

Valenzano (BA) 16-17 Giugno



Società Italiana di Fisiologia Veterinaria



SO.F.I.VET.
Società Italiana di Fisiologia
Veterinaria

Meeting 2008
Ruolo del segnale Calcio a livello cellulare

Università degli Studi di Bari
Facoltà di Medicina Veterinaria

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA:

Prof.ssa Antonia Zarrilli
Dr.ssa Elisabetta Micera
Dr.ssa Nicoletta C. Surdo

SEGRETERIA SCIENTIFICA:

Prof.ssa Antonia Zarrilli
Prof. Angelo Quaranta
Dr.ssa Maria Albrizio
Dott. Marcello Siniscalchi

CONSIGLIO DIRETTIVO SO.F.I.VET

Presidente

Prof. Gabriele Bono

Vicepresidente

Prof. Cristiano Boiti

Componenti

Prof. Luigi Avallone
Prof. Sergio Ledda
Prof. Claudio Sighieri

- FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET): GUARDARE IL SIGNALLING INTRACELLULARE IN TEMPO REALE** Pg. 2
Manuela Zaccolo
- LE FOTOPROTEINE RICOMBINANTI NELLO STUDIO DEL SEGNALE CALCIO E DEL METABOLISMO CELLULARE** Pg.5
Marisa Brini
- CANALI DEL CALCIO VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L IN CELLULE DELLA GRANULOSA MURALE EQUINA** Pg. 9
Albrizio M., Micera E., Surdo NC., Zarrilli A.
- SISTEMA ENDOCANNABINOIDE: NUOVE PROSPETTIVE NELLO STUDIO DEI CANALI IONICI NELLO SPERMATOZOO MATURO** Pg. 14
Bernabò N, Palestini P^{*)}, Maccarrone M, Pistilli MG, Falasca G, Gloria A, Mattioli M, Barboni B
- DISTRIBUZIONE DEL RECETTORE DEL CALCIO (CASR) NELL'APPARATO GASTROENTERICO DEL VITELLO BUFALINO NEONATO.** Pg.18
Pero ME, De Luca A, Lombardi P, Squillacioti C, Mirabella N., *Geibel JP, Avallone L.
- METODI PER MISURARE L'ATTENZIONE SELETTIVA SOCIALE NEL CANE** Pg. 22
Mongillo, P¹, Marinelli, L¹, Zebele, A², Bono, G¹
- VALUTAZIONE DELLA REATTIVITA' COMPORTAMENTALE DI CAVALLI ADIBITI ALLA RIABILITAZIONE EQUESTRE DI SOGGETTI CON DIFFERENTI DISABILITA'. INFLUENZE DELLE CONDIZIONI DI MANAGEMENT.** Pg. 23
Malara L., De Pasquale A., Ingala A., Innella G., Luigiano G., Panzera M.
- STUDIO FUNZIONALE SUI CA_v DI TIPO L NELLA GALLINA OVAIOLA DURANTE L'OVODEPOSIZIONE E LA MUTA** Pg. 24
E. Micera², L. Laporta¹, N. C. Surdo², M. Albrizio², G. Di Modugno¹, A. Zarrilli²
- CAPACITA' DIFFERENZIATIVA DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs) OVINE** Pg. 25
Czernik M., Sardi M., Ptak G., & Loi P.
- VALUTAZIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE IN PIASTINE DI CANI SANI ED AFFETTI DA LEISHMANIOSI** Pg. 26
d'Angelo D., Pelagalli A., Ma stellone V., Cestaro A., Bruno R., Lombardi P., Avallone L.
- IMPIEGO DELL'INSULINA NEL TRATTAMENTO DELLA FORMA NERVOSA DI CHETOSI BOVINA** Pg. 27
Sasso R., Dimatteo S., D'Onghia G.F., Volpe S., Siniscalchi M., Quaranta A.
- CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CANALI DEL Ca²⁺ VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L NELLA GRANULOSA FOLLICOLARE DI GALLINA OVAIOLA** Pg. 28
N. C. Surdo², E. Micera², L. Laporta¹, M. Albrizio², G. Di Modugno¹, A. Zarrilli²
- IMPIEGO DI SPERMATOZOI EPIDIDIMALI CRIOCONSERVATI PER LA FECONDAZIONE IN VITRO DI OVOCITI DI GATTO DOMESTICO "Felis catus"** Pg. 29
Ciani F. *, Cocchia N.¹, Tortora G. ¹, Lorzio R. ¹, Avallone L.
- L'ESPOSIZIONE DI BLASTOCISTI OVINE A POLICLOROBIFENILI (PCBs) INDUCE IRREGOLARITA' CROMOSOMICHE.** Pg. 30
Czernik M., Zacchini F., Pizzuto A., Scapolo PA., Loi. P. & Ptak G.
- MODIFICAZIONI DELLE IODOTIRONINE TOTALI E LIBERE NEL PUROSANGUE ARABO DOPO GARA DI GIMKANA: EFFETTO DELLO STATO DI ALLENAMENTO, DEL GENERE E DELL'ETA'** Pg. 31
Fazio E., Giacoppo E., Molinari P., Medica P., Ferlazzo A.

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET): GUARDARE IL SIGNALLING INTRACELLULARE IN TEMPO REALE**FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET): VISUALIZATION OF INTRACELLULAR SIGNALLING IN REAL TIME.**

Manuela Zaccolo

Division of Biochemistry and Molecular Biology, FBLS, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK

e-mail: m.zaccolo@bio.gla.ac.uk**Summary**

In recent years our ability to unravel the details of intracellular signalling has improved remarkably. Technological innovations resulting from the introduction of the green fluorescent protein (GFP) have played a significant role in these advances. Fluorescent indicators allow us to visualize events within a cell in real time and space. These tools provide high sensitivity and great versatility while minimally perturbing the cell under investigation. In particular, fluorescent energy transfer (FRET) technologies have given insight into biological questions relating to the spatiotemporal patterns of signalling by cAMP, calcium, receptor tyrosine kinases and other molecules. The presentation will focus on cAMP signalling and the novel insights that the FRET technology has provided on the spatial and temporal control of this key signalling molecule. However, similar considerations apply to the study of other signalling pathways, including cGMP, calcium, IP₃ and various protein kinases including PKA, PKB, PKC, PKD, Abl, Src.

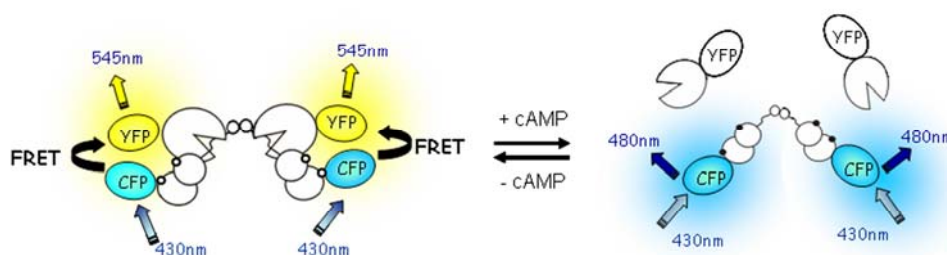
Lo studio del signalling mediato da cAMP ha ricevuto un rinnovato impulso grazie al riconoscimento che uno stretto controllo della propagazione del segnale nel tempo e nello spazio rappresenta un aspetto chiave di questa via di signalling(1). Lo studio dei meccanismi responsabili del controllo spazio-temporale del segnale cAMP ha stimolato lo sviluppo di nuove metodologie in grado di rilevare il cAMP in cellule vive(2). Negli ultimi dieci anni si è resa disponibile e ha trovato ampia applicazione una serie di tecniche dotate di elevata risoluzione nel tempo e nello spazio e basate sull'utilizzo di green fluorescent proteins (GFP) e del fenomeno di Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)(3). Queste tecniche si basano su sensori proteici il cui design essenziale comprende due fluorofori fusi geneticamente ad un dominio proteico capace di subire una variazione conformazionale in seguito al legame con cAMP. Questa variazione conformazionale determina una variazione della distanza fra i due fluorofori che si traduce in una variazione di FRET(4). Questi sensori consentono di misurare accuratamente in modo quantitativo e dinamico le variazioni di cAMP e forniscono una risoluzione nel tempo e nello spazio di molto superiore a quelle ottenibili con tecniche convenzionali, fornendo una immagine del signalling in tempo reale, catturata nel momento in cui il segnale è generato e si propaga nel complesso ambiente intracellulare.

Tradizionalmente il cAMP è stato misurato utilizzando metodi di accumulo nel tempo basati su radioimmunoassays. Questi metodi possono essere molto sensibili e rimangono tuttora strumenti essenziali per valutare le variazioni di nucleotidi ciclici in determinate circostanze, tuttavia il loro limite principale deriva dal fatto che richiedono la lisi del campione cellulare da analizzare e l'estrazione del secondo messaggero. In questo modo, qualsiasi informazione relativa alla

organizzazione spaziale del segnale cAMP va perduta. Inoltre, gli assays basati sull'accumulo di cAMP hanno scarsa risoluzione temporale e permettono di valutare le variazioni del secondo messaggero soltanto come variazione media in una popolazione cellulare, non consentendo di discriminare gli eventi di signalling a livello di singola cellula. Per queste ragioni, questo approccio e' inadeguato quando si vogliono studiare gli aspetti spazio-temporali del signalling mediato da cAMP.

Il FRET e' un fenomeno fisico grazie al quale l'energia assorbita da un fluoroforo e' trasferita ad un altro fluoroforo attraverso un processo non radiativo. Affinche' ci possa essere trasferimento di energia, tre condizioni devono essere rispettate: *i*) lo spettro di emissione del fluoroforo che agisce come donatore deve sovrapporsi allo spettro di assorbimento del fluoroforo che agisce da accettore; *ii*) il dipolo di emissione del donatore e il dipolo di assorbimento dell' accettore devono essere orientati perpendicolarmente tra di loro; *iii*) donatore e accettore devono trovarsi a meno di 10 nm di distanza l'uno dall'altro. Förster ha dimostrato che l'efficienza di FRET varia inversamente al variare della sesta potenza della distanza tra donatore e accettore(5). Di conseguenza, variazioni molto piccole della distanza fra donatore e accettore si traducono in ampie variazioni di FRET. Quindi il FRET rappresenta un modo molto efficace per misurare distanze intermolecolari e variazioni conformazionali comprese in una scala da 1 a 10 nm. Se il fluoroforo donatore e il fluoroforo accettore sono fusi ad una proteina che cambia conformazione in seguito al legame con cAMP, il FRET puo' essere utilizzato per misurare la concentrazione del secondo messaggero.

Un esempio di sensore FRET per cAMP e' la sonda basata sul PKA, la chinasi che lega ed e' attivata da cAMP (vedi figura). In questo caso la subunita' regolatoria (R) e la subunita' catalitica (C) della PKA sono state fuse rispettivamente alla variante ciano (CFP) e alla variante gialla (YFP) della green fluorescent protein. In assenza di cAMP, le subunita' R e C (in bianco nella figura) sono associate e formano un tetramero R_2C_2 . In questa conformazione i due fluorofori CFP e YFP sono abbastanza vicini e i loro dipoli sono orientati in modo tale da consentire FRET. Quando il cAMP si lega alle subunita' R, le subunita' C vengono rilasciate e i fluorofori si allontanano, abolendo il FRET.



Utilizzando questo sensore e' stato possibile visualizzare per la prima volta in modo diretto la presenza di microdomini di cAMP in cellule cardiache(6) e questo approccio ha consentito di analizzare i meccanismi molecolari responsabili della compartimentazione di questo secondo messaggero(7-10).

Il sensore basato su PKA ha tuttavia alcuni potenziali problemi, tra i quali la necessita' di esprimere le due subunita' R e C in quantita' equimolare, cosa non sempre facile da controllare. Inoltre, la subunita' C e' enzimaticamente attiva e puo' influire sulla fisiologia della cellula che si vuole analizzare. Per ovviare a questi problemi sono state sviluppate nuove versioni di sensori FRET basati su un design unimolecolare che puo' includere un singolo dominio che lega il cAMP(11, 12). Inoltre, per specifiche applicazioni, e' stato possibile modificare questi sensori per direzionarli in modo selettivo a specifici compartimenti subcellulari. Il fatto che queste sonde siano interamente geneticamente codificate ha infine consentito la loro espressione in animali transgenici (sia topo che

Drosophila melanogaster) (13, 14). La possibilità di studiare le dinamiche di cAMP in questi animali transgenici apre ora una via completamente nuova che consentirà di comprendere il signalling di questo fondamentale secondo messaggero nella complessità di un organismo vivente.

Referenze

- (1) Zaccolo, M., Magalhaes, P., and Pozzan, T. (2002) Compartmentalisation of cAMP and Ca^{2+} signals. *Curr Opin Cell Biol* 14, 160-6.
- (2) Willoughby, D., and Cooper, D. M. (2008) Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nat Methods* 5, 29-36.
- (3) Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., and Tsien, R. Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906-18.
- (4) Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., and Pozzan, T. (2000) A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* 2, 25-9.
- (5) Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Annals of Physics* 2, 55-57.
- (6) Zaccolo, M., and Pozzan, T. (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711-5.
- (7) Terrin, A., Di Benedetto, G., Pertegato, V., Cheung, Y. F., Baillie, G., Elvassore, N., Prinz, A., Herberg, F. W., Houslay, M. D., and Zaccolo, M. (2006) PGE1 stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *The Journal of Cell Biology*.
- (8) Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M. J., Pozzan, T., Houslay, M. D., and Zaccolo, M. (2004) Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 95, 67-75.
- (9) Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolucci, N., Houslay, M. D., and Zaccolo, M. (2006) Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 98, 226-34.
- (10) Li, C., Krishnamurthy, P. C., Penmatsa, H., Marrs, K. L., Wang, X. Q., Zaccolo, M., Jalink, K., Li, M., Nelson, D. J., Schuetz, J. D., and Naren, A. P. (2007) Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 131, 940-51.
- (11) Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M. J. (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* 279, 37215-37218.
- (12) Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F. J., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W. H., Bos, J. L., and Jalink, K. (2004) Detecting cAMP-induced activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* 5, 1-5.
- (13) Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J., and Engelhardt, S. (2006) Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 99, 1084-91.
- (14) Lissandron, V., Rossetto, M. G., Erbguth, K., Fiala, A., Daga, A., and Zaccolo, M. (2007) Transgenic fruit-flies expressing a FRET-based sensor for in vivo imaging of cAMP dynamics. *Cell Signal* 19, 2296-303.

SOCIETA' ITALIANA DI FISIOLOGIA VETERINARIA
Giornata di Studio Sul Ruolo del segnale Calcio a livello cellulare
Bari, 17 Giugno 2008

Le fotoproteine ricombinanti nello studio del segnale calcio e del metabolismo cellulare

Marisa Brini

Dipartimento di Chimica Biologica e Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

Università degli Studi di Padova, Viale G. Colombo, 3 35131 Padova (Italy).

Tel. +39.049.8276167; fax: +39.049.8276125; e-mail: marisa.brini@unipd.it

La maggior parte dei fattori che controllano la proliferazione, la differenziazione ed il movimento cellulare (ad eccezione degli ormoni steroidei) non penetrano nel citoplasma ma interagiscono con specifici recettori presenti sulla membrana plasmatica delle cellule e inducono la produzione o la mobilitazione di molecole (cAMP, Ca^{2+} , etc.) che, interagendo con proteine diverse, controllano la varietà di eventi intracellulari che costituiscono la risposta cellulare. In confronto alla grande varietà di mediatori extracellulari ed alle molteplici risposte da essi generate, il numero di secondi messaggeri è piuttosto limitato. Tra questi lo ione Ca^{2+} svolge un ruolo di importanza primaria (Carafoli et al., 2001). Stimoli cellulari che controllano numerosi fenomeni biologici sono trasmessi all'interno della cellula mediante variazioni della concentrazione di Ca^{2+} citosolica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$).

Anche se la prima dimostrazione del ruolo degli ioni Ca^{2+} nel controllo di una funzione cellulare (la contrazione del muscolo cardiaco) risale oltre ad un secolo fa, l'applicazione di questo meccanismo – che rappresenta oggi una nozione consolidata in biologia- a un'ampia varietà di funzioni e tipi cellulari ha dovuto attendere lo sviluppo di specifici sistemi di misura della $[\text{Ca}^{2+}]$ all'interno della cellula. Lo sviluppo di sonde, capaci di misurare la concentrazione di Ca^{2+} nelle cellule viventi ha dato un notevole contributo alla comprensione dei meccanismi che regolano l'omeostasi del Ca^{2+} e la partecipazione di questo ione nel controllo delle diverse funzioni cellulari.

In particolare, vi sono stati due grandi avanzamenti metodologici in questo campo. Il primo è stato l'isolamento di molecole naturali, come la fotoproteina equorina (Ridgway e Ashley, 1967), o di sintesi come gli indicatori metallo cromatici arsenazo III o antipirilazo III (Thomas, 1982) che hanno avuto un ruolo importante nello studio del ruolo dello ione Ca^{2+} come secondo messaggero intracellulare. Tuttavia questi studi risentivano di una limitazione sperimentale importante: gli indicatori di Ca^{2+} dovevano essere introdotti direttamente all'interno della cellula per microiniezione, limitando così il numero di tipi cellulari utilizzabili.

Il secondo avanzamento metodologico, che ha radicalmente cambiato la situazione, è stato lo sviluppo da parte di R. Tsien ed i suoi collaboratori (Tsien et al., 1982) di indicatori fluorescenti intrappolabili nel citoplasma. Questi composti sono derivati dal chelante del Ca^{2+} EGTA, per aggiunta di un gruppo cromoforo e schermatura dei quattro gruppi carbossilici per esterificazione. In questa forma i composti sono liberamente permeabili attraverso la membrana; giunti nel citoplasma, la gabbia tetracarbossilica (responsabile del legame selettivo con il Ca^{2+}) viene ripristinata per l'azione di esterasi citosoliche ed il colorante resta intrappolato nel citoplasma. La semplicità d'uso e l'efficacia ne hanno favorito un'ampia applicazione: è stato così possibile vedere, sia in popolazioni cellulari che a livello di singola cellula, che il segnale Ca^{2+} è finemente modulato secondo schemi spazialmente e temporalmente ben precisi, vedi per es. le oscillazioni ritmiche della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e la generazione di gradienti locali.

Gli indicatori fluorescenti, per la loro natura di molecole semplici, non possono essere applicati allo studio delle variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]$ in compartimenti subcellulari specifici, per es. gli organelli.

D'altro canto, nel contesto generale dell'omeostasi del Ca^{2+} , gli organelli cellulari svolgono un ruolo di primaria importanza, sia perché contribuiscono alla regolazione della $[\text{Ca}^{2+}]_c$, sia in quanto variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]$ luminale regolano attività tipiche degli organelli stessi. Gli ovvii candidati per l'analisi dell'omeostasi del Ca^{2+} in distretti cellulari specifici sono le sonde di natura proteica.

L'ampia diffusione delle tecniche di biologia molecolare, con la possibilità di modificare ed esprimere nelle cellule di interesse proteine esogene ha reso possibile l'enorme espansione di sonde proteiche in biologia cellulare. Due tipi di sonde proteiche, attualmente utilizzate, derivano dall'ampia varietà di organismi bioluminescenti presenti in natura. La prima è data dalle proteine luminescenti, ossia dalle proteine che emettono luce, spesso in risposta a parametri di interesse fisiologico, quali la concentrazione di ATP o di Ca^{2+} . Poiché le cellule di mammifero non possiedono molecole luminescenti, l'uso delle proteine luminescenti in studi di biologia cellulare è di solito associato a un eccellente rapporto segnale/rumore. Viceversa, poiché il segnale rispecchia unicamente l'emissione di luce da parte della proteina ricombinante, esso è piuttosto debole e quindi può essere raccolto o integrando il segnale proveniente da almeno 10^3 - 10^4 cellule, o, a livello di singola cellula, con strumenti di analisi di immagine a elevatissima sensibilità e costo. Il secondo gruppo di sonde proteiche, che incontra una utilizzazione sempre più ampia, è dato dalle proteine fluorescenti. Tra queste, protagonista indiscussa è la *green fluorescent protein* di *Aequorea victoria*, la quale però non sarà discussa in questa relazione.

L'isolamento del cDNA dell'equorina (Inouye et al., 1985) ha di nuovo valorizzato questa proteina come strumento per misurare la $[\text{Ca}^{2+}]$ in cellule vive. E' possibile introdurre per transfezione l'equorina in cellule molto diverse per struttura ed origine embriologica. L'aggiunta alla sua

sequenza amminoacidica di sequenze segnale, che sono riconosciute da specifici sistemi di direzionamento e sono necessarie e sufficienti a determinare la corretta localizzazione della proteina che le possiede, ha permesso lo sviluppo di sonde specifiche indirizzate alla matrice mitocondriale, al nucleo, al lume del reticolo endoplasmatico e sarcoplasmatico, all'apparato di Golgi, allo spazio sottostante la membrana plasmatica (Brini et al., 1999). La disponibilità di queste sonde ha permesso di ottenere numerose nuove, ed in parte inaspettate, informazioni di ampia rilevanza biologica. In particolare, è stato osservato che i mitocondri, nonostante la bassa affinità dei sistemi di trasporto, sono in grado di “sentire” le variazioni della $[Ca^{2+}]_c$ ed aumentare sensibilmente la concentrazione di Ca^{2+} nella matrice (Rizzuto et al., 1992; Rizzuto et al., 1993), grazie alla vicinanza spaziale ai siti intracellulari di rilascio del Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1998). Questi aumenti sono sufficientemente grandi da attivare le deidrogenasi Ca^{2+} -sensibili del ciclo di Krebs, e modulare quindi il metabolismo energetico in risposta alle aumentate necessità della cellula (Rizzuto et al., 1994). Per quanto riguarda la concentrazione nucleare del Ca^{2+} (che è implicata nel controllo di fenomeni quali l'espressione genica e l'apoptosi) è stato osservato che essa segue fedelmente la $[Ca^{2+}]_c$, suggerendo quindi che *in vivo* i pori nucleari siano aperti e permettano una rapida equilibratura delle concentrazioni citoplasmatica e nucleare del Ca^{2+} (Brini et al., 1993). Come atteso, il reticolo endoplasmatico mostra una concentrazione luminale di Ca^{2+} molto elevata (~1 mM), che subisce una drastica riduzione in seguito a stimolazione cellulare con agonisti che causano la produzione di inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3) e l'aumento della $[Ca^{2+}]_c$ (Montero et al., 1995). Questi dati offrono un'evidenza diretta del fatto che il reticolo endoplasmatico (o una larga parte di esso) rappresenta il compartimento intracellulare che svolge il ruolo di deposito di Ca^{2+} rilasciabile sotto stimolazione. Un'altra osservazione importante è stata la misura diretta della $[Ca^{2+}]$ dell'apparato di Golgi. Questi esperimenti hanno permesso di verificare che anche questo compartimento cellulare svolge la funzione di deposito intracellulare del Ca^{2+} , il quale, analogamente a quanto succede per il reticolo endoplasmatico, può essere mobilizzato da agonisti che causano la produzione di IP_3 (Pinton et al., 1998).

Un'altra applicazione molto utile dell'euciorina ricombinante è rappresentato dal fatto che il suo cDNA può essere cotrasfettato insieme al cDNA di una proteina di interesse della quale si vuole studiare il ruolo sulla omeostasi del Ca^{2+} . Uno degli approcci allo studio del ruolo e delle proprietà dei diversi componenti molecolari è la sovraespressione di proteine eterologhe e lo studio delle cellule così modificate. Secondo i comuni protocolli di trasfezione i due cDNA vengono assunti insieme, rendendo così possibile la generazione di una popolazione cellulare dotata della sonda per la misura del Ca^{2+} e di un corredo proteico specifico. Alcune delle proteine di membrana coinvolte nel trasporto dello ione sono state identificate ed isolate. Nonostante numerose informazioni siano oggi disponibili sulla struttura, la funzione e la regolazione di queste proteine, i meccanismi che

controllano il loro funzionamento in maniera coordinata non sono ancora chiari. Secondo questa strategia è stato possibile studiare, in cellule vive, i meccanismi di trasporto dello ione Ca^{2+} ed il loro contributo relativo all'omeostasi intracellulare di questo ione, sia in condizioni fisiologiche che in modelli cellulari patologici. In particolare, è stato studiato il ruolo rispettivo dei due sistemi di trasporto a maggiore affinità per il Ca^{2+} , le pompe Ca^{2+} -ATPasiche, e quello del sistema a bassa affinità (Brini et al., 2000), lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ della membrana plasmatica, tipico delle cellule eccitabili (Brini et al., 2002), il recettore/canale della rianodina (Brini et al., 2005), la proteina prionica (Brini et al., 2005) etc.

Bibliografia

- Brini, M., M. Murgia, L. Pasti, D. Picard, T. Pozzan, and R. Rizzuto. *EMBO J.* 12 (1993) 4813-4819.
- Brini M, Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. *Microsc Res Tech.* 46 (1999) 380-9.
- Brini, M., Bano, D., Manni, S., Rizzuto, R. & Carafoli, E.: *EMBO J.* (2000), 19, 4926-4935.
- Brini, M., Manni, S., & Carafoli, E.: *J. Biol. Chem.* (2002), 277, 38693-38699.
- Brini, M., Manni, S., Pierobon, N., Du, G.G., Sharma, P., MacLennan, D.H., & Carafoli, E.: *J. Biol. Chem.* (2005), 280, 15380-15389.
- Brini, M., Miuzzo, M., Pierobon, N., Negro, A. & Sorgato, M.C.: *Mol. Biol. of the Cell* (2005), 16, 2799-2808.
- Carafoli, E., Santella, L. Branca, D. & Brini, M.: *Crit. Rev. Biochem. Mol.* (2001), 36, 107-260.
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T, Tsuji FI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (1985) 3154-8.
- Montero, M., M. Brini, R. Marsault, J. Alvarez, R. Sitia, T. Pozzan, and R. Rizzuto. *EMBO J.* 14 (1995) 5467-5475.
- Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. *EMBO J.* 17 (1998) 5298-308.
- Ridgway, E. B., and C. C. Ashley. 29 (1967) 229-234.
- Rizzuto, R., A. W. M. Simpson, M. Brini, and T. Pozzan. *Nature* 358 (1992) 325-328.
- Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M. & Pozzan, T. *J. Cell Biol.* (1994), 126, 1183-1194.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. *Science.* 280 (1998) 1763-6.
- Thomas, MV In Biological techniques series. (1982) Academic Press, New York and London.
- Tsien, R. Y., T. Pozzan, and T. J. Rink *Nature* 295 (1982) 68-71.

CANALI DEL CALCIO VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L IN CELLULE DELLA GRANULOSA MURALE EQUINA

Albrizio M., Micera E., Surdo NC., Zarrilli A.

Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bari

e-mail: m.albrizio@veterinaria.uniba.it

ABSTRACT

One of the most useful second messenger in the cell is the calcium ion (Ca^{2+}). In excitable tissues it enters the cell through voltage dependent calcium channels (VOCCS) divided into HVA and LVA according to their electrical characteristics. They are generally closed at resting potential and open as a consequence of a membrane depolarisation. Ca^{2+} drives oocyte maturation and ovarian follicle development; steroidogenesis is also influenced by variations of the cytoplasmic Ca^{2+} concentrations. L-type calcium channels have been characterized in granulosa cells of humans, rat, swine and chicken, but, to our knowledge, no study has been conducted in the horse. In this report we showed that equine ovarian follicles of different sizes and degree of development express the pore forming α_{1C} subunit of the L-type calcium channel. We also showed that the channel agonist BayK 8644 and the antagonist nifedipine induce a different calcium influx of the ion according to follicles size while we did not observe a difference in the level of protein expression. Our results let us hypothesize the presence of a regulatory mechanism of the channel functionality, rather than of its molecular expression, correlated to follicular size and development.

Lo ione calcio (Ca^{2+}) è il secondo messaggero più utilizzato nel sistema di decodificazione dei segnali attraverso il quale uno stimolo esterno viene convertito in una risposta funzionale della cellula (Hardingham, 2006). Nel liquido extracellulare il Ca^{2+} è presente ad una concentrazione di 10^{-3} M, mentre nel citoplasma è mantenuto ad una concentrazione di 10^{-7} M dall'impermeabilità della membrana agli ioni, da trasportatori attivi e da vari sistemi tampone. Nei tessuti eccitabili, il Ca^{2+} permea principalmente attraverso i canali voltaggio dipendenti della membrana plasmatica (VOCCS). Essi generalmente sono chiusi quando la membrana plasmatica è al suo potenziale di riposo e si aprono in conseguenza di una depolarizzazione. Studi funzionali hanno identificato due tipi di canali del Ca^{2+} , i primi attivati da piccole depolarizzazioni e rapidamente inattivati (canali di tipo T o LVA), i secondi attivati da grandi depolarizzazioni (canali HVA). I canali di tipo L sono canali eteromultimerici di tipo HVA, costituiti di cinque subunità: α_1 , α_2 , β , γ e δ . La subunità α_1 è la più voluminosa (~190kDa), è formata da quattro domini identici che attraversano la membrana plasmatica costituendo il poro di permeazione per lo ione, pertanto svolge un ruolo funzionale rilevante (Catterall, 2000).

Il ruolo del Ca^{2+} nella maturazione dell'ovocita (Homa, 1995) e nell'accrescimento del follicolo ovarico (Batten, 1981) è ben noto. Si ritiene che la steroidogenesi sia fortemente condizionata non solo dal Ca^{2+} rilasciato dagli organuli citoplasmatici (Hori et al., 1998), ma soprattutto dal flusso dello ione proveniente dall'ambiente extracellulare attraverso i canali VOCCS (Platano et al., 2005). I VOCCS di tipo L e T sono stati caratterizzati funzionalmente solo sulle cellule della granulosa parietale umana (Platano et al., 2005), di gallina (Asem, 2002), di ratto (Tsang and Carnegie, 1984) e di suino (Veldhuis and Klase, 1982). Nella specie equina non sono stati pubblicati studi, né di tipo molecolare né di tipo funzionale, per l'identificazione e caratterizzazione dei VOCCS. Dal punto di vista riproduttivo la specie equina è poliestratale stagionale. La stagione riproduttiva coincide con l'inizio della primavera, quando il fotoperiodo è positivo, la temperatura aumenta e c'è una maggiore disponibilità di cibo. La cavalla differisce da altre specie nelle caratteristiche del suo ciclo estrale: non si osserva, infatti, il caratteristico picco preovulatorio di LH, al contrario manifesta un incremento della concentrazione sierica dell'ormone che permane per parecchi giorni fino alla

comparsa di un picco il giorno successivo all'ovulazione (Whitmore et al., 1973); questi eventi specie-specifici fanno presupporre l'esistenza di meccanismi locali di modulazione della crescita e maturazione del follicolo. Numerosi studi, inoltre, hanno dimostrato che l'entrata del Ca^{2+} nelle cellule endocrine è modulata da ormoni, fattori autocrini/paracrini, neurotrasmettitori, e che tali eventi modulatori sono importanti nel controllo della secrezione (del Mar Hernandez et al., 1999).

La nostra unità di ricerca si è proposta di verificare la presenza dei VOCCS di tipo L sulle cellule della granulosa follicolare equina e di valutare possibili correlazioni tra dimensioni follicolari e stato funzionale degli L-VOCCS.

MATERIALI E METODI

Allestimento del campione

Lo studio è stato effettuato durante la stagione riproduttiva su pool di cellule della granulosa prelevate mediante scraping follicolare da ovaie di cavalle adulte, macellate al locale mattatoio. I pool sono stati ottenuti raggruppando le cellule della granulosa prelevate da follicoli distinti in base al loro diametro in grandi (>20 mm), medi (11-20 mm) e piccoli (6-10 mm), secondo quanto riportato da Hinrichs and Schmidt (2000) per un totale di sei campionamenti. Le cellule della granulosa, dopo lavaggio in PBS, sono state divise in due aliquote utilizzate per lo studio di espressione della subunità α_{1c} del canale del Ca^{2+} di tipo L e per lo studio funzionale.

Western blot

Le cellule sono state congelate in azoto liquido, polverizzate meccanicamente e incubate per 30' a 4°C in PBS/0.1% Triton in presenza dei seguenti inibitori di proteasi: Pepstatina A (1µg/ml), Leupeptina (1µg/ml), Aprotinina (1µg/ml), PMSF (0.1mg/ml), Benzamidina (0.1mg/ml), Calpaina I e II (8µg/ml). Dopo centrifugazione a 10000xg a 4°C, è stato prelevato il sovratanante contenente l'estratto proteico che è stato dosato allo spettrofotometro (Beckman DU 640). Le proteine (50µg/campione) sono state separate mediante SDS-page su gel gradiente preconstituito 4-12% (BioRad, Milano), trasferite su membrana immobilon-P (Millipore, Bedford MA, USA) e ibridate per 18h con anticorpo primario di coniglio anti subunità α_{1c} dei VOCCS di tipo L, purificato per affinità (Chemicon Int. Inc., Temecula, CA) e diluito 1:200. Dopo 3 lavaggi della membrana in 20mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/1% Triton X-100/5% latte non grasso, è stata effettuata l'incubazione per 2h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi diluito 1:5000. L'immunocomplesso è stato rivelato mediante chemiluminescenza (SuperSignal West Pico, Pierce, Milano). Come controllo positivo sono state utilizzate proteine estratte da cervello di ratto. Dopo la rivelazione la membrana è stata incubata per 30' a 37°C in Restore™ Western blot stripping buffer (Pierce USA) e successivamente lavata in 0.01% Tween-20 in PBS per rimuovere l'immunocomplesso. Dopo aver verificato l'efficacia del trattamento di rimozione dell'immunocomplesso, la membrana è stata nuovamente ibridata con anticorpo anti beta-actina diluito 1:20000 e rivelato come descritto precedentemente. La normalizzazione dei segnali di ibridazione è stata effettuata mediante il Software Quantity-One (BioRAD, Milan, Italy) e i dati analizzati statisticamente applicando il test non parametrico di Wilcoxon.

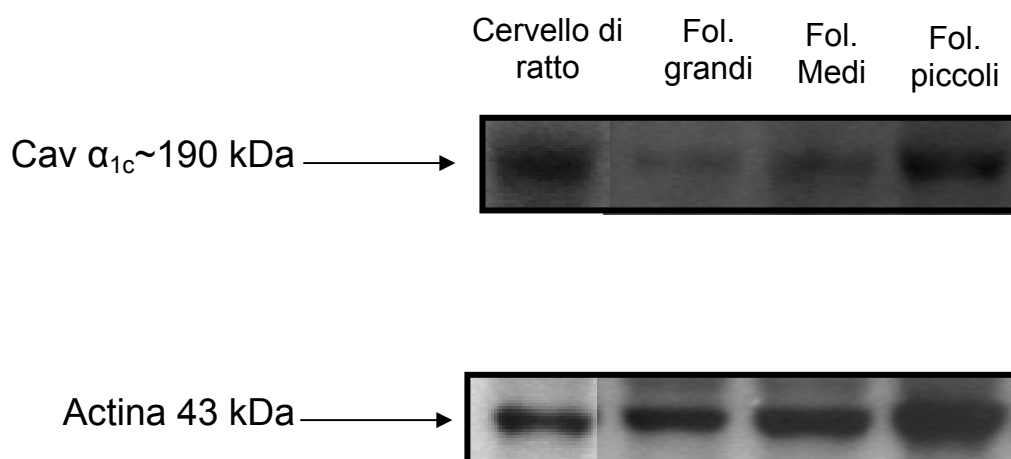
Analisi microspettrofluorimetrica

Le cellule della granulosa di ciascuna classe follicolare sono state incubate per 20h in camera WillCo-dish a 37°C, 5% di CO_2 in terreno di coltura (Dell'Aquila et al., 1997). Per effettuare l'analisi microspettrofluorimetrica il terreno di coltura è stato sostituito con un ugual volume di buffer: 400mg NaCl, 21mg KCl, 15mg Ca^{2+} -diidrato, 50mg Glucosio Anidro, 238mg Hepes, in 50ml H_2O , pH 7.4. La concentrazione intracellulare di calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e le sue variazioni sono state

misurate in tempo reale in ogni singola cellula grazie al sistema di videoimaging computerizzato QuantiCell 900 (Visitech, Sunderland, UK) associato al sistema QC 2000 e al software di analisi delle immagini Image ProPlus (Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA) impiegando il Fura-2 (AM-cell permeant) come indicatore fluorescente. La registrazione del segnale fluorimetrico è stata condotta su cellule in condizioni basali e dopo addizione di Bay K-8644 10 μ M, agonista, e nifedipina 10 μ M, antagonista dei canali di tipo L. Sono stati effettuati controlli negativi (aggiunta di Bay k-8644 e Nifedipina in assenza di Ca²⁺ e in presenza di EGTA nel buffer). La [Ca²⁺]_i è stata determinata come rapporto tra i valori di fluorescenza ottenuti alle due λ d'eccitazione (340 nm, 380 nm) (Grynkiewicz et al., 1985). Sono state osservate circa 60 cellule per tipo di follicolo in 2 prove indipendenti effettuando 2 scansioni al secondo, per un totale di 4 minuti. I dati sono espressi come media delle osservazioni registrate. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test ANOVA ad una via per dati non appaiati. I campioni sono stati considerati statisticamente significativi per P<0.05.

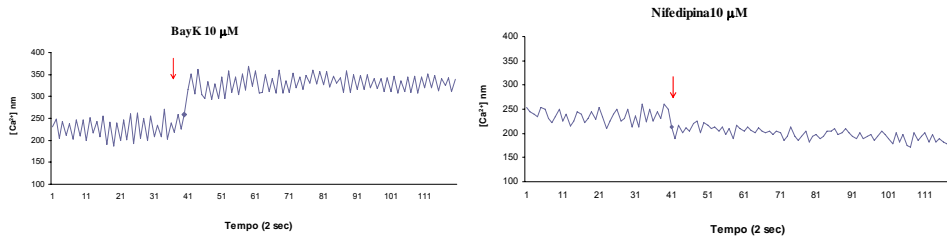
RISULTATI

L'analisi molecolare effettuata mediante western blot ha evidenziato la presenza di una banda positiva di ibridazione delle dimensioni attese in tutte e tre le classi follicolari. L'analisi densitometrica dei livelli di espressione dei canali di tipo L nelle tre classi follicolari non ha rivelato significatività statistica. L'agonista Bay K-8644 e l'antagonista nifedipina, hanno determinato, rispetto alla concentrazione basale, una variazione media della [Ca²⁺]_i statisticamente significativa (P<0,001) nelle tre classi follicolari analizzate. Nei follicoli grandi, l'agonista ha indotto un incremento della [Ca²⁺]_i pari a 101.812 nM, mentre l'antagonista un decremento di 37.97 nM. Nei follicoli medi e piccoli il Bay K8644 ha determinato rispettivamente un incremento di 28.64 nM e 20.80 nM, la nifedipina un decremento di 54.13 nM e 25.96 nM rispettivamente.

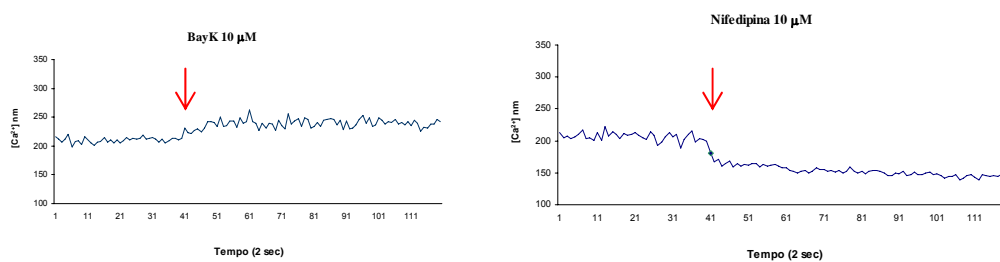


Western blot: Le proteine estratte da cervello di ratto (controllo positivo) e da cellule di granulosa recuperate da follicoli grandi, piccoli e medi sono state sottoposte ad ibridazione con AbI anti Cav α_{1c} (riquadro in alto) e anti actina (riquadro in basso). Il peso molecolare delle proteine attese è indicato dalle frecce.

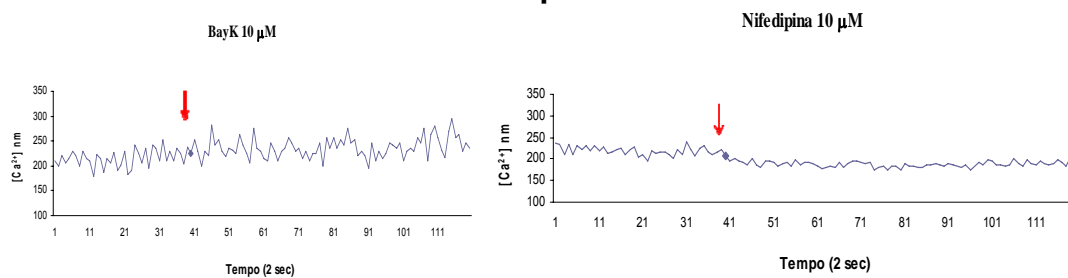
Follicoli grandi



Follicoli medi



Follicoli piccoli



Analisi microspettrofluorimetrica. I grafici mostrano gli effetti dell'agonista e dell'antagonista dei canali HVA di tipo L sulla $[Ca^{2+}]_i$ in cellule della granulosa recuperate da follicoli grandi, medi e piccoli. La freccia indica l'aggiunta della sostanza in esame.

DISCUSSIONE

Lo studio di tipo molecolare e funzionale ha dimostrato per la prima volta in questa specie la presenza dei VOCCS di tipo L sulle cellule della granulosa follicolare equina.

I livelli di espressione della proteina, corrispondente alla subunità α_{1c} , non sono risultati statisticamente differenti nelle tre classi follicolari analizzate. Al contrario sia l'agonista Bay K-8644 che l'antagonista nifedipina hanno determinato rispettivamente un incremento e un decremento statisticamente significativo ($P < 0,001$) della $[Ca^{2+}]_i$ media. È stata osservata una differente variazione della concentrazione dello ione in seguita all'aggiunta dell'agonista/antagonista nelle tre classi follicolari; pertanto i risultati ottenuti lascerebbero presupporre l'esistenza di un sistema regolatore della funzionalità dei canali di tipo L correlato con lo stato funzionale del follicolo durante il suo processo di accrescimento e maturazione.

BIBLIOGRAFIA

- Asem EK, Qin W, Rane SG. Effects of basal lamina of ovarian follicle on T-and L-type Ca^{2+} currents in differentiated granulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E184-E196.
- Batten BE, Anderson E. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} deprivation of cell shape in cultured ovarian granulosa cells. *Am J Anat* 1981; 161:101-14.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage gated calcium channels. *Annu Rev. Dev. Biol.* 2000; 16:521-55.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1997;12(12):2766-2772.
- Del Mar Hernandez M, Garcia Ferreiro RE, Garcia DE, Hernandez ME, Clapp C, Martinez de la Escalera G. Potentiation of prolactin secretion following lactotrope escape from dopamine action. Dopamine withdrawal augments L-type calcium currents. *Neuroendocrinology* 1999; 70:20-30
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260(6):3440-50.
- Hardingham NR, Bannister NJ, Read JC, Fox KD, Hardingham GE, Jack JJ. Extracellular calcium regulates postsynaptic efficacy through group 1 metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 2006;26(23):6337-45.
- Hinrichs K. and Schmidt AL. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology and season. *Biol Reprod* 2000; 62:1402-8.
- Homa ST. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:122-34.
- Hori U., Uemura T., Minaguchi H. Effects of GnRH on protein kinase C activity, Ca^{2+} mobilization and steroidogenesis in human granulosa cells. *Endocr. J.* 1985; 45:175-82.
- Platano D, Magli C, Ferraretti AP, Gianarolo L, Aicardi G. L and T-type voltage gated calcium channels in human granulosa cells: Functional characterization and cholinergic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(4):2192-7.
- Tsang BK. and JA. Carnegie. Calcium-dependent regulation of progesterone production by isolated rat granulosa cells: effects of the calcium ionophore A23187, prostaglandin E_2 , dl-isoproterenol and cholera toxin, *Biol. Reprod.* 1984; 30: 787-94.
- Veldhuis J D and Klase P A. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochem J.* 1982; 202(2): 381-386.
- Whitmore HL, Wentworth BC, Ginther OJ. Circulating concentration of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. *Am J Vet Res* 1973; 34:631-36.

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE: NUOVE PROSPETTIVE NELLO STUDIO DEI CANALI IONICI NELLO SPERMATOZOO MATURO

Bernabò N, Palestini P^{*}), Maccarrone M, Pistilli MG, Falasca G, Gloria A, Mattioli M, Barboni B

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi di Teramo.

^{*}) *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Milano-Bicocca.*

e-mail: nicola.bernabo@tiscali.it

SUMMARY: the TRP channel superfamily is composed by six families of ion channels: TRPCs, TRPVs, TRPMs, TRPMLs, TRPPs and TRPA. Among these molecules, in latest years, TRPV channel attracted the attention of researchers because of their involvement in several biological events. In particular TRPV1 channel have been described in central and peripheral nervous system and in many others cellular systems (keratinocytes, liver, polymorphonuclear granulocytes and macrophages). Recently TRPV1 channel have been identified in swine spermatozoa, were they act as members of the endocannabinoid system. In the present work we showed that TRPV1 channels are active signal transducers during the process of sperm capacitation modulating plasma membrane potential, intracellular calcium concentration and the ratio of actin polymerization. These data open new perspective in the study of sperm biology and may have powerful potential application in pathophysiological and technological research.

INTRODUZIONE: i TRP (“transient receptor potential”) sono una famiglia di canali cationici [1] di cui sono stati identificati 28 geni codificanti. e le cui proteine sono state associate a complessi macromolecolari comprendenti molecole di trasduzione come la proteina G, i recettori ad azione tirosin-chinasica o la fosfolipasi C (PLC) [2]. Attualmente alla superfamiglia dei TRP sono state riferite sei diversi gruppi di canali: i recettori TRP (TRPCs), i recettori vanilloidi (TRPVs), la melastatina (TRPMs), le mucolipine (TRPMLs), le policistine (TRPPs) e la ankyrin transmembrane protein (ANKTM1, TRPA). Tutti i TRP, con la sola eccezione di alcune policistine, presentano sei domini transmembrana che dividono la proteina in due porzioni distinte: il sensore di voltaggio ed il canale/poro [3]. Funzionalmente i TRPV5 e TRPV6 possono essere considerati come canali altamente selettivi per il calcio ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$), i TRPM4b e TRPM5 sono selettivi per i cationi monovalenti ($P_{Ca}/P_{Na} < 0.05$) mentre, tutti i restanti TRP risultano indifferentemente permeabili ai diversi cationi. Tra i canali TRP, particolare attenzione è stata rivolta alla famiglia dei TRPV visto il loro coinvolgimento in diversi meccanismi di “inside-out signalling”. Tali canali sono stati divisi in due categorie: i TRPV1-4 ed i TRPV5-6. Quest’ultimi presentano una limitata omologia con i TRPV1 (circa il 30%) e funzionalmente si comportano come dei veri e propri canali di calcio voltaggio-dipendenti. La loro spiccata selettività per i cationi bivalenti è motivata dalla presenza di residui amminoacidici dotati di carica negativa, come acido aspartico e glutammico, all’interno del canale/poro [4]. Sia TRPV5 che 6 sono stati identificati a livello dell’intestino tenue prossimale e del tubulo collettore del rene, strutture in cui pare siano coinvolti nei processi di “uptake” di calcio [5-6]. I TRPV1-4 sono, invece, canali scarsamente selettivi ($P_{Na}/P_{Ca} \sim 10$), in particolare i TRPV1 sono definiti “heat/proton/lipid/voltage-modulated Ca^{2+} -permeant ion channels” [7]. Questi canali, infatti, possono essere attivati da variazioni di voltaggio così come da incrementi della temperatura ($> 37^{\circ}C$) o da molecole ad attività vanilloide, quali la capsaicina (CPS) o la resiniferatossina. Originariamente sono stati isolati nel sistema nervoso, centrale e periferico, dove è stato loro attribuito un ruolo nella modulazione di diversi stimoli sensitivi di natura nocicettiva, termocettiva e uditiva [8] oltre ad essere stati associati anche alla percezione dello stato di sazietà [9]. Successivamente, la loro presenza è stata documentata in diversi tipi cellulari (cheratinociti, [10]; epatociti, [11]; granulociti polimorfo nucleati [12]; macrofagi, [13]) nonché negli spermatozoi di verro [14]. A questo livello i TRPV1 sono stati messi in correlazione con l’azione modulatoria che il sistema endocannabinoide esercita sugli spermatozoi nelle fasi post-eiaculazione. Negli organismi euteri, al momento

dell'eiaculazione, gli spermatozoi non sono in grado di fecondare l'ocita, prerogativa che acquisiscono solo al termine di una complessa maturazione, denominata capacitazione, che si realizza durante la risalita lungo le vie genitali femminili. Tale processo coinvolge profonde modificazioni che si realizzano a carico della membrana citoplasmatica (incremento della fluidità, riorganizzazione dei lipidi, modificazioni a livello del potenziale transmembranario di riposo), dell'ambiente ionico intracellulare (aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare), del citoscheletro (polimerizzazione dell'actina) così come dell'attività di alcuni enzimi (adenilato-ciclastasi, scramblasi, chinasi ecc.). Al termine di queste trasformazioni gli spermatozoi acquisiscono la capacità di riconoscere la cellula uovo, di aumentare la capacità fusogonica a carico delle membrane così da promuovere l'esocitosi del contenuto acrosomiale e successivamente fondersi con la membrana dell'ocita. Nella specie suina, è stato recentemente evidenziato come il sistema endocannabinoide sia coinvolto prima negli eventi che portano lo spermatozoo verso l'acquisizione del potere fecondante e, successivamente, nel mantenimento nel tempo di questa prerogativa. In particolare, quest'ultima azione si realizza attraverso l'attivazione dei TRPV1 che consentono di stabilizzare, nello spermatozoo capacitato, la struttura acrosomiale dotata di alta fusogenicità. Lo spermatozoo capacitato deve, infatti, essere in grado di mantenersi silente fino al momento dello specifico riconoscimento della cellula uovo, quando stimolato dalle glicoproteine della zona pellucida (ZP), avvia il processo di esocitosi del contenuto acrosomiale, attraversa la ZP e si fonde con l'ooplasma. I TRPV1 sembrano svolgere un ruolo inibitorio sui meccanismi intracellulari coinvolti nella reazione acrosomiale (RA) come dimostrato trattando gli spermatozoi capacitati con la capsazeipina (CPZ). In queste condizioni, gli spermatozoi vanno incontro ad RA in modo aspecifico, rilasciando prematuramente il proprio contenuto enzimatico e perdendo definitivamente la possibilità di riconoscere e fecondare la cellula uovo. Seppure il ruolo biologico di salvaguardia della funzionalità del gamete maschile capacitato sia stato con chiarezza dimostrato, rimane, tuttavia, da chiarire attraverso quali meccanismi intracellulari il TRPV1 operi quest'azione modulatrice. Pertanto, nella presente ricerca si è voluto:

- 1) investigare se e come si modifica la localizzazione del TRPV1 nel gamete maschile durante le trasformazioni che si realizzano dall'eiaculazione al termine del processo di acquisizione del potere fecondante
- 2) valutare gli effetti funzionali esercitati dal TRPV1 sulla cellula spermatica capacitata utilizzando specifiche molecole ad azione agonista (CPS) ed antagonista (CPZ). In particolare, sono stati analizzati effetti promossi su il potenziale transmembranario di riposo, la concentrazione intracellulare di calcio, il grado di polimerizzazione dell'actina.

MATERIALI E METODI: il seme è stato prelevato, lavato dal plasma seminale mediante centrifugazione in gradiente discontinuo di Percoll (35-70%) e diluito in TCM199 con aggiunti Ca^{2+} lattato 2.25mM, Na^+ piruvato 1.25mM e glucosio 13.9mM. La sospensione cellulare è stata incubata a 38.5°C, 5% di CO_2 in atmosfera umidificata per 4h ad una concentrazione di 1×10^8 cellule/ml. Il grado di capacitazione, indirettamente, è stato misurato mediante l'uso di una lectina FITC-coniugata (FITC-PSA) capace di legarsi al contenuto dell'acrosoma. L'integrità strutturale della vescicola acrosomiale ha permesso di documentare la percentuale di spermatozoi capacitati dopo la coincubazione per 30' con preparati di zone pellucide solubilizzate (ZPs) omologhe. Queste, infatti, sono in grado di promuovere la RA esclusivamente negli spermatozoi capacitati. La distribuzione del canale TRPV1 negli spermatozoi prima e dopo il processo di capacitazione è stata studiata mediante tecniche di immunocitochimica. Inoltre per modulare l'attività del canale TRPV1, al termine dell'incubazione, gli spermatozoi sono stati trattati con CPS (1mM) o con CPZ (1mM). Mediante analisi cinetiche eseguite avvalendosi di uno spettroscopio (studi di popolazione) o di un microscopio confocale (studio sulla singola cellula), si sono evidenziati gli effetti promossi dai trattamenti sia sul potenziale transmembranario di riposo, valutato usando uno specifico probe fluorescente (bis-oxonol) che i livelli di $[Ca^{2+}]_i$ analizzati dopo incorporazione della sonda fluorescente Fluo-3-AM. Per ciascun campione è stato analizzato il grado di polimerizzazione

dell'actina, utilizzando una molecola fluorescente in grado di legarsi selettivamente alla F-actina (falloidina FITC-coniugata). La distribuzione intracellulare dell'actina polimerizzata (F-actina) è stata monitorata sulla singola cellula effettuando con il microscopio confocale una ricostruzione 3D del segnale fluorescente utilizzando uno specifico software di analisi d'immagine (LaserPix 4.0, Biorad). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard di almeno tre prove indipendenti.

RISULTATI: l'incubazione degli spermatozoi per 4 h, ha promosso la capacitazione nel 30-40% degli spermatozoi, analogamente a quanto riportato da altri Autori [15]. Mediante l'analisi immunocitochimica è stato possibile identificare due diverse distribuzioni intracellulari del TRPV1: negli spermatozoi eiaculati il recettore si è presentato nell'80.2 \pm 4.8% delle cellule in regione post-acrosomiale (PA), mentre al termine dell'incubazione è prevalsa (50.2 \pm 5.5%) una localizzazione acrosomiale (A). Per valutare se quest'ultima appartenesse alle cellule che avevano raggiunto lo stato di capacitazione, l'analisi immunocitochimica è stata condotta dopo aver esposto i campioni di seme capacitato alle ZPs. In seguito alla co-incubazione si è verificata una perdita della localizzazione acrosomiale che ha interessato specificatamente gli spermatozoi che sono andati incontro alla RA. Inoltre, trattando gli spermatozoi al termine dell'incubazione in vitro con i modulatori del TRPV1 è stata registrata un significativo incremento della RA che si è realizzata in assenza di stimanti fisiologici (CTR 12.5 \pm 1.2% vs. CPS 45.2 \pm 5.6% e CPZ 38.5 \pm 4.4%; $p < 0.001$, test ANOVA). Le analisi funzionali hanno messo in evidenza che la CPS è stata in grado di promuovere una progressiva depolarizzazione del potenziale transmembranario di riposo che si è evidenziata dopo l'introduzione dell'agonista nella camera di registrazione. La CPS è stata, inoltre, capace di determinare un rapido incremento del $[Ca^{2+}]_i$ generando un picco di Ca^{2+} che si è esaurito riportando lo ione su livelli basali pretrattamento dopo mediamente 60 sec. Le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ sono state prevenute quando gli spermatozoi sono stati analizzati in presenza di inibitori dei canali del calcio voltaggio-dipendenti (Verapamil, nichel) o in medium privi dello ione. Al contrario, entrambi i trattamenti non sono stati in grado di modificare le variazioni indotte dalla CPS sul potenziale transmembranario di riposo. L'inserimento nella camera di registrazione di CPZ ha promosso una riduzione dei livelli di $[Ca^{2+}]_i$. Le analisi di popolazione eseguite in spettroscopia hanno consentito di verificare come la CPZ sia stata in grado di ridurre i livelli di $[Ca^{2+}]_i$ portandoli da valori medi di 437.5 \pm 36.2nM a 296.4 \pm 12.1nM ($p < 0.001$, test ANOVA). Infine, il grado di polimerizzazione dell'actina è risultato fortemente correlato al processo di capacitazione; negli spermatozoi incubati in vitro in condizioni capacitanti è stata registrata sia un aumento della presenza di F-actina che una sua rilocalizzazione in regione acrosomiale. Il trattamento con CPS non è in grado di modificare l'assetto citoscheletrico dell'actina che, invece, è stato, profondamente, influenzato dalla somministrazione di CPZ che ha promosso una sua rapida depolimerizzazione.

DISCUSSIONE: gli spermatozoi capacitati sono stati caratterizzati da una ri-localizzazione dei canali TRPV1 che si concentrano in corrispondenza della regione acrosomiale. Questo dato rafforza il risultato funzionale precedentemente riportato [14] secondo il quale il canale diventa operativo solo in fasi avanzate di capacitazione, suggerendone un ruolo nell'ambito dei processi che portano lo spermatozoo verso la fecondazione. Inoltre tale ipotesi sembra rafforzata dai riscontri sperimentali che evidenziano come iperattivando il TRPV1 negli spermatozoi capacitati, mediante la somministrazione di CPS, è possibile evocare un'imponente depolarizzazione della membrana cellulare seguita da un aumento dei livelli di $[Ca^{2+}]_i$, attivando così due vie di signalling intracellulare correlate agli eventi che portano alla RA. L'inibizione del canale, invece, ottenuta con la somministrazione di CPZ, non è stata in grado di promuovere alcun effetto sul potenziale transmembranario di riposo mentre ha determinato una diminuzione dei livelli di Ca^{2+} . In base a quanto osservato, si può affermare che la $[Ca^{2+}]_i$ devono essere regolati con estrema precisione nelle cellule capacitate, visto che un decremento così come un rapido rilascio possono promuovere spontaneamente la RA. Tuttavia, i meccanismi coinvolti nella sua induzione sembrano differire.

Infatti, la riduzione dei livelli della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla CPZ, arriva a promuovere l'esocitosi del contenuto acrosomiale dopo una riduzione del contenuto di $[Ca^{2+}]_i$ a cui si associa la depolimerizzazione dell'actina citoscheletrica. Questo dato sembra confermare quanto ipotizzato da Breitbart et al. [16], secondo cui la polimerizzazione dell'actina nella regione acrosomiale crea negli spermatozoi capacitati una rete di sostegno alla struttura cellulare necessaria per evitare che insorga la fusione tra la membrana acrosomiale esterna e quella plasmatica, che nel frattempo hanno raggiunto un elevato grado di fusogenicità. L'inibizione dei canali TRPV1 potrebbe portare alla perdita prematura dell'integrità dell'acrosoma attraverso la rimozione dal citoplasma di livelli basali di $[Ca^{2+}]_i$ richiesti per mantenere attivo il processo di polimerizzazione dell'actina. Al contrario, un'eccessiva attivazione del recettore, promossa dalla stimolazione con CPS, riesce ad indurre la RA attraverso l'innescamento di quei meccanismi che entrano nel determinismo della RA. Un'iperattivazione del TRPV1 promuove, infatti, un'imponente depolarizzazione della membrana cellulare che si traduce nell'apertura dei canali di Ca voltaggio-dipendente. L'entrata di Ca dall'ambiente extracellulare, è in grado di promuovere nel citoplasma un rapido picco di $[Ca^{2+}]_i$ che innesci l'esocitosi del contenuto acrosomiale mimando quanto fisiologicamente attivano le ZP.

In conclusione, è possibile ipotizzare che i recettori TRPV1 esercitino, attraverso la modulazione del potenziale di membrana, della $[Ca^{2+}]_i$, e del grado di polimerizzazione dell'actina, un'azione complessa volta a regolare i meccanismi che guidano l'esocitosi del contenuto acrosomiale una volta che lo spermatozoo di suino ha acquisito il pieno potere fecondante. Tali dati, aprono nuove prospettive di indagine volte sia ad approfondire la conoscenza sui meccanismi fisiologici coinvolti nell'acquisizione del potere fecondante dello spermatozoo di mammifero sia ad ipotizzare un potenziale coinvolgimento dei TRPV1 nelle sindromi di infertilità maschile inspiegata.

BIBLIOGRAFIA

1. Minke B, Wu C, Pak WL (1975) *Nature* 258: 84-7
2. Clapham DE (2003) *Nature* 426:517-524.
3. Vannier B, Zhu X, Brown D, and Birnbaumer L (1998) *J Biol Chem* 273:8675-8679
4. Clapham D., Julius D, Montell C, Schultz G (2005) *Pharmacol Rev* 57: 427-450
5. Hoenderop JG and Bindels RJ (2005a) *J Am Soc Nephrol* 16:15-26.
6. Hoenderop JG, Nilius B, and Bindels RJ (2005b) *Physiol Rev* 85:373-422
7. Caterina MJ and Julius D (2001) *Annu Rev Neurosci* 24:487-517.
8. Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, and Nuttall AL (2003) *J Neurophysiol* 90:444-455
9. Ahern GP (2003) *J Biol Chem* 278:30427-30434.
10. Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., Travers, J.B. (2003). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 217-222
11. Reilly, C.A., Taylor, J.L., Lanza, D.L., Carr, B.A., Crouch, D.J. Yost, G.S. (2003) *Toxicol. Sci.* 73:170-182
12. Heiner, I., Eisfeld, J., Halaszovich, C.R., Wehage, E., Jungling, E., Zitt, C., Luckhoff, A. (2003) *Biochem. J.* 371: 1045-1053.
13. Chen, C.W., Lee, S.T., Wu, W.T., Fu, W.M., Ho, F.M. & Lin, W.W. (2003) *Br. J. Pharmacol.* 140, 1077-1087.
14. Maccarrone M., Barboni B., Paradisi A., Bernabò N., Gasperi V., Pistilli M.G., Fezza F., Lucidi P., Mattioli M. (2005) *J. Cell Sci.* 118: 4393-404
15. Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil, Neill, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press Ltd
16. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. *Reproduction* (2005) 129:263-268.

DISTRIBUZIONE DEL RECETTORE DEL CALCIO (CASR) NELL'APPARATO GASTROENTERICO DEL VITELLO BUFALINO NEONATO.

DISTRIBUTION OF CA²⁺-SENSING RECEPTOR (CaSR) IN THE GASTROINTESTINAL TRACTS OF NEONATAL CALVES AFTER COLOSTRUM INGESTION.

Pero ME, De Luca A, Lombardi P, Squillacioti C, Mirabella N., *Geibel JP, Avallone L.

Departmento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Delpino, 1, 80137, Napoli, Italia.

*Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University, School of Medicine, 333 Cedar Street, SHM B147, P.O. Box 208026, New Haven, CT 06520-8026, USA.

mepero@unina.it

Abstract

The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) plays an important role in regulating the GIT function in mammals. CaSR is a G protein-coupled cell surface receptor that binds calcium ions and allows cells to react to changes in the extracellular concentration of calcium. It is widely distributed in mammalian tissue which are involved in adsorption and secretion processes. Various aspects of cellular function and processes modulated by CaSR have been reported including increases in intracellular Ca²⁺ activation of MAP Kinase, regulation of growth-differentiation, modulation of gene expression and changes in salt and water homeostasis. The expression and quantitative difference of CaSR were evaluated in different tracts of newborn water buffalo gastrointestinal system after colostrum ingestion during the first week of life in order to clarify the mechanisms by which ruminant gut undergoes to fast and important functional changes that are critical for calf survival. Results showed that CaSR is expressed all along the GIT from buffalo calves. Real time RT PCR showed that the receptor activity decreases according to age, being highly expressed soon after birth (up to 36h). Such result supports the hypothesis that CaSR may be involved in regulating its function especially during colostrums absorption time which is critical for calf survival.

Introduzione

Il recettore calcio (CaSR) è una molecola di superficie accoppiata ad una proteina G che lega gli ioni calcio permettendo alle cellule di reagire ai cambiamenti della sua concentrazione intracellulare (Brown EM et al., 1993; Brown EM, 1991). Il CaSR regola numerosi processi cellulari, agendo verosimilmente attraverso le vie di traduzione del segnale. Il suo ruolo nella regolazione della secrezione di paratormone (PTH) e calcitonina (CT) è ben caratterizzato ed il controllo a feedback di questi ormoni da parte del Ca⁺⁺ è di cruciale importanza nell'omeostasi sistemica del Ca⁺⁺ stesso.

Il CaSR è coinvolto anche nella secrezione di ormoni che non partecipano direttamente al controllo dell'omeostasi sistemica come la gastrina, l'ACTH, l'ormone della crescita e l'insulina. Inoltre è noto che elevate concentrazioni di Ca⁺⁺ stimolano la secrezione del peptide correlato al PTH (PTHrP) da parte di vari tipi di cellule. Diversi autori sostengono che il CaSR possa regolare tre processi molto importanti per la vita cellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ovvero la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Inoltre, esso è implicato nei processi di mineralizzazione, coagulazione, regolazione dell'attività enzimatica, della permeabilità e dell'eccitabilità di membrana. Altri autori sostengono che il CaSR possa essere coinvolto nella differenziazione cellulare dell'epitelio alveolare mammario, delle cripte del colon e di vari distretti

dell'intestino (Brown E M. 2001). L'espressione del CaSR è stata ben caratterizzata nell'apparato gastrointestinale (GIT) di diverse specie animali quali mammiferi, pesci ed uccelli e la sua attività è stata correlata con i processi di secrezione e assorbimento (Hebert S.C., et al., 2004). In particolare, mentre nei pesci il CaSR è espresso sulla porzione apicale delle cellule epiteliali dello stomaco e dell'intestino, negli anfibi, è localizzato nella porzione basale (Cima RR et al., 1997; Diaz R., et al., 1997). Nei mammiferi è stata effettuata una caratterizzazione più completa della distribuzione del recettore nei vari tratti del GIT e nei plessi nervosi di Meissner e Auerbach (Cheng SX et al., 2002). Infatti sembrerebbe che il colon possa assorbire e secernere calcio in risposta ai cambiamenti della sua concentrazione e dei livelli di vitamina D3. Inoltre il CaSR è espresso nelle cellule parietali e nelle cellule G secernenti gastrina intervenendo nel rilascio di questo ormone (Hebert SC., et al. 2004). La letteratura riguardo la presenza del CaSR nel neonato è molto carente. Per questo motivo, considerata l'importanza che l'assorbimento del calcio ha per numerosi processi fisiologici, lo scopo di questo studio è stato di valutare la distribuzione del CaSR nel GIT del vitello bufalino neonato durante la prima settimana di vita e di valutare eventuali differenze quantitative tra i diversi tratti e in relazione all'età.

Materiali e Metodi

Animali

Per questo studio sono stati utilizzati 10 vitelli bufalini neonati di età compresa tra le 6 e le 168 ore di vita. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi (gruppo I: 6- 36 ore di vita, gruppo II: 36-168 ore di vita). I soggetti, tutti di sesso maschile, sono stati alimentati con colostro materno per tutto il periodo che ha preceduto la sperimentazione. I tessuti (abomaso, duodeno, digiuno, ileo e colon) sono stati prelevati, lavati con soluzione fisiologica al fine di eliminare residui di sangue e tagliati in sezioni più piccole (1cm x 1cm).

Reazione di immunofluorescenza

I tessuti sono stati fissati in Bouin (acido picrico, formalina al 10%, acido acetico) e inclusi in paraffina. La reazione di immunofluorescenza è stata effettuata su sezioni di 5-7 micron ottenute al microtomo (Leica RM2235) e montate su vetrini Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Le sezioni sono state prima deparaffinate (60-80°C over night) e poi reidratate secondo il seguente schema (ETOH 100%-80%-60%-40%20%). Su ogni sezione, prima della reazione, venivano effettuati lavaggi con Tris Buffer (TBS) e un pretrattamento al microonde a 700W con una soluzione Citra Microwave Solution (Biogenex. San Ramon, CA) per aumentare la disponibilità dei siti antigenici. Dopo trattamento con SDS all'1%, i vetrini sono stati lavati con BSA/PBS, incubati con una soluzione di TBS/BSA 10% goat serum per 30 minuti e per tutta la notte con l'anticorpo primario policlonale anti-CaSR (1/100 prodotto dal laboratorio del prof. JP Geibel del Dipartimento di Fisiologia Cellulare e Molecolare della Yale University, USA). Dopo diversi lavaggi in PBS è stato aggiunto l'anticorpo secondario Alexa 594 anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) diluito 1:5000 (goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La fluorescenza è stata valutata con un microscopio confocale Zeiss Axiovert, Microsystem LSM (Germany).

Real time RT-PCR

L'RNA è stato estratto con TRIZOL (Sigma, Italy) da tutti i tratti del GIT di entrambi i gruppi di animali. L'integrità dell'RNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'RNA totale (1µg) è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando kit della Applied Biosystem secondo protocollo. Il disegno dei primer è stato effettuato con programma Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). I primer utilizzati sono riportati di seguito: CasR (forward) 5'-TAGCGCCTTGACCAAACAC-3', CasR (reverse) 5'-AAGCTCCGGGAATTAGACACTACA-3', GADPH (5'-TCC ACC CAC GGC AAG TTC-3'), GADPH (5'-TGA CGA GCT TCC CGT TCT CT-3') e sono stati disegnati sulla sequenza CaSR bovina (NM174002.) e GADPH bovina (AY 974798). Per verificare l'efficienza della retro-trascrizione (RT) ed escludere contaminazioni da

DNA un frammento di cDNA di β -actina (NC 007326) è stato amplificato con dei primer disegnati su un tratto di sequenza contenente un introne. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%. La real time è stata utilizzata per valutare le differenze quantitative del recettore calcio nei diversi tratti del GIT a varie età. L'espressione dell'mRNA del recettore è stata analizzata mediante ABI PRISM 7400 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Le condizioni di Real time sono state le seguenti: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 s e annealing/estensione a 60°C per 1 min. I pozzetti con un volume finale di 25 μ l contenevano 1 μ l di cDNA (40ng). Inoltre sono stati effettuati tre replicati per ciascun campione e per il controllo endogeno. I dati sono stati elaborati mediante il metodo comparativo secondo Livak e Schmittgen 2001. Per le analisi statistiche è stato utilizzato il test di Student's.

Risultati e Conclusioni

La figura 1 mostra i risultati relativi alla distribuzione del recettore calcio nell'abomaso, nel piccolo e nel grande intestino. Per quanto riguarda l'abomaso, il CaSR è espresso sia sulle cellule dell'epitelio della mucosa (Fig.1.A) che a livello delle ghiandole del fondo (Fig. 1B) in posizione basolaterale.

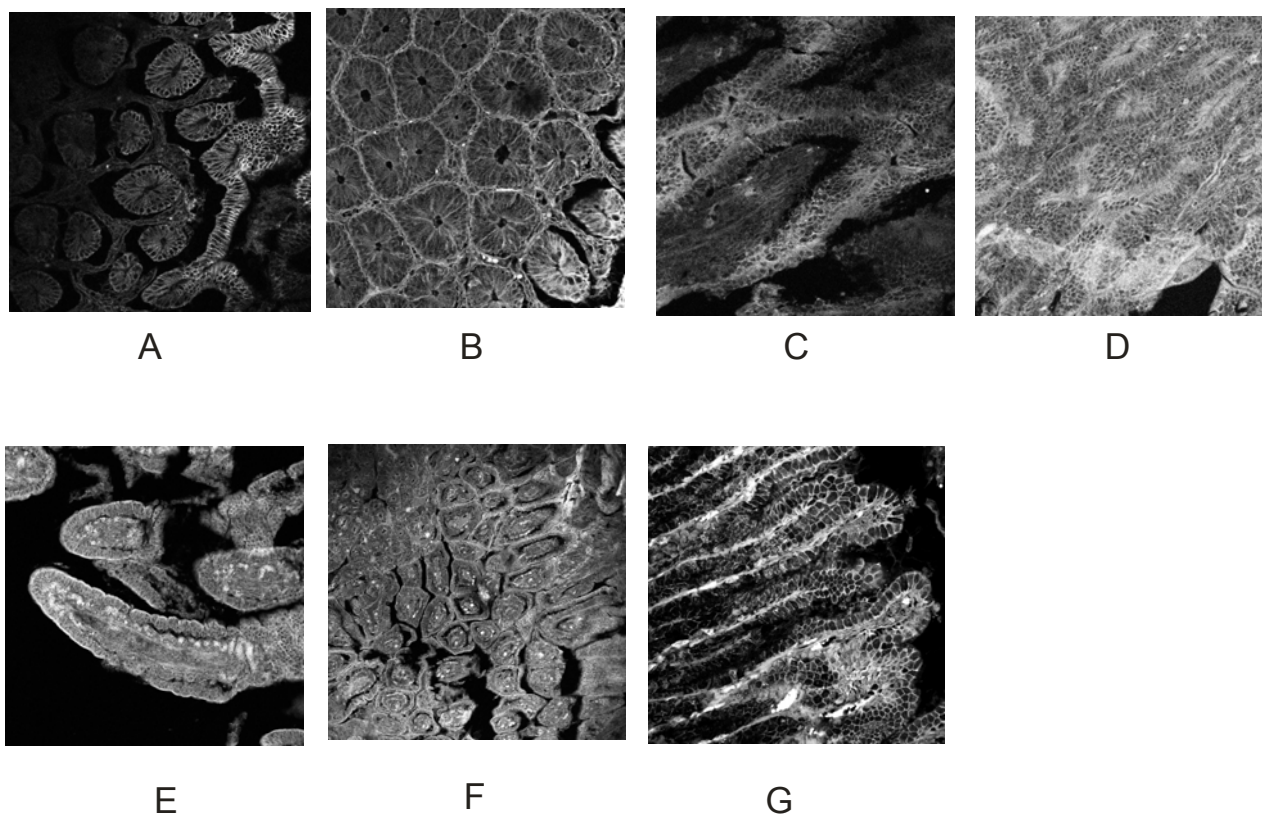


Figura 1. *Espressione del recettore calcio (CaSR) nell'apparato gastroenterico di vitello bufalino neonato. A. Epitelio dell'abomaso; B. Ghiandole del fondo dello stomaco. C. Sezione trasversale del duodeno D. Ghiandole di Lieberkuhn. E. Villo intestinale del digiuno F. Sezione trasversale del digiuno; G Colon;*

Nel tratto duodenale (Fig.1 C, sezione trasversale di un villo) il CaSR si osserva in posizione basolaterale dell'epitelio dei villi intestinali. La sua distribuzione è omogenea in tutte le sezioni del duodeno osservate (tratto ascendente, discendente e trasverso). Inoltre, nello stesso tratto il recettore si localizza a livello delle ghiandole del Lieberkuhn (Fig.1.D), sempre in posizione basolaterale. Per

quanto riguarda il digiuno, la distribuzione del recettore è meno omogenea e pur essendo presente lungo tutto il villo intestinale, mostra una maggiore espressione nella porzione apicale (Fig. 1 E). La posizione del recettore in questo tratto è sempre basolaterale come si può osservare nella sezione trasversale (Fig.1 F). Il colon rappresenta il tratto con una maggiore espressione del recettore che si localizza sulla porzione apicale e basolaterale delle cripte (Fig 1 G). Le reazioni di immunofluorescenza effettuate in entrambi i gruppi di animali per tutti i tratti del GIT mostrano una distribuzione sovrapponibile. Lievi differenze qualitative sono state osservate alle diverse età (data not shown). I risultati relativi alla Real time RT-PCR hanno permesso di valutare differenze significative tra i due gruppi di vitelli (6-36 e 36-168 ore di vita). Più precisamente i dati real time indicano che la concentrazione del mRNA del CaSR tende a diminuire con l'età. In conclusione possiamo dire che tutti i tratti del GIT esprimono il recettore calcio in quantità omogenea come evidenziato sia dalla reazione di immunofluorescenza che dalla Real time RT-PCR. Le differenze tra i due gruppi potrebbero rafforzare l'ipotesi che alla nascita l'epitelio intestinale presenta una maggiore permeabilità che tende a diminuire con il tempo (Matte JJ., et al., 1982). È noto, infatti, che nelle prime ore di vita il GIT subisce una serie di modificazioni morfologiche e funzionali necessarie per favorire i processi di assorbimento di diverse componenti nutritive contenute nel colostro, in particolare delle immunoglobuline, indispensabili per l'acquisizione dell'immunità passiva. Numerose, comunque, sono le molecole in grado di influenzare l'attività del CaSR. Tra queste ricordiamo i fattori di crescita ed altre molecole correlate ai processi di differenziazione e specializzazione dell'epitelio intestinale.

Per questo motivo, la corretta funzionalità intestinale è fondamentale per la sopravvivenza del neonato di qualsiasi specie ed il chiarimento dei meccanismi coinvolti nel processo di assorbimento è di importanza basilare sia per la sopravvivenza del vitello che per le sue future performance produttive e riproduttive.

Bibliografia

Brown E.M. Extracellular Ca(2+)-sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca 2+ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol. Rev.* 71:371-411, 1991; *Brown E.M.* and *McLeod R.J.* Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling. *Physiol Rev* 81: 239-297, 2001; *Brown, E.M.*, *Gamba G.*, *Riccardi D.*, *Lombardi M.*, *Butters R.*, *Kifor O.*, *Sun A.*, *Hediger M.A.*, *Lytton J.*, *Hebert S.C.* Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 366: 575-580, 1993; *Cheng SX.*, *Okuda M.*, *Hall AE.*, *Geibel JP.*, *Hebert SC.* Expression of calcium-sensing receptor in rat colonic epithelium: evidence for modulation of fluid secretion. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol)* 283(1):G240-50, 2002; *Cima RR.*, *Cheng I.*, *Klingensmith ME.*, *Chattopadhyay N.*, *Kifor O.*, *Hebert SC.*, *Brown EM.*, *Soybel DI.* Identification and functional assay of an extracellular calcium-sensing receptor in *Necturus* gastric mucosa. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol)* 273: G1051-1060, 1997; *Diaz R.*, *Hurwitz S.*, *Chattopadhyay N.*, *Pines M.*, *Yang Y.*, *Kifor O.*, *Einat MS.*, *Butters R.*, *Hebert SC.*, *Brown EM.* Cloning, expression, and tissue localization of the calcium-sensing receptor in chicken (*Gallus domesticus*). *Am J Physiol.* 273(3 Pt 2):R1008-16, 1997; *Hebert C.V.*, *Cheng S.*, *Geibel J.* Function and roles of the extracellular Ca 2+-sensing receptor in the gastrointestinal tract. *Cell Calcium* 25: 239-247, 2004; *Matte JJ.*, *Girard CL.*, *Seoane JR.* Absorption of colostrum immunoglobulins G in the newborn dairy calf *J.Dairy Sci* 65(9):1765-70, 1982.

METODI PER MISURARE L'ATTENZIONE SELETTIVA SOCIALE NEL CANEMongillo, P¹, Marinelli, L¹, Zebele, A², Bono, G¹¹Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, ²Dipartimento di Psicologia Generale,
Università degli Studi di Padova
e-mail: paolo.mongillo@unipd.it

Deficit di attenzione del cane potrebbero compromettere la relazione con il proprietario ed essere all'origine di problemi comportamentali. La capacità attentiva selettiva è importante nelle interazioni sociali, in particolar modo in un contesto complesso quale quello umano. Un metodo che valuti nel cane la capacità di attenzione selettiva nei confronti di uno stimolo sociale potrebbe essere utile per capire il suo ruolo nella relazione cane-uomo.

Materiali e Metodi

Scopo del presente studio è sviluppare uno strumento per misurare nel cane l'attenzione sociale selettiva nei confronti del proprietario. A tal fine sono stati sviluppati due test comportamentali di crescente difficoltà: nel test A (N=25) il cane osserva il proprietario (P) ed una persona estranea (E) entrare ed uscire ripetutamente dalla stanza attraverso due diverse porte; nel test B (N=18) il compito è reso più complesso dal fatto che la testa di P ed E è coperta da un cappuccio. Terminata la procedura (120 s), il cane è libero di dirigersi verso l'ultima porta usata da P o da S per lasciare la stanza. Particolare cura è stata prestata al fine di evitare l'uso di indizi olfattivi al momento della scelta e l'ordine di somministrazione dei test e delle porte di uscita è stato assegnato casualmente. Il livello di capacità attentiva è stato misurato come durata relativa del contatto visivo verso P ed E, durata media di un singolo sguardo verso P ed E e direzione scelta al termine della procedura. Infine, i livelli di disattenzione e di attività-impulsività sono stati valutati mediante un questionario (Vas et al. 2007), opportunamente tradotto e validato in italiano.

Risultati

Nel test A l'attenzione dei cani è stata rivolta significativamente più verso P che verso E (durata relativa contatto visivo=72,9±14,5% vs 18,2±11,3%; durata sguardo=4,2±1,9s vs 1,1±0,5s rispettivamente; Test T per campioni indipendenti; P<0,001) e risultati simili si sono osservati nel test B (durata relativa contatto visivo=68,5±12,0% vs 23,7±9,9%; durata sguardo=3,8±1,6s vs 1,4±0,6s rispettivamente; P<0,001). Nonostante ciò, il confronto tra test A e B eseguiti da uno stesso cane ha evidenziato una riduzione dell'attenzione verso P e un contemporaneo aumento dell'attenzione verso E nel test B (Test-T per campioni appaiati, P<0,05), in particolare quando sia P che E si trovavano all'interno della stanza (durata relativa contatto=24,7±10,5% vs 17,5±10,0%; P<0,05). La ridotta attenzione selettiva durante il test B è confermata anche dall'incapacità dei cani di focalizzarsi sull'ultima porta usata da P e di dirigersi verso di essa al termine del test, cosa che invece si verifica in maniera significativa al termine del test A (Test binomiale; P<0,005). È interessante notare che gli unici quattro cani che non hanno scelto la direzione corretta al termine del test A hanno ricevuto un punteggio significativamente maggiore per quanto riguarda il livello di attività-impulsività (3.5±0.1 vs 3.0±0.8; P<0,01).

Conclusioni

I risultati confermano che questi test possono essere applicati allo studio dell'attenzione sociale selettiva nel cane. È tuttavia necessario aumentare la casistica al fine di chiarire se i diversi gradi di difficoltà forniscano uno strumento più sensibile, da applicare in diversi contesti.

Bibliografia

Vas, J., Topál, J., Péch, E., Miklósi, A. 2007. Measuring attention deficit and activity in dogs: A new application and validation of a human ADHD questionnaire. *Applied Animal Behaviour Science*, 103, 105-117.

VALUTAZIONE DELLA REATTIVITA' COMPORTAMENTALE DI CAVALLI ADIBITI ALLA RIABILITAZIONE EQUESTRE DI SOGGETTI CON DIFFERENTI DISABILITA'. INFLUENZE DELLE CONDIZIONI DI MANAGEMENT.

Malara L., De Pasquale A., Ingala A., Innella G., Luigiano G., Panzera M.

Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate;
 Sezione di Fisiologia applicata ed Etologia comparata.
 Università degli Studi di Messina.

Nell'ambito delle terapie svolte con l'ausilio degli animali si colloca la *terapia con il mezzo del cavallo (T.M.C.)*, intesa come un complesso di tecniche per la riabilitazione di pazienti con specifici danni sensoriali, cognitivi e comportamentali.

Considerata l'esiguità dei dati bibliografici relativi alla valutazione dell'influenza delle condizioni di management sulla reattività comportamentale dei cavalli adibiti alla TMC, abbiamo ritenuto interessante indagare tale aspetto sia durante l'attività terapeutica che a riposo.

Il campione di soggetti da noi utilizzato, in questa prima fase di indagini, era costituito da n° 8 cavalli mantenuti in tre differenti condizioni di management.

Management di tipo 1 (n°2 soggetti): utilizzo esclusivo per le attività terapeutiche senza possibilità di interazioni intra ed interspecifica al di fuori delle sedute di TMC. I soggetti di questa tipologia erano stabulati in box.

Management di tipo 2 (n°3 soggetti): svolgimento di attività motoria aggiuntiva e opportunità di effettuare interazioni sociali intra ed interspecifiche.

Management di tipo 3 (n° 3 soggetti): liberi al paddock durante l'intera giornata, svolgimento giornaliero di attività di maneggio.

A tutti i soggetti è stata rilevata la frequenza cardiaca (FC) attraverso un cardiografometro telemetrico Polar S610i, prima e durante le sedute terapeutiche e durante un test di novità (*novel object test*).

In questa prima fase della ricerca, è stato possibile effettuare un'adeguata e compiuta indagine statistica solo nei confronti dei seguenti quadri nosografici: autismo (n. 14 soggetti), sindrome di Down (n. 8 soggetti), problemi relazionali (n. 16) e ritardo psicomotorio (n. 11 soggetti).

Utilizzando il test statistico non parametrico di Kruskal-Wallis, abbiamo ottenuto differenze statisticamente significative riguardo i confronti tipo 1 vs tipo 2 ($P < 0.001$) solo per i pazienti affetti da autismo

Al fine di valutare il contributo individuale alle differenze statisticamente significative rilevate, abbiamo utilizzato il test di Mann-Whitney. Da tale confronto sono emerse differenze statisticamente significative anche tra i soggetti appartenenti alla stessa tipologia di management.

Considerando che i confronti statistici relativi ai pazienti affetti da sindrome di Down e da problemi relazionali e ritardo psicomotorio sono risultati statisticamente non significativi - sia intragruppo che intergruppo - appare del tutto evidente che proprio nella sfera delle relazioni empatiche interspecifiche l'idoneità del management è il requisito fondamentale. Un altro aspetto, a nostro parere, meritevole di considerazione, riguarda i risultati ottenuti nel test di novità.

Indipendentemente dall'assenza di differenze statisticamente significative tra i valori medi totali minimi, medi e massimi della frequenza cardiaca, nelle tre differenti tipologie di management, si sono evidenziati considerevoli scarti tra il valore della frequenza media e quello della frequenza massima. Nei soggetti appartenenti alle tipologie di management 1 e 2, la frequenza massima si attesta su valori pressoché doppi rispetto a quelli della frequenza media, mentre nei soggetti appartenenti alla tipologia di management 3 essa aumenta di circa il 50%.

Riteniamo plausibile interpretare la risposta neurovegetativa e comportamentale dei soggetti della tipologia 3 come reazione di investigazione, sottesa alla soglia di attenzione ed allerta, mentre quella dei soggetti appartenenti alle tipologie 1 e 2 come reazione di allarme e atteggiamento di paura.

Il primo tipo di risposta è tipico dei soggetti con buoni livelli di investigazione e curiosità, il secondo tipo di risposta è tipico dei soggetti che temono le novità, non le investigano, ma le evitano.

STUDIO FUNZIONALE SUI Ca_v DI TIPO L NELLA GALLINA OVAIOLA DURANTE L'OVODEPOSIZIONE E LA MUTA

E. Micera², L. Laporta¹, N. C. Surdo², M. Albrizio², G. Di Modugno¹, A. Zarrilli²

*1*Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.
*2*Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.

e-mail: a.zarrilli@veterinaria.uniba.it

Lo ione Ca^{++} risulta coinvolto nella trasmissione di importanti segnali da diversi distretti dell'organismo alle cellule della granulosa e da queste ultime all'ocita durante l'intero processo di sviluppo follicolare (Cecconi et al., 2004). Affinché il Ca^{++} possa tradurre segnali di varia natura in eventi fisiologici è in molti casi essenziale l'attività dei Ca_v distinti in HVA-high voltage activated (L-N-P-Q-R-type) ed LVA-low voltage activated (T-type). Nella granulosa di pollo i Ca_v di tipo L sono stati identificati con la tecnica del patch-clamp (Schwartz et al., 1989; Asem et al., 2002) e in particolare proprio al Ca^{++} che permea tramite questi canali viene attribuita la fase di mantenimento della secrezione dell'LH (Stojilkovic et al., 1992). Considerata l'importanza che svolgono i follicoli ovarici nell'attività produttiva delle galline ovaiole, abbiamo ritenuto interessante indagare funzionalmente i Ca_v L-type in cellule in coltura della granulosa di galline ovaiole sia nel periodo di attività produttiva che durante la fase di muta. Abbiamo pertanto monitorato i flussi di Ca^{++} attraverso la membrana in presenza di Bay K-8644, agonista specifico dei Ca_v L-type. L'esperienza è stata condotta su galline ovaiole Isa Brown di età compresa tra i 22 e 24 mesi, allevate in capannoni con sistema di stabulazione in gabbie, situati in agro di Bitritto (BA). I soggetti sono stati suddivisi nel gruppo A, costituito da 4 animali in ovodeposizione, mantenuti con un programma di illuminazione di 15/h luce e 9/h buio, con la possibilità di accedere ad alimento ed acqua ad libitum, e gruppo B, anch'esso formato da 4 individui, in muta forzata secondo quanto indicato dal metodo California (Len et al., 1964). Dall'ovaio di tutti gli animali sono stati isolati i follicoli bianchi (Mehiong et al., 2006) con dimensioni comprese tra 4-7 mm di diametro. Da ogni singolo follicolo sono state isolate le cellule della granulosa, prelevate secondo quanto descritto da Gilbert (1977) e sottoposte al test di vitalità mediante colorazione con Tripan blue (Wuxan et al., 2000). Successivamente le cellule sono state incubate per 24 h con CO_2 al 5% in micropiastre Will Co Dish Kit. La misurazione della $[Ca^{++}]_i$ in ogni singola cellula è stata calcolata mediante l'utilizzo di un microspettrofluorimetro QuantiCell 900 (Visitech, Sunderland, UK) dotato di sistema QC 2000 system e di Image ProPlus software (Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA). La registrazione del segnale fluorimetrico (1 frame ogni 2 secondi) è stata condotta su cellule in condizioni basali e dopo addizione del Bay K-8644 1 μ M (Shin et al., 2004). Nel gruppo A l'aggiunta di Bay K-8644 ha evidenziato un incremento della $[Ca^{++}]_i$ altamente significativo ($P < 0.001$), diversamente lo stesso agonista non ha indotto variazioni statisticamente rilevanti nel gruppo B. Sia per la granulosa delle galline del gruppo A che del gruppo B sono stati effettuati controlli negativi (aggiunta di Bay k-8644 in assenza di Ca^{++} nel medium). Da questo studio emerge una importante risposta funzionale dei Ca_v L-type durante l'attività produttiva e una notevole riduzione dell'attività degli stessi durante la muta. In conclusione riteniamo che l'articolato e complesso meccanismo regolatorio di equilibri autocrini, paracrini ed endocrini del ciclo ovarico di questa specie, caratterizzato da alti livelli di LHRH, LH, progesterone e 17 β -estradiolo durante il periodo di ovodeposizione (Etches et al., 1981) che si riducono drasticamente durante la muta (Tanabe et al., 1982), vede probabilmente coinvolti i Ca_v L-type, nella loro diversa risposta funzionale, e il Ca^{++} come secondo messaggero.

BIBLIOGRAFIA: Asem E.K. et al. 2002, Am Journal Physiology Endocrinology Metab. Jan; 282(1): E184-196. Cecconi S. et al. 2004, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology; 115S 19-22. Etches, R. J. et al. 1981, Advances of Avian Endocrinology, Vol 33 Pergamon Press, New York, pp. 89-98. Gilbert A.B. et al. 1977, J Reprod Fertil; 50: 179-181. Len R.E. et al. 1964, Poultry Sci. 43:638-646. Meihong D. et al. 2006, Journal of reproduction and development, vol.52,no.4,569-576. Schwartz J.L. et al. 1989, Endocrinology Oct; 125(4): 1973-1982. Shin E.J. et al. 2004, Behavioural Brain Reserch. 15, 267-276. Stojilkovic S.S. et al. 1992, Journal Steroid Biochem Molecular Biology; 41, 453-467. Tanabe H. et al. 1982. Aspects of Avian Endocrinology, Texas Tech University, Lubbock, pp. 191-199. Wuxuan Q. et al. 2000, Am J. Physiol Cell Physiol 279:C319-325.

CAPACITA' DIFFERENZIATIVA DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs) OVINE

Czernik M., Sardi M., Ptak G., & Loi P.

Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi di Teramo,
Piazza A. Moro 45, 64100, Teramo
E-mail: ploii@unite.it

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono un'importante popolazione cellulare presente nel microambiente del midollo osseo. Tali cellule sono caratterizzate dalla capacità di differenziarsi in vitro in diverse tipologie cellulari di tipo mesenchimale, proprietà che fa di esse dei potenziali candidati per la terapia con cellule staminali adulte. Scopo di questo lavoro preliminare è stato la caratterizzazione della capacità differenziativa delle MSCs ovine. A tale scopo cellule mononucleate sono state isolate dal midollo osseo di tre pecore adulte e isolate dalle altre tipologie cellulari mediante centrifugazione su gradiente di ficoll. Le cellule sono state coltivate in condizioni standard (38.5 °C in 5% CO₂, in atmosfera umidificata) in medium alfa-MEM contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) fino allo stadio di confluenza. Le cellule sono state mantenute allo stadio di confluenza per 3-5 giorni prima di indurre la differenziazione adipogenica con medium alfa-MEM contenente dexametasone 1µM, metil-isobutixantina 0.5 mM, insulina 10mg/ml, indometacina 100 mM e 10% FBS. Le cellule sono state incubate nel medium di differenziazione per 72 h. Successivamente, la coltura è stata proseguita con medium alfa-MEM contenente 10 µg/ml insulina e FBS 10%. Quali parametri di effettiva differenziazione cellulare sono stati adottati il fenotipo, e la positività a colorazioni specifiche per i lipidi (Oil O Red), valutata a 21, 30 e 35 giorni di coltura. Cellule con un chiaro fenotipo adipocitico sono comparse già dopo 21 giorni di coltura (30%), aumentando progressivamente nei controlli successivi (~ 50% e 70% a 30 e 35 giorni rispettivamente), mentre nei fibroblasti ovinuti utilizzati come controllo negativo la percentuale di differenziazione è stata pari allo 0%. Questi risultati confermano la plasticità differenziativa delle MSCs ovine, e costituiscono un primo contributo per lo sviluppo di un modello pre-clinico ovino per testare sicurezza ed efficacia della terapia con cellule staminali.

Ringraziamenti: lavoro realizzato con finanziamenti PRIN 2006 e European Science Foundation EUROCORES Programme EuroSTELLS, contract no. ERAS-CT-2003-980409

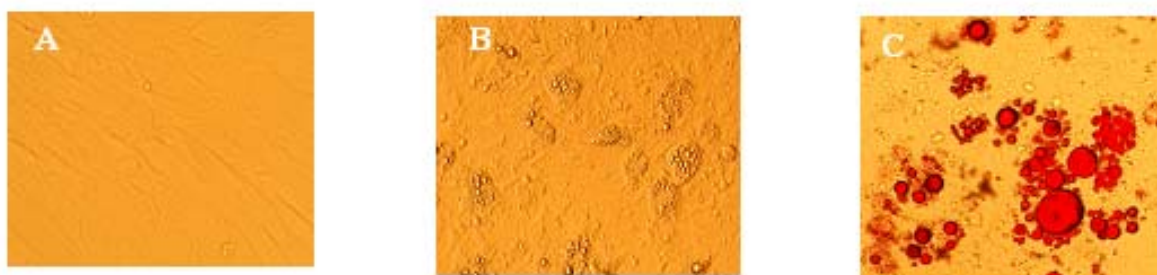


Fig.1. A- Cellule staminali mesenchimali, B- fenotipo adipogenico dopo 35 gg in medium di differenziazione, C - positività degli adipociti alla colorazione Oil O Red.

VALUTAZIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE IN PIASTINE DI CANI SANI ED AFFETTI DA LEISHMANIOSI

EVALUATION OF INTRACELLULAR CALCIUM IN PLATELETS FROM HEALTHY AND LEISHMANIOTIC DOGS

d'Angelo D., Pelagalli A., Ma stellone V., Cestaro A., Bruno R., Lombardi P., Avallone L.

Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Delpino, 1, 80137, Napoli, Italia. E-mail: dandange@unina.it

Le piastrine rappresentano gli elementi cellulari fondamentali per il processo di regolazione dell'emostasi. La loro interazione con l'endotelio vasale riveste un ruolo fondamentale sia nella fisiologia che nella fisiopatologia della coagulazione. fisiologicamente, infatti, le piastrine hanno la capacità di aderire alla parete del vaso solo dopo attivazione da parte dell'endotelio vasale. In condizioni patologiche, come quelle causate dalla rottura di una placca aterosclerotica, le piastrine aderiscono all'endotelio, si attivano e reclutano numerose altre piastrine per la formazione del tappo piastrinico. In medicina veterinaria, diversamente dalla medicina umana, la conoscenza dei meccanismi fisiologici specifici alla base di tali processi è piuttosto scarsa. Le piastrine subiscono fenomeni di attivazione, fra i quali è possibile menzionare, lo shape change, l'attivazione del recettore per il fibrinogeno che causa l'aggregazione delle piastrine, il rilascio del contenuto dei granuli e la produzione di trombossano A2 (Gachet C. et al., 1996, Mills D.C.B., 1996). Tali fenomeni sono mediati da modificazioni del calcio intracellulare che origina dal rilascio di calcio dagli store intracellulari e dall'entrata di calcio dal mezzo extracellulare (Rink T.J. et al., 1985, Rink T.J. et al., 1990). D'altro canto però, sono note numerose patologie nel cane, tra cui forme di Leishmaniosi e/o Ehrlichiosi, che comportano seria compromissione della funzione coagulativa (Harrus S. et al., 1996; Weiss D.J. et al., 1995). La leishmaniosi, in particolare, è una zoonosi largamente diffusa nelle zone costiere del Mediterraneo caratterizzata da una alterazione della coagulazione spesso asintomatica che si inserisce in un quadro sintomatologico estremamente vario. In precedenti ricerche abbiamo mostrato che, in corso di leishmaniosi, si verifica un danno piastrinico di entità variabile che, peraltro, non trova completa risoluzione con le terapie normalmente utilizzate in corso di tale patologia. I meccanismi attraverso i quali l'aggregazione piastrinica risulta alterata in corso di leishmaniosi non sono ancora chiari. Per tale motivo, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare le variazioni di calcio nelle piastrine di cani sani ed affetti da leishmaniosi allo scopo di raggiungere una migliore comprensione dei meccanismi responsabili di alterazioni dell'emostasi in corso di tale patologia.

MATERIALI E METODI

Soggetti impiegati: Per lo studio sono stati utilizzati n. 8 cani sani ed 8 affetti da leishmaniosi, diagnosticata sia clinicamente che mediante l'immunofluorescenza indiretta, di razze miste e di età compresa tra i 3 ed i 6 anni. Gli animali, selezionati in base all'anamnesi e sottoposti ad indagini ematologiche, non avevano ricevuto alcun trattamento farmacologico da almeno 30 giorni. *Preparazione delle piastrine:* Campioni di sangue (10 ml) sono stati prelevati alla medesima ora (8.00) dalla giugulare e posti in provette contenenti sodio citrato (3,8% ed in rapporto di 1:9 con il sangue). Il sangue è stato centrifugato a 800 rpm per 15 minuti al fine di ottenere plasma ricco di piastrine (PRP). Il PRP è stato incubato con Fura 2-AM 2 μ M, acido pluronico allo 0,2% ed aspirina 1mM per 45 minuti a 37°C. Quindi le piastrine sono state centrifugate a 2500 rpm per 15 minuti e risospese in HEPES calcium free. Le piastrine in sospensione, erano opportunamente stimulate con comuni agonisti: Adenosina-5'-difosfato (ADP) (0-10 μ M) e collagene (0-20 γ). Successivamente si è proceduto alla lettura mediante uno spettrofluorimetro Spex con eccitazione 340-380 ed emissione 505-510 in cuvetta termostata a 37°C per la determinazione del calcio intracellulare. Per il calcolo della concentrazione di Calcio intracellulare è stata usata la formula di Grynkiewicz (Grynkiewicz G. et al., 1985).

CONCLUSIONI

I risultati hanno evidenziato che entrambi gli agonisti sono in grado di aumentare le concentrazioni di calcio intracellulare agendo sia sugli store intracellulari che sui canali presenti sulla membrana delle piastrine; tale azione è stata riscontrata sia nelle piastrine dei cani sani che in quelle di cani affetti da leishmaniosi sintomatica. Inoltre, è stato dimostrato che il collagene è in grado di aumentare i livelli di calcio intracellulare rispetto all'ADP agendo sia sugli store intracellulari che a livello di membrana piastrinica. Le differenze osservate tra cani sani e leishmaniotici lasciano ipotizzare che, in corso di leishmaniosi canina, si verifichi una alterazione della funzione legata al calcio intracellulare che potrebbe a sua volta essere responsabile di una alterata espressione dei recettori legati alla sua mobilizzazione e successive alterazioni di eventi fisiologici quali lo shape change, l'attivazione della fosfolipasi A2 e quindi l'aggregazione piastrinica. Il permanere di una ridotta funzionalità piastrinica anche in seguito a trattamento terapeutico potrebbe trovare in questo risultato una sua logica ed aprire la strada a nuove prospettive terapeutiche.

Bibliografia

Gachet C. Hechler B., Leon C., Vial C., Ohlmann P. and Cazenave J.P. *Platelets* 7, 261-267, 1996. Mills D.C.B. *Thromb. Haemostasis* 76, 835-856, 1996. Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R.Y. *J Biol Chem* 260(6): 3440-3450, 1985. Harrus S., Waner T., Eldor A., Zwang E. and Bark H. *Vet Rec* 139(12):290-293, 1996. Moroi M. and Jung S. M. *Front Biosci* 3: 719-728, 1998. Rink T.J. Tsien R.Y., Sanchez A and Hallam T. J. in *Calcium in Biological System* (Robin R. P., Weiss G. B., and Putney J. W. pp 115-164 Plenum Publishing Co, New York, 1985. Rink T.J. and Sage S.O., *Annu. Rev. Physiol.* 52, 431-449, 1990. Weiss D.J., Trent A.M., and Johnston G. *Am J Vet Res* 56: 986-991, 1995

Impiego dell'insulina nel trattamento della forma nervosa di chetosi bovina

Sasso R., Dimatteo S., D'Onghia G.F., Volpe S., Siniscalchi M., Quaranta A.

Dipartimento di Produzione Animale – Università di Bari

Introduzione - La chetosi è un disturbo metabolico a componente neuro-endocrina, provocato da un grave deficit energetico, che si instaura frequentemente nelle bovine da latte a fine gestazione, e particolarmente in quelle ad alta produttività. Tale forma morbosa è caratterizzata da una marcata ipoglicemia e da un aumento di corpi chetonici, derivanti dal metabolismo e dalla conversione dei grassi mobilizzati dalle riserve corporee. L'ipoglicemia accentua la diminuzione della concentrazione ematica di insulina, il cui valore è già particolarmente basso nella bovina in fase di lattazione. L'aumento di glucagone, d'altro canto, incrementa la produzione epatica di chetoni (Baird, 1982). L'ipoglicemia e l'accumulo di acetoacetato, il cui metabolismo dipende dall'insulina, determinerebbero sintomi nervosi di tipo depressivo, mentre l'eccesso di alcool isopropilico, derivante dall'aumentato metabolismo dell'acetone, provocherebbe sintomi nervosi di tipo eccitativo (Ballarini, 1987; Jones e Summer, 2000).

Materiali e metodi - Sono giunte alla nostra osservazione 10 bovine di razza Frisona e Bruna Alpina, di 3°-6° parto, con evidenti sintomi di chetosi di tipo nervoso eccitativo. Gli animali, fra la terza e la sesta settimana *post partum*, manifestavano: barcollamento, deambulazione a testa alta, ruminazione a vuoto, cecità, leccamento compulsivo di oggetti e di parti del corpo fino al sanguinamento, e sono risultati positivi alla ricerca di corpi chetonici nell'urina, mediante impiego di apposito kit (Combur test®). Il campione è stato diviso in due gruppi uguali (A e B) di cinque soggetti ciascuno, e così trattato:

- gruppo A: terapia “classica” con soluzione glucosata al 25% con metionina (500 ml i/v ogni 12 ore per 3 giorni) + glicole propilenico (Izopropionato®, 160 g p. os ogni 12 ore per 7 giorni e poi 160 g al giorno per altri 7 giorni) + desametazone (Fatrocortin®, 10 ml i/v ogni 48 ore per 3 giorni) + vitamina B (Bicomplex®, 20 ml i/v al giorno per 7 giorni);
- gruppo B: terapia con insulina ad azione rapida (Actrapid®, unica dose di 1 ml o 100 UI s/c) + glicole propilenico (Izopropionato®, 160 g p. os ogni 12 ore per 7 giorni e poi 160 g al giorno per altri 7 giorni).

Risultati e discussione - Tutti gli animali hanno mostrato completa regressione della sintomatologia nervosa all'avvio della terapia, ma con tempi medi di recupero significativamente più brevi nel gruppo B rispetto al gruppo A (2 ore vs 11 ore). Inoltre, due bovine appartenenti al gruppo A hanno manifestato nuovamente i sintomi nervosi dopo la sospensione del trattamento cortisonico.

La terapia con insulina e glicole propilenico è risultata altamente efficace nel trattamento della forma nervosa di chetosi bovina, in tempi brevi e senza recidive. I nostri dati confermano i risultati di Sakai e coll. (1993) in quadri clinici di chetosi digestiva con impiego di insulina in associazione a destrosio. L'effetto utile dell'ormone nella forma nervosa potrebbe essere legato all'azione di riduzione della lipolisi e di stimolo della sintesi di trigliceridi: ciò determinerebbe una diminuzione della formazione di corpi chetonici e dei loro derivati, e un incremento del loro utilizzo a livello periferico, con scomparsa dell'azione tossica sul sistema nervoso. Il dosaggio di insulina impiegata è stato basso allo scopo di impedire un aggravamento dell'ipoglicemia (Hayirli et al., 2002), pur garantendo un effetto sul tessuto adiposo che è maggiormente sensibile all'ormone rispetto ad altri tessuti. L'associazione con glicole propilenico, sostanza glucogenetica, protegge dai rischi di shock ipoglicemico.

Bibliografia - Baird G. D. (1982): Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *J. Dairy Sci.*, 65(1):1-10. - Ballarini G. (1987): Malattie della bovina da latte ad alta produzione BLAP. Edagricole, Bologna. - Hayirli A., Bertics S. J., Grummer R. R. (2002): Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 85:2180-2191. - Jones A. E., Summers R.L. (2000): Detection of isopropyl alcohol in a patient with diabetic ketoacidosis. *J. Emerg. Med.*, 19(2):165-168. - Sakai T., Hayakawa T., Hamakawa M., Ogura K., Kubo S. (1993): Therapeutic effects of simultaneous use of glucose and insulin in ketotic dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76:109-114.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CANALI DEL Ca^{2+} VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L NELLA GRANULOSA FOLLICOLARE DI GALLINA OVAIOLA

N. C. Surdo², E. Micera², L. Laporta¹, M. Albrizio², G. Di Modugno¹, A. Zarrilli²

1 Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.

2 Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.

e-mail: a.zarrilli@veterinaria.uniba.it

Le cellule della granulosa (GC) circondano l'ovocita e ne permettono la maturazione mediante la secrezione di ormoni e fattori di crescita paracrini soprattutto in risposta a gonadotropine [1]. Diversi studi indicano che nella steroidogenesi delle GC, oltre al rilascio di Ca^{2+} dai compartimenti citosolici [2-5], svolge un ruolo importante anche l'afflusso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare. In particolare è stato dimostrato che la produzione di gonadotropina indotta da progesterone è significativamente inibita da antagonisti dei canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (CaVs) nelle GC umane [6;7], di gallina [5], e di altre specie [8;9]. Nelle GC aviaria il Ca^{2+} extracellulare risulta necessario per la sintesi proteica indotta dagli ormoni steroidei [10]. Inoltre l'entrata di Ca^{2+} attraverso i CaVs modula l'apoptosi [11] e altri processi quali i riarrangiamenti del citoscheletro [12] e la proliferazione cellulare [13], sia in condizioni fisiologiche (ovulazione e la formazione del corpo luteo) che patologiche (ovaio policistico). Esperimenti di patch-clamp [14;15] e microspettrofluorimetria [16;17] in GC aviaria hanno mostrato la presenza funzionale di CaVs di tipo T (LVA - a bassa soglia) e L (HVA - ad alta soglia); tuttavia in questa specie l'esatta identità molecolare dei CaVs di tipo L non è mai stata riportata. I CaVs, strutturalmente simili, sono costituiti da una subunità proteica principale $\alpha 1$ in grado di formare da sola il canale funzionale, alla quale sono correlate le proprietà biofisiche e farmacologiche del canale. All'interno dei CaVs di tipo L si distinguono due isoforme: $\alpha 1C$ cardiaca ($CaV_{1.2}$) e $\alpha 1D$ endocrina ($CaV_{1.3}$), ampiamente espresse in molti tessuti [18]. In aggiunta ad una ben documentata descrizione funzionale nelle GC di gallina ovaiole, in questo lavoro abbiamo voluto caratterizzare i CaVs di tipo L mediante RT-PCR e immunoblotting. L'analisi è stata effettuata su GC indifferenziate, isolate dai follicoli bianchi (4-7 mm) antrali di 6 galline ovaiole Isa Brown di età compresa tra 22 e 24 mesi. Da 3 soggetti sono stati estratti l'RNA totale con successiva sintesi di cDNA, dagli altri 3 le proteine totali [19]. Sono state standardizzate le condizioni di PCR con le differenti coppie di primers (appositamente scelte e precedentemente sottoposte ad analisi *in silico*) e di Western Blotting. L'analisi molecolare ha evidenziato in tutti i soggetti la presenza di due ampliconi corrispondenti all'isoforma $CaV_{1.2}$ e $CaV_{1.3}$, rispettivamente di 166 pb e 160 pb. L'analisi proteica ha rivelato anch'essa la presenza di entrambe le isoforme proteiche delle dimensioni attese. Il nostro lavoro evidenzia per la prima volta la presenza di tutte e due le isoforme dei CaVs di tipo L in cellule ovariche endocrine di gallina. Le GC sono cellule dinamiche, è dunque possibile che l'espressione di isoforme dei CaVs sia relativa ad una certa fase del ciclo cellulare e/o allo stato di differenziazione; inoltre la presenza della fase di reclutamento e selezione del follicolo dominante rende l'ovaio di gallina un modello unico per lo studio dello sviluppo follicolare. Pertanto la nostra caratterizzazione rappresenta un livello preliminare di acquisizione da cui partire per ulteriore approfondimenti sull'espressione dei canali CaVs e dei processi Ca^{2+} dipendenti ad essi correlati.

- [1] Nilsson E. & Skinner M.K. 2001, J Soc Gynecol Invest 8(Suppl):S17-S20. [2] Hori H. et al. 1998 Endocr J 45:175-182; [3] Veldhuis J.D. et al. 1984, Endocrinology 114:441-449; [4] Anderson L. et al. 1996, J Endocrinol 149:449-456; [5] Asem E.K. & Hertelendy F. 1986, Gen Comp Endocrinol 62:120-128; [6] Lee H.L. et al. 1989, Fertil Steril 52:958-964; [7] Agoston A. et al. 2004, J Clin Endocrinol Metab 89:4503-4512; [8] Veldhuis J.D. & Klase P.A. 1982, Endocrinology 111:1-6; [9] Tsang B.K. & Carnegie J.A. 1984, Biol Reprod 30:787-794. [10] Conkright M.D. & Asem E.K. 1995, Biol Reprod 52: 683-689; [11] Mussche S. et al. 2000, Ann NY Acad Sci 926:101-115; [12] Batten B.E. & Anderson E. 1981, Am J Anat 161:101-114; [13] Fritz S. et al. 1999, J Clin Endocrinol Metab 84:1744-1750; [14] Schwartz J.L. et al. 1988, FEBS Lett 241: 169-172 [15] Asem E.K. et al. 2002, Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E184-E196; [16] Laporta L. et al. 2008, 1st Mediterranean Summit of WPSA Advances and Challenges in Poultry Science; [17] Micera E. et al. 2008, SO.FI.VET; [18] Catterall W.A. 2000, Annu Rev Cell Dev Biol 16:521-555; [19] Johnson A.L. et al. 1997, Biology of Reproduction 57: 1096-1103.

IMPIEGO DI SPERMATOZOI EPIDIDIMALI CRIOCONSERVATI PER LA FECONDAZIONE IN VITRO DI OVOCITI DI GATTO DOMESTICO “*Felis catus*”

Ciani F. *, Cocchia N.¹, Tortora G.¹, Lorizio R.¹, Avallone L.

Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II; ¹Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Napoli Federico II.

*e-mail: ciani@unina.it

INTRODUZIONE - La crioconservazione dei gameti è fondamentale per lo sviluppo dei programmi di riproduzione assistita (ART - Assisted Reproduction Techniques) (1, 2). Nel gatto domestico particolare attenzione è stata rivolta alla raccolta degli spermatozoi dalla coda dell'epididimo e dal dotto deferente (3). I gameti felini hanno delle caratteristiche fisiche peculiari che rendono particolarmente difficile lo sviluppo di metodi di crioconservazione validi (4, 5). Obiettivo del presente studio è stato valutare la motilità, la vitalità, la morfologia e l'efficienza di fecondazione in vitro di spermatozoi epididimali di gatto domestico (*Felis catus*) pre e post congelamento.

MATERIALI E METODI - Gli epididimi sono stati raccolti da 20 gatti domestici (*Felis catus*), di razza europea, di età compresa tra i 12 ed i 48 mesi durante le routinarie procedure di castrazione presso l'Ambulatorio Ostetrico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli. La coda dell'epididimo con la porzione prossimale del dotto deferente sono state separate ed immerse in 2ml di Tris extender in una piastra petri, sezionate in due porzioni lungo l'asse longitudinale, immerse in 1 ml di Tris extender ed incubati a 38°C per 10' per il rilascio degli spermatozoi. Il tessuto epididimale è stato quindi rimosso, il medium raccolto e centrifugato a 700 x g per 6', il surnatante rimosso ed il pellets risospeso in Tris EY così da ottenere una concentrazione finale di spermatozoi pari a 40 x 10⁶ spermatozoi/ml. Il seme è stato trasferito in frigorifero a 4°C per 60'. Successivamente il seme è stato diluito con una eguale parte di Tris EY addizionato con l'8% di glicerolo così da ottenere una concentrazione finale di spermatozoi pari a 20 x 10⁶ spermatozoi/ml e di glicerolo pari al 4%. Il materiale così diluito è stato caricato in paillettes da 0,25 ml ed esposto ai vapori d'azoto ad una distanza di 6cm dalla superficie dell'azoto liquido per 20' per essere poi immerso in azoto liquido. Dopo 4 settimane ogni campione è stato riscaldato in bagnomaria a 42°C per 15'' e ridiluito in 1 ml di Tris EY. Sono stati valutati i seguenti parametri: concentrazione, motilità, vitalità, morfologia e la competenza di fecondazione. La FIV è stata effettuata con seme congelato-riscaldato (gruppo campione) e con seme fresco (gruppo controllo) in FertTalp Buffer impiegando una concentrazione di seme pari a 2x10⁶spz/ml preparato mediante swim-up.

RISULTATI E CONCLUSIONI - Il numero di spermatozoi raccolto dagli epididimi di gatto domestico è risultato pari a 58,15±18,3 x 10⁶, la motilità è risultata pari a 54,7±11,3 % nel campione fresco ed a 32±13,1 % nel campione congelato-riscaldato, la vitalità è risultata pari a 74,3±8,6 % nel campione fresco ed a 45,2±9,4 % nel campione congelato-riscaldato (i valori sono stati espressi come (Media±DS). L'efficienza della FIV, valutata in termini di *cleavage*, è risultata pari al 38 % di divisioni embrionali ottenute con seme fresco ed a 19 % con seme congelato-riscaldato. La crioconservazione di spermatozoi epididimali può rappresentare una potenziale procedura per il recupero e lo stoccaggio del materiale genetico di soggetti pregiati e/o a rischio d'estinzione (1). I risultati ottenuti per i parametri motilità, vitalità ed efficienza di fecondazione degli spermatozoi epididimali di gatto, pur mostrando una drastica riduzione della qualità del seme post scongelamento, ci permettono di definire la metodica di congelamento in mini paillettes con Tris EY addizionato con il 4% di glicerolo, una procedura valida e ripetibile.

BIBLIOGRAFIA - **1)** Luvoni GC (2006) Theriogenology 66: 101–111; **2)** Villaverde AISB, Mello Martins MI, Basto Castro V, Lopes MD (2006) Theriogenology 66: 1641–1644; **3)** Zambelli D, Cunto M (2006) Theriogenology 66: 159–165; **4)** White IG (1993) Reprod Fertil Dev. 5: 639–58; **5)** Tsutsui T, Wada M, Anzai M and Hori T (2003) J Vet Med Sci 65: 397–9.

L'ESPOSIZIONE DI BLASTOCISTI OVINE A POLICLOROBIFENILI (PCBs) INDUCE IRREGOLARITA' CROMOSOMICHE.

Czernik M., Zacchini F., Pizzuto A., Scapolo PA., Loi. P. & Ptak G.

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro 45, 64100, Teramo, Italy,

E-mail: gptak@unite.it

Uomo ed animali sono continuamente esposti a contaminanti chimici, quali i policlorobifenili (PCBs) presenti nell'ambiente, o assunti con gli alimenti e l'acqua di bevanda. Molti lavori mostrano che i PCBs si accumulano nei tessuti adiposi dei mammiferi, per venire in seguito mobilizzati, andando ad interferire su importanti funzioni organiche, non ultima la sfera riproduttiva. Pertanto, i PCBs possono rappresentare un fattore di rischio per la riproduzione femminile, e per lo sviluppo embrionale in modo particolare. In un precedente lavoro abbiamo dimostrato che una breve esposizione (48 ore) ai PCBs ha effetti negativi sullo sviluppo di embrioni ovini allo stadio di blastocisti. In questo lavoro abbiamo voluto dettagliare meglio gli effetti dei PCBs sugli embrioni pre-impianto, verificando se una loro esposizione esita in alterazioni cromosomiali. Blastocisti ovine prodotte in vitro secondo le procedure da noi sviluppate, sono state coltivate per 8 di giorni in medium CZB con amino acidi e 10% FBS (dal terzo giorno di coltura) sino alla schiusa dalla Zona Pellucida (ZP), e divise in 4 gruppi: controllo, DMSO 0.4%, trattamento con 20 µg/ml e 40 µg/ml di Aroclor 1254, una miscela di 60 congeneri di PCBs. Le concentrazioni impiegate nel presente studio sono analoghe a quelle rilevate negli organi riproduttivi (fluido follicolare e secrezioni uterine) di donne esposte a PCBs. Dopo 48 ore di incubazione, le blastocisti sono state coltivate per 16 ore in presenza di 0.24 µM di Nocodazole, esposte a medium ipotonico 0.9% KCl, fissate in metanolo:acido acetico 3:1 (v:v) a -20°C per 15 minuti e montate su vetrino. I preparati sono stati trattati con tripsina e colorati con Giemsa (G-Banding). Le piastre metafasiche sono state osservate a 100X (immersione), e i cariotogrammi corrispondenti allestiti su pannelli fotografici.

Mentre gli embrioni normali hanno presentato un cariotipo normale ($2n=54$), un elevato grado di aneuploidia è stato rilevato nelle blastocisti trattate con per entrambe le concentrazioni di PCBs ($2n = 30, 28, 34, 55, 41$ – nei cinque embrioni dai quali abbiamo allestito cariotogrammi leggibili con certezza). I nostri risultati indicano che una breve esposizione a PCBs induce una marcata aneuploidia in embrioni ovini allo stadio di blastocisti, e giustifica l'effetto tossico acuto di questi composti sullo sviluppo embrionale.

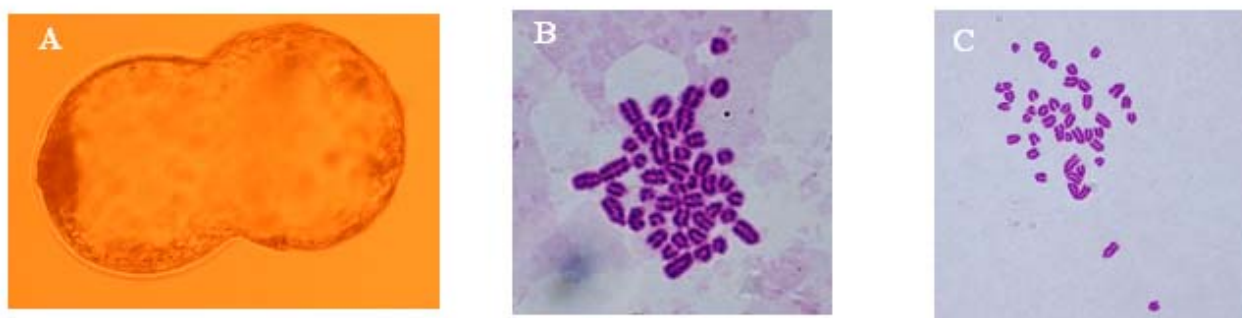


Fig 1. A - Blastocisti al giorno 8 di coltura durante la schiusa, B - Cariotipo normale ($2n=54$), C - Cariotipo aneuploide ($2n=41$).

MODIFICAZIONI DELLE IODOTIRONINE TOTALI E LIBERE NEL PUROSANGUE ARABO DOPO GARA DI GIMKANA: EFFETTO DELLO STATO DI ALLENAMENTO, DEL GENERE E DELL'ETA'

Fazio E., Giacoppo E., Molinari P., Medica P., Ferlazzo A.

Dipartimento di Morfologia, Biochimica, Fisiologia e Produzioni Animali, Sezione di Fisiologia veterinaria (Messina).

Il costo metabolico-funzionale e l'impegno psico-fisico di molteplici specialità equestri esalta il ruolo svolto dagli ormoni tiroidei nel sostenere i fabbisogni energetici e nel conseguimento di un'ottimale performance neuro-muscolare. Sulle basi di numerose, precedenti, indagini relative al profilo della funzionalità tiroidea dopo differenti tipi di esercizio, le modificazioni delle iodotironine totali e libere sono state valutate nel Purosangue Arabo dopo gare di *gimkana*, tenuto conto dello stato di allenamento, del sesso e dell'età. Le indagini sono state condotte su un totale di 23 cavalli Purosangue Arabi (9 allenati e 14 mai allenati), eterogenei per sesso (12 femmine e 11 maschi) ed età (13 soggetti di 4-9 anni e 10 soggetti di 10-15 anni). Tutti i soggetti allo studio hanno effettuato il circuito di gara in un tempo compreso tra 3 e 4 minuti. I prelievi di sangue sono stati effettuati in condizioni basali (9.00 a.m.), prima della gara, a 5' e 30' dopo la gara. L'analisi delle concentrazioni di iodotironine totali e libere è stata condotta in doppio sui sieri individuali con metodiche immunoenzimatiche (Radim). L'analisi statistica delle modificazioni osservate è stata condotta mediante ANOVA a una via per misure ripetute per valutare l'effetto dell'esercizio, anche in funzione dei differenti stati di allenamento, del genere, dell'età.

I risultati ottenuti hanno evidenziato, dopo la gara di *gimkana*, un aumento generalizzato dei livelli di T_3 a 5', che tendono successivamente a diminuire a 30'; una lieve diminuzione dei livelli di T_4 a 5', che è mantenuta ancora a 30'; livelli in diminuzione della fT_3 a 5', che tendono al recupero a 30'; e livelli pressoché immoificati di fT_4 . Un significativo effetto dell'esercizio è stato, tuttavia, rilevato per la T_3 solo nei cavalli allenati ($F=4,81$; $P<0,02$) e nei maschi ($F=4,22$; $P<0,02$); per la T_4 solo nei cavalli di 4-9 anni ($F=3,43$; $P<0,05$) e per la fT_3 solo nei maschi ($F=8,07$; $P<0,003$).

Rispetto ai livelli basali, infatti, il significativo aumento di T_3 è rilevabile a 5' nei cavalli allenati ($P<0,05$), con livelli ancora più elevati a 30' rispetto ai cavalli non allenati ($P<0,01$). Inoltre, la significativa diminuzione di T_4 è stata evidenziata solo nei soggetti di 4-9 anni ($P<0,05$). Per quanto concerne il decremento di fT_3 , a 5' esso è risultato significativo nei cavalli non allenati ($P<0,05$) rispetto a quelli allenati, e nei maschi ($P<0,001$) rispetto alle femmine. Differenze statisticamente significative sono state evidenziate anche per le modificazioni di fT_4 , che a 5' sono risultate più basse nei maschi ($P<0,05$) rispetto alle femmine.

I risultati ottenuti confermano, pertanto, il coinvolgimento degli ormoni tiroidei nella risposta allo stress da esercizio e indicano che la ghiandola tiroide sembra rispondere in modo meno incisivo (T_4 e fT_4) anche nel corso della gara di *gimkana*, indipendentemente dallo stato di allenamento. E' stato, altresì, evidenziato il probabile concorso dei tessuti extratiroidei nella risposta all'esercizio, in grado di utilizzare l'ormone in maniera temporalmente differenziata (T_3 e fT_3) in relazione allo stato di allenamento. La variabile sesso ha influito in maniera significativa sui livelli circolanti di T_3 e fT_3 , mentre l'età ha inciso in maniera significativa solo sulle modificazioni di T_4 . In conclusione, anche dopo gara di *gimkana*, le modificazioni delle iodotironine circolanti dimostrano il diverso coinvolgimento delle singole frazioni ormonali tiroidee e il loro utilizzo in maniera temporalmente differenziata e in funzione dello stato di allenamento, del sesso e dell'età.