

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA
CICLO: XXIII

Analisi dell'espressione di Spexina e Augurina nei tessuti di ratto

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.mo Prof. Raffaele De Caro

Dottoranda: Dott.ssa Gloria Sarasin

INDICE

ABSTRACT	5
RIASSUNTO	8
INTRODUZIONE	11
Spexina	12
Augurina	14
Rigenerazione del surrene	16
Surrene e ossigeno	18
Glomo carotideo	18
SCOPO DELLO STUDIO	22
MATERIALI E METODI	23
ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE	23
Campionamento dei tessuti	23
Modello sperimentale di rigenerazione del surrene	23
Modello sperimentale di esposizione all'iperossia	24
REAL TIME-PCR	24
IMMUNOISTOCHIMICA ANTI-SPEXINA E -AUGURINA	25
MISURAZIONE DEL VOLUME DEL GLOMO CAROTIDEO	26
TERMINAL-DUTP NICK AND LABELING (TUNEL)	27
MODELLI IN VITRO	27
Isolamento delle cellule del surrene	27
Colture primarie di cellule surrenali	28
STATISTICA	29

RISULTATI	30
REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION	30
IMMUNOISTOCHEMICA ANTI-SPEXINA	37
IMMUNOISTOCHEMICA ANTI-AUGURINA	52
CELLULE CORTICOSURRENALI ISOLATE E COLTURE PRIMARIE DI CELLULE CORTICOSURRENALI	65
MODIFICAZIONE DEL VOLUME E DELL' APOPTOSI NEL GLOMO CAROTIDEO DOPO ESPOSIZIONE A IPEROSSIA POSTNATALE	68
ESPRESSIONE DI SPEXINA ED AUGURINA IN CONDIZIONI IPEROSSICHE	68
DISCUSSIONE	71
ESPRESSIONE DI SPEXINA IN TESSUTI NORMALI DI RATTO	71
ESPRESSIONE DI AUGURINA IN TESSUTI NORMALI DI RATTO	73
SPEXINA E AUGURINA NELLO SVILUPPO POSTNATALE DEL SURRENE	76
SPEXINA E AUGURINA NELLA RIGENERAZIONE DEL SURRENE	79
EFFETTI DELLA SPEXINA SULLA CORTICOSTEROIDOGENESI E SULLA PROLIFERAZIONE CORTICOSURRENALE	80
IPEROSSIA POSTNATALE E GLOMO CAROTIDEO	81
BIBLIOGRAFIA	84

ABSTRACT

Background - Spexin (also called NPQ) and augurin (also called esophageal cancer-related gene 4, ECRG-4) are highly conserved peptides recently identified through bioinformatics approach. They have been found to be processed and secreted in transfected rat pancreatic cells. Spexin has been found to induce smooth muscle contraction in a stomach explant assays from rats. Augurin expression has been found to be down-regulated in esophageal and prostate tumors and in tumor cell lines.

Aim of the study - The aim of the present work is the analysis of spexin and augurin expression and location in a wide range of rat organs and tissues. Moreover, comparative analysis of spexin and augurin expression in adrenal gland postnatal development and in experimental models of adrenocortical regeneration after enucleation and following hyperoxic exposition during postnatal period were performed. Other aim is the study of the effects of spexin on proliferation and hormones release in adrenocortical cell culture.

Materials and Methods - Analysis of spexin and augurin expression through Real Time-Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR) and immunohistochemistry was performed in normal rat tissues, in carotid body, in developing adrenal glands (sampled from 2-, 28-, 45- and 90-day-old rats) and in regenerating rat adrenals. Spexin and augurin expressions were also estimated through Real Time-PCR and immunohistochemistry in samples of carotid body and adrenal gland collected from rats exposed to hyperoxia at 60% for the first 2 postnatal weeks and then maintained in normoxia for other 4 weeks. The effect of spexin on the steroidogenesis (aldosterone and corticosterone) and on the adrenal gland proliferation was evaluated also in adrenocortical cells freshly sampled from zona glomerulosa and from zona fasciculata/reticularis of the adrenal gland and in adrenocortical cells maintained in culture.

Results - Spexin and augurin immunoreactions were mainly cytoplasmic. Spexin was immunohistochemically detected, with different staining intensities, in epithelia and glandular components of skin, respiratory, digestive, urinary and reproductive systems.

Smooth muscle cells showed only weak immunostaining and connective tissue was negative. In the central nervous system, neurons from different nuclei showed different intensities and percentages of cytoplasmatic immunoreactivity. Spexin was also expressed in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei, in adenohypophysis, in thyroid and in parathyroid glands, in adrenal cortex and medulla (ganglionic cells), in Leydig cells and in thecal, luteal and interstitial cells of the ovary. Immunohistochemical analysis localized augurin immunostaining mainly in skeletal and heart muscle cells, in some lymphatic components, in hypothalamic supraoptic nucleus, in adrenal zona glomerulosa and medulla, in Leydig cells, in follicular and thecal cells of the ovary. Augurin expression was found to be higher in adrenal zona glomerulosa and medulla than in zona fasciculata/reticularis. Real Time-PCR and immunohistochemistry confirm spexin and augurin expression in all tissues above mentioned.

In adrenal gland, spexin expression was higher in adult (90-day-old) than in young (2-, 28, 45-day-old) rats whereas augurin expression was higher in 2-day-old rats. By Real Time-PCR, spexin and augurin expression was found to be up-regulated, showing a maximum of expression at day 5 and 8, respectively, during adrenocortical regeneration. Spexin and augurin expressions were also analysed in the carotid bodies through immunohistochemistry and Real Time-PCR. Real Time-PCR analysis demonstrated a 6-7 fold increase of spexin expression in hyperoxia-exposed carotid bodies compared with rats maintained in normoxia for all the first six postnatal weeks, while no expression differences were demonstrated in adrenal tissues. Also the expression of augurin was not modified by hyperoxic exposition. Spexin concentrations tested at 10^{-6} M stimulated the aldosterone basal secretion from ZG cells, while no effects were highlighted on corticosterone basal secretion. In primary adrenocortical rat cells, concentrations of 10^{-8} M and 10^{-6} M of spexin have notably inhibited cell proliferation.

Conclusions - On the basis of their wide diffusion, spexin and augurin are probably involved in many physiological functions. In particular, their location in neuronal and endocrine cells suggests roles as neuromodulators and paracrine/endocrine factors. Up-regulation of augurin expression in adrenocortical regeneration and in younger rats suggests involvement of this peptide in the regulation of adrenal cell proliferation. In particular, in vitro experimental approach confirmed spexin capability to inhibit the proliferation of adrenocortical cells and to modulate the hormonal production. The increased expression of spexin in hyperoxia-exposed carotid bodies suggests a possible role in functional and structural modifications of this tissue in reply hyperoxic stimuli in the first postnatal period.

RIASSUNTO

Presupposti dello studio - Spexina (anche detta NPQ) ed augurina (nota anche come 'esophageal cancer-related gene 4', ECRG-4) sono peptidi altamente conservati, identificati di recente attraverso studi di bioinformatica. E' stato evidenziato in cellule pancreatiche di ratto sottoposte a transfezione che possono essere processati e secreti. La spexina induce contrazione della muscolatura liscia gastrica di ratto. L'espressione di augurina è downregolata nei tumori esofagei e prostatici ed in linee cellulari tumorali.

Scopo dello studio - Lo scopo del presente studio è l'analisi dell'espressione e della localizzazione di spexina ed augurina in un ampio spettro di organi e tessuti di ratto. Inoltre, è stata eseguita un'analisi comparativa dell'espressione di spexina ed augurina nel corso dello sviluppo postnatale del surrene ed in modelli sperimentali di rigenerazione surrenalica dopo enucleazione e di esposizione ad iperossia in fase postnatale. Scopo ulteriore è stato lo studio degli effetti di spexina in colture di cellule corticosurrenali, in termini di proliferazione e produzione ormonale.

Materiali e Metodi - L'analisi dell'espressione di spexina ed augurina con le metodiche di Real Time-PCR ed immunohistochimica è stata condotta in tessuti normali di ratto, nel globo carotideo, in surreni in via di sviluppo (prelevati da ratti di 2, 28, 45 e 90 giorni) ed in surreni in rigenerazione. E' stata altresì valutata l'espressione di spexina ed augurina, mediante Real Time-PCR ed immunohistochimica, in campioni di glomi carotidei e surreni prelevati da ratti esposti ad iperossia al 60% per le prime due settimane postnatali e poi mantenuti in normossia per altre 4 settimane. L'effetto di spexina sulla steroidogenesi (aldosterone e corticosterone) e sulla proliferazione surrenalica è stato valutato anche su cellule prelevate da zona glomerulare e zona fascicolata/reticolare ed in cellule corticosurrenali mantenute in coltura.

Risultati - L'immunoreazione di spexina ed augurina è risultata essere principalmente citoplasmatica. Immunoreattività anti-spexina è stata rilevata, pur con differenti intensità di segnale, in epitelii e componenti ghiandolari della cute e dei sistemi respiratorio, digestivo, urinario e riproduttivo. Le cellule muscolari lisce hanno evidenziato una

immunoreattività debole mentre il tessuto connettivo è risultato negativo. Nel sistema nervoso centrale, i neuroni di diversi nuclei hanno mostrato immunoreattività citoplasmatica, seppur con percentuali diverse ed intensità variabili. La spexina è risultata essere espressa anche nei nuclei ipotalamici paraventricolare e sopraottico, nell'adenoipofisi, nella tiroide e nelle paratiroidi, nella corticale e nella midollare (cellule gangliari) del surrene, nelle cellule di Leydig, nella teca e nelle cellule luteali ed interstiziali dell'ovaio. L'analisi immunoistochimica ha localizzato l'augurina principalmente nelle cellule muscolari scheletriche e cardiache, in alcune componenti linfatiche, nel nucleo ipotalamico sopraottico, nella zona glomerulosa e nella midollare surrenalica, nelle cellule di Leydig, nelle cellule follicolari e della teca dell'ovaio. Maggiore espressione di augurina è stata rilevata nella zona glomerulare e nella midollare del surrene rispetto alla zona fascicolata/reticolare. La Real Time-PCR ha confermato l'espressione di spexina ed augurina in tutti i tessuti sopramenzionati. Nel surrene, l'espressione di spexina è stata maggiore nei ratti adulti rispetto a quelli più giovani, mentre l'espressione di augurina è risultata più elevata nei ratti di 2 giorni. Mediante Real Time-PCR si è rilevata sovraespressione di augurina e spexina nella rigenerazione surrenalica, con picchi di espressione a 5 e 8 giorni rispettivamente. L'analisi in Real Time-PCR ha dimostrato un incremento dell'espressione di spexina di circa 6-7 volte nei glomi esposti ad iperossia rispetto ai ratti mantenuti in condizioni normali di ossigeno per le sei settimane successive alla nascita, mentre non sono state rilevate differenze di espressione nei tessuti surrenalici. Anche l'espressione di augurina non è stata modificata dall'esposizione all'iperossia. Concentrazioni di spexina pari a 10^{-6} M stimolavano la secrezione basale di aldosterone da parte delle cellule della ZG mentre non sono stati riportati effetti sulla secrezione basale di corticosterone. In colture primarie di cellule

corticosurrenali di ratto concentrazioni di spexina pari a 10^{-8} e 10^{-6} M causavano una significativa inibizione della proliferazione.

Conclusioni – In ragione della loro notevole diffusione spexina ed augurina sono probabilmente implicate in numerose funzioni fisiologiche. In particolare, la loro localizzazione nelle cellule neuronali ed endocrine suggerisce un ruolo come neuromodulatori e come fattori paracrini/endocrini. La sovraespressione di augurina nella corticale surrenalica in rigenerazione e nei ratti più giovani, suggerisce un coinvolgimento di questo peptide nella regolazione della proliferazione delle cellule surrenali. In particolare, l'approccio sperimentale in vitro ha confermato la capacità di spexina di inibire la proliferazione delle cellule corticosurrenali e di modulare la produzione ormonale. L'aumentata espressione di spexina nei glomi carotidei esposti ad iperossia suggerisce un possibile ruolo nelle modificazioni strutturali e funzionali di questo tessuto in risposta a stimoli iperossici nel primo periodo postnatale.

INTRODUZIONE

Gli ormoni peptidici si legano a recettori di membrana e giocano un ruolo critico nella fisiologia normale e patologica. In alcuni casi, i peptidi vengono processati in seguito a modifiche post-traduzionali, e più del 50% degli ormoni peptidici vengono aminidati in posizione C-terminale (Malendowicz et al., 2006). I peptidi maturi passano attraverso la via secretoria e vengono rilasciati nello spazio subcellulare dove formano legami specifici con i loro recettori localizzati sulla superficie cellulare, modulando le funzioni cellulari.

La ricerca di nuovi ormoni peptidici è resa difficoltosa dalle loro piccole dimensioni, dalla loro bassa espressione e dalle scarse omologie di sequenza. Sono stati utilizzati diversi metodi per identificare nuovi ormoni peptidici. La purificazione biochimica accoppiata a saggi funzionali è il metodo di scoperta predominante (Braun-Menendez et al., 1939; Burgus et al., 1969; Schmidt et al., 1991; Katafuchi et al., 2003). Recentemente, grazie ai progressi nel sequenziamento genomico, sono state sviluppate strategie di ricerca bioinformatica. Queste hanno il vantaggio, rispetto agli approcci biochimici, di non avere bias per le proteine con bassa o ristretta espressione e possono essere ugualmente ben applicate in organismi in cui è difficile la purificazione biochimica di una quantità sufficiente di peptide. Molte sequenze specifiche, tra cui quelle che identificano i peptidi segnale e i siti di clivaggio del pre-proormone, servono per identificare i nuovi precursori peptidici ormonali nelle banche dati di cDNA umano. Mirabeau et al. (2007) hanno sviluppato uno strumento di ricerca bioinformatico che utilizza la struttura di molte sequenze peptidiche per stimare la probabilità che una proteina contenga un peptide processato o secreto appartenente a questa classe. Questo metodo ha permesso di identificare due peptidi chiamati spexina (SPX, detta anche NPQ) e augurina (detta anche *esophageal cancer-related gene 4, ECRG-4*).

Entrambe le proteine contengono sequenze di segnale, siti di clivaggio e almeno un putativo residuo dibasico, sito di clivaggio del pre-proormone.

Sulla base di alcuni precedenti risultati sperimentali su questi peptidi, questo progetto mette in luce la differente localizzazione ed espressione di spexina ed augurina in vari tessuti. Inoltre, l'attenzione è stata altresì focalizzata sull'analisi dell'espressione di spexina ed augurina nella ghiandola surrenale e nel globo carotideo con riferimento al possibile ruolo nella corticosteroidogenesi, nella proliferazione cellulare e nella risposta all'iperossia.

SPEXINA

La Fig. 1 mostra la struttura primaria del precursore della spexina umana. Vi si trova una piccola regione di 15 aminoacidi fiancheggiata da putativi siti di clivaggio dibasici altamente conservati nei mammiferi, negli uccelli e nei pesci. La presenza di un residuo di glicina nella posizione terminale del peptide putativo suggerisce che questo venga processato e aminidato, una caratteristica comune degli ormoni peptidici. (Eipper et al., 1992). Il peptide Spexina è costituito da molti aminoacidi aromatici, una caratteristica comune agli ormoni peptidici. Inoltre, c'è un significativo aumento nella conservazione della sequenza che coincide con il putativo sito di clivaggio del pro-ormone in posizione N-terminale. Queste scoperte dimostrano che Spexina viene processata e secreta quando espressa in cellule endocrine. Analisi immunocitochimiche anti-Flag in seguito a trasfezione con Flag-spexina in cellule pancreatiche β -TC3, ha dimostrato una colocalizzazione di spexina nei granuli della via secretoria. Analisi con Western blot del supernatante di cellule pancreatiche trasfettate con N-Flag-spexina ha inoltre evidenziato una banda di reazione Flag, dimostrandone così la secrezione (Mirabeau et al., 2007).

MKGLRSLAATTLALFLVFLGNSSCAPQRLLERRRNWTQAMLYLKGAQGRRFISDQSRR
KDLSDRPLPERRSPNPQLLTIPEAATILLASLQKSPEDEEKNFDQTRFLEDSELLNW

Figura 1: Struttura primaria del precursore della spexina umana.

Studi di ibridazione *in situ* hanno localizzato l'mRNA di spexina nello strato sottomucoso dell'esofago e del fondo dello stomaco del ratto (Mirabeau et al., 2007), dove il plesso sottomucoso del sistema nervoso enterico esprime molti ormoni peptidici quali, peptide rilasciante la gastrina o peptide intestinale vasoattivo coinvolti nella contrazione della muscolatura liscia (Costa et al., 2000). Dati recentemente apparsi in GenBank indicano che la proteina umana può essere trovata nell'encefalo, ovaio, rene e in cellule del tumore del polmone. Una ricerca preliminare dell'espressione di spexina utilizzando metodiche di Real Time-PCR ha dimostrato la presenza del suo trascritto nell'encefalo di uomo, topo e ratto. Un'analisi mediante Northern blot su tessuti umani ha recentemente evidenziato la presenza dell' mRNA di spexina nel rene, encefalo e pancreas (Sonmez et al., 2009).

La distribuzione subregionale di spexina nell'encefalo è stata inoltre studiata mediante ibridazione *in situ*. Una iniziale mappatura dell'mRNA di spexina ha mostrato la sua espressione nel tegmento mesopontino. Caudalmente, l'mRNA di spexina è stato identificato più precisamente nel nucleo di Barrington, il quale può essere identificato per la sua espressione dell'mRNA del fattore di rilascio della corticotropina (CRF). La distribuzione regionale dell'mRNA di spexina è praticamente sovrapponibile a quella del CRF, suggerendo una possibile co-localizzazione cellulare di questi due fattori. Al contrario, il segnale preproNPQ è distinto da quello della tirosina idrossilasi (TH), che è selettivamente espressa nel locus coeruleus.

Per quanto riguarda le ipotetiche funzioni della spexina in test su espianti muscolari di stomaco è stato scoperto che essa induce la contrazione della muscolatura liscia in maniera dose-dipendente con EC50 di 0.75 μ M (Mirabeau et al., 2007).

AUGURINA

Nella figura 2 è mostrata la struttura primaria del precursore di augurina. Essa contiene un singolo putativo sito di clivaggio pro-ormone seguito da un peptide più lungo altamente conservato nei mammiferi e nei pesci. Augurina contiene note sequenze peptidiche segnale e siti di clivaggio tra cui uno terminale che presenta un possibile sito di taglio pro-ormonale costituito da un residuo di-basico. Anche questa proteina è composta da molti aminoacidi aromatici. Infine, è stato evidenziato un significativo aumento nella conservazione della sequenza in corrispondenza del sito di clivaggio del pro-ormone in posizione N-terminale, a supporto del ruolo biologico di questa struttura.

Il gene dell'augurina corrisponde a "Esophageal Cancer Related Gene 4 (ECRG-4), che è un gene oncosoppressore originariamente clonato e identificato da Su et al. (1998) da epitelio normale dell'esofago umano. Il gene corrispondente, localizzato nel cromosoma 2q14.1-14.3, contiene 4 esoni, si estende per 13 kb ed ha una lunghezza del cDNA di 772 bp. Test di trasfezione di Flag-augurina in cellule pancreatiche β -TC3 ha evidenziato la localizzazione di augurina nel core dei granuli secretori. Il Western blot del supernatante delle cellule trasfettate ha evidenziato inoltre una banda immunoreattiva che ne dimostra la secrezione (Mirabeau et al., 2007).

MAASPARPAVLALTGLALLLLLCWGPGGISGNKCLKMLQKREAPVPTKTKVAVDENKAKEFL
GSLKRQKRQLWDRTRPEVQQWYQQFLYMGFDEAKFEDDITYWLNDRDRNGHEYYGDYYQRHYD
EDSAIGPRSPYGFRHGASVNYDDY

Figura 2: Struttura primaria del precursore dell'augurina umana.

Oltre all'esofago normale, è stata inoltre scoperta l'espressione di augurina a livello della vescica e dell'encefalo (Bi et al., 2001). Nel topo, studi di ibridazione *in situ* hanno evidenziato una elevata espressione di augurina nel lobo intermedio dell'ipofisi, nello strato glomerulare del surrene, nel plesso corioideo e nel nodo atrio ventricolare del cuore di topo. Esperimenti di ibridazione *in situ* a 18.5 giorni di gestazione hanno evidenziato la presenza di mRNA di augurina nella corteccia surrenalica, nel plesso corioideo e nell'osso (Mirabeau et al., 2007). Il pattern di espressione di augurina suggerisce un possibile ruolo nella modulazione dell'omeostasi del sale e dell'energia, nelle funzioni cardiovascolari e nella composizione dei fluidi cerebrali e spinali.

Per quanto riguarda il possibile ruolo nella tumorigenesi, il gene di augurina è downregolato nel carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC) e in linee cellulari tumorali di esofago (NEC, EC109, EC9706) e stomaco (GLC). L'ipermetilazione del gene dell'augurina è coinvolta nella carcinogenesi dell'esofago (Yue et al., 2003). Il livello di espressione dell' mRNA di augurina è significativamente ridotto nel ESCC se comparato con mucosa esofagea normale, in pazienti con tumore localmente invasivo T2-4, comparato con bassa invasività T1 e in tumori allo stadio 4 comparati con tumori ad uno stadio compreso tra 0 e 3. Inoltre, bassi livelli di espressione dell' mRNA di augurina sono stati associati ad una sopravvivenza significativamente più breve dopo resezione chirurgica se confrontati agli alti livelli di espressione di mRNA di augurina in pazienti affetti da

ESCC. Il livello di espressione dell' mRNA di augurina può rappresentare un fattore di prognosi indipendente per pazienti con ESCC (Mori et al., 2007).

Data la presenza di augurina a livello encefalico ed endocrino, Tadross e collaboratori (2010) hanno ipotizzato un possibile ruolo nel controllo del sistema neuroendocrino. L'espressione nell'ipotalamo suggerisce un ruolo fisiologico a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario. Questo gruppo di ricerca ha iniettato augurina a livello del terzo ventricolo, o nel nucleo paraventricolare, mostrando un aumento dell'adrenocorticotropina plasmatica (ACTH) e del corticosterone. L'aumento dei livelli di ACTH e corticosterone nel plasma in seguito ad iniezione intralventricolare veniva bloccato da un pretrattamento con l'antagonista del fattore rilasciante la corticotropina. Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che una incubazione con augurina aumentava il rilascio del fattore rilasciante la corticotropina e arginina vasopressina da tessuto ipotalamico in coltura. Queste scoperte indicano che l'augurina stimola la secrezione di ACTH attraverso il rilascio del fattore rilasciante la corticotropina e della arginina vasopressina (Tadross et al., 2010).

RIGENERAZIONE DEL SURRENE

La corteccia surrenalica dei mammiferi è costituita da tre zone concentriche funzionalmente distinte, la zona glomerulare, subcapsulare, secernente mineralcorticoidi (ZG), la zona fascicolata, intermedia, secernente glucocorticoidi (ZF), e la zona reticolare secernente androgeni (ZR). La maggior parte delle mitosi si verifica nella ZG, mentre la morte per apoptosi avviene per lo più nella ZR, in accordo con la teoria della 'migrazione cellulare', secondo la quale, le nuove cellule, derivanti dalle cellule staminali localizzate nella ZG, migrano attraverso la ZF la ZR per morire qui in apoptosi. Un punto di vista alternativo localizza le cellule staminali corticosurrenali in una zona intermedia indifferenziata tra ZG e ZF (Mitani et al., 2003). In condizioni normali, il grado di

rinnovamento delle cellule corticosurrenali è molto basso. Un modello sperimentale di crescita corticosurrenale e di attivazione delle cellule staminali locali è rappresentato dalla rigenerazione post enucleazione. Dopo l'enucleazione del surrene, che consiste nella rimozione della midollare degli strati più profondi della corticale (ZF/R) mantenendo la capsula e la ZG, la corteccia va incontro a rigenerazione corticale che ripristina completamente la struttura e la funzionalità in 4–6 settimane (Greep and Deane, 1949; Brogi and Pellegrino, 1959; Skelton, 1959; Ennen et al., 2005). Una rigenerazione ottimale richiede la rimozione del surrene controlaterale perchè la secrezione di glucocorticoidi da parte del surrene rimanente intatto previene l'aumento della secrezione dell'ACTH che è essenziale per guidare il processo di rigenerazione (Engeland and Levay-Young, 1999). Oltre all'ACTH, è stato riportato che molti altri peptidi regolatori favoriscono la rigenerazione corticosurrenale nel ratto. La crescita della corteccia surrenalica durante le prime fasi della rigenerazione può essere divisa in due step: un periodo di iniziale differenziazione (dal giorno 0 al giorno 3) e un successivo periodo di proliferazione (dal giorno 4 al giorno 7). Dal giorno 8, l'attività proliferativa post-enucleazione inizia a diminuire (Taki and Nickerson, 1985). La maggior parte delle volte, la differenziazione cellulare precede la proliferazione. Durante l'iniziale risposta all'enucleazione, le cellule corticali aderenti alla capsula non esprimono né la citocromo *P-450* aldosterone sintasi (*P-450*aldo), marker per le cellule della lomerulare, né la citocromo *P-450* 11 β -idrossilasi (*P-450*11 β), marker per le cellule della zona fascicolata (Engeland and Levay-Young, 1999). Queste osservazioni suggeriscono che l'enucleazione induce le cellule della glomerulare a dedifferenziarsi nel fenotipo delle cellule intermedie, cellule negative sia per *P-450*aldo che *P-450*11 β (Mitani et al., 1994; Engeland and Levay-Young, 1999). L'aumento del pool delle cellule della zona intermedia è pertinente con il fatto che la zona intermedia fornisce le cellule progenitrici per la rigenerazione (Mitani et al., 1995). Il ripristino delle cellule

della zona fascicolata attraverso la differenziazione delle cellule della zona intermedia o glomerulare è in linea con gli studi ultrastrutturali che mostrano l'acquisizione da parte delle creste mitocondriali di caratteristiche tipiche delle cellule della fascicolata

SURRENE E OSSIGENO

Studi precedenti utilizzando cellule surrenaliche di bovino, coniglio e ratto, hanno evidenziato che la steroidogenesi è sensibile ai cambiamenti del livello di ossigeno all'interno di un range fisiologico. È stato proposto che una diminuzione di aldosterone durante l'ipossia potrebbe avere benefici effetti diuretici, mentre il mantenimento della produzione di cortisolo potrebbe essere necessario per sostenere le funzioni vascolari e metaboliche. Altri gruppi di ricerca hanno dimostrato la sensibilità della steroidogenesi all'ossigeno in una varietà di modelli sperimentali in vitro (Raff and Bruder, 2005; Hardy and Cooper, 2010).

GLOMO CAROTIDEO

Il glomo carotideo è una piccola massa di tessuto situata a livello della biforcazione carotidea la cui principale funzione consiste nella chemorecezione arteriosa, inducendo un aumento del volume e della frequenza ventilatoria in risposta all'ipossia, all'ipercapnia o alla riduzione del pH del sangue. I lobuli del glomo, separati da setti di tessuto connettivo, sono organizzati in clusters di due tipi cellulari: cellule di tipo I, a loro volta separate in chiare, scure e picnotiche, e cellule di tipo II (o di sostegno) (Verna, 1979; Smith et al., 1982; Pallot et al., 1986; Pallot, 1987). Le cellule di tipo I sono considerate gli elementi chemorecettivi. Esse immagazzinano neurotrasmettitori o neuromodulatori come dopamina, serotonina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina, adenosina, met e leu-encefalina, neuropeptide Y, CGRP, galanina, endotelina, bombesina, NO,

adrenomedullina, neurotensina (Gonzalez et al., 1994; Verna, 1997; Kusakabe et al., 2003; Bairam and Carroll, 2005; Porzionato et al., 2006; 2010). Le cellule di tipo II mostrano markers astrocitari ed hanno un ruolo di sostegno (Pallot et al., 1986; Pallot, 1987) e, inoltre, è stato recentemente osservato che queste cellule, esposte a prolungata ipossia, possono comportarsi come precursori staminali delle cellule di tipo I (Pardal et al., 2007). Nel glomo carotideo, gli impulsi chemosensitivi sono principalmente trasmessi attraverso fibre afferenti del nervo glossofaringeo che derivano dal ganglio petroso (Pallot, 1987). Il glomo riceve anche un'innervazione simpatica e parasimpatica, che modula le attività chemosensitiva attraverso azioni sul sistema vascolare e sulle cellule di tipo I (Ichikawa, 2002).

Il glomo carotideo si sviluppa come una condensazione del terzo arco faringeo. Per quanto riguarda lo sviluppo funzionale, questo chemorecettore non contribuisce molto al controllo del respiro durante la vita fetale, nonostante il livello di ipossia di circa 25 torr (Blanco et al., 1984), e la sua attività non è necessaria per stabilire il ritmo del respiro alla nascita (Jansen et al., 1981). Nel primo periodo post-natale si sviluppa un graduale aumento alla chemosensibilità ipossica con un cambiamento nella soglia ipossica a 55 torr (Blanco et al., 1984, 1988; Gauda et al., 2004) e un aumento della curva di risposta allo stimolo ipossico (Blanco et al., 1984; Bamford et al., 1999; Kholwadwala and Donnelly, 1992; Gauda et al., 2004). Nel gatto adulto, vi è un aumento di tre volte nel volume del glomo carotideo rispetto ai neonati. (Clarke and Daly, 1985; Clarke et al., 1990). Alcuni autori hanno evidenziato pochissimi mitosi nel glomo carotideo dei polli neonati (Clarke and Daly, 1985), del ratto (von Dalnok and Menssen, 1986) e dell'uomo (Heath et al., 1990), ipotizzando un improbabile incremento postnatale del numero delle cellule di tipo I. Tuttavia, è stato visto che le cellule di tipo I di ratti neonati si dividono se messe in coltura (Fishman and Schaffner, 1984; Nurse and Fearon, 2002) e Wang e Bisgard (2005) hanno

marcato con bromodeossiuridina cellule di tipo I in ratti neonati, fornendo la prova di proliferazione delle cellule di tipo I nel periodo postnatale. Alcuni cambiamenti cellulari e molecolari associati ad un aumento postnatale della chemosensibilità all'ipossia sono stati identificati in un aumento della densità dei canali del K^+ (Peers and O'Donnell, 1990), un maggiore aumento del livello di Ca^{2+} intracellulare in risposta a tale stimolo (Sterni et al., 1995; Bamford et al., 1999) e modificazioni nel profilo dei neurotrasmettitori (Gauda et al., 1996, 2000, 2004). Studi di immunistochemica e di ibridazione hanno mostrato un aumento dell'espressione del neuropeptide Y (Oomori et al., 1991) e una ridotta espressione di tirosina idrossilasi (Holgert et al., 1995; Sterni et al., 1995; Bamford et al., 1999), recettore dei cannabinoidi (McLemore et al., 2004) e recettore 2 della dopamina (Holgert et al., 1995; Sterni et al., 1995; Bamford et al., 1999). In uno dei nostri studi precedenti, condotto mediante metodiche di immunistochemica e di immunofluorescenza, abbiamo scoperto un aumento dell'espressione di adrenomedullina in soggetti adulti rispetto a feti di 21-25 settimane di gestazione (Porzionato et al., 2006). Nei ratti al termine della prima settimana di vita postnatale è stato evidenziato un aumento delle cellule di tipo I (von Dalnok and Menssen, 1986). In ratti neonati è stata descritta anche una proliferazione delle cellule endoteliali e delle cellule di tipo II (Wang and Bisgard, 2005) ed un aumento del numero di sinapsi tra le cellule di tipo I e quelle di tipo II (Kondo and Iwasa, 1996) è stato descritto anche in ratti neonati. Per quanto riguarda l'innervazione delle cellule del glomo, alcuni autori hanno scoperto la proliferazione di cellule di Schwann (Wang and Bisgard, 2005) e di cellule della glia nel ganglio cervicale superiore e nel ganglio petroso del ratto (Wang and Bisgard, 2005; Lemke, 2001). Cambiamenti postnatali nel glomo carotideo possono essere ascritti al ruolo di fattori di crescita come il fattore neurotrofico derivante dall'encefalo (BDNF), e il fattore neurotrofico derivante dalle cellule gliali (GDNF), prodotti dalle cellule di tipo I (Hertzberg et al., 1994; Erickson

et al., 2001; Wang and Bisgard, 2005). Trk B, il recettore di BDNF, è localizzato sia nelle cellule di tipo I che nei neuroni chemoafferenti, suggerendo una sua funzione sia autocrina che paracrina. Ret, che è il recettore di GDNF, è stato invece scoperto solo nelle fibre nervose e nei neuroni sensitivi del ganglio petroso (Wang and Bisgard, 2005).

I cambiamenti morfologici e funzionali vengono riportati come conseguenza di una ipossia o iperossia cronica (Wang and Bisgard, 2002; Kusakabe et al., 2002, 2004, 2005; Prabhakar and Jacono, 2005; Lam e al., 2008). Tuttavia, alterazioni nel glomo carotideo sono state riportate anche in relazione all'età (Hurst et al., 1985; Heath and Smith, 1992; Di Giulio et al., 2003; Pokorski et al., 2004), in varie patologie respiratorie (Heath et al., 1990; Heath and Smith, 1992; Bencini and Pulera, 1991; Heath, 1991), malformazioni cardiache, mith et al., 1986) e nella 'sudden infant death syndrome' (Gauda et al., 2007; Porzionato et al., 2008a; 2009). I cambiamenti del glomo carotideo ascrivibili all'età prevedono una aumento del tessuto connettivo, una riduzione del parenchima e una diminuzione della proliferazione delle cellule di tipo II (Hurst et al., 1985; Heath and Smith, 1992; Porzionato et al., 2005).

SCOPO DELLO STUDIO

Il primo scopo di questo studio è l'analisi dell'espressione di due nuovi peptidi, spexina e augurina, in differenti *tessuti di ratto* attraverso metodiche di Real Time-PCR e di immunoistochimica, in quanto sono disponibili pochi dati in letteratura circa la loro espressione. Una migliore comprensione e della distribuzione cellulare e tissutale di spexina e augurina contribuirà a porre alcune ipotesi sulla loro funzione. I risultati della letteratura, seppur limitati, suggeriscono un ruolo svolto da questi peptidi a livello degli organi endocrini e nel sistema nervoso. Così, particolare attenzione è stata focalizzata su questi tessuti.

Ulteriore scopo di questo studio è stato analizzare la funzione di spexina ed augurina nel *surrene* di ratto. Il loro livello di espressione è stato studiato nello sviluppo postnatale e in un modello sperimentale di rigenerazione del surrene, ottenuto mediante incisione chirurgica della capsula surrenalica ed estrusione con rimozione della corticale profonda e della midollare. Inoltre, sono stati studiati gli effetti di spexina nella corticosteroidogenesi e nella proliferazione cellulare in cellule corticosurrenali isolate o in colture cellulari primarie.

Ulteriore scopo di questo progetto di ricerca ha interessato lo studio del *glomulo carotideo*. E' stata valutata l'espressione di spexina ed augurina nel glomulo di ratti a 6 settimane di vita esposti al 60% di iperossia per le prime due settimane di vita rispetto a ratti controllo. Gli effetti dell'esposizione all'iperossia nel glomulo carotideo sono stati analizzati anche in termini di valutazioni morfometriche del volume e dell'apoptosi.

MATERIALI E METODI

ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE

CAMPIONAMENTO DEI TESSUTI

Ratti adulti Sprague-Dawley, del peso di 200-220 g, sono stati tenuti in gabbie a 23°C, esposti a cicli luce-buio di 12:12 ore e mantenuti a condizioni di dieta standard e acqua *ad libitum* fino al sacrificio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal comitato etico locale per le sperimentazioni sugli animali. La prima parte dello studio ha riguardato l'analisi dell'espressione di spexina ed augurina in tessuti normali di ratti giovani e adulti. Una serie di campioni sono stati prelevati dai diversi organi da ratti di 2, 28, 45 giorni e da ratti adulti. Alcuni di questi campioni sono stati posti in RNA later® (Qiagen, Hilden, Germany) e congelati a -80°C per studi di Real Time-PCR, gli altri sono stati fissati in formalina al 10% per gli studi di immunostochimica.

MODELLO SPERIMENTALE DI RIGENERAZIONE DEL SURRENE

L'analisi dell'espressione di spexina ed augurina è stata condotta anche nel surrene in rigenerazione dopo parziale enucleazione. In condizioni di anestesia, il surrene di sinistra di dieci ratti è stato enucleato, mentre quello di destra è stato rimosso. L'intervento è stato condotto attraverso un approccio dorsale senza aprire il peritoneo. L'enucleazione è consistita nell'incisione della capsula surrenale e nell'estrusione, con rimozione, della corticale più profonda e della midollare; solo le cellule della ZG aderenti alla capsula sono rimaste *in situ*. Ai ratti sono state fatte delle iniezioni intramuscolari di amplital (30 mg/100g peso corporeo) subito dopo l'intervento, posizionati in gabbie individuali sterili, e mantenuti ad una dieta standard con liquidi contenenti una soluzione dello 0.9% di NaCl. Gli animali sono stati sacrificati al giorno 0 (60 min dopo l'enucleazione; gruppo controllo) e 5 giorni dopo l'intervento, e i loro surreni in via di rigenerazione sono stati prontamente rimossi. Tre surreni in rigenerazione per ogni time point sono stati fissati in formalina al

10% per 24 h, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni dello spessore di 5- μ m per analisi immunohistochimica. I campioni rimanenti sono stati congelati e mantenuti a -80°C per la (RT)-polymerase chain reaction (PCR).

MODELLO SPERIMENTALE DI ESPOSIZIONE ALL'IPEROSSIA

Ratte femmine gravide wild-type Sprague-Dawley (SD) (Harlan, Udine, Italy) sono state messe in gabbie (BioSpherix, OxyCycler model A84XOV, Redfield, NY) dotate di software di monitoraggio continuo di O₂ e CO₂. Al termine gestazionale, i ratti neonati sono stati distribuiti in modo random tra i due gruppi di esperimento: Gruppo 1 (aria ambiente, n=5), gruppo di controllo, mantenuto in aria ambiente per 6 settimane; Gruppo 2 (iperossia, n=5), esposti al 60% di ossigeno dalla nascita per 2 settimane e successivamente tenuti in aria ambiente per altre 4 settimane. Al termine dell'esperimento gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati i glomi carotidei e i surreni. La biforcazione carotidea di destra e una porzione di surrene sono stati fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina. Il globo di sinistra e una porzione del surrene sono stati separati dal tessuto connettivo e adiposo e congelati a -80°C. I blocchetti inclusi in paraffina sono stati serati in sezioni dallo spessore di 5- μ m. Per quanto riguarda l'analisi dei glomi carotidei, è stato eseguito un campionamento sistematico e uniformemente random di ciascun campione per tutta l'estensione rostro-caudale. Per ciascuno di questi, una fetta ogni 5, con inizio casuale a partire da una delle prime 4 fette, è stata colorata con ematossilina-eosina. Le fette contigue a quelle colorate con ematossilina-eosina sono state analizzate con il metodo TUNEL.

REAL TIME-PCR

L'analisi semiquantitativa Real-Time-PCR è stata effettuata con Roche Light Cycler 2.0 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) versione 4.0 (28-31), usando il seguente

programma: step di predenaturazione a 95°C per 10 min, e 45 cicli di amplificazione (denaturazione, 95°C per 10 sec; allineamento, 58°C per 5 sec; e amplificazione, 72°C per 10 sec). Successivamente, la curva di melting (60-90°C con differenza di grado pari a 0.1°C/sec) è stata effettuata per valutare la specificità dell'amplificazione e l'eventuale presenza di bioprodotti. Tutti i campioni sono stati amplificati in doppio e sono stati utilizzati come controlli interni della reazione l'ipoxantina guanina fosforibosil transferasi 1 (HPRT) oppure la porfobilinogeno deaminasi (PBGD).

IMMUNOISTOCHEMICA ANTI-SPEXINA E -AUGURINA

Tutti i tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per 48 h e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state gradualmente idratate attraverso passaggi in concentrazioni decrescenti di alcool e lavate in acqua distillata. Per l'immunoistochimica anti-augurina è stato effettuato uno smascheramento antigenico con tampone sodio citrato 10 mM, pH 6.0, in bagnetto a 96°C per 60 min. Le sezioni sono state incubate in una soluzione di perossido di idrogeno allo 0.3% per 10 min a temperatura ambiente, con lo scopo di rimuovere la perossidasi endogena, e successivamente in blocking serum (siero di capra normale al 2%) per 30 min. Le sezioni sono state incubate con anticorpo primario policlonale di coniglio specifico per uomo, ratto e topo anti-spexina [H-023-81, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA] diluito 1:600 in tampone fosfato salino (PBS) e con anticorpo primario policlonale di coniglio anti-augurina [C2ofr40 Sigma prestige antibodies, St. Louis, USA] diluito 1:50 in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Le sezioni sono state lavate per tre volte per 5 min in PBS, incubate con siero anti-coniglio per 30 min (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Histofine, Japan), e sviluppate in 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Infine, le sezioni sono state contrastate con ematossilina. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione

dell'anticorpo primario. L'immunoreazione di spexina nello stomaco umano è stata utilizzata come controllo positivo, come suggerito nel datasheet dell'anticorpo. Allo scopo di verificare la specificità della reazione immunoistochimica, sono stati effettuati test di assorbimento per spexina ed augurina. La colorazione immunoistochimica per spexina ed augurina è stata valutata mediante microscopio dapprima a basso ingrandimento (X5), poi confermata ad ingrandimenti maggiori (X10, X20, X40). La valutazione immunoistochimica ha considerato il numero di cellule positive, il pattern di localizzazione subcellulare (nucleare, citoplasmatico, nucleocitoplasmatico) e l'intensità di reazione. L'intensità di colorazione è stata classificata come – (assente), +/- (appena rilevabile), + (debole), ++ (moderata) o +++ (forte).

MISURAZIONE DEL VOLUME DEL GLOMO CAROTIDEO

L'esame delle sezioni è stato condotto mediante microscopio Leica DM4500B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connesso ad una telecamera digitale a alta risoluzione DFC320 (Leica Microsystems) e ad un computer dotato di softwares per l'acquisizione e l'analisi di immagini (QWin, Leica Microsystems).

La stima del volume del globo carotideo è stata effettuata su sezioni colorate con ematossilina ed eosina. Il volume (V) di ogni globo è stato stimato utilizzando il metodo di Cavalieri (Gundersen and Jensen, 1987; Gundersen et al., 1999):

$$V = a(p) \times \bar{d} \times \sum_{i=1}^n P_i(X)$$

dove $a(p)$ è l'area associata a ciascun punto di campionamento; \bar{d} è la distanza media tra due sezioni consecutive colorate con ematossilina-eosina; n è il numero di sezioni studiate;

$\sum_{i=1}^n P_i(X)$ è la sommatoria dei punti che cadono all'interno della struttura in esame.

TERMINAL dUTP NICK END LABELING (TUNEL)

Il metodo TUNEL è stato applicato seguendo un protocollo già utilizzato in precedenza (Porzionato et al., 2008b; Iafrate et al., 2009). Le sezioni di glomo carotideo sono state incubate con 20 µg/mL di proteinasi K per 15 min a temperatura ambiente e lavate in una soluzione 0.01 M di PBS. Sono state incubate in perossido di idrogeno allo 0.3% in acqua distillata per bloccare la perossidasi endogena e, successivamente, incubate con soluzione tampone (Equilibration buffer, ApopTag, Oncor, Gaithersburg, MD, USA) per 5 min a temperatura ambiente. Le sezioni sono state trattate con il mix di reazione della terminal-deossinucleotidil transferasi per 1 ora a temperatura ambiente, lavate in stop-wash buffer, e incubate per 15 min a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi incubate con streptavidina coniugata a perossidasi di rafano diluita 1: 500 in PBS, per 30 min a temperatura ambiente. Dopo la reazione, le sezioni sono state lavate in PBS, messe in 0.03% 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, Milan, Italy) contenente 0.01% H₂O₂, e contrastate con ematossilina. Come controllo positivo, è stata effettuata una incubazione con DNasi. Come controllo negativo è stato omissa il mix di reazione della terminal-deossinucleotidil transferasi. L'analisi dell'apoptosi è stata eseguita contando il numero di cellule positive sul totale nelle sezioni sottoposte al metodo TUNEL. La percentuale delle cellule di tipo I e di tipo II positive al TUNEL è stata valutata (con obiettivo 40x) in 5 sezioni ed in 3 campi per sezione. La percentuale media delle cellule positive è stata calcolata per ogni caso e per ogni gruppo sperimentale.

MODELLI IN VITRO

ISOLAMENTO DELLE CELLULE DEL SURRENE

I surreni di ratti maschi adulti sono stati decapsulati per separare la ZG dalla ZF/R. Le cellule disperse sono state ottenute mediante digestione con collagenasi di tipo I e disaggregazione meccanica (Hinson et al., 1992). Le cellule sono state contate con CASY-

Cell Counter and Analyser System, Model TT, Schærfe System GmbH, Reutlinger, Germany. Aliquote di ogni sospensione cellulare (10^4 cellule/mL in Krebs-Ringer bicarbonate buffer con 0,3% glucosio e 0,2% albumina di siero bovino) sono state incubate con diverse concentrazioni di spexina. Come controllo positivo le cellule sono state incubate in presenza di ACTH [1×10^{-7} mol/L] (Cotrosyn, Organon). Le incubazioni sono state effettuate in bagnetto a 37° C per 60 min, in una atmosfera di 95% O₂ e 5% CO₂. Alla fine dell'esperimento i tubi incubati sono stati centrifugati a 4° C e il supernatante è stato conservato a -36°C.

COLTURE PRIMARIE DI CELLULE SURRENALI

Per la preparazione delle colture primarie di cellule corticosurrenali sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley di 21 giorni. Dopo il sacrificio, i surreni sono stati immediatamente prelevati e posizionati in terreno di coltura Dulbecco MEM/Nutrient mix, Gibco (15.57 g/L) e il grasso e il tessuto connettivo sono stati eliminati. Ogni surrene è stato tagliato in piccoli pezzi. I frammenti di tessuto sono stati dissociati dalla sospensione cellulare usando la digestione enzimatica in terreno Dulbecco MEM/Nutrient mix supplementato con 1 g/L di collagenasi (type I, Sigma), 0.1 g/L di inibitore della tripsina (Sigma), 0.3 g/L BSA (Sigma) e 4.75 g/L HEPES (Sigma) per 30 min a 37° C in bagnetto agitato. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e risospese con terreno di coltura Dulbecco con 1.125 g/L di sodio bicarbonato (POCH), 10% di siero bovino fetale (Gibco) e specifiche concentrazioni di antibiotico (penicillin-streptomycin-fungizone mixture; Sigma). Le cellule sono state contate e le sospensioni sono state messe in piastre da 96 pozzetti (NUNC Brand Products), 10000 cellule per pozzetto, e coltivate per 96 ore a 37° C in atmosfera umida al 5% CO₂ e 95% aria. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 24 ore. Al quarto giorno, le cellule sono state incubate con diverse concentrazioni di spexina [1×10^{-10} – 1×10^{-6} M]. Come controllo positivo le cellule sono state incubate in

presenza di ACTH [1×10^{-7} M]. L'incubazione è stata effettuata a 37° C in una atmosfera al 5% CO₂ e 95% O₂. Il terreno di coltura raccolto è stato conservato a -36° C fino al saggio del corticosterone. Gli steroidi sono stati estratti dal terreno di coltura e le loro concentrazioni sono state misurate mediante RIA utilizzando corticosterone [1,2,6,7-³H] e aldosterone [1,2,6,7-³H].

Il grado di proliferazione delle cellule adrenocorticali è stato misurato utilizzando il metodo colorimetrico della bromodeossiuridina (BrdU). Le cellule sono state incubate con BrdU per 6 ore e in seguito fissate con metanolo a -20°C. Dopo aver rimosso il fissativo le cellule sono state incubate con nucleasi per 30 minuti a 37°C e subito dopo con BrdU-POD per 30 minuti a 37°C; sono state lavate per 3 volte e incubate con il substrato per 10 minuti. Il valore di estinzione è stato misurato alla lunghezza d'onda di 490 nm.

STATISTICA

I dati sono stati espressi come media ± Errore Standard e la loro comparazione statistica è stata condotta mediante test di Mann-Whitney e test Kruskal-Wallis seguito dal test di comparazione multipla di Dunn.

RISULTATI

REAL TIME –POLYMERASE CHAIN REACTION

La prima analisi mediante Real Time-PCR di spexina ed augurina ha riguardato i tessuti endocrini. Entrambi i peptidi sono risultati essere espressi in tutti i tessuti endocrini esaminati (surrene, ipofisi, ipotalamo, testicolo, tiroide, ovaio). L'espressione di spexina è risultata maggiore rispetto a quella di augurina in tutti questi organi. Tiroide, ovaio ed ipotalamo sono i tessuti che hanno mostrato la più alta espressione di spexina ($P < 0.05$). La ghiandola tiroidea è stata il tessuto con la più alta espressione di augurina ($P < 0.05$), mentre non sono state trovate differenze statisticamente significative tra gli altri tessuti (Fig. 3). Come mostrato in Fig.4, nel surrene di ratti maschi adulti, i livelli più elevati dell'mRNA di spexina sono stati trovati nella ZG e nella ZF/R della corteccia, livelli molto più bassi erano presenti nella midollare. Un alto livello di espressione del gene della spexina è stato trovato anche in cellule fresche isolate da ZG e ZF/R ottenute da ratti adulti. In cellule corticosurrenali di ratto in coltura i livelli di mRNA della spexina erano notevolmente più basso rispetto alle cellule fresche isolate e non subivano variazioni dopo 24 ore di esposizione ad ACTH. Al contrario, i livelli di espressione dell'augurina sono risultati più elevati nella ZG e nella midollare rispetto alla ZF/R ($P < 0.05$); mentre non sono state trovate differenze statisticamente significative tra la ZG e la midollare.

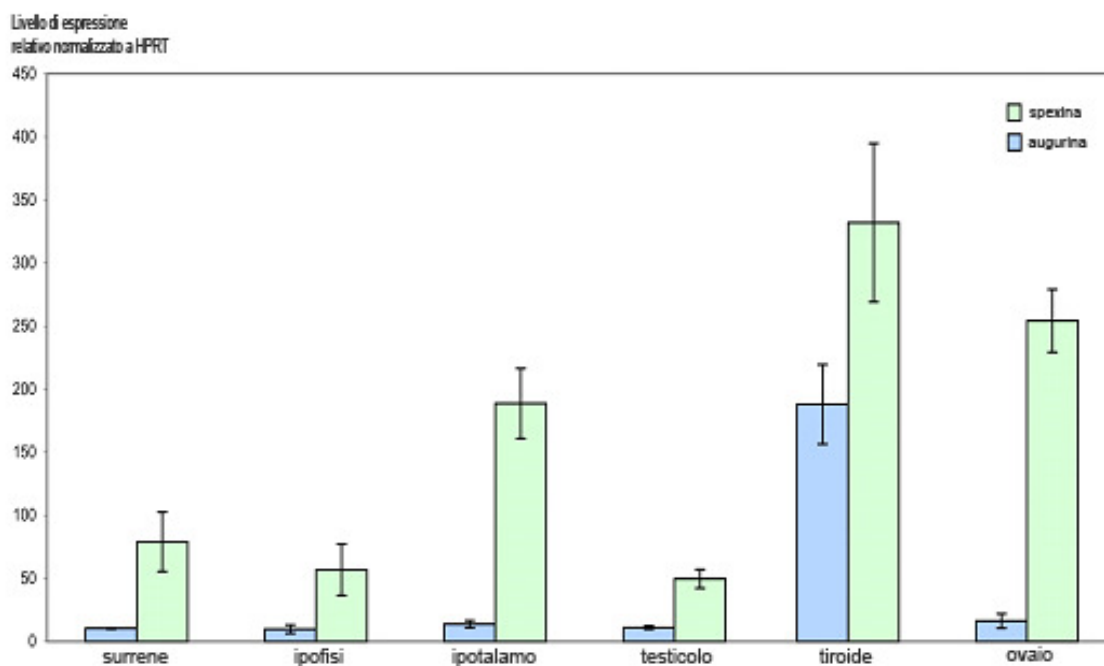


Figura 3: Analisi dell'espressione di spexina ed augurina nelle ghiandole endocrine di ratti adulti mediante Real Time-PCR.

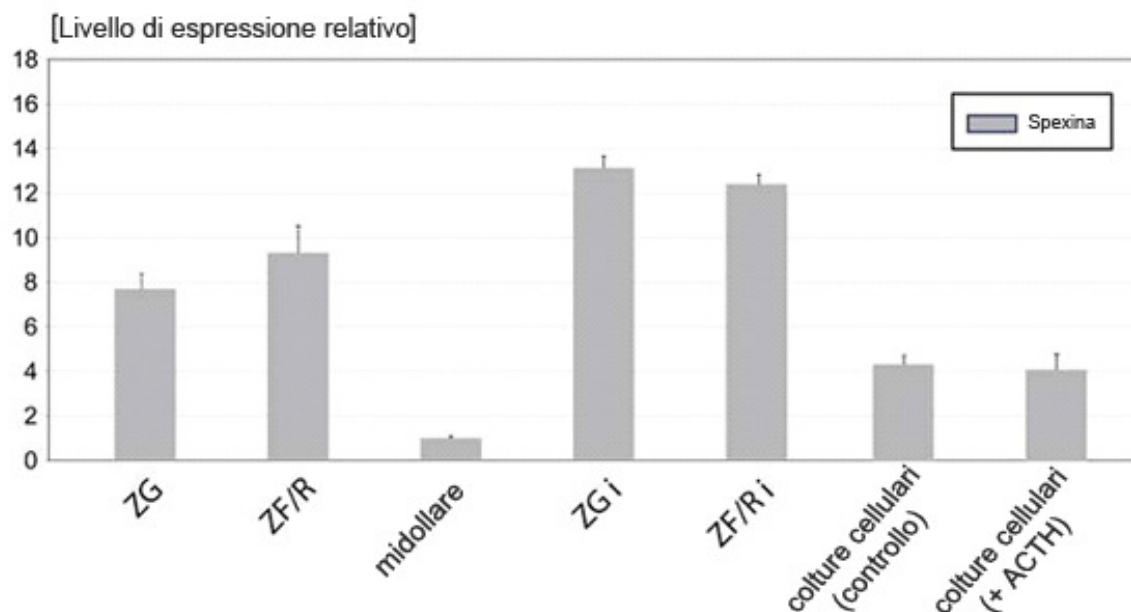


Figura 4: Livelli dell'mRNA di spexina (in relazione all'espressione del gene PBGD) nei diversi compartimenti del surrene di ratto, in cellule isolate e in cellule in coltura. ZG – zona glomerulare, ZF/R – zona fascicolata/reticolare; ZGi e ZF/Ri – cellule fresche isolate di corteccia surrenalica; coltura cellulare in stato basale e dopo stimolazione con ACTH (dopo 4 giorni di coltura). Ogni barra rappresenta la media \pm SE da 3 surreni.

Una certa espressione di spexina ed augurina è stata altresì rilevata in tutti gli altri tessuti non endocrini esaminati attraverso Real Time-PCR (Fig. 5).

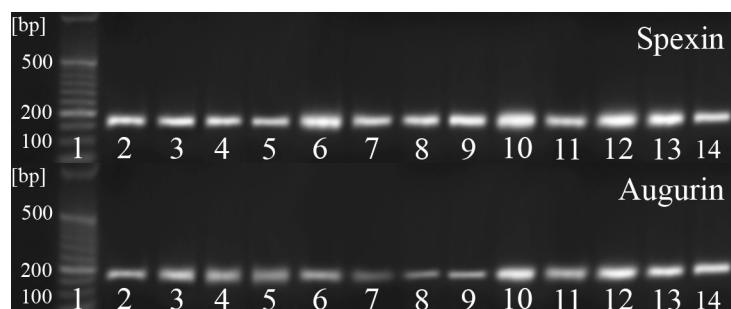


Figura 5: Gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro con evidenza dell'amplificazione dei geni di spexina ed augurina in intestino tenue (corsa 2), muscolo scheletrico (3), utero (4), stomaco (5), pancreas (6), fegato (7), milza (8), polmone (9), encefalo (10), cuore (11), esofago (12), rene (13), vescica (14). In corsa 1, marcatore di dimensioni molecolari.

Per quanto riguarda l'espressione di spexina, pancreas, encefalo, esofago e rene hanno mostrato il più alto livello di espressione rispetto agli altri tessuti ($P < 0.05$); utero, polmone e stomaco hanno mostrato un più alto livello di espressione rispetto a vescica, intestino tenue, cuore, tessuto scheletrico, fegato e milza ($P < 0.05$) (Fig. 6). Per quanto riguarda l'espressione di augurina, stomaco, utero, encefalo e cuore hanno mostrato un contenuto più elevato di mRNA rispetto agli altri tessuti ($P < 0.05$); l'esofago ha mostrato un alto livello di espressione rispetto a muscolo scheletrico, vescica, rene, intestino tenue, pancreas, fegato, milza e polmone ($P < 0.05$); il muscolo scheletrico e la vescica hanno mostrato un alto contenuto di mRNA di augurina in relazione a rene, intestino tenue, pancreas, fegato, milza, polmone ($P < 0.05$) (Fig. 7).

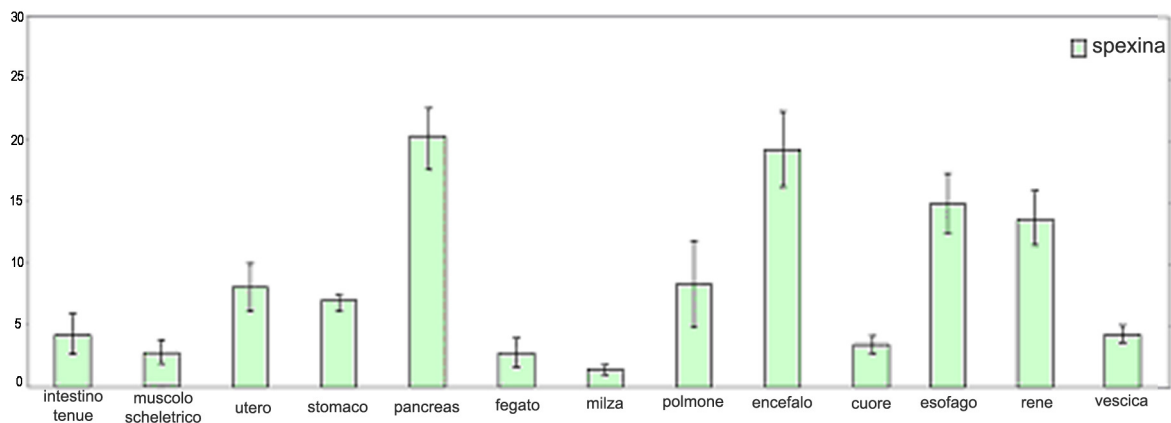


Figura 6: Analisi dell'espressione di spexina in tessuti non endocrini di ratti adulti mediante Real Time-PCR.

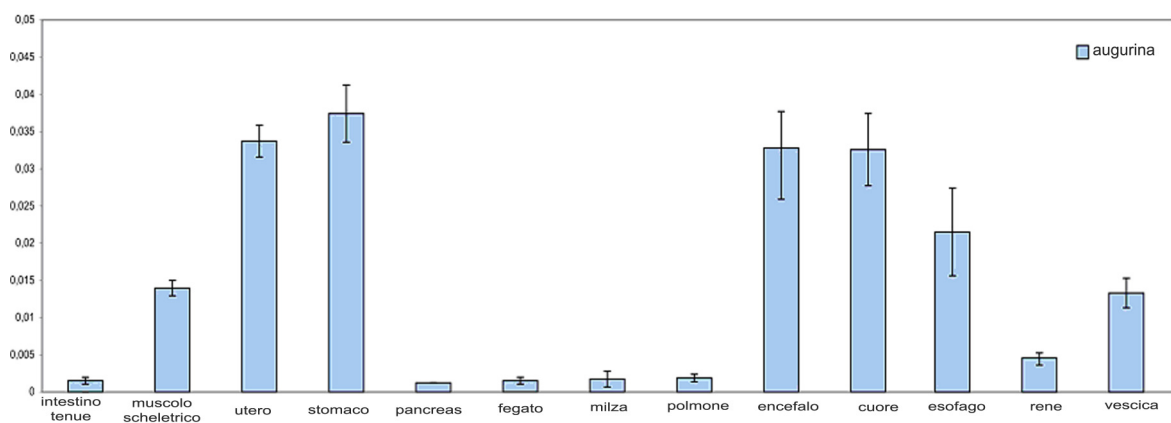


Figura 7: Analisi dell'espressione di augurina in tessuti non endocrini di ratti adulti mediante Real Time-PCR.

Nel surrene, è stato trovato un diverso livello di espressione di spexina ed augurina in riferimento a diverse età postnatali (Fig.8). L'espressione di spexina è risultata più elevata nei surreni di ratti adulti rispetto a quelli dei ratti giovani ($P<0.05$). Non sono state trovate differenze statisticamente significative tra ratti di 2-, 28- e 45-giorni. Augurina mostrava una bassa differenza di espressione tra le diverse età ma l'espressione di augurina a 2 giorni di vita era statisticamente più alta rispetto alle altre età ($P<0.05$).

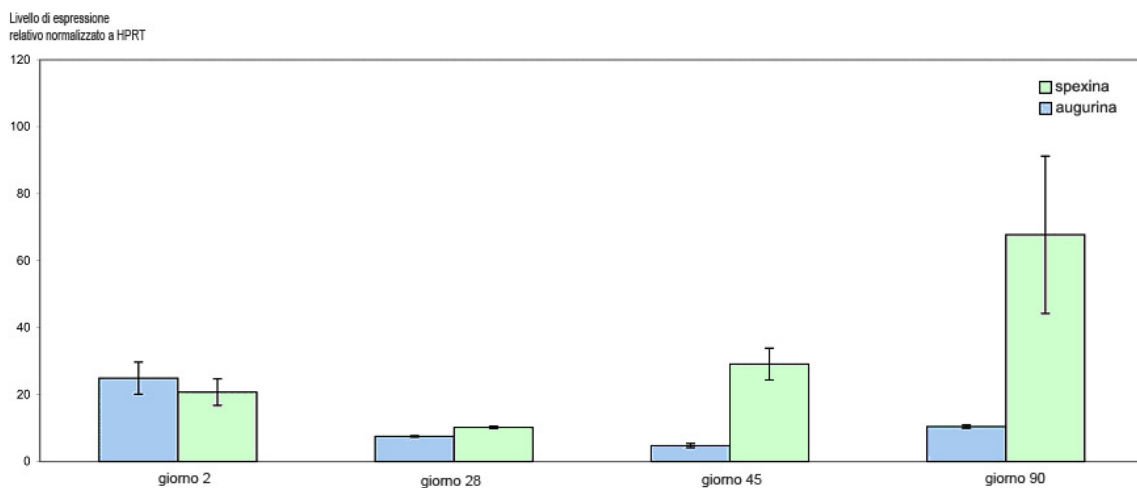


Figura 8: Analisi mediante Real Time-PCR dell'espressione di spexina ed augurina in ghiandole surrenali di ratti a diverse età.

Abbiamo inoltre caratterizzato il livello di espressione dell'mRNA di spexina nel corso della rigenerazione del surrene indotta da enucleazione. I risultati dell'enucleazione del surrene riportano un evidente e lineare aumento del livello di mRNA di spexina, con il picco maggiore che si evidenzia a 8 giorni dopo l'intervento (Fig.9). L'espressione del gene della spexina ritornava a livelli di controllo 30 giorni dopo l'enucleazione.

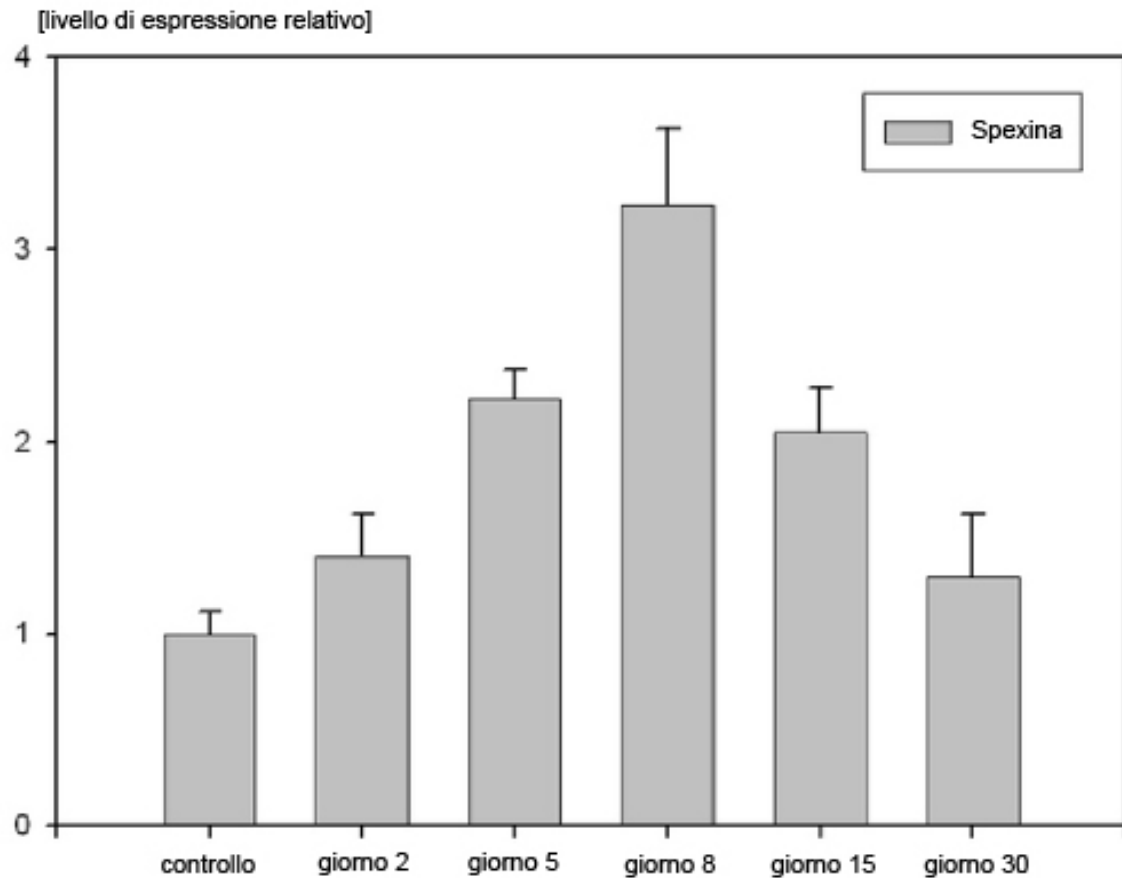


Figura 9: Livello di espressione dell'mRNA di spexina nella rigenerazione del surrene enucleazione-indotta (in relazione all'espressione del gene PBGP) in ratti maschi adulti. I giorni corrispondono ai giorni dopo l'enucleazione surrenalica. Ogni barra rappresenta la media \pm SE da 3 surreni.

L'espressione di augurina era altamente upregolata nei surreni in rigenerazione, con livelli più elevati 5 giorni dopo l'enucleazione (Fig. 10).

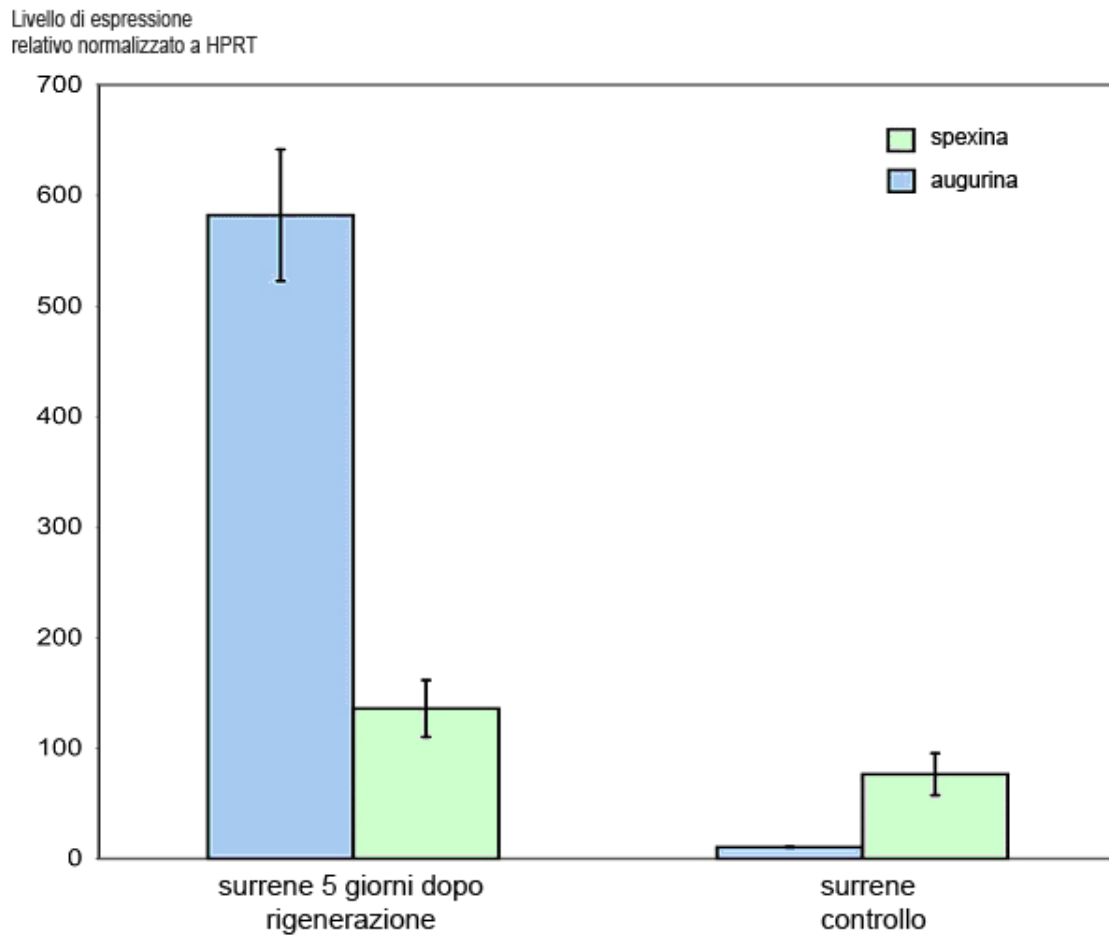


Figura 10: Analisi mediante Real Time-PCR dell'espressione di spexina ed augurina in ghiandole surrenali in rigenerazione.

IMMUNOISTOCHEMICA ANTI-SPEXINA

Abbiamo trovato una diffusa positività per spexina nei diversi tessuti ed organi esaminati, anche se il livello di espressione differiva nelle diverse popolazioni cellulari. L'immunoreattività di spexina coinvolgeva principalmente cellule epiteliali, endocrine e neuronali. Per quanto riguarda la localizzazione subcellulare, la positività è stata prevalentemente rilevata a livello citoplasmatico. Il test di assorbimento ha confermato la specificità della colorazione immunohistochimica (Fig. 11).

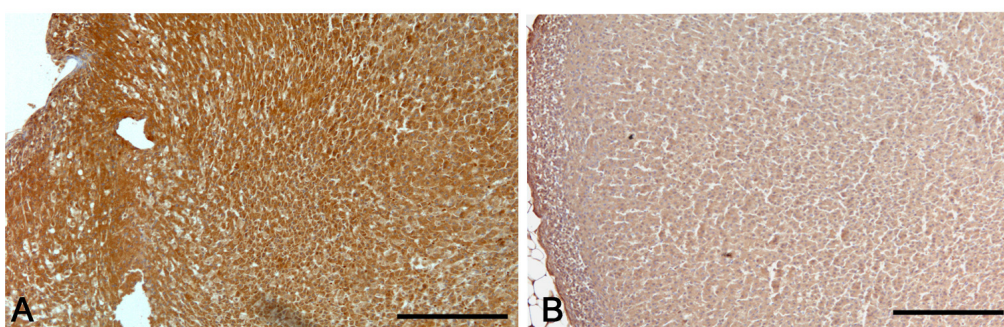


Figura 11: Test di assorbimento con spexina in surrene di ratto: rispetto al normale protocollo immunohistochimico (A) si evidenzia l'assenza di immunoreazione usando il sopranatante dell'anticorpo assorbito con spexina (B). Barre di scala: 75 μ m (A-B).

Cute

Le cellule epiteliali hanno mostrato una forte positività citoplasmatica. Le guaine interna ed esterna dei follicoli piliferi mostravano una forte positività citoplasmatica, mentre il fusto del pelo e le papille dermiche erano negative. Le ghiandole sebacee hanno mostrato una moderata positività citoplasmatica (Fig. 12A).

Apparato respiratorio

Le cellule epiteliali della trachea, dei bronchi e dei bronchioli hanno mostrato una forte colorazione citoplasmatica. Nessuna colorazione è stata vista a livello delle strutture cartilaginee tracheali e bronchiali. Nel parenchima del polmone, la maggior parte dei

pneumociti risultava negativa, anche se alcune cellule alveolari presentavano una debole/moderata immunoreazione citoplasmatica (Fig. 12B).

Muscoli

Il muscolo scheletrico ed il cuore mostravano una colorazione eterogenea, alcune fibre erano negative, altre mostravano un'immunoreazione debole o moderata (Fig. 12C-D). Le cellule muscolari lisce del tratto gastrointestinale, del sistema urinario e dei vasi mostravano una debole o moderata immunoreattività citoplasmatica.

Ossso

Osteoblasti, osteociti ed osteoclasti erano negativi (Fig. 12E). Nel midollo osseo, la maggior parte delle cellule erano negative. Una moderata colorazione è stata identificata nel citoplasma dei megacariociti (Fig. 12F).

Cartilagine

Le cellule cartilaginee erano principalmente negative ma qualche cellula mostrava una moderata colorazione citoplasmatica.

Tessuto linfatico

Moderata/forte immunoreazione è stata trovata nelle cellule epiteliali del timo, con particolare attenzione al compartimento midollare. Anche i corpuscoli di Hassal hanno mostrato una immunoreazione positiva. I linfociti erano negativi (Fig. 12G).

Nella milza, le cellule della polpa bianca erano principalmente negative mentre nella polpa rossa alcune cellule mostravano una moderata o forte positività citoplasmatica (Fig. 12H).

Nei linfonodi (Fig. 12I-J) la maggior parte dei linfociti dei follicoli mostravano una moderata immunoreazione citoplasmatica mentre nella zona parafollicolare i linfociti erano principalmente negativi. Sono state trovate rare cellule con positività nucleare. Gli aggregati linfocitari lungo il canale alimentare erano prevalentemente negativi, con alcune cellule che mostravano una moderata colorazione citoplasmatica.

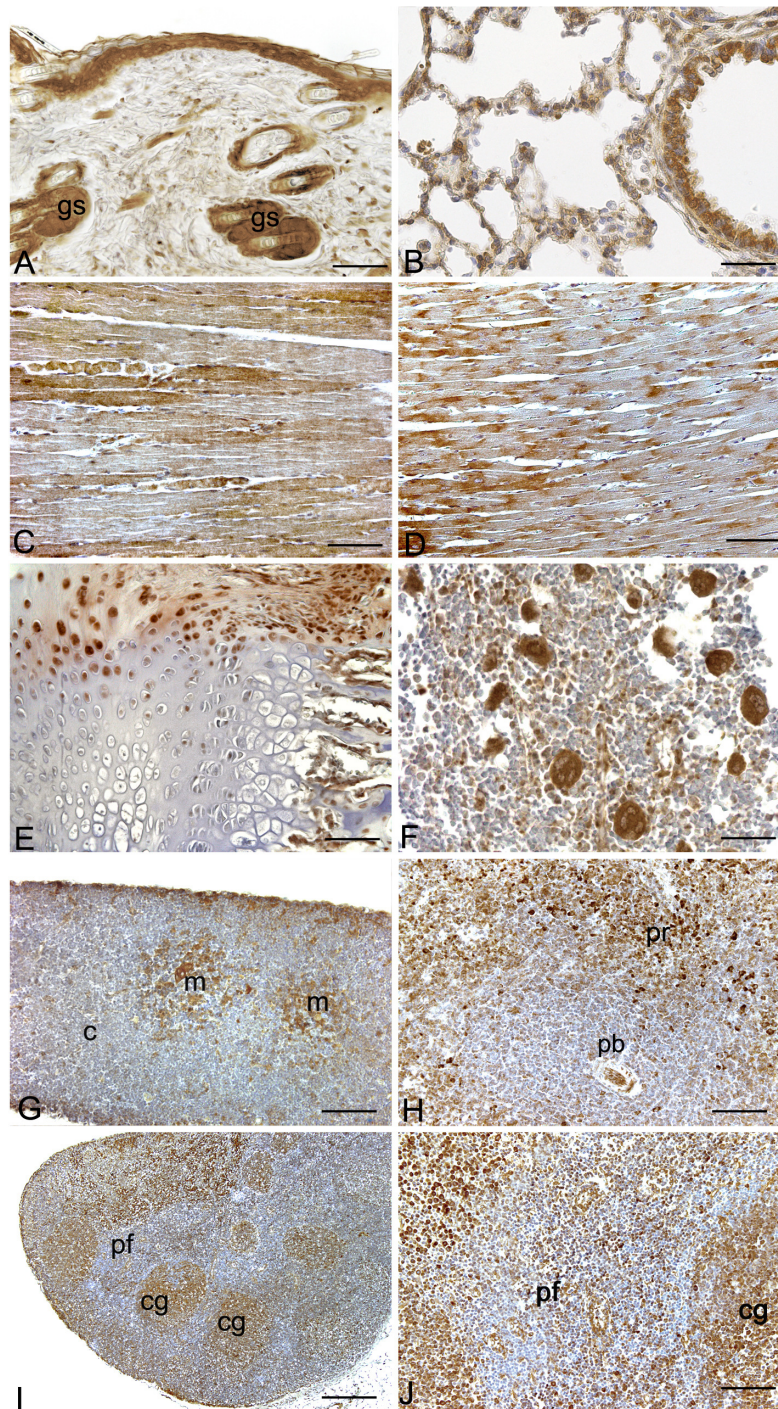


Figura 12: Immunoistochimica anti-spexina in tessuti normali di ratto. A: cute (gs: ghiandola sebacea). B: polmone C: muscolo scheletrico. D: cuore. E: cartilagine ed osso. F: midollo osseo. G: timo. (m: midollare; c: corticale). H: milza. (pb: polpa bianca; pr: polpa rossa). I-J: linfonodi. (cg: centro germinativo; pf: zona parafollicolare). Barre di scala: 300 μ m (J); 150 μ m (H); 75 μ m (A-E; G; J); 37,5 μ m (F).

Apparato digerente

Nelle ghiandole salivari, l'epitelio duttale mostrava una forte immunoreazione citoplasmatica. Le cellule degli acini secretori mostravano una moderata/forte positività citoplasmatica che coinvolgeva il compartimento basale delle cellule. I setti di tessuto connettivo risultavano negativi (Fig. 13A).

L'epitelio dell'esofago mostrava una intensa reazione citoplasmatica mentre i nuclei risultavano negativi. La lamina propria e lo strato sottomucoso erano negativi. Le cellule muscolari lisce della muscularis mucosae e lo strato muscolare mostravano una debole o moderata positività citoplasmatica (Fig. 13B).

Nello stomaco, le cellule dell'epitelio più superficiale e dell'epitelio ghiandolare mostravano una moderata o forte immunoreazione citoplasmatica. Alla base delle ghiandole gastriche la positività era molto intensa. Solo alcune cellule epiteliali erano negative (Fig. 13C).

Nell'intestino tenue le cellule epiteliali mostravano una moderata/forte immunocolorazione citoplasmatica mentre le cripte mostravano una positività meno intensa (Fig. 13D).

Nel pancreas esocrino è stata trovata una forte immunoreazione a livello delle cellule degli acini secretori. In queste cellule la colorazione coinvolgeva principalmente il compartimento basale delle cellule. I setti di tessuto connettivo erano negativi (Fig. 13E).

Gli epatociti hanno mostrato una moderata colorazione citoplasmatica senza immunoreazione nucleare. Il tessuto connettivo dello spazio portale era negativo. I sinusoidi, il tratto portale, le venule epatiche terminali e le arteriole epatiche erano negative. Il dotto biliare era solitamente negativo, tuttavia sono state trovate alcune cellule epiteliali sparse con una moderata colorazione citoplasmatica (Fig. 13F).

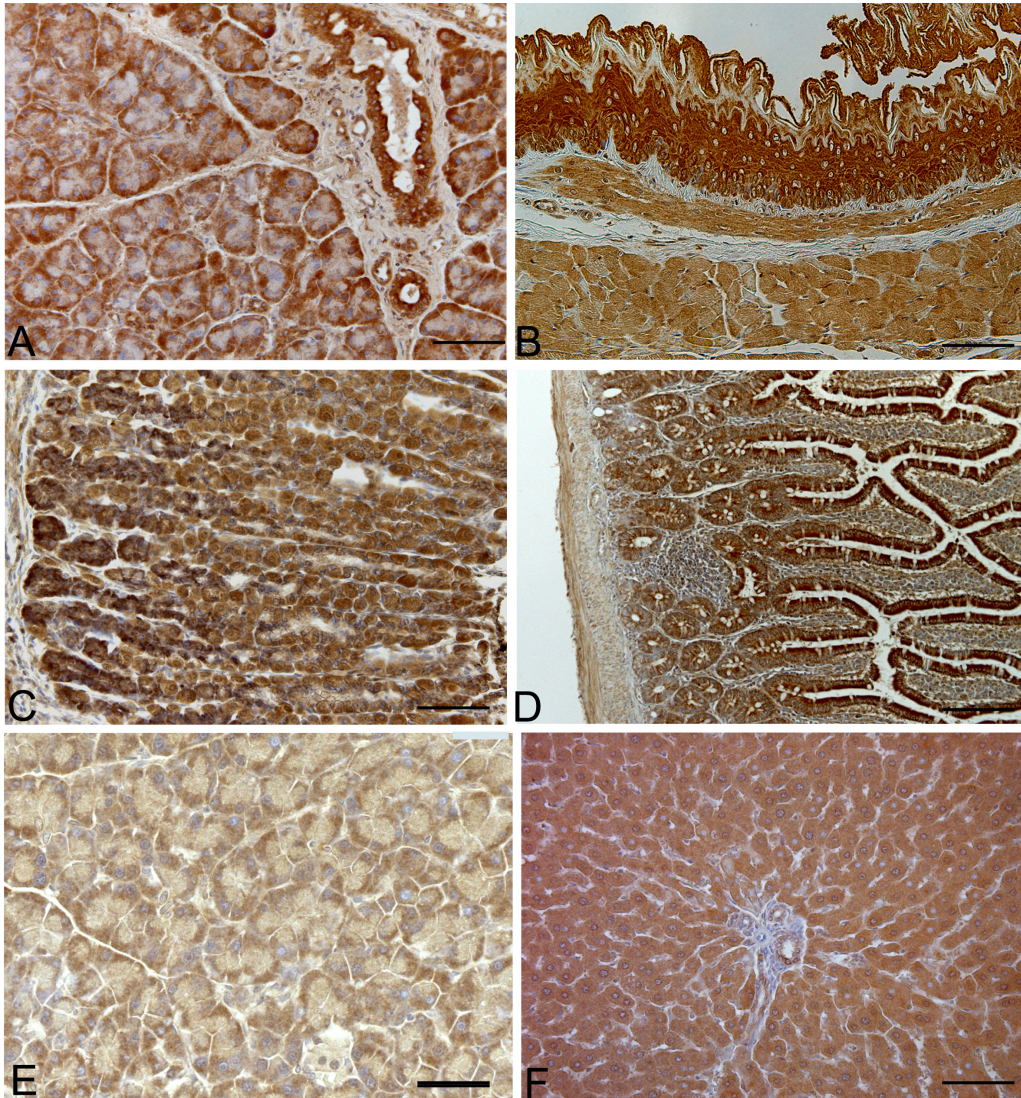


Figura 13: Immunoistochimica anti-spexina in tessuti dell'apparato digerente di ratto. A: ghiandola salivare. B: esofago. C: stomaco. D: intestino tenue. E: pancreas. F: fegato. Barre di scala: 150 μ m (D); 75 μ m (A-C; E; F).

Apparato urinario

I corpuscoli renali erano solitamente negativi. E' stata osservata una reazione citoplasmatica positiva nell'epitelio della maggior parte dei tubuli corticali, tuttavia, alcuni tubuli adiacenti a quelli fortemente positivi erano negativi. Rare cellule hanno mostrato una reazione nucleare (Fig. 14A). Le fibre dello stroma circostante erano negative.

L'epitelio dell'uretere e della vescica ha mostrato una moderata reazione citoplasmatica (Fig. 14B).

Apparato riproduttivo femminile

Nell'ovaio (Fig. 17 E-F) le cellule della granulosa erano principalmente negative, anche se alcune cellule mostravano una moderata o forte immunocolorazione citoplasmatica. Le cellule della teca presentavano una debole o moderata positività citoplasmatica. Le cellule del corpo luteo e delle ghiandole interstiziali hanno evidenziato una intensa reazione citoplasmatica. Lo stroma era prevalentemente negativo.

Le cellule epiteliali della tuba e dell'endometrio (Fig. 14D) mostravano una moderata o forte immunoreazione citoplasmatica mentre lo stroma era negativo e lo strato muscolare mostrava una debole colorazione citoplasmatica.

L'epitelio vaginale ha evidenziato una forte colorazione del citoplasma delle cellule in tutto il suo spessore. La lamina propria è risultata negativa (Fig. 14E).

Apparato riproduttivo maschile

Nei testicoli, gli spermatogoni, gli spermatociti e gli spermatidi non hanno evidenziato una immunocolorazione. Al contrario, alcune cellule del Sertoli hanno mostrato una moderata immunoreazione citoplasmatica e tutte le cellule di Leydig sono risultate fortemente positive a livello citoplasmatico (Fig. 14G, 17D). L'epitelio dell'epididimo ha mostrato una moderata/forte immunoreattività. Le cellule dell'epitelio ghiandolare delle vescichette seminali (Fig. 14I) e della prostata (Fig. 14L) hanno anch'esse evidenziato una moderata o forte colorazione citoplasmatica.

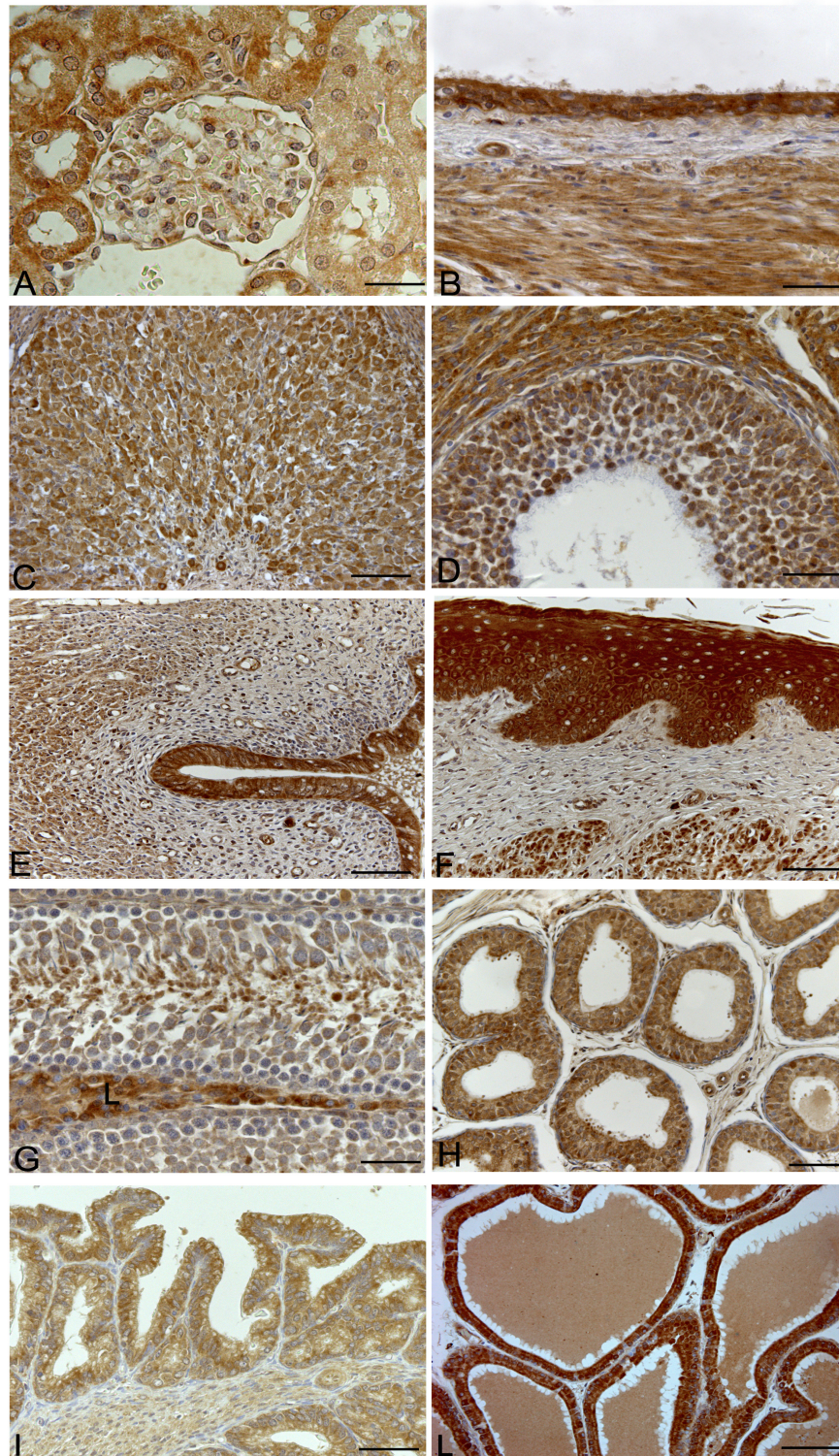


Figura 14: Immunoistochimica anti-spexina in tessuti del sistema genitourinario di ratto. A: rene. B: vescica. C: ovaio, corpo luteo. D: ovaio, follicolo ooforo. E: utero. F: vagina. G: testicolo. (L: cellule di Leydig). H: epididimo. I: vescicola seminale. L: prostata. Barre di scala: 75 μm (C; E; F; H-L); 37,5 μm (B; D; G); 23,8 μm (A).

Encefalo

In tutto il sistema nervoso centrale, erano visibili molti neuroni con moderata colorazione citoplasmatica. Le cellule della glia erano solitamente negative. Al contrario, l'ependima ha mostrato una forte reazione citoplasmatica in tutti i distretti esaminati. Nella corteccia encefalica, c'erano alcuni neuroni che mostravano una reazione forte o moderata e altri che invece risultavano negativi. La distribuzione dei neuroni positivi e negativi seguiva spesso l'organizzazione degli strati nella corteccia. I neuroni dell'ippocampo (CA1, CA2, CA3, CA4, lamine dorsale e ventrale del giro dentato) mostravano una moderata colorazione citoplasmatica (Fig. 15A-B).

Nella corteccia cerebellare le cellule del Purkinjie mostravano una moderata immunocolorazione citoplasmatica. Negli strati granulare e molecolare la maggior parte delle cellule erano negative, anche se alcune di esse mostravano una positività citoplasmatica o nucleo-citoplasmatica (Fig. 15C). Nel tronco encefalico, i differenti nuclei mostravano diverse percentuali di neuroni positivi (Fig. 15D).

Nel plesso corioideo, le cellule ependimali erano fortemente positive a livello del citoplasma mentre le strutture vascolari erano negative o debolmente positive (Fig. 15E).

Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico, i neuroni del ganglio del trigemino (Fig. 15F) e del ganglio cervicale superiore (Fig. 15G) mostravano una forte positività citoplasmatica.

Nella retina (Fig. 15H) lo strato dei fotorecettori mostrava una moderata colorazione nei vari segmenti; lo strato nucleare esterno era negativo; lo strato nucleare interno presentava una moderata/forte immunocolorazione citoplasmatica o nucleocitoplasmatica; le cellule gangliari mostravano una intensa colorazione citoplasmatica; lo strato plessiforme era negativo. L'epitelio della cornea (Fig. 15I) mostrava una colorazione nucleare e citoplasmatica molto intensa; lo strato della cornea era prevalentemente negativo, solo

alcune cellule sparse mostravano una immunocolorazione citoplasmatica moderata o intensa. L'epitelio del corpo ciliare (Fig. 15J) mostrava una moderata positività citoplasmatica, alcune cellule mostravano inoltre una positività moderata a livello nucleare.

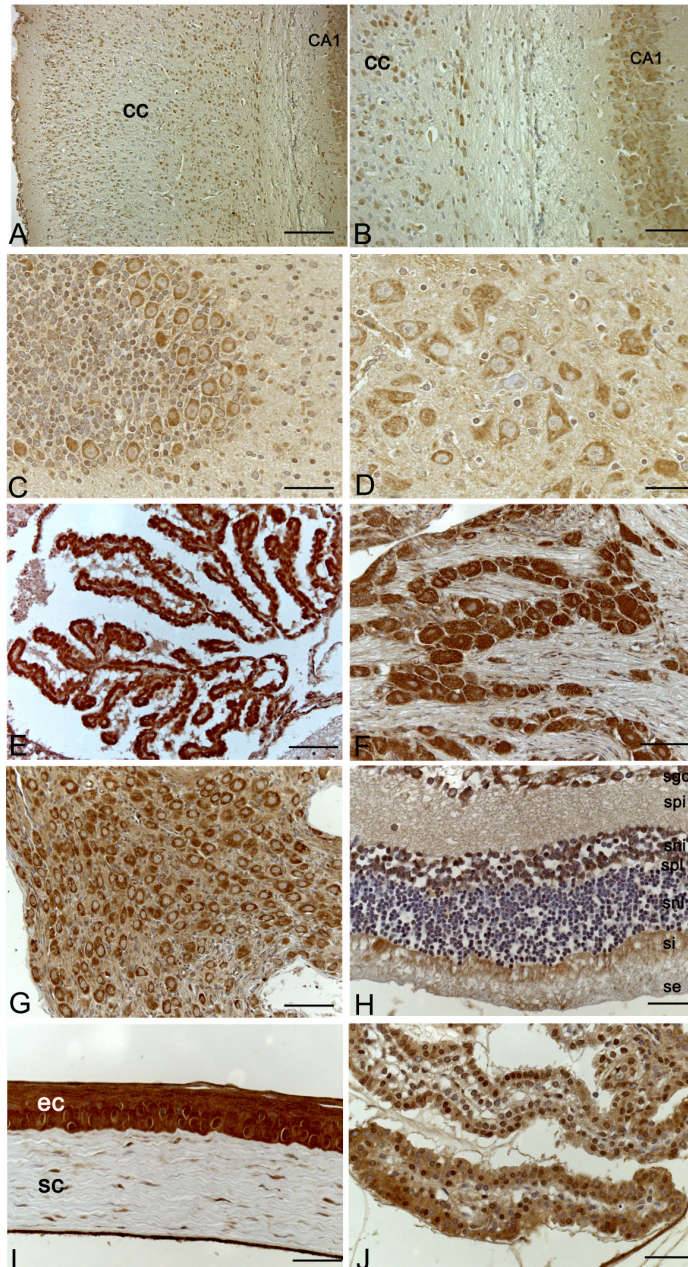


Figura 15: Immunoistochimica anti-spexina in strutture del sistema nervoso e dell'occhio di ratto. A-B: corteccia cerebrale (CC) ed ippocampo (CA1). C: corteccia cerebellare. D: tronco encefalico. E: plesso corioideo. F: ganglio del trigemino. G: ganglio cervicale superiore. H: retina. (sgc: strato delle cellule gangliari; spi: strato plessiforme interno; sni: strato nucleare interno; spe: strato plessiforme esterno; sne: strato nucleare esterno; si: segmenti interni nello strato dei fotorecettori; se: segmenti esterni nello strato dei fotorecettori). I: cornea. (ec: epitelio corneale; sc: stroma corneale). J: corpo ciliare. Barre di scala: 150 μ m (A); 75 μ m (B; F; G); 37,5 μ m (C-E; H-J).

Ghiandole endocrine

Nell'ipotalamo sia i neuroni magnocellulari che quelli parvocellulari del nucleo paraventricolare mostravano una moderata positività citoplasmatica, anche se erano visibili anche alcuni neuroni negativi (Fig. 16A). I neuroni del nucleo supraottico mostravano una reazione citoplasmatica molto forte (Fig. 16B). Gli altri nuclei ipotalamici mostravano vari gradi di espressione di spexina. L'eminenza mediana non risultava immunoreattiva né nello stato interno né in quello esterno (Fig. 16C).

Nella adenoipofisi alcune cellule mostravano una moderata o forte immunocolorazione citoplasmatica mentre altre non erano immunoreattive. Nella neuroipofisi le fibre mostravano una debole o moderata immunocolorazione e alcuni pituiciti evidenziavano una positività nucleare. Nella pars intermedia alcune cellule mostravano una immunoreazione citoplasmatica, nucleare o nucleocitoplasmatica (Fig. 16D-E).

Nella tiroide l'epitelio parafollicolare mostrava una colorazione eterogenea. In alcuni follicoli le cellule epiteliali erano moderatamente positive a livello citoplasmatico, in altri, non erano colorate. Qualche volta le cellule della tiroide mostravano una immunocolorazione nucleare. Le cellule parafollicolari mostravano una moderata/forte immunoreattività citoplasmatica (Fig. 16F). Le cellule principali della paratiroide presentavano una moderata positività nucleocitoplasmatica.

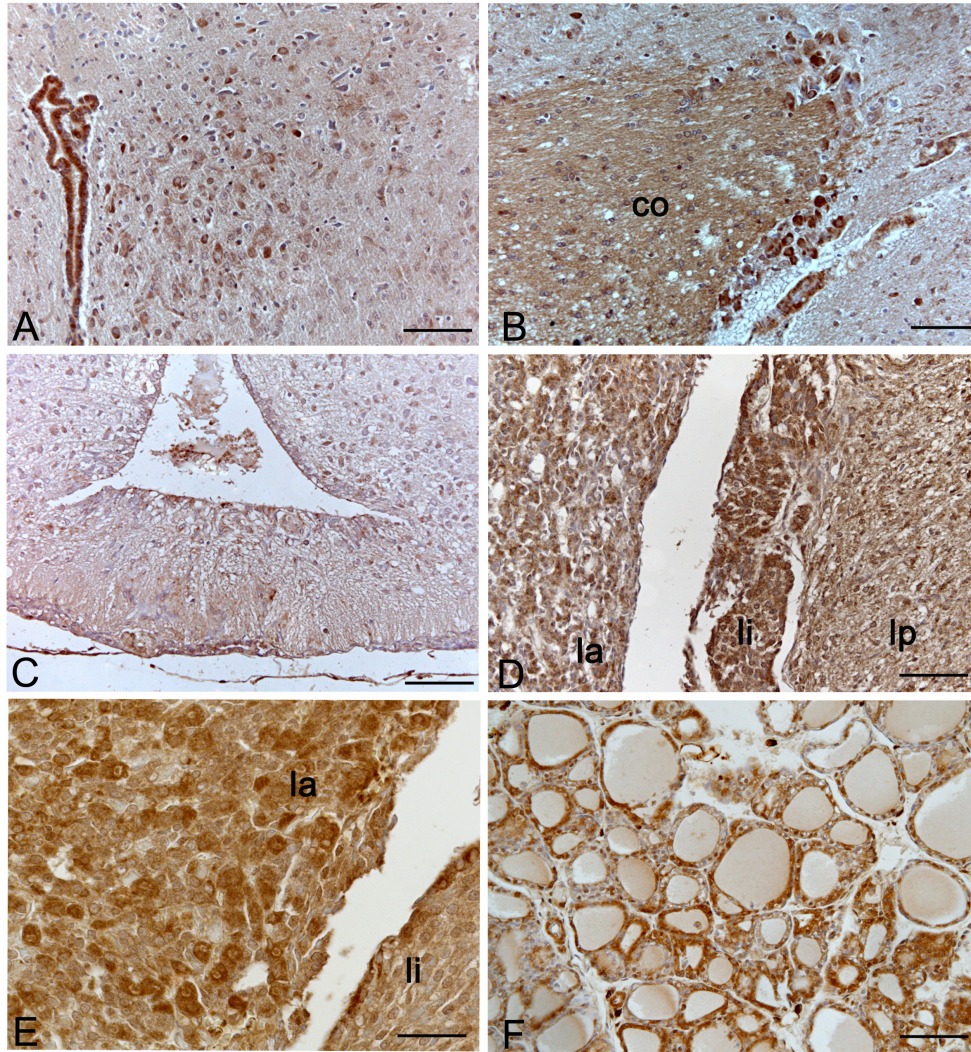


Figura 16: Immunoistochimica anti-spexina in tessuti endocrini di ratto. A: nucleo paraventricolare. B: nucleo sopraottico. (co: chiasma ottico). C: eminenza mediana. D-E: ipofisi. (la: lobo anteriore; li: lobo intermedio; lp: lobo posteriore). F: tiroide. Barre di scala: 75 μm (A; B; D); 37,5 μm (C; E; F).

Le cellule del surrene mostravano una moderata/forte immunoreattività citoplasmatica alla spexina e alcune cellule sparse mostravano anche una colorazione nucleare. Le cellule della midollare erano principalmente negative o presentavano una debole positività citoplasmatica. A livello della midollare, le cellule gangliari mostravano una forte reazione citoplasmatica (Fig. 17A-B).

Le cellule delle isole di Langerhans non mostravano immunoreazione positiva alla spexina (Fig. 17C).

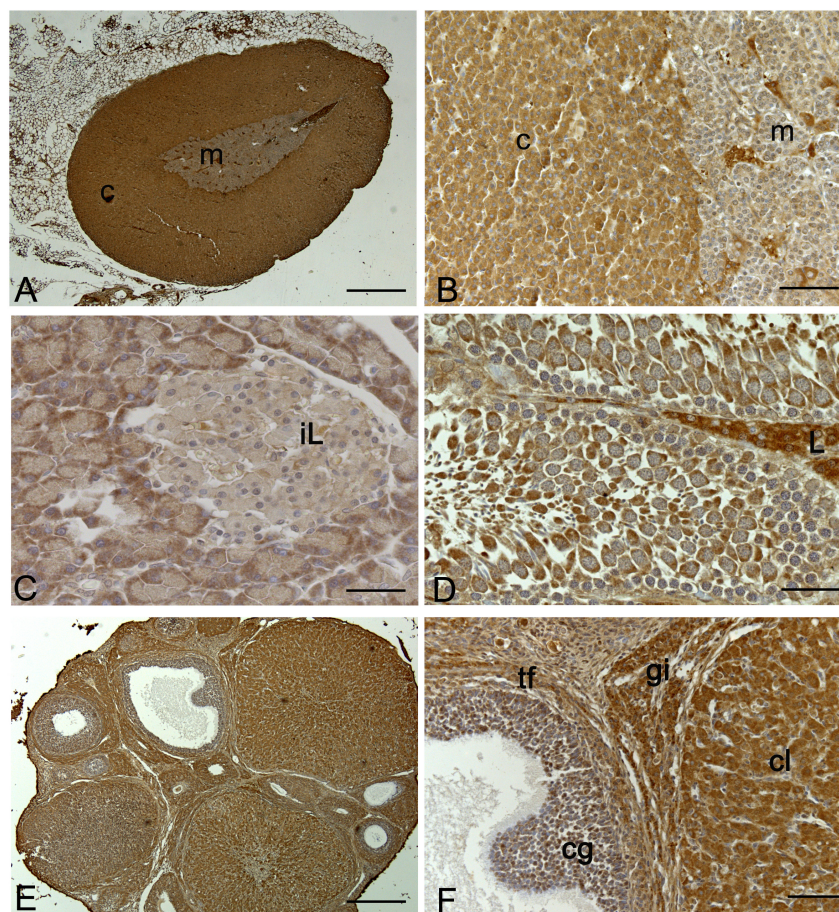


Figura 17: Immunoistochimica anti-spexina in tessuti endocrini di ratto. A-B: surrene. (m: midollare; c: corticale). C: pancreas. (iL: isole di Langerhans). D: testicolo. (L: cellule di Leydig). E-F: ovaio. (cg: cellule della granulosa; tc: teca del follicolo; gi: ghiandole interstiziali; cl: corpo luteo). Barre di scala: 600 μ m (A); 75 μ m (B); 37,5 μ m (C; D; F); 300 μ m (E).

Tab. 1: Espressione di spexina in tessuti normali di ratto. Intensità e percentuale cellulare di immunoreattività: -, assenza di immunoreattività; -/+, immunoreattività quasi assente; +, debole; ++, moderata; +++, forte.

Tessuto	Tipi cellulari	Positività nucleare	Positività citoplasmatica
Cute	Epidermide	-	+++
	Ghiandole sebacee	-	+++
Cuore	Cellule muscolari	-	+
Muscolo scheletrico	Cellule muscolari	-	+
Muscolo liscio	Cellule muscolari	-	+
Osso	Osteoblasti	-	+
	Osteoclasti	-	+
	Midollo	-	+/-
	Megacariociti	-	++
Apparato digerente			
Esofago	Epitelio	-	+++
Stomaco	Epitelio superficiale	-	++
	Base delle ghiandole	-	+++
Intestino tenue	Epitelio	-	+++
Colon	Epitelio	-	++
Fegato	Epatociti	-	++
Pancreas	Epitelio degli acini	-	++
	Epitelio duttale	-	-
	Cellule di Langerhans	-	-
Apparato respiratorio	Epitelio alveolare	-	+
	Epitelio bronchiale	-	++
Apparato urinario			
Rene	Corpuscolo renale	-	+/-
	Epitelio tubulare	-	++
Vescica	Epitelio	-	++
Apparato riproduttivo maschile			
Testicolo	Spermatogoni	-	-
	Spermatociti	-	-
	Cellule del Sertoli	-	+
	Cellule di Leydig	-	+++
Epididimo	Epitelio	-	++
Vescichette seminali	Epitelio	-	++
Prostata	Epitelio ghiandolare	-	+++
Apparato riproduttivo femminile			
Ovaio	Ovociti	-	-
	Epitelio follicolare	+/-	+
	Cellule della teca	-	++
	Cellule luteali	-	++

Tuba	Epitelio	-	++
Utero	Cellule endometriali	-	++
Vagina	Epitelio	-	+++

Ghiandole endocrine			
Ipofisi	Lobo anteriore	-	++
	Pars intermedia	+	++
	Lobo posteriore	+/-	+
Tiroide	Epitelio follicolare	-	++
	Epitelio parafollicolare	-	++
Paratiroide	Cellule principali	-	++
Surrene	Corteccia	-	++
	Midollare	-	+
	Cellule gangliari	-	+++
Isole di Langerhans	Cellule di Langerhans	-	-
Tessuto linfatico			
Timo	Cellule epiteliali	-	++
	Cellule linfatiche	-	-
Linfonodo	Follicoli	-	++
	Parafollicolare	-	+/-
	Midollare	-	-
Milza	Polpa rossa	-	++
	Polpa bianca	-	-
Sistema nervoso			
Corteccia cerebrale	Neuroni	-	++
	Glia	-	-
Cervelletto	Cellule di Purkinje	-	++
	Strato granulare e molecolare	+/-	+/-
	Glia	-	-
Tronco encefalico	Neuroni	-	++
	Glia	-	-
Plesso corioideo	Cellule ependimali	-	+++
Ganglio del trigemino	Neuroni	-	+++
Ganglio cervicale superiore	Neuroni	-	+++
Occhio			
Retina	Strato Segm. Est. Fotorecettori	-	-
	Strato Segm. Int. Fotorecettori	-	++
	Strato nucleare esterno	-	-
	Strato nucleare interno	+/-	++
	Strati plessiformi	-	-
	Strato gangliare	-	+++
Cornea	Epitelio	++	+++
	Stroma	-	+/-
Corpuscolo ciliare	Epitelio	+/-	++

IMMUNOISTOCHEMICA ANTI-AUGURINA

Cute

Le cellule dell'epidermide, i follicoli piliferi e le ghiandole sebacee non presentavano immunoreattività all'augurina (Fig. 18A).

Apparato respiratorio

L'epitelio della trachea, bronchiale e bronchiolare erano negativi (Fig.18B-C). Non è stata evidenziata alcuna reazione nella cartilagine della trachea né nella cartilagine bronchiale. Nel parenchima del polmone, la maggior parte dei pneumociti era negativa, anche se rare cellule della linea alveolare erano debolmente o moderatamente immunoreattive a livello citoplasmatico (Fig. 18D).

Muscoli

Le cellule muscolari scheletriche (Fig. 18E) e cardiache (Fig. 18F) hanno evidenziato una moderata immunoreazione. Le cellule muscolari lisce del tratto gastrointestinale, del sistema urinario e dei vasi erano negative o mostravano una debole positività citoplasmatica.

Ossso

Osteoblasti, osteociti e osteoclasti erano principalmente negativi, come anche le cellule del midollo osseo.

Cartilagine

Le cellule cartilaginee erano quasi sempre negative.

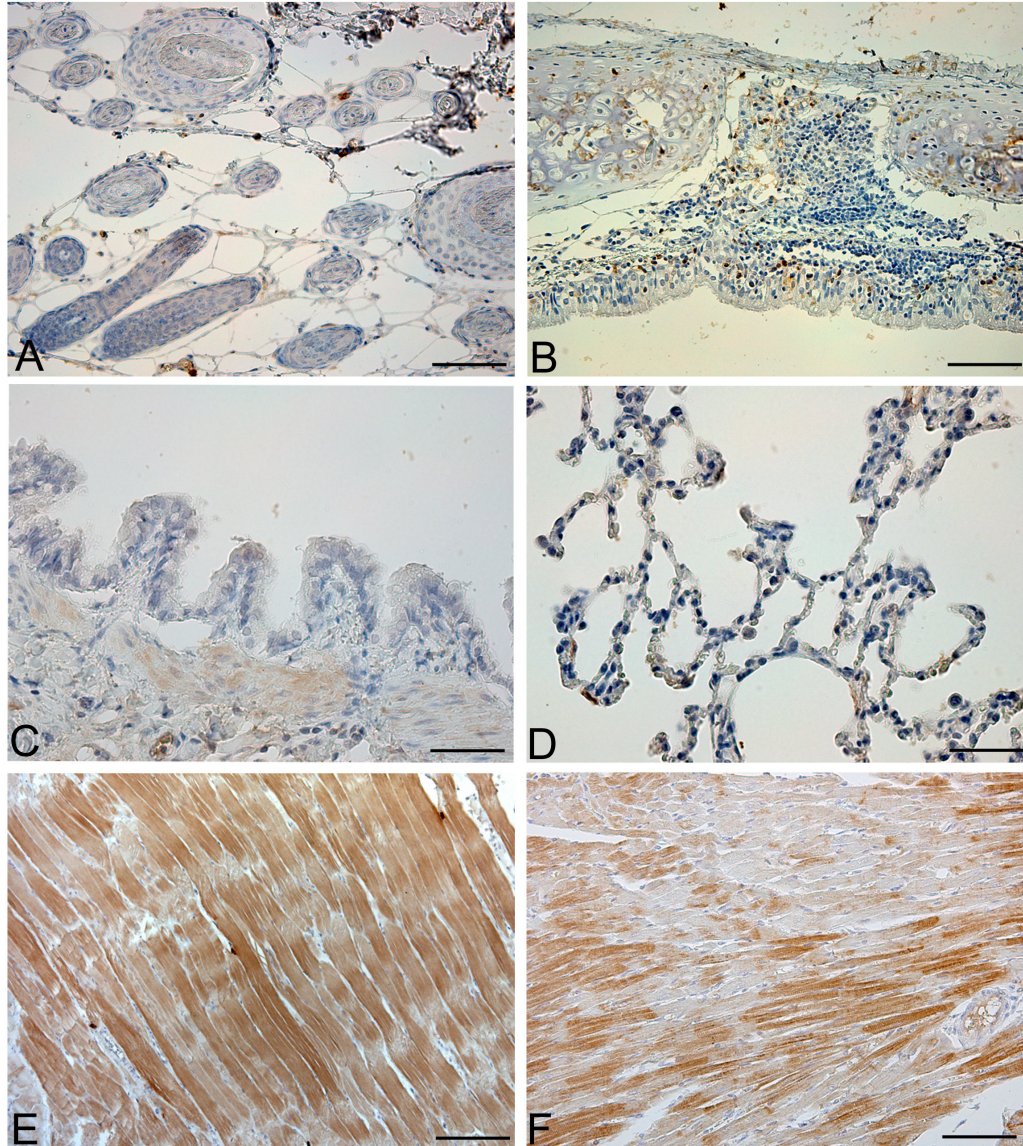


Figura 18: Immunoistochimica anti-augurina in tessuti di ratto. A: cute. B-C: trachea. D: polmone. E: muscolo scheletrico. F: cuore. Barre di scala: 150 μm (E); 75 μm (A; B; F); 37,5 μm (C; D).

Tessuto linfatico

Nel linfonodo (Fig. 19A-B), la maggior parte delle cellule corticali erano negative, mentre nella midollare le cellule mostravano una moderata/forte immunoreattività citoplasmatica. Le cellule epiteliali del timo erano negative sia nel compartimento corticale sia in quello midollare, i corpuscoli di Hassal erano anch'essi negativi. Le cellule linfatiche erano principalmente negative, ma un gruppo numeroso di cellule mostrava una positività moderata/forte a livello citoplasmatico, e spesso queste cellule erano localizzate nel compartimento corticale (Fig. 19C). Nella milza, le cellule della polpa bianca erano principalmente negative mentre nella polpa rossa alcune cellule mostravano una moderata o forte immunoreattività citoplasmatica (Fig. 19D). Gli aggregati linfocitari localizzati lungo il canale alimentare erano principalmente negativi, anche se alcune cellule mostravano una moderata positività citoplasmatica.

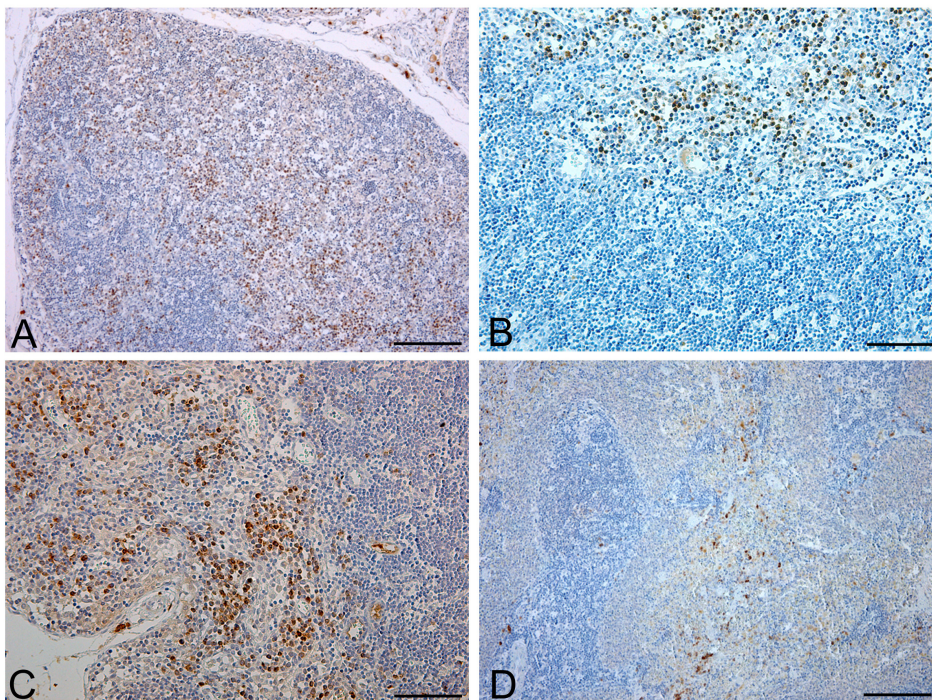


Figura 19: Immunoistochimica anti-augurina in tessuti linfatici di ratto. A-B: linfonodo. C: timo. D: milza. Barre di scala: 75 μm (A; C; D); 37,5 μm (B).

Apparato digerente

Nelle ghiandole salivari, l'epitelio duttale e degli acini era principalmente negativo. Anche i setti di tessuto connettivo erano negativi (Fig. 20A).

L'epitelio dell'esofago mostrava una moderata immunocolorazione citoplasmatica localizzata principalmente sullo strato superficiale (Fig. 20B). La lamina propria e lo strato sottomucoso erano negativi. Le cellule muscolari lisce della muscularis mucosae e lo strato muscolare mostravano una debole colorazione citoplasmatica.

Nello stomaco le cellule epiteliali erano principalmente negative anche se alcune cellule alla base delle ghiandole gastriche mostravano una moderata colorazione citoplasmatica (Fig. 20C). Nell'intestino tenue le cellule epiteliali erano negative ma a livello della lamina propria alcune cellule mostravano una forte reazione citoplasmatica (Fig. 20D).

Gli epatociti mostravano una moderata colorazione citoplasmatica senza immunoreazione nucleare. Il tessuto connettivo degli spazi portalì era negativo. Le cellule sinusoidali, le venule portalì, le venule epatiche terminali e le arteriole epatiche erano negative. I dotti biliari erano solitamente negativi (Fig. 20E).

Nel pancreas esocrino è stata trovata una debole reazione citoplasmatica nelle cellule degli acini secretori. I setti di tessuto connettivo erano negativi (Fig. 20F).

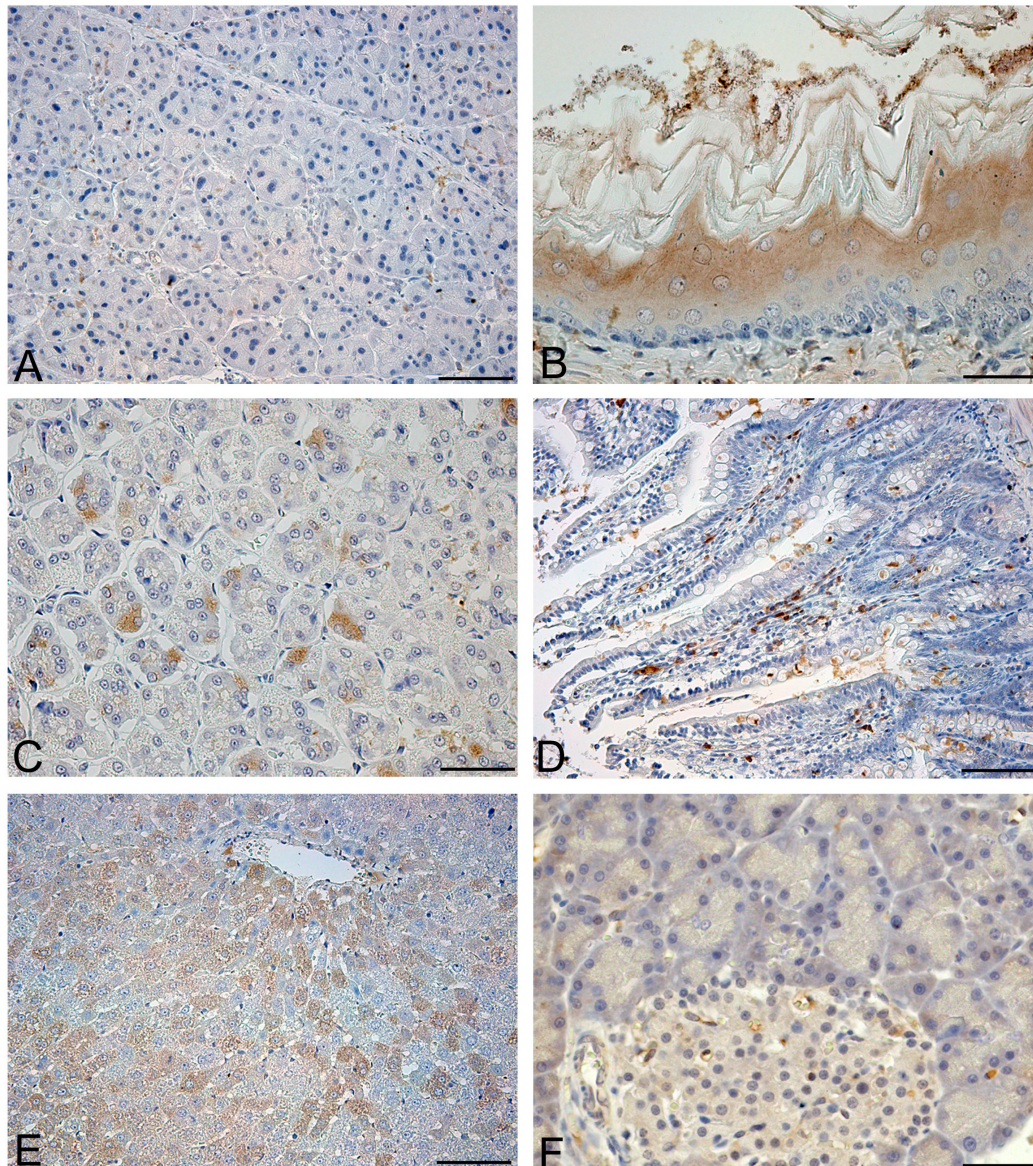


Figura 20. Immunoistochimica anti-augurina in tessuti dell'apparato digerente di ratto. A: ghiandola salivare. B: esofago. C: stomaco. D: intestino tenue. E: fegato. F: pancreas. Barre di scala: 75 μm (D; E); 37,5 μm (A-C; F).

Apparato urinario

I corpuscoli renali e l'epitelio tubulare erano solitamente negativi o debolmente positivi. Lo stroma fibroso circostante era negativo, anche se alcune rare cellule erano positive (Fig. 21A). L'epitelio dell'uretere e della vescica (Fig. 21B) era solitamente negativo anche se lo strato muscolare mostrava una positività debole o moderata.

Apparato riproduttivo femminile

Nell'ovaio (Fig. 21C-D) le cellule della granulosa presentavano una moderata immunocolorazione citoplasmatica. Le cellule della teca mostravano una debole colorazione citoplasmatica. Il corpo luteo mostrava talvolta una colorazione citoplasmatica molto forte principalmente nella zona centrale. Le cellule delle ghiandole interstiziali presentavano una debole colorazione citoplasmatica. Lo stroma era principalmente negativo.

Le cellule epiteliali della tuba (Fig. 21E) avevano una moderata o forte immunoreattività citoplasmatica mentre lo stroma era negativo e lo strato muscolare mostrava una debole colorazione citoplasmatica. L'epitelio dell'endometrio e della vagina presentavano una debole colorazione citoplasmatica. La lamina propria era negativa.

Apparato riproduttivo maschile

Non è stata evidenziata alcuna immunoreazione a livello di spermatogoni, spermatociti, spermatidi e cellule del Sertoli. Al contrario, le cellule di Leydig hanno mostrato una moderata/forte positività citoplasmatica (Fig. 21F). Gli epiteli dell'epididimo, della prostata (Fig. 21G) e delle vescichette seminali (Fig. 21H) erano principalmente negativi.

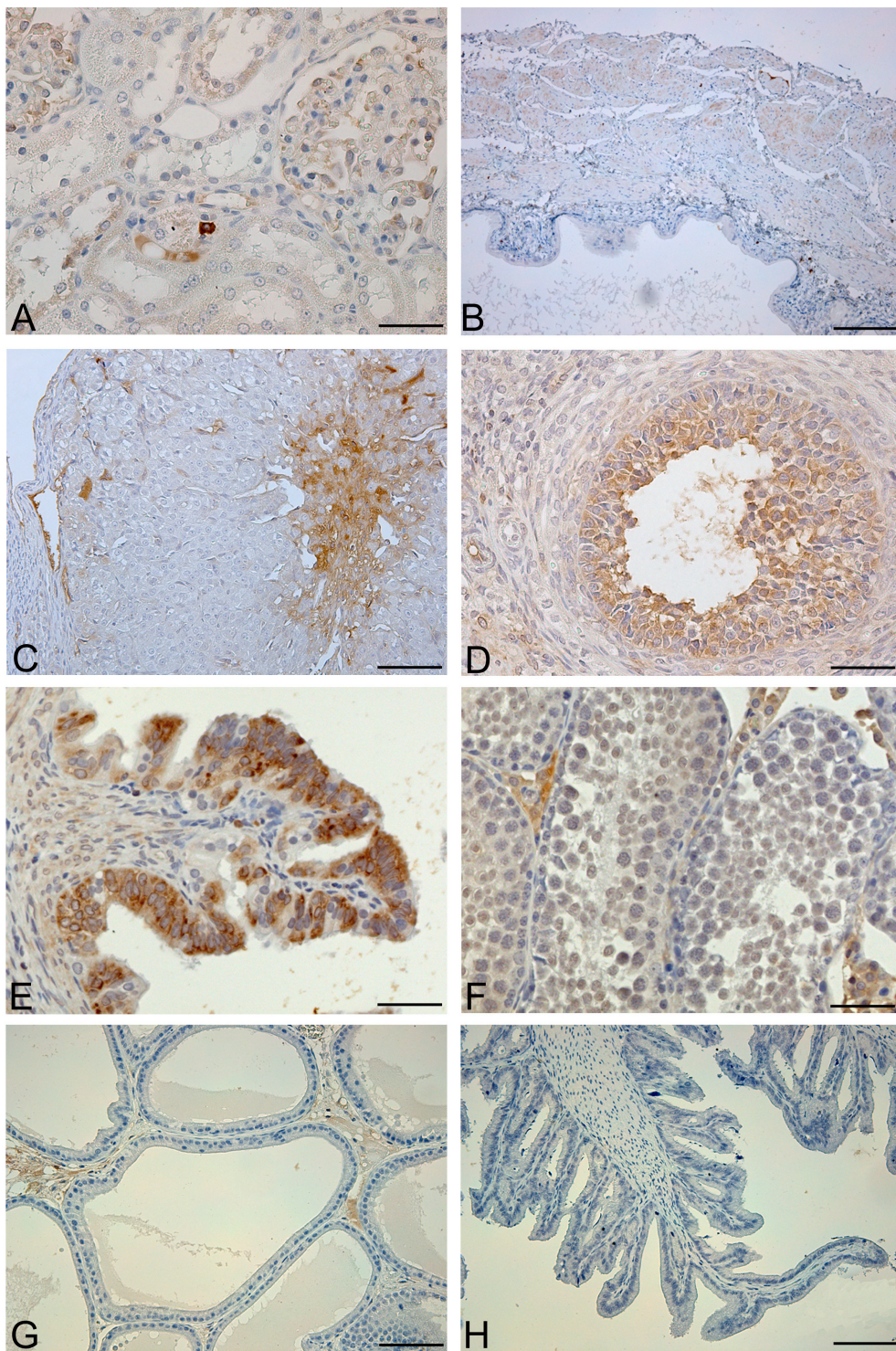


Figura 21: Immunoistochimica anti-augurina in tessuti del sistema genitourinario di ratto. A: rene. B: vescica. C: ovaio, corpo luteo. D: ovaio, follicolo ooforo. E: tuba uterina. F: testicolo. G: prostata H: vescicola seminale. Barre di scala: 150 μm (B); 75 μm (C; G; H); 37,5 μm (A; D; E; F).

Sistema nervoso ed occhio

Nel sistema nervoso centrale alcuni gruppi neuronali mostravano una moderata positività citoplasmatica mentre altri erano negativi. Al contrario le cellule della glia erano prevalentemente negative. Nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo (CA1, CA2, CA3, CA4, lamine dorsali e ventrali del giro dentato) i neuroni erano prevalentemente negativi o mostravano una debole immunoreattività citoplasmatica (Fig. 22A).

Nella corteccia cerebellare le cellule del Purkinje mostravano una moderata positività citoplasmatica. Negli strati granulare e molecolare la maggior parte delle cellule erano negative, anche se sono state trovate alcune cellule che mostravano una moderata reazione citoplasmatica (Fig. 22B). Nel tronco encefalico i diversi gruppi di neuroni hanno mostrato una diversa percentuale e una diversa intensità di positività, in particolare il complesso olivare ha mostrato la più alta percentuale di immunoreattività (Fig. 22C).

Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico, le cellule gangliari del trigemino (Fig. 22D) e del ganglio cervicale superiore hanno mostrato una reazione molto forte a livello citoplasmatico.

Le strutture di retina, cornea e corpo ciliare erano prevalentemente negative.

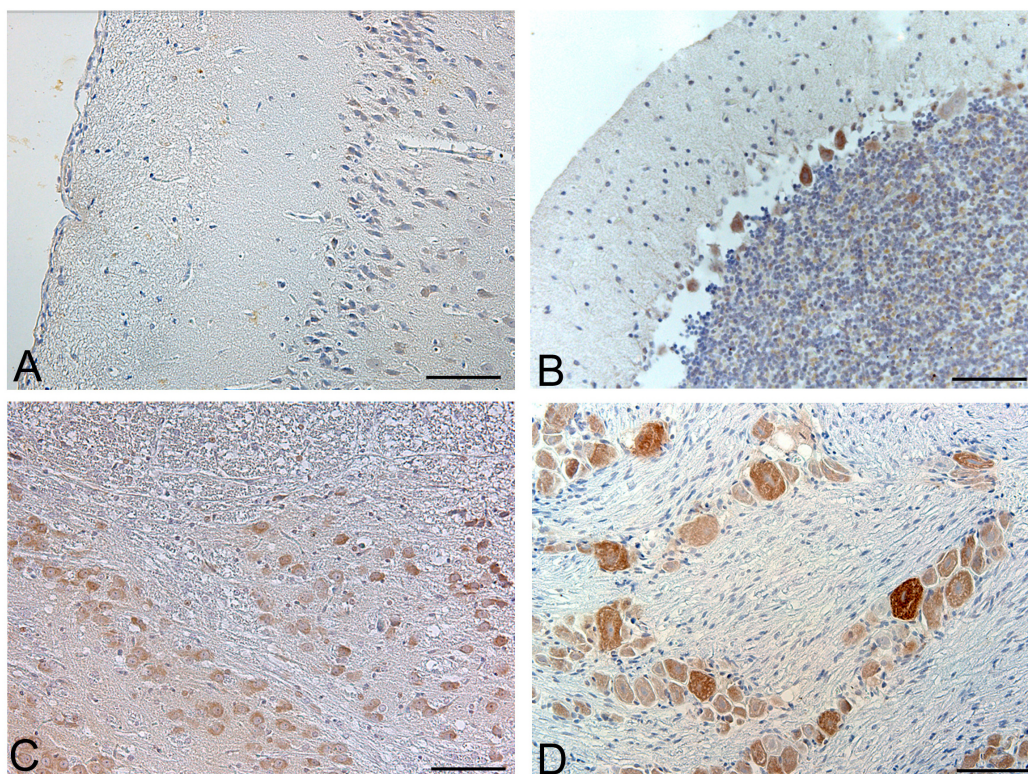


Figura 22: Immunoistochimica anti-augurina in strutture del sistema nervoso di ratto. A: corteccia cerebrale. B: corteccia cerebellare. C: tronco encefalico, nucleo olivare inferiore. D: ganglio del trigemino. Barre di scala: 75 μ m (A-D).

Ghiandole endocrine

Nell'ipotalamo i neuroni del nucleo supraottico hanno mostrato una moderata positività citoplasmatica (Fig. 23A), mentre gli altri nuclei ipotalamici erano principalmente negativi. L'eminenza mediana non ha evidenziato immunoreattività nei suoi strati interno ed esterno.

Nell'adenoipofisi alcune cellule hanno mostrato una debole positività citoplasmatica mentre altre non hanno evidenziato immunoreattività. Nella neuroipofisi le fibre e i pituiciti hanno mostrato una debole/moderata immunoreazione. Le cellule della pars intermedia hanno mostrato una debole immunoreazione citoplasmatica.

Nella tiroide le cellule dell'epitelio follicolare hanno evidenziato una colorazione eterogenea. In alcuni follicoli le cellule epiteliali mostravano una debole/moderata colorazione citoplasmatica, in altri le cellule follicolari erano negative. Le cellule parafollicolari hanno anch'esse mostrato una debole colorazione citoplasmatica (Fig. 23B). Le cellule principali della paratiroide hanno mostrato una debole immunoreazione citoplasmatica.

Le cellule della corteccia surrenalica hanno mostrato una moderata reazione citoplasmatica ad augurina nella ZG, mentre la ZF/R era prevalentemente negativa. La midollare e le cellule gangliari hanno presentato una moderata positività citoplasmatica (Fig. 23C-D).

Le cellule delle isole di Langerhans non hanno evidenziato reattività per augurina (Fig. 20F).

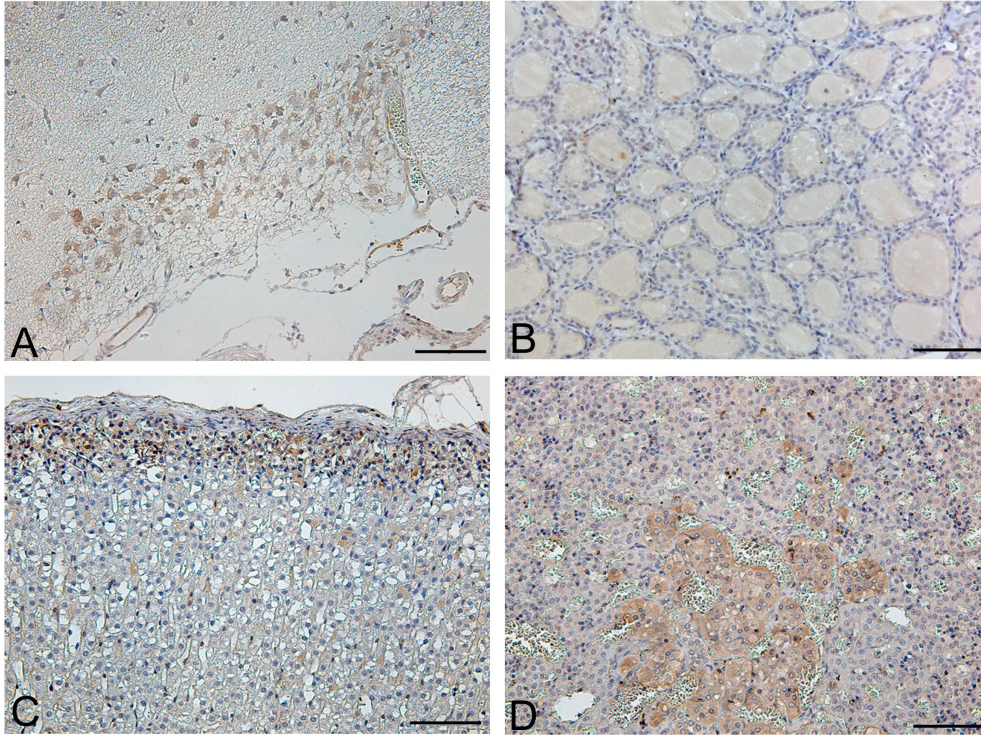


Figura 23: Immunoistochimica anti-augurina in tessuti endocrini di ratto. A: nucleo sopraottico. B: tiroide. C: surrene, corticale. D: surrene, midollare. Barre di scala: 75 μ m (A-D).

Tab. 2: Espressione di augurina in tessuti normali di ratto. Intensità e percentuale cellulare di positività: -, assenza di immunoreattività; +/-, immunoreattività quasi assente; +, debole; ++, moderata; +++, forte.

Tessuto	Tipi cellulari	Positività nucleare	Positività citoplasmatica
Cute	Epidermide	-	-
	Ghiandole sebacee	-	-
Cuore	Cellule muscolari	-	++
Muscolo scheletrico	Cellule muscolari	-	++
Muscolo liscio	Cellule muscolari	-	+/-
Osso	Osteoblasti	-	-
	Osteoclasti	-	-
	Midollo	-	-
	Megacariociti	-	-
Apparato digerente			
Esofago	Epitelio	-	++
Stomaco	Epitelio superficiale	-	-
	Base delle ghiandole	-	+
Intestino tenue	Epitelio	-	-
Colon	Epitelio	-	-
Fegato	Epatociti	-	++
Pancreas	Epitelio degli acini	-	+
	Epitelio duttale	-	-
	Cellule di Langerhans	-	-
Apparato respiratorio	Epitelio alveolare	-	-
	Epitelio bronchiale	-	-
Apparato urinario			
Rene	Corpuscolo renale	-	-
	Epitelio tubulare	-	-
Vescica	Epitelio	-	-
Apparato riproduttivo maschile			
Testicolo	Spermatogoni	-	-
	Spermatociti	-	-
	Cellule del Sertoli	-	-
	Cellule di Leydig	-	++
Epididimo	Epitelio	-	-
Vescichette seminali	Epitelio	-	-
Prostata	Epitelio ghiandolare	-	-
Apparato riproduttivo femminile			
Ovaio	Ovociti	-	-
	Epitelio follicolare	-	++
	Cellule della teca	-	+/-
	Cellule luteali	-	++
Tuba	Epitelio	-	++
Utero	Cellule		

	endometriali	-	+
Vagina	Epitelio	-	+
Ghiandole endocrine			
Ipofisi	Lobo anteriore	-	+
	Pars intermedia	-	+
	Lobo posteriore	-	+
Tiroide	Epitelio follicolare	-	+
	Epitelio parafollicolare	-	+
Paratiroide	Cellule principali	-	+
Surrene	ZG	-	++
	ZF/R	-	-
	Midollare	-	++
	Cellule gangliari	-	++
Isole di Langerhans	Cellule di Langerhans	-	-
Tessuto linfatico			
Timo	Cellule epiteliali	-	-
	Cellule linfatiche	-	++
Linfonodo	Follicoli	-	-
	Parafollicolare	-	-
	Midollare	-	++
Milza	Polpa rossa	-	++
	Polpa bianca	-	-
Sistema nervoso			
Corteccia cerebrale	Neuroni	-	+/-
	Glia	-	-
Cervelletto	Cellule di Purkinje	-	++
	Strato granulare e molecolare	-	+/-
	Glia	-	-
Tronco encefalico	Neuroni	-	++
	Glia	-	-
Plesso corioideo	Cellule ependimali	-	++
Ganglio del trigemino	Neuroni	-	++
Ganglio cervicale superiore	Neuroni	-	++
Occhio			
Retina		-	-
Cornea	Epitelio	-	-
	Stroma	-	-

**CELLULE CORTICOSURRENALI ISOLATE E COLTURE PRIMARIE DI CELLULE
CORTICOSURRENALI**

Per verificare i possibili effetti della spexina sulla corticosteroidogenesi sono state incubate cellule fresche isolate da ZG e da ZF/R di ratti adulti in presenza di spexina. Come dimostrato in Fig. 24 la spexina a concentrazioni pari a 10^{-6} M stimolava la secrezione basale di aldosterone da parte delle cellule della ZG mentre le rimanenti concentrazioni testate (10^{-10} M e 10^{-8} M) non avevano effetto. A tutte le concentrazioni testate la spexina non ha modificato la secrezione basale di corticosterone da parte di cellule fresche isolate di ZF/R. Sia le cellule della ZG che quelle della ZF/R hanno risposto all'ACTH (10^{-7} M) con un visibile aumento nella secrezione di aldosterone e di corticosterone. In colture cellulari primarie di cellule corticosurrenali una prolungata esposizione a spexina (10^{-6} M) provocava un leggero aumento nella secrezione degli ormoni steroidei (Fig. 25). La spexina non ha avuto effetti sulla secrezione di corticosterone stimolata da ACTH. In colture primarie di cellule corticosurrenali di ratto, concentrazioni di spexina pari a 10^{-8} e 10^{-6} inibivano notevolmente l'incorporazione di BrdU nelle cellule studiate, in analogia a quanto evidenziato con esposizione ad ACTH. Gli effetti dell'ACTH sulla proliferazione delle cellule corticosurrenali rimanevano invariati in presenza di spexina (10^{-6} M).

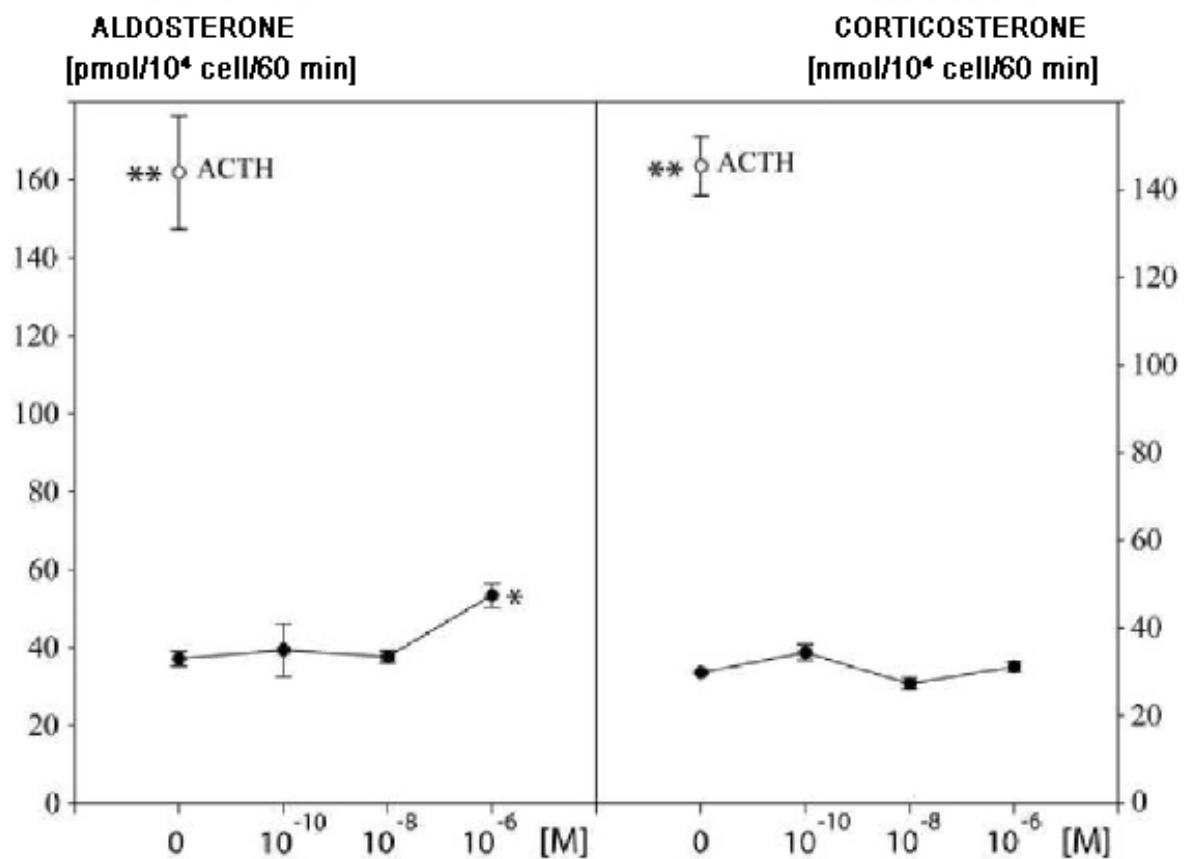


Figura 24: Effetti della spexina (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M) sulla secrezione basale di aldosterone [$\text{pmol}/10^4 \text{ cell}/60 \text{ min}$] e di corticosterone [$\text{nmol}/10^4 \text{ cell}/60 \text{ min}$] da cellule isolate dalla zona glomerulare e dalla zona fascicolata/reticolare, rispettivamente, del surrene di ratto. Come controllo positivo è stato utilizzato l'ACTH [1×10^{-7} M]. I risultati sono espressi come media \pm SE. Per ogni gruppo $n = 6$. La comparazione statistica delle differenze è stata fatta mediante test t di Student – in comparazione con i dati ottenuti dal gruppo di controllo: * - $p < 0.01$; ** - $p < 0.001$.

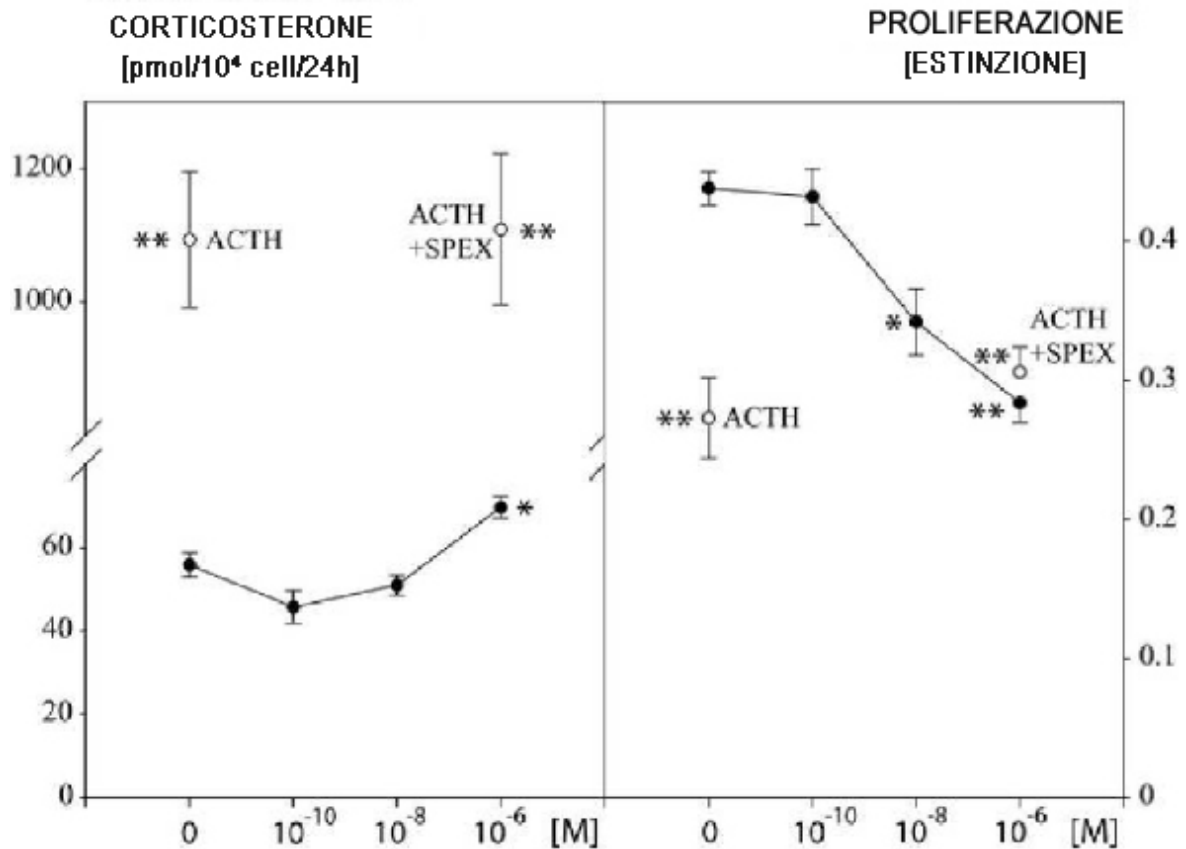


Figura 25: Effetti della spexina (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M) sulla secrezione del corticosterone [pmol/10⁴ cell/24h] in colture primarie di cellule corticosurrenali di ratto e loro attività proliferativa (assorbimento). Le cellule sono state esposte per 24 ore a spexina. Come controllo positivo è stato utilizzato l'ACTH (1×10^{-7} M). I risultati sono espressi in media \pm SE. Per ogni gruppo n = 6. La comparazione statistica delle differenze è stata fatta mediante test t di Student – in comparazione con i dati ottenuti dal gruppo di controllo: * - p < 0.01; ** - p < 0.001.

MODIFICAZIONE DEL VOLUME E DELL' APOPTOSI NEL GLOMO CAROTIDEO DOPO ESPOSIZIONE A IPEROSSIA POSTNATALE

L'esposizione ad iperossia durante le prime due settimane di vita postnatale ha causato una riduzione del volume del globo carotideo che era ancora evidente dopo quattro settimane di ripresa in condizioni di normossia. D'altro canto, l'analisi dell'apoptosi attraverso il metodo TUNEL non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nell'indice apoptotico delle cellule di tipo I e di tipo II tra i gruppi normossici e iperossici.

ESPRESSIONE DI SPEXINA ED AUGURINA IN CONDIZIONI IPEROSSICHE

L'espressione di spexina ed augurina è stata inoltre analizzata nel globo carotideo mediante immunostochimica e Real Time-PCR. Innanzitutto, l'amplificazione dell'mRNA di tirosina idrossilasi ha confermato la corrispondenza tra l'RNA testato e l'RNA del globo carotideo. Il metodo classico di Real Time-PCR ha dimostrato la presenza sia di spexina che di augurina nel globo carotideo di ratto. L'espressione di spexina nei glomi esposti ad iperossia è stata di circa 6-7 volte maggiore (ratti esposti al 60% di iperossia per 2 settimane dopo la nascita e poi mantenuti per le altre 4 settimane al 21% O₂) rispetto ai ratti mantenuti a condizioni normali di ossigeno per le sei settimane di vita postnatale (Fig. 26). Al contrario, la Real Time-PCR non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione di augurina tra ratti normossici e ratti esposti a iperossia.

L'analisi immunostochimica ha confermato l'espressione di spexina nelle cellule di tipo I sia nell'uomo che nel ratto. La colorazione citoplasmatica per spexina (Fig. 27) era diffusa in tutte le cellule glomiche di tipo I. Le cellule positive sono state trovate sia al centro che alla periferia dei lobuli. Nelle cellule di tipo II non è stata evidenziata immunoreazione. Non erano chiaramente visibili terminazioni nervose positive a spexina. Al contrario, la

reazione di augurina era molto debole, probabilmente dovuta alla bassa sensibilità del metodo rispetto alla Real Time-PCR.

A differenza del glomo carotideo, il surrene non ha mostrato differenze statisticamente significative nell'espressione di spexina ed augurina tra surreni normossici e iperossici sia mediante Real Time-PCR che immunohistochimica.

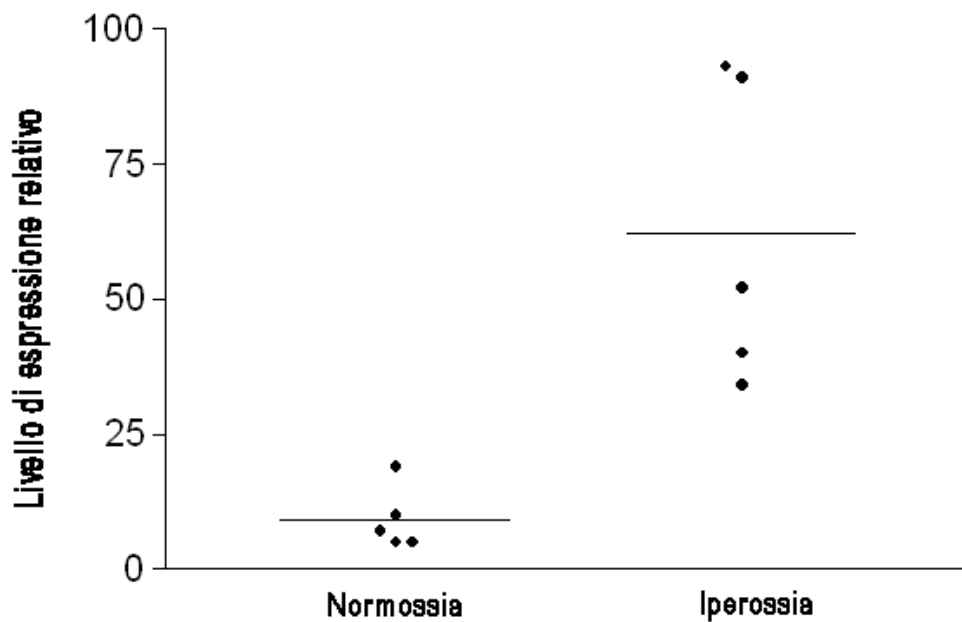


Figura 26: Analisi mediante PCR quantitativa dell'espressione del gene di spexina nel glomo carotideo di ratto esposto a normossia per le prime sei settimane di vita postnatale (Normossia) o iperossia per le prime due settimane postnatali e successivamente esposti a normossia per le seguenti quattro settimane (Iperossia). L'espressione del gene PBGD è stata utilizzata per normalizzare i dati. E' evidenziato il valore medio per ogni gruppo.

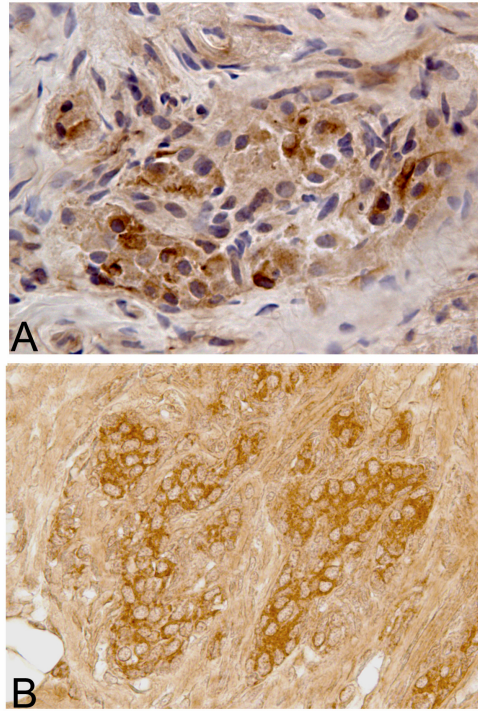


Figura 27: Reazione immunoistochimica anti-spexina in glomo carotideo umano (A) e di ratto (B).

DISCUSSIONE

ESPRESSIONE DI SPEXINA IN TESSUTI NORMALI DI RATTO

Questo studio è il primo in letteratura che valuta la presenza dell'mRNA e delle proteine spexina ed augurina in un ampio range di tessuti normali di ratto. Per quanto riguarda la distribuzione di spexina questa è stata identificata in vari tessuti e tipi cellulari, anche se non in tutti. E' stata rilevata una certa eterogeneità nella positività dei vari tessuti sia tra tipi cellulari che all'interno dello stesso tipo cellulare. Nel rene, per esempio, i tubuli corticali hanno mostrato una forte positività, mentre le cellule del corpuscolo renale non hanno evidenziato immunoreattività (eterogeneità tra cellule). Tuttavia, nella corteccia renale sono stati trovati anche alcuni tubuli negativi (eterogeneità all'interno di uno stesso tipo cellulare). Tali dati suggeriscono un coinvolgimento funzionale di spexina in specifici tipi cellulari ed in cellule in stati funzionali specifici.

L'analisi attraverso Real Time-PCR ha riportato l'espressione di spexina in tutte le ghiandole endocrine, con la tiroide, l'ovaio e l'ipotalamo che mostravano il più alto livello di espressione. Non è stata trovata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di spexina tra i diversi compartimenti surrenalici. L'analisi immunostochimica ha evidenziato l'espressione di spexina nelle cellule dell'adenipofisi e della pars intermedia, nelle cellule epiteliali della tiroide, nelle cellule principali della paratiroide, nelle cellule della corteccia surrenalica, nelle cellule di Leydig e nelle cellule della teca e del corpo luteo dell'ovaio. Le cellule delle isole di Langerhans, invece, non presentavano immunoreazione e nella midollare del surrene la positività anti-spexina era limitata alle cellule gangliari. L'assenza di differenze statisticamente significative tra corticale e midollare del surrene, mediante Real Time-PCR, può essere spiegata con l'elevato grado di espressione nelle cellule gangliari (che mostrano una elevata intensità di colorazione) oppure in riferimento a meccanismi di regolazione post-trascrizionali della

sintesi della proteina spexina nella midollare del surrene. L'espressione di spexina in diversi tipi di cellule endocrine suggerisce un ruolo nella modulazione di differenti funzioni endocrine, in analogia a quanto già evidenziato in letteratura per altri neuropeptidi.

La Real Time-PCR ha identificato l'espressione di spexina anche nell'encefalo di ratto e l'analisi immunostochimica ha confermato la presenza di spexina in molte popolazioni neuronali sia del sistema nervoso centrale che periferico. In letteratura, l'espressione di spexina è stata identificata nell'encefalo di ratto attraverso Real time-PCR e Northern blot (Somnez et al., 2009). Studi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato inoltre una diversa espressione di spexina in diversi centri nervosi. Per esempio, l'mRNA di spexina è stato trovato essere distribuito a livello del nucleo di Barrington, a livello dell'estensione caudale del tegmento mesopontino. In accordo con precedenti studi, abbiamo evidenziato una differente espressione di spexina in diversi nuclei nervosi. La diffusa distribuzione di spexina nei tessuti nervosi, insieme alla sua capacità di essere secreta (Mirabeau et al., 2007), suggerisce un ruolo di questo peptide nella neuromodulazione. È stato ampiamente riportato in letteratura come alcuni peptidi giochino un ruolo sia nella modulazione di funzioni endocrine sia in processi di neuromodulazione. Nel presente studio alcuni nuclei hanno mostrato una elevata percentuale di positività e una forte immunoreazione mentre altri risultavano negativi. Una mappatura specifica delle diverse strutture del sistema nervoso sarà necessaria per valutare meglio in quali strutture nervose la spexina svolga un ruolo più importante. Anche nella corteccia cerebrale e cerebellare sono stati trovati neuroni positivi disposti in specifiche strutture anatomiche. Per esempio, nella corteccia cerebrale è stato visto che gli strati più superficiali e profondi mostravano una elevata percentuale di neuroni positivi, mentre quelli intermedi risultavano prevalentemente negativi. Anche nella corteccia cerebellare, i neuroni di Purkinje, a differenza degli altri citotipi neuronali, mostravano una forte immunoreazione. Un suggestivo pattern di

espressione di spexina è stato identificato anche a livello della retina: lo strato dei fotorecettori mostrava una moderata colorazione nello strato intermedio mentre quelli più esterni erano negativi; lo strato nucleare interno e le cellule gangliari hanno evidenziato una moderata/forte immunoreattività, mentre gli altri strati nucleari erano negativi. La presente analisi immunohistochimica ha permesso inoltre di identificare l'espressione di spexina in una serie di strutture del sistema nervoso periferico. In particolare, i neuroni dei gangli degli strati sottomucoso e muscolare, nel canale alimentare, e del ganglio cervicale superiore e del trigemino hanno mostrato una intensa immunoreattività. La positività dei neuroni dei gangli sottomucosi hanno confermato l'ipotesi di Mirabeau et al. (2007) che l'identificazione dell'mRNA di spexina nello strato sottomucoso dell'esofago di topo e nello stomaco tramite ibridazione *in situ* potrebbe essere ascritta alla locale presenza del plesso.

Spexina è stata vista essere altamente espressa in differenti tipologie di epitelio mentre non è quasi mai stata rilevata la sua espressione a livello del tessuto connettivo. L'espressione di spexina negli epiteli, caratterizzati da un alto indice di proliferazione, suggerisce un possibile ruolo di spexina nella modulazione della proliferazione, differenziazione e morte cellulare, anche se sarebbero necessarie analisi specifiche in modelli sperimentali *in vitro*.

ESPRESSIONE DI AUGURINA NEI TESSUTI NORMALI DI RATTO

Anche augurina è stata identificata in differenti tessuti ma la sua espressione non era così diffusa come quella di spexina. Per quanto riguarda i tessuti endocrini, in letteratura, augurina è stata identificata, attraverso esperimenti di ibridazione *in situ*, a livello del lobo intermedio dell'ipofisi di topo e nello strato glomerulare del surrene. In questo lavoro, l'analisi attraverso Real Time-PCR ha evidenziato l'espressione di spexina in tutte le

ghiandole endocrine. Questo lavoro è il primo che utilizza l'immunoistochimica per analizzare il pattern di distribuzione di augurina nei tessuti endocrini.

L'analisi immunoistochimica ha evidenziato l'espressione di augurina a livello del nucleo supraottico dell'ipotalamo, della ZG e della midollare del surrene, delle cellule di Leydig, delle cellule follicolari e luteiniche dell'ovaio. Nell'ipofisi, nella tiroide e nella ghiandola paratiroidea l'immunocolorazione per augurina era meno intensa e le isole di Langerhans erano pressochè negative. L'intensità immunoistochimica per augurina non era perfettamente correlabile con i risultati quantitativi in Real Time-PCR. Per esempio, la tiroide ha mostrato il più alto livello di espressione di augurina attraverso Real Time-PCR mentre l'immunoistochimica ha evidenziato nella tiroide livelli di immunoreattività minori rispetto ad altri tessuti endocrini. Questa discrepanza potrebbe essere spiegata in rapporto a meccanismi di regolazione post-trascrizionali dell'espressione di augurina. Come per spexina, la presenza di augurina in molte cellule endocrine suggerisce fortemente un ruolo modulatore delle funzioni endocrine. Ad esempio la specifica localizzazione di augurina nella ZG e nella midollare del surrene suggerisce un coinvolgimento di questo peptide nella modulazione della produzione dei mineralcorticoidi e delle catecolamine.

In letteratura, l'espressione di augurina è stata identificata anche a livello dell'encefalo (Bi et al., 2001) e studi di ibridazione *in situ* hanno localizzato l'mRNA di spexina anche nel plesso corioideo (Mirabeau et al., 2007). Oltre alla conferma dell'espressione di augurina nell'encefalo attraverso Real Time-PCR, la presente analisi immunoistochimica ha identificato l'espressione di augurina nei neuroni di diverse strutture del sistema nervoso centrale e periferico. Nel sistema nervoso centrale, alcuni nuclei hanno mostrato un'alta percentuale di positività e una forte colorazione mentre altri erano negativi. Come per spexina, sarebbe necessaria una specifica mappatura delle diverse strutture del sistema nervoso per valutare meglio in quali strutture l'espressione di augurina sia più elevata.

Tuttavia, la nostra prima analisi ha evidenziato una più alta espressione di spexina in alcuni gruppi neuronali del tronco encefalico, del cervelletto e dei gangli periferici mentre la percentuale di positività minore è stata trovata nella corteccia cerebrale. Per quanto riguarda i nuclei del tronco encefalico il complesso olivare inferiore è stata una delle strutture che ha mostrato la più intensa colorazione. Nella corteccia cerebellare le cellule del Purkinje hanno mostrato una moderata colorazione citoplasmatica mentre nello strato granulare ed in quello molecolare la maggior parte delle cellule era negativa. Nel complesso, le strutture che hanno mostrato la più alta percentuale di positività e intensità di colorazione sono state il ganglio del trigemino ed il ganglio cervicale superiore. Come per spexina, la frequente positività neuronale per augurina ne suggerisce un possibile ruolo come neuromodulatore. Augurina può quindi essere aggiunta alla lunga lista di neuropeptidi, come probabilmente anche spexina, che giocano un duplice ruolo nella modulazione delle funzioni endocrine e nervose.

Per quanto riguarda gli altri tessuti e cellule non endocrini e non nervosi, abbiamo trovato espressione di augurina, seppur moderata, anche nelle cellule muscolari del cuore e non solo nel nodo atrioventricolare, come riportato da Mirabeau et al. (2007), forse in relazione ad una maggiore sensibilità dell'analisi immunohistochimica. Oltre alle cellule muscolari del cuore, augurina è stata identificata nelle cellule del muscolo scheletrico e, in misura minore, nelle cellule muscolari lisce. La colorazione immunohistochimica per augurina nell'epitelio dell'esofago è in accordo con i dati di letteratura circa il suo ruolo nella tumorigenesi dell'esofago, essendo l'espressione di augurina down-regolata nel carcinoma a cellule squamose dell'esofago e nelle linee cellulari di cancro dell'esofago (Yue et al., 2003; Mori et al., 2007). Nell'apparato digerente, la positività per augurina è stata osservata nelle cellule alla base delle ghiandole gastriche, negli epatociti e nelle cellule del pancreas esocrino. Sulla base del ruolo svolto dall'augurina nella tumorigenesi dell'esofago

e sulla base della possibile funzione di questo peptide sullo sviluppo postnatale e sulla rigenerazione di alcuni tessuti (per esempio, il surrene) possiamo ipotizzare un ruolo regolatore di augurina nei meccanismi di proliferazione e di morte cellulare. I possibili effetti trofici di augurina nell'esofago, nello stomaco, nel fegato e nelle linee cellulari di pancreas dovrà essere valutato in futuro. Vanno inoltre considerati i possibili cambiamenti nell'espressione di augurina nelle corrispondenti neoplasie.

Nel presente studio è stato altresì evidenziato che l'augurina è fortemente espressa nel citoplasma di gruppi di cellule localizzate nei tessuti linfatici. Tali cellule sono localizzate principalmente nel compartimento midollare del linfonodo, nel compartimento corticale del timo e nella polpa rossa della milza. Rare cellule positive si possono trovare anche ai margini del tessuto linfatico del sistema respiratorio e digerente. Al contrario, non sono presenti nel midollo osseo. Ulteriori analisi con markers di cellule linfatiche saranno necessari per meglio identificare le cellule positive. Anche per le cellule linfatiche può essere proposto un ipotetico ruolo di augurina nella regolazione della proliferazione e della morte cellulare.

SPEXINA E AUGURINA NELLO SVILUPPO POSTNATALE DEL SURRENE

L'analisi dell'espressione di spexina ed augurina nello sviluppo postnatale del surrene ha mostrato significativi cambiamenti nel livello di espressione di questi peptidi. L'espressione di spexina era più alta nei surreni di ratti adulti rispetto a quelli di ratti di 2-, 28- e 45-giorni. Tale correlazione con lo sviluppo suggerisce un ruolo svolto da questo peptide nei processi di differenziazione delle ghiandole endocrine. Al contrario, l'espressione di augurina a 2 giorni di vita era significativamente più alta rispetto alle altre età, suggerendo così un possibile ruolo di augurina nella regolazione delle prime fasi dello sviluppo del surrene. Di fatto è stato rilevato in letteratura come l'espressione di alcuni

fattori trofici vari in relazione alla fase di sviluppo. Per esempio, nella ZF di ratto sono visibili un alto numero di cellule immunoreattive per bFGF nella prima settimana di vita postnatale, mentre diminuiscono durante la seconda e la terza settimana; nella midollare le cellule cromaffini positive per bFGF diventano rilevabili a P8 e aumentano di numero durante la seconda e la terza settimana (Grothe and Unsicker, 1990). Le variazioni di espressione di spexina ed augurina possono essere correlate a modificazioni dei contenuti di enzimi e neuropeptidi delle cellule del surrene. La corteccia surrenalica di ratto subisce molti cambiamenti cellulari, biochimici ed enzimatici durante lo sviluppo postnatale (Van Dorp and Deane, 1950; Kolena et al., 1968; Magalhaes et al., 1981; Grothe and Unsicker, 1990; Dupont et al., 1991; Pignatelli et al., 1995). L'enzima 3 beta-idrossi-5-ene-steroidodeidrogenasi/5-ene-4-ene isomerasi (3 beta-HSD) è stato scoperto essere espresso nella ZG a un livello inferiore alle altre zone fino a P25 mentre dopo questo periodo esso mostra una immunocolorazione della stessa intensità delle altre zone corticali (Dupont et al., 1991). Modifiche postnatali sono state descritte anche nelle fibre nervose della midollare del surrene, nelle cellule cromaffini ed in quelle gangliari. L'innervazione funzionale splancnica della midollare del surrene nel ratto diventa matura nel periodo postnatale. Le fibre immunoreattive all'acetilcolinesterasi (AChE), alla colina acetiltransferasi ed all'encefalina (ENK), presumibilmente di natura pregangliare, aumentano di numero e di intensità durante il periodo postnatale. In contrasto, le fibre immunoreattive al peptide correlato al gene della calcitonina ed alla galanina sono già quasi completamente sviluppate al secondo giorno. L'innervazione sensitiva del surrene sembra pertanto precedere lo sviluppo dell'innervazione autonoma. Inoltre è stato ipotizzato che le fibre immunoreattive per AChE e ENK esercitino un effetto inibitorio sull'espressione di ENK, CGRP e neurotensina nelle cellule cromaffini, dal momento che il livello di questi peptidi era alto nel primo periodo postnatale e poi diminuiva (Holgert et

al., 1994). Così è stato suggerito che le fibre pregangliari, ma non gli assoni sensitivi, dei nervi splancnici siano coinvolti nel controllo dello sviluppo dell'espressione di alcuni, ma non di tutti, i peptidi delle cellule cromaffini e che questi cambiamenti si possano riflettere nella maturazione della trasmissione funzionale (Holgert et al., 1994, 1996b). E' stato evidenziato che i grandi neuroni gangliari positivi per il neuropeptide Y mostrano un aumento dell'immunoreattività per AChE, neurofilamento 10 e tirosina idrossilasi nel periodo postnatale, assieme ad aumentati livelli dell'mRNA del neuropeptide Y, del recettore a bassa affinità per le neurotrofine, e del recettore tropomiosina chinasi. I più piccoli neuroni gangliari positivi al polipeptide vasoattivo intestinale (VIP) (neuroni gangliari di tipo II) esprimono livelli crescenti dell'mRNA del VIP durante lo sviluppo postnatale. Questi neuroni gangliari di tipo II sembrano essere relativamente maturi allo stadio P2 e non esprimono livelli significativi degli mRNA di LANR o trk. Le dimensioni cellulari di entrambe le tipologie di neuroni gangliari aumenta di circa 2 volte e mezza dopo la nascita. Con l'avanzare dell'età, i neuroni del ganglio di tipo I tendono ad associarsi in gruppi densamente popolati mentre quelli di tipo II rimangono isolati singolarmente o in piccoli gruppi, per lo più nella periferia della regione midollare. Sembra che quest'ultima classe neuronale migri verso la parte midollare e/o della corticale subito dopo la nascita, possibilmente dopo aver stabilito un contatto con i target della regione corticale (Holgert et al., 1996a).

Ulteriori studi saranno necessari per valutare la regolazione dell'espressione di spexina ed augurina nel surrene durante il periodo prenatale e per valutare la loro regolazione nello sviluppo di altri organi e tessuti.

SPEXINA E AUGURINA NELLA RIGENERAZIONE DEL SURRENE

Per quanto riguarda il modello sperimentale di rigenerazione del surrene sia l'espressione di spexina che quella di augurina erano altamente upregolate nella fase di rigenerazione. Quindi, la up-regolazione dell'espressione di questi geni potrebbe essere considerata un primo evento dell'attivazione delle cellule staminali corticosurrenali indotta dall'enucleazione, favorendo sia la fase di differenziazione sia quella di proliferazione della rigenerazione. I risultati desunti permettono così di ipotizzare che spexina ed augurina potrebbero agire come regolatori endogeni della crescita corticosurrenale e potrebbero essere inclusi nel gruppo di peptidi ipotalamici probabilmente coinvolti nella regolazione dell'asse ipofisi-corticosurrenale che modulano la rigenerazione della corteccia surrenalica. Questo gruppo di peptidi include la galanina, l'orexina e l'arginina-vasopressina che stimolano (Hochol et al., 2000), e leptina e encefaline che inibiscono la crescita surrenalica (Markowska et al., 2004). Per ora, la sola ipotesi che può essere avanzata sul meccanismo(i) riguarda la upregolazione dell'espressione di spexina ed augurina durante la rigenerazione del surrene. Si può innanzitutto ipotizzare che l'ACTH aumenti la loro espressione ed il loro rilascio durante gli stadi precoci della rigenerazione. Tuttavia, va considerato che durante la prima fase del processo di rigenerazione le cellule staminali locali aderenti alla capsula sono esposte a stimoli ipossici conseguenti all'incompletezza del nuovo letto vascolare nel surrene. L'enucleazione, quindi, induce una iniziale risposta infiammatoria nei surreni in rigenerazione, e le citochine infiammatorie aumentano l'espressione di alcuni neuropeptidi attraverso una via dipendente e una indipendente da NO.

EFFETTI DELLA SPEXINA SULLA CORTICOSTEROIDOGENESI E SULLA PROLIFERAZIONE

CORTICOSURRENALE

Abbiamo effettuato degli esperimenti per vedere l'effetto diretto di spexina su cellule corticosurrenali di ratto. Alle alte concentrazioni testate (10^{-6} M) la spexina evocava un piccolo ma statisticamente significativo aumento della secrezione di aldosterone ma non di corticosterone da parte di cellule isolate e aumentava la secrezione di glucocorticoidi da parte di cellule corticosurrenali isolate. Tuttavia, l'effetto più rilevante della spexina è stato osservato sulla proliferazione delle cellule corticosurrenali. Sia concentrazioni di 10^{-8} M che di 10^{-6} M di spexina inibivano l'incorporazione di BrdU nelle cellule testate, effetto comparabile con quello evocato dall'ACTH (Ramachandrea et al., 1975; Rybak et al., 1981). Ne consegue che ci sono grosse differenze tra l'azione di ACTH e di spexina nelle colture di cellule corticosurrenali di ratto. Gli effetti inibitori dell'ACTH nell'attività proliferativa delle cellule studiate è accompagnato all'aumento di 20 volte della produzione del corticosterone ma solo un piccolo aumento nella produzione di corticosterone (circa 40%) è visibile nel caso della spexina. Il recettore della spexina non è ancora stato identificato, di conseguenza, il meccanismo d'azione del polipeptide nelle cellule rimane sconosciuto.

Numerosi studi dimostrano che molti peptidi sintetizzati nel surrene possono controllare la crescita corticosurrenale e le funzioni secretorie (Delarue et al., 2001; Ehrhart-Bornstain et al., 1998; Malendowiz et al., 1994 Toth et al., 1995; Vinson et al., 1994). Il nostro studio offre la prima evidenza che la spexina può essere inclusa nel gruppo di peptidi che regolano la crescita corticosurrenale. I risultati dello studio effettuato suggeriscono un coinvolgimento diretto della spexina nella regolazione della proliferazione delle cellule corticosurrenali anche se il meccanismo d'azione è ancora poco chiaro.

IPEROSSIA POSTNATALE E GLOMO CAROTIDEO

Gli effetti morfologici e funzionali dell'esposizione a iperossia postnatale nel glomo carotideo sono stati esaminati in letteratura da Gauda e Lawson (2000), Donnelly (2000), Bavis (2005), e da Wang e Bisgard (2005). Una riduzione del volume del glomo carotideo adulto è stato riportato in letteratura dopo 1 (Bisgard et al., 2003) o 4 (Fuller et al., 2001, 2002; Prieto-Lloret et al., 2004) settimane di esposizione postnatale al 60% di iperossia. Wang e Bisgard (2005) hanno dimostrato che un'iperossia al 60% produce una diminuzione della proliferazione e del numero totale di cellule di tipo I, con diminuzione dei contenuti di tirosina idrossilasi e di sinaptofisina. Al contrario, la percentuale delle aree positive alla tirosina idrossilasi, secondo uno studio di Prieto-Lloret et al. (2004), non era statisticamente modificata. Erickson et al. (1998) hanno trovato una diminuzione del numero di fibre sensitive nervose non mielinizzate e nel numero di neuroni tirosina idrossilasi-positivi nel ganglio petroso in seguito all'esposizione ad iperossia per le prime quattro settimane di vita postnatale. Alcuni autori hanno focalizzato la loro attenzione sugli effetti dell'iperossia sull'ultrastruttura del glomo carotideo. Di Giulio et al. (1998) hanno riportato una necrosi localizzata, un aumento del reticolo endoplasmatico, dell'apparato del Golgi, e del volume dei mitocondri nelle cellule di tipo I del glomo carotideo di ratti adulti esposti al 98-100% di iperossia per 60-65 ore. Hanno inoltre riportato una riduzione delle vescicole con core chiaro nelle sinapsi terminali dei nervi, una valorizzazione della matrice extracellulare e una riduzione dell'area citoplasmatica e nucleare media delle cellule glomiche.

Gli studi appena considerati hanno valutato l'effetto di una iperossia postnatale senza considerare le possibili modificazioni che possono verificarsi in seguito ad un periodo di recupero in un ambiente normossico. Recenti lavori hanno focalizzato l'attenzione sulla possibilità che una iperossia postnatale potesse alterare le funzioni dei chemorecettori

arteriosi periferici (PAC), come il glomo carotideo, anche in seguito a periodi di recupero e in età adulta. Per esempio, la prematurità sembra aumentare il rischio di SIDS anche attraverso un'alterazione della risposta dei PAC (Gauda et al., 2007; Porzionato et al., 2008a; 2009). I PAC subiscono lo sviluppo strutturale e funzionale durante il periodo post-natale, con graduale aumento della sensibilità ipossica (Porzionato et al., 2008a; Gauda et al., 2009) e la prematurità potrebbe causare anomalie intrinseche della risposta dei PAC ulteriormente aggravata dalla terapia con l'ossigeno associata alla prematurità. In particolare, l'esposizione all'iperossia causa una iposensibilità dei PAC, causando una risposta inefficace. In questo studio noi confermiamo la riduzione del volume del glomo carotideo anche dopo un periodo di recupero di 4 settimane in condizioni normali di ossigeno. Queste scoperte supportano l'ipotesi che l'esposizione a iperossia nel primo periodo di vita postnatale possa causare modificazioni strutturali del glomo carotideo che possono persistere per un lungo periodo anche dopo il ritorno in normossia. D'altra parte, non sono state trovate differenze statisticamente significative nell'indice apoptotico delle cellule di tipo I e di tipo II tra gruppi normossici e iperossici. Questo dato può essere spiegato in seguito al verificarsi di eventi apoptotici soprattutto in concomitanza con stress iperossici. E' anche possibile che gli effetti iperossici nel glomo carotideo possano agire attraverso una riduzione della proliferazione cellulare più che un aumento della morte cellulare. Di fatto, anche altri autori non hanno evidenziato un aumento dell'indice apoptotico nel glomo in seguito ad esposizioni ad iperossia (Wang and Bisgard, 2005) e un lavoro più recente ha sottolineato il verificarsi della proliferazione cellulare anche nel periodo postnatale, oltre ad aver identificato una nicchia di cellule staminali nel glomo carotideo (Pardal et al., 2007).

Oltre alle modifiche volumetriche, le analisi Real Time PCR ed immunoistochimiche hanno permesso di identificare una elevata espressione di spexina nel glomo carotideo di

ratti esposti ad iperossia nelle prime due settimane di vita postnatale. Il ruolo accertato di spexina nella regolazione della proliferazione cellulare delle cellule corticosurrenali suggerisce un possibile ruolo di questo peptide anche nella regolazione della proliferazione delle cellule del glomo carotideo. Questa ipotesi è particolarmente supportata alla luce dei molti fattori trofici che sono espressi nel glomo carotideo (Porzionato et al., 2008c) e giocano un ruolo nella modificazione di questa struttura in risposta a ipossia e/o iperossia.

BIBLIOGRAFIA

Bairam A. and Carroll J.L. Neurotransmitters in carotid body development. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2005; 149: 217-232.

Bamford O.S., Sterni L.M., Wasicko M.J., Montrose M.H. and Carroll J.L. Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: 875-884.

Bencini C. and Pulera N. The carotid bodies in bronchial asthma. *Histopath.* 1991; 18: 195-200.

Bi M.X., Han W.D. and Lu S.X. Using lab on-line to clone and identify the esophageal cancer related gene 4. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* 2001; 33: 257-261.

Blanco C.E., Dawes G.S., Hanson M.A. and McCooke H.B. The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs. *J. Physiol.* 1984; 351: 25-37.

Blanco C.E., Hanson M.A. and McCooke H.B. Effects on carotid chemoreceptor resetting of pulmonary ventilation in the fetal lamb in utero. *J. Dev. Physiol.* 1988; 10: 167-174.

Braun-Menendez E., Fasciolo J.C., Leloir L.F. and Muñoz J.M. Hypertensin: The substance causing renal hypertension. *Nature* 1939; 144: 980-981.

Brogi M.P. and Pellegrino C. The secretion of corticosterone and aldosterone by the rat adrenal cortex regenerating after enucleation. *J. Physiol.* 1959; 146: 165–178.

Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D. and Guillemin R. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: Mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH₂ sequence. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1969; 269: 1870–1873.

Clarke J.A. and Daly M.D. The volume of the carotid body and periadventitial type I and type II cells in the carotid bifurcation region of the fetal cat and kitten. *Anat. Embryol.* 1985; 173: 117-127.

Clarke J.A., de Burgh Daly M. and Ead H.W. Comparison of the size of the vascular compartment of the carotid body of the fetal, neonatal and adult cat. *Acta Anat.* 1990; 138: 166-174.

Connell J.M.C. and Davies E. The new biology of aldosterone. *J. Endocrinol.* 2005; 186: 1–20.

Costa M., Brookes S.J.H. and Hennig G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000; 47: 15–19.

Delarue C., Contesse V., Lenglet S., Sicard F., Perraudin V., Lefebvre H., Kodjo M., Leboulenger F., Yon L., Gallo-Payet N. and Vaudry H. Role of neurotransmitters and

neuropeptides in the regulation of the adrenal cortex. *Rev. Endocr. Metab. Disorders* 2001; 2: 253-267.

Di Giulio C., Cacchio M., Bianchi G., Rapino C. and Di Ilio C. Selected contribution: carotid body as a model for aging studies: is there a link between oxygen and aging? *J. Appl. Physiol.* 2003; 95: 1755-1758.

Dupont E, Rhèaume E, Simard J, Luu-The V, Labrie F and Pelletier G. Ontogenesis of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta4 isomerase in rat adrenal as revealed by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocr.* 1991; 129: 2687-2692.

Ehrhart-Bornstein M., Hinson J.P., Bornstein S.R., Scherbaum W.A. and Vinson G.P. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.* 1998; 19: 101-143.

Eipper B.A., Stoffer D.A. and Mains R.E. The biosynthesis of neuropeptides: Peptide - amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 1992; 15: 57-85.

Engeland W.C. and Levay-Young B.K.. Changes in the glomerulosa cell phenotype during adrenal regeneration in rats. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: 1374-1382.

Ennen W.B., Levay-Young B.K. and Engeland W.C. Zone-specific cell proliferation during adrenocortical regeneration after enucleation in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005; 289: 883-891.

Erickson J.T., Brosenitsch T.A. and Katz D.M. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J. Neurosci.* 2001; 21: 581-589.

Fishman M.C. and Schaffner A.E. Carotid body cell culture and selective growth of glomus cells. *Am. J. Physiol.* 1984; 246: 106-113.

Gauda E.B., Bamford O. and Gerfen C.R. Developmental expression of tyrosine hydroxylase, D2-dopamine receptor and substance P genes in the carotid body of the rat. *Neurosci.* 1996; 75: 969-977.

Gauda E.B., Carroll J.L. and Donnelly D.F. Developmental maturation of chemosensitivity to hypoxia of peripheral arterial chemoreceptors--invited article. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 648: 243-255.

Gauda E.B., Cooper R., Akins P.K. and Wu G. Prenatal nicotine affects catecholamine gene expression in newborn rat carotid body and petrosal ganglion. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 2157-2165.

Gauda E.B., Cristofalo E., Nunez J. Peripheral arterial chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2007; 157: 162-170.

Gauda E.B., McLemore G.L., Tolosa J., Marston-Nelson J. and Kwak D. Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. *Semin. Neonatol.* 2004; 9: 181-194.

Gauda E.B., Northington F.J., Linden J. and Rosin D.L. Differential expression of $\alpha(2a)$, A(1)-adenosine and D(2)-dopamine receptor genes in rat peripheral arterial chemoreceptors during postnatal development. *Brain Res.* 2000; 872: 1-10.

Gonzalez C., Almaraz L., Obeso A. and Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* 1994; 74: 829-898.

Greep R.O. and Deane H.W. Histological, cytochemical and physiological observations on the regeneration of the rat's adrenal gland following enucleation. *Endocrin.* 1949; 45: 42–56.

Grothe C. and Unsicker K. Immunocytochemical mapping of basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat adrenal gland. *Histochem.* 1990; 94: 141-147.

Gundersen H.J., Jensen E.B., Kiêu K. and Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *Microsc.* 1999; 193: 199-211.

Gundersen H.J. and Jensen E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J.Microsc.* 1987; 147: 229-263.

Hardy R. and Cooper M. Adrenal gland and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010; 503: 137–145.

Heath D. and Smith P. Diseases of the Human Carotid Body. *Springer-Verlag* 1999. London.

Heath D. The carotid bodies in chronic respiratory disease. *Histopath.* 1991; 18: 281-283.

Heath D., Khan Q. and Smith P. Histopathology of the carotid bodies in neonates and infants. *Histopath.* 1990; 17: 511-519.

Hertzberg T., Fan G., Finley J.C., Erickson J.T. and Katz D.M. BDNF supports mammalian chemoafferent neurons in vitro and following peripheral target removal in vivo. *Dev. Biol.* 1994; 166: 801-811.

Hinson J.P., Kapas S., Orford C.D. and Vinson G.P. Vasoactive intestinal peptide stimulation of aldosterone secretion by the rat adrenal cortex may be mediated by the local release of catecholamines. *J Endocrinol.* 1992; 133: 253-258.

Hochól A., Neri G., Jêdrzejczak N., Trejter M., Markowska A., Nussdorfer G.G. and Malendowicz L.K. Effects of galanin on the secretion and proliferative activity of the immature and regenerating adrenal glands of rats. *Peptides* 2000; 21: 147-150.

Holgert H., Dagerlind A., Hökfelt T. and Lagercrantz H. Neuronal markers, peptides and enzymes in nerves and chromaffine cells in the rat adrenal medulla during postnatal development. *Dev. Brain Res.* 1994; 83: 35-52.

Holgert H., Dagerlind A. and Hökfelt T. Phenotype of intraadrenal ganglion neurons during postnatal development in rat. *J. Comp. Neurol.* 1996a; 4: 603-620.

Holgert H., Lagercrantz H., Dagerlind A., Hartman B.K., Cozzari C., Brimijoin S. and Hökfelt T. Effect of immunological sympathectomy on postnatal peptide expression in the rat adrenal medulla. *Dev. Brain. Res.* 1996b; 97: 88-95.

Holgert H., Hökfelt T., Hertzberg T. and Lagercrantz H. Functional and developmental studies of the peripheral arterial chemoreceptors in rat: effects of nicotine and possible relation to sudden infant death syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 7575- 7579.

Hurst G., Heath D. and Smith P. Histological changes associated with ageing of the human carotid body. *J. Pathol.* 1985; 147: 181-187.

Iafrate M., Galfano A., Macchi V., Ejituru E., Sarasin G., Porzionato A., Novara G., De Caro R., Artibani W. and Ficarra V. Varicocele is associated with an increase of connective tissue of the pampiniform plexus vein wall. *World J. Urol.* 2009; 27: 363-369.

Ichikawa H. Innervation of the carotid body: Immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 59: 188-195.

Ingle D.J. and Higgins G.M. Regeneration of the adrenal gland following enucleation. *Am. J. Med. Sci.* 1938; 196: 232-239.

Jansen A.H., Ioffe S., Russell B.J. and Chernick V. Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth. *J. Appl. Physiol.* 1981; 51: 630-633.

Katafuchi T., Kikumoto K., Hamano K., Kangawa K., Matsuo H., and Minamino N. Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 12046–12054.

Kholwadwala D. and Donnelly D.F. Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *J. Physiol.* 1992; 453: 461-473.

Kolena J., Macho L., Palkovič M. and Poór J. Steroidogenic enzyme system in the rat adrenal glands during postnatal development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1968; 10: 247-252.

Kondo H. and Iwasa H. Re-examination of the carotid body ultrastructure with special attention to intercellular membrane appositions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 410: 45-50.

Kusakabe T., Hirakawa H., Matsuda H., Yamamoto Y., Nagai T., Kawakami T., Takenaka T. and Hayashida Y. Changes in the peptidergic innervation in the carotid body of rats chronically exposed to hypercapnic hypoxia: an effect of arterial CO₂ tension. *Histol. Histopathol.* 2002; 17: 21-29.

Kusakabe T., Hirakawa H., Oikawa S., Matsuda H., Kawakami T., Takenaka T. and Hayashida Y. Morphological changes in the rat carotid body 1, 2, 4, and 8 weeks after the termination of chronically hypocapnic hypoxia. *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 1133-1140.

Kusakabe T., Matsuda H. and Hayashida Y. Hypoxic adaptation of the rat carotid body. *Histol. Histopathol.* 2005; 20: 987-997.

Lam S.Y., Tipoe G.L., Liong E.C. and Fung M.L. Differential expressions and roles of hypoxia-inducible factor-1alpha, -2alpha and -3alpha in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Histol. Histopathol.* 2008; 23: 271-280.

Lemke G. Glial control of neuronal development. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 87-105.

Magalhaes MM, Breda JR, Magalhães MC, Reis J: Postnatal development of the rat adrenal cortex: an ultrastructural morphometric study. *J. Ultrastruct. Res.* 1981; 76: 215-223.

Mains R.E. and Eipper B.A. Synthesis and secretion of corticotropins, melanotropins, and endorphins by rat intermediate pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1979; 16: 7885-7894.

Malendowicz LK and Markowska A. Neuromedins and their involvement in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex. *Histol. Histopathol.* 1994; 9: 591-601.

Markowska A., Neri G., Hochol A., Nowak M., Nussdorfer G.G. and Malendowicz L.K. Effects of leptin and leptin fragments on steroid secretion and proliferative activity of regenerating rat adrenal cortex. *Int. J. Mol. Med.* 2004; 13: 139-141.

McDonald D.M. and Mitchell R.A. The innervation of glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative structural analysis. *J. Neurocytol.* 1975; 4: 17-23.

McLemore G.L., Cooper R.Z., Richardson K.A., Mason A.V., Marshall C., Northington F.J. and Gauda E.B. Cannabinoid receptor expression in peripheral arterial chemoreceptors during postnatal development. *J. Appl. Physiol.* 2004; 97: 1486-1495.

Mirabeau O., Perlas E., Severini C., Audero E., Gascuel O., Possenti R., Birney E., Rosenthal N. and Gross C. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. *Genome Res.* 2007; 17: 320-327.

Mitani F., Mukai K., Miyamoto H., Suematsu M. and Ishimura Y. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1619: 317-324.

Mori Y., Ishiguro H., Kuwabara Y., Kimura M., Mitsui A., Kurehara H., Mori R., Tomoda K., Ogawa R., Katada T., Harata K. and Fujii Y. Expression of ECRG4 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2007; 18: 981-985.

Nurse C.A. and Fearon I.M. Carotid body chemoreceptors in dissociated cell culture. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 59: 249-255.

Nurse C.A. Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton. Neurosci.* 2005; 120: 1-9.

Nussdorfer G.G. Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol. Rev.* 1996; 48: 495-530.

Oomori Y., Ishikawa K., Satoh Y., Matsuda M. and Ono K. Neuropeptide Y-immunoreactive chief cells in the carotid body of young rats. *Acta Anat.* 1991; 140: 120-123.

Pallot D.J. The Mammalian Carotid Body. *Springer-Verlag.* 1987.

Pallot D.J., Al Neamy K. and Blakeman N. Quantitative studies of the rat carotid body Type I cells. *Acta Anat.* 1986; 126: 187-191.

Pardal R., Ortega-Sáenz P., Durán R. and López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 2007; 131: 364-377.

Peers C. and O'Donnell J. Potassium currents recorded in type I carotid body cells from the neonatal rat and their modulation by chemoexcitatory agents. *Brain Res.* 1990; 522: 259-266.

Pignatelli D., Pinto P., Almeida H., Magalhães M.M., Magalhães M.C. and Ho M.M. The development of the adrenal cortex in the rat. An immunohistochemical study. *Endocr. Res.* 1995; 21: 129-136.

Pokorski M., Walski M., Dymecka A. and Marczak M. The aging carotid body. *J. Physiol. Pharmacol.* 2004; 55: 107-113.

Porzionato A., Macchi V., Guidolin D., Parenti A., Ferrara S.D. and De Caro R. Histopathology of carotid body in heroin addiction. Possible chemosensitive impairment. *Histopathol.* 2005; 46: 296-306.

Porzionato A., Macchi V., Belloni A.S., Parenti A. and De Caro R. Adrenomedullin immunoreactivity in the human carotid body. *Peptides* 2006; 27: 69-73.

Porzionato A., Macchi V., Parenti A., Maturri L. and De Caro R. Peripheral chemoreceptors: postnatal development and cytochemical findings in Sudden Infant Death Syndrome. *Histol. Histopathol.* 2008a; 23: 351-365.

Porzionato A., Macchi V., Guidolin D., Sarasin G., Parenti A. and De Caro R. Anatomic distribution of apoptosis in medulla oblongata of infants and adults. *J. Anat.* 2008b; 212: 106-113.

Porzionato A., Macchi V., Parenti A. and De Caro R. Trophic factors in the carotid body. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008c; 269: 1-58.

Porzionato A., Macchi V. and De Caro R. Sudden infant death syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 2580-2582.

Porzionato A., Macchi V., Barzon L., Masi G., Belloni A., Parenti A., Palù G. and De Caro R. Expression and distribution of galanin receptor subtypes in the rat carotid body. *Mol. Med. Rep.* 2010; 3: 37-42.

Prabhakar N.R. and Jacono F.J. Cellular and molecular mechanisms associated with carotid body adaptations to chronic hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2005; 6: 112-120.

Raff H. and Bruder E. Steroidogenesis in Human Aldosterone-Secreting Adenomas and Adrenal Hyperplasias: Effects of Hypoxia in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 290: 199-203.

Ramachandran J. and Suyama A.T. Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1975; 72: 113-117.

Rybak S.M. and Ramachandran J. Primary culture of normal rat adrenocortical cells. I. Culture conditions for optimal growth and function. *In Vitro* 1981; 17: 599-604.

Saland L.C. The mammalian pituitary intermediate lobe: An update on innervation and regulation. *Brain Res. Bull* 2001; 54: 587–593.

Schmidt W.E., Kratzin H., Eckart K., Dreves D., Mundkowski G., Clemens A., Katsoulis S., Schäfer H., Gallwist B. and Kreutzfeldt W. Isolation and primary structure of pituitary human galanin, a 30-residue non-amidated neuropeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1991; 88: 11435–11439.

Skelton F.R. Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension. *Physiol. Rev.* 1959; 39: 162–182.

Smith P., Jago R. and Heath D. Anatomical variation and quantitative histology of the normal and enlarged carotid body. *J. Pathol.* 1982; 137: 287-304.

Sonmez K., Zaveri N.T., Kerman I.A., Burke S., Neal C.R., Xie X., Watson S.J. and Toll L. Evolutionary sequence modeling for discovery of peptide hormones. *PLoS Comput. Biol.* 2009.

Sterni L.M., Bamford O.S., Tomares S.M., Montrose M.H. and Carroll J.L. Developmental changes in intracellular Ca²⁺ response of carotid chemoreceptor cells to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: 801-808.

Su T., Liu H.L., Lu S.X., Zhao X.J., Zhou C.X and Jin S.Q. Cloning and identification of cDNA fragment related to human esophageal cancer. *Chin. J. Oncol.* 1998; 20: 254-257.

Tadross J.A., Patterson M., Suzuki K., Beale K.E., Boughton C.K., Smith K.L., Moore S., Ghatei M.A. and Bloom S.R. Augurin stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis via the release of corticotrophin-releasing factor in rats. *Brit. J. Pharmacol.* 2010; 159: 1663-1671.

Taki T.M. and Nickerson P.A. Differentiation and proliferation of adrenocortical cells during early stages of regeneration. *Lab. Invest* 1985; 53: 91-100.

Tóth I.E. and Hinson J.P. Neuropeptides in the adrenal gland: distribution, localization of receptors, and effects on steroid hormone synthesis. *Endocr. Res.* 1995; 21: 39-51.

Van Dorp A.W. and Deane H.W. A morphological and cytochemical study of the postnatal development of the rat's adrenal cortex. *Anat. Rec.* 1950; 107: 265-281.

Verna A. The mammalian carotid body: morphological data. In: The carotid body chemoreceptors. 1997; *Gonzalez C. (ed). MIU Landes Bioscience. Austin*, pp 1-29.

Verna A. Ultrastructure of the carotid body in the mammals. *Int. Rev. Cytol* 1979; 60: 271-330.

Vinson G.P., Hinson J.P. and Tóth I.E. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6: 235-246.

von Dalnok G.K. and Menssen H.D. A quantitative electron microscopic study of the effect of glucocorticoids in vivo on the early postnatal differentiation of paraneuronal cells in the carotid body and the adrenal medulla of the rat. *Anat. Embryol.* 1986; 174: 307-319.

Wang Z.Y. and Bisgard G.E. Chronic hypoxia-induced morphological and neurochemical changes in the carotid body. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 59: 168-177.

Wang Z.Y. and Bisgard G.E. Postnatal growth of the carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2005; 149: 181-190.

Yue C.M., Deng D.J., Bi M.X., Guo L.P. and Lu S.H. Expression of ECRG4, a novel esophageal cancer-related gene, downregulated by CpG island hypermethylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2003; 9: 1174-1178.