repression of GnRH transcription in GT1-7 GnRH neurons*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(3): p. 437-54.
401. Dungan, H.M., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1154-8.
402. Smith, J.T., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling*. Reproduction, 2006. **131**(4): p. 623-30.
403. Thaler, J.P., et al., *Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox*. Front Neuroendocrinol, 2010. **31**(1): p. 79-84.

404. Breton, C., *The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation*. J Endocrinol, 2013. **216**(2): p. R19-31.
405. Arora, S. and Anubhuti, *Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review*. Neuropeptides, 2006. **40**(6): p. 375-401.
406. Fliers, E., et al., *White adipose tissue: getting nervous*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(11): p. 1005-10.
407. Huang, X., et al., *Deferoxamine synergistically enhances iron-mediated AP-1 activation: a showcase of the interplay between extracellular-signal-regulated kinase and tyrosine phosphatase*. Free Radic Res, 2007. **41**(10): p. 1135-42.
408. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
409. Aimo, L. and P.I. Oteiza, *Zinc deficiency increases the susceptibility of human neuroblastoma cells to lead-induced activator protein-1 activation*. Toxicol Sci, 2006. **91**(1): p. 184-91.
410. Davila, D. and I. Torres-Aleman, *Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 2014-25.
411. Kim, J. and P.K. Wong, *Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK signaling*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1987-98.
412. Uranga, R.M., N.M. Giusto, and G.A. Salvador, *Iron-induced oxidative injury differentially regulates PI3K/Akt/GSK3beta pathway in synaptic endings from adult and aged rats*. Toxicol Sci, 2009. **111**(2): p. 331-44.
413. Kuperstein, F. and E. Yavin, *ERK activation and nuclear translocation in amyloid-beta peptide- and iron-stressed neuronal cell cultures*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(1): p. 44-54.
414. Kuperstein, F. and E. Yavin, *Pro-apoptotic signaling in neuronal cells following iron and amyloid beta peptide neurotoxicity*. J Neurochem, 2003. **86**(1): p. 114-25.
415. Salvador, G.A. and P.I. Oteiza, *Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells*. Neurotoxicology, 2011. **32**(1): p. 75-82.
416. Bhattacharyya, S., J. Ghosh, and P.C. Sil, *Iron induces hepatocytes death via MAPK activation and mitochondria-dependent apoptotic pathway: beneficial role of glycine*. Free Radic Res, 2012. **46**(10): p. 1296-307.
417. Wu, W.S., et al., *Mitochondrial ferritin attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity: reduction in oxidative damage through the Erk/P38 mitogen-activated protein kinase pathways*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(2): p. 158-69.
418. Toker, A., *Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(4): p. 652-8.
419. Cecconi, S., et al., *The role of Akt signalling in the mammalian ovary*. Int J Dev Biol, 2012. **56**(10-12): p. 809-17.
420. Uranga, R.M., S. Katz, and G.A. Salvador, *Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19773-84.
421. Xue, B. and B.B. Kahn, *AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 73-83.
422. Minokoshi, Y., et al., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 569-74.
423. Claret, M., et al., *AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2325-36.
424. Kim, M.S., et al., *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 727-33.
425. Cai, D. and T. Liu, *Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. E1-39.
426. Piperno, A., *Classification and diagnosis of iron overload*. Haematologica, 1998. **83**(5): p. 447-55.
427. Cao, C. and K.O. O'Brien, *Pregnancy and iron homeostasis: an update*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 35-51.
428. McArdle, H.J., et al., *Role of the placenta in regulation of fetal iron status*. Nutr Rev, 2011. **69 Suppl 1**: p. S17-22.
429. Casanueva, E. and F.E. Viteri, *Iron and oxidative stress in pregnancy*. J Nutr, 2003. **133**(5 Suppl 2): p. 1700S-1708S.
430. Scholl, T.O., *Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(5): p. 1218S-1222S.
431. Zoller, H. and A.S. Knisely, *Control of iron metabolism--lessons from neonatal hemochromatosis*. J Hepatol, 2012. **56**(6): p. 1226-9.

432. Baynes, R.D., et al., *Maternal and fetal iron measurements in a hemochromatotic pregnancy*. Am J Hematol, 1991. **36**(1): p. 48-9.
433. Esposito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2670-7.
434. Hershko, C.M., et al., *Iron chelation therapy*. Curr Hematol Rep, 2005. **4**(2): p. 110-6.
435. Porter, J.B., et al., *Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: Implications for clinical use*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1054**: p. 155-68.
436. Garrick, M.D. and L.M. Garrick, *Cellular iron transport*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(5): p. 309-25.
437. Crichton, R.R., D.T. Dexter, and R.J. Ward, *Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases*. J Neural Transm, 2011. **118**(3): p. 301-14.
438. Boehme, S.A., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1611-8.
439. Sotsios, Y., et al., *The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5954-63.
440. Sullivan, S.K., et al., *MIP-3alpha induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK)*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 674-82.
441. Weissenbach, M., et al., *Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration*. Eur J Immunol, 2004. **34**(10): p. 2895-906.
442. Sotsios, Y. and S.G. Ward, *Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 217-35.
443. Katkade, V., et al., *Domain 5 of cleaved high molecular weight kininogen inhibits endothelial cell migration through Akt*. Thromb Haemost, 2005. **94**(3): p. 606-14.
444. Kanellis, J., et al., *Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(1): p. 6-12.
445. Caligiuri, A., et al., *Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulates the activated phenotype of hepatic stellate cells*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 668-76.
446. Liang, K.W., et al., *Berberine inhibits platelet-derived growth factor-induced growth and migration partly through an AMPK-dependent pathway in vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 2008. **590**(1-3): p. 343-54.
447. Karten, M.J. and J.E. Rivier, *Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective*. Endocr Rev, 1986. **7**(1): p. 44-66.
448. Millar, R.P., et al., *Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(1): p. 17-35.
449. Juan Manuel Castellano Rodríguez, Tesi di Dottorato di Ricerca dal titolo *CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA Kiss1/GPR54 EN EL CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN*, conseguita presso l'Università di Cordoba, Dipartimento di Biologia Cellulare, Fisiologia e Immunologia nel 2010.