



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE**

**CARATTERIZZAZIONE DEI NEURONI CHE SINTETIZZANO OSSIDO
NITRICO NEL CORPO CALLOSO DEL RATTO**

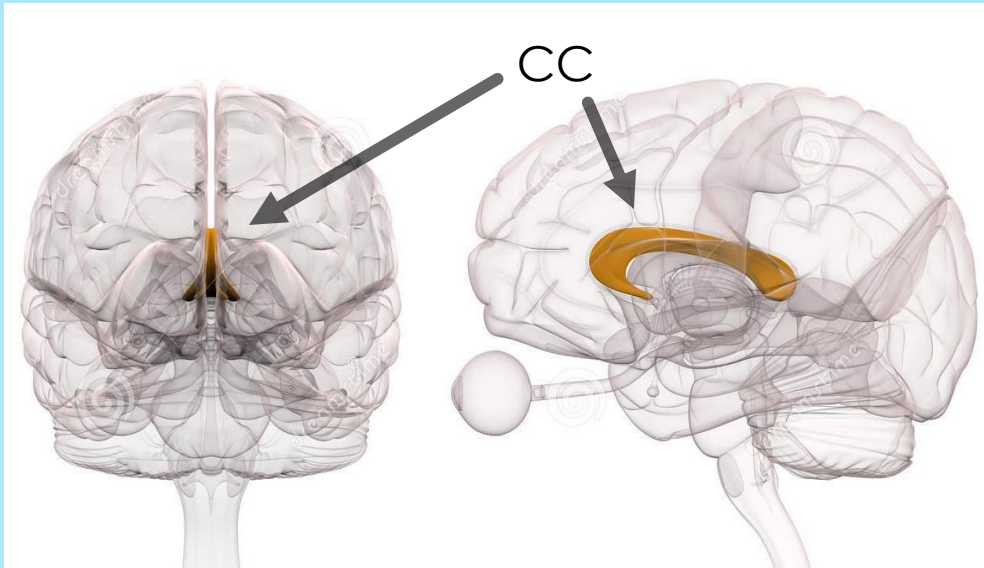
**CHACTERIZATION OF NO-PRODUCING NEURONS IN THE RAT
CORPUS CALLOSUM**

Tesi di Laurea di:
Mirella Maddalena Gorgoglione

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Mara Fabri

**Sessione estiva Luglio 2020
Anno Accademico 2019/2020**

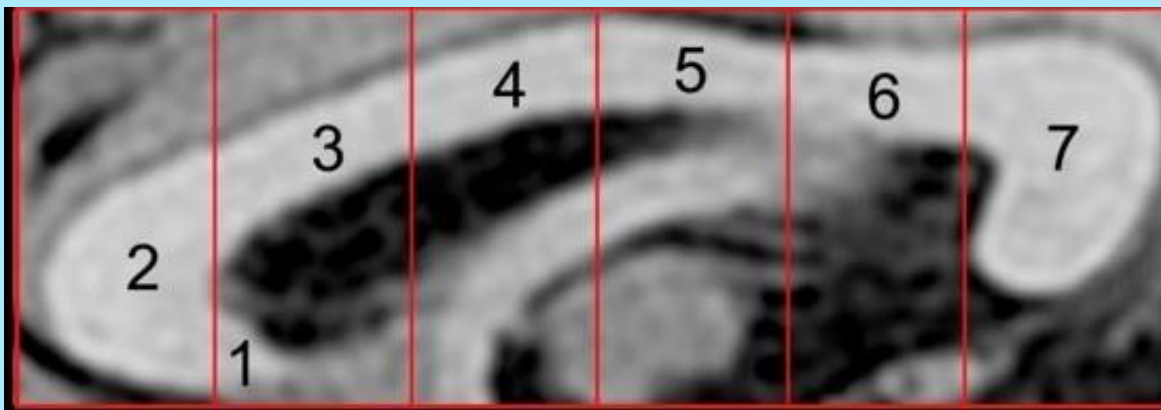
IL **CORPO CALLOSO** È UNA SPESSA LAMINA DI SOSTANZA BIANCA SITUATA SULLA LINEA MEDIANA DEL CERVELLO INTERPOSTA TRA GLI EMISFERI CEBRALI , COSTITUITA DA FASCI DI FIBRE MIELINICHE CHE COLLEGANO I DUE EMISFERI.



Le **FUNZIONI** del corpo calloso (CC) sono:

- ▶ La comunicazione tra gli emisferi cerebrali con il passaggio di informazioni motorie, sensitive e cognitive
- ▶ Mantenere l'equilibrio di eccitazione e di attenzione tra i due emisferi

SUDDIVISIONE del corpo calloso secondo Witelson:

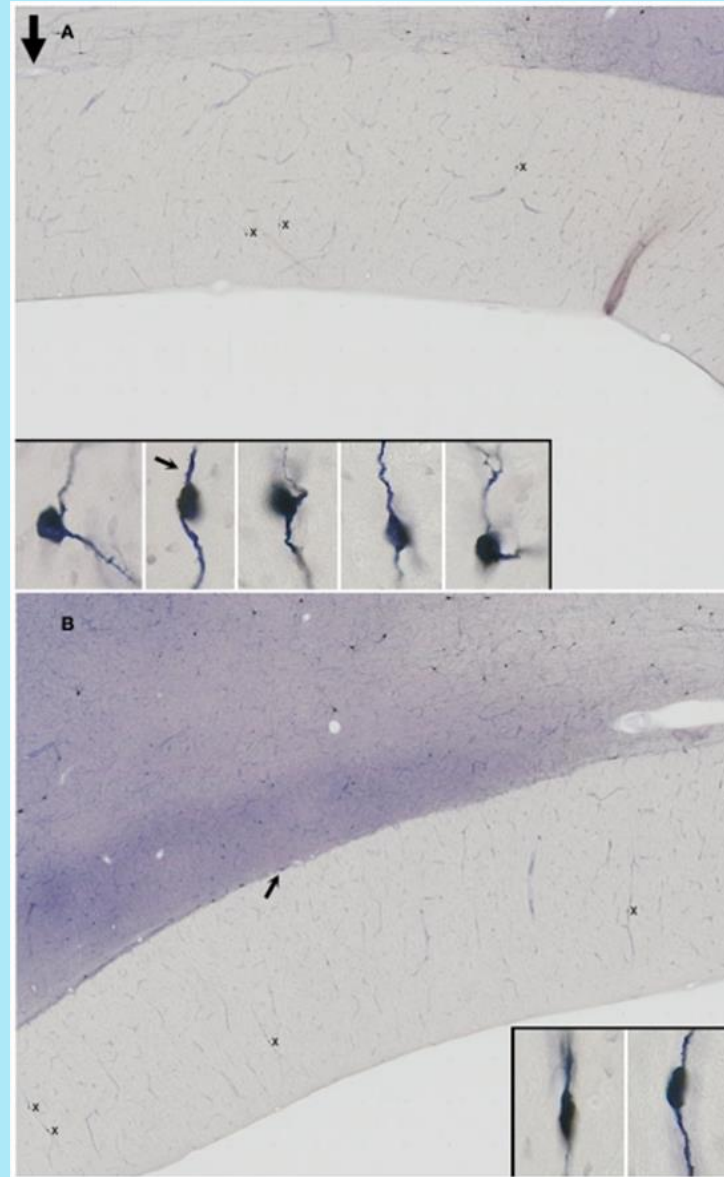


1. ROSTRO
2. GINOCCHIO
3. TRONCO ANTERIORE
4. TRONCO CENTRALE
5. TRONCO POSTERIORE
6. ISTMO
7. SPLENIO

COS'E' L'OSSIDO NITRICO?

L'ossido nitrico (NO) è un mediatore endogeno di processi importanti, come la vasodilatazione e la trasmissione degli impulsi nervosi. Nel nostro organismo la sintesi di questo composto è affidata ad un gruppo di enzimi appartenenti alla famiglia delle ossido nitrico sintetasi (NOS), che utilizzano come substrato l'aminoacido arginina. La sintesi di NO viene stimolata da diversi fattori, come ad esempio il cosiddetto "shear stress", un parametro che misura la forza esercitata dallo scorrimento del sangue sulle pareti dei vasi. Quando la pressione arteriosa aumenta eccessivamente, l'organismo si difende sintetizzando NO che, dilatando le pareti dei vasi, contribuisce all'abbassamento della pressione. Al contrario l'inibizione della sintesi di ossido nitrico determina un aumento delle resistenze periferiche ed un conseguente innalzamento della pressione arteriosa.

Un recente studio ha dimostrato l'esistenza di neuroni che sintetizzano NO nel CC del macaco



Da: Rockland e Nayyar, 2012

Il presente studio è stato condotto sul CC del ratto per ricercare la presenza di neuroni che sintetizzano il NO.

Approcci sperimentali:

- istochimica per evidenziare la diaforasi del dinucleotide nicotinamide-adenine (NADPH-d)
- immunoistochimica per evidenziare l'enzima Ossido Nitrico Sintetasi neurale (nNOS)

SCOPO:

descrivere
la presenza
la distribuzione
il numero
la morfologia

MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 21 ratti maschi adulti albini Sprague - Dawley (peso 250–300 g) la cui cura e manipolazione sono state approvate dal Comitato per il Benessere degli Animali dell'Università Politecnica delle Marche secondo le linee guida del National Institutes of Health.

Metodi di indagine:

- immunoistochimica (ihi) per evidenziare la NADPH-d
- immunocitochimica (icc) per evidenziare l'enzima nNOS
- Immunofluorescenza (if) per evidenziare la proteina fibrillare acida (GFAP), marker degli astrociti

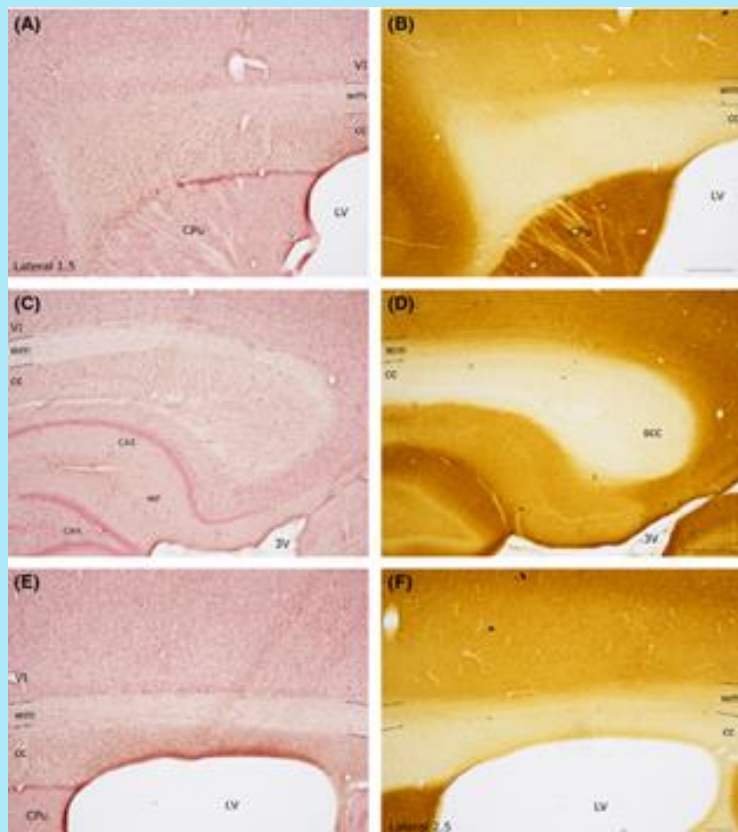
Per visualizzare con chiarezza i confini del CC e distinguerlo dalla sostanza bianca sovrastante sono stati usati metodi di:

- colorazione con Citocromo Ossidasi (CO)
- controcolorazione con Rosso Neutro (RN)

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

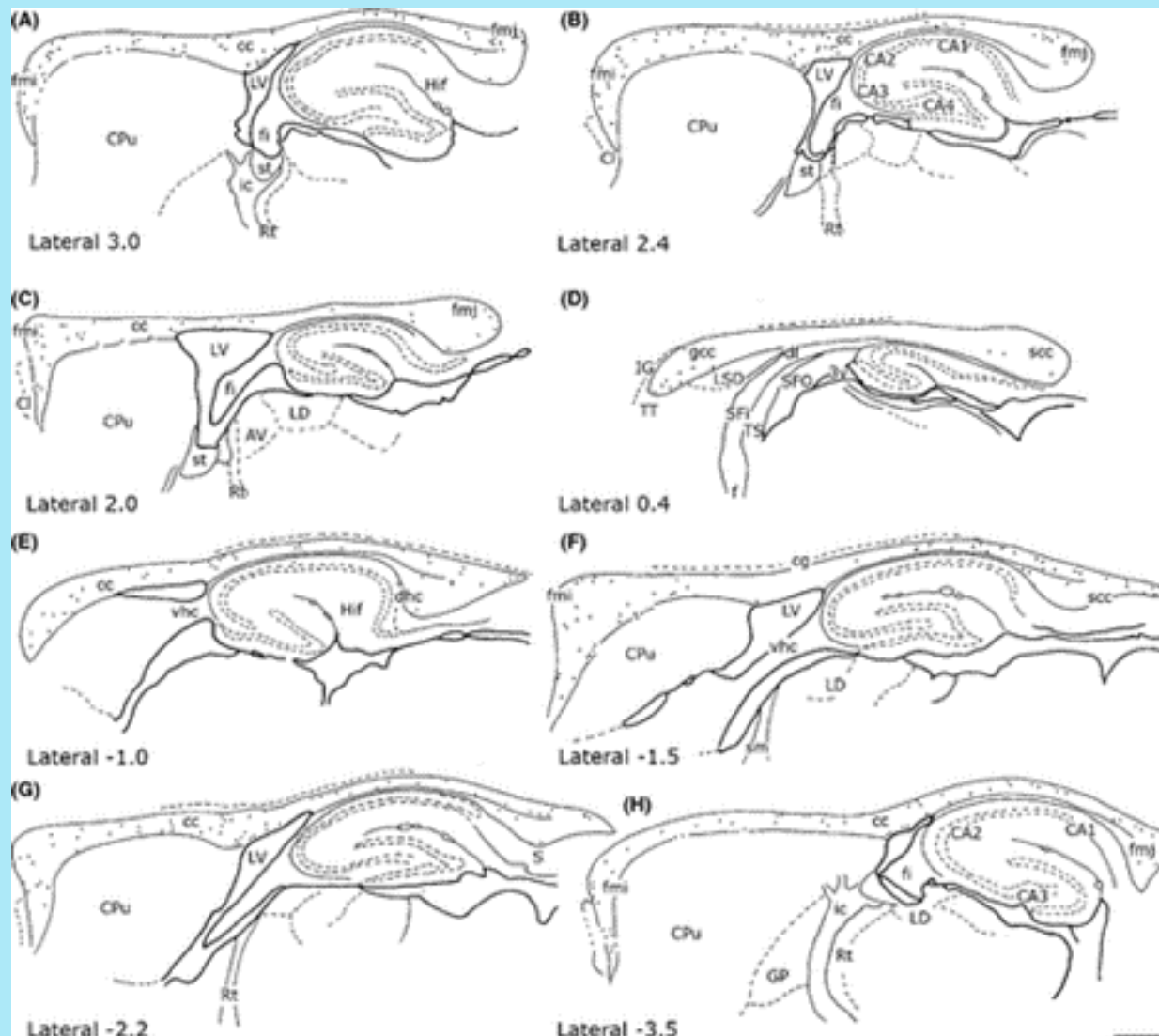
1. I ratti destinati all'esperimento sono stati anestetizzati e perfusi
2. Il cervello è stato rimosso e collocato nel fissativo
3. I cervelli sono stati crioprotetti in una soluzione di saccarosio al 20%, congelati e tagliati nel piano sagittale tramite microtomo scorrevole per ottenere sezioni consecutive di 60 o 40 μm di spessore
4. Alcune sezioni di 60 μm sono state reagite con la NADPH-d e NBT per l'ih, o con un anticorpo anti-nNos per l'icc
5. Le sezioni di 40 μm sono state fatte reagire con la CO o colorate con il RN
6. Sezioni sono state fatte reagire con una miscela di anticorpi anti-GFAP e anti-nNOS, per l'if; gli anticorpi secondari erano coniugati con fluoresceina (FICT) e rodamina (TRICT) per la visualizzazione simultanea al microscopio confocale

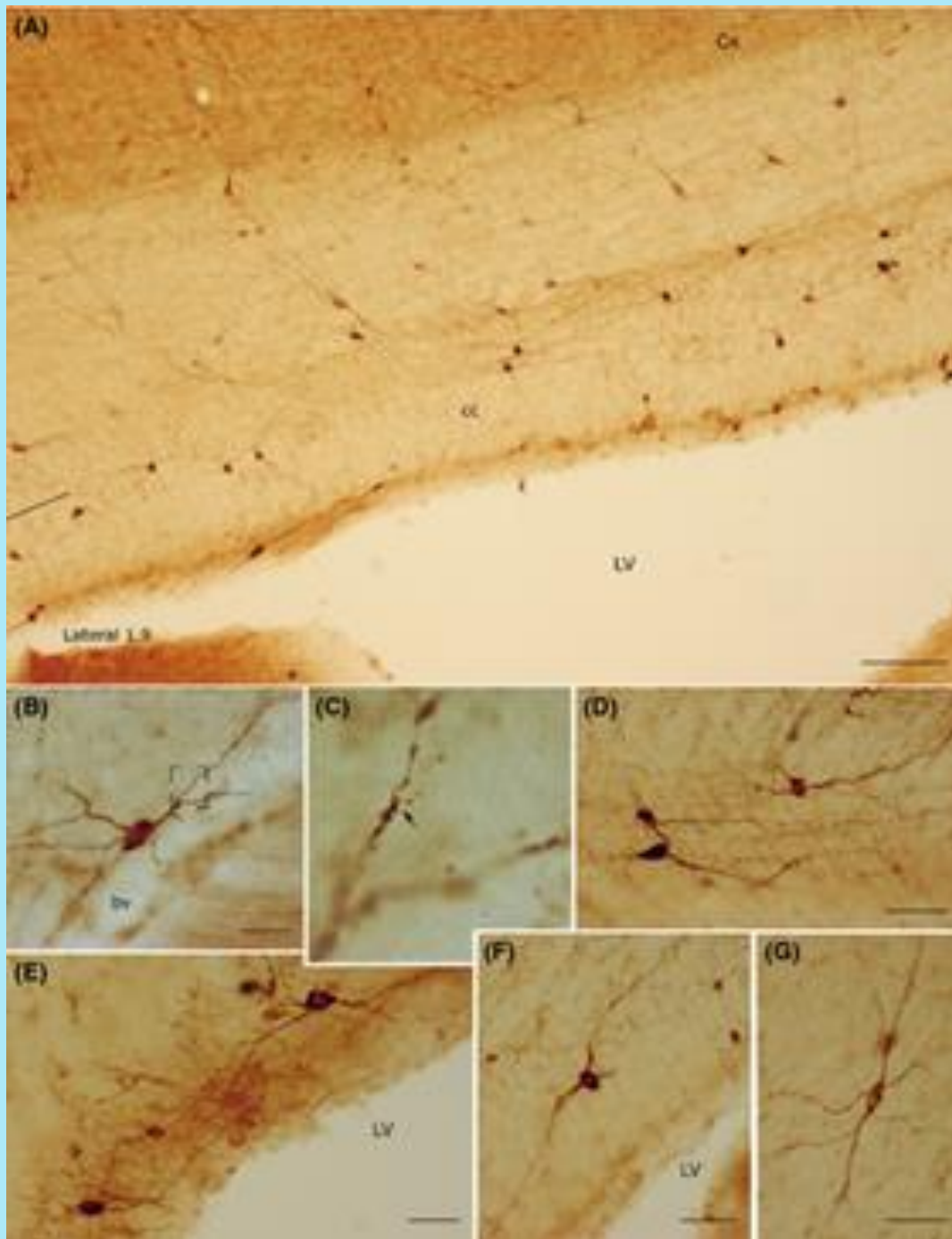
RISULTATI



Con la CO sono stati osservati i **confini** del tessuto nervoso che circonda il CC.

- Numerosi neuroni NADPH d+ ed nNOS sono stati osservati nel CC. La distribuzione è stata studiata tramite osservazione al microscopio ottico e riproduzione con una camera lucida;
- Tali neuroni sono numerosi nelle regioni laterali del CC, e man mano diminuiscono nelle regioni mediali, dove sono pochi o perfino assenti;
- Neuroni NADPH-d+ di varie morfologie emettono fibre che attraversano il CC e si dirigono verso la corteccia cerebrale sovrastante;
- Il corpo cellulare ha una posizione centrale entro i 60 micron di profondità della stessa sezione;
- Gli alberi dendritici sono stati marcati e non hanno presentato discontinuità con i loro corpi cellulari;
- Neuroni NADPH-d+ intracallosi sono vicini ai vasi sanguigni.





I risultati mostrano che:

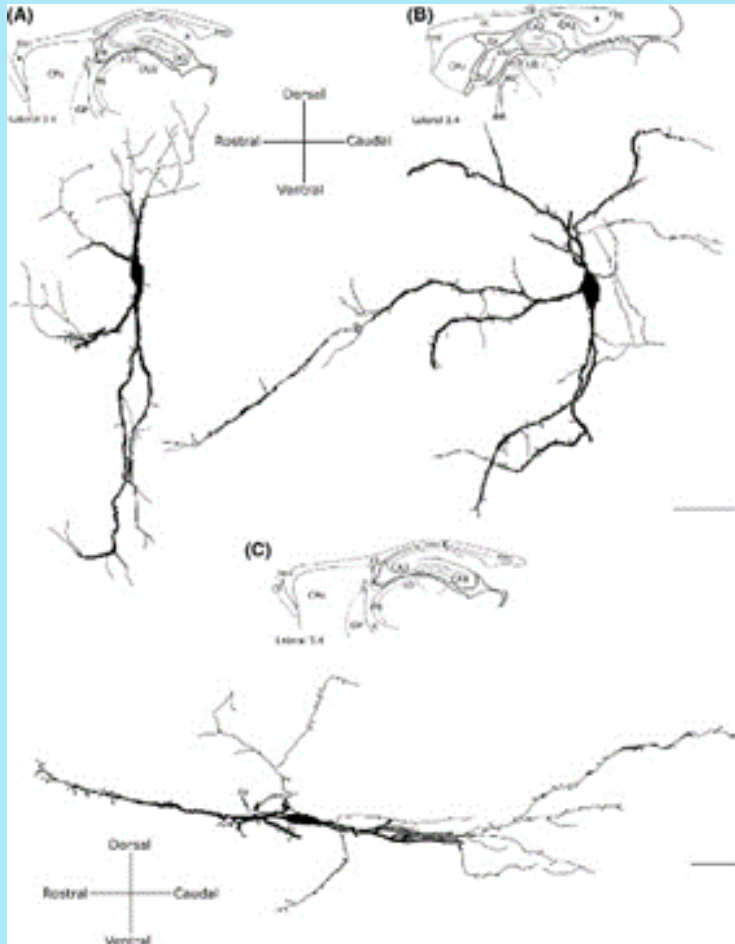
- nel CC ci sono molti neuroni nNOS positivi, più numerosi nella regione laterale e rari nella regione mediale.
- nello splenio, i neuroni si presentano in gruppi isolati o formano un ammasso con altri neuroni.
- nel ginocchio formano un ammasso più grande, situato al confine con il caudato-putatem.
- i dendriti hanno una divergenza verso lo strato 5 della corteccia cerebrale o verso l'ippocampo, secondo la posizione del soma nel CC.
- molti neuroni intracallosi marcati si trovano sopra il ventricolo laterale, ed inviano i loro dendriti nello strato ependimale.

La figura a lato mostra:

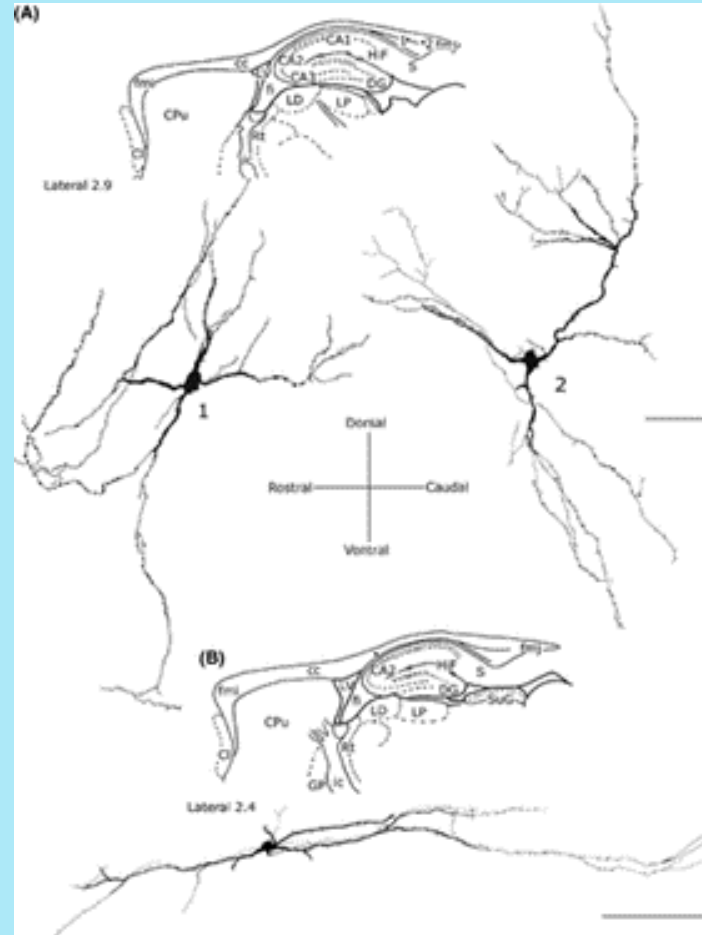
- A) distribuzione dei neuroni nNos
- B) neurone bipolare vicino ad un vaso sanguigno
- C) ingrandimento di un dendrite di B
- D) neurone intracallosale nNOS triangolare e ovoide
- F) neurone nNOS rotondo vicino al ventricolo laterale
- G) neurone intracallosale bipolare nNOS

In relazione alla **morfologia**, i neuroni intracallosi IP NADPH-d+/ NOS sono classificati in:

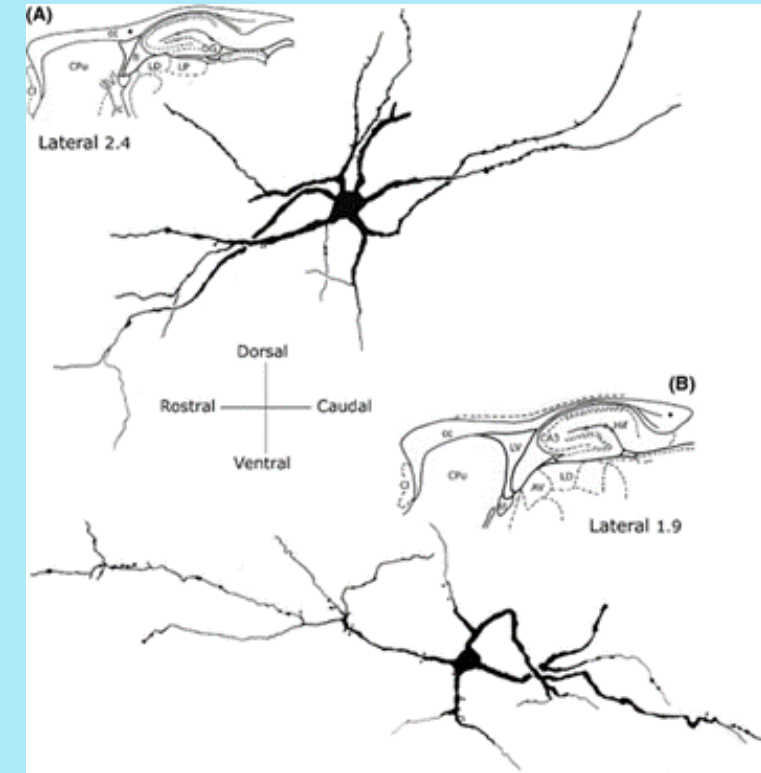
- 1. Neuroni bipolari**, circa il 28,03% suddivisi in due categorie:
- Fusiformi, circa il 24,44%. Questi particolari neuroni sono presenti nell'ependima del ventricolo laterale e sono in contatto con il liquido cerebrospinale.
 - Rettangolari, circa il 3,59%, posti nello splenio con direzione rostro caudale.



- 2. Neuroni rotondi**, 19,73%
Presentano un corpo cellulare rotondo. Sono presenti nel ginocchio e nello splenio.

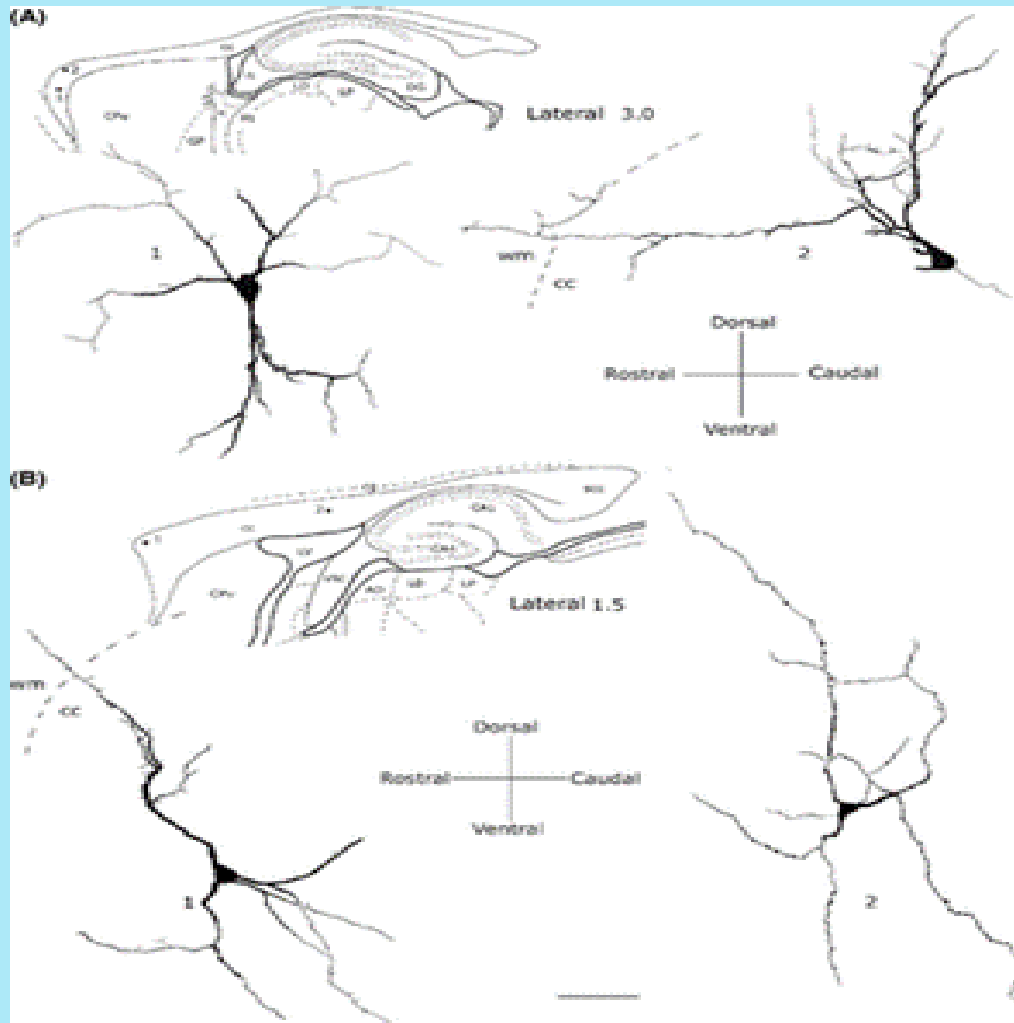


- 3. Neuroni poligonali** (quadrangolari), 43,42%.
Hanno un soma poligonale o quadrangolare, piccolo o grande. Sono considerati le cellule più comuni nel CC.



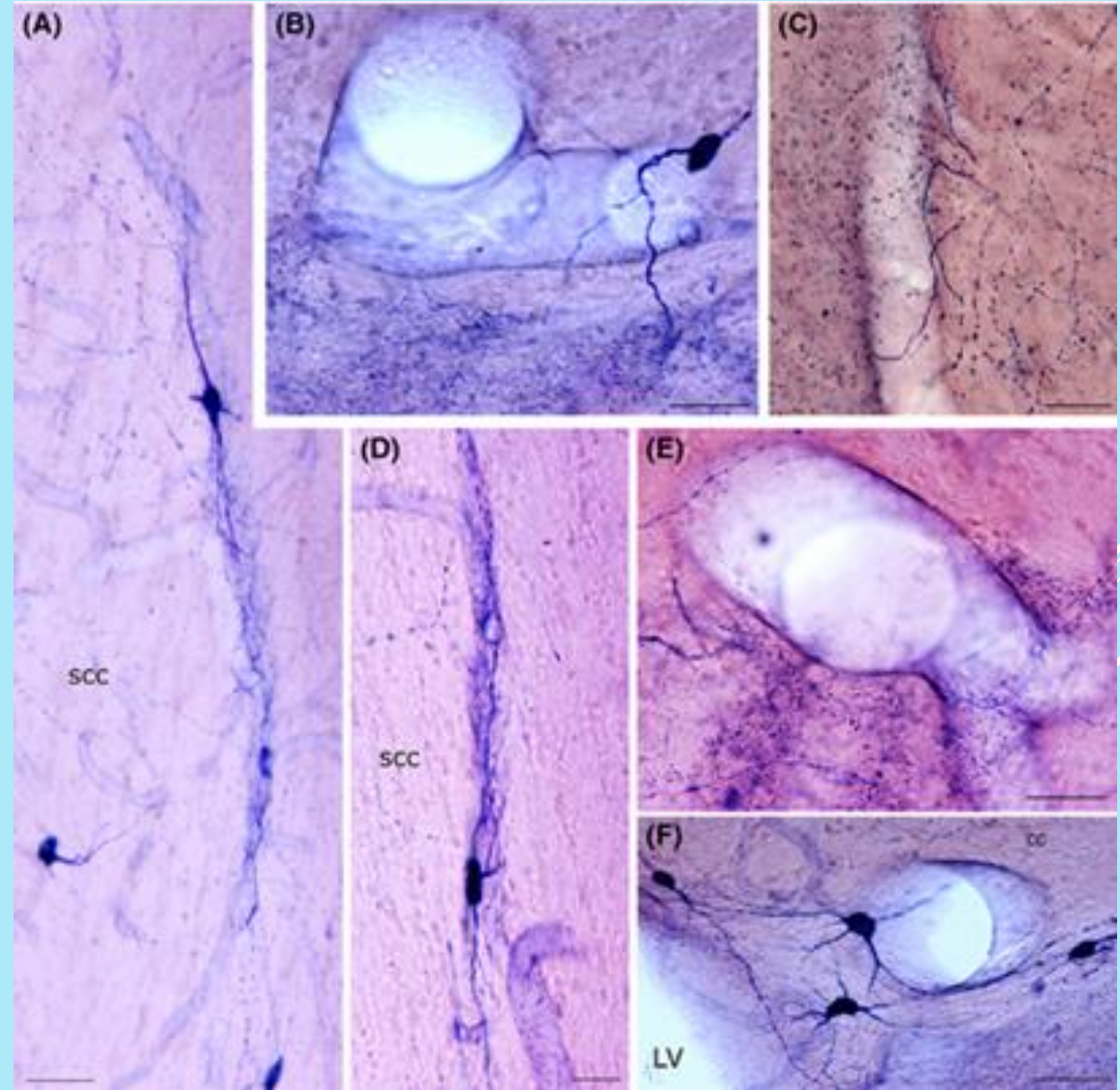
4. Neuroni piramidali triangolari (11,87 % dei neuroni intraCC)

I neuroni piriformi hanno soma a forma di goccia con un dendrite apicale e uno o due dendriti basali spessi. Il dendrite apicale spesso si biforca dopo 25 – 30 micron in due rami spessi. Attraversano tutto il corpo calloso e si dirigono nella sostanza bianca sovrastante. In altri casi sono diretti sul versante ventrale del CC.



5. Neuroni piramidali triangolari (10,49% dei neuroni intra CC)

Le fibre nervose di questa classe di neuroni arrivano nello strato avventizio dei vasi sanguigni. Si è visto che formano reti aggrovigliate. In altri casi sono i margini citoplasmatici ad avvolgere le pareti dei vasi del CC



CONCLUSIONE

- Il CC del ratto contiene una considerevole popolazione di neuroni NADPH-d + / nNOS che ammontano a oltre 2000 cellule intracallosali.
- I neuroni IP NADPH-d + / nNOS mostrano un gradiente latero-mediale, cioè sono più numerosi nelle regioni laterali che in quelle mediali del CC.
- I neuroni IP NADPH-d + / nNOS sono morfologicamente eterogenei.
- Molti neuroni NADPH - d + sono strettamente associati ai vasi sanguigni intracallosali.
- nNOS produce NO dopo la stimolazione dei recettori del glutammato NMDA.
- La loro posizione nelle regioni ependimali del CC e la loro associazione con i vasi sanguigni intracallosali suggerisce un ruolo attivo per loro nella regolazione sia della composizione del liquido cerebrospinale che dei vasi sanguigni intracallosali.
- I cambiamenti emodinamici indotti da compiti motori e visuomotori e dalla stimolazione periferica (Mosier e Bereznaya, 2001; Tettamanti et al., 2002; Omura et al., 2004; Weber et al., 2005; D'Arcy et al., 2006; Mazerolle et al., 2010; Fabri et al., 2011) in specifiche regioni del CC potrebbero essere correlate alla presenza di neuroni intracallosali IP NADPH-d + / nNOS, la cui depolarizzazione potrebbe causare un aumento del flusso sanguigno.

RIASSUNTO ESTESO

Il presente studio ha determinato la presenza, la distribuzione e la morfologia dei neuroni produttori di ossido nitrico nel corpo calloso del ratto.

Recenti studi avevano già descritto i neuroni che producono ossido nitrico nel corpo calloso del macaco.

I Neuroni che producono NO possono essere visualizzati mediante rilevazione immunocitochimica del nNOS . Inoltre, l'attività dell'enzima nNOS può essere valutata usando una colorazione istochimica per l'enzima NADPH-d, che è considerato un NOS neuronale. Sono state quindi utilizzate l'immunocitochimica e l'istochimica per studiare la presenza, la distribuzione e la morfologia dei neuroni produttori di NO nel CC del ratto. Sono stati inoltre eseguiti esperimenti di doppia marcatura con anticorpi fluorescenti combinando l'immunocitochimica per la nNos con con quella per la GFAP.

In tutti i cervelli di ratto, numerosi neuroni nel CC erano positivi per NADPH-d Hi o NOS lcc . Erano abbondanti lungo la dimensione rostrocaudale, ma mostravano variazioni regionali lungo la sua estensione lateromediale. I neuroni IP NADPH - d + / nNOS erano numerosi nelle regioni laterali e diminuivano progressivamente nel cc mediale, dove erano molto pochi o assenti

Talil neuroni presentava no eterogenità moroflogica. Sono stati distinti in: bipolari (fusiformi, rettangolari), rotondi, poligonali (o quadrangolari) e piramidali (triangolari e piriformi). La loro posizione nelle regioni ependimali del CC e la loro associazione con i vasi sanguigni intracallosali suggerisce un ruolo attivo nella regolazione sia della composizione del liquido cerebrospinale che dei vasi sanguigni intracallosali.