



Università degli Studi di Perugia
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea Specialistica in Biotecnologie Mediche
Tesi di Diploma di Laurea Magistrale

**QUALE RUOLO PER IL RECETTORE
DELL'ACTH (MC2-R) NEL CORPO LUTEO DI
CONIGLIO?**

Laureanda

Gabriella Guelfi

Relatori

Prof.ssa Simona Ronchetti

Prof. Cristiano Boiti

Anno Accademico 2006-2007

A mio figlio Tommaso

COMPENDIO

La sperimentazione descritta in questa tesi riguarda l'analisi comparativa dell'espressione di alcuni geni nel corpo luteo di coniglio; la cui sequenza non è presente in banca dati.

Per valutarne la progressione temporale sono state scelte tre scadenze, che rappresentano la fase luteinica iniziale (4 gg), intermedia (9 gg) e pre-terminale (13 gg) dal tempo 0 di pseudogavidanza.

In questa sperimentazione oltre a valutare come principale obiettivo l'espressione genica di MC2-R, mediante real-time PCR, mi sono interessata ad altri geni coinvolti nella regolazione del CL.

Questa tesi sperimentale si è sviluppata nelle seguenti attività:

- Individuare nel corpo luteo di coniglio la presenza di mRNA per MC2-R, clonarlo e sequenziarlo. Al meglio delle mie conoscenze non esistono precedenti lavori che descrivano la presenza di MC2-R nel corpo luteo di alcuna specie animale.
- Valutare l'espressione di MC2-R a 4, 9 e 13 giorni, ipotizzando che la sua modulazione corrisponda ad un ruolo funzionale attivo.
- Studiare l'espressione della proteina StAR, "rate-limiting" per la steroidogenesi.
- Analizzare l'espressione di LH-R ed FSH-R come regolatori della fase luteale.
- Valutare l'espressione luteinica della β -endorfina, peptide oppioide endogeno importante regolatore della secrezione di LH a livello ipotalamico.

INDICE GENERALE

COMPENDIO

Capitolo primo

INTRODUZIONE

ORMONI

- *Caratteristiche di azione* 10
- *Interazioni con lo stress* 13
- *Interazioni con il sistema immunitario* 15

ORMONI STEROIDEI

- *Fonti ematiche di colesterolo* 17
- *Steroidogenesi* 19
- *Steroid acute regulatory protein (STAR)* 22
- *Recettori e meccanismo di azione* 23
- *Neurosteroidi* 25

ORMONI PEPTIDICI

- *Produzione e rilascio* 27
- *Recettori e meccanismo di azione* 30

GONADOTROPINE

- *GnRH e Gonadotropine* 31
- *Recettori FSH e trasduzione del segnale* 39
- *Recettori LH e trasduzione del segnale* 41

ORMONI POMC DERIVATI

- *Produzione e rilascio* 43
- *Recettori Melanocortinici (MC-R)* 47

Ormone Adrenocorticotropo (ACTH) 49

- *Secretagoghi dell'ACTH* 51
- *Recettore dell'ACTH e trasduzione* 53

β -endorfina	59
ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA NEL CONIGLIO	
▪ <i>Ciclo estrale</i>	62
▪ <i>Luteinizzazione</i>	66
▪ <i>Neoangiogenesi</i>	68
▪ <i>Regolazione funzione luteale</i>	69
▪ <i>Attività steroidogenica del corpo luteo</i>	71
▪ <i>Induzione farmacologia dell'ovulazione</i>	72
Capitolo secondo	
PROCEDURA SPERIMENTALE	
ETRAZIONE RNA	75
REAL-TIME PCR	76
▪ <i>Curve di melting</i>	79
▪ <i>Caratteristiche primer</i>	80
WESTERN-BLOTTING	83
Capitolo terzo	
RISULTATI	
Punto 1. ESPRESSIONE DI MC2-R	85
▪ <i>Curve di fluorescenza</i>	86
▪ <i>Curve di melting</i>	86
▪ <i>Gel elettroforesi</i>	86
Punto 2. ESPRESSIONE MC2-R 4-9-13 GIORNI	87
▪ <i>Curve di fluorescenza</i>	87
▪ <i>Analisi valori di real-time PCR</i>	89
Punto 3. ESPRESSIONE StAR 4-9-13 GIORNI	90
▪ <i>Curve di fluorescenza</i>	90

▪ <i>Curve di melting</i>	91
▪ <i>Gel elettroforesi</i>	91
▪ <i>Analisi valori di real-time PCR</i>	92
Punto 4. ESPRESSIONE β -endorfina 4-9-13 GIORNI	93
▪ <i>Curve di fluorescenza</i>	93
▪ <i>Curve di melting</i>	93
▪ <i>Gel elettroforesi</i>	94
▪ <i>Analisi valori di real-time PCR</i>	94
Punto 5. ESPRESSIONE LH-R ed FSH-R 4-9-13 giorni	95
▪ <i>Curve di fluorescenza</i>	95
▪ <i>Curve di melting</i>	95
▪ <i>Gel elettroforesi</i>	96
▪ <i>Analisi valori di real-time PCR</i>	97
Punto 6. WESTERN BLOTTING DI MC2-R	100
Capitolo quarto	
DISCUSSIONE	102
PUNTO 1- 2 - 3	106
PUNTO 4	110
PUNTO 5	112
BIBLIOGRAFIA	116

ACRONIMI

3 β -HSD	3 β -IDROXY-STEROID DEHYDROGENASE
17-OHP	17 IDROSSIPROGESTRONE
ACAT1	ACYL-CoA CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE 1
ACTH	ADRENOCORTICOTROPHIC HORMONE
APO	APOLIPOPROTEIN
cAMP	ADENOSINA MONO FOSFATO CICLICA
CL	CORPO LUTEO
CRH	CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE
CREB	cAMP-REGULATORY ELEMENT-BINDING PROTEIN
CYP	CYTOCHROME P450
CYP11A1	CYTOCHROME P450 SIDE-CHAINCLEAVAGE
CNGC	CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANEL
DHEA	DEHYDROEPIANDROSTENEDIONE
FSH	FOLLICLE STIMULATING HORMONE
GABA	γ -AMMINO-BUTIRRICO
GnRH	GONADOTROPIN RELEASING HORMONE
GR	GLUCOCORTICOID RECEPTOR
GRE	GLUCOCORTICOID-RESPONSE ELEMENT
HDL	HIGH DENSITY LIPOPROTEIN
HCG	GONADOTROPIN CORIONIC HORMONE
IFN γ	INTERFERON γ
IGF	INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR
IL	INTERLEUKIN
LDL	LOW DENSITY LIPOPROTEIN
LH	LUTEINIZING HORMON

MRAP	MELANOCORTIN-2 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN
MAPK	MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE
NK	NATURAL KILLER
P4	PROGESTERONE
PMSG	PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN
POMC	PRO-OPIOMELANOCORTIN
PRL	PROLATTINA
SHBG	SEX HORMON BINDING GLOBULIN
SR-BI RECEPTOR	SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I
StAR	STEROID ACUTE REGULATORY PROTEIN
THDOC	TETRAIDRODEOSSICORTICOSTERONE
THP	ALLOPREGNANOLONE
TNF α	TUMOR NECROSIS FACTOR α
VLDL	VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN

Capitolo primo

INTRODUZIONE

ORMONI

CARATTERISTICHE DI AZIONE

Le ipotesi paleontologiche datano a circa 750 milioni di anni fa la comparsa dei primi organismi pluricellulari, dopo una lenta “*incubazione*” degli organismi unicellulari durata circa 3 miliardi di anni (la probabile datazione delle prime forme cellulari risale a 3.5 – 4 miliardi di anni), passata attraverso lo sviluppo di strutture fotosintetiche (2.6 miliardi di anni fa), la strutturazione di una cellula eucariotica (1.6 miliardi di anni) e alla capacità di riprodurre le strutture cellulari mediante riproduzione sessuale. Dalla comparsa ed affermazione delle strutture pluricellulari (ossia da circa 575 milioni di anni fa), il meccanismo dell’evoluzione ricevette una potente spinta diffusiva che in circa 1/5 del tempo che era stato necessario per realizzarle, portò alla differenziazione di centinaia di migliaia di specie, fino a quelle che si dimostrano adattate alle odierne condizioni ambientali del nostro pianeta. Il segreto di questa “efficienza” evolutiva risiede senz’altro nella possibilità di racchiudere in uno stesso organismo gruppi di cellule, organi con funzione specializzata in grado di contenere il completo “progetto” di costruzione dell’intero organismo, in modo da far convergere la loro specifica attività allo scopo di ogni struttura biologica. In oltre mezzo miliardo di anni, quindi, gli organismi pluricellulari hanno affrontato e risolto la sfida della gestione e coordinazione funzionali dei diversi gruppi cellulari sempre più specializzati in organi mediante l’instaurazione di sistemi per una rapida comunicazione intercellulare, in modo da fornire un efficace network per l’intero organismo. Ne sono esempio la maggior parte dei principali sistemi, da quello nervoso, a quello circolatorio, a quello immunitario:

ma certamente il sistema fondamentale di comunicazione è quello endocrino, che è ipotizzabile sia stato il primo ad essere utilizzato, anche dagli organismi inferiori, che attiva e fruisce dello sviluppo di quelli precedentemente citati, perché fondamentalmente si basa su un fenomeno biofisico-chimico che da sempre è stato lo strumento fondamentale dei fenomeni e processi vitali, e senza il quale non si sarebbe potuta organizzare e diffondere la biosfera, dai primi coacervi abiotici alle varie forme di vita a cui oggi assistiamo.

Nel sistema endocrino avviene il riconoscimento tra strutture complementari, di cui generalmente una viene definita *ligando*, attivatore o disattivatore e l'altra *recettore*. I ligandi del sistema endocrino, gli ormoni (dal greco *ὄρμη* = impulso, rilascio) sono sostanze proteiche o lipidiche che vengono prodotte ed assemblate nelle cellule delle ghiandole: *endocrine*, se prevede il trasporto ematico dell'ormone perché prodotto in distretti corporei distanti dagli organi che possiedono i recettori specifici; *paracrine*, se le strutture recettoriali sono poste nelle immediate vicinanze della ghiandola produttrice; *autocrine*, se il riconoscimento e l'attivazione avviene in strutture recettoriali poste sulle cellule che li secernono, ed utilizzano meccanismi di regolazione funzionale a feedback. Il rapporto che si stabilisce tra un ormone ed il rispettivo recettore è un legame chimico debole, regolato da molte condizioni "ambientali" che esistono nel contorno di quello che, una volta formato, viene definito *complesso ormone-recettore*. Esistono numerosi fenomeni biofisici e biochimici che possono influenzare la formazione del complesso, ma quello dominante è sicuramente il "riconoscimento" della complementarietà strutturale ed elettrica tra le due molecole: in particolare, maggiore è la complementarietà tridimensionale delle strutture che si legano, maggiori i legami che si formano e più forte, ossia più duraturo, sarà il legame finale che ne deriva. Tale caratteristica viene definita *affinità*. Nella seconda metà dell'800 venne enunciato (dai chimici Waage e Guldberg) un modello che, nonostante la sua semplicità, rende conto delle più importanti caratteristiche di un'interazione come quella tra ormone e recettore: viene indicato come "*Legge dell'azione di massa*", ed afferma che "la velocità di

una reazione chimica, (in questo caso la formazione del complesso ormone-recettore = OR) è proporzionale alla concentrazione dei reagenti OR che vi prendono parte.



Si tratta di una reazione in cui entrano in gioco legami chimici deboli che si formano e si decompongono, e che, con il tempo, raggiunge ad una situazione di *equilibrio dinamico* in cui, complessivamente, le concentrazioni relative dei reagenti singoli e del complesso formato non variano (a meno che, come afferma la legge, non si modifichi la concentrazione di una delle specie coinvolte nell'equilibrio). Tale equilibrio può essere raggiunto sia partendo dalle specie separate, in assenza del complesso, che viceversa. Stechiometricamente, l'equazione cinetica per calcolare la velocità di formazione, del complesso, è un rapporto differenziale, che può essere risolto mediante una costante, k_a :

$$\frac{d[OR]}{dt} = k_a [O][R]$$

In base alla legge, la velocità di comparsa del complesso ($d[OR]/dt$) è proporzionale al prodotto delle concentrazioni dei due reagenti mediante la suddetta costante di velocità di associazione, k_a . Parimenti, si può scrivere un'equazione che renda conto della velocità di dissociazione del complesso:

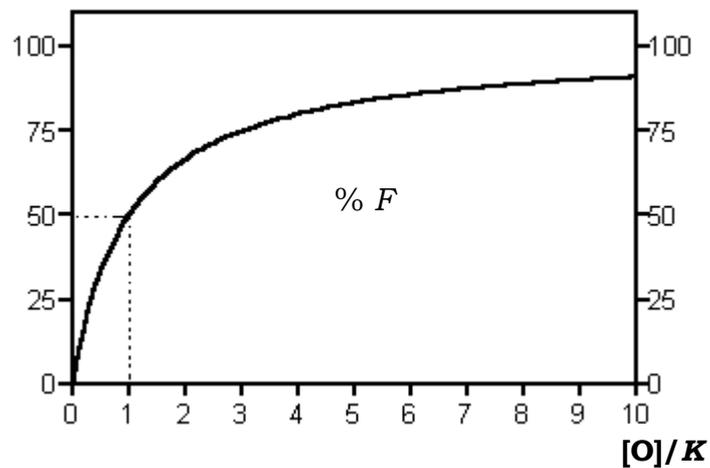
$$\frac{d[OR]}{dt} = k_d [OR]$$

in cui k_d rappresenta la costante di dissociazione. Quando la reazione raggiunge l'equilibrio, ossia quando la velocità di formazione di O + R ed OR si equivalgono, avremo:

$$k_a [O][R] = k_d [OR] \Rightarrow \frac{k_d}{k_a} = K = \frac{[OR]}{[O][R]}$$

in cui la costante K viene definita *costante di affinità* della reazione, e rappresenta una valutazione termodinamica dell'affinità, ossia della forza di legame, del complesso OR. Attraverso una serie di passaggi algebrici si arriva a definire che K rappresenta la concentrazione di ormone libero quando metà dei

siti recettoriali sono occupati. Questo vuol dire che quando il valore di K è basso, il recettore possiederà un'elevata affinità per l'ormone, perché sarà necessaria una bassa concentrazione di ormone per legare metà dei siti del recettore. L'equazione matematica può essere rappresentata come il grafico di una iperbole equilatera, in cui quando $[O]=0$ la percentuale di occupazione dell'ormone è 0; quando $[O] = K$, $F = 1/2 = 50\%$ di occupazione; quando $[O] = 4K$, $F = 4/5 = 80\%$ di occupazione; quando $[O] = 95K$, $F = 95/96 = 99\%$ di occupazione; e così via.



Il grafico illustra un'altra caratteristica dei legami specifici ormone recettore, ossia che sono *saturabili*.

INTERAZIONI CON LO STRESS

Il principale meccanismo adattativo che l'organismo pone in atto nella risposta allo stress è rappresentato dall'attivazione dell'asse *ipotalamo-ipofisi-surrene*, con secrezione di ACTH e conseguente stimolazione della corteccia surrenale. L'asse neuroendocrino surrenale gioca un ruolo assolutamente centrale nella complessa integrazione della risposta dell'organismo agli stress, sia fisici che psicobiologici, attraverso il controllo del metabolismo intermedio, della funzionalità del sistema cardiovascolare, della pressione arteriosa, e dell'interferenza sul sistema nervoso centrale. L'ipotalamo controlla: *umore, libido, sete, appetito, sonno, temperatura corporea e pressione arteriosa*. Sotto lo stimolo di perturbazioni esterne, il nostro organismo innesca una serie di reazioni di difesa: l'ipotalamo libera il CRH e le endorfine. Il CRH stimola l'ipofisi a secernere ACTH che, a sua volta, stimola la secrezione dei glucocorticoidi (cortisolo) da parte delle ghiandole surrenali. Il *cortisolo* esplica una potente azione antinfiammatoria e antidolorifica, stimola la gluconeogenesi, cioè la sintesi di nuovo glucosio, e la deposizione dei trigliceridi nel tessuto adiposo. L'ipotalamo regola processi sistemici con variabili interne ed esterne, quali: temperatura, osmolarità dei fluidi corporei, ritmi circadiani e stagionali, riproduzione, crescita e sviluppo, peso corporeo. L'inibizione dell'*asse ipotalamo-ipofisi-gonadi* rappresenta il punto di partenza di una vasta patologia della riproduzione che sottolinea l'interdipendenza tra organi riproduttivi e mediatori dello stress. Il CRF presiede alla risposta biochimica centrale con liberazione di ACTH, β -endorfina, β -lipotropina, prolattina, contemporaneamente diminuisce la secrezione di GnRH e quindi di LH che stimola il testosterone (maschio) e il progesterone (femmina). Ne conseguono anaestro, ipercortisolemia e iperandrogenismo con incremento degli ormoni della teca ovarica. E' stato osservato che il rilascio elevato di glucocorticoidi in animali esposti a stress acuto è associato a danneggiamento o perdita di neuroni nell'ippocampo. Il danno include cambiamenti nell'architettura della cellula ed

accresciuta vulnerabilità ad altre sostanze neurochimiche (Bremner, Davis, Southwick, Krystal, Charney 1993).

INTERAZIONI CON IL SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario ed il sistema neuroendocrino comunicano tra di loro con un pattern comune di ormoni e recettori. Le cellule immunocompetenti sintetizzano ormoni peptidici biologicamente attivi sul sistema neuroendocrino e presentano recettori per gli ormoni di tale sistema di controllo. A loro volta gli ormoni neuroendocrini sono in grado di modulare la funzione immunitaria così come gli ormoni immunitari, le citochine, modulano la funzione neuroendocrina. I due sistemi agiscono di concerto nella regolazione delle complesse risposte integrate a stress e ad antigeni, comprendendo cellule linfoidi, neuroni colinergici ed adrenergici, citochine e linfochine, ormoni e neuropeptidi secreti da ghiandole endocrine e dal sistema nervoso centrale, recettori specifici, centri nervosi superiori che modulano queste risposte. Le cellule immunologicamente competenti, in particolare monociti, macrofagi di presentazione dell'antigene e linfociti, producono citochine coinvolte nella risposta immune che attivano l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Le endotossine ed i lipopolisaccaridi batterici stimolano la sintesi ed il rilascio di interleuchine (IL) IL-1, IL-6, IL-2 e TNF- α che sono regolati da un feedback da parte del cortisolo. Gli effetti delle varie citochine sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene a livello del cervello, dell'adenoipofisi e della ghiandola surrenalica sono il miglior esempio della modulazione immunologica di un fondamentale sistema neuroendocrino. La IL-1 prodotta da macrofagi e monociti attivati, stimola il rilascio del CRH ed è in grado di stimolare direttamente la sintesi di cortisolo dal surrene. Il TNF- α , prodotto principalmente dai monociti attivati, è in grado di stimolare la secrezione ipofisaria di ACTH. La IL-6, prodotta dai linfociti T, ha azioni molto simili a quelle delle due precedenti citochine. La IL-2, sintetizzata dai Linfociti T dopo la stimolazione antigenica, è in grado di incrementare i livelli plasmatici di ACTH e cortisolo, anche se questa azione può solo essere indiretta e dovuta alla risposta allo stress generato da febbre e brivido. Il γ -INF *in vitro* su linee

cellulari di provenienza surrenale provoca incremento della produzione di steroidi.

Lo stress sopprime la funzionalità del sistema immunitario: infatti, in seguito ad una infezione o ad una esposizione antigenica o alla presenza di tossine batteriche, si osserva una risposta stress-simile che stimola il rilascio di ACTH e cortisolo che a sua volta tende a sopprimere l'ulteriore risposta delle cellule immunocompetenti. Recettori per CRH, ACTH e glucocorticosteroidi mediano gli effetti di questi ormoni sul sistema immunitario. Sulle cellule immunologicamente competenti, in particolare su monociti e linfociti sono stati evidenziati anche recettori per gli oppioidi endogeni.

Probabilmente sono le endorfine il collegamento nella modulazione tra sistema immune e sistema neuroendocrino surrenalico. In vivo la risposta neuroendocrina allo stress è in grado di sopprimere l'attività "*natural killer*" dei linfociti T, evento bloccato dal naloxone noto antagonista oppioidergico.

I glucocorticosteroidi sono in grado di inibire molti aspetti della funzione immune, stabilendo una sorta di ansa a *feedback lungo* tra sistema immunitario e neuroendocrino. Gli steroidi glicoattivi, protagonisti della risposta allo stress, sono infatti in grado di bloccare l'attivazione dei linfociti, la produzione e l'azione di IL-1, IL-2, γ -INF e delle prostaglandine. I glucocorticosteroidi, infine, sopprimono la produzione di ACTH e di endorfine da parte dei leucociti.

ORMONI STEROIDEI

FONTI EMATICHE DI COLESTEROLO

Le LDL trasferiscono colesterolo endogeno ed esogeno ad altri tessuti: sono aggregati sferoidali il cui core idrofobico è costituito da colesterolo esterificato e trigliceridi (porzione idrofobica), mentre esternamente sono costituite da apoproteine, fosfolipidi e colesterolo libero (porzione idrofilica).

In condizioni fisiologiche le LDL sono esclusivamente prodotte a partire dal catabolismo delle IDL, a loro volta prodotte dalle VLDL. La regione del recettore, localizzata esternamente alla membrana cellulare, riconosce sia l'apo-B100 che l'apo-E: tale recettore è dipendente sia da Ca^{++} che da Mg^{++} con elevata specificità.

Le LDL, dopo aver interagito con il loro recettore, subiscono un processo di endocitosi con formazione di vescicole tappezzate di clatrina; successivamente gli esteri del colesterolo vengono idrolizzati nei lisosomi dalla lipasi lisosomiale acida a colesterolo libero, mentre il recettore ritorna nella superficie cellulare (Mason 2002).

Il colesterolo è usato dalle cellule steroidogeniche per la sintesi degli steroidi può essere nuovamente esterificato per azione dell'enzima acil-CoA-colesterolo aciltransferasi (ACAT), quindi successivamente immagazzinato in vescicole lipidiche. Il livello di colesterolo libero nelle cellule determina una iper-regolazione della sintesi del recettore per le LDL.

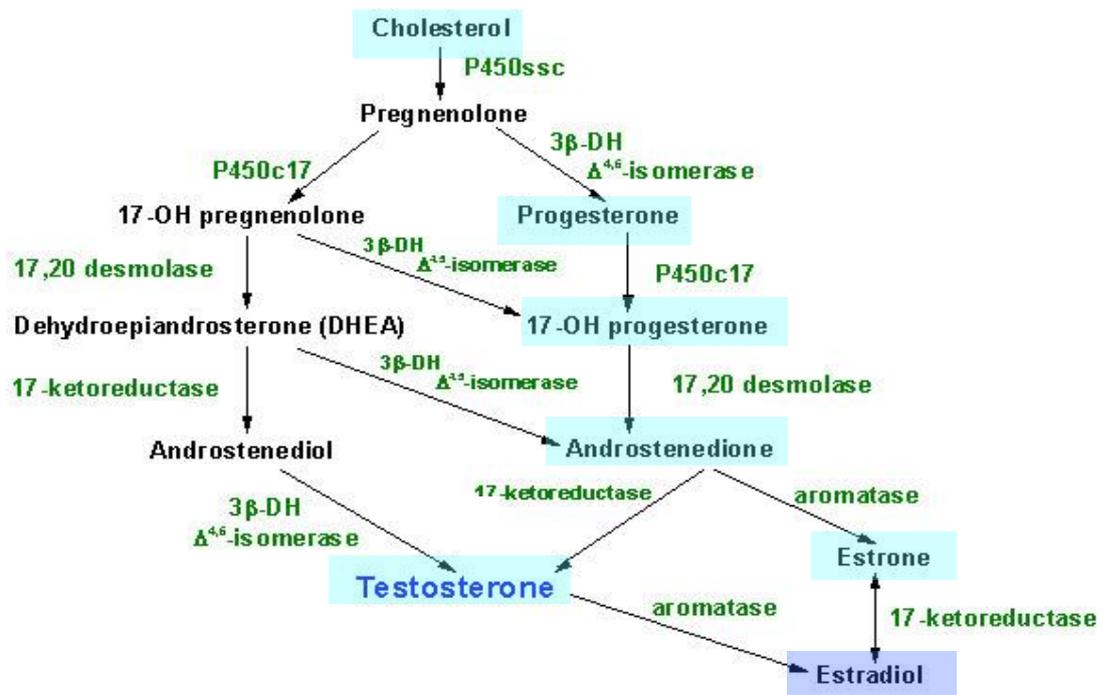
Le LDL possono entrare nella cellula anche attraverso un processo di endocitosi non mediata da recettore, nel caso di concentrazioni elevate di LDL. Anche le HDL possono essere utilizzate per ottenere colesterolo in quanto, se le LDL veicolano il 70% del colesterolo plasmatico il restante 30% è trasportato dalle HDL. Le HDL si legano tramite apo A-1 al loro recettore, detto "*scavenger BI*" (SR-B1), conosciuto anche come CLA-1 e rilasciano selettivamente nella

cellula gli esteri del colesterolo. Nel surrene umano l'espressione di SR-B1 è regolata da due ormoni: Angiotensina II ed ACTH (Connelly 2004).

Le HDL a differenza delle LDL possono effettuare, se necessario, “*trasporto inverso*” ovvero rimozione del colesterolo dai tessuti. Il colesterolo utilizzato nella steroidogenesi, oltre che derivato da LDL ed HDL, può essere sintetizzato *ex novo* dall'Acetil-CoA attraverso il mevalonato e lo squalene. Indipendentemente dalla fonte, il colesterolo nelle cellule steroidogeniche è esterificato ed immagazzinato in gocce lipidiche citoplasmatiche.

In seguito alla stimolazione da parte di ACTH viene attivata una esterasi ed il colesterolo libero viene trasportato all'interno dei mitocondri dove un enzima che catalizza il clivaggio della catena laterale, il citocromo P450, converte il colesterolo in pregnolone. Una proteina regolatrice steroidogenica acuta (StAR) ACTH-dipendente è essenziale per il trasporto del colesterolo al P450_{scc} a livello della membrana mitocondriale interna. Dalla via del pregnolone si formeranno tutti gli ormoni steroidei presenti nei mammiferi, attraverso una serie di reazioni che nelle cellule follicolari o luteali avvengono sulla membrana mitocondriale interna.

STEROIDOGENESI



Tutte le molecole steroidee possiedono una struttura base, detta ciclopentanoperidrofenantrene, costituita da tre anelli a 6 atomi di carbonio e uno a 5 atomi e derivano dal colesterolo.

Gli ormoni steroidei si dividono in 3 gruppi principali, a seconda del numero di atomi di carbonio che possiedono: 1) il *pregnano*, struttura base dei corticoidi e dei progestinici a 21 atomi di carbonio (C21); 2) gli steroidi a 19 atomi di carbonio (C19) che comprende gli *androgeni*, che condividono il nucleo di androstano; 3) gli estrogeni steroidi a 18 atomi di carbonio (C18) basati sul nucleo di estrano.

L'ovaio può sintetizzare il colesterolo *ex novo* da precursori a 2 atomi di carbonio, oppure può utilizzare come substrato il colesterolo LDL circolanti. Gli enzimi steroidogenici fanno parte del gruppo delle ossidasi con citocromo P450. La prima tappa della biosintesi steroidea è la trasformazione del colesterolo in pregnolone mediante l'idrossilazione del C20 e del C22 e la successiva scissione della catena laterale grazie alla P450_{scc} mitocondriale. La biosintesi steroidea prosegue seguendo due vie: quella dei Δ^5 - 3β -idrossisteroidi, che porta alla formazione di 17-idrossipregnenolone e di deidroepiandrosterone (DHEA) e quella dei Δ^4 -3-chetosteroidi, con formazione di progesterone, 17α -idrossiprogestosterone ed androstenedione. Attraverso la via dei Δ - 3β idrossisteroidi il pregnolone viene convertito a 17α -idrossipregnenolone, che la P450_c desmolasi trasforma in DHEA. Quest'ultimo viene convertito in androstenedione dalla 3β -idrossisteroidodeidrogenasi. L'androstenedione ed il testosterone, suo derivato per azione della 17β -idrossisteroidodeidrogenasi, sono rapidamente trasformati nei corrispondenti estrogeni C18 estrone ed estradiolo, mediante reazioni microsomiali di aromatizzazione. L'aromatizzazione è mediata dall'aromatasi P450, situata nel reticolo endoplasmatico delle cellule della granulosa. Nella via dei Δ^4 -3-chetosteroidi, il pregnolone viene direttamente trasformato in progesterone, tramite una 3β -idrossisteroidodeidrogenasi e una Δ^5 - $4\rightarrow 5$ isomerasi. Quest'ultimo, idrossilato a 17α -idrossiprogestosterone, costituisce il precursore della serie degli androgeni C19 androstenedione e testosterone.

Le cellule steroidogeniche ovariche possiedono gli enzimi necessari per la produzione di progesterone, androgeni ed estrogeni. Nel follicolo ovarico non luteinizzato e nello stroma prevale la via biosintetica dei Δ^5 - 3β -idrossisteroidi, che porta alla produzione di androgeni ed estrogeni, ma non di progesterone, mentre la via dei Δ^4 -3-chetosteroidi predomina nel tessuto luteinico.

La steroidogenesi ovarica si modifica qualitativamente e quantitativamente durante le fasi del ciclo. Gli estrogeni circolanti sono principalmente di origine ovarica, e derivano in misura minore dalla conversione degli androgeni

surrenali nel tessuto adiposo. L'androstenedione ed il testosterone prodotti dalle cellule ovariche sono rapidamente trasformati in estrone e, soprattutto, in estradiolo. L'estriolo, è prodotto solo in parte dall'ovaio, e deriva dal metabolismo periferico di estrone ed estradiolo. Non esiste una quota di progesterone prodotta a livello periferico per cui il progesterone che si ritrova in circolo è esclusivamente di origine ovarica o surrenalica. Il progesterone viene escreto con le urine in parte sotto forma di pregnandiolo, in parte come pregnantriolo, metabolita diretto del 17-idrossiprogesterone (17-OHP). Per quanto riguarda il comparto androgenico la metà della produzione giornaliera di DHEA e di androstenedione è di origine surrenalica, l'altra metà dell'androstenedione è ovarico, mentre il DHEA è in parte di provenienza ovarica ed in parte periferica. Il testosterone deriva per il 50% dalla trasformazione periferica dell' androstenedione, per il 25% dall'ovaio e per l'altro 25% dal surrene. Il derivato 5α -ridotto del testosterone, il diidrotestosterone (DHT), è il principale ormone androgenico e si forma direttamente a livello dei tessuti bersaglio agendo con meccanismo autocrino e paracrino. La maggior parte degli androgeni viene eliminata con l'urina sotto forma di 17-chetosteroidi. Gli steroidi e i metaboliti attivi vengono escreti sotto forma di solfo- e glicurono-coniugati. Tale coniugazione da parte del fegato e della mucosa intestinale porta, di solito, ad una riduzione dell'attività dello steroide cui consegue l'escrezione con l'urina o con la bile. Il testosterone e l'estradiolo circolano nel sangue in parte (60-90%) legati ad una β -globulina detta *globulina legante gli ormoni sessuali* (Sex Hormone Binding Globulin, SHBG), in parte legati all'albumina (10-40%) e solo in minima misura liberi (~ 1%). Gli effetti biologici degli steroidi sessuali sono determinati dalla frazione libera circolante rispetto a quella legata, anche se la quota legata all'albumina ha una biodisponibilità maggiore rispetto a quella degli steroidi veicolati dalla SHBG a causa di una minore affinità di legame.

STEROID ACUTE REGULATORY PROTEIN (StAR)

La StAR è una fosfoproteina ACTH-indotta, identificata per la prima volta in cellule surrenaliche di ratto in sospensione. La sua presenza è stata dimostrata ormai in tutte le cellule dotate di attività steroidogenica, fatta eccezione per quelle della placenta (Stocco 1996, Stocco 1997).

Il gene *StAR*, clonato da Sugawara e Strauss nel 1995, nell'uomo è localizzato sul cromosoma 8 ed è costituito da sette esoni e da sei introni, che codificano per una proteina dotata di breve emivita plasmatica (circa 5 minuti), localizzata nei mitocondri nella sua forma matura di 30 kDa. Essa viene sottoposta ad una serie di modificazioni post-traduzionali a partire da precursori citosolici del peso molecolare di 37 e 32 kDa (Stocco 1996).

Il ruolo della StAR consiste nel permettere, attraverso meccanismi non ancora completamente chiariti, che coinvolgono anche altre proteine presenti sulle membrane mitocondriali (porina, adenilato, recettore periferico delle benzodiazepine e *GTP-binding protein*) il passaggio del colesterolo dal compartimento citoplasmatico alla membrana mitocondriale interna, dove sono posti gli enzimi deputati alla sintesi steroidea (Thomson 1998, Arakane 1998).

Appare chiaro, a questo punto, come la proteina StAR, rappresenti la tappa limitante per l'inizio del meccanismo steroidogenico (Stocco 1997, Lin 1995). A conferma di ciò, è stato dimostrato che mutazioni del gene *StAR*, capaci di introdurre un codone di stop nel *frame* di lettura, producono una proteina tronca, quindi inattiva dal punto di vista funzionale (Bose 1996, Fujeda 1997) che, impedendo l'ingresso del colesterolo nel mitocondrio non permette una adeguata steroidogenesi. Tale condizione patologica, nota nell'uomo come "*iperplasia surrenalica lipoidea congenita*", è letale e si manifesta in epoca neonatale: essa deve essere diagnosticata alla nascita e richiede la somministrazione di terapia ormonale steroidea sostitutiva.

RECETTORI E MECCANISMO DI AZIONE

L'attività degli steroidi sessuali si esplica attraverso la loro azione su un sistema di recettori intracellulari. I recettori per gli ormoni steroidei fanno parte di una superfamiglia che comprende anche i recettori per gli ormoni tiroidei, la vitamina D3 e l'acido retinoico. Per questo motivo alcuni ormoni possono legarsi a più di un recettore appartenente alla stessa superfamiglia.

Questi recettori condividono tre domini (*detti regolatore, legante il DNA e legante l'ormone*) ed una *regione cardine*. L'attivazione del recettore porta alla sua separazione dalle proteine inibenti, ad una modificazione conformazionale, ad una fosforilazione e, all'alterazione della conformazione nucleotidica. Il complesso ormone-recettore, infatti, legandosi a specifiche sequenze di DNA, regola la sintesi proteica intracellulare.

Gli estrogeni sono in grado di indurre la sintesi del loro recettore e di quelli per gli androgeni e per i progestinici. Questo processo, detto di *reintegrazione*, ha luogo nel citoplasma anche se i recettori neosintetizzati raggiungono prontamente il nucleo. L'efficacia biologica di un estrogeno dipenderà dall'affinità per il proprio recettore e dalla concentrazione dello steroide: infatti, qualora l'affinità sia relativamente scarsa e lo steroide venga rapidamente eliminato (come accade nel caso dell'estriolo) l'effetto potrà essere mantenuto se la concentrazione si mantiene elevata nel tempo. I progestinici, invece, i cui recettori presentano due diverse conformazioni, sono in grado di inibire la sintesi recettoriale sia a livello traduzionale che trascrizionale. I progestinici competono con gli androgeni sia a livello recettoriale che per l'utilizzazione della 5 α -reduttasi, comportandosi quindi contemporaneamente da *antiandrogeni* e da *antiestrogeni*; poiché i recettori per gli androgeni sono molto simili a quelli per il progesterone. Gli steroidi sessuali agiscono sia a livello di organi bersaglio specifici (apparato uro-genitale e mammella) sia a livello di altri tessuti ed apparati (quali l'osso, il sistema nervoso, l'apparato cardiovascolare, i metabolismi, il connettivo e la cute). Di primaria importanza è la protezione

esercitata dagli estrogeni a livello del sistema cardiovascolare, anche tramite l'influenza sul metabolismo lipidico e glucidico, sui fattori dell'emostasi, sui peptidi vasoattivi e sulla pressione arteriosa. Nell'uomo il sistema nervoso centrale è stato, inoltre, incluso di recente tra le strutture bersaglio degli steroidi sessuali, contribuendo alla scoperta di un loro effettivo ruolo nell'insorgenza delle modificazioni del tono dell'umore e delle performance.

NEUROSTEROIDI

Numerose evidenze sperimentali indicano che alcuni steroidi possono venire sintetizzati anche a livello del sistema nervoso centrale. Pertanto il termine neurosteroidi, o meglio *steroidi neuroattivi*, include tutti quegli ormoni che sono sintetizzati a livello cerebrale sia *ex novo* dal colesterolo che tramite il metabolismo *in situ* di precursori ematici.

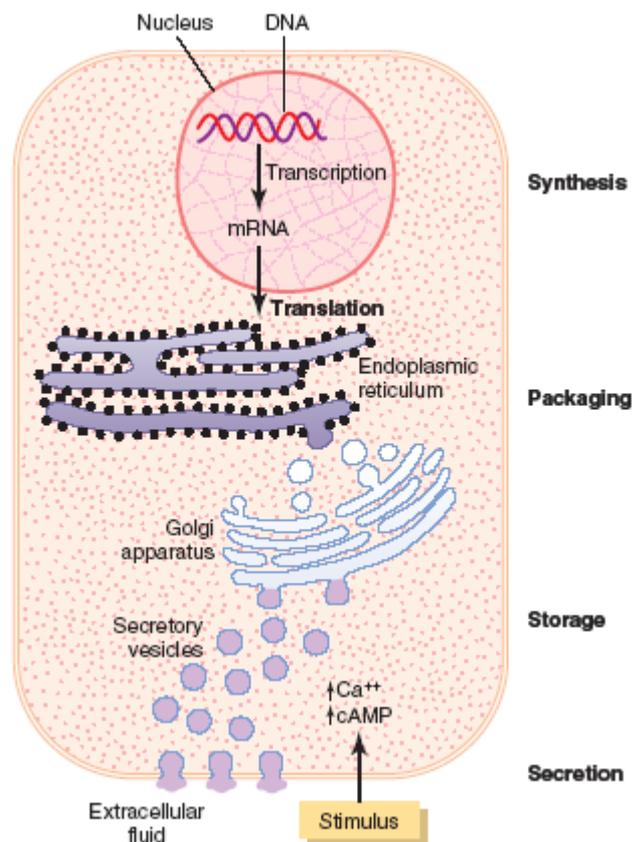
I neurosteroidi agiscono, come altre sostanze psicoattive quali le benzodiazepine, i barbiturici ed i convulsivanti, a livello dei recettori dell'acido γ -amino-butirrico A (GABA). La loro attività risulta essere bimodale in quanto alcuni sono GABA A agonisti (3α , 5α -THP, THDOC e androsterone), altri GABA A antagonisti (pregnolone e DHEAS). Un tipo di citocromo P450 mitocondriale, coinvolto nella steroidogenesi, è stato ritrovato nel cervello di ratto, in particolare a livello della sostanza bianca. I tessuti cerebrali contengono, anche, una 5α -reduttasi ed una 3α -idrossisteroidoossidoreduttasi, prevalentemente nel compartimento gliale. Questi enzimi riducono il progesterone a 3α -idrossi- 5α pregnan-20-one (allopregnanolone) e il desossicorticosterone ad allotetraidrodesossicorticosterone (Genazzani 1995) Il DHEA a livello del sistema nervoso centrale origina probabilmente dal pregnolone tramite una 17α -idrossilasi-17-20 desmolasi (enzima P450 dipendente). Il DHEA può essere metabolizzato nel sistema nervoso centrale tramite la stessa via metabolica del pregnolone e viene convertito ad androstenedione quindi ridotto ad androsterone. I neurosteroidi con attività GABA A agonista esercitano un effetto anestetico ed ipnotico, mentre quelli con attività GABA A antagonista possono esercitare anche un'azione proconvulsivante. Alcune delle attività degli steroidi neuroattivi nel ratto sono mediate dall'effetto modulatore che questi esercitano sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e su quello ipotalamo-ipofisi-gonadi, tramite l'interazione con i recettori GABA A.

I neurosteroidi sembrano essere coinvolti nei meccanismi di stress. I livelli cerebrali di pregnanolone risultano essere aumentati in condizioni di stress, contribuendo all'incremento del livello di attenzione e di allerta necessario particolarmente nelle fasi iniziali dello stress. D'altro canto gli elevati livelli di 3α , 5α -THP e di THDOC riscontrati nel plasma e nel cervello di ratto stressato, possono proteggere i neuroni da una iper-stimolazione e sembrano esercitare il loro ruolo prevalentemente nelle fasi finali delle reazioni di stress. Le complesse reazioni agli eventi stressogeni potrebbero dunque essere, almeno in parte, modulate dal bilancio tra i vari tipi di neurosteroidi. Un coinvolgimento dei recettori GABA A è stato dimostrato anche nella depressione e nell'ansia. Queste due condizioni patologiche si accompagnano infatti ad un incremento dei livelli cerebrali dei neurosteroidi eccitatori. Partendo dall'evidenza che alcuni neurosteroidi agiscono sull'eccitabilità neuronale, è stato possibile ipotizzare che gli stessi possano influenzare il comportamento. È ben noto che gli estrogeni esercitano un effetto modulatore sulla sintesi ed il rilascio di neurotrasmettitori e neuropeptidi, stimolano la crescita dendritica, le connessioni sinaptiche e la plasticità neuronale.

ORMONI PEPTIDICI

PRODUZIONE E RILASCIO

Molti ormoni proteici vengono tradotti in polipeptidi multicomponenti, detti *preproormoni*, che possiedono un'attività minima rispetto agli ormoni di cui sono composti. I preproormoni vengono rilasciati nel reticolo endoplasmatico rugoso in forma inattiva. I preproormoni contengono una o più copie di un ormone peptidico, una sequenza segnale ed altre sequenze peptidiche che possono o meno possedere attività biologica. Mentre il peptide inattivo si sposta attraverso il reticolo endoplasmatico, la sequenza segnale viene rimossa da enzimi idrolitici creando una molecola più piccola, ancora inattiva, chiamata *proormone*. Il proormone passa dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi tramite delle vescicole secretorie, contenenti enzimi proteolitici che lo scindono in ormone attivo più altri frammenti con o senza attività biologica. All'interno dell'apparato del Golgi avvengono modificazioni per azione di numerosi enzimi, che ne alterano struttura e caratteristiche chimiche. Una modificazione quasi sempre presente è la *glicosilazione*, in cui un oligosaccaride viene sostituito covalentemente alla *sequenza segnale N-terminale* della struttura proteica, per formare una *glicoproteina*, che sarà in grado proprio attraverso la struttura glucidica di riconoscere o farsi riconoscere da recettori specifici. Le vescicole secretorie traslocano e vengono immagazzinate nel citoplasma della cellula. Quando la cellula riceverà il segnale per il rilascio, le vescicole si muoveranno verso la membrana cellulare e rilasceranno il loro contenuto per esocitosi Ca^{++} -dipendente. Tutti i frammenti peptidici derivati dal proormone vengono contemporaneamente rilasciati nel liquido extracellulare in un processo noto come *cosecrezione* e l'ormone entra nella circolazione sistemica per raggiungere il suo bersaglio.



Il meccanismo con cui i peptidi vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare è rappresentato da una classica esocitosi ed avviene attraverso la successione di quattro passaggi fondamentali caratteristici. La prima azione definita di *veicolazione vescicolare* (vesicle trafficking), che prevede lo spostamento delle vescicole derivanti dall'apparato del Golgi verso la superficie cellulare, mediante adesioni specifiche alle fibre del citoscheletro con l'ausilio di proteine motrici, quali le chinesine, che consumano l'energia necessaria, sottoforma di ATP, alla loro mobilitazione.

Una volta raggiunta la sede da cui verranno liberate, ed in cui è presente un recettore interno alla membrana citoplasmatica, le vescicole passano alla *fase di raggruppamento* (vesicle tethering), in cui si legano ad alcuni fattori di raggruppamento, lunghe proteine elicoidali che le tengono unite insieme,

all'inizio abbastanza lassamente, mediante legami che le tengono a distanze superiori ai 25 nm.

Segue una *fase di aggancio* (vesicle docking), in cui le distanze tra le membrane a doppio strato lipidico si accorciano al disotto dei 5-10 nm: questa fase è mediata da speciali proteine strutturali che innescano il meccanismo di fusione delle membrane.

Nella *fase di fusione* (vesicle fusion), un complesso proteico denominato SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion proteins attachment receptor* = recettore solubile di aggancio delle proteine di fusione sensibili all'*N*-etilmaleimide) guida il processo di unione delle vescicole tra loro con la membrana cellulare, permettendo infine il rilascio delle molecole trasportate.

Durante la fusione le proteine transmembrinarie vescicolari diventano proteine costitutive della membrana cellulare, ma risultano capovolte rispetto alla loro posizione vescicolare nativa (la porzione vescicolare interna diventa porzione cellulare esterna): con questo meccanismo la superficie cellulare espone importanti recettori di regolazione per le comunicazioni transmembrana e di trasporto. Tali ormoni sono idrofili per cui solubili nel plasma, non necessitano di proteine di trasporto e possiedono un'emivita estremamente breve.

PROPRIETÀ	ORMONI STEROIDEI	ORMONI PEPTIDICI
Regolazione feedback della sintesi	Si	Si
Immagazzinamento	Molto limitato	Un giorno
Meccanismo di secrezione	Diffusione attraverso membrana plasmatica	Esocitosi delle vescicole di deposito
Legame con proteine di membrana	Si	Raramente
Vita media nel plasma	Ore	Minuti
Durata di azione	Da ore a giorni	Da minuti ad ore
Recettori	Citosolici o nucleari	Sulla membrana plasmatica
Meccanismo di azione	Il complesso recettore-ormone controlla la trascrizione e la stabilità di mRNA	Il legame dell'ormone provoca la sintesi di un secondo messaggero o il cambiamento del potenziale di membrana

Tab 1. Tabella riassuntiva delle proprietà degli ormoni steroidei e peptidici

RECETTORI E MECCANISMO DI AZIONE

Gli ormoni peptidici interagiscono con i siti specifici di recettori posti sul lato extracellulare della membrana citoplasmatica delle cellule bersaglio: i recettori attraversano quindi a tutto spessore il doppio strato lipidico. Tali recettori sono accoppiati al complesso eterotrimerico della proteina G, α - β - γ , ancorato alla membrana citoplasmatica attraverso i gruppi prenilici presenti sulle subunità β - γ . La proteina G trasferisce il segnale dall'esterno all'interno della membrana con un processo noto come trasduzione del segnale che amplifica il segnale iniziale nella cascata di reazioni intracellulari che seguono. L'attivazione della proteina G può determinare uno dei seguenti fenomeni: aprire i canali ionici della membrana; stimolare o inibire un enzima amplificatore presente sul lato citoplasmatico della membrana. Ci sono tre tipi di enzimi amplificatori: l'*adenilato ciclasi*, che catalizza la conversione di ATP in AMP ciclico; la *guanilato ciclasi*, che controlla la formazione di GMP ciclico; e la *fosfolipasi C* che converte un fosfolipide di membrana in due differenti molecole che diventano entrambe secondi messaggeri. I secondi messaggeri sono molecole intracellulari prodotte in risposta alla trasduzione di segnali. Essi costituiscono il tramite, con cui le molecole che non possono entrare nella cellula, modificano il funzionamento intracellulare. I secondi messaggeri attivano le proteine chinasi sia direttamente che tramite il rilascio di ioni Ca^{++} dagli organuli dove sono accumulati. Quattro sono i secondi messaggeri chimici conosciuti: AMP ciclico, GMP ciclico, diacilglicerolo, inositolo trifosfato. La fosforilazione del secondo messaggero scatena una serie di eventi intracellulari che portano alla definitiva risposta cellulare che dipende dal tipo di enzima attivato e dal bersaglio finale di quest'ultima. In generale, le proteine fosforilate prodotte dalle chinasi controllano uno o più dei seguenti bersagli: enzimi metabolici, proteine di trasporto, proteine che regolano l'attività di geni e sintesi di proteine e recettori di membrana.

GONADOTROPINE

GnRH E GONADOTROPINE

Nella maggior parte degli esseri viventi, il controllo di attività biologiche fondamentali (come la crescita, lo sviluppo, la produzione, l'utilizzazione e l'accumulo di energia, l'attività riproduttiva) è svolto dall'intima connessione anatomico-funzionale che si stabilisce tra alcune aree specializzate del sistema nervoso e quello endocrino. L'assoluta necessità di questo legame anatomico-funzionale tra ipotalamo ed ipofisi li fa considerare come una unica unità funzionale.

Il controllo del sistema endocrino è governato dall'ipotalamo, che si distingue in un'area mediale ed una laterale. L'area ipotalamica laterale, rappresenta il tramite tra i nuclei dell'ipotalamo mediale ed il sistema nervoso centrale (SNC). All'ipotalamo afferiscono fibre nervose ascendenti e discendenti: le prime sono costituite dalle proiezioni dei nuclei di neuroni aminergici del tronco cerebrale, principalmente dai neuroni noradrenergici del ponte e del midollo allungato. Le fibre discendenti arrivano all'ipotalamo dal proencefalo basale, dal tubercolo olfattorio, dal setto pellucido, dall'amigdala e dall'ippocampo. Dall'ipotalamo si dipartono fibre che lo collegano con il resto del SNC. Tra i fasci di fibre efferenti vi sono fasci dopaminergici provenienti dalla zona ipotalamica, che si proiettano rostralmente verso la regione soprachiasmatica e dorsale dell'ipotalamo entrando in rapporto con i neuroni peptidergici che secernono il "gonadotropin releasing hormone" (GnRH). Il sistema neurosecretorio parvicellulare rappresenta l'unità ipotalamica ipofisiotropa responsabile della funzione riproduttiva, costituito dai fasci nervosi aminergici (dopaminergici) e peptidergici (GnRH).

Il sistema neurosecretore magnocellulare è costituito dai neuroni dei nuclei supraottico e paraventricolare e dai fasci che si proiettano all'ipofisi posteriore: esso è deputato alla sintesi, al trasporto ed al rilascio dell'ossitocina e della vasopressina.

Il controllo neurale della secrezione gonadotropica ipofisaria, è mediato da un decapeptide definito, "gonadotropin releasing hormone" (GnRH) o "luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), sintetizzato soprattutto dai neuroni del nucleo arcuato, le cui terminazioni raggiungono la zona a palizzata dell'eminenza mediana. Altri neuroni producono GnRH nei nuclei ipotalamici anteriori e posteriori. La sua identificazione e sintesi è stata realizzata simultaneamente dai gruppi di Schally e da Guillemin nel 1971. Come altri neuro-ormoni, il GnRH rappresenta una parte di un precursore maggiore costituito da tre regioni di sequenze aminoacidiche codificate da una unica sequenza di DNA. Il GnRH, legato a specifiche strutture recettoriali ad alta affinità presenti sulla membrana delle cellule gonadotrope ipofisarie, determina una microaggregazione per cui il complesso recettore-ormone viene rapidamente internalizzato per endocitosi. La microaggregazione recettoriale, attiva la proteina legante la guanosina che rappresenta a sua volta un segnale di attivazione per l'enzima fosfolipasi C. L'idrolisi di inositolo fosfolipidi avviata dalla fosfolipasi C porta ad una miscela di diacilglicerolo ed inositolo trifosfato. A questo punto si separerebbero le due vie differenti che portano rispettivamente alla liberazione ed alla sintesi delle gonadotropine. La prima via parte dall'inositolo trifosfato che determina un immediato incremento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{++} attraverso la mobilizzazione dello ione sequestrato negli organuli citoplasmatici. Parallelamente, il diacilglicerolo è idrolizzato ad acido fosfatidico ed acido arachidonico. Quest'ultimo viene metabolizzato dalle ipossigenasi, con formazione di derivati dell'acido epossieicosatrenoico, che determinano l'ingresso selettivo del Ca^{++} extracellulare. Il processo finale di esocitosi dei granuli citoplasmatici contenenti FSH ed LH è innescato dal legame del Ca^{++} alla calmodulina.

La seconda via del secondo messaggero inizia dal diacilglicerolo, che ridistribuisce la proteina C chinasi dal citoplasma alle membrane delle cellule gonadotrope. Tale enzima attivato fosforila ed attiva a sua volta un certo numero

di proteine, che stimolano la trascrizione di mRNA per la sintesi delle gonadotropine.

Il controllo della secrezione del GnRH viene attuato mediante una delicata sincronizzazione tra organi effettori ed organi bersaglio. Il processo neurosecretorio responsabile della liberazione del GnRH, è di base un processo energetico calcio-dipendente, innescato da una depolarizzazione di membrana, sia elettrica che chimica. *In vivo* ed *in vitro* tre componenti sembrano correlarsi per la secrezione del GnRH: due di esse, il sistema adenil ciclasi e quello che attiva la chinasi proteica cAMP-dipendenti, richiedono il Ca^{++} extracellulare; invece il sistema PGE₂, non è dipendente dal Ca^{++} extracellulare ma è capace di mobilizzare il Ca^{++} intracellulare.

Il livello di controllo interneuronale, si attua attraverso una complessa rete di interconnessioni nervose, che agiscono sul sistema deputato alla sintesi del GnRH, in grado di condizionare i ritmi biologici di rilascio del peptide. Sull'attività del sistema si innestano inoltre impulsi di natura fondamentalmente vegetativa, con effetti stimolatori od inibitori. Le fibre che veicolano questo tipo di segnali, appaiono a loro volta sottoposte ad impulsi provenienti dalle strutture cerebrali superiori, che governano la vita di relazione del soggetto. Schematicamente, nel controllo autonomo della funzione neuronale per la sintesi del GnRH sono implicate :

- vie noradrenergiche, afferenti dal tronco encefalico;
- vie oppioidergiche, afferenti prevalentemente dall' ipotalamo mediobasale;
- vie serotoninergiche, derivanti dal mesencefalo;
- vie gabaergiche, di origine ipotalamica.

La noradrenalina (NA), presente in quantità elevate nel nucleo arcuato e nel nucleo dorso-mediare dell'ipotalamo , è l'unico neuromediatore del GnRH non prodotto dall'ipotalamo, bensì nel tronco encefalico. La NA viene considerata il principale neurotrasmettitore con effetti stimolatori sul rilascio del GnRH, mediante l'attivazione di recettori α -adrenergici . Il controllo noradrenergico sul

GnRH sembra mediare il ritmo della dismissione di LH, nonché gli effetti degli estrogeni sul rilascio GnRH-gonadotropine.

L'effetto della dopamina (DA) sulla secrezione del GnRH è tuttora controverso, ma appare certo che il sistema dopaminergico, che controlla la secrezione del GnRH, è quello tuberoinfundibolare-dopaminergico (TIDA). In vitro la DA stimola il rilascio di GnRH mentre in vivo lo inibisce con la mediazione della β -endorfina. L'effetto modulatore, di segno opposto, dei sistemi dopaminergico e noradrenergico avrebbe un ruolo importante nel controllo del fenomeno ovulatorio. Esisterebbe, infatti, una sorta di antagonismo tra la NA e la DA nel controllo della secrezione di GnRH, che culmina al momento dell'ovulazione, quando si ha la massima secrezione di NA e la caduta del tono dopaminergico. La DA è inoltre il principale neuromediatore con chiaro effetto inibitorio sulla secrezione della prolattina ipofisaria. Gli oppioidi endogeni, prodotti dai neuroni che costituiscono la via preotticotuberale, vengono sintetizzati a partire dai loro precursori, quali il pre-POMC, la preproencefalina A e la prepro-encefalina B. Da ognuno di questi si ottengono rispettivamente: le β -endorfine, che esercitano la maggiore azione inibitoria sul rilascio del GnRH; le encefaline, che non sembrano avere effetti inibitori; le dinorfine, che sopprimono anch'esse, sebbene con minore attività, il rilascio del GnRH.

Gli effetti degli oppioidi endogeni sembrano essere indiretti, mediati probabilmente da una inibizione del rilascio della NA. Si ipotizza inoltre che sui neuroni oppioidergici del nucleo arcuato vi siano recettori per gli estrogeni, che giustifica perché nelle donne in menopausa l'azione inibitoria degli oppioidi endogeni venga meno a causa dell'ipoestrogenismo.

Gli oppioidi eserciterebbero, anche un'azione ipofisaria, stimolando il rilascio della PRL. Dati sperimentali sostengono la necessità dell'integrità delle vie serotoninergiche, perché si manifesti l'effetto di controregolazione positiva degli estrogeni sul rilascio preovulatorio delle gonadotropine.

Infine, le vie gabaergiche sembrano avere effetto inibitore sull'attività dei neuroni noradrenergici, mentre l'incremento del tono gabaergico medierebbe l'effetto controregolatore negativo degli estrogeni a livello ipotalamico.

Sotto lo stimolo del GnRH vengono rilasciate dall'ipofisi le gonadotropine ipofisarie, LH ed FSH. Si tratta di glicoproteine costituite da due subunità polipeptidiche, unite da legami non covalenti ad alta affinità. La subunità denominata "alfa" è comune alle due gonadotropine, ma anche al TSH ed all'hCG. L'altra subunità, detta "beta", è specifica per ogni gonadotropina. Nella struttura generale di queste glicoproteine, si descrive la presenza di catene glucidiche: due gruppi nelle subunità α ed un gruppo nella subunità β . È probabile che essi abbiano un ruolo nell'attivazione recettoriale e nel mantenimento della stabilità metabolica della molecola.

Le subunità α e β , individualmente sono biologicamente inattive, né mostrano capacità di legame con il sito recettoriale specifico. La combinazione delle due catene configura quindi, lo stato attivo della molecola, consentendo alla subunità α di occupare la maggior parte dei siti di legame recettore-ormone ed alla subunità β di realizzare la sua conformazione attiva.

Le modalità di rilascio del GnRH nel sistema portale ipotalamo-ipofisario, hanno una funzione critica sull'attività biologica delle cellule gonadotrope. Infatti, nei primati non umani con scollegamento ipotalamo-ipofisario, la stimolazione esogena delle cellule gonadotrope, con frequenze ridotte delle pulsazioni di GnRH, determina un'alterazione del rapporto tra le due gonadotropine prodotte, mentre un incremento della frequenza, inibisce la secrezione delle gonadotropine, attraverso il fenomeno della "*down regulation*" sul sistema recettoriale gonadotropo.

Durante la fase luteale i picchi di LH diminuiscono di frequenza e crescono in ampiezza, soprattutto in fase luteale tardiva. Queste modificazioni sono, probabilmente conseguenza dell'effetto inibitorio espletato dal progesterone sull'ipotalamo, mediante neuromediatori oppioidergici.

Le concentrazioni plasmatiche delle gonadotropine, sono maggiori durante la fase follicolare rispetto alla luteale in quanto in tale fase esplicano il loro ruolo predominante nel controllo della regolazione della steroidogenesi.

La steroidogenesi ovarica è un processo che necessita del contributo delle cellule teicali e delle cellule della granulosa secondo una sorta di sinergismo funzionale. Nel periodo follicolare le cellule della granulosa sono prive di apporto vascolare; spettano quindi alla teca le prime fasi della sintesi steroidea che consistono nella produzione di molecole a 19 atomi di carbonio ad azione androgenica. Questo processo, è sottoposto all'influenza stimolante dell'LH, che porta principalmente alla formazione di androstenedione e di testosterone. I due androgeni in parte vengono secreti nel circolo generale, dove sono soggetti alla trasformazione da parte degli organi periferici, in parte passano nella granulosa dove sotto lo stimolo dell'FSH, sono convertiti in estrogeni dalle aromatasi.

Nella granulosa gli androgeni LH-indotti di origine tecale vengono aromatizzati ad estrogeni (E) sotto lo stimolo dell'FSH. La granulosa possiede anche una debole attività steroidogenica intrinseca che porta alla formazione di progesterone (P4) ma è limitata dalla scarsissima disponibilità del colesterolo in questa sede. E' probabile che piccole quantità di progesterone prodotte nella granulosa vengano utilizzate per la sintesi di androgeni; questo processo è sottoposto ad un controllo a "feed-back" negativo da parte degli estrogeni. Il P4 inoltre frena l'azione dell'FSH sull'aromatasi e sulla sua stessa sintesi.

La produzione di androstenedione (A4) da parte delle cellule teicali dipende principalmente dallo stimolo dell'LH mediato dall'AMP ciclico. PGE₂, insulina, "Insulin Growth Factor-1" (IGF-I) e norepinefrina (NE) favoriscono questo processo agendo o sull'adenil ciclasi o sui recettori per l'LH.

Le LDL circolanti, oltre a costituire la fonte principale del colesterolo, rappresentano anche uno stimolo per la steroidogenesi. Prolattina (PRL), "Epidermal Growth Factor" (EGF), GnRH ed estradiolo (E₂) sono tutti fattori in grado di rallentare la trasformazione del colesterolo in androgeni agendo a vari livelli. La conversione degli androgeni (androstenedione e testosterone) in

estrogeni (estrone ed estradiolo) è indotta principalmente dall'FSH. Insulina, IGF-1, "Transforming Growth Factor- β (TGF- β) e activina ne potenziano l'azione, mentre l'LH la mantiene. Progesterone, GnRH, glucocorticoidi, "Transforming Growth Factor- α " (TGF- α), EGF, "Fibroblast Growth Factor" (FGF) e inibina hanno invece effetto inibente.

Dopo l'ovulazione inizia ad organizzarsi il corpo luteo: lo spazio antrale verrà parzialmente o totalmente occupato dai precursori delle cellule luteiniche e da piccoli vasi che stabiliscono anastomosi con i vasi venosi della superficie interna della parete luteale. Il corpo luteo induce la propria vascolarizzazione mediante la produzione di "*fattori angiogenici*". Oltre alle cellule luteali propriamente dette, nel corpo luteo dei primati è stata descritta la presenza di piccole cellule luteiniche di diametro più piccolo (15 μm), dette *cellule paraluteiniche*: la loro origine e funzione non è nota, ma probabilmente originano dalle cellule stromali che rappresentano cellule tecali in degenerazione, e sembrano deputate alla secrezione steroidea.

In alcune specie di animali domestici, tra cui il coniglio, le cellule luteali si differenziano in due sottogruppi: le piccole cellule luteiniche (8-22 μm) e le grandi cellule luteiniche (>22 μm). Il dato importante in queste popolazioni cellulari è costituito dalla diversa attività funzionale dei due gruppi. Le grandi cellule producono elevate quantità di progesterone e sono in grado di produrre relaxina ed ossitocina, ma non posseggono recettori per l'LH. Presentano, inoltre recettori per le PGF 2α e per l'estradiolo. Per contro, le piccole cellule luteiniche rappresentano il bersaglio primario per l'LH, che determina incremento di cAMP e la produzione di progesterone. È quindi ipotizzabile che l'effetto di differenti fattori che controllano l'attività del corpo luteo (luteotropi e luteolitici) possa essere modulato attraverso l'attività delle due popolazioni cellulari.

L'andamento delle concentrazioni plasmatiche di progesterone riflette fedelmente l'attività funzionale del corpo luteo. Un'adeguata dinamica della maturazione follicolare è un requisito fondamentale per una normale funzione

luteale. L'acquisizione del patrimonio recettoriale per l'LH, è fondamentale per il processo di luteinizzazione dei follicoli . Questo processo dipende dall'FSH: infatti la soppressione di questa gonadotropina durante la fase follicolare genera una riduzione dei livelli plasmatici preovulatori di estradiolo e di progesterone luteale ed una riduzione della massa cellulare del corpo luteo. Il preciso ruolo dell'LH nello sviluppo, mantenimento e regressione della funzione luteale non è ancora ben definito. Le fluttuazioni sincrone di progesterone ed LH in fase luteale media, confermano l'effetto steroidogenico dell'azione dell'LH e sostengono la dipendenza della funzione luteale, almeno in questa fase, dall'aumento gonadotropo ipofisario.

RECETTORE FSH E TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Il recettore per l'FSH fa parte della grande famiglia dei recettori transmembrana che regolano le proteine G eterotrimetriche. Il recettore maturo (678 aminoacidi, 76.465 Da) è organizzato in tre regioni:

1. una lunga porzione per il legame (359 residui) con l'estremità NH₂-terminale in posizione extracellulare, che contiene sei potenziali siti di glicosilazione con un gruppo azotato ed un residuo cisteinico alla giunzione tra i settori extracellulare e transmembrana. Questo gruppo cisteinico è conservato anche nei recettori per l'LH ed il TSH e si ritiene pertanto giuochi un ruolo nei processi di legame;

2. una regione transmembrana composta da 7 eliche α idrofobiche che vincolano il recettore alla membrana;

3. loop intracellulari ed una porzione COOH-terminale che contiene una percentuale relativamente elevata di serine e di treonine. Questi settori intracellulari giocano un ruolo di regolazione sulle proteine G, e potrebbero entrare in funzione nei meccanismi che controllano la desensibilizzazione e la ipo-regolazione.

Sono stati trovati isomeri tronchi del recettore per l'FSH, corrispondenti al settore extracellulare. Non è chiaro se si tratti di proteine rilevanti dal punto di vista fisiologico; tuttavia è possibile che esse svolgano una funzione determinante per la biodisponibilità dell'FSH a livello delle cellule della granulosa.

Nell'ovaio umano il recettore per l'FSH viene espresso nelle cellule della granulosa in una fase molto precoce della follicologenesi. Benché il meccanismo che controlla l'espressione dei recettori per l'FSH nella specie umana sia sconosciuto, nei roditori è dimostrato un ruolo autocrino dell'attivina nell'induzione e nel mantenimento dei recettori per l'FSH. Tutte le cellule della granulosa esprimono abbondantemente i recettori per l'FSH, a prescindere dalla loro posizione all'interno del follicolo o del corpo luteo.

L'incremento localizzato della concentrazione di FSH nel microambiente induce l'espressione di tre importanti risposte fisiologiche nelle cellule della granulosa, vale a dire *il potenziale steroidogenico, le mitosi e l'induzione del recettore per l'LH*.

Il principale meccanismo molecolare che segue l'interazione dell'FSH con il suo recettore prevede l'attivazione differenziale di due geni: la P450 aromatasi e la 17 -idrossisteroidodeidrogenasi. Andrebbe sottolineato che la via del segnale per l'FSH controlla anche la potenziale sintesi di progesterone da parte delle cellule della granulosa.

Il meccanismo con cui l'FSH stimola le mitosi rimane sconosciuto, anche se è stata postulata la presenza di un fattore di crescita. E' stato dimostrato che il *fattore di crescita insulino-simile-1*, il *fattore di crescita dei fibroblasti* ed il *fattore di crescita epidermico* incrementano le mitosi nelle cellule umane della granulosa. L'FSH potrebbe stimolare le mitosi attraverso uno o più di questi fattori di crescita. E' certamente una sfida importante quella di identificare le molecole effettrici che in alcuni mammiferi mediano le mitosi FSH-dipendenti nel follicolo dominante e di comprendere come queste vie non funzionino nel gruppo di follicoli destinati a morire per atresia.

Un altro importante cambiamento che dipende dall'FSH e si verifica nel follicolo è l'espressione dei recettori per l'LH nelle cellule della granulosa . Questi recettori hanno un ruolo fondamentale nell'innescare l'ovulazione indotta dall'LH. Questo evento si verifica rapidamente ed ha luogo nella fase follicolare tardiva, prima del picco ematico dell'LH.

Altre possibili azioni dell'LH, comprendono la cessazione delle mitosi e l'induzione dell'atresia.

RECETTORE LH E TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Nella produzione di estradiolo sono coinvolte in modo fondamentale le interazioni LH-recettori a livello delle cellule interstiziali della teca (TIC). L'attivazione della via di segnale del recettore per l'LH si associa all'espressione di una batteria di geni che portano ad una maggiore biosintesi di androstenedione. Il cDNA del recettore per l'LH nella specie umana è stato clonato e ne è stata definita la sequenza. Anche questo recettore fa parte della grande famiglia dei recettori transmembrana che interagiscono con le proteine G. Come per il recettore per FSH anche quello LH è organizzato in tre porzioni:

- 1) una porzione extracellulare con sei siti potenziali di glicosilazione e gruppi cisteinici a livello della giunzione tra i settori extracellulari e transmembrana. L'interazione con i residui aminoacidici, non con i carboidrati, promuove il legame con l'LH

- 2) un settore transmembrana a 7 eliche α idrofobiche che vincolano il recettore alla membrana

- 3) una porzione intracellulare COOH-terminale che interagisce con i residui del terzo loop intracellulare per attivare le proteine G. La porzione COOH terminale contiene anche potenziali siti di fosforilazione che mostrano siti comuni per la fosforilazione della proteina chinasi C (PKC).

Benché non sia nota la funzione della fosforilazione del recettore per l'LH, anche in questo caso essa potrebbe giocare un ruolo nella desensibilizzazione e nella ipo-regolazione del recettore stesso. Anche per LH-R, come per FSH-R, sono stati identificati frammenti di recettori in cui il settore transmembrana è assente. Tali recettori tronchi possono essere interamente extracellulari o persino secreti dalle cellule. Non è noto se tali varianti più corte siano funzionanti; tuttavia, se interagiscono con l'LH potrebbero influenzarne la biodisponibilità a livello delle cellule interstiziali della teca. Come con l'FSH, il meccanismo con il quale l'LH induce una risposta biologica passa attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale della proteina chinasi A (PKA) cAMP dipendente. Le

proteine eterotrimetriche di proteine G agiscono come trasduttori che accoppiano i recettori attivati dall'LH all'adenil ciclasi che, a sua volta attivata, sintetizza il secondo messaggero, l'AMP ciclico . Quest'ultimo attiva la PKA, e questa fosforila specifici residui serinici e treoninici sulle proteine substrato. Le proteine fosforilate inducono risposte citoplasmatiche e nucleari che possono portare ad un aumento della steroidogenesi.

A livello nucleare, il meccanismo d'azione dell'LH coinvolge l'attivazione selettiva dei geni, soprattutto la trascrizione dei geni P450c22, P450c17 e 3 β -HSD, ma rimane ancora da determinare la natura dei fattori di trascrizione.

Infine, da molti anni si sa che la tappa limitante l'entità della steroidogenesi riguarda la traslocazione di colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna (dove può essere metabolizzato dal P450c22 a pregnolone) da parte della StAR: recentemente questa proteina, è stata isolata e clonata . Un concetto importante è che la StAR è insostituibile per la steroidogenesi LH-stimolata.

ORMONI POMC DERIVATI

PRODUZIONE E RILASCIO

La ricerca sul POMC iniziò alla fine degli anni '60, dopo che erano stati scoperti i proormoni proinsulina e lipotropine, e quando Yalow & Berson. evidenziarono la presenza di materiale ACTH attivo ad alto peso molecolare in estratti di tumore timico. Solo alla fine degli anni '70, mediante lo studio del cDNA, si poté definitivamente appurare che la molecola dell'ACTH non era l'unica presente nel polipeptide, ma che la proteina veniva precipitata da anticorpi anti ACTH come da anti β -LPH ed anti β -endorfina. Il gene POMC umano è una sequenza policistronica con una singola espressione sul cromosoma 2p23: la sua dimensione è di 7665 bp ed è formato da 3 esoni e 2 introni. Le zone di clivaggio della proteina che ne risulta dipende dagli enzimi presenti nelle varie cellule e dall'utilizzo che le cellule produttrici ne faranno per la loro omeostasi se ad esempio viene sintetizzata nelle cellule corticotrope dell'ipofisi anteriore sarà frammentata in quattro siti, mentre in altri tessuti (come ipotalamo, placenta ed epitelio) verranno utilizzati tutti i siti di scissione per produrre peptidi utili all'omeostasi energetica e del dolore, alla stimolazione dei melanociti e del sistema immunitario. In questo caso si parla di distinte melanotropine, lipotropine ed endorfine contenute all'interno delle sequenze maggiori dell'adrenocorticotropina e della β -lipotropina (Cochet 1982).

Mutazioni di questo gene sono state correlate alla comparsa di obesità precoce, insufficienza surrenale e perfino alla pigmentazione rossa dei peli. Sono anche state descritte varianti "spliced" che codificano per la stessa proteina senza alcuna alterazione fenotipica.

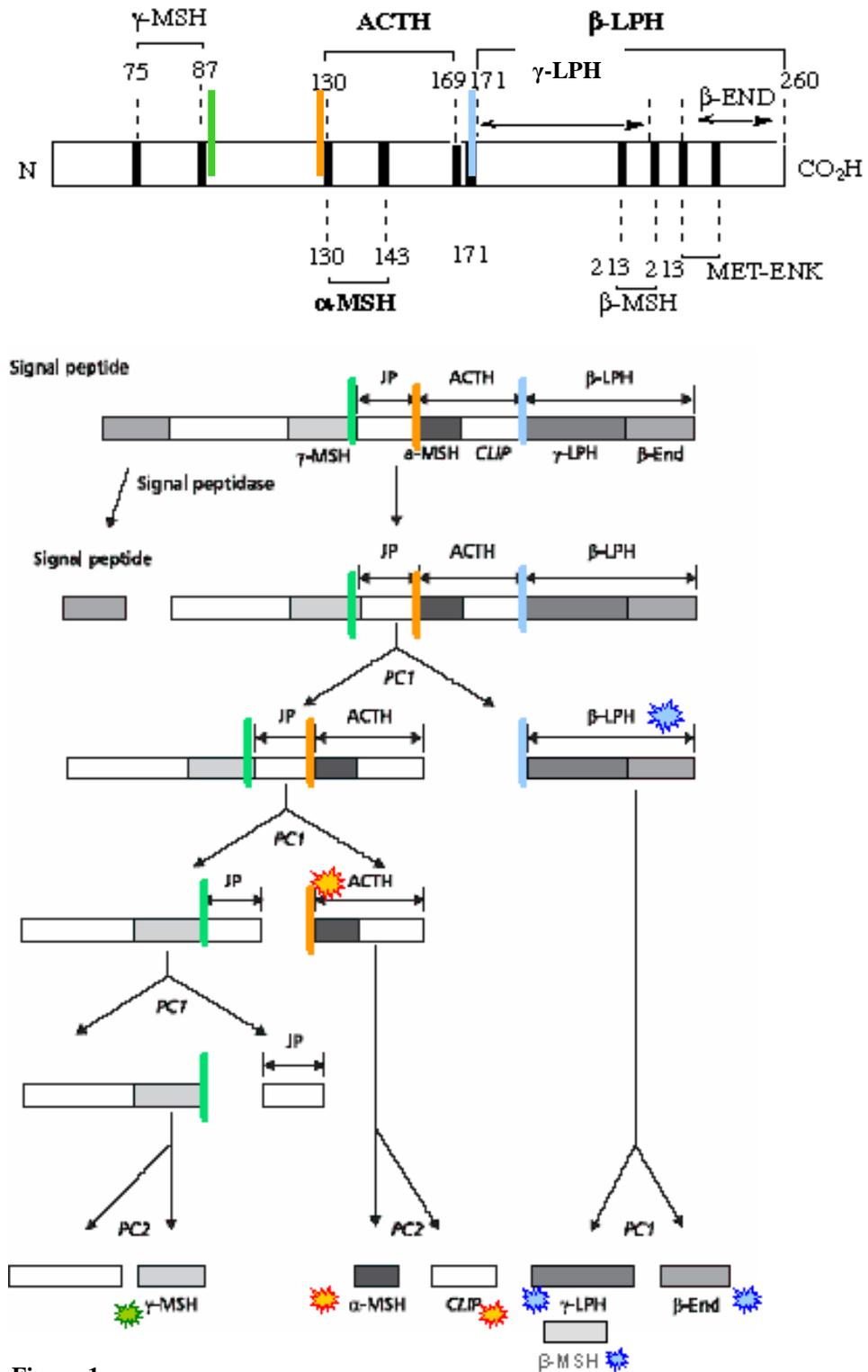


Figura 1
POMC e prodotti di clivaggio

POMC è un peptide di 240 aminoacidi che ha la potenzialità, all'interno della sua molecola, di generare varie altre molecole di grande significato biologico e neurologico in virtù di eventi che seguono alla sintesi proteica e sono rappresentati da clivaggi proteolitici in sedi strategiche della molecola della POMC (Eipper 1980). Come descritto in precedenza durante la traslocazione dal reticolo del Golgi alla membrana cellulare periferica per la secrezione, la POMC contenuta nelle vescicole secretorie subisce una serie di degradazioni che rilasceranno nel fluido interstiziale gli ormoni peptidici attivi. Tali scissioni avvengono ad opera di enzimi contenuti all'interno delle vescicole (trascritti e tradotti insieme al proormone) che vengono chiamati *proormone convertasi* (PC) (König 2006), a loro volta attivati dai rispettivi zimogeni inattivi. Al controllo dell'attività delle peptidasi sono predisposti una serie di famiglie di inibitori (Rawlings 2004)

Non solo la POMC, ma gli ormoni stessi possono essere secreti come frammenti *preormonali*, come è il caso del pro-ACTH, che viene successivamente scisso in ACTH nei siti d'azione. Oltre alle PC, il proormone o i suoi frammenti possono subire l'attacco di differenti proteasi, come l'*endopeptidasi neutra* (NEP, o *neprilisina*), e lo stesso ACE (*angiotensin-converting enzyme* o *kininase II* o *dipeptidyl peptidase A*) può essere coinvolto nella degradazione della POMC per la produzione di ACTH₁₋₃₉. Per la processazione della proopiomelanocortina sono stati riconosciuti principalmente 2 tipi di PC: la PC1 (*proprotein convertase 1*), inibita dalla pro-SAAS; e la PC2 (*proprotein convertase 2*), che ha come inibitore la 7B2 (*secretogranina V*). All'interno della POMC questi peptidi sono separati l'uno dall'altro da due o più aminoacidi basici che servono come sedi di riconoscimento per il clivaggio proteolitico che avviene all'interno dell'apparato del Golgi. POMC può essere considerata composta da tre domini principali (Chang 1980).

Il Dominio I o Dominio N-terminale, che da origine a :

- Glicopeptide N-terminale 1-76
- Joining Peptide(JP) 79-108

Il Dominio II o Dominio intermedio dal quale deriva:

- ACTH 112-150

Il Dominio III o Dominio C-terminale che da luogo a :

- β -Lipotropina (β -LPH)153-240.

Nel Cervello l'ACTH è clivato fino a fornire α -MSH 112-124, CLIP 130-150 ed il rapporto γ -MSH/ACTH è 300 volte maggiore nell'Ipotalamo, telencefalo e mesencefalo rispetto alla Ipofisi anteriore. In modo simile la β -LPH nelle sedi extraipofisarie è ulteriormente clivata a fornire β -LPH 153-207 e β -Endorfina 210-240 con un rapporto superiore a 30 rispetto all'ipofisi.

RECETTORI MELANOCORTINICI (MC-R)

I recettori melanocortinici (MC-R) clonati sono di cinque tipi tutti legati a proteine G e con struttura 7TM. Questi recettori sono molto conservati: lo dimostra il fatto che importanti proprietà strutturali dei MC-R si sono conservate per un periodo di almeno quattrocento milioni di anni, e sembra che questi recettori siano apparsi perfino prima dell'apparizione dei vertebrati stessi, cosa che sottolinea l'importante ruolo fisiologico che rivestono. I sottotipi MC-R sono simili nella struttura aminoacidica primaria, ma questa somiglianza non si è conservata nella loro funzionalità.

MC1-R è stato il primo recettore della famiglia MC-R ad essere clonato da una linea cellulare di melanoma di topo e da melanociti umani (Mountjoy 1992).

MC1-R mostra affinità per: $\alpha\text{-MSH} \geq \text{ACTH} > \beta\text{-MSH} \gg \gamma\text{-MSH}$

MC1-R data la sua maggiore affinità è considerato il recettore di $\alpha\text{-MSH}$. L'interazione MC1-R / $\alpha\text{-MSH}$ regola la pigmentazione cutanea, tuttavia anche altre cellule esprimono tale recettore come i fibroblasti, le cellule endoteliali, i macrofagi, i monociti ed i linfociti: in queste ultime cellule sembra avere un ruolo antinfiammatorio ed immunomodulatore (Wikberg 1999). MC1-R risulta iper-regolato nella pelle in presenza di alte quantità di ligando e di endotelina (Abdel 2001); esso è anche espresso nel corpo luteo dove probabilmente è coinvolto nella risposta luteolitica vascolare.

MC2-R, meglio conosciuto come ACTH-R, fu clonato dalle ghiandole surrenali (Chajlani 1993). Possiede attività lipolitica e di induzione della steroidogenesi, è anche espresso nel tessuto adiposo bianco dei roditori e di altri mammiferi, ma non nell'uomo, (Boston 1998), dove svolge attività lipolitica.

MC2-R mostra affinità per: **ACTH**

MC3-R è espresso in molte aree del sistema nervoso centrale, ma anche in altri distretti, come il tratto gastrointestinale, il cuore ed in alcune cellule ematiche, come macrofagi e monociti.

MC3-R mostra affinità per: $\gamma\text{-MSH} = \text{ACTH} \geq \alpha\text{-MSH}$

L'attivazione a livello centrale dei recettori MC3R ed MC4R, provoca uno stimolo anoressigeno, mentre il blocco di tali recettori incrementa l'assunzione del cibo e l'aumento del peso (Lu 2001; Olszewski 2003). Le altre funzioni di MC3-R variano a seconda del ligando.

MC4-R è espresso principalmente nel SNC e nel midollo spinale agisce stimolando le funzioni neuroendocrine e l'omeostasi energetica (Mountjoy 1997). MC4-R mostra affinità per: α -MSH = ACTH \geq γ -MSH

Un suo ruolo, recentemente scoperto, riguarda la modulazione della funzione erettile. Alcuni difetti genetici su tale gene sono associati ad un aumento dell'indice di massa corporea che può evolvere verso l'obesità

MC5-R è stato l'ultimo gene melanocortinico ad essere clonato (Labbe 1994), la sua espressione è ubiquitaria: surrenali, reni, polmone, midollo, timo, ghiandole mammarie, tessuto adiposo, ovaio, utero... (Van der Kraan 1998). MC5-R mostra affinità per: α -MSH \geq ACTH $>$ γ -MSH

È stato dimostrato che la mancanza di MC5-R nella pelle è associata con una diminuzione della secrezione dei feromoni sessuali, α - e β - farnesene. Questi ormoni stimolano potentemente l'aggressività nel topo (Morgan 2004).

ORMONE ADRENOCORTICOTROPO (ACTH)

Quando attraverso gli organi di senso viene colto uno stimolo aspecifico, lo stress, si determina l'attivazione e la modulazione dei neuroni aminergici sopraipotalamici secernenti noradrenalina, acetilcolina e serotonina che, a loro volta, influenzano i neuroni peptidergici ipotalamici. Questi ultimi immettono nella circolazione portale-ipofisaria il CRH che arriva all'ipofisi e stimola la secrezione di ACTH. Quest'ultimo va ad agire sulle cellule della zona reticolare e fascicolata del corticosurrene inducendo la secrezione di cortisolo e di androgeni surrenalici.

Il cortisolo esercita un effetto feedback negativo sia sull'ipofisi *feed-back corto*, che sull'ipotalamo *feed-back lungo*. Esso esercita anche un effetto feedback negativo su sé stesso, *feed-back extracorto*. L'ACTH esercita un effetto feedback sui neuroni peptidergici ipotalamici che secernono CRH. Tra le azioni biologiche più importanti svolte dal CRH vi è quella di favorire la steroidogenesi surrenalica inducendo la liberazione, da parte dell'ipofisi, dell'ACTH.

L'ACTH è un polipeptide costituito da 39 aminoacidi, dei quali i primi 23 (1-23) costituiscono il nucleo attivo specifico della molecola (Bennett 1973), mentre i restanti 16 (24-39) costituiscono la coda variabile della molecola, con funzione stabilizzatrice. La sua emivita è di circa 10 minuti. Questo ormone esercita sia alcuni effetti sul surrene che extrasurrenalici. Tra i primi in particolare sulla zona fascicolata e reticolare, occorre ricordare:

- stimolazione della crescita del corticosurrene;
- mantenimento delle dimensioni e dell'integrità del corticosurrene;
- mantenimento dell'attività enzimatica sintetica steroidea;
- aumento del flusso plasmatico surrenalico;
- attivazione dell'AMP ciclico: che rappresenta lo stimolo e l'avvio della steroidogenesi;
- accumulo di colesterolo nelle cellule cortisolo-secernenti;
- stimolazione della tappa di conversione del colesterolo in pregnolone.

Tra gli effetti extrasurrenalici realizzati dall'ACTH il più importante è rappresentato dall'azione melanocitostimolante, che deriva dalla provenienza dell'ACTH dalla pro-opiomelanocortina.

Un gran numero di fattori interagiscono per determinare il pattern finale di secrezione integrata dell'ACTH. Questi fattori (stress, ritmi circadiani, feedback negativo dei corticosteroidi e della leptina) agiscono in modo integrato tra di loro per controllare la sintesi e la secrezione dell'ormone. La secrezione di ACTH è caratterizzata da un rilascio di tipo "pulsatile" da parte delle cellule corticotrope ipofisarie senza secrezione interpulsazione. Nelle 24 ore nell'uomo è possibile riconoscere dai 12 ai 40 pulsazioni di ACTH, (Horrocks 1990). La secrezione di β -Endorfina è parallela alla secrezione pulsatile dell'ACTH. Il ritmo circadiano di ACTH dipende dal ritmo circadiano del CRH (Abe 1979). Questo nucleo è stimolato dal ritmo luce-oscurità trasmesso da zone retiniche non adibite alla visione diretta tramite una proiezione diretta retino-ipotalamica. I cicli luce-oscurità agiscono quindi quali "*time-giver*" nel generare il più noto dei ritmi endogeni circadiani.

E' stata dimostrata una correlazione tra il ritmo circadiano di ACTH di cortisolo e il ritmo circadiano della leptina, l'ormone proteico sintetizzato dagli adipociti. Il pattern di secrezione della leptina è inversamente correlato a quello dell'asse corticosurrenalico. Poiché la somministrazione in vivo di leptina sopprime l'incremento di cortisolo indotto dallo stress e l'aumento del CRH indotto dalla ipoglicemia è ragionevole pensare che la leptina possa avere un ruolo di normale feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Esiste un legame anatomico attraverso il quale i neuroni leptino-responsivi possono influenzare l'attività ritmica del nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo.

Il ritmo dell'ACTH è legato a variazioni nell'ampiezza e non nella frequenza delle pulsazioni secretorie. Tutti i peptidi correlati al POMC sono cosecreti con un ritmo circadiano simile a quello dell'ACTH, ed i loro punti di minimo differiscono solo in relazione alla loro diversa emivita plasmatica.

SEGRETAGOGHI DELL'ACTH

Come accennato l'attivazione del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (NPV), successivamente a input stressogeni (interni od esterni), induce un aumento del CRH. A sua volta quest' ultimo, in sinergia con la vasopressina, determina un maggiore aumento dei peptidi derivati dalla POMC.

Durante forti stimoli stressogeni è osservabile una ipersecrezione sia di ACTH che di glucocorticoidi ed un incremento di CRH. Parallelamente si riscontra una desensibilizzazione dei recettori per il CRH a livello delle cellule corticotropiche, probabilmente a seguito degli aumentati livelli basali di cortisolo (Nemeroff 1984; Barden 2004). Una ipotesi riguardante il possibile meccanismo d'azione degli antidepressivi sulla normalizzazione funzionale dell'asse HPA è che tali farmaci, dopo alcune settimane di trattamento continuativo, possano determinare un incremento della concentrazione cellulare dei recettori per i corticosteroidi, rendendo quindi il sistema più suscettibile all'effetto inibitorio di feedback esercitato dal cortisolo. Controprova di tale azione sui recettori potrebbero essere le modificazioni dell'RNA messaggero indotte da antidepressivi, sia per i recettori MR che per quelli GR (Kitayama 1988; Seckl 1992).

L'azione degli antidepressivi, oltre ad aumentare il meccanismo di inibizione a feedback mediante il potenziamento del sistema recettoriale dei mineralcorticoidi e glucocorticoidi, potrebbe anche agire attraverso l'inibizione della trascrizione genica riguardante i recettori per il corticosterone (Budziszewska 2002). Il CRH, infatti, induce effetti comportamentali ben codificati, producendo negli animali, in maniera dose-dipendente, aumento della vigilanza: questi effetti risultano persistenti anche dopo ipofisectomia (Eaves 1985). Alle dosi più elevate, o negli animali già stressati, gli effetti del CRH divengono ansiogeni, con aumento dell'attività motoria, della frequenza cardiaca e respiratoria, della pressione arteriosa, dei livelli di glicemia, della inibizione

della attività sessuale e dell'assunzione di cibo. Risulta evidente l'attivazione simpatica e l'inibizione parasimpatica (De Souza 1995; Heinrichs 1995).

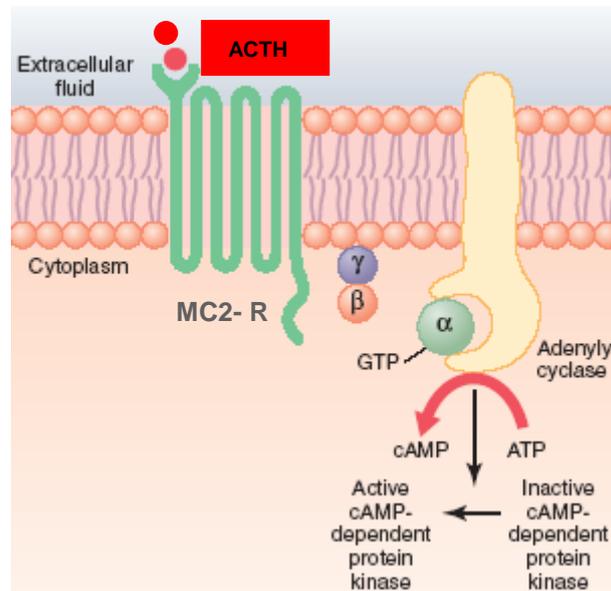
Gli effetti del CRH sono mediati da due diversi tipi di recettori: i CHR_1 , l'attivazione dei quali induce ansia, ed i CHR_2 che dimostrano effetti opposti. Questi ultimi, quali antagonisti dei CHR_1 , potrebbero dimostrare effetto ansiolitico ed antidepressivo (Nibuya 1995; Zobel 2000). Analoga potenziale attività antidepressiva potrebbe essere esercitata da steroidi con azione antiglicocorticoide, come ad esempio il deidroepiandrosterone (DHEA), (Wolkowitz 1999).

Il ruolo del CRH è caratterizzato dai seguenti eventi neuroendocrini:

- Attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene
- Attivazione del sistema adrenergico centrale
- Inibizione della pulsatilità del GnRH
- Incremento della attività respiratoria
- Riduzione della attività gastroenterica
- Alterata risposta immunologia
- Alterazioni del comportamento ACTH e secrezione di cortisolo

Studi immunoistochimici hanno evidenziato come il CRH sia largamente distribuito non solo nel SNC, ma anche in altri organi: apparato gastrointestinale, pancreas, fegato, polmoni, ghiandole surrenali e testicoli. Questa diffusa distribuzione anatomica suggerisce che il CRH, oltre a fungere da modulatore dell'asse ipofisi-surrene, può esplicare numerose funzioni fisiologiche nell'ambito del cervello, dell'apparato gastrointestinale, delle gonadi e della placenta, e lascia pensare alla possibilità da parte di molti tessuti di produrre peptici POMC derivati per una possibile regolazione autocrina o paracrina.

RECETTORE ACTH E TRASDUZIONE



I recettori MC2-R sono recettori di superficie caratterizzati da una struttura con sette domini elicoidali transmembranari, con il segmento N-terminale sul lato esterno della membrana e quello C-terminale su quello citoplasmatico. Tali recettori, accoppiati a proteine G, sono detti GPCR (G Protein Couplet Receptors). Delle 16 subunità di proteine G trimeriche identificate nei mammiferi, di MC2-R si conosce solo la via di segnalazione associata al complesso $G_{S\alpha}$ che ha effetto stimolatore sulla proteina effettrice adenil ciclasi la quale interagisce inducendo un aumento dei livelli intracellulari del secondo messaggero cAMP.

L'attacco dell'ACTH al dominio extracellulare del recettore induce una modificazione conformazionale che permette al dominio citosolico di legarsi ad una proteina G associata nel versante interno della membrana.

La proteina G ha attività GTPasica, poiché è in grado di legare il GTP attivandosi e successivamente di catalizzarne l'idrolisi a GDP disattivandosi: tale meccanismo "on"/"off" funziona da interruttore molecolare della via di trasduzione.

Le subunità α , γ delle proteine G sono legate covalentemente ai lipidi di membrana. Quando MC2-R è libero, la subunità α della proteina G_S ($G_{S\alpha}$) lega il GDP e si associa alle sottounità β e γ , se MC2-R si lega all'ACTH si determina un cambiamento conformazionale del recettore che si lega alla subunità $G_{S\alpha}$ e questo legame induce a sua volta una modificazione conformazionale in $G_{S\alpha}$.

A questo punto il GDP si stacca e viene sostituito da una molecola di GTP; il complesso attivo $G_{S\alpha}$ -GTP si dissocia dalle subunità $G_{S\beta\gamma}$. Il complesso $G_{S\alpha}$ -GTP interagisce con l'adenilato ciclasi che così attivata catalizza la sintesi del cAMP: ora l'ormone si può dissociare dal recettore, il GTP viene idrolizzato ed il complesso $G_{S\alpha}$ -GDP si separa dall'adenilato ciclasi e può associarsi nuovamente alle sottounità $G_{S\beta\gamma}$, rendendosi nuovamente disponibile per una nuova trasduzione.

L'adenilato ciclasi è un enzima con due domini di membrana formati ciascuno da sei α -eliche. Nei mammiferi ci sono sei isoforme dell'enzima che vengono attivate o inibite da proteine di traduzione G. Non esiste specificità tra adenilato ciclasi e proteina G in quanto alcune adenilato ciclasi possono essere attivate da differenti GPCR, evocando la medesima risposta cellulare.

L'attivazione dell'adenilato ciclasi è proporzionale alla concentrazione totale di $G_{S\alpha}$ -GTP, risultante dal numero di recettori stimolati. Nelle stesse cellule i livelli di cAMP possono essere regolati in base all'equilibrio di up- e ipo-regolazioni: ad esempio nelle cellule steroidogeniche, attraverso la stessa via di trasduzione possono essere iper-regolate dall'ACTH e ipo-regolate dalla prostaglandina PGE1, e questo avviene perché i primi recettori interagiscono con una proteina G attivatrice (G_S) contenente le subunità α β e γ mentre la PGE1 attiva con una proteina G inibitoria (G_I) contenente le subunità β ϵ γ come risposta la prima interazione stimola la produzione di adenilato ciclasi mentre la seconda la inibisce.

La struttura $G_{S\alpha}$ -GTP si differenzia dalla $G_{I\alpha}$ -GTP non per la composizione molecolare (molto simile), ma per la posizione che assumono interagendo con

l'adenilato ciclasi: la prima struttura interagisce completamente mentre la seconda non riesce a stabilire un contatto di adesione completo.

L'adenil ciclasi idrolizza l'ATP in adenosina-3'-5'-monofosfato (cAMP), che diventa il messaggero secondario del sistema per indurre potenti risposte citoplasmatiche.

L'effettore principale del cAMP è una proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA), un complesso proteico tetramerico composto da due subunità catalitiche (C) e due inibitorie (regolatrici R). Quando il cAMP si lega alle subunità regolatrici, queste si separano da quelle catalitiche, che diventano attive. Le subunità catalitiche attivate vanno a fosforilare specifici residui di serina e treonina di enzimi bersaglio, modificandone l'attività.

Ogni sottounità R possiede due siti di legame per il cAMP chiamati A e B. Il legame del cAMP al sito B induce una modificazione conformazionale che smaschera il sito A, altrimenti inaccessibile. Il legame di cAMP al sito A provoca la liberazione delle sottounità C.

Il legame del cAMP alle sottounità R è di tipo cooperativo positivo, per cui anche piccole variazioni nella concentrazione citosolica di cAMP possono provocare un significativo aumento di dissociazione delle sottounità C e quindi una più elevata attività della PKA.

A "spegnere" l'attività di tali enzimi provvede una fosfoproteina fosfatasi che, rimuovendo i gruppi fosfato, termina la sua risposta fisiologica. Lo stesso ruolo può essere svolto anche da una fosfodiesterasi che converte cAMP in 5'-AMP.

Effetto dell'aumento di cAMP causato dall'interazione ACTH / MC2-R è un aumento della steroidogenesi e della secrezione di ormoni steroidei. Sulla base degli studi condotti su differenti specie di mammiferi si possono classificare, in base agli effetti, due tipi di reazioni mediate dalla interazione ACTH/MC2-R: le reazioni che inducono "*effetti acuti*" che si manifestano dopo pochi minuti e quelle che inducono "*effetti cronici*" che avvengono dopo poche ore. Entrambi

determinano un aumento della trascrizione e traduzione degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi (Jefcoate 2002).

Aumentando il numero di interazioni ACTH / MC2-R, nella corteccia surrenale, si osserva il “fenomeno acuto” entro 3 minuti dal trattamento con un picco a 10 - 15 minuti, la cascata di reazioni che segue porta all'aumento di cAMP e di PKA con l'induzione finale del metabolismo del colesterolo.

I geni iper-stimolati responsabili di tale effetto finale codificano per il recettore delle LDL e quello delle HDL: dopo idrolisi il colesterolo nel citoplasma viene veicolato dalla StAR, attivata dall'ACTH, all'interno del mitocondrio, a cui segue l'iper-stimolazione sempre indotta dall'ACTH dell'attività esterasica che inibisce ACAT-1.

L'ACTH stimola anche l'iper-espressione del gene dell'endotelina al fine di aumentare l'afflusso di sangue per rifornire le cellule di più substrati, in particolar modo colesterolo ed O₂, necessari al gene CYP11A1 iper-modulato dall'ACTH di codificare per il citocromo P450 11A1 punto di regolazione della steroidogenesi, in quanto catalizzatore della conversione del colesterolo in pregnolone.

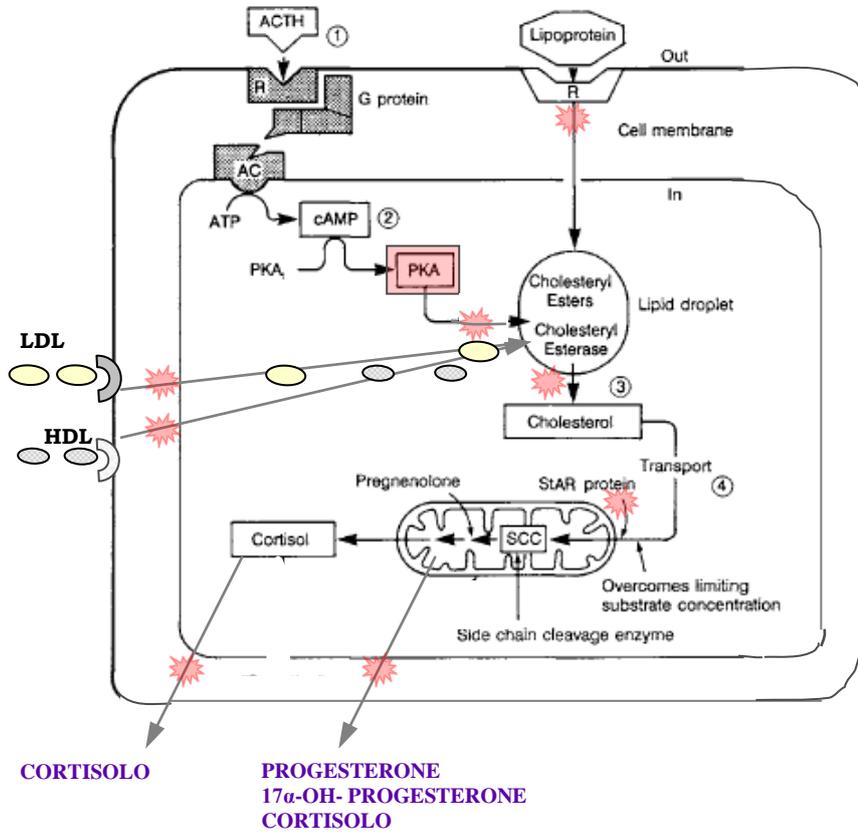
Gli “effetti cronici” innescano reazioni a livello nucleare che portano (in alcuni mammiferi ed in particolar modo nell'uomo) ad un aumento dell'espressione del gene Steroidogenic Factor 1 (SF1) (Watanabe 1994), indispensabile fattore di trascrizione di tutti gli enzimi steroidei.

Il meccanismo che segue l'interazione tra ACTH/MC2-R è un esempio tra differenti vie di trasduzione di segnale e permette la regolazione fine di processi complessi. Infatti la capacità delle cellule di rispondere appropriatamente ai segnali extracellulari dipende anche dalla regolazione delle vie di traduzione del segnale. La sintesi e la liberazione di alcuni ormoni sono soggette ad un controllo retroattivo, ma un'altra modalità per regolare la trasduzione del segnale tra cellule è la modulazione del numero e/o della funzionalità dei recettori della superficie cellulare.

Per esempio la sensibilità di un certo tipo cellulare ad un determinato ormone può essere ipo-regolata per endocitosi dei recettori. L'internalizzazione dei recettori in risposta ad un agonista può essere stimolata dalla sovra-espressione di BARK e β -arrestina (*desensibilizzazione omologa*) o per fosforilazione PKA dipendente (*desensibilizzazione eterologa*). Nella desensibilizzazione omologa la β -arrestina, si lega al recettore fosforilato impedendo alla proteina G_s di legarsi. La β -arrestina non si lega solo ai recettori, ma anche alla clatrina, proteina che rivestite le fossette che internalizzano le LDL nella cellula (Baig 2002; Clark 2003). L'endocitosi dei recettori inattivati per fosforilazione ad opera di BARK è stimolata dalla β -arrestina. Se avviene desensibilizzazione eterologa il ciclo di fosforilazione/defosforilazione permette alla cellula di calibrare la sensibilità del recettore: se il recettore è defosforilato possiede un'elevata sensibilità anche a concentrazioni ormonali molto basse, se fosforilato non è invece in grado di trasdurre il segnale (Kilianova 2006). I recettori internalizzati vengono defosforilati negli endosomi, la β -arrestina si stacca ed i recettori nuovamente sensibilizzati tornano sulla superficie cellulare. Alcuni recettori, nei lisosomi, possono anche essere degradati.

MECCANISMI D'AZIONE dell'ACTH

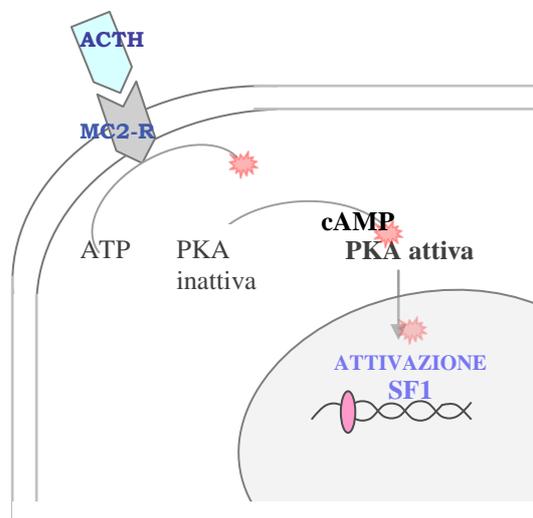
Vie attivate dalla PKA fosforilata



Via di attivazione steroidogenesi

MECCANISMO D'AZIONE dell'ACTH

Vie attivate dalla PKA fosforilata



Via di attivazione SF1

β-ENDORFINA

Nel 1975 Hughes e Kosterlitz isolarono e studiarono la met- e la leu-Enkefalina, due sostanze prodotte all'interno del nostro organismo che hanno attività simile a quella della morfina e che per tale motivo furono definite "oppioidi endogeni". Nel 1973, Pert e Snyder avevano dimostrato l'esistenza di recettori specifici per la morfina stessa nel tessuto nervoso umano. In seguito furono scoperti altri oppioidi endogeni: le endorfine e le dinorfine. Allo stesso modo, i recettori sensibili all'attività di tali sostanze sono distribuiti in modo eterogeneo nel Sistema Nervoso Centrale e Periferico. Il numero delle famiglie dei neuropeptidi oppioidi identificati è in continua crescita, ma le famiglie più note sono tre: encefaline, endorfine e dinorfine.

Attualmente si conoscono quattro distinte classi di endorfine, indicate come alfa, beta, gamma e delta

La β-endorfina e le altre endorfine sono polipeptidi che attivano un gran numero di neuroni centrali (nell'ipotalamo, nell'amigdala, nel talamo e nel *locus caeruleus*). Nei corpi cellulari è presente il precursore POMC che viene trasportato lungo l'assone e diviso in frammenti specifici; uno di questi è la β-endorfina, costituita da 31 aminoacidi. La β-endorfina prodotta dalla scissione della β-lipotropina, viene rapidamente N-acetilata sul residuo N-terminale per formare la β-N-acetil-β-endorfina. Questa, dopo il rilascio e l'interazione con i recettori oppioidi, viene idrolizzata dalle peptidasi in frammenti più piccoli non attivi e quindi in aminoacidi (Bolander 2004).

La metencefalina e la leucoencefalina sono piccoli peptidi presenti in molti neuroni centrali (nel globo pallido, nel talamo, nel nucleo caudato e nel nucleo grigio centrale). Il loro precursore, la proencefalina, viene prodotto nel corpo cellulare e quindi suddiviso da peptidasi specifiche. I frammenti risultanti comprendono due encefaline, ognuna composta da cinque aminoacidi e contenente terminali di metionina o leucina. Dopo il rilascio e l'interazione con i

recettori peptidergici, le encefaline vengono idrolizzate in peptidi più piccoli non attivi ed aminoacidi, quali le dinorfine e la sostanza P.

Le dinorfine sono un gruppo di sette peptidi con sequenze aminoacidiche simili che coesiste con le encefaline.

In tutti i peptidi oppioidi naturali il requisito indispensabile per il legame con il rispettivo recettore è la presenza di tirosina (Tyr) in posizione N-terminale, ed in posizione 4, ad una distanza sterica critica, la presenza di fenilalanina (Phe). I primi quattro aminoacidi sono presenti in tutte i neuropeptidi, mentre quelli rimanenti sono responsabili della selettività verso il tipo o sottotipo di recettore. I recettori degli oppioidi sono stati classificati in tre tipi : μ , δ e κ . Per ciascuno sono stati ipotizzati sottotipi recettoriali, che appartengono tutti alla superfamiglia dei recettori associati a proteine G e controllano l'attività dell'adenil ciclasi e dei canali di membrana di Ca e K.

I recettori μ hanno una elevata affinità per la morfina, ma legano anche alcuni oppioidi endogeni come la β -endorfina e le encefaline. Si dividono in $\mu 1$ (a livello sovraspinale inducono analgesia) e $\mu 2$ (a livello spinale inducono stipsi e depressione respiratoria). La stimolazione di tali recettori è anche responsabile della miosi e della sensazione di euforia.

I recettori κ possiedono un'elevata affinità per le endorfine endogene. La stimolazione di questi recettori determina stati di disorientamento e/o depersonalizzazione. Si distinguono in $\kappa 1$ (producono analgesia a livello sovraspinale) e $\kappa 3$ (producono miosi e depressione respiratoria).

I recettori δ legano le encefalite, causando analgesia sia spinale che sovraspinale.

Neuropeptidi	Sequenza aminoacidica	Tipo di Recettore
Met-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	$\delta > \mu$
Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$\delta > \mu$
β-endorfina (1-31)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met- Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr- Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys- Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	$\mu > \delta$
Dinorfina A (1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu- Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu- Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	$\kappa (\mu)$
Dinorfina B (1-13)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu- Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val- Thr	$\kappa (\mu)$

La β -endorfina viene secreta nel sangue dall'ipofisi, ma poiché non può superare la barriera ematoencefalica, nel midollo spinale e nel cervello viene prodotta dai neuroni ipotalamici. La β -endorfina causa il rilascio di GH (aumentando indirettamente il rilascio di GRH o inibendo il rilascio di somatostatina - Norman 1997) e PRL ed inibisce il rilascio delle gonadotropine e dell'ormone TSH. La β -endorfina proviene dalla scissione del POMC nelle cellule corticotrope dell'ipofisi anteriore, come prodotto di scissione dalla β -lipotropina e viene rapidamente N-acetilata per formare la α -N-acetil- β -endorfina.

Lo stress causa produzione di CRH e β -endorfina, la quale diminuisce la secrezione di gonadotropine, ossitocina e vasopressina. Durante lo stress ACTH, β -LPH e β -endorfina vengono rilasciati simultaneamente dalle cellule corticotrope. La secrezione di β -endorfina, nella fase luteinica, risulta stimolata dall'estradiolo e dal progesterone.

ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA NEL CONIGLIO

CICLO ESTRALE

Nei mammiferi, ad eccezione dei primati, l'ovulazione avviene ad intervalli regolari nel corso del periodo detto "estro". Sulla base della frequenza dei cicli estrali e della loro regolarità, gli animali sono classificati come *poliestrali*, *poliestrali stagionali* e *monoestrali*.

La coniglia non mostra cicli estrali regolari, nel corso dei quali l'ovulazione ha luogo spontaneamente, ma un estro più o meno permanente in cui l'ovulazione si verifica solo dopo accoppiamento, indotta da stimoli associati al coito ("ovulazione riflessa" o "indotta"). Durante tale periodo i follicoli ovarici si sviluppano e regrediscono continuamente, cosicché il numero di quelli in fase preovulatoria è quasi costante. Se la coniglia non si accoppia i follicoli ovarici permangono per 12-16 giorni.

Lo sviluppo dei follicoli e l'attività dell'ovaio dipendono dagli ormoni ipofisari FSH e LH. Quando uno o più follicoli iniziano ad evolvere, essi continuano l'accrescimento sino all'ovulazione o all'atresia (degenerazione), evento che si verifica nella maggior parte dei follicoli che iniziano la fase maturativa. Il tempo totale richiesto dall'inizio dello sviluppo maturativo fino all'ovulazione non è noto con precisione nella coniglia. Lo sviluppo dei follicoli sino allo stadio di formazione dell'antro non è strettamente dipendente dalla presenza di gonadotropine com'è stato sperimentalmente dimostrato in animali ipofisectomizzati. Pertanto, in questa prima fase si deve ipotizzare che la maturazione follicolare sia sotto il controllo di fattori intraovarici.

Al contrario, la formazione del follicolo antrale ed il suo accrescimento finale sono direttamente dipendenti dall'azione degli ormoni FSH e LH. Il primo svolge un ruolo fondamentale nella formazione del follicolo antrale, stimolando la mitosi delle cellule della granulosa e la formazione del liquido follicolare. Inoltre, l'FSH incrementa il numero dei recettori per l'LH nelle cellule della

granulosa, predisponendole al successivo processo di luteinizzazione che segue l'ovulazione. Anche le cellule tecali sono stimulate dall'LH ed i recettori per questo ormone sono presenti sin dall'inizio della formazione delle cellule della teca.

Il principale ormone steroideo prodotto dal follicolo è rappresentato dal 17- β estradiolo, ma nella coniglia sono prodotti anche progestinici ed androgeni: questi ultimi possono essere secreti in quantità superiori a quelle degli estrogeni. Esperimenti condotti *in vitro* hanno inequivocabilmente dimostrato che le cellule tecali del follicolo secernono soprattutto testosterone, mentre le cellule della granulosa convertono il testosterone in 17- β estradiolo grazie alla loro elevata attività aromatasica.

Nella coniglia l'ovulazione riflessa neuro-umorale segue due vie: una via afferente (nervosa), che trasmette gli stimoli provocati dal coito al sistema nervoso centrale, ed una via efferente (umorale) che invia i segnali del SNC alle ovaie per l'ovulazione. L'ipotalamo libera modeste quantità di GnRH, che attraverso il circolo portale ipofisario agisce sull'ipofisi anteriore inducendo la liberazione degli ormoni FSH e LH entro pochi minuti dallo stimolo.

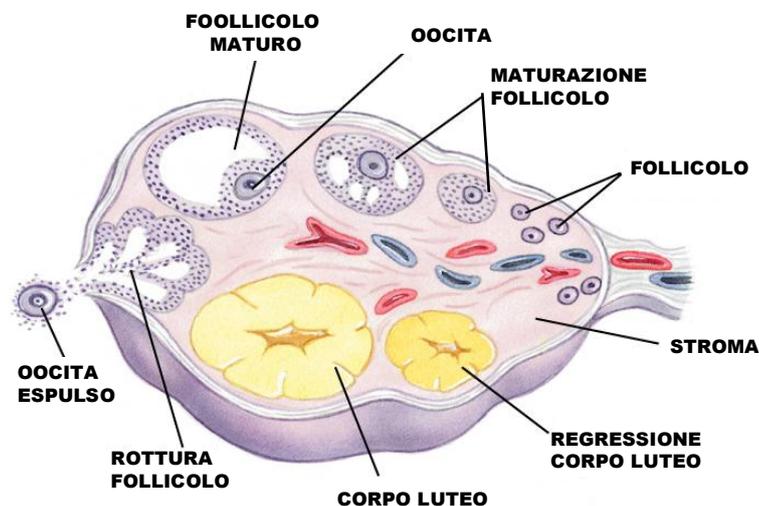
L'ovulazione può essere indotta anche farmacologicamente, agendo direttamente sulla via efferente a livello ipofisario mediante la somministrazione di GnRH o a livello ovarico mediante l'HCG.

Entro due ore dall'accoppiamento della coniglia si ha un picco di concentrazione di LH nel sangue (picco ovulatorio) che attiva tutta una serie di processi che, nella coniglia, portano all'ovulazione tra la 10a e la 12a ora dal coito (o dalla somministrazione esogena di una dose ovulatoria di GnRH o HGC).

Contemporaneamente, in relazione all'accoppiamento, l'ipotalamo induce la liberazione di ossitocina da parte dell'ipofisi posteriore. Quattro, cinque ore dopo il coito, i livelli di LH ritornano ai valori basali, mentre 16-22 ore dopo si osserva un nuovo picco di FSH. Questa ulteriore secrezione di FSH permette di

stimolare la formazione di una nuova popolazione di follicoli ovarici che si svilupperanno fino allo stadio antrale, che avranno una funzione luteotropa fondamentale (mediata dall'17- β estradiolo) sui CL già a partire dalla quinta o sesta giornata dall'ovulazione.

Nella coniglia la gestazione ha una durata di 30-33 giorni. Il mantenimento della gravidanza, durante tutto il periodo di gestazione, è garantito dal progesterone e l'unica fonte di progesterone è il CL. La durata dell'attività steroidogenica del CL, si mantiene approssimativamente per 30-32 giorni, assicurando la sintesi del progesterone necessario al mantenimento della gravidanza. Se all'ovulazione non segue la fecondazione, nelle coniglie s'instaura una pseudogestazione, con un blocco dell'attività riproduttiva per 15-18 giorni: infatti i CL che si formano in seguito all'ovulazione persistono e continuano a sintetizzare e rilasciare progesterone, e regrediscono solamente verso il 17-18° giorno.



Le modificazioni secretorie dell'endometrio, la sua preparazione all'eventuale impianto e il mantenimento della gravidanza iniziale richiedono la presenza e l'integrità funzionale del corpo luteo, che rappresenta, per unità di peso, la più attiva ghiandola endocrina dell'organismo (Abramowitz 1982). Dopo

l'ovulazione la sua formazione avviene grazie ad un rimodellamento morfologico e biochimico delle componenti steroidogeniche della struttura follicolare, detto luteinizzazione (Allen 1930), e ad un attivo processo di invasione vascolare e di angiogenesi (Anderson 1969).

Un'altra peculiarità di questa importante ghiandola endocrina è la sua vita limitata. In assenza di gravidanza, infatti, il CL si avvia inesorabilmente ad un processo di regressione funzionale e strutturale (luteolisi). Differenze morfologiche, dimensionali e immunocitochimiche consentono di riconoscere nel corpo luteo due sottopopolazioni di cellule steroidogeniche (Fergusson 1941), le grandi e le piccole cellule luteali, rispettivamente originate dalle cellule della granulosa e della teca del follicolo (Ferruz 1991). Tali sottopopolazioni presentano alcune differenze funzionali. Sebbene entrambe in grado di sintetizzare progesterone, le cellule grandi, infatti, sembrano più attive rispetto alle piccole nella produzione basale di tale ormone (Fraenkel 1903).

Diverse evidenze e dati bibliografici su altre specie animali suggeriscono, che anche nel corpo luteo sia conservato il sistema bicellulare per la sintesi degli estrogeni, tipico del follicolo (Fletcher 1982). Nelle cellule derivate dalla teca, infatti, l'enzima 17-idrossilasi consente la sintesi degli androgeni, successivamente trasformati in estrogeni dall'aromatasi presente nelle cellule derivate dalla granulosa (Flower 1982). Sebbene i precisi meccanismi implicati nei processi di sviluppo, mantenimento e regressione del corpo luteo non siano stati definitivamente chiariti, vari studi hanno evidenziato una moltitudine di fattori ormonali e locali in grado di influenzare la funzione luteale.

LUTEINIZZAZIONE

Il processo di luteinizzazione rappresenta la tappa finale di differenziamento delle cellule steroidogeniche del follicolo ed i meccanismi che regolano la crescita e la regressione del CL sono relative alla specie considerata.

Il CL si forma subito dopo l'ovulazione: le cellule luteali prendono origine dalle cellule della parete del follicolo di Graaf, questi cambiamenti che sono il risultato di un notevole aumento dei livelli sierici di LH. Sotto l'influenza del picco preovulatorio dell'LH, avviene lo scoppio e l'espulsione dell'ovulo: la parete del follicolo collassa nella cavità formatasi che viene invasa dai capillari provenienti dalla teca interna, stimolati da fattori angiogenici secreti immediatamente dopo l'ovulazione.

Tale processo, che interessa inizialmente la granulosa e poi, più gradualmente anche la teca interna, è mediato dall'LH che induce un rimodellamento strutturale e funzionale di tali cellule rendendole più efficienti nella sintesi del progesterone e più generalmente nella steroidogenesi. Quest'ultima, infatti, è da due a tre volte più attiva nel corpo luteo che nel follicolo (Auletta 1988).

La luteinizzazione, si accompagna ad un forte incremento di espressione dei recettori per le HDL e LDL sia nelle cellule della teca sia della granulosa (Azmi 1984; Bahr 1985), le quali diventano in questo modo attive nell'acquisire il colesterolo circolante, fondamentale substrato per la sintesi degli ormoni steroidei. Ciò giustifica il notevole aumento dei livelli di StAR (Belfiore 1994), elemento "rate-limiting" per la steroidogenesi.

Alla luteinizzazione segue la luteolisi che indica il processo di regressione del CL. Come già accennato il CL è, un organo particolare caratterizzato da un'attività transitoria la sua attività funzionale, generalmente, si mantiene per un periodo di 10-14 giorni, in relazione alla specie animale, e quindi, degenera fino a formare il "*corpo albicans*", costituito da tessuto connettivo e collagene.

Durante la luteolisi è possibile distinguere due fasi, definite con i termini "*funzionale*" e "*strutturale*". La luteolisi "*funzionale*" implica una riduzione

della capacità secernente del CL, associata ad una diminuzione della concentrazione ematica di progesterone. Per convenzione, la luteolisi funzionale inizia quando la concentrazione del progesterone scende del 50% rispetto ai valori che si riscontrano nel picco della fase luteinica. Questa prima fase si conclude quando la concentrazione plasmatica di progesterone scende al di sotto dei livelli tipici della fase estrale: nel coniglio, tale valore è usualmente inferiore ad 1 ng/mL.

Per luteolisi “strutturale” s’intende l’involutione della struttura del CL fino al corpo albicans: in realtà, non è sempre possibile separare nettamente i due eventi, essendo la luteolisi un processo continuo che implica contemporaneamente cambiamenti funzionali e strutturali.

NEOANGIOGENESI

Alla luteinizzazione si associa un attivo processo di invasione vascolare e di neoangiogenesi che trasforma la struttura non vascolare del follicolo in quella riccamente vascolarizzata del corpo luteo. Dopo l'ovulazione, infatti, alla perdita dell'integrità strutturale della membrana basale, che nel follicolo separa la teca dalla granulosa, segue l'espansione dei capillari della teca nello strato originariamente non vascolare della granulosa (Braden 1988; Boshier 1981).

Dall'attivo processo proliferativo cellulare del microcircolo deriva, una ricca rete di capillari che consente sia un adeguato approvvigionamento di substrati per l'intensa steroidogenesi luteale, sia una veloce ed efficiente immissione in circolo del progesterone prodotto.

I fattori che regolano l'angiogenesi luteale svolgono un ruolo estremamente importante nella funzionalità del corpo luteo: in tale processo un ruolo fondamentale è, senza dubbio, svolto dal Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Browing 1980), glicoproteina in grado di promuovere la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali del microcircolo e di incrementare la permeabilità vascolare (Bulmer 1964; Butcher 1969). Nel corpo luteo tale fattore di crescita è prodotto dalle cellule steroidogeniche (Channing 1969; Cheghini 1991), le quali come le cellule endoteliali, ne posseggono anche i recettori (Carnegie 1987; Cheghini 1991). Ciò suggerisce, quindi, che il VEGF possa esercitare anche un'azione autocrina di modulazione della steroidogenesi luteale.

Circa i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione luteale del VEGF, nel corpo luteo in via di formazione, l'LH sembra essere il principale stimolo per la sintesi di VEGF (Damle 1984). Viceversa, in cellule luteali differenziate di primati la sintesi di tale fattore di crescita appare prevalentemente regolata dall'ipossia (Day 1980).

REGOLAZIONE DELLA FUNZIONE LUTEALE

La $\text{PGF2}\alpha$, in particolare, è coinvolta nei processi di regressione del corpo luteo (Grazul 1992) ed è in grado di ridurre la sintesi luteale di progesterone. Per contro, diverse evidenze suggeriscono per la PGE2 un'azione luteotropica sia *in vivo*, dove esiste una correlazione positiva tra progesterone e PGE2 (Grusenmeyer 1992), sia *in vitro*, dove la PGE2 stimola la sintesi di progesterone (Gutknecht 1972). Invece, nella fase luteale tardiva, il mutato rapporto $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ potrebbe contribuire alla caduta dei livelli di progesterone. Anche il GH è in grado di influenzare la sintesi luteale dei suddetti prostanoidei tale ormone infatti inibisce la produzione della prostaglandina luteolitica $\text{PGF2}\alpha$. Ciò potrebbe costituire uno dei meccanismi attraverso cui il GH influenza la steroidogenesi del corpo luteo.

Altri importanti fattori implicati nel controllo della funzione del CL sono le endoteline, potenti vasocostrittori, presenti, assieme ai loro recettori (Hawkins 1993), non solo a livello dell'endotelio, ma anche nelle cellule luteali steroidogeniche, (Hilliard 1973). Un'ulteriore prova del coinvolgimento dell'ET-1 nella regressione del CL viene dai dati di Usuki e Girsh (Hunter 1995) i quali osservarono in modelli animali un marcato aumento dell'espressione dell'ET-1 in fase luteale tardiva in concomitanza con l'aumento dei livelli della prostaglandina luteolitica $\text{PGF2}\alpha$; questa era in grado, a sua volta, di stimolare la produzione di ET-1 in cellule luteali bovine (Hunter 1995). Dati presenti in letteratura, dimostrano che le PGs, a loro volta, riescono ad influenzare la produzione delle ETs. In particolare, la PGE2 , prostaglandina luteotropica e vasodilatatrice, inibisce la produzione di ET-1 in cellule endoteliali (Ikonen 1997), mentre la $\text{PGF2}\alpha$, ad azione luteolitica e vasocostrittrice, aumenta il contenuto di ET-1 nel corpo luteo (Grazul 1992). In quest'ultimo, ricco di cellule endoteliali in stretta contiguità con le cellule steroidogeniche, si può ipotizzare l'esistenza di una collaborazione funzionale tra questi due tipi cellulari nel

produrre sostanze (quali ETs e PGs) in grado di modulare reciprocamente la loro sintesi ed i loro effetti. La variazione nel tempo di tale equilibrio può produrre, a seconda delle fasi del ciclo, effetti trofici o regressivi sul CL *in toto*.

La funzione luteale appare modulata anche da diverse citochine, che tanta parte hanno non solo nei processi di formazione e regressione del corpo luteo, ma anche nella diretta regolazione della steroidogenesi luteinica. Tra queste un ruolo importante è svolto da IL-1 β , prodotta nel corpo luteo non solo dai macrofagi localmente presenti (Jackob 1997), ma anche dalle cellule steroidogeniche, che ne esprimono anche i recettori (Jones 1981). In queste ultime cellule l'espressione dell'IL-1 β è stimolata dall'LH (Juengel 1999). Diversi autori hanno studiato *in vitro* gli effetti di tale citochina sulla steroidogenesi luteale (Juengel 1998) con risultati però non univoci, probabilmente per i diversi modelli sperimentali usati (variabile contaminazione leucocitaria, differente grado di differenziamento delle cellule steroidogeniche studiate, ecc).

ATTIVITA' STEROIDOGENICA DEL CORPO LUTEO

L'attività steroidogenica del CL è indirizzata soprattutto alla sintesi e alla secrezione del progesterone, anche se la ghiandola mantiene in parte la capacità di sintetizzare altri ormoni steroidei.

Il ruolo svolto dal progesterone è di fondamentale importanza per il mantenimento della gestazione in diverse specie animali tra cui la coniglia ed, in sinergia con gli estrogeni, controlla ogni minimo aspetto delle diverse funzioni riproduttive. Nella coniglia (animale poliestrale ad ovulazione indotta) le concentrazioni del progesterone permangono costantemente su valori basali indipendentemente dal susseguirsi delle fasi ovariche di ciascun ciclo estrale. Solamente nel caso di accoppiamento o di trattamento con GnRH o gonadotropine (hCG, LH), in conseguenza dell'ovulazione così provocata, il progesterone presenta un rapido innalzamento che permane per un periodo variabile, a seconda che la coniglia rimanga gravida o meno.

Il progesterone viene sintetizzato dalle cellule luteiniche e non potendo essere immagazzinato in elevate quantità viene secreto mediante semplice diffusione.

INDUZIONE FARMACOLOGICA DELL'OVULAZIONE

La pratica dell'inseminazione artificiale ha rappresentato, negli ultimi anni, una svolta nell'organizzazione e nella gestione degli allevamenti cunicoli industriali. Essendo la coniglia un animale ad ovulazione indotta è necessario, in corso di inseminazione artificiale, sopperire alla mancanza dello stimolo del coito con uno stimolo adeguato capace di innescare il meccanismo neuro-endocrino responsabile dell'ovulazione. Per fare ciò esistono due sistemi fondamentali: il primo di tipo farmacologico ed il secondo non farmacologico chiamato anche biostimolazione.

Le biostimolazioni sono ancora oggetto di studio a causa dei dati discordanti riportati dai vari autori ma sono destinate a prendere piede soprattutto nella zootecnia biologica dove è bandito l'utilizzo dei farmaci. A questa grande famiglia appartengono il "flushing" (apporto supplementare di sostanze energetiche e proteiche nella razione), "l'effetto maschio" (stimolazione olfattiva dovuta ai feromoni prodotti dal maschio), "l'effetto luce" (aumento del fotoperiodo che influirebbe positivamente sulle performance riproduttive), lo sfregamento con un catetere dei genitali femminili (per simulare il coito), ed infine alcune manipolazioni quali la separazione della fattrice dalla nidiata ed il cambio della gabbia.

Molto più pratici, efficaci e standardizzati sono invece i trattamenti farmacologici, di origine essenzialmente ormonale. Ad esempio il GnRH o analoghi sintetici somministrati per via intramuscolare al momento dell'inseminazione, determinano a livello ipofisario il rilascio di LH responsabile dello scoppio dei follicoli pre-ovulatori e quindi dell'ovulazione dopo 12-13 ore.

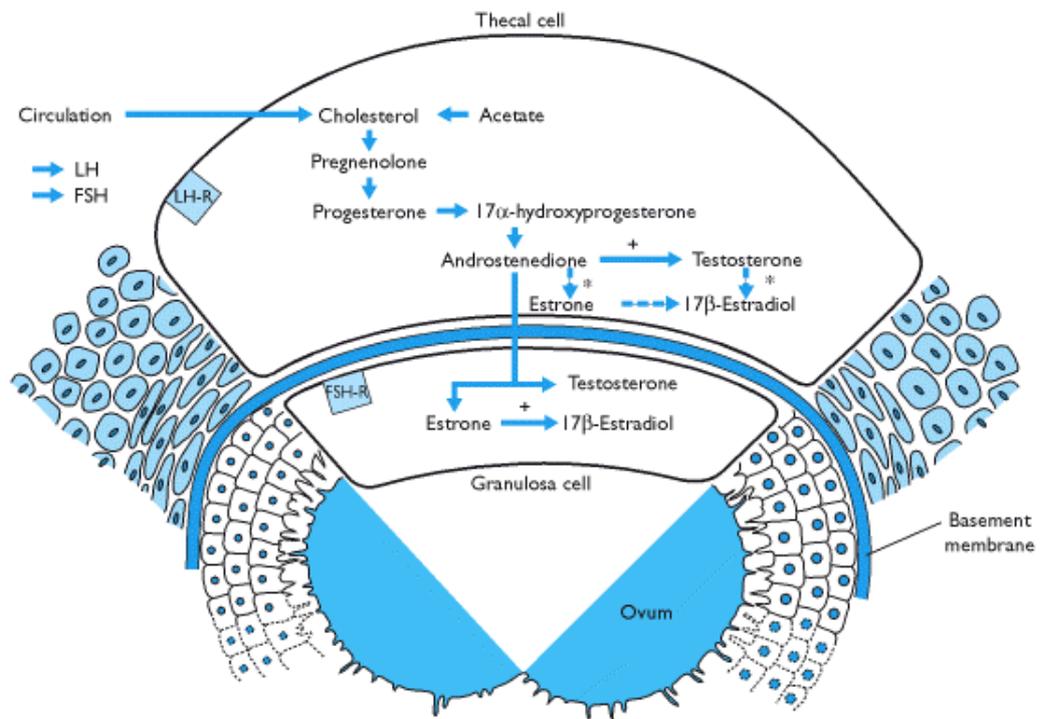
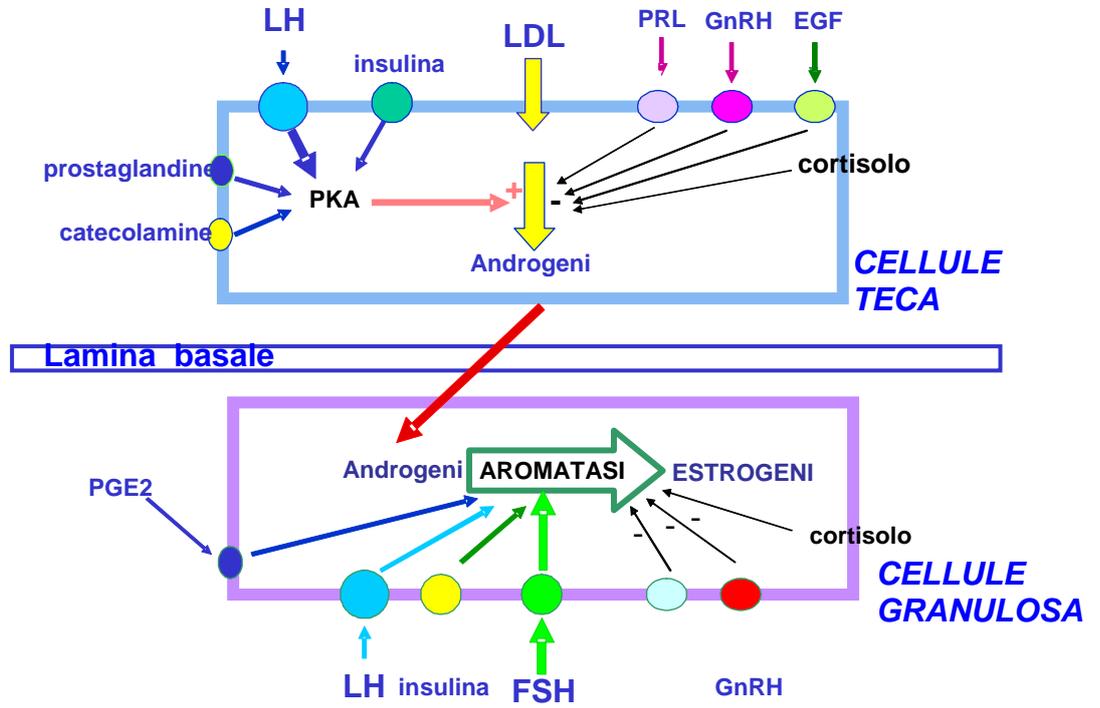
Alcuni protocolli prevedono l'utilizzo di PMSG con effetto follicolo stimolante (crescita e maturazione del follicolo), da somministrare 48-72 ore prima dell'inseminazione, che sembra essere efficace soprattutto in femmine in lattazione, anche se sul suo utilizzo non tutti gli autori sono concordi poiché, induce risposta immunitaria con produzione di anticorpi anti-PMSG; inoltre

sperimentalmente induce una super-ovulazione, agendo da fattore di trascrizione per geni coinvolti nella riproduzione. A volte si utilizza anche l'associazione di PMSG e hCG, ed infine un ulteriore protocollo prevede l'utilizzo di prostaglandine (PGF2 α) per la sincronizzazione degli estri somministrate 64 ore prima della inseminazione artificiale (ricordandosi che PGF2 α stimola la luteolisi).

Per aumentare la probabilità di successo nella scelta di un protocollo per l'induzione dell'ovulazione è necessario tener conto di alcuni fattori legati alle performance riproduttive. Innanzitutto l'ordine di parto: recettività, fertilità e prolificità sembrano essere migliori nelle nullipare e nelle pluripare e un po' più scarse nelle primipare soprattutto se in fase di lattazione. Tutto ciò è dovuto all'antagonismo ormonale che si crea tra riproduzione e lattazione a cui si aggiunge il deficit energetico nei soggetti più giovani, che non hanno ancora terminato lo sviluppo corporeo, ulteriormente aggravato dalla minor capacità di ingestione durante la gravidanza per l'ingombro uterino dei feti.

La fase riproduttiva ha anch'essa un'importanza determinante: infatti prolattina (ormone necessario alla produzione e secrezione del latte) e progesterone (ormone indispensabile per la gravidanza) esercitano un effetto di inibizione l'uno sull'altro.

La recettività sessuale è un'altra condizione da non sottovalutare: Infatti un animale recettivo presenta frequenze ovulatorie, maggiori rispetto ad un animale non recettivo, e tale recettività è maggiore nell'immediato post-partum per poi diminuire per alcuni giorni (poco meno di 1 settimana), fino a raggiungere valori accettabili grazie alla maturazione dei follicoli ed alla produzione di estrogeni.



Capitolo secondo

PROCEDURA SPERIMENTALE

ESTRAZIONE RNA E RT

Le fasi preparative della real-time PCR da mRNA sono:

- Estrazione RNA con Trizol
(come da protocollo Invitrogen)
- Trattamento con DNasi I Amp Grade
(come da protocollo Invitrogen)
- Preparazione del cDNA con SuperScript II

(3 µg RNA con 200 ng random primers come da protocollo Invitrogen)

REAL-TIME PCR

In confronto alle metodiche tradizionali di PCR, la Real-Time PCR garantisce miglioramenti in termini di specificità e precisione nella determinazione quantitativa del campione da dosare. Questi vantaggi sono dovuti al sistema di rilevazione (fluorescenza) ed alla misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato. Tale tecnica consente di ridurre il numero dei replicati necessari alla determinazione di ogni campione e di evitare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano le maggiori fonti potenziali di falsificazione dei risultati.

In real-time PCR la concentrazione degli amplificati aumenta con il procedere dei cicli, con conseguente incremento dell'emissione di fluorescenza. Rappresentando in diagramma le intensità di emissione in ascissa e il numero dei cicli in ordinata, si ottiene una curva che fornisce informazioni sulla quantità di DNA stampo originariamente presente nella reazione. Come fluorocromo intercalante, per valutare il prodotto di PCR, ho utilizzato il SYBR Green. Lo strumento da real-time PCR, oltre a servire da termociclatore, durante la PCR eccita mediante una lampada a tungsteno il fluorocromo presente nel campione, convogliando la fluorescenza emessa ad uno spettrografo.

Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza in una rappresentazione grafica, in tempo reale, della cinetica di amplificazione.

I valori di Random Fluorescence Units (RFU) ottenuti durante l'amplificazione dei singoli geni, indicano la quantità di DNA fluorescente e sono rappresentati in un grafico in funzione del numero dei cicli eseguiti. Contemporaneamente un algoritmo determina il *ciclo soglia* che corrisponde all'effettiva emissione di fluorescenza sottratta del rumore di fondo.

Il calcolo della quantità di DNA nei campioni viene effettuato determinando il "ciclo soglia" (Ct) della PCR, ossia il ciclo in cui viene raggiunto il valore

limite di fluorescenza che separa i segnali di amplificazione specifici da quelli di *background* del sistema. Il numero di cicli necessari ad un campione per raggiungere il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente.

Il vantaggio in termini di precisione di intervallo di quantificazione rispetto alla PCR tradizionale, è dovuto alla possibilità di determinare quantitativamente il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione, durante la quale i reagenti sono ancora in eccesso e gli elementi di variabilità sono ridotti al minimo.

Dopo la PCR ho effettuato l'analisi delle curve di melting per controllare che il prodotto di PCR non presentasse dimeri ed una gel-elettroforesi (al 2, 2% di agarosio) per verificare che la lunghezza in bp dei vari campioni corrispondesse a quella teorica attesa.

Protocollo sperimentale real-time PCR:

La real-time PCR su cDNA è stata allestita in un volume di reazione di 25 μL , utilizzando il reagente “SYBR Green QPCR Master Mix” (Bio-Rad).

Diversi esperimenti sono stati allestiti per poter ottimizzare le condizioni di reazione, l'efficienza ed i valori ideali di Ct.

La miscela di reazione contiene 12,5 μL di Syber SuperMix (Biorad), 1,5 μL di primer senso 10 μM , 1,5 μL di primer antisense 10 μM ed acqua distillata sterile fino a un volume finale di 20 μL . I reagenti vengono miscelati e suddivisi nei pozzetti della piastra da real-time. Successivamente si aggiungono 0,5 μL di campione o di acqua (nel controllo). L'amplificazione del DNA si esegue in una piastra a 96 pozzetti, utilizzando lo strumento iCycler iQ detection system (Biorad). Per ogni analisi si dosa in parallelo una curva standard di riferimento, per diluizioni seriali di DNA da 0,005 ng a 50 ng, per determinare l'efficienza di reazione. I campioni vengono sottoposti ai seguenti cicli di Real-Time PCR:

- a. 95 °C \times 1, 30 min
- b. 40 cicli: 95 °C \times 15 sec + 53 °C \times 30 sec (durante i quali sono raccolti i valori di fluorescenza).

Dopo ogni PCR l'analisi delle curve di melting ha evidenziato la purezza dei prodotti di reazione. Al termine della Real-Time, veniva valutata la lunghezza in bp dei vari campioni mediante gel elettroforesi (al 2% di agarosio).

CURVE DI MELTING

La T_M è la temperatura di melting, ossia temperatura alla quale il 50% dei duplex di DNA si separano. Terminata la reazione di amplificazione, il prodotto di PCR è mantenuto per 50 secondi a 50 °C ed infine sottoposto a riscaldamento graduale (0.5 °C/sec) fino ad arrivare a 90 °C. Durante quest'ultima fase si realizza il rilevamento continuo della fluorescenza e l'eventuale presenza di dimeri viene evidenziata da uno sfasamento delle curve ottenute riportando in ordinata la fluorescenza della derivata negativa ed in ascissa la temperatura. Se nella curva di melting dovessero formarsi dimeri di primers vedremo 2 picchi: quello specifico dell'amplificato ed uno aspecifico ad un T_M inferiore dovuto ai dimeri di primers (Fukushima, H. 2003). Questo perchè il SYBR green è un intercalante aspecifico che lega tutto il DNA ds, per cui se ci sono aspecifici, presentano un segnale aggiuntivo oltre a quello del campione. Al termine della denaturazione il DNA perde fluorescenza, perchè il SYBR Green non emette in assenza di DNA ds.

La specificità della real-time PCR si valuta quindi determinando la "melting curve" dei prodotti amplificati.

CARATTERISTICHE DEI PRIMERS

MC2-R

BC06974 Homo sapiens melanocortin 2 receptor

Lunghezza sequenza	894
Lunghezza prodotto di PCR	133
Tm prodotto PCR	86,9
Ta prodotto PCR	53,7
Primer S	GCC ATC ACA CTG ACC ATC C
Posizione S	652
Primer AS	CGT TCA CCT GGA AGA GGA C
Posizione AS	784

18 S

Come housekeeping sono stati utilizzati i seguenti primer Human 18S

Lunghezza prodotto di PCR	148
Tm prodotto PCR	88,9
Ta prodotto PCR	54
Primer S	CGATCAGATACCGTCGTAGT
Primer AS	TTCCTTTAAGTTTCAGCTTTGC

StAR**HSSTAR8** Human steroidogenic acute regulatory protein (StAR)

Lunghezza sequenza	759
Lunghezza prodotto di PCR	130
Tm prodotto PCR	88, 5
Ta prodotto PCR	55, 7
Primer S	AGAGCATCATCAACCAGGTC
Posizione S	38
Primer AS	GGGCACAGTTGGGAACAG
Posizione AS	167

 β -ENDORFINA**NM_000939** Homo sapiens proopiomelanocortin, (β -endorfina 922 – 1051)

Lunghezza sequenza POMC	1245
Lunghezza sequenza β -endorfina	129
Lunghezza prodotto di PCR	129
Tm prodotto PCR	90
Ta prodotto PCR	54, 5
Primer S	CTACAGGATGGAGCACTTC
Posizione S	922
Primer AS	TAGGCGTTCTTGATGATGG
Posizione AS	1051

FSH-R**AY429104.1** Homo sapiens follicle stimulating hormone receptor, complete cds

Lunghezza sequenza	2088
Lunghezza prodotto di PCR	150
Tm prodotto PCR	85, 5
Ta prodotto PCR	51, 8
Primer S	GAGGAATGCCATTGAACTGAGG
Posizione S	134
Primer AS	GGAAGGTTGGAGAACACATCTG
Posizione AS	284

LH-R**S57793** Homo sapiens luteinizing hormone receptor mRNA, complete cds

Lunghezza sequenza	2100
Lunghezza prodotto di PCR	118
Tm prodotto PCR	86,8
Ta prodotto PCR	52, 8
Primer S	CTGGAGAAGATGCACAATGG
Posizione S	627
Primer AS	CAATTAGCCTCTGAATGGACTC
Posizione AS	745

WESTERN BLOTTING

I campioni vengono lisati in incubazione per 30 minuti in ghiaccio in 300 μ L di tampone di lisi costituito da: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA sodico 5 mM, PMSF 100 mM, leupeptina 2, 5 mM ed aprotinina 2, 5 mM. Si centrifuga quindi per 15 minuti a 15.000 rpm ed il precipitato, lavato 3 volte con tampone di lisi freddo, si fa bollire per 3 minuti. Per la corsa elettroforetica utilizza un gel SDS-PAGE 15%, al termine della quale il gel viene trasferito su membrana di nitrocellulosa da 0.45 μ m (Pierce) \times 60 min a 200 V a temperatura ambiente, in un tampone Tris/Glicina 25 mM, pH 8, 3 con il 20% (v/v) di metanolo. Dopo aver brevemente lavato le membrane in distillata, si immergono in soluzione Ponceau \times 60 sec, per visualizzare le bande proteiche.

Dopo la scannerizzazione delle bande, le aree libere delle membrane vengono saturate per immersione in PBS contenente latte scremato al 5% per 30 min.

Segue incubazione delle membrane con anticorpo primario anti MC2-R in BSA 1% per 60 min. Sono stati utilizzati due tipi di anticorpo primario in differenti sessioni sperimentali, allo scopo di evidenziare il miglior segnale:

- 1) anti MC2-R (SantaCruz sc-6876): anticorpo di capra anti recettore umano
- 2) anti MC2-R(SantaCruz sc-13107): anticorpo di coniglio anti recettore umano

Dopo prolungato lavaggio in PBS + Tween20 0.2%, le membrane erano incubate con uno specifico anticorpo secondario:

- 1) per il primario di capra, un anti-goat IgG da pollo, coniugato con perossidasi (Santa Cruz sc-2953).
- 2) per il primario di coniglio, un anti-rabbit IgG monoclonale, coniugato con perossidasi (Sigma A2074).

La reazione della perossidasi del complesso antigene-anticorpo viene rilevata per chemiluminescenza con reattivo Super Signal (Pierce), su lastre BioMax Light-1 (Kodak), per singole esposizioni da 5 a 60 sec

Capitolo Terzo

RISULTATI

La sperimentazione ha percorso i seguenti passaggi:

- Punto 1 .** Individuare nel corpo luteo di coniglio la presenza di mRNA per MC2-R, clonarlo e sequenziarlo.
- Punto 2 .** Valutare l'andamento dell'espressione nel CL di coniglio di MC2-R a 4, 9, 13 giorni, ipotizzando che una modulazione d'espressione corrisponda ad un ruolo funzionale attivo.
- Punto 3 .** Studiare l'espressione della proteina StAR "rate-limiting" per la steroidogenesi.
- Punto 4 .** Analizzare l'espressione di LH-R ed FSH-R come regolatori luteotropi e luteolitici del corpo luteo
- Punto 5 .** Valutare l'espressione della β -endorfina peptide oppioide endogeno prodotto di clivaggio del gene POMC, importante nella regolazione della secrezione di LH a livello ipotalamico
- Punto 6 .** Eseguire un Immunoblotting nel CL per individuare la proteina MC2-R.

Punto 1. Espressione MC2-R

Non essendo depositata in banca dati la sequenza MC2-R di coniglio, ho disegnato alcuni primers partendo da zone di massima omologia tra vari mammiferi. I primers sono stati progettati rispettando i requisiti necessari per l'utilizzo in real-time PCR. Il tratto sequenziato corrisponde a circa 300 bp su 894 che, confrontato in banca dati, possiede una omologia di sequenza dell'80%. Il risultato di real-time è stato normalizzato contro l'housekeeping 18S. L'efficienza di PCR relativa ai primers utilizzati nella valutazione quantitativa è del 94%.

Nel punto 1 come nei punti successivi ogni campione analizzato in real-time PCR è stato ripetuto almeno 6 volte.

Come controlli di PCR sono stati saggiati tre bianchi cDNA– per controllare la qualità dei reagenti, e tre RT– per verificare eventuali contaminazioni genomiche.

Tutti i dati di real-time PCR sono stati normalizzati ed elaborati con il software per analisi di espressione *Gene Expression* Bio-Rad.

CURVE DI FLUORESCENZA

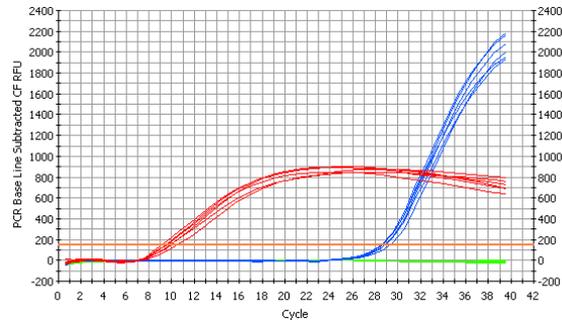


Figura 2

La serie di curve rosse corrisponde al 18S housekeeping. La serie di curve blu corrisponde al gene MC2-R. Tutti i controlli sono rappresentati in figura da linee verdi.

CURVE DI MELTING

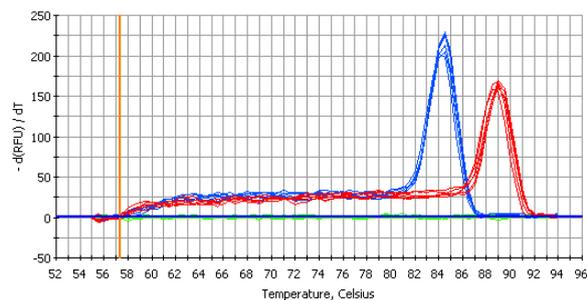


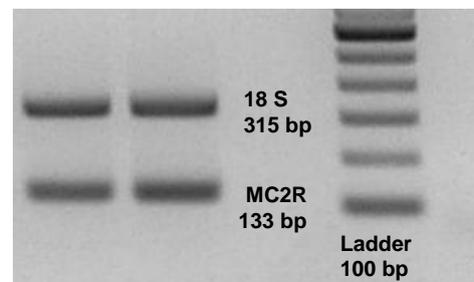
Figura 3

Le due serie di curve evidenziano due differenti temperature di melting relative a MC2R (blu) e 18S (rosso). La figura indica che non sono presenti artefatti di PCR.

GEL ELETTROFORESI

Figura 4

La gel elettroforesi ha permesso di verificare che la lunghezza del prodotto di real-time PCR ottenuto corrisponde a quella attesa.



Punto 2 . Espressione di MC2-R a 4, 9 e 13 giorni

La presenza di mRNA per MC2-R nel CL è stata valutata a 4, 9 e 13 giorni di pseudogavidanza.

CURVE DI FLUORESCENZA

Sono messe a confronto le curve di Real- Time PCR a 4 e 13 giorni che rappresentano il punto massimo e minimo dell'intervallo. Controlli e ripetizioni sono stati ripetuti come precedentemente descritti.

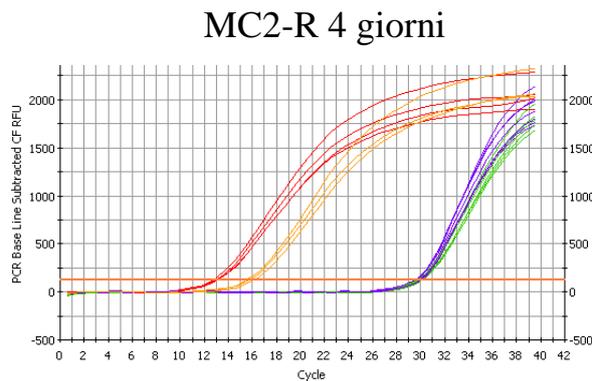
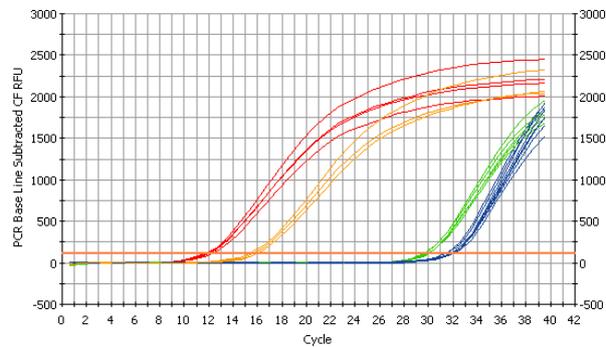


Figura 7

Espressione di MC2-R a 4 giorni con relativo 18S e controllo positivo. La serie di curve viola corrisponde all'espressione del gene MC2-R a 4 giorni mentre il fascio di curve verdi è relativo all'espressione di MC2-R nel surrene di coniglio, utilizzato come controllo positivo dell'espressione del gene. La serie di curve rosse corrisponde al 18S housekeeping nel corpo luteo di coniglio, mentre le curve arancio corrispondono al 18S nel surrene di coniglio

MC2-R 13 giorni

**Figura 8**

Espressione di MC2-R a 13 giorni con relativo 18S e controllo positivo. Le curve blu corrispondono all'espressione del gene MC2-R a 13 giorni, le curve verdi sono relative all'espressione di MC2-R nel surrene di coniglio (controllo positivo). Le curve rosse corrispondono al 18S nel corpo luteo di coniglio, mentre le curve arancio corrispondono al 18S nel surrene di coniglio

Le curve di melting del primer MC2-R non sono state riportate, perché presentate nella Figura 3.

ANALISI DEI VALORI DI REAL-TIME PCR

MC2-R	Media	SD	Significatività
4 Giorni	5,01	0,92	
9 Giorni	1,02	0,36	4 vs 9: P < 0,001
13 Giorni	1,00	0,25	4 vs 13: P < 0,001

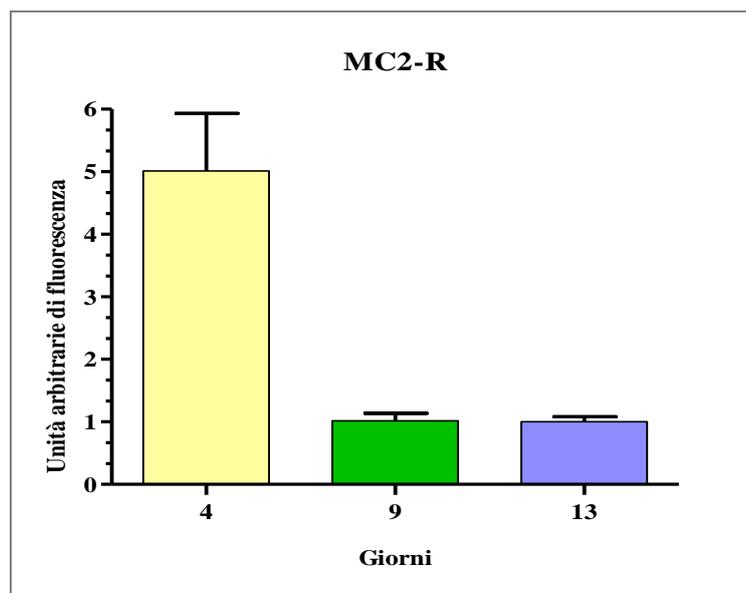
**Figura 9**

Tabella e rappresentazione grafica dei valori di espressione di MC2-R a 4, 9, 13 giorni espressi in unità arbitrarie di fluorescenza.

Punto 3 . Espressione StAR a 4, 9, 13 giorni

In banca dati non è presente la sequenza del gene StAR di coniglio per cui ho disegnato alcuni primers partendo da zone di massima omologia. I primers scelti hanno permesso di clonare e sequenziare un tratto di 200 bp pari al 26% della lunghezza della proteina, con un'omologia maggiore del 90%.

CURVE DI FLUORESCENZA

Di seguito in tabella sono messi a confronto i valori di Real-Time PCR a 4, 9, e 13 giorni, mentre sono riportati solamente i profili di real-time PCR a 4 giorni.

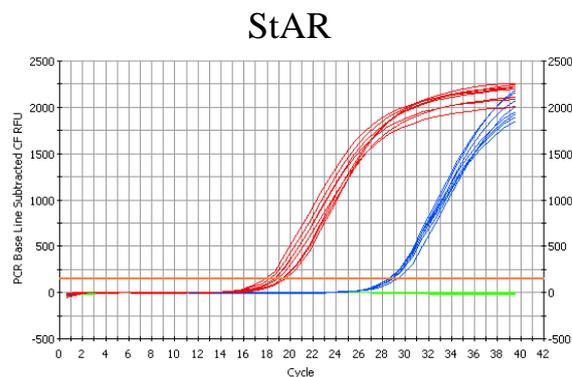


Figura 10

Le curve rosse corrispondono al 18S, le curve blu corrispondono alla StAR, le linee verdi sono i controlli di RT e PCR.

CURVA DI MELTING

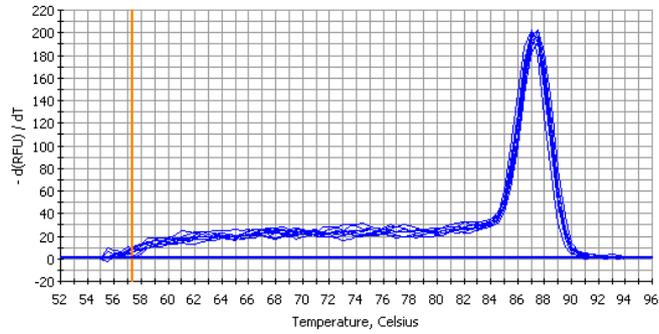


Figura 11

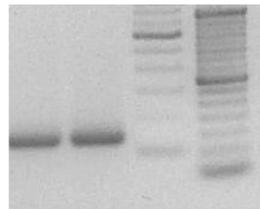
Temperatura di melting relativa ai primers di StAR, non sono presenti artefatti di PCR.

GEL ELETTROFORESI

StAR **Ladder**
130 bp **100 50 bp**

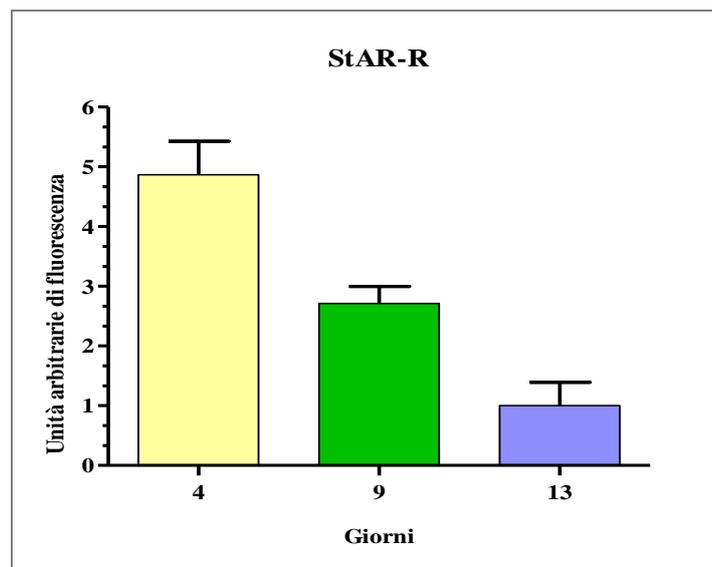
Figura 12

La gel elettroforesi ha permesso di verificare che la lunghezza del prodotto di real-time PCR ottenuto corrisponde a quella attesa di 130 bp.



ANALISI VALORI DI REAL-TIME PCR

StAR	Media	SD	Significatività
4 Giorni	4,87	0,56	4 vs 9: $P < 0,01$
9 Giorni	2,71	0,71	4 vs 13: $P < 0,001$
13 Giorni	1,00	0,96	9 vs 13: $P < 0,01$

**Figura 13**

Valori di mRNA di StAR a 4, 9, 13 giorni espressi in unità arbitrarie di fluorescenza.

Punto 4 . Espressione della β -endorfina a 4, 9, 13 giorni

CURVE DI FLUORESCENZA

In tabella sono confrontati i valori di Real-Time PCR a 4, 9, e 13 giorni, mentre sono riportati solamente i profili di real-time PCR a 4 giorni.

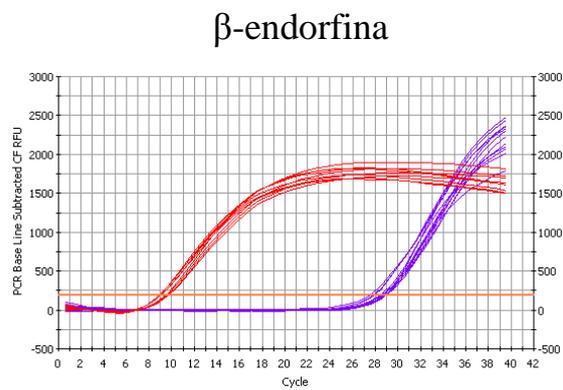


Figura 14

Curve rosse 18S, curve viola β -endorfina

CURVA DI MELTING

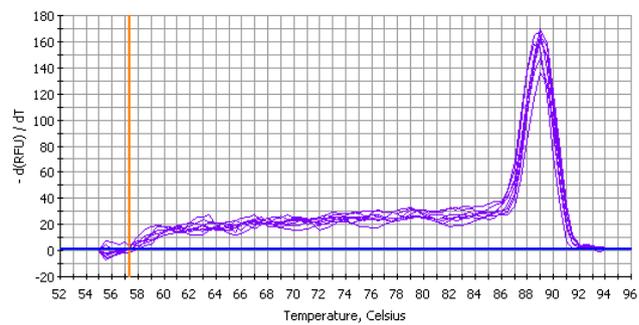


Figura 15

Le curve viola evidenziano la temperatura di melting relativa alla β -endorfina. Non sono presenti artefatti di PCR..

GEL ELETTROFORESI

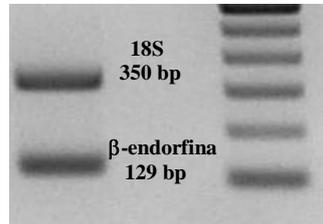


Figura 16

Il prodotto di real-time PCR ottenuto corrisponde al frammento atteso.

ANALISI VALORI DI REAL-TIME PCR

β-Endorfina	Media	SD	Significatività
4 Giorni	1,00	0,41	
9 Giorni	3,90	0,89	4 vs 9: P < 0,001
13 Giorni	5,04	1,16	4 vs 13: P < 0,001

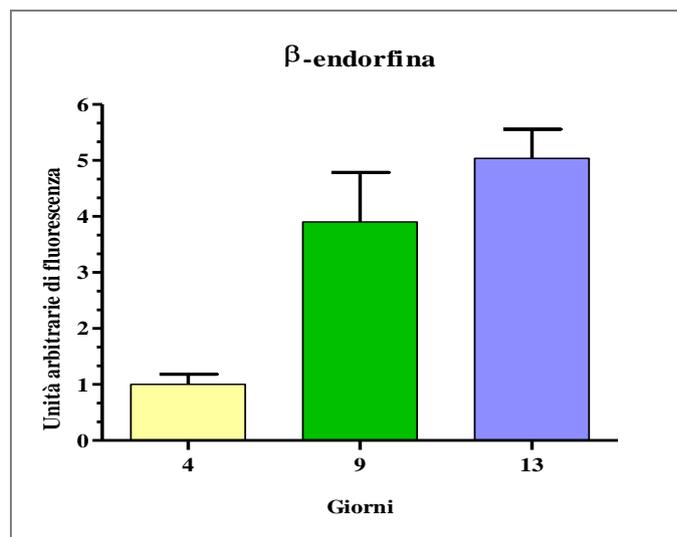


Figura 17

Valori di mRNA per la β-endorfina a 4, 9 e 13 giorni espressi in unità arbitrarie di fluorescenza.

Punto 5 . Espressione LH-R e FSH-R 4, 9, 13 giorni

CURVE DI FLUORESCENZA

In tabella sono confrontati i valori di Real-Time PCR a 4, 9, e 13 giorni, i profili di real-time PCR riportati sono a 4 giorni.

LH-R FSH-R

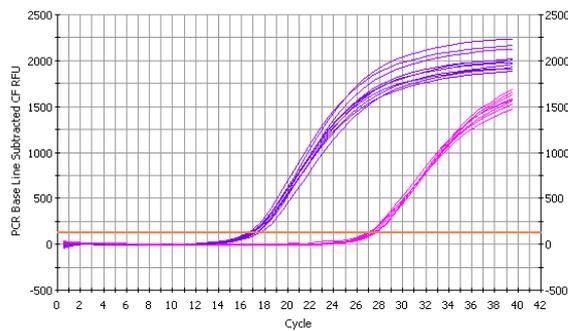


Figura 18
Espressione di LH-R ed FSH-R a 4 giorni. Le curve viola corrispondono all'espressione del gene LH-R, le curve fucsia all'espressione di FSH-R .

CURVE DI MELTING

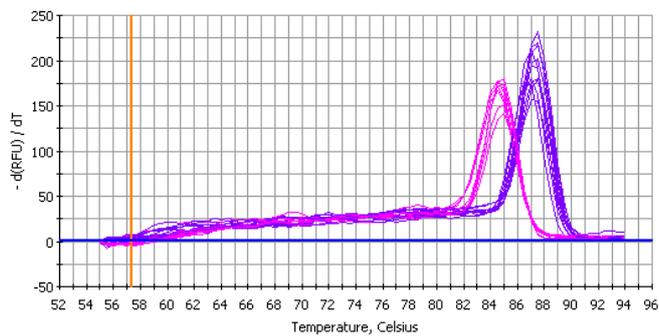


Figura 19
Le curve evidenziano due differenti temperature di melting relative a LH-R (viola) e FSH-R (fucsia). Non sono presenti artefatti di PCR..

GEL ELETTROFORESI

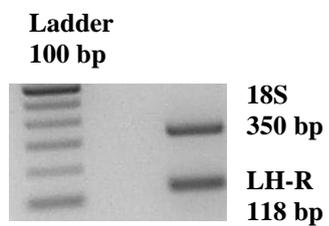
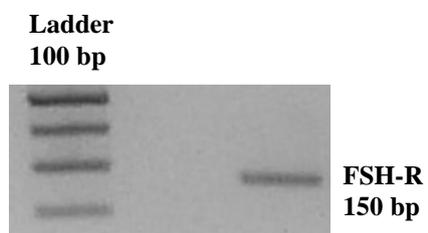


Figura 20

Il prodotto di real-time PCR di LH-R ed FSH-R ottenuto corrisponde a quello atteso.



ANALISI DEI VALORI DI LH-R

LH-R	Media	SD	Significatività
4 Giorni	1,25	0,21	
9 Giorni	1,00	0,24	4 vs 13: P < 0,001 9 vs 13: P < 0,001
13 Giorni	2,71	0,48	

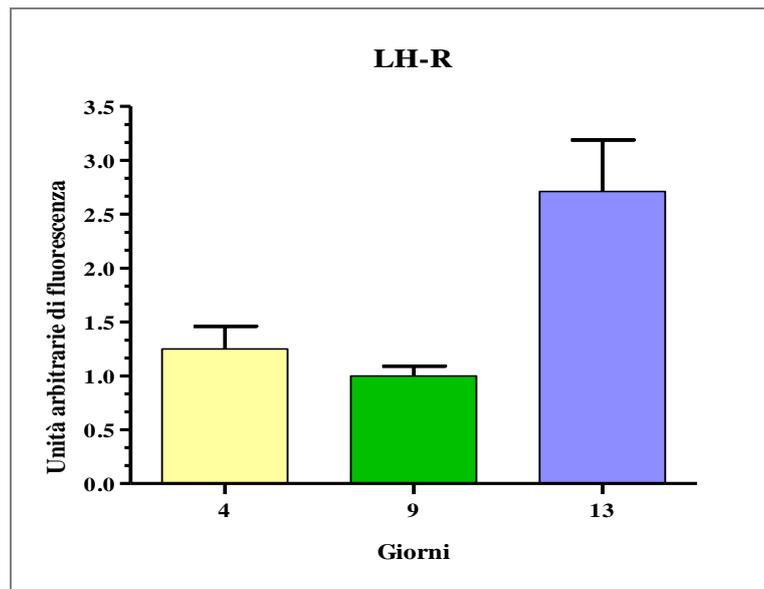


Figura 21

Valori di espressione di LH-R .

ANALISI DEI VALORI DI FSH-R

FSH-R	Media	SD	Significatività
4 Giorni	1,26	0,27	
9 Giorni	1,00	0,34	4 vs 13: P < 0,01 9 vs 13: P < 0,001
13 Giorni	2,03	0,31	

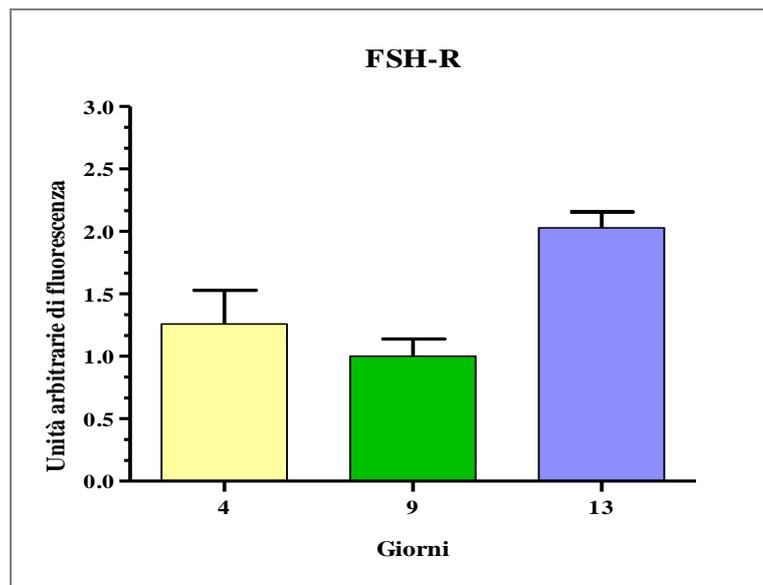


Figura 22

Valori di espressione di FSH-R.

ANALISI DEI VALORI DEL RAPPORTO LH-R/FSH-R

LH-R/FSH-R	
4 Giorni	0,99
9 Giorni	1,00
13 Giorni	1,30

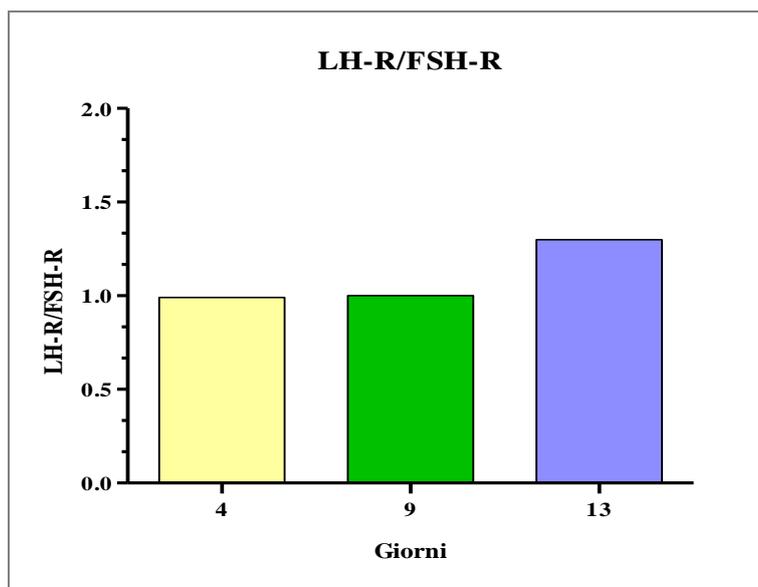


Figura 23

Rapporto tra i valori di espressione di LH-R e FSH-R a 4, 9 e 13 giorni.

Punto 6 . WESTERN BLOTTING DI MC2-R

Le evidenze sperimentali messe in luce nelle prove di *Western blotting* non permettono di pervenire a conclusioni significative circa la presenza del recettore nei campioni saggiati.

Per la rilevazione di MC2-R, è stato possibile impiegare solo preparazioni anticorpali presenti in commercio, sviluppate da sequenze peptidiche del recettore umano, le quali presentano una buona cross-reattività con le omologhe sequenze di topo e ratto. Nelle prove ho utilizzato due differenti preparazioni di anticorpo primario, orientando la mia scelta tra le sette preparazioni commerciali di Ab MC2-R disponibili (4 policlonali e 3 monoclonali, venduti da differenti fornitori) .

In una serie di prove ho utilizzato un primario sviluppato nella capra ed un secondario da pollo anti-IgG di capra, coniugato con perossidasi: in tali esperimenti non è stato possibile distinguere alcun segnale a causa dell'esteso background aspecifico.

Nella successiva serie di prove è stato l'impiegato un primario sviluppato nel coniglio, con una sequenza del peptide immunogenico differente da quella del primo anticorpo di capra. Vista la necessità di rilevare un anticorpo primario di coniglio, la prevedibile difficoltà circa l'impiego di un secondario, anti-IgG di coniglio, in un campione tissutale omologo, era la forte probabilità di cross-reattività di un secondario policlonale sviluppato contro proteine di coniglio. Pertanto ho deciso di utilizzare un anticorpo monoclonale anti-IgG di coniglio (sviluppato contro peptidi sintetici purificati).

Questo sistema riconosce specificamente il proprio controllo positivo, rappresentato da un campione di surrene di topo, sviluppando una banda a circa 30 kDa, ma non presenta alcuna reazione di positività certa né nel CL né nel surrene di coniglio, anche se si evidenziano alcune deboli bande ma non allo stesso livello di peso molecolare atteso di 30 kDa.

Si potrebbe ipotizzare nella sequenza della proteina quanto visto per l'mRNA ed illustrato brevemente nella parte iniziale dei risultati: *“Deve inoltre essere ancora chiarito perché alcune caratteristiche del profilo di melting del prodotto di PCR di questo recettore espresso nel corpo luteo siano differenti rispetto a quelle che lo caratterizzano nelle ghiandole surrenali, sebbene entrambi possano essere evidenziati con la stessa coppia di primers. Ciò potrebbe far pensare alla presenza di una variante di MC2-R presente nel corpo luteo di coniglio”*

C'è quindi la necessità di sviluppare un primario anti-recettore di coniglio immunizzando una specie eterologa con un costrutto progettato in base alla sequenza MC2-R di coniglio, una volta completata.

A prescindere dalle difficoltà tecniche di specificità del primario, l'assenza di segnale potrebbe derivare da processi di internalizzazione del recettore, cui segue una rapida degradazione lisosomiale e, solo raramente, il riciclaggio; oppure dall'assenza o da un mancato meccanismo di inserzione nella membrana cellulare del recettore da parte della proteina regolatrice MRAP che sembra sia indispensabile per l'inserzione di MC2-R nella membrana cellulare o da una mancata traduzione dell'RNA in proteina.

Capitolo quarto

DISCUSSIONE

I processi di formazione, mantenimento e regressione del CL sembrano essere il risultato di un delicato equilibrio tra fattori luteotropi e luteolitici, la cui natura e le cui interferenze reciproche sono per lo più ignote. Nel corpo luteo di coniglio la fase luteotropa è stimolata dagli steroidi sessuali (E_2 , P_4) che, dopo essersi legati agli specifici recettori citoplasmatici, interagiscono con il DNA come fattori di trascrizione per geni che regolano proliferazione, differenziazione, angiogenesi ed apoptosi. Nella successiva fase luteolitica, a seguito di interazioni recettoriali di varia natura, viene indotta iper-espressione dei geni pro-apoptotici e di citochine infiammatorie.

Le conoscenze attuali rappresentano solo la punta dell'iceberg di un universo ancora poco conosciuto di modulatori, che mediano le reciproche interazioni funzionali tra le varie popolazioni cellulari, steroidogeniche e non, del corpo luteo. L'auspicabile futuro ampliamento delle conoscenze potrebbe fornire nuovi strumenti nella terapia dell'infertilità e nel miglioramento dell'efficienza riproduttiva degli animali da allevamento, sia in cicli spontanei che indotti.

Sulla base di tali considerazioni ho concentrato il mio studio sulla modulazione dell'espressione genica che, negli eucarioti superiori, rappresenta uno dei sistemi di regolazione a breve termine in grado di garantirne la capacità cellulare di adattarsi rapidamente alle variazioni ambientali. I geni sono espressi in maniera differenziale non solo nei diversi stadi dello sviluppo, ma anche nei diversi tipi cellulari che compongono lo stesso tessuto. Infatti le funzioni di un particolare tipo cellulare dipendono dal tipo di proteine che essa produce e dalla quantità prodotta perchè è attraverso la modulazione dell'espressione genica che l'organismo mantiene l'omeostasi cellulare.

Il lavoro sperimentale oggetto della mia tesi si inserisce nell'ambito di un progetto più ampio che, dal 1998, si prefigge di valutare il profilo fisiologico di

espressione di alcuni geni coinvolti nell'evoluzione ed involuzione del corpo luteo di coniglio. Questo studio ha permesso di sviluppare per il CL di coniglio una mappa di espressione di geni apoptotici, quali: p53, Fas-L, Bcl2, eNOS ed iNOS, geni legati alla neoangiogenesi come VEGF, e varie citochine coinvolte nella risposta immunomediata ed infiammatoria (Zampini 1988; Zerani 2000; Boiti 2001; Brecchia 2001; Boiti 2002; Farneti 2002; Boiti 2003; Boiti 2004; Boiti 2004; Zerani 2005; Boiti 2005).

La sperimentazione descritta in questa tesi riguarda l'analisi comparativa dell'espressione genica nel corpo luteo, a tre scadenze, che rappresentano le fasi luteiniche iniziale (4 giorni), media (9 giorni) e quasi-terminale (13 giorni): queste finestre sono state scelte in base alla diversa suscettibilità del CL all'azione della prostaglandina F₂ α (PGF_{2 α}) nella coniglia pseudogravida (Boiti 1998). Per tempo zero si intende il giorno di ovulazione ed induzione della pseudogavidanza tramite somministrazione per via parenterale di 0, 8 μ g/coniglio di GnRH (Receptal).

L'analisi genica condotta in real-time PCR, ha richiesto una lunga fase di standardizzazione necessaria per passare dalle precedenti valutazioni (in cui si utilizzava la gel-image analysis) ad un sistema in fluorescenza.

La real-time PCR, essendo dotata di alta sensibilità e specificità, richiede un'attenta selezione delle possibili cause in grado di inficiare la ripetibilità dei dati, ed un'elaborazione matematica dei risultati alquanto complessa.

Tra l'espressione dei vari geni esaminati, quello che ha costituito il fulcro del mio lavoro sperimentale è stato il gene MC2-R. Tale recettore per l'ACTH non è mai stato evidenziato, in condizioni fisiologiche nel corpo luteo di nessuna specie animale, anche se il CRF, (generalmente descritto come il neuropeptide ipotalamico che regola la secrezione dell'ACTH) ed il CRF-R sono stati individuati in aree periferiche, dove sembra che l'ACTH agisca in maniera paracrina come citochina proinfiammatoria. Inoltre l'mRNA del CRF e del CRF-R sono stati trovati nello stroma ovarico e nel tessuto tecale dei follicoli

ovulatori murini poche ore dopo il proestro, per cui si ritiene svolgano un ruolo funzionale nei processi ovulatori. Gli stessi risultati sono stati ottenuti con ovaie di pollo. L'azione del CFR sembra adiuvata (o addirittura sostituita) dal sistema formato dall'urocortina e dal suo recettore. (Mastorakos 1993; Schafer 1997; Schafer 1997; Baigent 2001; Vitoratos 2006).

Una rilevante scoperta degli ultimi anni è che, insieme al gene MC2-R, viene trascritto ed espresso anche un gene per la produzione di una proteina accessoria, MRAP, indispensabile per l'inserimento del recettore nella membrana cellulare. In un meeting della Biochemical Society del 2006 è stato comunicato che, *“l'analisi Western blot in tessuti di ratto ha rivelato nelle surrenali e nei tessuti ovarici la presenza di MRAP come proteina dimerica...”*. In un precedente rapporto del 2005 era stato ipotizzato che la difficoltà di ottenere colture cellulari che esprimessero il recettore MC2R, dipendesse proprio dalla mancanza dell'espressione della proteina accessoria, piuttosto che dall'assenza di traduzione dell'mRNA per l'MC2R (Almiro do Vale 2006; Rached 2005).

La ricerca del recettore MC2-R ha richiesto un lavoro sperimentale molto lungo: attualmente sono riuscita a sequenziare solamente un tratto pari ad un terzo dell'intera sequenza. Deve inoltre essere ancora chiarito perché alcune caratteristiche del profilo di melting del prodotto di PCR di questo recettore espresso nel corpo luteo siano differenti rispetto a quelle che lo caratterizzano nelle ghiandole surrenali, sebbene entrambi possano essere evidenziati con la stessa coppia di primers. Ciò potrebbe far pensare alla presenza di una variante luteinica di MC2-R. Per meglio chiarire il ruolo funzionale del recettore ho cercato di supportare i dati di espressione con lo studio per immunoblotting della proteina ma, a causa di problemi che verranno descritti oltre in modo più dettagliato, tali dati non sono stati d'aiuto.

Nel mio lavoro è stato parallelamente inserito lo studio di altri geni allo scopo di corroborare l'ipotesi di un coinvolgimento di differenti recettori ormonali di membrana in grado di amplificare il segnale mediato dalle proteine

G. Tra questi recettori ho valutato l'espressione dei recettori delle gonadotropine FSH ed LH.

Infine ho esaminato l'espressione della proteina StAR (*rate-limiting* della steroidogenesi) e della β -endorfina, inserita per valutare durante lo sviluppo luteinico un possibile ruolo autocrino o paracrino dei prodotti di clivaggio del gene POMC, di cui ACTH ed MSH sono ancora oggetto di studio.

DISCUSSIONE Punto 1 - Punto 2 - Punto 3

L'mRNA del recettore MC2 è presente nel corpo luteo di coniglio e la sua espressione è modulata, tanto da far ipotizzare un suo ruolo funzionale nella regolazione della fase luteale. Valutando i meccanismi d'azione di tale recettore in altri distretti, ho cercato di individuare quelli che potrebbero essere utilizzati nel CL.

Si è visto come il tessuto luteinico sia composto da cellule steroidogeniche, da cellule endoteliali, da fibroblasti e da cellule del sistema immunitario (quali macrofagi, eosinofili e linfociti T). Queste cellule hanno un ruolo specifico nella regolazione della funzione luteinica consentendo l'integrazione dei meccanismi immunologici ed endocrinologici. Ciascuno di questi tipi cellulari presenta caratteristiche differenti in termini di espressione genica, di sensibilità e specificità recettoriale.

I vari tipi cellulari sono coinvolti in particolari interazioni di messaggi autocrini, paracrini o endocrini, e grazie a questa rete di comunicazione le varie fasi luteali di crescita, maturazione ed involuzione del CL possono essere considerate come il risultato di più fattori, tra cui il rilascio di citochine infiammatorie, di fattori endoteliali, angiogenici, immunitari, ormonali, neurormonali ed indotti da stress che modulano vicendevolmente i loro effetti finali.

All'interno di questi eventi sembrerebbe facile poter assegnare un ruolo a MC2-R poiché altrove l'interazione con il suo ligando ACTH possiede attività antinfiammatoria, immunosoppressiva, antiapoptotica e steroidogenica.

La sequenza aminoacidica 1-13 dell'ACTH stimola i macrofagi a produrre la IL10 con proprietà antinfiammatoria, e blocca l'espressione del gene NF- κ B, che è un fattore di trascrizione per citochine e chemochine, un fattore di crescita per geni apoptotici, ed un attivatore di iNOS (Haycock 2000; Gupta 2000; Haddad

2001; Mandrika 2001; Hassoun 2002) rallentando il rilascio dei mediatori infiammatori.

L'ACTH possiede anche attività immunosoppressiva; rallenta la produzione di IL1 β , TNF α ed IL6; ed inibisce direttamente la produzione di NO in linee di cellule nervose murine, agendo da antiapoptotico (Catania 2004).

L'azione steroidogenica dell'ACTH nelle surrenali dell'uomo e di gran parte dei mammiferi e nel tessuto adiposo murino (Cammass 1997) è indotta dalle sequenze 5-13 e 15-18 mediante l'aumento di PKA. Quando il cAMP si lega alle subunità regolatrici di PKA, queste si separano da quelle catalitiche, che a loro volta diventano attive e vanno a fosforilare specifici residui di serina e treonina su enzimi bersaglio, modificandone l'attività.

Tra i geni iper-stimolati responsabili dell'effetto steroidogenico vi sono quelli che codificano per il recettore delle LDL, HDL-R ed il gene dell'endotelina: questa iper-espressione ha come effetto finale l'aumento l'afflusso di sangue per rifornire le cellule di più substrati, in particolar modo colesterolo ed O₂. Il colesterolo dopo l'idrolisi viene veicolato dalla StAR (attivata dall'ACTH) all'interno del mitocondrio dove il citocromo P45011A1 (punto di regolazione della steroidogenesi) catalizza la conversione del colesterolo in pregnolone, che verrà poi trasformato in progesterone.

I dati presentati nel punto 2 evidenziano una maggior espressione di MC2-R a 4 giorni: ciò potrebbe essere spiegato "dal ruolo poliedrico" dell'ACTH nell'aiutare il corpo luteo a proteggersi dai processi infiammatori mediati da citochine e ad incrementare l'attività steroidogenica necessaria per produrre progesterone. Infatti, al giorno 4 la progesteronemia è ancora bassa (circa 5 ng/mL) rispetto al livello massimo che si raggiunge circa al 10° giorno (15 ng/mL) (Browning 1980).

L'attività steroidogenica (maggiore a 4 giorni rispetto a 13) è confermata dall'andamento della StAR, esattamente come avviene in altri distretti dove la StAR viene considerata ACTH-dipendente (punto 3). Gli estrogeni prodotti a

livello ovarico, a loro volta, modulano la StAR: infatti una deplezione di estradiolo riduce la capacità luteotropa.

Negli anni passati si pensava che gli estrogeni agissero sul citocromo P450_{scc}, ma le conoscenze attuali hanno modificato tale teoria, trasferendo il punto di controllo sulla StAR (Cok 1997). Si ignora se l'azione steroidea derivi da una minor sintesi di mRNA della StAR o da una minor attività della proteina: l'effetto finale è una ridotta conversione del colesterolo in pregnolone.

La fase luteotropa dipende dall'attività della StAR infatti, se viene inibita si ha una riduzione del livello di progesterone, del peso del corpo luteo, del numero dei recettori per gli estrogeni e di quelli per LH.

In coniglie ipofisectomizzate, se la StAR mantiene la sua attività, la somministrazione di estradiolo si rende necessaria dal 6° giorno di pseudogavidanza, poiché prima di allora il CL sembra svilupparsi spontaneamente (Yuh 1984).

Il ruolo di StAR risulta insostituibile nella regolazione del CL e la sua maggiore espressione a 4 giorni appare giustificata dalla maggiore necessità di P4 nelle prime fasi luteali: ciò sembra corroborare l'ipotesi dell'eventuale del ruolo steroidogenico di MC2-R nel CL e della modulazione di espressione maggiore al quarto giorno.

Secondo la bibliografia, l'mRNA del CRF e del CRF-R sono stati trovati nello stroma ovarico e nel tessuto tecale di follicoli murini, per cui si ritiene svolgano un ruolo funzionale nei processi ovulatori, con una probabile regolazione autocrina. (Mastorakos 1993; Schafer 1997; Baigent 2001; Vitoratos 2006). Anche l'mRNA di MRAP, indispensabile per l'inserimento di MC2-R nella membrana cellulare, viene trascritto nei tessuti ovarici di ratto (meeting della Biochemical Society 2006).

Alla luce di tali conoscenze, l'espressione di MC2-R nel CL, teoricamente coerente da un punto di vista funzionale, deve essere ancora considerata un'ipotesi progettuale da sviluppare e da supportare con dati relativi alla

presenza della proteina, ed alla sua localizzazione, oltre che con il completamento della sequenza nucleotidica.

Essendo il CL riccamente vascolarizzato uno tra gli obiettivi futuri sarà poter escludere che la presenza di mRNA MC2-R nel CL derivi da contaminazione linfocitaria. In letteratura, in molti mammiferi, la presenza di MC2-R è descritta nel 47% dei linfociti B e nel 23% dei linfociti T (Johnson 2001). Per eliminare tale incidenza sto cercando di isolare le cellule della granulosa dalla corona radiata del follicolo. In tale momento evolutivo la cellula uovo è al centro dell'antro follicolare con adese le cellule della granulosa.

La purezza in termini di popolazione cellulare recuperata è verificata attraverso colorazione citologica.

Parallelamente a questa serie di valutazioni, sto conducendo ricerche su CL incubati *in vitro* con ACTH al fine di valutare come l'incubazione modifichi i livelli di progesterone, NOS e PGF2 α .

DISCUSSIONE Punto 4

Tra i sistemi peptididergici quello dei peptidi oppioidi gioca un ruolo importante nella regolazione della secrezione di LH inibendo l'attività dei neuroni ipotalamici che secernono GnRH. Gli oppioidi endogeni sembrano essere i fattori chiave nell'inibizione che lo stress induce sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Infatti esso aumenta la secrezione di CRF e di β -endorfina cerebrale, e quest'ultima riducendo la sensibilità delle cellule ipofisarie secernenti gonadotropine allo stimolo del GnRH ipotalamico induce la diminuzione della secrezione di LH. Se si somministra per via intraventricolare naloxone (antagonista degli oppioidi) l'inibizione sul rilascio di LH mediata dalla β -endorfina viene eliminata.

In alcuni mammiferi, tra cui l'uomo, in fase luteale si registra una riduzione della frequenza del rilascio pulsatile di LH correlato all'aumento dell'attività oppioide, infatti la somministrazione di naloxone aumenta la frequenza dei picchi di LH.

La mia prima ipotesi nel momento in cui ho scoperto l'esistenza di MC2-R nel CL è stata considerare questa ghiandola provvisoria come centro di integrazione paracrina e autocrina. Mi sono posta, quindi, l'obiettivo di scoprire se una eventuale produzione di ACTH nel CL regolasse l'espressione del suo recettore, e con tale ipotesi ho iniziato il "walking" sul gene POMC.

In questo lavoro sperimentale è stata presentata la porzione genica relativa alla β -endorfina perchè è l'unico prodotto di clivaggio del gene POMC il cui studio sono riuscita a completare.

I dati presentati al punto 4 mostrano il picco massimo di espressione della β -endorfina in 13.ma giornata e trovano conferma in bibliografia con quelli registrati nei CL di ratto e di suino, l'espressione della β -endorfina è anche regolata dall'espressione di LH-R e della PRL (Reis 2004).

Lavori sperimentali nel suino indicano come il rilascio dell'oppioide, dopo stimolazione con LH, avvenga da parte delle grandi cellule luteiniche mentre il TNF α (con meccanismo autocrino o paracrino) ne inibisca la secrezione con la collaborazione sinergica della PGF2 α (Przala 1999).

Yin et al. (1998) hanno osservato un ruolo degli oppioidi nel determinare la morte cellulare. Pertanto è possibile che vi sia un sinergismo nell'indurre la lisi del CL in cui un aumento della β -endorfina collabori inibendo i canali L, N e/o PQ per il calcio (Sciorsci 2000; Roumy 2001), determinando un deficit di calcio endocellulare: tale situazione è in grado di modificare la funzionalità endocrina poiché una carenza di calcio intracellulare sopprime tutte le funzioni calcio-dipendenti (Sciorsci 2000).

Un'ulteriore ipotesi, che potrebbe spiegare la situazione evidenziata nei miei esperimenti al 13° giorno è che un aumento di β -endorfina corrisponda ad un aumento di ACTH e quest'ultimo a sua volta induca una modulazione negativa del recettore MC2-R.

DISCUSSIONE Punto 5

La follicologenesi, l'ovulazione e lo sviluppo luteale sono processi controllati da fattori ovarici, che possono agire sia come ormoni in grado di modulare la secrezione di gonadotropine, sia come fattori paracrini o autocrini, in grado di modulare la sintesi dei recettori per le gonadotropine presenti nel CL.

Le modificazioni del progesterone liberato durante le varie fasi luteali possono spiegare solo parzialmente il processo luteolitico. Infatti una teoria accolta negli ultimi anni dal mondo scientifico vede l'ovaio come un organo neuroendocrino in grado di svolgere le proprie funzioni attraverso integrazioni endocrine e paracrine differenti a seconda del ciclo riproduttivo della specie considerata.

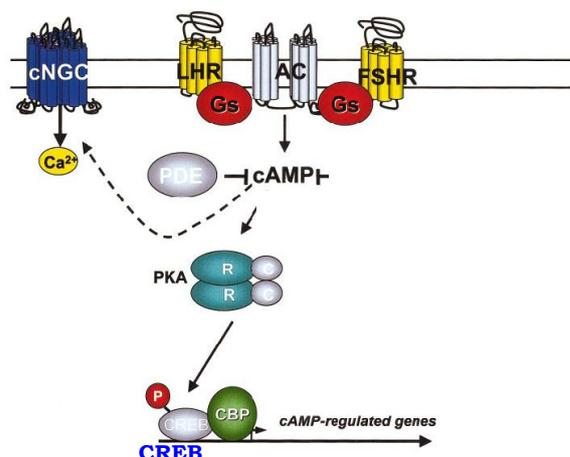
Molti effetti centrali sono regolati da fattori rilasciati dal follicolo o dal CL. Ne sono un esempio: il sistema attivina-inibina, che agisce in modo determinante sulla regolazione della secrezione di FSH; gli oppioidi, come la β -endorfina, che sembrano essere i fattori chiave nell'inibizione che lo stress induce sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (che come ho visto è espressa dal CL); la leptina, che regola la secrezione di LH attraverso il neuropeptide Y (Barasch 1996); il neuropeptide Y, che stimola la liberazione pulsatile del GnRH in risposta al progesterone ed agli estrogeni; l'IGF-I e l'IGF-II, che promuovono, a livello delle cellule della teca e della granulosa, la sintesi dei recettori di LH e la secrezione di inibina, ed in sinergia con l'FSH stimolano l'attività aromatasica.

Anche se non esistono dati relativi agli effetti del sistema attivina-inibina e follistatina nel coniglio, questo meccanismo di regolazione potrebbe spiegare la modulazione dell'espressione di LH-R ed FSH-R a 4 ed a 9 giorni. L'inibina è sintetizzata dalle cellule della granulosa e dalle cellule del corpo luteo ed in minima percentuale dalla ghiandola surrenalica: questo ormone blocca la sintesi di FSH e riduce la sensibilità delle cellule ipofisarie secernenti gonadotropine sotto lo stimolo del GnRH ipotalamico (probabilmente mediante una riduzione

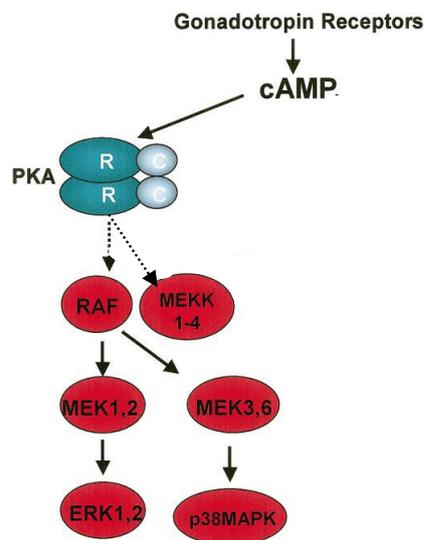
dell'espressione dei recettori per il GnRH). I livelli di inibina variano, nelle specie ad ovulazione spontanea, in maniera inversamente proporzionale ai valori di FSH nel sangue periferico. Ne esistono due tipi: l'inibina B, più alta in fase follicolare, prodotta in maggior misura dalle cellule della granulosa e l'inibina A, che raggiunge livelli maggiori in fase luteinica, prodotta principalmente dalle cellule luteiniche. Nell'uomo, i livelli circolanti di inibina A forniscono dati relativi alla funzionalità del corpo luteo, nulla si sa invece nel coniglio.

L'attivina, invece, promuove la secrezione di FSH mediante un meccanismo GnRH indipendente: i suoi livelli maggiori si registrano in fase luteale tardiva nell'uomo ed in altri mammiferi. Alla luce di quanto detto, si potrebbe supporre che FSH-R possa essere ipo-espresso (4 e 9 giorni) perché regolato dall'azione dell'inibina A; ed iper-espresso (13 giorni) grazie allo stimolo dell'attivina.

Un'altra ipotesi (Conti 2002) suggerisce che, se sussiste sinergia di modulazione positiva tra i due recettori gonadotropinici, l'interazione amplifica il segnale di traduzione, determinando nelle cellule del CL la fosforilazione di CREB (Sassone-Corsi 1998), e l'attivazione della trascrizione dell'inibina A e dell'aromatasi (geni la cui trascrizione è CREB-dipendente) (Richards 1994). Dai dati presentati, ciò è quello che si può osservare al giorno 13.



Un altro meccanismo proposto per la doppia interazione di LH-R ed FSH-R è l'influenza sull'attivazione di una PKA attraverso il fosfatidil inositolo 3 fosfato, che determina la fosforilazione ed attivazione di Raf e MEK, entrambi chinasi della famiglia MAPK. Le MAPK sono un gruppo di chinasi serina-treonina espresse in tutte le cellule eucariotiche e attivate per fosforilazione in seguito a vari stimoli extracellulari (citochine, fattori di crescita, neurotrasmettitori o ormoni), oppure all'adattamento a condizioni di stress ambientale. Esse possiedono un ruolo importante nella luteolisi poiché, attivate, svolgono un ruolo promotore dell'apoptosi. Inoltre collaborano nell'angiogenesi con VEGF nel modulare la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, ed il rimodellamento tissutale nelle fasi luteiniche. L'azione luteolitica potrebbe essere quindi promossa dall'iper-regolazione dei recettori gonadotropinici, FSH-R ed LH-R, con successiva attivazione di MAPK, è stato dimostrato come all'attivazione di MAPK contribuisca fortemente anche la prostaglandina $PGF2\alpha$, responsabile dell'ultima fase della luteolisi.



Dai dati di espressione dei due recettori presentati al punto 5, è evidente come entrambi aumentino al giorno 13 ma, oltre alla loro tendenza nel tempo, è

importante evidenziare l'incidenza di ognuna di loro nell'effetto finale. Come accade nella maturazione dei follicoli, e nell'uomo nella selezione del follicolo dominante, tale maturazione non dipende tanto dai valori assoluti delle gonadotropine, quanto dal valore del rapporto LH/FSH: un valore < 1 indica una condizione in cui i valori di FSH-R aumentano per stimolare l'attività mitotica e la differenziazione morfologica, che porteranno alla formazione del follicolo, fase in cui si registra una iper-regolazione dei geni coinvolti nella steroidogenesi, un'elevata produzione di estradiolo e l'espressione dei recettori per LH.

Il legame tra LH ed LH-R favorisce, consecutivamente, l'ovulazione, l'aromatizzazione degli androgeni e la soppressione dell'espressione dell'aromatasi, (Richards 1995; Richards 2001). Dall'ovulazione il rapporto LH-R/FSH-R inverte di tendenza e diventa ≥ 1 , per aumento di LH-R.

Dai dati ottenuti relativi all'espressione di LH-R ed FSH-R: il rapporto tra le due gonadotropine a 13 giorni è 1,3 contro un valore 1 negli altri giorni ciò dimostra una maggior espressione di LH-R in 13^a giornata. Forse, ciò accade, perché a 13 giorni le cellule luteiniche necessitano della stimolazione antimitotica e vasoattiva dell'LH-R e non della stimolazione mitogena dell'FSH-R, inoltre il progesterone continua ad essere prodotto sotto l'azione del legame tra LH ed il suo recettore

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Malek Z.A.** (2001) *Melanocortin receptors their functions and regulation by physiological agonists and antagonists*. Cell. Mol. Life. Sci. **58**: 434–441.
- Abe K.**, Kroning J., Greer MA., *et al.* (1979) *Effects of destructure of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma Thyrotropin*. Neuroendocrinology **29**: 119.
- Abramowitz J.**, Birnbaumer L. (1982) *Temporal characteristics of gonadotropin interaction with rabbit luteal receptors and activation of adenylyl cyclase: comparison to the mode of action of catecholamine receptor*. Endocrinology **111**: 970-976.
- Allen W.M.**, *et al.* (1930) *Physiology of the corpus luteum. VII. Maintenance of pregnancy in rabbit after very early castration by corpus luteum extracts*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **27**: 403-405.
- Albright F.**, Halsted J. (1935) *Studies on ovarian dysfunction. II. The application of the "hormonal measuring sticks" to the sorting out and to the treatment of the various types of amenorrhea*. New Engl. J. Med. **212**: 250.
- Almiro do Vale I.**, Egertová M., Elphick M.R., Clark A.C. (2006) *Molecular characterisation of the Melanocortin-2 Receptor Accessory Protein- (MRAP)* Meetings of Biochemical Society - June 27.
- Anderson L.** *et al.* (1969) *Comparative aspect on uterine-luteal relationship*. Rec. Prog. Horm. Res **25**: 57-104.
- Arakane F.**, *et al.* (1998) *The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)*. J. Biol. Chem. **273**: 16339-16345.
- Aratane F.**, Sugawara T., Stocco D.M, (1996) *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in absence of its mitochondrial import sequence: implicatioos for the mechanism of StAR action*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 13731-13736.

- Auletta F.J.** (1988) *A.P.F. and Flint Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows non-human primates, and women, especially in relation to time of luteolisi.* *Endocr. Rev.* **9**: 88-105.
- Azmi T.I., J.D. O'Shea.** (1984) *Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of corpus luteum.* *Lab. Invest.* **51**: 206-217.
- Bahar J.M., N. Ben-Jonathan** (1985) *Ovarian catecholamines during the prepubertal period and reproductive cycle of several species.* eds. *Catecholamines as Hormone Regulators.* New York: Raven Press, 279-292.
- Baig A., Swords F.M., Szaszák M., King P.J., Hunyady L., Clark A.J.** (2002) *Agonist activated adrenocorticotropin receptor internalizes via a clathrin-mediated G protein receptor kinase dependent mechanism.* *Endocr. Res.* **28**: 281-9.
- Baigent S. M.** (2001) *Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response.* *Peptides* **22** : 809-820.
- Barasch IA, Cheung CC, et al.** (1996) *Leptin is a metabolic signal to the reproductive system.* *Endocrinology.* **137**:3144-7.
- Barden N.** (2004) *Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression.* *J. Psychiatry Neurosci.* **29**: 185-93.
- Behrman H.R., Luborsky-Moore J.L., et al.** (1979) *Mechanisms of PGF₂alpha action in functional luteolysis.* *Advances in Experimental Medicine and Biology* **112**: 557.
- Belfiore C.J., Hawkins D.E., et al.** (1994) *Regulation of cytochrome P-450_{sc} synthesis and activity in the ovine corpus luteum.* *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **51**: 283-290.
- Bennett, H. P. J., Lowry P. J., McMartin C.** (1973) *Confirmation of the 1-20 amino acid sequence of human adrenocorticotropin.* *Biochem. J.* **133**: 11-13.
- Berga SL., Loucks A.B., Rossmanith W.G., et al.** (1991) *Acceleration of LH pulse frequency in functional hypothalamic amenorrhea by dopaminergic blockade.* *J. Clin. Endocrin. Metab.* **72**: 151.

- Berga S.L.**, Mortola J.F., Yen S.S.C. (1988) *Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea*. J. Clin. Endocrin. Metab. **66**: 242.
- Boiti C**, Zampini D., Zerani M., Guelfi G., Gobbetti A. (2001) *Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of pseudopregnant rabbit in vitro*. Journal of Endocrinology **168**:141-151.
- Boiti C**, Zampini D., Guelfi G., et al. (2002) *Functional expression patterns of endothelial and inducible Nitric Oxide Synthase isoforms in corpora lutea of pseudopregnant rabbits at different luteal stages*. Journal of Endocrinology **173**: 285-296.
- Boiti C.**, Guelfi G., Zampini D., *Regulation of nitric-oxide synthase isoforms and role of nitric oxide during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis during in rabbits*. Reproduction 125: 807-816.
- Boiti C.**, Guelfi G., Zerani M., et.al (2004) *Expression patterns of cytokines, p53, and nitric oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis*. Reproduction **127**: 229 – 238.
- Boiti C**, Guelfi G, Zerani M, et al. (2004) *Ruolo della leptina e dell'IGF- I nella regolazione della riproduzione delle coniglie in relazione a diversi sistemi di gestione ed alimentazione*. Rivista di coniglicoltura 1, 34-38:
- Boiti C**, Guelfi G, Brecchia G, Dall'Aglio C, , et al. (2005) *Role of the endothelin-1 system in the luteolytic process of pseudopregnant rabbits*. Endocrinology. **146**(3):1293-300.
- Boshier D.P.**, Hollowa H. (1981) *Triacylglycerols in the rat uterine epithelium during the oestrus cycle and early pregnancy*. J. Reprod. Fertil. **62**: 441-446, .
- Boston B.A.** (1998) *The role of melanocortins in adipocyte function*. Ann. NY Acad. Sci. **885**: 75–84.
- Bose H.S.**, et al. (1996) *The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia*. New Engl. J. Med. **335**: 1870-1878.

- Braden T.D.**, Gamboni F., Niswender G.D. (1988) *Effects of PGF₂alpha-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum*. Biol. Reprod. **39**: 245-253.
- Brecchia G.**, Zampini D., Guelfi G., Boiti C., et al. (2001) *Effects of early maternal deprivation on the neuroendocrine responses of young rabbits*. 4th International Conference on Farm Animal Endocrinology. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, **5**:49.
- Browning J.M.**, Keyes P.L., Wolfr C. (1980) *Comparison of serum progesterone, 20 α -dihydroprogesterone and estradiol-17 β on pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy*. Biol. Reprod. **23**: 1014-1019.
- Budziszewska B.**, et al. (2002) *Effect of antidepressant drugs on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and glucocorticoid receptor function*. Pol. J. Pharmacol. **54**: 343-49.
- Bulmer D.**, et al. (1964) *The histochemistry of ovarian macrophages in the rat*. J. Anat. **98**: 313-319, .
- Butcher R. L.**, Barley D. et al. (1969) *Local relationship between the ovary and terus of rats and guinea pigs*. Endocrinology **84**: 476-481.
- Chajlani V.**, Muceniece R., Wikberg J.E. (1993) *Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **195**: 866–873.
- Cammass FM.**, et al. (1997) *The mouse adrenocorticotropin receptor gene cloning and characterization of its promoter and evidence for a role*. Mol. Endocrinol. **11**: 867-876.
- Catania A.**, Gatti S., Colombo G., Lipton J.M. (2004) *Targeting Melanocortin Receptors as a Novel Strategy to Control Inflammation*. Pharmacol. Rev. **56**:1-29.

- Carnegie J.A.**, Dardick I., Tsang B.K. (1987) *Microtubules and the gonadotropic regulation of granulosa cell steroidogenesis*. *Endocrinology* **120**: 819-828.
- Cavagnaro J.** (1986) *Molecular basis for the bidirectional modulation of the neuroendocrine and the immune systems*. *Year Immunol.* **2**:303.
- Channing C.** (1969) *Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology*. *J. Endocrinol.* **43**: 381-390.
- Cheghini N., et al.** (1991) *Cellular distribution and cycle phase dependency of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea*. *Biol. Reprod.* **45**: 506-513.
- Choen S.I.** (1980) *Cushing's syndrome: a psychiatric study of 29 patients*. *Br. J. Psychiatry* **136**: 120.
- Chretien M.**, Benjannet S., Gossard F., et al. (1979) *From β -lipotropin to β -endorphin and "pro-opiomelanocortin"*. *Can. J. Biochem.* **57**: 1111.
- Cochet, M.**, Chang A.C.Y., Cohen S.N. (1982) *Characterization of the structural gene and putative 5-prime-regulatory sequences for human proopiomelanocortin*. *Nature* **297** : 335-339.
- Coiro V**, Volpi R, Gramellini D, et al. (1997) *Age-related decrease in the opioid control of LH secretion during reproductive years in normal women*. *Gynecol Obstet Invest.***43**:162-5.
- Cok S.**, Hay R., Holt J. (1985) *Estrogen-mediated mitochondrial cholesterol transport and metabolism to pregnenolone in the rabbit luteinized ovary*. *Endocrinology*, **117**: 2462-2470.
- Crowley W.F.Jr.**, Filicori M., Spratt D., et al. (1985) *The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women*. *Rec. Prog. Horm. Res.* **41**: 473.
- Damle S.**, Labarbera A.R. (1984) *Progesterone production by rabbit corpora lutea in vitro: regulation by LH and epinephrine*. *Biol Reprod*; 30(suppl 1) 115(abst).33.

- Day S.L.**, Birnbaumer L. (1980) *The effect of estradiol on hormonally stimuable adenylyl cyclase activity and on progesterone production in normal and regressing corpora lutea from control and human gonadotropin-treated pseudopregnant rabbits*. *Endocrinology* **106**: 375-381.
- Dennett D.C.** (1997) *L'idea pericolosa di Darwin. L'evoluzione ed i significati della vita* Bollati Boringhieri Editore
- Eaves M.**, Britton K.T., Rivier J., Vale W., Koob GF. (1985) *Effects of corticotropin releasing factor on locomotor activity in hypophysectomized rats*. *Peptides* **6**: 923– 926.
- Elmqvist J.K.**, Ahima R, S., Elias C.F., *et al.* (1998) *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 741.
- Eipper B.A.**, Mains R.E. (1980) *Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin-endorphin and related peptides*. *Endocr. Rev.* **1**: 1-27.
- Farneti S.**, Giovanetti C., Guelfi G., Boiti C., *et al.* *Effects of p-benzouquinone on nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression in the LPS-activated alveolar rat macrophages NR8383 cells*. 2nd Nitric Oxide Conference June 2002 Prague.
- Fergusson J.**, *et al.* (1941) *A study of the mobility of intact uterus at term*. *Surg. Gynecol. Obstet.* **73**: 359-366.
- Ferruz J.**, Barria A. (1991) *Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins*. *Biol. Reprod.* **45**: 592-597.
- Ferruz J.**, *et al.* (1991) *Norepinephrine release in the immature ovary is regulated by autoreceptor and neuropeptide*. *J. Endocrinology* **130**: 1345-1351.
- Fletcher P.W.**, Niswender G.D. (1982) *Effect of PGF2alfa on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue*. *Prostaglandins* **20**: 803-818.
- Flower R.**, Sheldrick L. (1982) *Evidence a systemic route for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep*. *J. Reprod. Fertil.* **67**: 215-225.

- Fujeda K.**, *et al.* (1997). *Spontaneous puberty in 46, XX subjects with congenital lipoid adrenal hyperplasia*: J. Clin. Invest. **99**(6): 1265-1271.
- Genazzani A.**, Palumbo M., *et al.* (1995) *Evidence for a role for the neurosteroid allopregnanolone in the modulation of reproductive function in female rats*. Eur. J. Endocrinol. Sep **133**:375-80, .
- Gillies G.**, Linton EA., Lowry PJ. (1982) *Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by Vasopressin*. Nature **299**: 355.
- Gindoff PR.**, Ferin M. (1987) *Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate*. Endocrinology **121**: 837.
- Gospodarowicz D.**, Thakral K. (1978) *Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 847-851.
- Grazul-Bilska A.T.**, *et al.* (1992) *Production of mitogenic factors by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle*. Endocrinology **130**: 3625-3632.
- Grusenmeyer D.P.**, Pate J.L. (1992) *Localization of prostaglandin F2 α inhibition of lipoprotein use by bovine luteal cells*. J. Reprod. Fertil. **94**: 311-318.
- Gupta A.**, Diaz R.A., Higham S., Kone B.C. (2000) *α -MSH inhibits induction of C/EBP β -DNA binding activity and NOS2 gene transcription in macrophages*. Kidney Int. **57**: 2239-2248.
- Gutknecht G.D.**, *et al.*, (1972) *Inhibition of prostaglandin F2 α or LH-induced luteolysis in the pseudopregnant rabbit by 17 β -estradiol*. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. **139**: 406-410.
- Haddad J.**, Lauterbach R., Saade N.E., Safieh-Garabedian B., Land S.C. (2001) *A melanocyte-related tripeptide, Lys-d-Pro-Val, ameliorates endotoxin-induced nuclear factor κ B translocation and activation: evidence for*

- involvement of an interleukin-1b 193-195 receptor antagonism in the alveolar epithelium. Biochem. J. 355: 29-38.*
- Hall K.**, Lundin G., Pova G. (1988) *Serum levels of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. Acta Endocrinol.(Copenh) 118: 321.*
- Harmer C., Bicknell A.** (2005) *Role of gamma-MSH peptides in the regulation of adrenal steroidogenesis .The Melanocortin Pathway 26: 1944-1951.*
- Hassoun H.**, Zou L., Moore F.A., Kozar R.A., Weisbrodt N.W., Kone B.C. (2002) *Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against mesenteric ischemia-reperfusion injury. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 282: G1059-G1068.*
- Haycock J.**, Rowe S.J., Cartledge S., Wyatt A., Ghanem G., Morandini R., Rennie I.G., MacNeil S. (2000) *Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. J. Biol. Chem. 275: 15629-15636.*
- Hawkins D.E.**, Belfiore C.J., Kile J.P. (1993) *Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod. 48: 1185-1190.*
- Heiman M.L.**, Ahima R.S., Craft L.S., *et al.* (1997) *Leptin inhibition of the hypothalamic-adrenal axis in response to stress. Endocrinology 138: 3859.*
- Heinrichs S.C.**, Menzaghi F., Merlo Pich E., Britton K.T., Koob G.F. (1995) *The role of CRF in behavioral aspects of stress. Ann. NY Acad. Sci. 771: 92-104.*
- Helgi B.**, Schiöth H.B., Haitina T., Ling M.K., Ringholm A., Fredriksson R., Cerdá-Reverter J.M., Klovins J. (2005) *Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. Peptides 26 : 1886-1900.*

- Hilliard J.**, et al. (1973) *Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice, and rabbit*. Biol. Reprod. **8**: 203-211.
- Holsboer-Trachsler E.**, Stohler R., Hatzinger M. (1991) *Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression*. Psychiatry Res. **38**:163-71.
- Horrocks PM.**, Jones A.F., Ratcliffe W.A., et al. (1990) *Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty four hours in normal males and females*. Clin. Endocrin. **32** : 127.
- Hunter G.L.**, Casida L.E. (1995) *Absence of local effects of the rabbit uterus on weight of corpus luteum*. J. Reprod. Fertil **13**: 179-181.
- Hunzicker-Dunn M.** (1982) *Epinephrine-sensitive adenylil cyclase activity in rabbit ovarian tissue*. Endocrinology **110**: 233-240.
- Ikonen E.**, et al. (1997) *Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport*. Curr. Opin. Lipidol. **8**:60-64.
- Jackob W.**, Jentsch K.D., Mauersberger B. (1977) *Demonstration of angiogenic activity in the corpus luteum of cattle*. Exp. Pathol. **13**: 231-236.
- Jefcolate C.** (2002) *High-flux mitochondria cholesteroltrafficking a specialized function of adrenal cortex*. J. Clin. Invest. **110**: 881-890.
- Johnson EW**, Hughes TK Jr, Smith EM; (2001) *ACTH receptor distribution and modulation among murine mononuclear leukocyte populations*. J Biol Regul Homeost Agents **15**:156–62.
- Jones P.B.C.**, Hsueh A.J.W. (1981) *Regulation of progesterone metabolizing enzyme by adrenergic agents, prolactin and prostaglandins in culture rat ovarian tissue*. Endocrinology **109**: 1347-1354.
- Juengel L.J.**, Meberg B.M., Turzillo A.M. (1995) *Hormonal regulation of mRNA encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea*. Endocrinology **136**:5423-5429.

- Juengel L.J.**, Nett T.M., Tandesky T.M., *et al.* (1995) *Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes.* *Endocrine* **3**:323-326.
- Juengel J.L.**, Nett T.M., Anthony R.V., Niswender G.D. (1997) *Effects of luteotropic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insuline-like growth I and growth hormone receptor in th ovine corpus luteum.* *J. Reprod. Fertil.* **110**: 291-298.
- Juengel L.J.**, Meberg B.M., *et al.* (1998) *Concentration of mRNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ δ 5, δ 4 isomerase (3 β -HSD) and 3 β -HSD enzyme activity following treatment of ewes with prostaglandin F2 α .* *Endocrine* **8**:45-50.
- Juengel L.J.**, Larrick T.L., Meberg B.M. (1999) *Luteal expression of steroidogenic factor-1 mRNA during the estrous cycle and in response to luteotropic and luteolytic stimuli in ewes.* *Endocrine* **9**: 227-232.
- Kallen C.B.**, *et al.* (1998) *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein.* *J. Biol. Chem.* **273**: 26285-26288.
- Kato T**, Kumai A., *et al.* (1993) *Effect of beta-endorphin on cAMP and progesterone accumulation in rat luteal cell.* *Endocr. J.* **40**: 323-328.
- Kilianova Z.**, Basora N., Kilian P., Payet M.D., Gallo-Payet N. (2006) *Human Melanocortin Receptor 2 Expression and Functionality: Effects of Protein Kinase A and Protein Kinase C on Desensitization and Internalization.* *Endocrinology* **147**: 2325–2337.
- Kitayama I.**, Janson A.M., Cintra A., Fuxe K., Agnati L.F., Ogren S.O., *et al.* (1988) *Effects of chronic imipramine treatment on glucocorticoid receptor immunoreactivity in various regions of the rat brain.* *J. Neural. Transm.* **73**:191-203.
- Klinefelter HF Jr.**, Albright F., Griswold G.C. (1943) *Experience with a quantitative test for normal or decreased amounts of follicle-stimulating*

- hormone in the urine in endocrinological diagnosis. J. Clin. Endocrinol. Metab.* **3**: 529.
- König S.**, Luger T.A., Scholzen T.E. (2006) *Monitoring neuropeptide-specific proteases: processing of the proopiomelanocortin peptides adrenocorticotropin and α -melanocyte-stimulating hormone in the skin. Experimental Dermatology* **15**: 751–761.
- Lazarus R.S.**, Folkman S. (1984) *Stress. Appraisal and Coping*. New York, Springer Publishing Company: 445.
- Licinio J.**, Mantzoros C., Negrao A.B., *et al.* (1997) *Human Leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary adrenal function. Nat. Med.* **3** : 575
- Ling M.H.**, Perry P.J., Tsuang M.T. (1981) *Side effects of corticosteroid therapy Arch. Gen. Psychol.* **38** :471.
- Lin D.**, Sugawara T., Strauss III J.F., Clark B.J., Stocco D.M., *et al.* (1995) *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science* **267**: 1828-1831.
- Lin D.**, Stocco D.M., *et al.* (1995). *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science* **265**:1828
- Lu X.Y.** (2001) *Role of central melanocortin signaling in eating disorders. Psychopharmacol Bull.* **35**: 45-65.
- Lúis Forti F.**, *et al.* (2006) *ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. Molecular and Cellular Biochemistry* **293**: 147-160.
- Mandrika I.**, Muceniec R., and Wikberg J.E. (2001) *Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon- γ -induced NF- κ B DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. Biochem. Pharmacol.* **61**: 613-621.
- Mastorakos G.**, Webster E.L., Friedman T.C., Chrousos G.P. (1993) *Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding sites in the rat ovary. Journal of Clinical Investigation* **92** : 961–968.

- Morgan C.**, Thomas R., Ma W., Novotny M., Cone R. (2004) *Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice*. Chem. Senses **29** (2): 111-115.
- Mountjoy K.G.**, Robbins L.S., Mortrud M.T., Cone R.D. (1992) *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors*. Science **257**: 1248
- Mountjoy K.G.**, Wong J. (1997) *Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides*. Mol. Cell. Endocrinol. **128**: 171–177.
- Munck A.**, Guyre P.M., Holbrook N.J. (1984) *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions*. Endocrin. Rev. **5**: 25.
- Nakanishi S.**, Anoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N., et al. (1979) *Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor*. Nature **278** : 423–427.
- Nemeroff C.B.**, Widerlov E., Bisette G., Walleus H., Karlsson I., Eklund K., Kilts C.D., Loosen P.T., Vale W. (1984) *Elevated concentrations of CSF corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients*. Science **226**: 1342–1344.
- Nibuya M.**, Morinobu S., Duman R.S. (1995) *Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments*. J. Neurosci. **15**: 7539–7547.
- Olszewski P.K.**, Wickwire K., Wirth M.M., Levine A.S., Giraud S.Q. (2003) *Agouti-related protein: appetite or reward*. Ann. NY Acad. Sci. **994**:187–91.
- Petraglia F.**, Vale W., Rivier C. (1986) *Opioids act centrally to modulate stress-induced decrease in LH in the rat*. Endocrinology **119** : 2445.
- Przala J.**, Kaminski T., Siawrys G., Okrasa S. (1999) *Large luteal cells are the source of immunoreactive β -endorphin in the pig: effects of HCG and TNFA on its secretion by luteal cells in vitro*. Endocr. Regul. **33**: 117-123.

- Quigley M.E.**, Sheehan K.L., Casper R.F., *et al.* (1980) *Evidence for an increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea.* J. Clin. Endocrin. Metab. **50**: 949.
- Rached M.**, El Mourabit H., Buronfosse A., Blondet A., Naville D., Begeot M., Armelle Penhoat A. (2005) *Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells.* Peptides **26** : 1842–1847.
- Raffin-Sanson M.L.**, de Keyzer Y., Bertagna X. (2003) *Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions.* European Journal of Endocrinology **149**: 79-90.
- Reichlin S.**, *et al.* (1993) *Neuroendocrine-immune interactions.* New Engl. J. Med. **329** :1246.
- Reis F.**, Polisseni F. (2004) *Effect of the pre-treatment with prolactin on the distribution of immunoreactive beta-endorphin through different ovarian compartments in immature, superovulated rats.* J. Molecular Histology **35**: 759-764.
- Reame N.E.**, Sauder S.E., Case G.D., *et al.* (1985) *Pulsatile gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea : evidence that reduced frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion is the mechanism of persistent anovulation.* J. Clin. Endocrinol. Metab. **61**: 851.
- Reifenstein E.C. Jr.** (1946) *Psychogenic or "hypothalamic" amenorrhea.* Med. Clin. North Am. **30**:1103.
- Richards J.S.** (1994) *Hormonal control of gene expression in the ovary.* Endocr. Rev. **15**:725–751.
- Richards J.S.**, Fitzpatrick S.L., Clemens J.W., Morris J.K., Alliston T., Sirois J. (1995) *Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones signals and regulated genes.* In: Bardin C.W. (ed.), Recent Progress in Hormone Research. San Diego: Academic Press **50**: 223–254.
- Richards J.S.** (2001) *Perspective: the ovarian follicle— a perspective in 2001.* Endocrinology **142**: 2184–2193.

- Rivier C., Vale W.** (1985) *Effects of corticotropin-releasing factor, neurohypophyseal peptides and catecholamines on pituitary function.* Fed. Proc. **44**: 189.
- Rivier C., Vale W.** (1984) *Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in rats.* Endocrinology **114**: 914.
- Roberts, J.L., Hallelwell R.A., Seeburg P.H., Shine J., Herbert E., Goodman H. M., Baxter J.D.** (1979) *The gene for the precursor to ACTH and β -endorphin: molecular cloning, structure and expression in cultured cells.* Clin. Res. **27**: 506.
- Roumy M, Zajac JM** (2001) *Modulation of calcium conductance by opioid and anti-opioid peptides* J Soc Biol. **95**: 277-83.
- Saffran M., Schally A.V.** (1955) *Release of Corticotropin by anterior pituitary tissue in vitro.* Can. J. Biochem. **33**: 408.
- Sassone-Corsi P.** (1998) *Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM.* Int. J. Biochem. Cell Biol. **30**: 27–38.
- Sciorsci L., Dell'Aquila M., Minoia P.** (2000) *Effects of Naloxone on Calcium Turnover in Cows Affected by Milk Fever.* Immunopharmacol Immunotoxicol. **22**: 575-626.
- Seckl J.R., Fink G.** (1992) *Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo.* Neuroendocrinology **55**: 621-6.
- Selye H.** (1936) *Stress syndrome: a syndrome produced by diverse noxious agents.* Nature **138**: 32.
- Schafer M., Mousa S.A., Stein C.** (1997) *Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation.* European Journal of Pharmacology **323** : 1-10.
- Sialva M.K., Ohannesian J.P., Heiman M.L., et al.** (1996) *Nocturnal rise of Leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects.* J. Clin. Invest. **97**: 1344.

- Spencer C.A.**, Lum S.M.C., Wilber J.F., *et al.* (1983) *Dynamics of serum Thyrotropin and thyroid hormone changes in fasting.* J. Clin. Endocrin. Metab. **56**: 883.
- Stevens V.L.**, Xu T., Lambeth J.D. (1993) *Cholesterol trafficking in steroidogenic cells: reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a presteroidogenic pool.* Eur. J. Biochem. **216**: 557-563.
- Stocco D.M.**, Clark B.J. (1996) *Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells.* Endocr. Rev. **17**(3): 221-244.
- Stocco D.M.**, Clark B.J. (1997) *The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis.* Steroids **62**: 29-39.
- Stocco D.M.** (1997). *A StAR search: implications in controlling steroidogenesis.* Biol. Reprod. **56**: 328-336.
- Suh B.Y.**, Liu J.H., Berga S.L., *et al.* (1988) *Hypercortisolism in patients with functional hypothalamic amenorrhea.* J. Clin. Endocrin. Metab. **66**: 733.
- Thomson M.** (1998) *Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis.* Horm. Metab. Res. **30**: 16-28.
- Van der Kraan M.**, Adan R.A., Entwistle M.L., Gispen W.H., Burbach J.P., Tatro J.B. (1998) *Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands.* Endocrinology **139**: 2348-2355.
- Vitoratos N.**, Papatheodorou D.C., Kalantaridou S.N., Mastorakos G. (2006) *"Reproductive" Corticotropin-Releasing Hormone* Ann. NY Acad. Sci. **1092**: 310-318.
- Wang X.**, Liu S., Eimerl S., Timberg R., Weiss A.H., Orly J., Stocco D.M. (1998) *Effect of truncated forms of steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer.* Endocrinology **139**: 3903-3912.
- Watanabe N.**, *et al.* (1994) *Regulatory mechanism of cAMP-dependent and cell specific expression of steroidogenic P450 SCC (CYP11A1) gene.* Eur. J. Biochem. **222**: 885-834.

- Waterman M.R.** (1995) *A rising StAR: an essential role in cholesterol transport.* Science **267**: 1780-1781.
- Weigent D.A.,** Blalock J.E. (1987) *Interactions between the neuroendocrine and immune systems :common hormones and receptors.* Immunol. Rev. **100**: 79.
- Whitfield P.L.,** Seeburg P.H., Shine J. (1982) *The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence and interspersions with repetitive DNA.* DNA **1**: 133.
- Williams C.L.,** Nishiara M., Thalabard J.C., *et al.* (1990) *Corticotropin-releasing factor and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey.* Neuroendocrinology **52**:133.
- Wildt L.,** Leyendecker G. (1987) *Induction of ovulation by the chronic administration of Naltrexone in hypothalamic amenorrhea.* J. Clin. Endocrin. Metab. **64**: 1334.
- Wikberg J.E.S.** (1999) *Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs.* Eur. J. Pharmacol **375**: 295–310.
- Wolkowitz O.M.,** Reus V.I., Weingartner H., Thompson K., Breier A., Doran A., Rubinow D., Pickar D. (1999) *Treatment of depression with antigluccorticoid drugs.* Psychosom. Med. **61**: 698–711.
- Yalow R.S.,** Berson S.A. (1971) *Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and in extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma.* Biochemical and Biophysical Research Communications **44** : 439–445.
- Yuh K.,** Bill C.H., Keyes P.L. (1984) *Transient development and function of rabbit corpora lutea after hypophysectomy.* Am. J .Physiol. Endocrinol. Metab. **247**: 808-814.
- Zampini D,** Guelfi G, Boiti C *et al.* *Functional expression of nitric oxide synthase in rabbit corpora lutea.* Proc. 189th Meeting of the Society for Endocrinology. London 23-24 November 1998 Journal of Endocrinology **159** Supplement P46 (Abstract).

- Zerani M**, Guelfi G., Zampini D., Gobbetti A., Boiti C. (2000) *Immunolocalisation of NO synthase in rabbit corpora lutea and its activity during prostaglandin-F2 α -induced luteolysis*. Nitric oxide Biology and Chemistry **4**:319, First International Conference “Biology, Chemistry and Therapeutic applications of Nitric Oxide”. San Francisco California USA, June 3-7, 2000.
- Zerani M**, Boiti C, Guelfi G, et al. (2005) *Leptin receptor expression and in vitro leptin actions on prostaglandin release and nitric oxide synthase activity in the rabbit oviduct*. J Endocrinol. May;**185**(2): 319-25.
- Zobel A.W.**, Nickel T., Kunzel H.E., Ackl N., Sonntag A., Ising M., Holsboer F. (2000) *Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated*. J Psychiatr Res **34**: 171–181.