



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Neuroni nNOS positivi nel corpo calloso umano: studio immunoistochimico
nNOS positive neurons in the human corpus callosum: immunohistochemical study

Tesi di Laurea di:
Lorenza Tamberi

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Mara Fabri

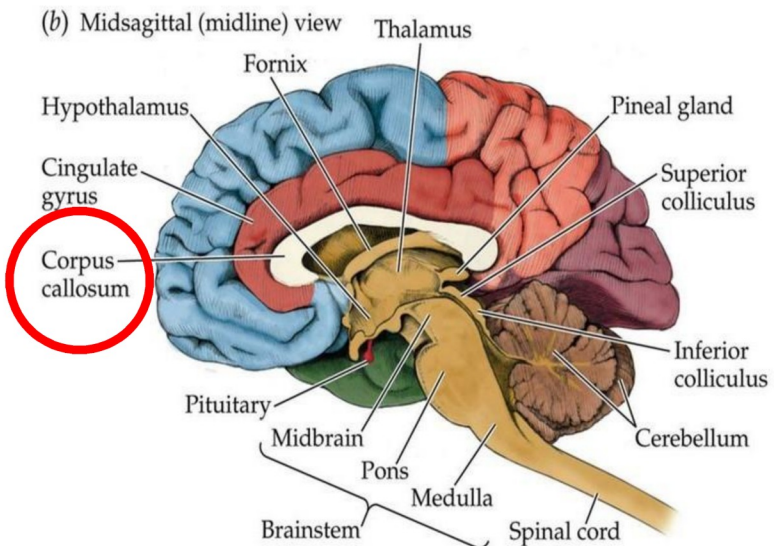
Correlatore
Chiar.ma Dott.ssa Teresa Lorenzi

Sessione Estiva Luglio 2019
Anno Accademico 2018/2019

L'ossido nitrico (NO) è un gas molto diffuso negli animali, nei quali svolge funzione di neurotrasmettitore con effetto vasodilatatore.

Nel sistema nervoso è presente in molte strutture, ed in particolare, recentemente, è stata dimostrata la sua presenza in neuroni del corpo calloso della scimmia [1] e del ratto [2]

Internal Structures of the Brain



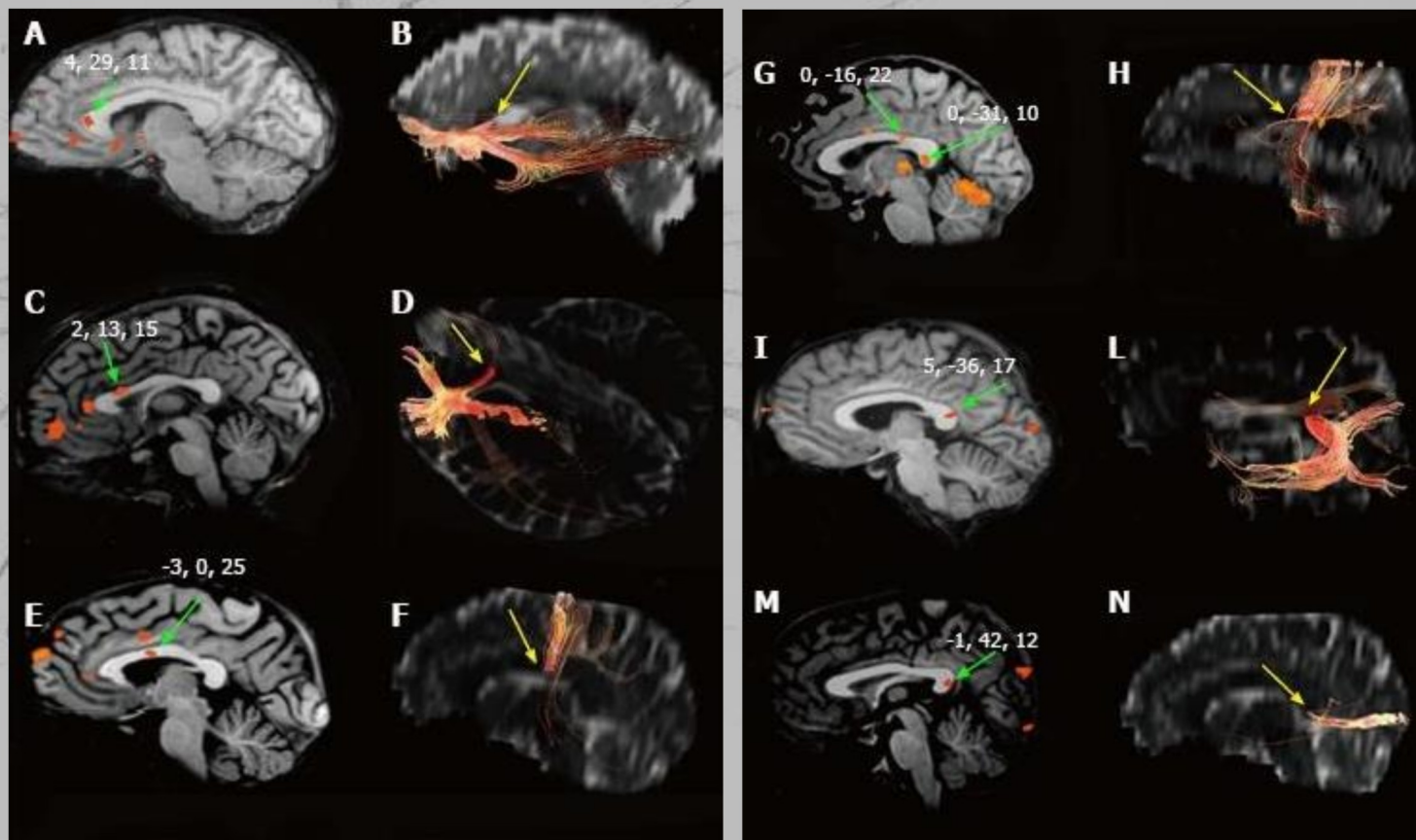
- **IL CORPO CALLOSO** è una struttura costituita da **SOSTANZA BIANCA** che connette gli emisferi cerebrali ed è deputata al trasferimento e all'integrazione delle informazioni tra i due emisferi.

[1] Rockland e Nayyar, *Front Neural Circuits* (2012) doi: 10.3389/fncir.2012.00004.

[2] Barbaresi et al., *Brain and Behavior* **4(3)** (2014) 317-336

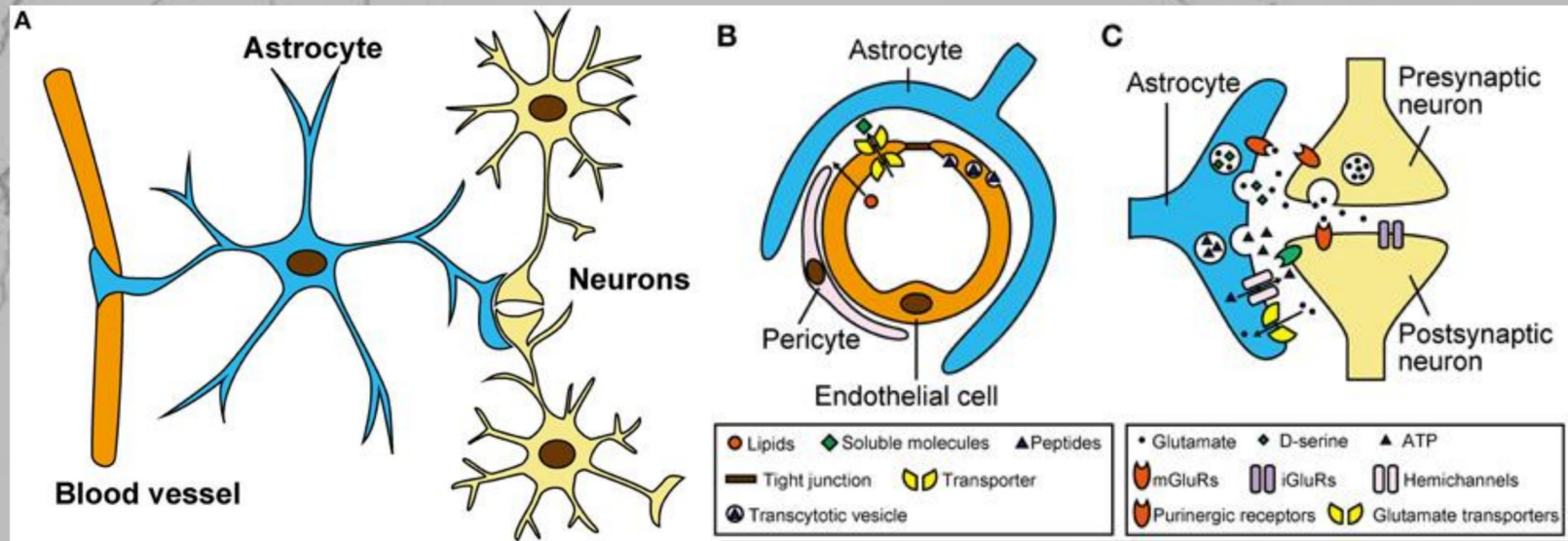
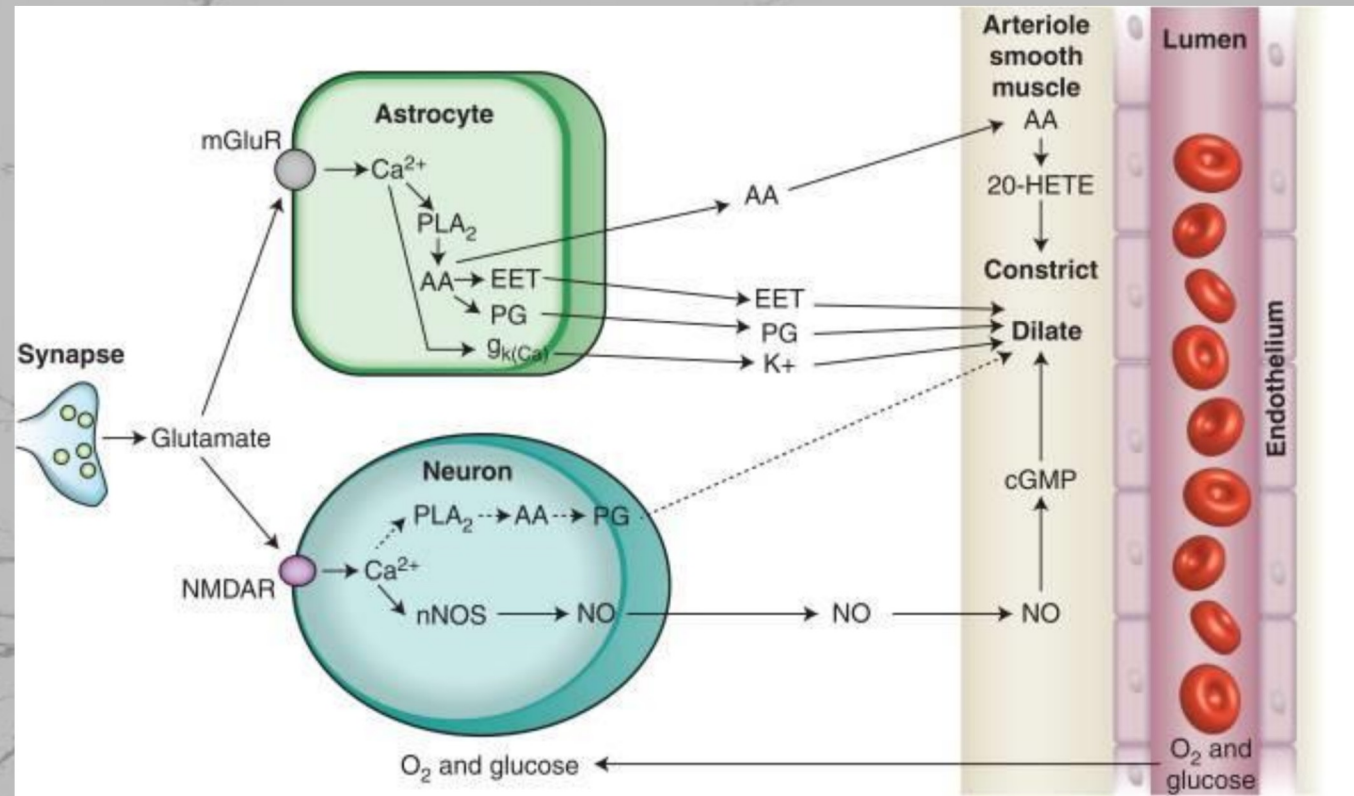
Precedenti studi svolti mediante l'utilizzo della Risonanza Magnetica Funzionale (fMRI) hanno rilevato la presenza dell'effetto BOLD (blood oxygen level dependent) nel corpo calloso, che indicava un'attivazione della sostanza bianca (il CC) in seguito a differenti stimoli [3].

- **L'effetto BOLD** è l'aumento del flusso sanguigno nei vasi che si trovano in prossimità di neuroni attivi.



IPOSTESI:

- **Fibre callosali glutamatergiche** di origine corticale prendono contatto con i neuroni nNOS nel CC
- Neuroni nNOS attivati dalle fibre callosali rilasciano **OSSIDO NITRICO (NO)**
- L'ossido nitrico induce **VASODILATAZIONE**
- La vasodilatazione determina l'**AUMENTO DEL FLUSSO EMATICO**
- **Effetto BOLD** nel CC



LO STUDIO:

Abbiamo studiato la composizione neurale e gliale del corpo calloso, per determinare la natura neurochimica dei suoi elementi, e le loro relazioni con le cellule dell'endotelio dei vasi sanguigni. Abbiamo svolto, parallelamente, studi immunohistochimici su:

- Campioni di **CORPO CALLOSO UMANO** derivati da reperti autoptici.



Suddivisione del corpo calloso secondo Witelson: 1. Rostro; 2. Ginocchio; 3. Tronco anteriore; 4. Tronco centrale; 5. Tronco posteriore; 6. Istmo; 7. Splenio

Trattamento dei campioni (ginocchio e rostro)

1) LA FISSAZIONE

Formalina 10%, Paraformaldeide al 4%
a 4°C.

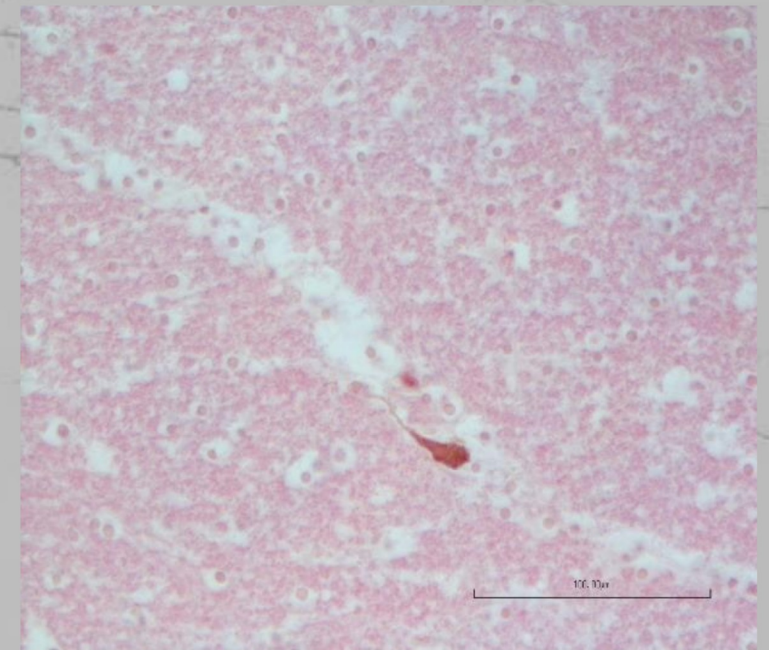
2) INCLUSIONE

Disidratazione, trattamento con xilene, preparazione del
blocchetto in paraffina.

3) TAGLIO AL MICROTOMO


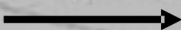

- Sezioni sagittali seriate di **3 μ m** -> continuità degli
elementi del tessuto.
- Sezioni sagittali di **12 μ m** e **15 μ m** -> morfologia
dell'intera cellula neuronale.

Alcune sezioni sono state colorate con **ematossilina/eosina**
per controllare lo stato e la qualità del tessuto.



4) REAZIONE DI IMMUNOISTOCHEMICA

In questi studi abbiamo usato tre diversi tipi di anticorpi:

- 1. Anti-nNOS** che lega i neuroni nNOS positivi, quindi che possiedono l'enzima ossido nitrico sintasi neuronale.  Per individuare **nel corpo calloso** le cellule contenenti l'enzima.
- 2. Anti-neuN**, che si lega in modo specifico ai nuclei dei neuroni maturi  Per individuare i **neuroni nel corpo calloso**.
- 3. Anti-GFAP** (glial fibrillary acid protein), marker specifico per gli astrociti.  Per studiare la **componente gliale astrocitaria**.

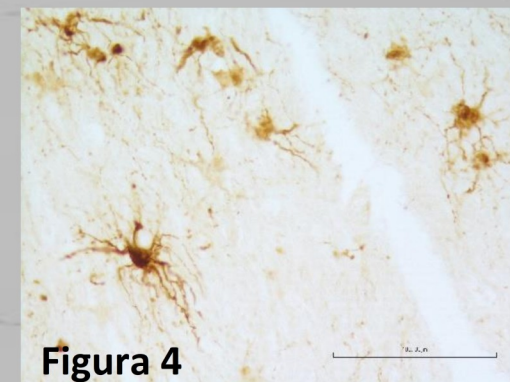
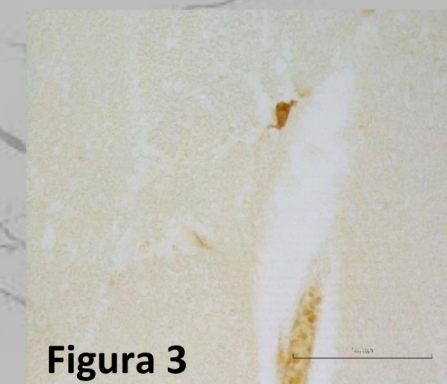
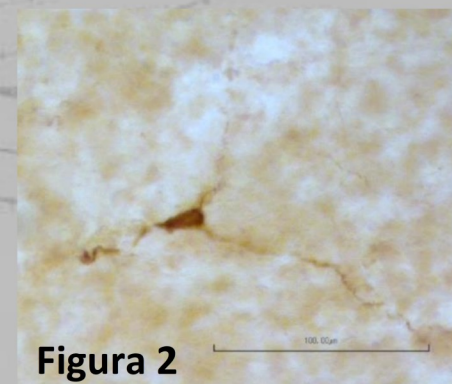
Ihc convenzionale mediante reazione colorimetrica (DAB) per l'osservazione di elementi single-labeled al **microscopio ottico**.

Ihc con anticorpi secondari fluorescenti per l'osservazione di elementi double-labeled al **microscopio confocale**.

RISULTATI:

Nei campioni sono stati evidenziati diversi elementi positivi al nNOS:

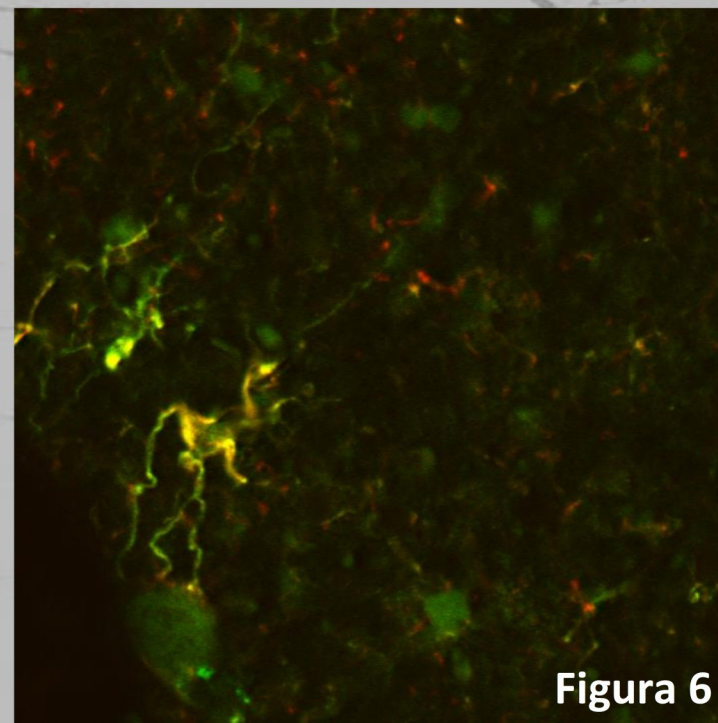
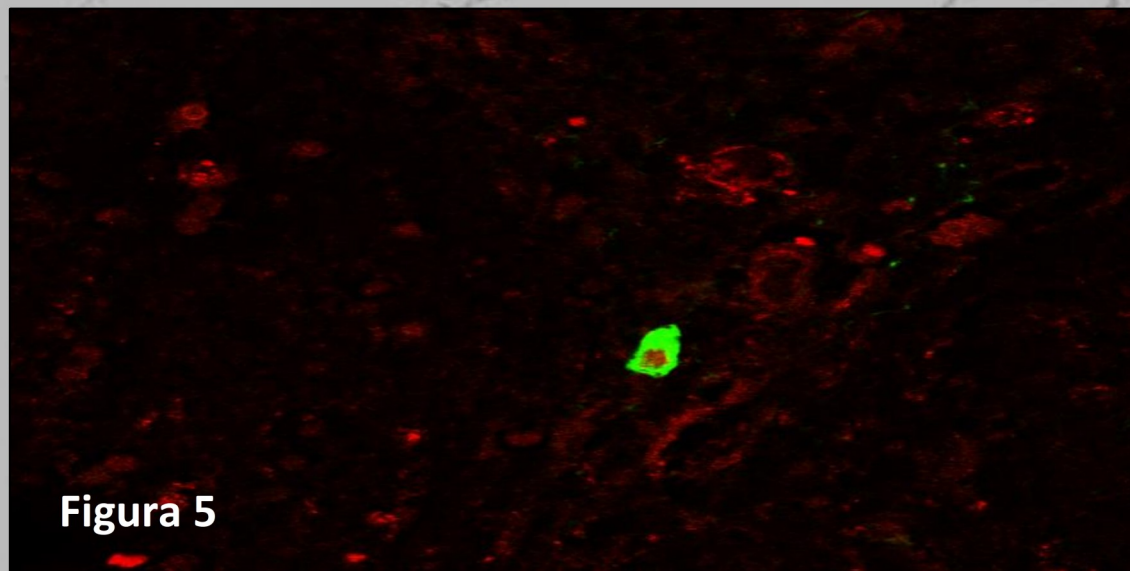
1. **Fibre** che attraversano il corpo calloso (Figura 1)
2. Cellule con morfologia riconducibile a quella dei **neuroni**, presenti soprattutto nelle regioni marginali del CC, con prolungamenti decorrenti molto vicino a piccoli vasi (Figure 2 e 3)
3. Cellule con morfologia riconducibile a quella degli **astrociti** (Figura 4)



Con la tecnica di doppia marcatura si è visto che:

➤ Le cellule **nNOS** positive assimilabili ai neuroni sono risultate positive anche al **Neun**. Tali cellule sono quindi neuroni (Figura 5)

➤ Le cellule **nNOS** positive riconducibili agli astrociti si sono dimostrate positive anche al **GFAP**. Esse quindi sono astrociti (Figura 6)





RIASSUNTO ESTESO

Avendo riscontrato un effetto BOLD nel Corpo Calloso umano in studi di stimolazione sensoriale condotti durante analisi fMRI, si è ipotizzata la presenza di cellule nNOS positive in questa commessura cerebrale.

Dopo attivazione da parte delle fibre callosali di origine corticali, le cellule nNOS positive probabilmente sintetizzano e rilasciano ossido nitrico, neurotrasmettitore che va ad indurre vasodilatazione e quindi aumento del flusso ematico locale nelle regioni attive dell'encefalo.

La presenza di questi elementi nel CC è stata verificata mediante reazioni di immunohistochimica, utilizzando tre diversi anticorpi:

Anti-nNOS, specifico per cellule che sintetizzano e rilasciano NO;

Anti-Neun, specifico per i neuroni;

Anti-GFAP, specifico per gli astrociti.

Al momento, nel corpo calloso umano sono state osservate cellule nNOS positive che sono riconducibili a neuroni e astrociti, ma sono necessarie ulteriori analisi per definirne le specifiche modalità di attivazione.