

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**



**Dottorato di Ricerca in**

**BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN  
MEDICINA VETERINARIA  
XIX Ciclo (2003-04/2005-06)**

Tesi Sperimentale:

**Diossina e sviluppo dell'encefalo.  
Alterazioni strutturali e neurochimiche nel topo e nella pecora.**

Coordinatore e Tutore  
Chiar.mo Prof. Giuseppe Paino

Candidata  
Dott.ssa Pratibha Mahadeo Mithbaokar



# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	1
<b>ABBREVIAZIONI</b>	3
<b>INTRODUZIONE</b>	7
1. Meccanismi d'azione molecolari della diossina	7
2. Effetti della diossina sul cervello	10
3. Effetti della diossina sullo sviluppo del cervello	13
4. Sistema serotoninergico	16
5. Recettore	21
6. Trasportatore della serotonina	22
<b>MATERIALI E METODI</b>	24
1. Studi su topo	24
2. Studi sulla pecora	26
3. Istologia	27
4. Procedure di Immunoistologia	27
5. Osservazioni su topo	28
6. Gli studi con microscopio ottico e le osservazioni	28
<b>RISULTATI</b>	29
<b>Cervello di topo</b>	
1. Morfologia	29
2. Istologia	30
3. Immunohistologia della serotonina	31
Cervello di topo adulto	31
Cervello neonatale (P6, P24, P21)	33
4. Immunoistologia del recettore della serotonina (5HT- <sub>1A</sub> )	37
Cervello di topo adulto	37
Cervello neonatale (P6, P24, P21)	38
5. Immunoistologia del trasportatore della serotonina (SERT)	42
Cervello di topo adulto	42
Cervello neonatale (P6, P24, P21)	44

## **Cervello di pecora**

6. Istologia e immunoistologia della serotonina:	46
Cervello della pecora adulta	46
Cervello della pecora neonata	48
7. Immunoistologia del recettore della serotonina 5-HT1A	50
Cervello della pecora adulta	50
Cervello della pecora neonata	52
8. Immunoistologia del trasportatore della serotonina SERT	54
Cervello della pecora adulta	54
Cervello della pecora neonata	55
<b>DISCUSSIONE</b>	56
<b>CONCLUSIONI</b>	64
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	65
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	71



## ABSTRACT

La contaminazione da diossina è un grave problema agro-zootecnologico nelle zone maggiormente industrializzate del mondo e, in particolare, in Regione Campania (Italia). In realtà, la via principale di contaminazione nell'uomo passa attraverso la catena alimentare, e i prodotti di origine animale rappresentano il 90% dell'esposizione totale.

Per comprendere i meccanismi cellulari dell'azione della diossina sul cervello, nel presente lavoro abbiamo studiato gli effetti della diossina nel cervello sia adulto sia in fase di sviluppo del topo e della pecora. In particolare, abbiamo studiato le anomalie istologiche e le alterazioni del sistema di trasmissione neurale legato al neurotrasmettitore serotonina, investigando con metodi istologici ed immunohistologici l'espressione della serotonina, del suo recettore 5-HT<sub>1A</sub> e del suo trasportatore (SERT).

Femmine adulte di topo del ceppo Swiss Mouse CD1 sono state trattate i.p. con 5 o 10 µg/kg di TCDD, sospesa in olio di arachidi, per 14 giorni. I gruppi di controllo sono stati trattati con placebo: olio di arachidi. Le femmine trattate sono state fatte accoppiare con maschi non trattati e la loro prole è stata studiata al 6<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> giorno postpartum (pp). I cervelli neonatali sono stati studiati tramite procedure istologiche ed immunohistologiche per l'espressione della serotonina, del suo recettore 5-HT<sub>1A</sub> e del suo trasportatore.

Le pecore di controllo sono state allevate in Provincia di Avellino e pecore esposte alla diossina ambientale provenienti da Acerra (provincia di Napoli). Cervelli di femmine adulte di pecora (di circa 3 anni) furono studiati tramite procedure istologiche ed immunohistologiche per l'espressione della serotonina e del suo trasportatore (SERT).

Sebbene non induca importanti anomalie morfologiche, l'esposizione alla diossina provoca alterazioni istologiche nel cervello adulto. Nel cervello in fase di sviluppo, essa induce anche alterazioni morfologiche, come evidenziato da diminuite dimensioni del cervello. La diossina provoca gravi condizioni patologiche sia nel topo sia nella pecora, come dimostrato dalla presenza di cellule degenerate in diverse regioni cerebrali e di notevoli formazioni vacuolari sia nei topi sia, e più gravemente, nelle pecore.

Il sistema di trasmissione della serotonina è gravemente alterato nei cervelli adulti e neonatali. La diossina svuota i neuroni serotoninergici di serotonina sia nel topo, adulto e in fase di sviluppo, sia nella pecora. Alterazioni sottili delle fibre serotoninergiche, del recettore 5-HT<sub>1A</sub> e del trasportatore della serotonina nelle strutture limbiche potrebbero essere l'origine di alterazioni nelle capacità affettive, emotive e cognitive dell'animale. Alterazioni gravi presentate dal sistema serotoninergico in strutture quali, medulla, pons e cervelletto potrebbero dare delle

indicazioni sul meccanismo soggiacente le alterazioni comportamentali, come le difficoltà motorie, presentate dagli animali esposti alla diossina.

Perciò, i risultati sui modelli animali qui riportati potrebbero richiedere l'attenzione della comunità clinica e dei ricercatori impegnati nello studio e nella cura dei problemi legati alla diossina e alle malattie connesse alla serotonina.

## ABBREVIAZIONI

### Gruppi sperimentali:

- O - controllo-animale trattati con olio
- D1 - animale trattati con diossina (5µg/kg)
- D2 - animale trattati con diossina (10µg/kg)
- CA - Controllo Adulto di pecora
- DA - Adulto di pecora esposto a Diossina
- CN - Controllo Neonato di pecora
- DN - Neonato di pecora esposto a Diossina
- E - Stadio embrionale
- P - Stadio postnatale
- i.p. - intra peritoneale

### Regioni di cervello (secondo a Paxinos e Franklin 2001)

- 8vn - vestibular root vestibulocochlear nucleus
- 12 N - hypoglossal nucleus
- Amb - ambiguus nucleus
- BLA - basolateral amygdala nucleus, anterior
- BLP - basolateral amygdala nucleus, posterior
- CA1 - CA1 field of Cornu ammonis
- CA2 - CA2 field of Cornu ammonis
- CA3 - CA3 field of Cornu ammonis
- Cg - cingulum
- cic - commissure of inferior colliculus
- CIC - central nucleus of inferior colliculus
- cp - cerebral peduncle
- Cpu - Caudate putamen
- Cu - Cuneate nucleus
- D3V - dorsal 3<sup>rd</sup> ventricle
- DC - dorsal cochlear nucleus
- DCIC - dorsal cortex of inferior colliculus
- DG - Dentate Gyrus
- Dhc - Dorsal hippocampal commissure



DMTg - dorsomedial tegmental area  
DPGi - dorsal paragigantocellular nucleus  
DRI - Dorsal raphe nucleus interfascicular part  
ECIC - external cortex of inferior colliculus  
f - fornix  
fi - fimbria of hippocampus  
Gem - geminal hypothalamic nucleus  
Gi - gigantocellular reticular nucleus  
GiA - gigantocellular reticular nucleus, alpha part  
GiV - gigantocellular reticular nucleus ventral part  
GV - Geniculate nucleus  
Hbc - habenular commissure  
Hi - hilus  
Hn - Habenular nucleus  
ic - internal capsule  
IC- Inferior Colliculus  
Icp - inferior cerebellar peduncle  
IO - inferior olive nucleus  
IntP - interposed cerebellar nucleus, posterior part  
LaDL - lateral Amygdala nucleus, dorsolateral part  
LaVL - lateral Amygdala nucleus, ventrolateral part  
LDTg - laterodorsal tegmental nucleus  
LDTgV - laterodorsal tegmental nucleus, ventral  
LEnt - Lateral Entorhinal cortex  
LO - lateral orbital cortex  
LPB - lateral parabrachial nucleus  
Ml - primary motor cortex  
m5 - motor root of 5n  
mcp - middle cerebellar peduncle  
mcP - middle cerebellar peduncle  
Med - medial fastigial cerebellar nucleus  
MeDL - medial cerebellum nucleus dorsolateral protuberance  
MEnt - Medial Entorhinal cortex  
MG - medial geniculate body

ml - medial lemniscus  
MNR - median raphe nucleus  
MO - medial orbital cortex  
Mo5 - motor trigeminal nucleus  
MPB - medial parabrachial nucleus  
Mt - mammillothalamic tract  
Mtu - medial tuberal nucleus  
Opt - optical tract  
PFI- paraflocculus  
Pir - pyriform cortex  
PMnR - paramedian raphe nucleus  
Pn - pontine nuclei  
PnC - pontine reticular nucleus, caudal  
PnO - pontine reticular nucleus, oral part  
Po - posterior thalamic nuclear group  
Pr5 - principal sensory trigeminal nucleus  
PRh - perirhinal cortex  
Pv - periventricular fiber system  
py - pyramidal tract  
R - Red Nucleus  
RMg - raphe magnus nucleus  
Rob - raphe obscurus nucleus  
Rpa - Raphe pallidus nucleus  
RPO - rostral periolivary region  
rs - rubrospinal tract  
RSA - retrosplenial agranular cortex  
RSG - retrosplenial granular cortex  
Rt - Reticular thalamic nucleus  
S1- primary somatosensory cortex  
s5 - sensory root of the trigeminal nerve  
S1BF - somatosensory area  
SolC - nucleus of solitary tract, commissural part  
solDM - nucleus of the solitary tract, dorsomedial part  
solM - nucleus of the solitary tract, medial part

solL - nucleus of the solitary tract, lateral part  
sox - suproptic decussation  
sp5 - spinal trigeminal tract  
Sp5c - spinal 5 nucleus, caudal part  
STh - subthalamic nucleus  
SubCV - subcoeruleus nucleus, ventral part  
Tz - nucleus of the trapezoid body  
V2L - secondary visual cortex, lateral area  
VCA - ventral cochlear nucleus anterior part  
VCP - ventral cochlear nucleus, posterior part  
VLGPC - ventral lateral geniculate nucleus, parvocellular part  
VLL - ventral nucleus of lateral lemniscus  
VLTg - ventrolateral tegmental area  
VM - ventromedial thalamic nucleus  
VPL - ventral posterolateral thalamic nucleus  
VPM - ventral posteromedial thalamic nucleus  
Vsc - ventral spinocerebellar tract  
VTA - Ventral Tegmental Area  
VTg - ventral tegmental nucleus  
xscp - decussation superior Cerebellar peduncle  
ZI - zona incerta

# INTRODUZIONE

Idrocarburi alogenati aromatici (Halogenated aromatic hydrocarbons-HAH) come le policlorodibenzo-*p*-diossine (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins - PCDD) ed altre sostanze chimiche strutturalmente simili sono inquinanti ambientali anche a basse concentrazioni (ng-pg/gm). Comunemente note come diossine, si formano, come prodotti secondari indesiderati, durante vari processi termici come l'incenerimento di rifiuti municipali, nelle industrie metallurgiche e durante alcuni processi di combustione di composti chimici contenenti il cloro (Kuratsune 1989). Questi inquinanti (costituiscono da anni argomento di ricerca) sono diventati un punto di attenzione per i ricercatori, per la loro potente tossicità ed i vari effetti biologici che producono. I congeneri bifenili policlorurati (polychlorinated biphenyls - PCB) sono noti come neurotossine con effetti comportamentali e neurochimici (Tilson et al. 1979; Rogan et al. 1986). Tra le diossine, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina (TCDD-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) rappresenta il congenere più tossico della famiglia di HAH ed è un composto modello per le indagini sperimentali. Negli animali, la TCDD induce una vasta gamma di cambiamenti biochimici, metabolici e morfologici. La TCDD è cancerogena (IARC-International Agency for Research on Cancer, 1997) e teratogena ma l'effetto più significativo della TCDD, negli animali da laboratorio, è la sua tossicità estrema e specifica per la specie ed il ceppo. Per esempio, è stata osservata la differenza di 1000 volte nel ratto e 10 volte nel topo. (Unkila et al. 1994). In animali esposti ad alti dosaggi di TCDD, una drammatica perdita di peso corporeo, dovuta ad ipofagia, precede la morte. Le altre manifestazioni tossiche indotte da TCDD sono atrofia del timo, immunosoppressione, inoltre è un distruttore endocrino che agisce su ghiandole come la tiroide, il surrene, l'ipofisi e le gonadi.

E' necessario comprendere i meccanismi d'azione molecolari della diossina per conoscere il meccanismo di tossicità e le sue azioni a livello cellulare e tissutale.

## 1. Meccanismi d'azione molecolari della diossina

### 1a. Recettore Arilico

Non sono ancora completamente chiari i meccanismi con cui la TCDD induce tossicità. Gli effetti di TCDD si esplicano nell'induzione epatica di geni che codificano per un gruppo di enzimi metabolizzanti gli xenobiotici (vedi Mandal 2005) e, in genere, si suppone che la maggior parte, ma non tutti, gli effetti della diossina sono mediati dal recettore arilico (AhR), proteina presente nel citoplasma. Quando una molecola di TCDD entra la cellula, si lega al recettore

arilico (Poland and Knutson 1982). Il legame trasforma il recettore nella sua forma funzionale che lega il DNA (Henry and Gasiewicz 1993). Il complesso trasformato ligando-recettore arilico trasloca nel nucleo, dove si lega fortemente al DNA. Essenziali per il legame al DNA sono il traslocatore nucleare per il recettore arilico (Ah receptor nuclear translocator - Arnt) e la fosforilazione mediante proteina chinasi C. Si presume che l'associazione di Arnt al complesso ligando-recettore AhR possa generare un fattore di trascrizione eterodimerico legante il DNA. Il complesso ligando-AhR-Arnt agisce da regolatore di trascrizione presumibilmente mediante un'elevata affinità per alcune sequenze di DNA, le cosiddette dioxin-responsive enhancer (DRE), tramite il legame al nucleo di una sequenza di riconoscimento a sei siti leganti.

Un modello meccanicistico semplice per la tossicità di TCDD è presentato nella fig.A, che indica il legame di TCDD (ligando) a AhR nel citoplasma, la traslocazione del recettore al nucleo, la dimerizzazione del AhR con la proteina Arnt, il legame di questo complesso di fattore di trascrizione eterodimerico a sequenze specifiche di DNA presenti nelle regioni 5' promoter di geni responsivi, e l'inappropriata modulazione dell'espressione genica rappresentano le fasi iniziali di una serie di cambiamenti biochimici, cellulari e tissutali che si evidenziano nella tossicità osservata (Gasiewicz and Rucci 1984).

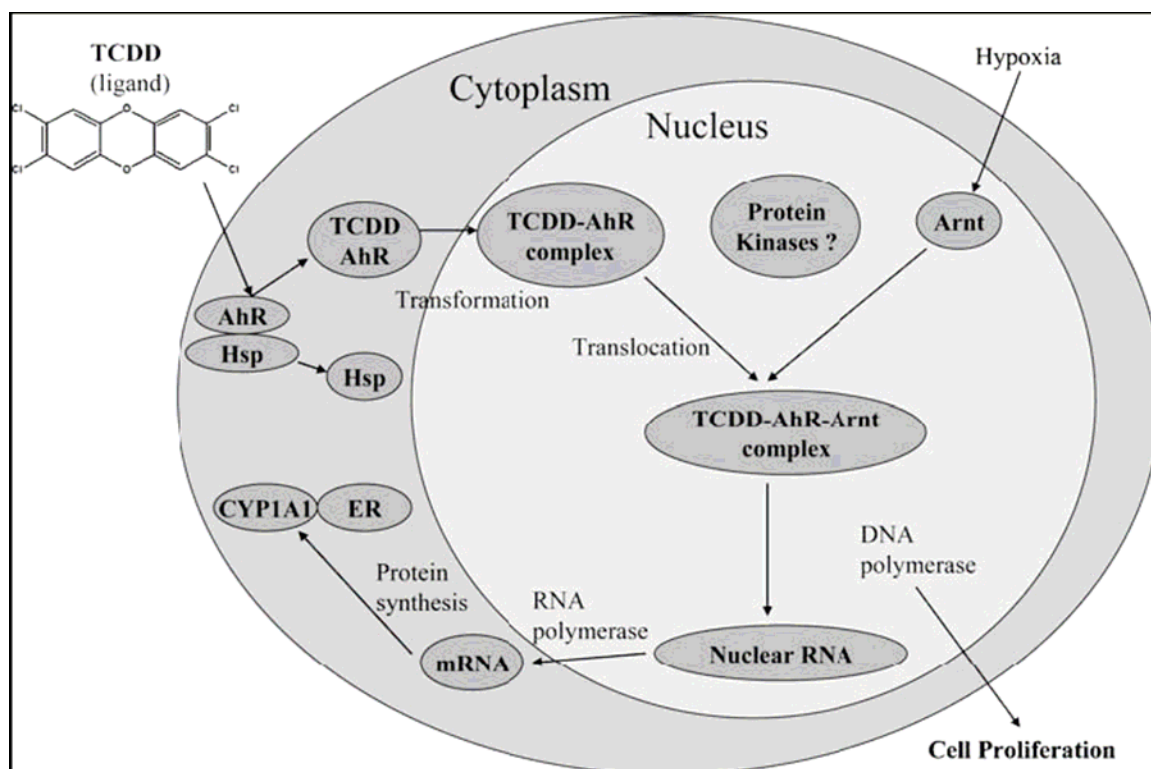


Fig.A. Un modello meccanicistico semplice per la tossicità di TCDD tramite il pathway AhR. ER - reticolo endoplasmico, CYPIA - citocromo P4501A1, AhR (aryl hydrocarbon receptor) - recettore arilico, Hsp(heat shock protein), Arnt (Ah receptor nuclear translocator) - traslocatore nucleare per il recettore arilico, mRNA (messenger ribonucleic acid) - RNA messaggero (Mandal 2005). Gli effetti della TCDD sono correlati all'affinità per AhR.

La Fig. B, dimostra come la diossina agisce al livello cellulare per alterare la proliferazione ed induce i diversi tipi di teratogenesi e cancro nel tessuto.

## **Diossina (TCDD)**

**Diossina libera nei tessuti**



**Legame della diossina al AhR nei tessuti**



**Complesso AhR-Diossina che legante il DNA**



**Regolazione genica**



**Regolazione dell'mRNA**



**Sintesi proteica**



**Alterazioni biochimiche**



**Risposte cellulari precoci (stimolazione della crescita cellulare)**



**Risposta tissutale ritardata (cancro, teratogenesi)**

*Fig. B. Rappresentazione schematica della complessa sequenza degli eventi tossici mediati da TCDD (Mandal 2005).*

## **2. Effetti della diossina sul cervello**

### **2a. Effetti di TCDD sul comportamento**

Anoressia e perdita di peso corporeo sono tra gli effetti più severi della tossicità acuta da TCDD che provocano la morte, mentre nessun effetto comportamentale si osserva nelle fasi iniziali. Questi effetti potrebbero essere riscontrati anche nell'uomo. Nella popolazione umana esposta alla TCDD, sono stati riportati alterazioni dell'umore (Unkila et al. 1995), oltre a disturbi cognitivi in soggetti esposti a diossine come policlorodibenzofurani (Polychlorinated dibenzofurans - PCDFs) e PCB.

E' stata osservata una riduzione nella memoria verbale studiando la cognizione in persone esposte alla TCDD (veterani della guerra del Vietnam). Nei ratti, sebbene non siano state osservate alterazioni neurocomportamentali, a dosaggi letali, si è notato un decremento progressivo nell'attività locomotoria. Inoltre, è noto che la diossina riduce il potenziamento a lungo termine (Long term potentiation - LTP) nei pathways collaterale-CA1 di Schaffer e nelle fibre muschiose-CA3 dell'ippocampo di topo. Poiché LTP rappresenta un modello utile per valutare comprensione e memoria, in cui una stimolazione adeguata di un pathway afferente produce un aumento persistente nell'efficacia della trasmissione sinaptica, è ragionevole supporre che la diossina possa causare un decremento cognitivo nell'uomo.

La diossina può agire sul sistema nervoso periferico, poiché analisi funzionali ed istologiche hanno evidenziato una polineuropatia tossica in ratti esposti a TCDD (Grahmann et al. 1993; Grehl et al. 1993).

### **2b. Effetti della TCDD sul sistema nervoso centrale (SNC)**

La somministrazione acuta di una dose letale di TCDD in animali adulti induce una varietà di effetti severi d'intossicazione, come anoressia, perdita progressiva del peso corporeo, ipotermia e ridotta attività locomotoria. I meccanismi di queste sindromi pato-fisiologiche sono ancora sconosciuti. TCDD è estremamente lipofila, quindi il tessuto adiposo rappresenta uno dei tessuti di deposito di TCDD. Il fegato accumula il 30% della dose somministrata. Tenendo presente il flusso sanguigno ed il contenuto lipidico elevato del cervello, è sorprendente quanto poca TCDD si accumuli in tale organo. La difficile penetrazione di TCDD nel cervello può derivare dal relativo legame alle lipoproteine plasmatiche. La distribuzione all'interno del cervello è relativamente uniforme (Unkila et al. 1993). Anche se la penetrazione di TCDD nel cervello è scarsa, è rilevata comunque con le concentrazioni più alte nell'ipotalamo (Pohjanvitra et al.

1990). Questi risultati implicano un effetto diretto della TCDD sul sistema nervoso centrale (SNC).

Anoressia e tossicità acuta indotte da TCDD sono state documentate, ma i meccanismi biochimici dell'induzione non sono ancora chiari. L'importanza del SNC nella regolazione del bilancio energetico e del peso corporeo potrebbe anche suggerire la partecipazione del SNC nella tossicità da TCDD. L'applicazione diretta di TCDD nel cervello, mediante infusione continua nei ventricoli laterali, ha prodotto effetti maggiormente potenti, piuttosto che applicata perifericamente. In base a queste osservazioni, diventa essenziale stabilire gli effetti cellulari, biochimici e neurochimici della diossina sul SNC per capire il meccanismo d'azione neurale delle diossine.

## **2c. Effetti biochimici**

### **Induzione della tossicità del calcio.**

Gli studi effettuati finora non hanno indicato cambiamenti morfologici nel cervello di animali esposti a TCDD (Pohjanvirta et al. 1990). Tuttavia, nella coltura di tessuto ippocampale di ratto, TCDD a bassa concentrazione, ha effetto sull'omeostasi del calcio, aumentando il  $Ca^{++}$  intracellulare (Hanneman et al. 1993), ed alle concentrazioni di 10-100 nM, l'aumento di  $Ca^{++}$  nelle cellule ippocampali si presenta in 40 secondi (Hanneman et al. 1993). Nella cavia, l'assorbimento di glucosio nel cervello è inibito *in vitro* dopo esposizione alla TCDD. Questi fatti hanno potuto indicare la neurotossicità di TCDD (Hassoun et al. 1998).

Pohjanvirta e collaboratori (1994) hanno segnalato una diminuzione nei livelli d'inositolo indotta da TCDD nel cervello entro 2 giorni dal trattamento in ratti suscettibili (Long Evans substrain Turku AB: L-E) ed in 8 giorni in quelli resistenti (Han/Wistar: H/W). Si presume che questa diminuzione nel livello d'inositolo possa essere dovuta ad una diminuzione nei livelli plasmatici di glucosio-6-fosfato, indotta da TCDD, nel ratto, sia in ceppi suscettibili che resistenti.

La proteina Fos, prodotto del gene immediate-early *c-fos*, generalmente è considerata un indicatore specifico dell'attivazione di un neurone. La localizzazione immunoistochimica della proteina Fos viene utilizzata comunemente per tracciare i pattern anatomici dell'attivazione funzionale del sistema nervoso in risposta ad una varietà di stimoli, come traumi, stress e sostanze farmacologiche. Tre giorni dopo la somministrazione di una singola dose letale di TCDD (50  $\mu$ g/kg) nel ratto adulto Long-Evans, un numero significativamente alto di cellule Fos-immunopositive è stato riscontrato nell'ipotalamo, nel nucleo amigdaloidale centrale e nel nucleo



dello stria terminale. Questi risultati indicano che una parte della tossicità della TCDD può essere indotta tramite un'azione diretta sul SNC.

## **2d. Alterazioni enzimatiche**

La diossina altera una varietà di funzioni neurali, probabilmente mediante l'attivazione del recettore arilico. Molti degli effetti tossici, inclusa la distruzione dei ritmi circadiani nel rilascio ormonale e nella soppressione dell'appetito, sembrano essere mediati dai neuroni dell'ipotalamo e/o del tronco encefalico. Tuttavia, è poco chiaro se questi effetti siano diretti o indiretti, perché non ci sono studi esaurienti sull'espressione dei componenti del pathway-AhR nel cervello. È stato trovato che gli mRNA di AhR e di Arnt sono ampiamente distribuiti nel cervello e nel tronco encefalico. Parecchie regioni del tronco encefalico e dell'ipotalamo addette alla regolazione dell'appetito e dei ritmi circadiani, funzioni che si interrompono dopo esposizione alla diossina, pare che presentino livelli cospicui di mRNA di AhR e di Arnt. Questa informazione neuroanatomica fornisce importanti indizi sia sulle zone che sui meccanismi prodotti dalla diossina nel sistema nervoso centrale, precedentemente sconosciuti (Bagchi et al. 2002).

Alcune regioni del cervello come il cervelletto ed l'encefalo contengono quantità apprezzabili di AhR benché siano considerevolmente inferiori rispetto al fegato. Parecchi enzimi metabolizzanti gli xenobiotici, come il citocromo P-450, sono presenti nel cervello. Le attività dell'enzima sono distribuite irregolarmente in varie regioni del cervello. Le diossine, compreso la TCDD, potrebbero indurre l'attività di questi enzimi nel cervello. Nel ratto, il bulbo olfattivo esprime livelli relativamente elevati d'attività endogene di monoossigenasi associate al CYP1A1, dove, inoltre è stata notata la maggiore risposta di induzione da TCDD (Unkila et al. 1993).

Huang ed altri (2000), hanno trattato ratti (Sprague-Dawley) con una singola dose orale di TCDD (10 µg/kg) e dopo 1, 3 e 28 giorni hanno studiato l'espressione del citocromo P450 1A1 (CYP1A1), di AhR e di Arnt, in regioni del cervello e nelle pituitarie ed hanno trovato che i livelli di mRNA e della proteina CYP1A1 erano aumentati drammaticamente nelle pituitarie. Un aumento significativo dell'mRNA relativo al CYP1A1, inoltre, è stato rilevato in tutte le regioni del cervello esaminate compreso il bulbo olfattivo, lo striato-caudato, l'ipotalamo, l'ippocampo, la corteccia, il cervelletto ed il substantia nigra. L'aumento nell'espressione era dipendente dal tempo, con i massimi livelli 1 giorno dopo il trattamento con TCDD. Gli mRNA di Arnt e di AhR sono stati rilevati nelle stesse zone ma, contrariamente, al CYP1A1 i cambiamenti nell'espressione dell'mRNA di Arnt e di Ahr sono stati limitati al tempo di 28 giorni. Questi

risultati forniscono la prova per la presenza di CYP1A1, Ahr ed Arnt nel sistema nervoso centrale, inoltre indicano che TCDD potrebbe influenzare il cervello mammifero attraverso il pathway-AhR.

## **2e. Alterazioni dei neurotrasmettitori**

### **Catecolamine e Istamine**

La perdita di appetito, che è la caratteristica predominante dell'intossicazione da TCDD, sembra dovuta alle alterazioni dei neurotrasmettitori negli animali esposti. È ben noto che le catecolamine e la serotonina svolgono ruoli importanti nel comportamento. Studi di Tuomisto ed altri (1990), hanno indicato che la TCDD non influisce significativamente sulle concentrazioni di noradrenalina, di dopamina o di istamina in regioni specifiche del cervello neppure fino a 3 giorni dopo il trattamento (Unkila et al. 1993). Solo 10 giorni dopo una dose letale (20 µg/kg), la concentrazione d'istamina nell'ipotalamo è aumentata in ratti suscettibili (L-E).

Altri studi hanno segnalato che la somministrazione sottocronica di PCB ha fatto diminuire significativamente le concentrazioni di dopamina nel cervello di maschi adulti in primati non-umani, suggerendo che i neuroni dopaminergici sono bersagli della tossicità da diossina.

La serotonina (5-HT) è un neurotrasmettitore che è coinvolto in numerose funzioni fisiologiche. Il turnover di serotonina in ratti trattati con TCDD è stato rivelato tramite l'aumento nel precursore della serotonina: l'amminoacido triptofano e nel metabolita: acido 5-idrossi-indoleacetico (5-HIAA) (Tuomisto et al. 1990; Unkila et al. 1993). Questo aumento era evidente fino a 2 giorni dopo il trattamento con una dose letale ed aumentava progressivamente fino al 100% a 16 giorni, in cui l'animale era moribondo. In ratti sensibili alla TCDD (L-E), una singola dose letale (50 µg/kg) ha aumentato sia 5-HIAA che le concentrazioni di triptofano in tutte le regioni del cervello compreso l'ipotalamo; mentre in ratti resistenti alla TCDD (H/W) nessun aumento è stato notato (Unkila et al. 1993). Il triptofano è uno dei regolatori principali del turnover della serotonina del cervello.

## **3. Effetti della diossina sullo sviluppo del cervello**

### **3a. Effetti comportamentali**

Le diossine, trasferite al feto ed al cucciolo attraverso la placenta e la lattazione (Krowke et al. 1990), producono un'ampia varietà di effetti tossici nella prole. Il sistema nervoso centrale (SNC)

durante lo sviluppo iniziale può anche essere un potenziale bersaglio della diossina (Tilson et al. 1979; Levin et al. 1988; Schantz and Bowman 1989; Jacobson et al. 1990; Lilienthal 1990; Chen et al. 1992).

Osservazioni iniziali sui figli di donne esposte casualmente a diossine e a PCB (incidenti di Yushoo, in Giappone nel 1968 e quello di Yu-cheng, a Taiwan nel 1979), mediante il consumo di olio di riso contaminato, hanno dimostrato segni di apatia, ipotonia e basse prestazioni durante prove di intelligenza. Studi effettuati negli U.S.A. su infanti nati da madri che avevano consumato pesce contaminato (dal lago Michigan) hanno mostrato effetti negativi significativi sulle prestazioni del comportamento neonatale (Jacobson et al. 1985).

Le esposizioni sia pre- che neonatali hanno provocato maggiori avvenimenti dell'ipotonia ed hanno ridotto l'ottimizzazione neurologica neonatale, che conferma gli effetti neurotossici delle diossine sui bambini, in fase di sviluppo (Huisman et al. 1995). L'esposizione ai livelli ambientali di PCB ed alle diossine, durante lo sviluppo, ha influito negativamente sulle capacità cognitive e motorie, in uno studio sui bambini effettuato da un gruppo olandese (Dutch cohort study) (Patandin et al. 1999; Vreugdenhil et al. 2002).

Inoltre, nella scimmia, le esposizioni peri- e postnatali alla TCDD notoriamente influiscono sulla cognizione (Schantz and Bowman 1989).

I tessuti in fase di sviluppo, compreso il cervello, sembrano più suscettibili alla TCDD. Poiché la TCDD può attraversare la placenta e distribuirsi all'embrione, numerosi studi sono stati eseguiti sia sulle alterazioni funzionali, indotte dall'esposizione a TCDD *in utero*, sia sulla riproduzione, che non sono evidenti se non col passare degli anni. Gli ormoni tiroidei e gonadici (Kwiat and Basbaum 1990), che sono essenziali per lo sviluppo del cervello sono influenzati dalla TCDD, provocando, sessualmente, risposte neuro-comportamentali bimorfiche.

Evidenze relative alla TCDD come distruttore endocrino, vengono da studi che indicano, che l'esposizione al giorno 15 p.c., induce demascolinizzazione nel comportamento sessuale del ratto maschio ed anomalie nel sistema riproduttivo nella prole femminile. Inoltre è stato dimostrato una diminuzione nel punteggio per errori sulle prestazioni radiali nel labirinto (radial maze performance) in ratti maschi, esposti alla TCDD nello stadio prenatale. Altri studi (Tilson et al. 1979) hanno mostrato un cambiamento nella cognizione spaziale e nella memoria, in maschi esposti nello stadio prenatale.

### **3b. Effetti morfologici**

Finora, relativamente poca attenzione è stata posta alle alterazioni morfologiche del cervello dopo esposizione prenatale alla TCDD.

L'esposizione a TCDD, *in utero* e durante la lattazione, altera la differenziazione sessuale nella prole. Henshel ed altri (1997) hanno segnalato che l'esposizione a TCDD ha influito sullo sviluppo dell'asimmetria del cervello in uccelli selvaggi. L'esposizione a basse dosi di TCDD *in ovo* ha causato un aumento dose-dipendente, sia nella frequenza che nella severità dell'asimmetria totale del cervello (per esempio, la taglia, il peso) (Henshel et al.1997). L'esposizione prenatale a TCDD riduce lo spessore corticale ed altera il pattern normale dell'asimmetria corticale nella prole di ratti esposti il giorno 8 p.c. Nella prole di ratti trattati con TCDD, lo spessore corticale risulta ridotto rispetto ai cervelli di controllo.

Gli eventi primari nello sviluppo neurale, quali la neurogenesi, la migrazione delle cellule e la morte programmata delle cellule (apoptosi), possono influenzare il numero delle cellule e possono essere influenzati dagli ormoni steroidi.

### **3c. Effetti cellulari**

L'esposizione alla TCDD ha aumentato significativamente la morte picnotica cellulare (pycnotic cell death-PCD) con caratteristiche apoptotiche, particolarmente nel tronco encefalico dorsale negli embrioni di zebra-fish (*Danio rerio*), durante la fase iniziale di sviluppo. Tale induzione d'apoptosi è stato dimostrato che coinvolge l'AhR, quindi, suggerirebbe che l'attivazione di AhR può indurre apoptosi nel SNC durante lo sviluppo. Più recentemente Huang ed altri (2005) hanno dimostrato che TCDD induce sia necrosi che apoptosi nelle cellule pituitarie *in vitro*.

### **3d. Effetti su neurotrasmettitori**

Agrawal ed altri (1981) hanno segnalato che i livelli di dopamina ed i siti leganti del recettore della dopamina sono diminuiti in topi esposti a PCB nello stadio prenatale. Recentemente, Kuchiiwa ed altri (2002) hanno studiato gli effetti sull'esposizione alla diossina, *in utero* e durante la lattazione, ed hanno segnalato una riduzione del 25-50% di cellule immunoreattive alla serotonina nei nuclei del rafe della prole, indicando che l'esposizione alla diossina *in utero* e durante la lattazione, causa un cambiamento duraturo nel sistema serotonergico.

Evidenze sperimentali su cervelli, sia adulti che in fase di sviluppo, indicano la partecipazione dei sistemi di neurotrasmissione sia dopaminergico che serotoninergico, agli effetti biologici della diossina. In particolare, nell'adulto, avviene l'alterazione del sistema serotoninergico, in un modo drastico, subito dopo l'esposizione a TCDD (Tuomisto et al. 1990). Inoltre, come riportato sopra, esposizioni alla TCDD, *in utero* e durante la lattazione, provocano alterazioni apprezzabili nelle cellule serotoninergiche del neonato (Kuchiiwa et al. 2002). Queste evidenze richiedono un'analisi dettagliata degli effetti della diossina sul sistema serotoninergico, sia nel cervello adulto che in fase di sviluppo, per capire meglio i meccanismi biologici d'azione della diossina.

#### **4. Sistema serotoninergico**

Da quando è stata scoperta più di 50 anni fa, la serotonina (5-hydroxytryptamine, 5-HT) risulta essere uno dei neurotrasmettitori centrali da un punto di vista filogenetico ed ontogenetico. Il ruolo di neurotrasmettitore è stato osservato in una varietà di invertebrati e vertebrati; mentre le funzioni morfogenetiche di 5-HT appaiono durante i primi stadi di sviluppo del cervello (Lauder and Krebs 1978). Inoltre, la serotonina non si limita al sistema nervoso centrale. I neuroni serotoninergici svolgono un ruolo importante nell'innervazione enterica e 5-HT può essere immagazzinata ed essere liberata dai cosiddetti paraneuroni e dalle piastrine del sangue (Azmitia 2001).

All'interno della nevrassa, l'abbondante distribuzione di terminali contenenti 5-HT contrasta con la localizzazione limitata e discreta dei loro corpi cellulari, situati principalmente nei nuclei del rafe. Questa distribuzione diffusa dell'innervazione di 5-HT spiega la varietà di funzioni in cui 5-HT è implicata, compreso il ciclo sonno-sveglia, il controllo dell'umore, il comportamento sessuale, l'alimentazione, la termoregolazione, il controllo del dolore, etc. Ancora, le disfunzioni serotoninergiche sono state segnalate nei numerosi processi neuropatologici, quali i disordini del sonno, ansia e depressione, aggressività, bulimia ed anoressia, così come in condizioni neurodegenerative tra cui la malattia di Alzheimer, nel Parkinson e nella corea di Huntington (Charney et al 1990; Griebel 1995).

Capire la funzione di questo neurotrasmettitore, all'interno delle zone del sistema nervoso in cui è stato localizzato, richiede l'identificazione dei relativi bersagli e dei meccanismi di traduzione, inoltre dei recettori e del sistema trasportatore.

#### **4a. Origine, ontogenesi e regolazione della neurogenesi della serotonina**

Le cellule nel sistema nervoso centrale dell'adulto che esprimono serotonina, sono state trovate nei nuclei del rafe, che in gran parte si limitano alla base del ponte e della medulla. Lo sviluppo di queste cellule è stato studiato dettagliatamente nel ratto (Molliver 1987; Wallace and Lauder 1992). Ci sono due gruppi di neuroni che esprimono la serotonina nel rombencefalo ventrale. Il rapporto preciso tra questi gruppi ed i rombomeri è incerto. In genere, queste cellule si formano alla base; unica eccezione è costituita dalle cellule serotonergiche che contribuiscono ai nuclei dorsali del rafe. Il gruppo rostrale è il primo ad essere rilevabile tramite immuno-istochimica per serotonina. Queste cellule sono presenti nel periodo embrionale E12-15. L'immunoreattività per serotonina compare nel gruppo caudale intorno a E14. Verso E15 le proiezioni rostrali raggiungono il diencefalo e da E17 forniscono il telencefalo, anche se gli studi riguardanti il periodo d'origine, suggeriscono che queste cellule si cominciano a formare nello stesso periodo delle cellule rostrali (E11-12).

#### **4b. La serotonina come regolatore dello sviluppo**

La serotonina è implicata nello sviluppo della sinapsi. Ciò è stato dimostrato in topi mutanti. La serotonina regola la generazione di circuiti neocorticali nella corteccia somatosensitiva. Inoltre, sembra interessare altri processi inerenti lo sviluppo, quali differenziazione e migrazione delle cellule (Lauder and Liu 1994; Cases et al. 1996). Per esempio, una diminuzione dei livelli di serotonina fanno ritardare l'inizio della differenziazione dei neuroni che si trovano lungo i pathway dove si sviluppano le fibre serotoninergiche (Lauder and Krebs 1978). Parecchi studi hanno dimostrato che i recettori della serotonina sono espressi abbastanza presto per mediare questi effetti (Roth et al. 1991; Hellendall et al. 1993). Inoltre, i tessuti non neurali del cervello esprimono i recettori della serotonina. Per esempio, il plesso coroideo presenta livelli elevati del recettore 5-HT<sub>2C</sub> (Hellendall et al. 1993). È stato postulato che la serotonina possa regolare la produzione dei fattori neurotrofici dal plesso coroideo. Oltre tutto, anche le cellule ependimali e la glia radiale esprimono recettori serotoninergici 1A. Le cellule gliali esprimono anche la proteina beta S-100, che funge da sostanza trofica per i neuroni serotoninergici. È stato suggerito che i neuroni della serotonina stimolino le cellule gliali adiacenti a produrre S-100 beta e quindi forniscono il supporto trofico (vedi Lauder and Liu 1994).

Forse l'evidenza più chiara che la serotonina possa regolare processi inerenti lo sviluppo viene da studi sullo sviluppo cranio-facciale. Le cellule ectomesenchimali esprimono il trasportatore della serotonina ed i recettori della serotonina (Shuey et al 1993). Si pensa che siano esposti a

serotonina proveniente dalla circolazione materna. Sostanze che impediscono il trasporto o il legame della serotonina ai recettori causano malformazioni cranio-facciali (vedi Moiseiwitsch e Lauder 1995). La serotonina può anche regolare la migrazione di cellule della cresta neurale che producono la maggior parte del mesenchima del craniofacciale primordiale (Moiseiwitsch e Lauder 1995). È probabile che la serotonina possa avere effetti simili al sistema nervoso centrale (Cases et al 1996).

#### **4c. Neuroanatomia del sistema serotoninergico**

**Neuroni serotoninergici nel sistema nervoso centrale:** Il sistema serotoninergico nel cervello del roditore consiste di gruppi di neuroni all'interno dei nuclei del rafe, nel grigio centrale, nella formazione reticolare circostante il tronco dell'encefalo ed ha varie proiezioni attraverso il sistema nervoso centrale. La maggior parte dei neuroni serotoninergici è presente nei nuclei del rafe mediano del tronco encefalo. Questi gruppi di neuroni sono stati classificati alfa-numericamente in nove gruppi e le loro posizioni e le regioni citoarchitettoniche vengono identificate come riportato di seguito (tabella 1).

**Proiezioni neuronali della serotonina:** I neuroni della serotonina all'interno del tronco encefalico presentano vaste proiezioni principalmente a tutte le zone del cervello e del midollo spinale (Steinbusch 1981, Törk 1985). Il gruppo rostrale dei neuroni della serotonina (B5-B9) danno origine a quasi tutte le fibre ascendenti e dai gruppi caudali (B1-B4) hanno origine la maggior parte delle fibre discendenti (Aitken and Törk 1988). L'innervazione serotoninergica delle strutture corticali cambia durante lo sviluppo postnatale sotto il controllo di fattori corticali intrinseci (Nakazawa et al. 1992). Durante le prime 8 settimane postnatali, nel ratto, avviene una considerevole riduzione (37%) dei neuroni serotoninergici nei gruppi di cellule B5-B9 (Koh et al. 1991), le fibre degenerano con l'età (van Luijtelaar et al. 1989) indicando che il sistema serotoninergico è attivo durante il periodo critico dello sviluppo neurale e, in condizioni normali, subisce notevoli cambiamenti durante la vita dei roditori (Hornung et al. 1990).

Il midollo spinale riceve le fibre forti e ben organizzate della serotonina che originano dai gruppi caudali delle cellule della serotonina (B1-B3) principalmente dalle cellule B3. Queste fibre attraversano tutta la materia grigia della maggior parte dei segmenti spinali principalmente negli strati 1 e 2 del corno dorsale (Anderson et al. 1989, Kwiat and Basbaum 1990). Inoltre, i gangli periferici (gangli nodosi e petrosali) proiettano al complesso solitario.

## **Tabella 1.**

### **Origine delle proiezioni neuronali serotoninergiche nelle diverse regioni del SNC**

---

#### **B1- Nucleo pallido del rafe (Raphe pallidus nucleus-RPa)**

##### **Medulla caudale ventrolaterale (Caudal ventrolateral medulla -CVL):**

- 1) midollo spinale (corno dorsale gli strati 1 e 2, colonna intermediolaterale, lo strato 10 intorno ai nuclei motori del canale centrale del corno ventrale (lamina VIII ed IX).
- 2) formazione reticolare (parte rostrale della colonna respiratoria ventrale).

#### **B2- Nucleo oscuro del rafe (Raphe obscurus nucleus-Rob):**

- 1) midollo spinale (gli strati 1 e 2 del corno dorsale, colonna intermediolaterale, lo strato 10 intorno ai nuclei motori del canale centrale del corno ventrale (lamina VIII ed IX).
- 2) formazione reticolare (parte rostrale della colonna respiratoria ventrale).

#### **B3- Nucleo rafe magno (RMg); Medulla rostrale ventrolaterale (RVL); Nucleo reticolare laterale paragigantocellulare (LPGi):**

- 1) midollo spinale (gli strati 1 e 2 del corno dorsale, colonna intermediolaterale, lo strato 10 intorno ai nuclei motori del canale centrale del corno ventrale (lamina VIII ed IX).
- 2) Midollo allungato, complesso solitario (compreso A2 e C2). Nuclei vagali ed ipoglossali dorsali. cellule catecolaminiche di A1 e di C1. Formazione reticolare (parte rostrale della colonna respiratoria ventrale). Strutture Pontine  
(Le cellule laterali di B-3 proiettano su altre) cellule mediali di B-3.
- 3) cervelletto
- 4) setto, corteccia entorinale

#### **B4- La sostanza grigia centrale del midollo allungato**

- 1) formazione reticolare (parte rostrale della colonna respiratoria ventrale).

#### **B5- Nucleo del rafe del Ponte mediano (Pontine median raphe- MnR)**

- 1) Strutture diencefaliche: Nucleo accumbens, ippocampo



**B6- Nucleo dorsale del rafe del Ponte dorsale (Pontine dorsal raphe -DR):**

- 1) midollo spinale cervicale, cellule B3 che proiettano al midollo spinale
- 2) Strutture Pontine
- 3) Cervelletto
- 4) Strutture encefaliche, nucleo dello stria terminale, claustrum, nucleo accumbens, amigdala, ippocampo
- 5) vasi sanguigni del tronco dell'encefalo

**B7- Nucleo dorsale del rafe del tronco encefalico (Midbrain dorsal raphe nucleus-DR):**

- 1) midollo spinale cervicale; midollo allungato, complesso solitario, cellule B3 che proiettano al midollo spinale
- 2) cellule dopaminergiche del tronco encefalico, sostanza grigia acquaduttale e le strutture intorno come il nucleo tegmentale pedunculopontino colinergico, Rafe del ponte mediano (MnR), Nucleo lineare caudale (CLi); nucleo superiore ed inferiore del collicolo e nucleo cocleare, nucleo talamico laterale genicolato
- 3) Strutture diencefaliche: setto; corteccia entorinale; proencefalo basale colinergico; gangli basali; striato posteromediale, globus pallidus, corteccia visiva
- 4) vasi sanguigni del tronco encefalico
- 5) Nuclei talamici centromediani ed intralaminari, amigdala.

**B8- Nucleo mediano del rafe del tronco encefalico (MnR);**

Nucleo lineare caudale (CLi):

- 1) midollo spinale cervicale, cellule B3 che proiettano al midollo spinale
- 2) Strutture pontine, cellule dopaminergiche del tronco encefalico, complesso interpeduncolare
- 3) Strutture diencefaliche, nucleo laterale abenula, setto, corteccia entorinale, proencefalo basale colinergico, striato peromediale, globus pallidus, amigdala, ippocampo, Strati esterni della maggior parte delle regioni corticali.

**B9- Lemnisco mediale (ml):**

- 1) midollo spinale cervicale, cellule B3 che proiettano al midollo spinale
- 2) colliculus superiore
- 3) Strutture diencefaliche: intralaminare, centrale mediale, genicolato laterale, reticolari, paraventricolari, nuclei del talamo romboide, nucleo subtalamico; proencefalo basale colinergico.

Riferimento: Halliday et al, 1995; Paxinos 1995; Paxinos and Franklin 2001.

## 5. Recettore

L'attività del neurotrasmettitore serotonina è mediata da un certo numero di recettori postsinaptici (5-HTR). Attualmente si conoscono sette principali famiglie di recettori della serotonina, denominati 5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub> e la loro classificazione è basata principalmente sulle loro sequenze amminoacidiche. Ad eccezione della famiglia 5-HT<sub>3</sub>, i recettori della serotonina hanno 7 regioni idrofobiche e  $\alpha$ -elicoidali transmembraniche, 3 loop intracellulari, un N-terminale extracellulare e un C-terminale intracellulare. Dei 3 loop intracellulari, il terzo loop è tipicamente il più lungo. Questa disposizione delle 7  $\alpha$ -eliche transmembrana rappresenta l'architettura prototipica della superfamiglia di GPCR (Bonasera and Tecott 2000; Olivier et al. 1999).

Il recettore 5-HT<sub>1A</sub> è uno dei primi recettori della serotonina ad essere stato identificato e caratterizzato. Il recettore 5-HT<sub>1A</sub> è espresso estesamente nel cervello, particolarmente nelle zone limbiche, compreso l'ippocampo, la corteccia, il setto, l'amigdala oltre che i nuclei del rafe, il talamo, il nucleo del tratto solitario ed il corno dorsale del midollo spinale (Vergé and Callas 2000). Parecchi studi indicano che il recettore 5-HT<sub>1A</sub> è localizzato sulle cellule piramidali, mentre altri studi suggeriscono che questo recettore è posizionato sugli interneuroni inibitori. Come la maggior parte dei recettori della serotonina, 5-HT<sub>1A</sub> è un recettore legato alla proteina G. Poiché la maggior parte dei recettori della serotonina sono inibitori, si presuppone solitamente che le fibre serotoninergiche che si proiettano ad una zona specifica conducano ad inibizione dell'impulso elettrico finale. Tuttavia, se l'attivazione del recettore 5-HT<sub>1A</sub> risulta nell'inibizione o nell'eccitazione delle cellule eccitatorie principali, può dipendere dal tipo di neuroni su cui è posizionato il recettore e questo non è stato ancora completamente chiarito (Saxena 1965).

Il recettore 5-HT<sub>1A</sub> per parecchio tempo è stato un bersaglio sia nella ricerca di base che nella clinica perché sono espressi dai neuroni serotoninergici (Verge' and Callas 2000). E' prominente l'espressione somatodendritica (cioè presinaptica) del recettore 5-HT<sub>1A</sub> sui neuroni serotonergici (Roth et al 1991); 5-HT che si lega a questi recettori sopprime l'eccitazione neuronale (autoregolazione) ed il rilascio di 5-HT dai terminali nelle zone di proiezione. Al livello postsinaptico, le cellule bersaglio che esprimono i recettori 5-HT<sub>1A</sub> sono state identificate tramite l'ibridazione *in situ* in cellule piramidali e granulari dell'ippocampo, con una localizzazione preferenziale dell'immunoreattività per 5-HT<sub>1A</sub> nei dendriti e in cellule colinergiche del complesso settale. Questi eterorecettori 5-HT<sub>1A</sub> sono stati implicati nell'aumento nel rilascio di noradrenalina e di acetilcolina mediato dagli agonisti del 5-HT<sub>1A</sub> in parecchie zone del cervello.

Questo recettore è coinvolto in varie funzioni centrali, compreso il controllo del comportamento sessuale, la termoregolazione, l'alimentazione, e diversi studi hanno evidenziato alterazioni nel legame e nella distribuzione dei recettori 5-HT<sub>1A</sub> nella depressione e nella malattia di Alzheimer. L'interesse per questi recettori si è sviluppato negli ultimi anni soprattutto per il loro coinvolgimento in importanti malattie umane, dovute a disfunzioni del sistema limbico, tra cui la schizofrenia, la depressione primaria ed gli stati d'ansia (Hensler 2006).

## **6. Trasportatore della Serotonina**

Un processo chiave regolatore della neurotrasmissione chimica è l'inattivazione dei neurotrasmettitori dopo il loro rilascio nello spazio sinaptico. Questo processo di inattivazione è mediato da sistemi trasporto/re-uptake di maggior affinità, che sono legati alla membrana, ciascuno di essi è neurotrasmettitore specifico. Questi fattori di trasporto presentano alta affinità per i rispettivi ligandi e sono localizzati nelle membrane presinaptiche del plasma e negli elementi gliali adiacente ai cleft sinaptici. Il trasportatore della serotonina (SERT) è una proteina di membrana integrale e politopica costituita da 12 domini transmembrana (Blakelt and Bauman 2000).

SERT nel cervello del mammifero sembra essere presente nel nucleo del Rafe (Sur et al. 1996). La distribuzione diffusa ed eterogenea delle fibre fini, che sono SERT-immunoreattive, è stata rilevata nei cervelli del ratto, nello strato molecolare del giro dentato, nei strati oriens di CA1, nello strato lacunoso molecolare e nello strato radiatum delle regioni CA1-CA3 dell'ippocampo. Inoltre, livelli elevati di SERT sono stati rilevati, usando i metodi immunoistochimici, in zone come caudato-putamen, complesso amigdaloido, zone corticali, substantia nigra, pallidum ventrale, nuclei settali ed interpedunculari e nuclei olfattivi (Austin et al. 1994). Nelle scimmie, quantità significative dei depositi e poche fibre immunoreattive al SERT, sono state osservate nello strato molecolare del giro dentato, nello strato lucidum di CA3 e nello strato radiatum delle regioni CA1-CA3 dell'ippocampo e nel subiculum, rispetto al cervello di ratto. I corpi cellulari piramidali dello strato piramidale hanno mostrato una debole immunoreattività. È noto che i neuroni serotoninergici del rafe trasmettono gli assoni collaterali a varie zone del cervello compreso l'ippocampo (Meister et al. 1995).

Tuttavia, SERT è associato non soltanto a varicosità sinaptiche ma anche agli assoni, indicando che SERT non può essere coinvolto soltanto nel termine della trasmissione sinaptica, ma anche di regolazione della quantità di serotonina nel cervello e midollo spinale di topo (Fujita et al. 1993).

L'espressione di SERT nel topo comincia al giorno E12 in due fasce discontinue nel tronco encefalico anteriore e posteriore. L'espressione si estende cranio-caudalmente, raggiungendo il diencefalo basale a E13, il complesso settale a E15 e la corteccia cerebrale a E16. L'estensione caudale dell'espressione discende al margine ventrolaterale del midollo spinale e raggiunge i livelli lombari a E14, E17-E18, l'espressione si vede nello striato, nella zona amigdaloidea, nel talamo ventrobasale, nei nuclei ipotalamici paraventricolari e periventricolari e nella substantia nigra. Il pattern di espressione generale spazio-temporale del trasportatore della serotonina nel topo è d'accordo con i dati sulla localizzazione immunoistochimica di serotonina nell'embrione di ratto (Brüning et al. 1997). Questi risultati indicano che le fibre serotonergiche possono effettuare il re-uptake del trasmettitore molto prima della formazione di sinapsi e che l'espressione del trasportatore potrebbe rappresentare un pre-requisito nelle funzioni inerenti lo sviluppo svolte dalla serotonina. Inoltre durante le fasi postnatali un'espressione di SERT che dipende dall'età è stata osservata nel ratto (Moll et al. 2000). Nei ratti, dopo la nascita, l'espressione di SERT nella corteccia frontale aumenta costantemente dal giorno postnatale 25 fino all'età adulta (Hansson et al. 1998).

SERT svolge un ruolo importante nel controllo del sistema serotonergico nel cervello e, negli ultimi anni, studi molecolari sembrano indicare che il re-uptake della serotonina, componente della plasticità sinaptica, che è strettamente regolato (Blier and de Montigny 1994), quindi esso potrebbe avere un ruolo importante sia nello sviluppo che nel cervello adulto.

In presente lavoro, abbiamo studiato gli effetti della diossina sul cervello di topo adulto e neonato, sulla struttura del cervello e sul sistema serotoninergico. Inoltre, abbiamo studiato il sistema serotoninergico nel cervello di pecore, sia adulte che neonate, allevate in zone contaminate dalla diossina, rispetto a pecore provenienti da zone non contaminate, per capire come la diossina potrebbe alterare un sistema di neurotrasmettitore classico ed il meccanismo relativo al trasferimento di informazioni in un modello sperimentale (topo) ed in un modello animale di valore nutrizionale (pecora) esposto alla contaminazione ambientale.

# MATERIALI E METODI

## 1. Studi su topo:

### 1a. Mantenimento degli animali

Topi, femmine e maschi appartenenti al ceppo CD-1 (Harlan, Correzzana, MI, Italia), dell'età di 4 mesi, sono stati stabulati sotto condizioni standard di temperatura ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), umidità ( $55\pm 10\%$ ) e ciclo circadiano (12 ore luce/12 ore buio) e con cibo (Teklad Global Topi, Harlan) ed acqua *ad libitum*.

### 1b. Animali e trattamento:

La TCDD è stata fornita da Wellington laboratories (Ontario, Canada). Una soluzione madre di TCDD in dimetilsolfossido (DMSO), alla concentrazione di  $10^{-4}$  M, è stata preparata sciogliendo 1 mg di TCDD in 31.06 ml di DMSO (peso molecolare TCDD = 322). Le diluizioni successive sono state preparate in olio di arachide (Sigma) (Faqi et al 1998).

Ventidue femmine, sono state trattate ogni giorno per via intraperitoneale, tra le 9.00 e le 10.00 di mattina, per 14 giorni.

Le femmine sono state suddivise in tre gruppi, di cui uno di controllo (Gruppo-O, costituito da sei topi, trattati con 3.3 ml/kg di olio di arachidi). Gli altri due gruppi sono stati trattati con lo stesso volume di due concentrazioni diverse di TCDD in olio di arachidi (Gruppo-D1, costituito da otto topi, trattati con 5  $\mu\text{g}$  /kg; Gruppo D2, costituito da otto topi, trattati con 10  $\mu\text{g}$  TCDD /kg).

### 1c. Accoppiamento

Dopo otto giorni di trattamento, le femmine di controllo (Gruppo-O) e quelle trattate (Gruppo-D1, Gruppo D2) sono state fatte accoppiare con maschi non trattati di quattro mesi (3:1).

La verifica dell'accoppiamento è stata seguita attraverso l'osservazione del tappo vaginale. Quelle fecondate sono state separate dalle altre, ma hanno continuato a ricevere il trattamento con TCDD – per un periodo totale di 14 giorni. Dopo il parto, i neonati sono stati allattati dalle loro madri naturali e sono stati sacrificati ai giorni post natale (P) 6, 14 e 21.

#### **1d. Preparazione degli animali e delle sezioni di tessuto**

I neonati sono stati anestetizzati per via intraperitoneale con Zoletil 100 (Virbac srl, Milano) che contiene 290.85 mg di Tiletamine.HCl e 287.50 mg di Zolazepam.HCl. Una soluzione madre contenente Tiletamine.HCl alla concentrazione di 50 mg/ml di PBS (phosphate buffered saline) è stata preparata e somministrata ai neonati al dosaggio di 30 µg/g peso corporeo. I loro cervelli sono stati fissati *in situ* tramite perfusione transcardiale, come riportato da Freund e Meskenaite (1992), mediante il passaggio di soluzione fisiologica, seguita da un fissativo freddo e preparato di fresco, contenente paraformaldeide al 4% in PBS (pH 7.4). I cervelli perfusi sono stati prelevati e post-fissati nello stesso fissativo per tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo, i cervelli fissati sono stati processati mediante passaggi in soluzione salina, salina-alcool e sono stati conservati in EtOH freddo al 70% fino all'utilizzo. In seguito, i cervelli sono stati disidratati tramite passaggi in alcool a gradiente, chiariti in xilene ed inclusi in paraffina. Sezioni paraffinate da 6 micron sono state preparate da ogni cervello dai gruppi O, D1 e D2 agli stadi P6, P14 e P21 e sono state sottoposte alle procedure di istologia ed immunoistologia.

## **2. Studi sulla pecora**

Pecore normali adulte (età circa 3 anni) (Gruppo Controllo Adulto (CA): n=5) e neonate (età circa 2 mesi) (Gruppo Controllo Neonato (CN): n=5) hanno pascolato nella campagna di Chiusano S. Domenico (Avellino).

Pecore adulte (età circa 3 anni) (Gruppo Diossina-Adulto (DA): n=5) e neonate (età circa 2 mesi) (Gruppo Diossina-Neonato (DN): n=5) esposte alla diossina, hanno pascolato ad Acerra (provincia di Napoli), Zona Industriale Montefibre, che è, come noto, è un'area contaminata da diossina. La diossina (come 2,3,7,8-TCDD) misurata nelle pecore è stata 50-60 pg/gm grasso nel latte. Il limite massimo, stabilito dalla Commissione Europea (2002/201/CE) per 2,3,7,8-TCDD è pari a 3 pg/gm grasso nel latte.

Nella pecora l'esposizione ambientale alla diossina è stata cronica, indiretta e lunga.

### **2a. La pecora:**

Sia le madri che i neonati sono stati decapitati da medici veterinari. I cervelli sono stati fissati *in situ* attraverso le arterie con il passaggio di soluzione fisiologica, seguita da un fissativo freddo e preparato di fresco, contenente paraformaldeide al 4% in PBS (pH 7.4). I cervelli perfusi sono stati post-fissati nello stesso fissativo per una settimana a 4°C, lavati con salina, e conservati in EtOH freddo al 70% fino all'utilizzo.

### **2b. Dissezione del cervello di pecora:**

I cervelli delle pecore sono stati tagliati prima lungo la linea sagittale. Gli emisferi sinistri sono stati conservati in EtOH al 70% a 4°C. Gli emisferi della parte destra dell'encefalo delle pecore adulte e neonate sia normali (CA, CN) che esposte a diossina (DA, DN) sono stati tagliati in senso rostro-caudale, per analizzare corteccia frontale, parietale ed occipitale, cervelletto, medulla, talamo, ipotalamo, ponte ed ippocampo.

I cervelli sezionati sono stati disidratati tramite passaggi in alcool a gradiente, chiariti in xilene ed inclusi in paraffina.

Sezioni coronali in paraffina da 10 micron provenienti da varie regioni dell'encefalo di pecora sono state tagliate, montate sui vetrini superfrost (BDH), asciugate a 37°C per tutta la notte ed utilizzate per studi istologici ed immunoistologici.

### **3. Istologia:**

#### **Ematossilina-Eosina:**

Le sezioni paraffinate di cervello di topo (6 micron) e quello di pecora (10 micron) sono state sparaffinate in xilene, idratate mediante bassi gradi di alcool, acqua, colorate con Ematossilina di Harris (BDH) per 2 minuti, passate in acqua, creando il contrasto in azzurro, con un passaggio per 10 secondi in  $\text{NH}_4\text{OH}$  all'1%, poi passate in acqua, colorate velocemente con Eosina acquosa (BDH), deidratate in alti gradi di alcool, chiarite in xilene e montate con Entellan (Merck, Darmstad, Germany).

### **4. Procedure di Immunoistologia:**

Per gli studi immunoistologici, sono stati usati anticorpi primari ottenuti dal coniglio, come, anti-serotonina (5-HT) (Chemicon International Cat. AB938, dil.1:1000) ed anti-serotonin transporter (SERT) (Chemicon International Ct. AB1594P, dil. 1:500); mentre l'anticorpo primario, anti-serotonin receptor 1A (5-HT<sub>1A</sub>) è stato ottenuto da guinea pig (Chemicon International AB 5406, dil. 1:500). La rilevazione è stata effettuata mediante immunoperoxidasi di Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), formato dal siero normale, di avidina-D e biotina blocks, dagli anticorpi secondari biotinilati come antirabbit e anti-guinea pig, ed un complesso preformato macromolecolare di horseradish perossidasi con avidina-biotinilata (ABC) e il 3,3'-diaminobenzidine (DAB) come cromogeno.

Le sezioni paraffinate sono state sparaffinate con le tecniche standard. Per inibire la perossidasi endogena, le sezioni sono state trattate con perossido di idrogeno all' 1.5% in metanolo a temperatura ambiente (RT). Le sezioni sono state trattate con il siero per 1 ora per bloccare la nonspecificità. Per gli anticorpi anti-SERT ed anti-5HT-<sub>1A</sub>, è stato necessario lo smascheramento degli epitopi, usando la soluzione Target retrieval 1X a pH 9 (Dako Cytomation- Tris-EDTA buffer pH 9) a 90°C per 30 minuti, mentre le incubazioni sono state fatte a 37°C: l' anticorpo primario per 2 ore; anticorpo secondario per 1 ora, ABC per 1 ora. Per la serotonina, l'incubazione con anticorpo primario è stata effettuata a 4°C per tutta la notte e le altre incubazioni con anticorpo e ABC, sono state fatte a RT per 1 ora. La horseradish perossidasi legata è stata visualizzata mediante DAB. La reazione è stata controllata al microscopio ed è stata bloccata in acqua. In seguito le sezioni sono state controcolorate con Ematossilina di Harris, deidratate in alcol a gradiente, chiarite in xilene e montate in Entellan. Le sezioni incubate con il siero normale invece dell'anticorpo primario, sono state usate come controllo negativo.



## **5. Osservazioni sul topo:**

Nel topo l'esposizione alla diossina è acuta, diretta, forte e per un periodo breve (14 giorni). Tra i 3 gruppi (O, D1, D2) di femmine di topo studiate con il trattamento per i 14 giorni, le femmine del gruppo D2 presentavano rigonfiamento addominale e blande alterazioni cutanee dopo 13 giorni di trattamento. Fra i neonati ottenuti da questi 3 gruppi di femmine, sono state trovate delle differenze tra quelli esposti alla diossina e quelli di controllo, riguardanti la morfologia esterna, poichè i figli dei gruppi trattati con D2 presentavano un aspetto vecchieggiante allo stadio P21 rispetto agli altri gruppi; il peso postnatale era inferiore di circa 2 grammi rispetto al controllo allo stesso stadio e inoltre i figli dei gruppi trattati presentavano ipereccitabilità ed ipersensibilità al contatto con l'operatore.

## **6. Studi con microscopio ottico ed osservazioni:**

Le varie zone dell'encefalo nel topo sono state classificate mediante atlante Paxinos and Watson (1986) e quelle della pecora sono state classificate secondo Yoshikawa (1968) e Johnson et al (sito web).

# RISULTATI

## Cervello di topo

### 1. Morfologia

Nel cervello del topo adulto non abbiamo trovato dei cambiamenti morfologici significativi nell'animale trattato con diossina. Tuttavia il formato del cervello neonatale ha presentato cambiamenti rispetto ai gruppi di controllo. Come riportato nella tabella 2, già dal giorno P6 osserviamo una diminuzione della lunghezza e dello spessore del cervello in generale. Questa riduzione sembra continuare ugualmente nelle fasi successive e, dal giorno P14, inoltre anche la larghezza è variata, e dal giorno P21 tutte le misure sono influenzate a livelli significativi.

Tabella 2

#### La misura di cervello di topo:

Stadio		O	D1	D2
P6	Lunghezza	10	10	9
	Spessore	7	6	6
	Larghezza	6	6	6
P14	Lunghezza	11	11	11
	Spessore	7	7	7
	Larghezza	7	7	6.5
P21	Lunghezza	13	12.5	11
	Spessore	8	7.5	6.5
	Larghezza	8	7	6.5

Le misure sono presentate in millimetri.

Lunghezza = La misura del cervello dall'apice del bulbo olfattivo al base del cervelletto.

Spessore = La misura del cervello dal fondo alla superficie della corteccia.

Larghezza = La misura dal lato sinistro del cervelletto a quello destro.

## **2. ISTOLOGIA**

### **2a. Cervello di topo adulto**

La colorazione con Ematossilina ha evidenziato parecchie anomalie nel cervello di topo trattato con diossina in diverse regioni. Rispetto al controllo (olio-O), nel gruppo D1 (5 µg/kg) non ci sono molte anomalie nelle strutture corticali, tranne che nella corteccia temporale di D1, dove abbiamo trovato cellule in degenerazione con la presenza di vacuoli, oltre che raggruppamenti delle cellule nella corteccia visiva secondaria, nella zona laterale (V2L). Anche nelle strutture ippocampali, non è stata evidenziata alcuna anomalia significativa.

Nel gruppo D2 (10 µg TCDD/kg), la regione ippocampale CA3 e l'ilus proprio (adiacente al DG), mostrano cellule con dei segni di degenerazione, vacuolizzazione e con degli spazi intercellulari. Nella zona degli strati II, III della corteccia temporale, in particolare, le cellule sono arrotondate, vacuolari e di tipo degenerativo. Gli strati III, IV, della corteccia peririnale e quelle della corteccia occipitale mostrano delle cellule in fase di degenerazione. Tuttavia, la corteccia entorinale sembra normale. Cellule in degenerazione e degli spazi vacuolari si trovano in DG nella lamina ventrale e nell'ilus.

Nel cervelletto, nel ponte e nella medulla (midollo) nessuna alterazione istologica evidente è stata riscontrata nel gruppo D1, ma in D2 si nota perdita delle cellule accompagnata da abbondante vacuolizzazione. Inoltre, in D1, si trovano vacuoli abbondanti nella sostanza bianca cerebellare.

### **2b. Cervello di topo in fase di sviluppo**

Il cervello neonatale ha rivelato soltanto alterazioni morfologiche secondarie durante le fasi studiate e queste alterazioni sono riportate nello studio dell' immunoistologia della serotonina.

### 3. Immunohistologia della serotonina

#### 3a. Cervello di topo adulto

Nel considerare le osservazioni immunoistologiche, abbiamo concentrato la nostra attenzione principalmente in 3 zone differenti di interesse, relative al neurotrasmettitore della serotonina, ed abbiamo confrontato i risultati visti nei due gruppi trattati con diossina (D1 e D2) a quelli dei controllo (trattati con soltanto olio). Le 3 zone includono il proencefalo (che comprende corteccia, ippocampo e zone del talamo e subtalamo), il tronco encefalico ed il cervelletto. Comunque, cambiamenti significativi sono stati osservati anche in altre regioni del cervello come il lobo olfattivo, ponte e la medulla (risultati non sono presentati).

**Proencefalo:** La struttura del proencefalo ragionevolmente è in genere immunoreattiva in controllo (**O**). Gli strati corticali verso la pia madre sono inoltre ben colorati e, quelli degli strati profondi mostrano una colorazione immunoreattiva in zone specifiche. La struttura delle fibre sembra fortemente positiva, particolarmente nella fimbria, nel cingolo, Cpu e nello striato. Nell'ippocampo in cui generalmente si evidenzia una minore colorazione, il tratto piramidale in CA1 è ragionevolmente leggermente positivo. Un risultato simile è stato riscontrato anche nell'amigdala (Fig. 1). Nel D1 sembra esserci una riduzione generale nella immunopositività per serotonina e nel D2 la regione del proencefalo è completamente negativa.

**Tronco dell' encefalo:** Nel controllo, l'intero tronco encefalico in generale è ben colorato per la serotonina bilateralmente, in zone specifiche come nei nuclei del rafe. Parecchi gruppi di fibre sono ben colorati nei nuclei reticolari del ponte, (PnC e PnO). Inoltre il nucleo sensoriale 5 (Pr5) è positivo lateralmente, come una fascia sottile. Il peduncolo cerebellare centrale (mcP) con il nucleo cocleare ventrale (VCA) appaiono ben colorati. Inoltre, nella zona media, il nucleo trigeminale motorio e le fibre adiacenti sono stati trovati positivi. I MPB, LPB e, rostralmente, il nucleo centrale del collicolo inferiore (cic) sono ben colorati, leggermente ed uniformemente. Poche cellule nel tratto di spigemiale (sp5) sono colorate più intensamente. Cellule del leminusco (DLL, ILL, VLL), e rostralmente, lo SNR e le strutture adiacenti sono colorati ma non intensamente. In ICP le strutture della fibra appaiono ben colorate bilateralmente (Fig. 2). Il D1 è generalmente colorato più intensamente rispetto al controllo. La maggior parte dei nuclei e delle strutture delle fibre, come già detto precedentemente, sono colorate più intensamente rispetto al controllo. Nel D2, il tronco encefalico, interamente, è colorato meglio del controllo e del gruppo D1. Molte cellule positive sono viste dappertutto e le fibre sono colorate intensamente,

maggiormente rispetto ai gruppi di controllo e D1. L'ICP e sp5 sono ben colorati. Medialmente i nuclei del rafe sono colorati bene. Alcuni nuclei, tra cui RMg, sono poco colorati.

**Cervelletto:** Nel controllo (O), lo strato molecolare del cervelletto è debolmente ed uniformemente positivo. Tra le cellule del Purkinje, alcune sono colorate debolmente ed altre non sono colorate ma nessuna appare colorata intensamente. Le cellule granulari sono in gran parte negative e gli interi strati granulari sono uniformemente poco positivi. Nel cervelletto le strutture delle fibre non sono molto colorate (Fig.2). Nel D1 le cellule granulari mostrano una colorazione leggera. Lo strato granulare è colorato meglio del controllo. Lo strato molecolare è colorato uniformemente e meglio del controllo. Le fibre sono colorate più intensamente del controllo. I nuclei MeDL, PFI sono colorati uniformemente con grandi cellule ben colorate. Le cellule del Purkinje sono generalmente negative, ma poche cellule in alcuni lobuli sono debolmente positive. Nel D2, lo strato molecolare è colorato meglio del controllo e tantissime cellule del Purkinje sono trovate fortemente positive. L'intero strato granulare è ben colorato benché nessuna cellula granulare positiva sia stata osservata.

### 3b. Cervello neonatale:

#### *P6*

**Proencefalo:** Gli strati corticali, generalmente, sono colorati leggermente nel gruppo di controllo (O) ma nel D1, la maggior parte delle zone sono poco positive, soprattutto, gli strati I, III della corteccia sembrano positivi, benché nessuna cellula sia stata trovata positiva. L'intero corno di Ammone (CA1, 2 e 3) è generalmente positivo, ma DG non lo è. Nonostante nessuna cellula specifica sia colorata, la zona, in generale, è trovata positiva. Il proencefalo basale in D1 è più positivo di quello del gruppo di controllo. Nel D2, gli strati corticali II ed III sono leggermente ed uniformemente positivi da S1BF (corteccia S1,) fino alla corteccia peririnale (PRh). L'ippocampo e le regioni striatali non sono colorate. Nella maggior parte delle zone corticali, gli strati corticali I, II, III fino al IV sono leggermente positivi.

**Tronco dell'encefalo:** Il tronco encefalico nel controllo è generalmente poco ed uniformemente colorato e il maggior numero di cellule è colorato leggermente e bilateralmente. Ciò è più specifico nelle strutture medialì che corrispondono ai nuclei del rafe. Nel D1, il tronco encefalico è poco ed uniformemente positivo. Inoltre, il nucleo centrale del collicolo inferiore (CIC) ed il collicolo inferiore in se sono uniformemente positivi. Cellule del nucleo magno del rafe (RMg), del nucleo reticolare caudale pontino (PnC) sono fortemente positive. Inoltre, le cellule nel nucleo di subcoeruleus ventrale (SubCV) sono positive bilateralmente. Generalmente, un gran numero di cellule è positivo bilateralmente nella zona mediale e meglio colorato che nel controllo. Nel D2, sono stati osservati due tipi di cellule. Alcune cellule sono uniformemente ben colorate. Altre cellule, anche se sono colorate positive nel soma, sembrano vuote indicando una possibile perdita di serotonina. Le cellule colorate intensamente, sono uniformemente positive e sono maggiori nel numero che nei controlli. Il nucleo centrale del collicolo inferiore (CIC) e del collicolo inferiore sono uniformemente e poco positive.

Cellule del nucleo magno del rafe (RMg), del nucleo reticolare pontino, del caudale mediale disposto (PnC) sono fortemente positive. Cellule nel nucleo subcoeruleus ventrale (SubCV) sono bilateralmente positive. Specialmente le cellule del rafe sono colorate intensamente. Parecchi gruppi di cellule grandi nel nucleo reticolare parvicellulare, alfa PCRtA sono leggermente positive. Le cellule sono colorate più intensamente rispetto a quelle di controllo, ma meno di

quelle D1, e poche in numero rispetto a D1, inoltre, presentano degli spazi vuoti all'interno delle cellule. Appare una marcata riduzione del numero di cellule positive.

#### **Cervelletto:**

Nel cervelletto del controllo benché sia stata vista una positività generale, lo strato molecolare e quello granulare sono leggermente colorati; le cellule del Purkinje sono negative (Fig. 3, 4).

Nel D1, lo strato molecolare e gli strati granulari (ma non le cellule) sono uniformemente poco positivi ma meglio del controllo, le cellule del Purkinje sono positive.

#### ***P14***

**Proencefalo:** La zona corticale è scarsamente colorata nel controllo benché si veda una colorazione leggera nello striato. Inoltre, l'ippocampo è in gran parte negativo. Non abbiamo incontrato cambiamenti nei pattern di colorazione di questa zona, sia in D1 che in D2 (Fig. 6).

**Tronco dell'encefalo:** Nei controlli il tronco encefalico è generalmente abbastanza ben colorato. Le cellule positive inoltre sono presenti nel nucleo reticolare gigantocellulare (Gi) bilateralmente e nel tratto spinale del trigemino (sp5). Il DC (nucleo cocleare dorsale) è positivo. Le cellule reticolari ed i nuclei del rafe sono bilateralmente positivi. Le fibre del peduncolo cerebellare inferiore (ICP), quelle del peduncolo cerebellare centrale (MCP) sono positive (Fig. 6). Nel D1, l'intensità della colorazione è migliore rispetto al controllo e molte cellule sono positive, leggermente e bilateralmente. Medialmente il nucleo magno del rafe (RMg), il tratto spinale del trigemino (sp5) sono positivi. Nel D2, l'intera zona è ben colorata ed in particolare il nucleo cuneo (Cu) è bilateralmente fortemente positivo.

#### **Cervelletto:**

La regione cerebellare generalmente non è colorata in nessuna regione nei gruppi O, D1 e D2.

#### ***P21***

**Proencefalo:** Nel controllo gli strati corticali sono negativi. La zona ippocampale è generalmente leggermente positiva. La regione CA3 risulta poco positiva. Un'analisi attenta delle regioni di CA indica che fra le cellule piramidali della regione CA1 tante cellule sono ben

positive. Nessuna colorazione è stata vista nelle cellule DG né negli interneuroni di questa zona. La fimbria risulta maggiormente positiva ed anche il caudate putamen è positivo; il cingolo, il nucleo talamico posterolaterale ventrale (VPL) e la capsula interna (ic) sono leggermente positivi. Il D1 è generalmente meno colorato rispetto al controllo e la zona corticale sembra essere un po' positiva. Tante cellule corticali mostrano una leggera positività; anche l'intera regione ippocampale sembra uniformemente positiva anche se le cellule piramidali e le cellule granulari di DG non mostrano alcuna positività particolare. La zona dello striato è colorata bene similmente benché nessuna colorazione considerevole della fimbria sia stata notata. Nel D2, la colorazione della corteccia e quella dell'ippocampo somiglia al controllo. La regione CA3 inoltre è ben positiva, ma CA1 non è colorato bene. E' stata vista una leggera colorazione della fimbria e del cingolo (Fig. 5). Caudate putamen, capsula interna (ic), tratto ottico (OPT) sono chiaramente e bilateralmente leggermente positivi.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo (O), il tronco encefalico è colorato leggermente ed uniformemente. Nella maggior parte dei nuclei, appare una colorazione specifica per le cellule. Il tratto spigeminale è colorato bene. Specificamente, il nucleo obscurus del rafe (Rob) è fortemente positivo. Il cervello basale è uniformemente e bilateralmente ben colorato. Inoltre, il tratto spinale trigeminale (sp5), il peduncolo cerebellare inferiore (ICP), il tratto rubrospinale (rs) sono tutti positivi. La zona del nucleo gigantocellulare reticolare (Gi) è bilateralmente positiva. Molte cellule giganti sono inoltre leggermente positive. I nuclei del rafe sono ben sviluppati e ben colorati uniformemente (Fig. 7).

Nel D1, il tronco encefalico è uniformemente ben colorato. Il cervello basale è bilateralmente e uniformemente colorato bene. Il tratto spinale del trigemino (sp5) è colorato bene in continuo con vsc (tratto spinocerebellare ventrale); ed anche il peduncolo cerebellare inferiore (ICP) e il tratto rubrospinale (rs) sono positivi. La zona del nucleo gigantocellulare reticolare (Gi) è bilateralmente positiva. Molte cellule giganti sono leggermente positive ma in più rispetto al gruppo di controllo. In generale, il pattern di colorazione è più o meno simile a quello di controllo.

Nel D2, il tronco encefalico è bilateralmente positivo nel nucleo cocleare dorsale (CC), nel nucleo cocleare ventrale, nella parte posteriore (VCP), nel tratto spinale del trigemino (sp5) e nella radice vestibolare del nucleo vestibolococleare (8vn). Le strutture bilaterali della fibra nella zona del nucleo reticolare intermedio (Irt), e del nucleo reticolare gigantocellulare (Gi) sono profondamente positive. Un piccolo numero di cellule indipendenti nella zona reticolare gigantocellulare del nucleo (Gi) risulta fortemente positivo. La zona tegmentale, la zona



tegmentale dorsomediale (DMTg), il nucleo tegmentale latero-dorsale (LDTgV) sono bilateralmente positivi. La zona parabrachiale è positiva.

**Cervelletto:** Le fibre della sostanza bianca del cervelletto del gruppo di controllo sono fortemente positive. Lo strato molecolare e granulare e le cellule del Purkinje sono tutti negativi (Fig.7). In D1 e D2, le fibre iniziali del cervelletto, dai lobuli laterali e mediali, sono positive. Altrove la colorazione è simile al gruppo di controllo. Nel D2, la zona del cervelletto non è positiva. Tutti gli strati e le cellule, generalmente, sono scarsamente colorati.

## 4. Immunohistologia del recettore della serotonina (5HT<sub>1A</sub>)

### 4a. Cervello di topo adulto

**Proencefalo:** Nel controllo, molte zone corticali quali RSC, RSA hanno le cellule colorate benché le fibre siano meno colorate. Nella corteccia entorinale degli strati II, III, sia le cellule che le strutture della fibra sono fortemente positive. Nella regione ippocampale, cellule DG non sono colorate mentre sono positive quelle della regione CA1. Caudate putamen, striato, mt (tratto mammillo-talamico) sono positivi. Nella corteccia piriforme (Pir), poche cellule sono colorate (Fig. 8). Nel D1, la struttura corticale non è positiva. Nell'ippocampo le regione CA1 e DG sono entrambe leggermente positive. Il cingolo e le fibre alveolari sono positive. Inoltre, la maggior parte delle strutture subcorticali come lo striato, caudate putamen, fimbria, tratto mammillo-talamico (mt) sono positive. Il globus pallido è fortemente positivo. Il D2 appare generalmente meno colorato rispetto a O e D1. Gli strati corticali sono principalmente negativi. L'ippocampo è colorato a malapena, tranne il tratto CA3 che è leggermente positivo, eccetto il cingolo.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo, le strutture del tronco cerebrale sono fortemente positive. Specialmente i RPO, VLTg, MNR, PmNR sono colorati bene. In molti casi benché le cellule siano leggermente positive, le fibre sono generalmente ben colorate. (Fig. 9). Sia nel D1 che nel D2 lo strato corticale è completamente negativo. La zona di tronco encefalico è colorata meno intensamente rispetto allo strato corticale del O è completamente negativa. L'intera zona è meno intensamente colorata rispetto al controllo.

**Cervelletto:** Nel controllo, il cervelletto è colorato uniformemente in tutti gli strati e nella materia bianca. Tra le cellule del Purkinje alcune sono non colorate, altre colorate uniformemente e alcune intensamente (Fig. 9). Nel D1, la regione cerebellare risulta uniformemente poco colorata ma meno rispetto al controllo. Lo strato molecolare, lo strato granuloso incluso le cellule granulose sono colorate molto leggermente. Le cellule del Purkinje non sono positive. Nel D2, lo strato granulare è positivo e quello molecolare è negativo. La sostanza bianca e le fibre sono colorate fortemente. Le cellule del Purkinje sono negative.

## 4b. Cervello del topo neonato

### *P6*

#### **Proencefalo**

Le intere regioni del proencefalo in tutti i 3 gruppi (O, D1 e D2) sono negative, indicando la mancanza del sistema di recettore a questo stadio dello sviluppo in questa regione.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo, le cellule isolate del Collicolo e vicino al Nucleo Rosso sembrano essere positive. Nel D1, le grandi cellule in Amb (il nucleo di ambiguus) sembrano essere positive ma il tronco encefalico del D2, è completamente negativo.

**Cervelletto:** Le strutture cerebellari in tutti i 3 gruppi (il controllo, D1 e D2) sono uniformemente negative.

### *P14*

**Proencefalo:** Nel controllo, strutture corticali, ippocampo, cingolo e fibre alveolari, striato sono negativi. La zona della fimbria e lo striato ventrale sono leggermente positive. In D1 e in D2 il pattern di colorazione in molte strutture è simile a quello del controllo tranne una leggera positività nel caudate putamen e nel peduncolo cerebrale invece alcune fibre nella struttura talamica (ventral posteromedial thalamic nucleus-VPM) sono ben colorate.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo, il tronco dell'encefalo è ben colorato. I nuclei del rafe sono colorati fortemente bilateralmente. Il tratto di trigeminal spinale (sp5), il peduncolo inferiore cerebellare (icp), il tratto spinocerebellare ventrale (vsc) sono fortemente colorati. Le cellule di Medial Gigantocellular reticular nucleo(Gi) sono bilateralmente ben colorate. Alcune cellule in Gi sono fortemente colorate (Fig 10). Nel gruppo D1, analisi dettagliate mostrano molte aree ben colorate, in particolare nel nucleo del rafe, grandi cellule colorate intensamente, oltretutto, il tratto trigemino-spinale (sp5), il peduncolo cerebellare inferiore (icp), il tratto ventrale spinocerebellare (vsc) sono colorati intensamente. Le cellule del nucleo reticolare mediale gigantocellulare (Gi) sono ben colorate bilateralmente. Alcune cellule in Gi sono

colorate in maniera intensa. Il D2, nonostante la colorazione intensa, mostra nuclei che risultano meno colorati rispetto ai gruppi O e D1. Ma non ci sono differenze tra i pattern di colorazione dei due gruppi.

**Cervelletto:** Nel cervelletto del controllo, lo strato molecolare è leggermente positivo, anche gli strati granulari risultano positivi. Ma la sostanza bianca è molto positiva. Le cellule del Purkinje sembrano uniformemente colorate in molte aree. In D1, lo strato molecolare è meno positivo rispetto al controllo ma comunque ben colorato. Lo strato granulare non risulta molto positivo. Le cellule del Purkinje sono positive ma diversi livelli di positività si vedono nei diversi lobi. In D2, lo strato molecolare è meno positivo del controllo ma è ben colorato. Lo strato granulare non è molto positivo ma le cellule del Purkinje sono colorate poco e risultano uniformemente positive in diverse aree. Le fibre della sostanza bianca non mostrano una colorazione significativa.

## **P21**

**Proencefalo:** Nel controllo, le strutture del proencefalo sono positive fortemente. Sebbene negli strati corticali la colorazione specifica non si veda, gli strati profondi sono colorati bene e uniformemente. Alcune cellule piramidali grandi negli strati IV, V nella corteccia peririnale sono positive, ma le cellule vicine sono negative. L'ippocampo non è colorato in genere ma l'analisi accurata mostra che gli strati piramidali sono colorati uniformemente. Le cellule in CA1, CA2 e CA3 sono colorate bene ma non quelle di DG. Alcune cellule in hbc vicino a D3V, alveo, cingolo e strato oriens dell'ippocampo sono positive. La fimbria è positiva. Cp, Cpu, Gem sono positivi bilateralmente. Pv vicino al ventricolo 3 è poco positivo. Le fibre nello striato sono positive (Fig.11).

La corteccia in D1 è negativa. Ma il pattern di colorazione è simile a quello del controllo. Anche le cellule CA sono poco colorate. Poche cellule in hbc vicino al D3V, alveolo, cingolo, strato oriens dell'ippocampo sono positive. La fimbria è positiva. Cp, Cpu, Gem sono positivi bilateralmente. Pv vicino al ventricolo 3 è poco positivo. Le fibre nello striato sono fortemente positive. Anche le cellule grandi piramidali negli strati 4, 5 della corteccia peririnale sono positive; le cellule vicino sono negative. In D2 la corteccia e l'ippocampo sono generalmente negativi al contrario del controllo e D1, ma le strutture subcorticali e le fibre in genere sono colorate bene come gli altri 2 gruppi ma poco intensamente.

**Tronco dell'encefalo:** Il tronco è colorato bene nel controllo. I nuclei del rafe sono particolarmente colorati fortemente. In più, numerosi nuclei e le strutture delle fibre sono colorate bene indicando uno sviluppo avanzato del sistema recettoriale a questo stadio. Le aree specifiche come sp5, icp sono colorate fortemente. Py è colorato bene e Gi, GiA sono fortemente positivi (Fig. 12). In genere, le strutture del tronco dell'encefalo sono colorate meglio in D1 rispetto al controllo. Particolarmente i nuclei del rafe sono colorati fortemente indicando la stimolazione dell'espressione del recettore in questo gruppo. Sp5, icp sono colorati bene. DPGi mediale e DC sono colorati fortemente.

In D2, sebbene sia stata vista una buona colorazione, il tronco encefalico è colorato meno rispetto a O e D1. icp, sp5, DC sono colorati bene ma l'intera zona incluso Sol, DPGi non è colorata. (Fig 12).

**Cervelletto:** In O e in D1, lo strato molecolare è poco ma uniformemente colorato. Nello strato granulare sono delle cellule poco positive. La sostanza bianca del cervelletto e le fibre sono fortemente colorate. Le cellule del Purkinje sono colorate bene ma quelle di D1, sono meno colorate rispetto al controllo. In D2, lo strato molecolare risulta uniformemente meno colorato. Le cellule granulari sono positivi. Le cellule del Purkinje sono colorate scarsamente in alcune zone ma colorate bene in altre zone di un singolo lobo.

## 5. Immunohistologia del trasportatore della serotonina (SERT)

### 5a. Cervello del topo adulto

**Proencefalo:** La corteccia nel controllo non è molto colorata ma alcune zone mostrano gli specifici pattern di colorazione positivi. Le cellule di V2L, S1, RSA, RSG e tante fibre nella corteccia sono positive. Le cellule degli strati II, III della corteccia Pir, PRh sono positive. Nella corteccia entorinale mediale e in Lent, le cellule sono colorate fortemente (Fig. 13).

Nell'ippocampo gli strati piramidale e molecolare sono colorati uniformemente. I corpi cellulari di CA3 sono positivi. Lo strato interno del DG è positivo e quello esterno è negativo. Parecchi interneuroni sono positivi negli strati piramidali molecolari. Le fibre nello strato piramidale sono positive. Le cellule di CA3 all'interno degli strati molecolari e polimorfico di DG sono fortemente positive. Alveo è uniformemente positivo. Fimbria, le fibre di Cpu, LaDL, LaVL sono fortemente positive. BLA è positivo. Nello striato tante fibre sono fortemente positive. Mt e fornice sono positivi.

In D1, la corteccia è più colorata rispetto al controllo. Le cellule piramidali di CA sono colorate meglio di O. Le fibre di RSA e tante cellule negli strati profondi della corteccia sono colorate fortemente. Le cellule piramidali nello strato V sono positive in S1BF. Py è continuamente e fortemente colorato. Le cellule piramidali dell'ippocampo sono positive uniformemente e lo strato molecolare è colorato poco. I corpi cellulari di CA3 sono positivi. Lo strato interno di DG è positivo ma quello esterno è negativo. Molti interneuroni sono positivi negli strati molecolari e piramidali. Le fibre nello strato piramidale sono positive. In ilus, le cellule di CA3 e tanti interneuroni e lo strato polimorfico in genere sono fortemente colorati. Alveo è uniformemente positivo, fimbria è fortemente positiva.

Il D2 è molto più colorato del D1. Gli strati della corteccia sono colorati più di altri gruppi tranne lo strato I. Nell'ippocampo la regione CA è uniformemente positiva ma le cellule granulari di DG non sono positive e fibre nello strato polimorfico di DG sono positive in modo evidente. Tanti interneuroni e le fibre nella zona piramidale sono positivi. Fimbria Cpu, icp sono positive. Tanti gruppi di fibre sono positivi nello strato.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo, è fortemente e uniformemente positivo. I nuclei del rafe, Tz, ml sono ben positivi.. Tante fibre sono positive. ECIC, DCIC, CIC sono fortemente positivi. Le fibre di CIC, cic sono fortemente positive. LDTgV, VTg sono positivi. Alcune cellule sparse in solDM, solL, solM sono positive (Fig. 14). In D1 e D2 c'è un pattern di colorazione simile a quello del controllo ma è colorato meglio del controllo. Tante fibre e nuclei sono colorati fortemente in D1 rispetto al controllo. In D2, py è colorato fortemente e sp5 è colorato uniformemente.

**Cervelletto:** Nel controllo, lo strato molecolare e quello granulare sono uniformemente positivi. Tante cellule granulari sono ben colorate. Le cellule del Purkinje sembrano negative ma si notano scarsamente anche le cellule positive. Le fibre nella sostanza bianca sono fortemente positive (Fig 14). In D1 lo strato molecolare è meno colorato del controllo. Le cellule del Purkinje non sono colorate. Lo strato granulare è colorato ma non si vede la specifica colorazione delle cellule granulari. Le fibre nella sostanza bianca sono uniformemente positive. In D2, tutti gli strati e le cellule sono negativi.



## 5b. Cervello del topo neonato

### *P6*

Sia il **proencefalo** che il **tronco dell'encefalo** sono negativi in O, D1 e D2.

### *P14*

**Proencefalo:** Nel controllo, la corteccia e l'ippocampo sono negativi in genere. Le cellule piramidali di Cornu Ammonis mostrano una colorazione leggera e fine ma le cellule granulari di DG sono negative. Fimbria è positiva, il cingolo è continuamente positivo. Lo striato, Cpu, il nucleo amigdaloidale sono positivi. In D1, la corteccia e l'ippocampo sono negativi in genere. Il cingolo e lo striato sono positivi ma la fimbria è meno positiva di quella di O. Cpu, amigdala, opt sono positivi. In D2, la corteccia e l'ippocampo sono negativi in genere. Il cingolo è scarsamente positivo, lo striato e VLGPC sono meno positivi rispetto agli altri gruppi; opt è leggermente positivo. STh è anche positivo.

**Tronco dell'encefalo:** Nel controllo, i nuclei del rafe sono colorati bene in tutte le regioni. Le fibre di sp5, GiV sono fortemente colorate. L'intera struttura incluso icp, Gi, MeDL, Med, IntP è ben colorata in continuazione con le fibre della sostanza bianca (Fig. 15). In D1 i nuclei del rafe sono colorati meno intensamente rispetto al controllo. Sia il py che il nucleo reticolare sono positivi con delle fibre. CIC, ECIC, DCIC sono negativi. s5 è fortemente positivo. In D2, i nuclei del rafe sono colorati scarsamente. Sp5, Sp5c, DC sono intensamente positivi.

**Cervelletto:** In tutti i 3 gruppi, lo strato molecolare e quello granulare sono uniformemente negativi. Le cellule granulari e quelle dei Purkinje sono negative per il SERT. Solo le fibre della sostanza bianca sono colorate bene.

### *P21*

**Proencefalo:** Nel controllo, il pattern di colorazione è in genere intenso. La corteccia è uniformemente scarsamente colorata. L'ippocampo è negativo ma lo strato molecolare interno è leggermente colorato. Il cingolo, fimbria, le fibre del nucleo Genicolato (GV), Cpu, nucleo dell'amigdala basolaterale posteriore (BLP), nucleo dell'amigdala basolaterale anteriore (BLA),

amigdala sono intensamente positivi. Il tratto mammillotalamico (mt) e la commissura abenculare (hbc) sono positive bilateralmente. Le fibre della capsula interna (Ic), peduncolo cerebrale (cp), nucleo tubero mediale (Mtu) sono fortemente positive (Fig.16). In D1, il pattern di colorazione è simile a quello di O ma l' intensità di colorazione è minore; invece in D2 l' intensità di colorazione è molto ridotta. Gli strati della corteccia non sono colorati. Corno dell'ammone dell'ippocampo, DG e lo strato molecolare sono colorati molto leggermente. La fimbria, il cingolo, lo striato sono colorati molto meno rispetto al controllo e al D1.

**Tronco dell'encefalo:** Allo stadio P21, questa zona è intensamente molto positiva rispetto agli stadi di P6, P14. I nuclei del rafe, il tratto spinale trigeminale (sp5), il tratto piramidale (py), nucleo olivo- inferiore sono fortemente positivi. Il nucleo cuneato (Cu) è positivo, il nucleo ipoglossale (12N) è positivo leggermente, il nucleo del tratto solitario (SolC) è negativo (Fig. 17). In D1 e in D2, sia l'intensità che il pattern di colorazione sono simili a quelli di O. In D2, nucleo ventrale di lemniscus laterale (VLL), la radice motoria 5n (m5), il nucleo pontino (Pn) e le fibre di Pn, del lemniscus mediale (ml) e di xscp sono fortemente positive. Il grigio periacquedottale è totalmente negativo.

**Cervelletto:** Nel controllo, in D1 e in D2 lo strato molecolare e quello granulare sono negativi. Le cellule del Purkinje non sono positive. In O, alcune cellule granulari sembrano positive ma la sostanza bianca è fortemente positiva (Fig. 17); in D1, le cellule granulari sembrano positive ma non uniformemente e la sostanza bianca è fortemente positiva rispetto al controllo. In D2, la colorazione della sostanza bianca è molto ridotta rispetto al controllo e al D1.

## **Cervello di pecora**

### **6. Istologia e immunoistologia della serotonina:**

#### **6a. Cervello della pecora adulta**

##### **Proencefalo:**

##### ***Corteccia frontale:***

Nel Controllo Adulto (CA), tanti gruppi di cellule positive alla serotonina si notano negli strati IV e V. Le cellule piramidali e triangolari sono positive. Ci sono 2 tipi di cellule positive, alcune sono fortemente positive alcune sono leggermente positive. Nello strato I cioè lo strato molecolare, in genere senza cellule, le fibre isolate sono positive. I vasi sanguigni sono sani. In Nell'adulto esposto alla diossina (DA) tante cellule sono generalmente e leggermente colorate. Si notano (sotto la corteccia) numerosi vacuoli e cellule in degenerazione In altri strati la colorazione è leggera e uniforme. Lo strato molecolare contiene le particelle cellulari. Le strutture di fibre sono positive. I vasi sanguigni sono ritratti e staccati dal tessuto. (Fig. 18)

##### ***Corteccia parietale:***

In CA, lo strato molecolare è leggermente positivo. Le cellule piramidali solitarie, leggermente o fortemente colorate sono negli strati V, VI. Lo strato I è fibroso con pochissime cellule. Ci sono 2 tipi di cellule positive, alcune sono fortemente positive altre sono leggermente positive, ma sono meno di quelle della corteccia frontale (Fig. 19). In DA, lo strato molecolare è leggermente positivo e un gran numero di cellule sono positive leggermente e ci sono tante cellule in fase di degenerazione. I vasi sanguigni sono ritratti e non sono in numero simile a quello della corteccia frontale. Ci sono molti vacuoli. Le fibre solitarie sono positive.

##### ***Corteccia occipitale:***

In CA, tante cellule solitarie piramidali sono colorate debolmente. Negli strati profondi, si notano cellule piramidali colorate fortemente. Non ci sono vacuoli. I tratti delle fibre sono positivi leggermente. In DA, si notano solo cellule colorate leggermente. Ci sono tanti vacuoli. Le fibre sono fortemente positive.

**Talamo:** In CA, pochissime cellule sparse sono positive, ci sono dei vacuoli, le fibre sono debolmente o negativamente colorate. I vasi sanguigni sono sani. (Fig. 20). In DA, i vacuoli sono più abbondanti rispetto al controllo. Le cellule sono positive e ci sono vasi sanguigni staccati.

**Ipotalamo:** In CA e DA pochissime grandi cellule solitarie sono positive, i vasi sanguigni sono positivi.

**Midollo (Medulla):** In CA, ci sono le cellule grandi e piccole fortemente positive in gruppi. Alcune cellule sono fortemente positive e alcune sono leggermente positive. In genere ci sono tanti vacuoli. Le fibre sono sottili e positive (Fig. 22, 23). In DA, ci sono gruppi di cellule positive ma tante cellule sembrano vuote. Ci sono grandi cellule in degenerazione, staccate dalla massa. Ci sono vacuoli e sono in più in rispetto al controllo. Le fibre sono sottili e positive.

**Ponte (Pons):** In CA, si trovano tante cellule positive grandi e piccole. Abbondanti fibre che sono sottili e solitarie sono colorate intensamente (Fig 24). In DA, le cellule sono sottili. Numerosi vacuoli sono presenti, la struttura fibrosa è ridotta e leggermente colorata. Si notano cellule in degenerazione.

**Cervelletto:** In CA, tante cellule del Purkinje sono fortemente positive, alcune sono negative. Le fibre centrali sono ben positive in alcune zone e in altre sono debolmente positive. Ci sono vacuoli nelle fibre centrali. Molte cellule e alcune fibre sono positive nello strato granulare. Lo strato molecolare è leggermente positivo (Fig. 21). In DA, ci sono poche cellule del Purkinje colorate meno intensamente rispetto al controllo. Si trovano vacuoli nelle fibre centrali che sono colorate bene; negli strati intergranulari il numero di vacuoli è maggiore. Cellule intensamente colorate, si notano nello strato granulare.

## **6b. Cervello della pecora neonata:**

### **Proencefalo:**

**Corteccia frontale:** In CN le fibre sono colorate leggermente. Sono positivi tanti gruppi di cellule (piccole) (Fig. 18). In DN le fibre sono fortemente colorate. Ci sono tanti vacuoli tra le fibre. Le cellule di misura media sono debolmente positive.

**Corteccia Parietale:** In CN, la colorazione è debole. Le fibre sono colorate leggermente. Si trovano poche cellule positive e i vasi sanguigni (Fig. 19). In DN le fibre sono fortemente colorate, ci sono tanti vacuoli nelle fibre, il tessuto è danneggiato. Ci sono numerose cellule piccole positive.

**Corteccia Occipitale:** In CN, le fibre sono colorate leggermente ma meglio di quelle della corteccia parietale. Le cellule sono maggiormente negative e cellule di misura media sono colorate leggermente negli strati IV e V (Fig. 19). In DN, le fibre sono colorate fortemente, ci sono tanti vacuoli tra le fibre e nella corteccia. Piccole cellule piramidali colorate debolmente sono negli strati IV e V. La positività è strato-specifica.

**Talamo:** In CN i vasi sanguigni sono colorati bene. Poche cellule leggermente positive si notano. In DN, ci sono aree delle fibre leggermente colorate. Tanti vacuoli sono presenti, i vasi sanguigni sono colorati bene, le cellule sono colorate leggermente.

**Ipotalamo:** In CN, è leggermente colorato, le cellule sono piccole, lunghe e sottili. Alcuni vasi sanguigni sono leggermente o fortemente colorati, alcune cellule sono colorate debolmente (Fig. 20). In DN, le fibre sono colorate fortemente, le cellule grandi sono colorate. Le cellule non sembrano colorate ma i vasi sanguigni sono colorati. Numerosi vacuoli sono presenti.

**Midollo (Medulla):** In CN, in genere l'intero tessuto è colorato leggermente. Lo strato I è uniformemente ben colorato e tanti tipi di cellule sono colorati debolmente. I vasi sanguigni sono colorati e tanti vacuoli sono presenti (Fig. 23). DN è colorato meglio del controllo specialmente negli strati I e II. Le cellule sono colorate più del controllo. Le fibre sono colorate bene e distintamente. I vacuoli sono molto in più rispetto al controllo.

**Ponte (Pons):** In CN è in genere colorato leggermente e uniformemente ma solo poche cellule sono colorate positive. (Fig. 24). DN in genere è colorato meglio del controllo, anche le cellule sono più colorate del controllo. Alcune cellule sono positive fortemente, le fibre sono grosse e colorate uniformemente. Tanti vacuoli sono presenti. Tutti i tipi di cellule sono colorati positivi.

**Cervelletto:** In CN le fibre sono leggermente positive. Lo strato molecolare e quello granulare sono positivi leggermente. Alcune cellule del Purkinje sono positive debolmente invece altre sono intense (Fig.21). In DN, le fibre sono fortemente positive con tanti vacuoli. Le cellule del Purkinje sono positive in molte zone ma non intensamente. Gli strati granulari sono positivi ma quelli molecolari non sono positivi.

## 7. Immunoistologia del recettore della serotonina 5-HT<sub>1A</sub>

### 7a. Cervello della pecora adulta

#### **Proencefalo:**

**Corteccia frontale:** Nel Controllo Adulto (CA), tutti gli strati sono positivi ma le zone specifiche sono negative. Le cellule piramidali negli strati III, IV sono positive. Le cellule piramidali grandi e i vasi sanguigni sono positivi. Le cellule sono positive ma le fibre sono negative (Fig. 25). Nell'adulto esposto alla diossina (DA) alcune cellule sono fortemente positive ma tante cellule sono leggermente positive. Qualche zona è negativa. Le cellule piramidali sono in fase di degenerazione.

**Corteccia parietale:** In CA si nota la colorazione di grandi e piccole cellule piramidali con lunghe fibre negli strati III e IV. Ci sono vacuoli nelle fibre (Fig. 26). In DA sono presenti tante piccole cellule positive. Numerose cellule piramidali grandi sono colorate leggermente negli strati II e IV.

**Corteccia occipitale:** In CA, gli strati I e II sono uniformemente negativi. L'altro strato è in genere colorato bene. Le fibre sono debolmente positive. Specifiche cellule piramidali di varia misura sono positive leggermente. In DA, l'intera struttura è più positiva particolarmente negli strati profondi. Lo strato I è positivo. Le cellule piramidali di vari tipi sono fortemente colorate.

**Talamo:** In CA, le cellule sono leggermente colorate, la struttura vascolare è ben colorata e le fibre sono debolmente positive (Fig. 27). In DA, ci sono delle zone colorate intensamente o leggermente. Le fibre sono colorate intensamente. La struttura vascolare è colorata più del controllo.

**Ipotalamo:** In CA, il tessuto è scarsamente colorato e le strutture vascolari sono leggermente colorate. In DA nelle zone specifiche, cellule grandi e piccole sono colorate più del controllo. Si notano cellule in degenerazione con vacuoli. La struttura vascolare è positiva fortemente ed è staccata.

**Midollo (Medulla):**

**CA:** Si trovano cellule piramidali, formazione reticolare e fibre sottili positive con numerosi vacuoli. (Fig. 28). In DA cellule senza nuclei sono evidenti nello strato esterno. Le cellule piramidali sono colorate intensamente. Le fibre sembrano sottili ma forti. Ci sono più vacuoli rispetto al controllo.

**Ponte (Pons):** In CA alcune zone non sono colorate e tante zone sono ben colorate e si notano distinte grandi cellule. In DA le cellule sono leggermente colorate, i vasi sanguigni sono staccati e ci sono tante cellule in fase di degenerazione.

**Cervelletto:** In CA, molte cellule del Purkinje sono fortemente colorate e alcune sono debolmente colorate. Nello strato molecolare le fibre sono leggermente positive. Le fibre centrali non sono colorate ma pochissime cellule granulari sono leggermente colorate (Fig. 29). In DA, sono presenti numerosi vacuoli nella sostanza bianca. Le fibre e le cellule del Purkinje sono colorati intensamente. Lo strato granulare è fortemente colorato. Lo strato molecolare è ben colorato.



## **7b. Cervello della pecora neonata:**

### **Proencefalo:**

**Corteccia frontale:** In CN, le fibre ed i vasi sanguigni sono leggermente colorati. Si trovano delle cellule positive. In DN le fibre sono fortemente colorate. I vasi sanguigni non sono colorati. Lo strato è leggermente e uniformemente colorato (Fig.25).

**Corteccia Parietale:** In CN, le fibre sono colorate bene e si notano vari tipi di cellule che sono in genere negative (Fig.26). In DN, le fibre sono ben colorate.

**Corteccia Occipitale:** In CN, le fibre sono ben colorate ma le cellule sono negative invece in DN, le fibre sono colorate meglio rispetto al controllo.

**Talamo:** In CN la colorazione è leggera e dispersa in alcune aree. Le cellule non sono colorate ma le fibre sono leggermente colorate. In DN, la colorazione è meno intensa rispetto al controllo. Le cellule sono debolmente colorate.

**Ipotalamo:** In CN, in alcune zone limitate le fibre sono colorate. Molte cellule sono debolmente positive e le altre sono fortemente positive (Fig. 27). In DN, alcune zone sono colorate fortemente, in alcune aree le fibre sono colorate intensamente. Le cellule sono colorate meglio del controllo.

**Midollo (Medulla):** In CN, le fibre centrali sono poco evidenti, molte cellule sono leggermente positive, le strutture vascolari non sono colorate. Gli strati esterni del midollo non sono positivi. Gli strati reticolari sono fortemente positivi e le altre cellule sono in genere negative (Fig. 28). In DN, il pattern di colorazione è simile a quello del controllo ma è migliore.

**Ponte (Pons):** In CN, alcune zone sono negative e in alcune, i gruppi di fibre e cellule sono ben positive. In DN, molte cellule sono leggermente positive e le fibre sono sottili e leggermente positive. La struttura vascolare non è positiva.

**Cervelletto:** In CN le fibre sono ben colorate. Cellule del Purkinje sono leggermente e uniformemente colorate in alcune zone, in altre zone non sono colorate invece sono colorate

benealtrove. Lo strato granulare è negativo ma le cellule granulari sono positive. Lo strato molecolare è colorato leggermente (Fig. 29). In DN, lo strato molecolare è leggermente e uniformemente colorato. Le cellule granulari sono positive. Le cellule del Purkinje mostrano diversi tipi di colorazione, nulla, leggera o intensa. Le fibre di cellule del Purkinje sono positive in molte zone. La struttura fibrosa è intensamente positiva.

## 8. Immunoistologia del trasportatore della serotonina SERT

### 8a. Cervello della pecora adulta

#### **Proencefalo:**

**Corteccia frontale:** Nel Controllo Adulto (CA), le fibre sono scarsamente positive. I vari strati sono scarsamente colorati. Nell'Adulto esposto alla diossina (DA), le fibre sono scarsamente positive ma meglio di quelle del controllo.

**Corteccia parietale:** In CA, particolarmente le fibre sono positive in un'area vasta. Le cellule non sono positive (Fig. 30). In DA, non si vede la colorazione positiva.

**Corteccia occipitale:** in CA non è molto colorata. Gli strati profondi sono leggermente positivi. In DA, la colorazione di vari strati è minore rispetto al controllo.

**Talamo:** In CA, molte fibre sono positive, non si trovano cellule positive. In DA, le cellule e le fibre non sono colorate.

**Ipotalamo:** In CA e DA le cellule o le fibre non sono positive.

**Midollo (Medulla):** In CA la rete reticolare è fortemente positiva, le fibre sono positive, anche le strutture vacuolari sono positive (Fig. 31). In DA il midollo è debolmente positivo rispetto al controllo in varie zone.

**Ponte (Pons):** In CA, una vasta area è positiva, le fibre sono positive, le cellule grandi sono negative (Fig. 32). In DA, le fibre sono debolmente positive e le cellule grandi sono negative.

**Cervelletto:** In CA le fibre interne sono fortemente positive. In CA e DA le cellule del Purkinje e quelle granulari sono negative. Lo strato molecolare è negativo (Fig.33). In DA, le cellule del Purkinje si trovano raramente e nello strato granulare si notano i vacuoli.

## **8b. Cervello della pecora neonata:**

### **Proencefalo:**

**Corteccia frontale:** in CN è in genere negativa. Le cellule sono maggiormente negative, le fibre sono leggermente positive (Fig. 30). In DN, la struttura delle fibre è maggiormente positiva rispetto al controllo, le cellule sono maggiormente negative.

**Corteccia Parietale:** In CN le fibre sono positive e le cellule non sono colorate. Non ci sono vacuoli. In DN, le fibre sono positive simile al controllo e le cellule non sono positive.

**Corteccia Occipitale:** In CN, le cellule non sono positive. Negli strati I e II le fibre sono leggermente positive. I vasi sanguigni sono negativi. Si notano pochi vacuoli (Fig. 30). In DN, le fibre sono colorate più rispetto al controllo. La corteccia è negativa, non si trovano le cellule positive. Ci sono molti vacuoli nelle fibre.

**Talamo:** In CN, le fibre sono scarsamente positive. In DN, le fibre sono scarsamente positive come quelle del controllo.

**Ipotalamo:** In CN le cellule non sono colorate e le fibre sono negative (Fig. 34). In DN alcune zone sono colorate uniformemente e fortemente con dei vacuoli. Le cellule sono negative e anche le fibre sono negative.

**Midollo (Medulla):** In CN, le fibre sono leggermente colorate. Vari tipi di cellule con distinti nucleoli sono presenti ma non sono positivi. La **rete reticolare** è leggermente positiva ma le cellule grandi spesso trovate nella vicinanza non sono positive (Fig. 31). In DN, la colorazione è migliore rispetto al controllo. La **rete reticolare** è fortemente positiva. Le fibre sono ben colorate. Tra i vari tipi di cellule, nessuna è positiva.

**Ponte (Pons):** In CN, le fibre sono leggermente colorate ma le cellule non sono colorate. I vasi sanguigni sono negativi (Fig. 32). In DN, tante fibre sono colorate ma l'intensità della colorazione è simile a quello del controllo. Le cellule non sono positive e numerosi vacuoli si trovano nel ponte.

**Cervelletto:** In CN le fibre sono leggermente positive, le cellule del Purkinje sono negative. Lo strato molecolare e quello granulare è negativo (Fig. 33). In DN, le fibre sono maggiormente positive rispetto al controllo. Le cellule del Purkinje e quelle granulari sono negativi. Lo strato molecolare e quello granulare sono negativi.

## DISCUSSIONE

Le informazioni nel cervello vengono processate in maniera seriale e parallela in multifocale e sono distribuite attraverso dei network. L'attività, e quindi l'impatto di questi network locali sull'intero funzionamento del cervello è controllato da proiezioni estese e parzialmente sovrapposte appartenenti a molti sistemi di trasmissione che funzionano globalmente. Tra i sistemi di trasmissione, è di particolare interesse il sistema serotonergico, che è coinvolto nella regolazione di svariate funzioni cerebrali.

Si suppone che alterazioni nei pattern di emissione e d'attività di questi sistemi possano svolgere un importante ruolo in varie malattie psichiatriche, che si cerca di regolarizzare mediante trattamenti a base di psicofarmaci. Durante lo sviluppo del cervello, proiezioni serotonergiche svolgono un ruolo nell'organizzazione del controllo dell'estensione assonale e nella formazione di sinapsi. Mentre, nel cervello adulto, sono coinvolte anche nella stabilizzazione e nella riorganizzazione della connessione neuronale in punti di proiezione distanti. Queste funzioni da non-trasmittitore pare che siano mediate principalmente dall'attivazione dei recettori 5-HT degli astrociti, effettuando un'alternanza tra produzione e rilascio di vari fattori di crescita neurotrofici. Durante la maturazione del cervello, la funzione iniziale della serotonina è quella trofica. L'organizzazione dei segnali viene gradualmente sostituita dal suo ruolo predominante di neurotrasmettitore e neuromodulatore, per cui l'iniziale plasticità delle proiezioni serotonergiche in via di sviluppo viene rimpiazzata da un pattern d'innervazione più stabile nelle loro terminazioni. Tale pattern, come ad esempio, la densità delle fibre serotonergiche afferenti e presinaptiche in varie proiezioni viene influenzata da variabili ambientali come stimoli psicosociali, stress, perdita di legami, ma anche trattamenti farmacologici o nutrizionali nei primi periodi dello sviluppo del cervello. Anche nel cervello adulto, il pattern d'innervazione serotonergico risulta più plastico di quanto si pensasse. La densità degli assoni serotonergici terminali nei campi di proiezione individuali potrebbe aumentare per ramificazioni assonali e formazione di nuove sinapsi, o diminuire per degenerazione sinaptica o per la perdita di terminali assonici indotta da stupefacenti.

Molte di queste conoscenze provengono da studi effettuati sugli animali di laboratorio. Di solito, in alcuni studi, gli effetti di alcuni trattamenti ambientali o farmacologici, su uno o più parametri neurochimici, sono studiati in singole regioni cerebrali sia durante lo sviluppo del cervello, sia nello stadio adulto che nella senescenza. Qui, abbiamo scelto di studiare il primo periodo dello sviluppo postnatale del cervello.

**Serotonina:** Abbiamo progettato gli esperimenti per avere un'ampia visione di questo sistema di neurotrasmissione, oltre che per capire come venga interessato dall'azione di importanti contaminanti ambientali (diossina), in un modello sperimentale (topo) ed in un modello di rilevanza nutrizionale (pecora). Abbiamo studiato tutte le 3 principali componenti del neurotrasmettitore serotonina, il ligando serotonina, il suo recettore HT-<sub>1A</sub> ed il suo trasportatore, per comprendere meglio i meccanismi d'azione molecolari della diossina su questo neurotrasmettitore chiave.

Nel nostro studio, le femmine di topo sono state trattate con 5 o 10 µg/kg di TCDD, per 14 giorni e la loro prole è stata studiata al 6<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> giorno postpartum (pp). In generale, dai nostri esperimenti, si deduce che la diossina nel topo adulto, ad entrambe le concentrazioni adoperate (D1 e D2), produce un aumento dell'espressione di serotonina nel tronco encefalico (Fig.2). Questi effetti riguardano anche le regioni encefaliche del topo in via di sviluppo a P6, P14 e P21 (Fig. 3, 4, 7). Di conseguenza, possiamo ribadire che la diossina aumenta l'espressione immunohistologica della serotonina sia nel cervello adulto che neonatale (P6, P14, P21). Invece nello studio di Kuchiiwa et al (2002), le femmine erano trattate per 8 settimane con diossina (4.9 ng/kg, 0.499ng/kg) e allo stadio P42, in topi maschi, il numero di neuroni immunoreattivi per la serotonina è ridotto nei nuclei del rafe, implicando, che la TCDD in utero e/o attraverso il latte materno, può agire come neuroteratogena. Quindi l'effetto di diossina sulla sintesi o funzione di serotonina può anche dipendere dal dosaggio, dal tempo di esposizione e forse altri criteri come gli ormoni (Satoshi et al 2002).

I nostri studi sono in accordo con lavori precedenti che hanno riportato un aumento del turnover della serotonina cerebrale, in ratti trattati con diossina, mediante l'aumento dei livelli dell'aminoacido triptofano, precursore della serotonina, e del suo metabolita, l'acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA) (Tuomisto et al. 1990; Unkila et al 1993).

Per quanto riguarda l'espressione della serotonina nelle regioni corticali del cervello di topo adulto (Fig. 1), abbiamo riscontrato una riduzione significativa, sia a D1 che a D2, ma a P6 e P21 si evidenzia un marcato miglioramento.

Nella struttura ippocampale dell'adulto, abbiamo riscontrato scarsa espressione di serotonina nel controllo. Situazione che abbiamo trovato anche nei cervelli in via di sviluppo. Mentre nel cervello di controllo a P21, abbiamo visto una buona positività che risulta ridotta in D1. Questi dati potrebbero indicare la plasticità delle fibre serotoninergiche in via di sviluppo indotta dalla diossina.

Le fibre serotoninergiche nella regione cerebellare potrebbero giocare un ruolo importante nelle funzioni motorie. Qui, sebbene lo strato granulare non esprima cospicue quantità di fibre

serotonergiche, abbiamo osservato che sono espresse negli strati molecolari e nelle cellule del Purkinje. Inoltre, le fibre di proiezione risultano ben colorate (Fig. 2). Si nota un drastico cambiamento di queste fibre nel cervello del topo adulto trattato con diossina poiché i livelli d'espressione aumentano significativamente. Mentre, riguardo al cervelletto postnatale, abbiamo osservato un'aumentata colorazione per serotonina nelle cellule del Purkinje allo stadio P6. Queste osservazioni potrebbero anche confermare la neuroplasticità del sistema serotonergico nello sviluppo del cervelletto, nei primi stadi postnatale, sebbene ciò non sia sostenibile per gli stadi successivi (P14 e P21) (Fig. 7).

**Recettore:** L'immunoistochimica per il 5HT-<sub>1A</sub> nel cervello di topo adulto di controllo, ha evidenziato la presenza di questo recettore in regioni specifiche del cervello. Molte regioni corticali non mostrano alcuna presenza o solo una scarsa presenza di questo recettore nel nostro topo di controllo adulto. Ma la corteccia entorinale è ben colorata, soprattutto negli strati II e III. Le regioni dell'ippocampo CA1 appaiono piuttosto colorate, sebbene DG non sia molto positivo. Anche il cingolo, lo striato ed il nucleo mammillo-talamico dell'encefalo si colorano fortemente. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni effettuate da Aznar et al. (2003) che hanno evidenziato cellule immunopositive attraverso tutto il proencefalo di ratto, soprattutto nella corteccia ed il setto.

Il trattamento con diossina (D1, D2), sebbene abbia inibito l'espressione del recettore nella corteccia entorinale (Fig. 8), in altre regioni come il cingulum e la maggior parte dello striato l'espressione del recettore non è alterata nel D1 ma soltanto leggermente nel D2. Quindi prendiamo nota che l'effetto inibitorio della diossina sul recettore risulti altamente cellulo- e regione-specifico.

Nell'ippocampo, la regione di CA1 è positiva ma il giro dentato non sembra di esprimere il recettore. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Aznar et al. (2003).

La serotonina produce delle azioni opposte e complementari sulla funzione neuronale, maturazione, proliferazione e apoptosi tramite 5HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2A</sub>. Il recettore 5-HT<sub>1A</sub> si manifesta nel SNC durante le prime fasi dello sviluppo postnatale e sembra partecipare alla cessazione della proliferazione e alla differenziazione; nel cervello adulto, i recettori 5-HT<sub>1A</sub> sembrano essere coinvolti nel mantenimento dello stato maturo dei neuroni (Azmitia 2001).

Anche se tutti i recettori serotonergici sono espressi di preferenza da neuroni non-5HT e perciò localizzati postsinapticamente rispetto alle fibre 5-HT ed ai terminali, essi possono essere localizzati presinapticamente, ad esempio a livello assonale o terminale dei neuroni. Questo è il

caso dei nuclei del rafe, per quel che riguarda 5HT-<sub>1A</sub>. Come già riportato ampiamente in letteratura, questi recettori sono divenuti oggetto di importanti studi sperimentali perché essi funzionano da autorecettori e così controllano la funzione delle stesse cellule serotoninergiche dei nuclei del rafe.

Nel nostro lavoro abbiamo riscontrato una forte espressione di 5HT-<sub>1A</sub> nei nuclei del rafe nel cervello adulto di topo (Fig. 9), e tale espressione non viene modificata dal trattamento con diossina. Le osservazioni sull'espressione della serotonina hanno indicato che la diossina aumenta l'espressione di serotonina nei nuclei del rafe. Quindi è possibile supporre che sia il ligando che il recettore nelle cellule serotoninergiche del rafe possano essere ampiamente attivate.

E' possibile che molte disfunzioni comportamentali riportate in letteratura (vedi Introduzione) potrebbero essere attribuite fondamentalmente all'alterazioni del sistema serotoninergico, come si è evidenziato in questo lavoro. In effetti, il meccanismo autorecettoriale 5HT-<sub>1A</sub> rappresenta uno degli argomenti più studiati e più discussi in letteratura (Stamford et al 2000).

La corteccia cerebellare mostra piuttosto una buona presenza dell'espressione del recettore. Tra le cellule del Purkinje abbiamo osservato diversi tipi d'espressione, alcuni fortemente positivi, altri debolmente positivi ed altri ancora negativi. E' ben noto che non tutte le cellule del Purkinje siano coinvolte nel meccanismo serotoninergico, ma a prescindere da ciò, la diossina invariabilmente inibisce l'espressione del recettore totalmente nelle cellule del Purkinje. Comunque è interessante notare come l'inibizione non avvenga nelle fibre della materia bianca, in cui il recettore è ben espresso positivamente nel controllo ed appare inalterato nei cervelli esposti alla diossina.

Durante lo sviluppo postnatale il sistema recettoriale 5HT-<sub>1A</sub> non è sviluppato nella maggior parte delle strutture del cervello a P6, sebbene il collicolo ed il nucleo rosso presentino alcune positività. Ma a partire da P14 l'espressione del recettore è adeguatamente sviluppata. Il tronco encefalico, in generale, ed il nucleo del rafe esprimono il recettore ed è interessante considerare che la diossina non riesce ad inibire l'espressione del recettore sia nelle regioni del proencefalo che del tronco encefalico. Tutto ciò è in accordo con le nostre osservazioni. Infatti la serotonina non è inibita dalla diossina nel tronco encefalico, sebbene sia inibita in alcune zone del proencefalo. Ci domandiamo se l'espressione della serotonina a P14 possa essere regolata principalmente da un meccanismo autorecettoriale già a questo stadio. Similmente a P21, l'espressione del recettore nel tronco encefalico appare piuttosto resistente alla diossina (Fig. 12). Queste osservazioni dovrebbero essere prese in considerazione nelle applicazioni cliniche terapeutiche basate sulla serotonina, sia nel neonato che nell'adolescente, in terapia umana. Dallo



stadio P14 compare un'espressione del recettore leggera ed uniforme in tutte le aree del cervelletto, tranne nelle fibre della materia bianca dove l'espressione appare veramente notevole. Comunque, tale espressione viene inibita dalla diossina in maniera dose-dipendente. In particolare, a P21, l'inibizione appare più evidente. Queste osservazioni confermerebbero il ruolo chiave del sistema recettoriale 5HT-<sub>1A</sub> nei danni motori provocati in animali esposti alla diossina. Inoltre, potrebbero anche avere una rilevanza nelle malattie umane che coinvolgono la serotonina.

**Trasportatore della serotonina:** Il reuptake di serotonina dai neuroni serotoninergiche è il meccanismo principale di terminazione dell'azione del trasmettitore sui siti postsinaptici e questo processo è effettuato dal trasportatore della serotonina (SERT) situato sulla membrana plasmatica. Nello studio presente, nel topo adulto SERT è espresso uniformemente in parecchie regioni del proencefalo. La corteccia visiva, la corteccia RSC mostra una buona espressione di SERT. Nell'ippocampo le regioni del Corno di Ammone sono uniformemente positive. Inoltre, in CA2 il soma delle cellule piramidali è inoltre positivo. In più gli interneuroni sono positivi. Così l'espressione di SERT avviene non soltanto nel soma delle cellule piramidali e degli interneuroni, ma anche sia sulle fibre di proiezione che quelle locali. I trattamenti della diossina (sia D1 che D2) migliorano in maniera drammatica l'espressione di SERT nella maggior parte delle strutture del proencefalo. Ciò è vero nei nuclei del rafe ed in altre strutture del tronco dell'encefalo. Quindi è evidente che indipendentemente dalla modalità con cui la diossina agisce (inibisce o stimola) sulla serotonina o sul relativo recettore 5HT-<sub>1A</sub>, il SERT è stimolato invariabilmente dalla diossina. A livello molecolare, è ben accettato che le proteine di trasporto dell'ammina sono sotto il controllo di vari vie di trasduzione del segnale (signal transduction pathways) che controllano il livello finale dei trasportatori di superficie (Blakelt e Bauman 2000). È possibile che esista un meccanismo universale per cui un'alterazione dipendente dalla tossicità nel sistema del trasmettitore potrebbe indurre il livello del trasportatore in modo da accertare il livello fisiologico del trasmettitore nei siti presinaptici. Tuttavia a nostra conoscenza non c'è nessuna prova a disposizione nella letteratura per sostenere questa ipotesi.

Nel cervelletto dell'adulto un certo livello di SERT viene espresso delle cellule del Purkinje questo è inibito dalla diossina. Tuttavia le strutture della fibra della materia bianca sembrano uniformemente positive sia nei controlli che in quelli trattati con diossina.

Durante il sviluppo postnatale (P6), il cervello è negativo per il SERT come per il recettore 5HT<sub>1A</sub>. Sulla base di rilevazione immunoistochimica, nel topo normale, il SERT viene espresso fra la nascita e 1 settimana di vita, con l'espressione massima intorno a 3 settimane dell'età, che declina verso l'età adulta (Thompson and Lauder 2005). Il nostro risultato è d'accordo con queste osservazioni precedenti.

Al giorno P14 osserviamo un fatto molto interessante: SERT è espresso ad un livello elevato nel tronco dell'encefalo nel controllo. Questo viene inibito totalmente in cervelli D1 ma in D2 questo livello ancora una volta è ristabilito. In P21 l'espressione di SERT è mantenuta alta in tutti i gruppi, sia nel controllo che in D1 ed in D2. Quindi sembra essere un fatto di maturazione per quanto riguarda il SERT ed a P21 la protezione del meccanismo della neurotrasmissione della serotonina con la disponibilità di SERT presinaptico è in pieno, simile a quella del controllo.

**Sistema serotoninergico nella pecora:** Nello studio presente è stata usata anche la pecora poichè è un modello di animale da fattoria, non soltanto per il relativo valore nutritivo, ma in effetti nella Regione Campania tantissime pecore sono state esposte alla diossina ambientale di origine industriale. Le pecore adulte e quelle neonate sono stati ottenuti dalle campagne in cui gli animali sono stati confermati per contenere un livello elevato della diossina nel relativo tessuto adiposo e conseguentemente legalmente sono stati proibiti per l'uso ed erano sotto la cura degli ispettori sanitari ufficiali.

Le osservazioni istologiche mostrano la formazione dei vacuoli nella maggior parte del cervello sia quello dell'adulto che quello neonatale. Questa condizione è molto severa in medulla e nel ponte (Fig. 22, 28). In fatti la formazione dei vacuoli è considerata come un segnale per le condizioni patologiche. Inoltre troviamo numerosi siti nei quali, i vasi sanguigni sono staccati dalla massa generale del tessuto. Questo danno ai vasi sanguigni può formare una base fondamentale per tante altre condizioni patologiche sia in adulto che in neonato.

L'espressione di serotonina nelle zone corticali di pecora adulta è ovvia e l'immunoreattività si presenta nelle fibre e nel soma delle cellule piramidali e in interneuroni implicando una proiezione vasta delle fibre serotoninergiche direttamente a soma ed a agli assoni e dendriti dei neuroni individuali (Fig 19). Ma in cervello esposto alla diossina, vari interneuroni sono positivi in soma ma le fibre sono negative. Invece nelle regioni subcorticali come il talamo di controllo adulto, le cellule sono debolmente positive ma le proiezioni delle fibre sono positive alla

serotonina. Questo può indicare che le fibre serotoninergiche che originano dal tronco encefalico, non sono in grado di fornire ai neuroni efferenti della struttura corticale. Questo può essere uno dei meccanismi dal quale la diossina interferisce con gli aspetti funzionali della corteccia nella pecora adulta.

Notevolmente le strutture corticali nella pecora neonata, sono colorati intensamente sia in controllo che in quella esposta alla diossina. Sembra chiaro che in neonato della pecora c'è un incremento nelle proiezioni serotoninergiche, il quale sembra specifico alla cellula ed alla zona (Fig. 19).

La situazione diventa più convincente nella corteccia cerebellare, dove in controllo adulto, le cellule del Purkinje si colorano intensamente e le fibre sono ben colorate; mentre in diossina adulto, l'intensità dell'immunoreattività per la serotonina è molto ridotta (Fig. 21). In cervelletto del diossina-neonato, la colorazione per la serotonina aumenta drammaticamente.

Perciò la diossina può modulare la neuroplasticità dei neuroni serotoninergici in maniere diverse in neonato e in adulto.

Riguardo all'espressione di serotonina in ponte e in medulla di adulto, dove è presente il maggior numero di cellule e fibre serotoninergiche, vediamo che la serotonina viene ridotta in soma dei neuroni di animali esposti (Fig. 23, 24) ed allo stesso tempo le fibre sono meno positive. Ma in neonato vediamo un drammatico aumento della colorazione in fibre per la serotonina in rispetto al controllo neonato (Fig. 23, 24).

Le nostre osservazioni su 5HT-<sub>1A</sub> and SERT, possono dare una spiegazione plausibile.

Il recettore 5HT-<sub>1A</sub> è situato nel soma della corteccia frontale e le fibre sembrano negative per l'espressione della serotonina ma nella corteccia frontale di controllo neonato, si nota un'alta espressione di recettore (Fig 25) e questa diminuisce in neonato-diossina (Fig 26). In medulla l'espressione di serotonina è relativamente bassa in adulto ed è alta in medulla di neonato-diossina (Fig 28).

Il cervelletto mostra un'uniforme espressione per il recettore anche se il suo stato patologico è evidenziato dalla formazione vacuolare.

Nel caso di SERT, la corteccia mostra una buona positività in adulto, la stessa espressione viene inibita in animale esposto alla diossina. Invece in neonato, i livelli di SERT sono relativamente

alti in controllo, e in quello esposto alla diossina i livelli migliorano (Fig.30). Il pattern di colorazione nel ponte (Fig.31) offre una tipica ed interessante immagine della intera situazione del sistema del neurotrasmettitore sia in adulto che in neonato, esposto alla diossina.

Da queste evidenze, sembra che la diossina modifica l'espressione di serotonina, del recettore e del trasportatore, inducendo delle varie malformazioni fisiologiche e comportamentali.

## CONCLUSIONI

L'esposizione a diossina nel cervello adulto, sebbene non induca severe anomalie morfologiche, provoca alterazioni istologiche.

Durante lo sviluppo del cervello, pare che la diossina induca alterazioni morfologiche, come si evidenzia nella diminuzione delle misure del cervello.

La diossina provoca importanti condizioni patologiche, sia nel cervello di topo che di pecora, come è emerso dalla degenerazione cellulare in parecchie zone del cervello. Inoltre, sono state evidenziate parecchie importanti formazioni vacuolari, sia nel topo, ma più marcatamente nella pecora.

Il sistema di neurotrasmissione serotoninergico viene gravemente danneggiato, sia nel cervello adulto che neonatale. Il processo di alterazione indotto dalla diossina sembra essere correlato alla deplezione di serotonina dai neuroni serotoninergici, sia nell'adulto che nel neonato, nel topo e nella pecora.

Alterazioni sottili delle fibre serotoninergiche, del recettore 5-HT<sub>1A</sub> e dei trasportatori della serotonina nelle strutture limbiche potrebbero tradursi in alterazioni nelle capacità affettive, emotive e cognitive dell'animale.

## Bibliografia

- Aitken AR, Törk I (1988) Early development of serotonin containing neurons and pathways as seen in whole mount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol* 274: 32-47.
- Agrawal, A.K., Tilson, H.A. and Bondy, S.C.(1981) 3,4,30,40-Tetrachlorobiphenyl given to mice prenatally produces longterm decreases in striatal dopamine and receptor binding sites in the caudate nucleus, *Toxicol. Lett.* 7: 417-424.
- Anderson CR, McLachlan EM and Srb-Christie O (1989) Distribution of sympathetic preganglionic neurons and monoaminergic nerve terminals in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 283: 269-284.
- Austin MC, Bradley CC Mann JJ and Blackley RD (1994) Expression of serotonin transporter messenger RNA in the human brain. *J. Neurochem.*66: 73-93.
- Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM.(2003) The 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Research.*959: 58-67
- Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Research Bulletin* 56: 413-424.
- Bagchi D, Balmoori J, Magchi M, Ye X, Williams CB and Stohs SJ (2002) Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology* 175: 73-82.
- Blakelt RD and Bauman AL (2000) Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 328-336.
- Blier P, and de Montigny C (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 15: 220-226.
- Bonasera SJ and Tecott LH (2000) Mouse models of serotonin receptor function: toward a genetic dissection of serotonin systems. *Pharmacol. Ther.* 88: 133-142.
- Brüning G, Liangos O and Baumgarten G. (1997) Prenatal development of the serotonin transporter in mouse brain *Cell Tissue Res.* 289: 211-221
- Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A deficient mice: A role of serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16: 297-307.
- Charney DS, Crystal JH, Delgado PL and Heninger GR (1990) Serotonin-specific drugs for anxiety and depressive disorders. *Ann. Rev. Med.* 41: 437-446.
- Chen Y, Guo CJ, Hsu CC and Rogan, WJ (1992) Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *J. Am. Med. Assoc.* 268: 3213–3218.

Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology . Applied Pharmacology* 150: 383-392.

Freund TF, Meskenaite V (1992) Gaba-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 89:738-742.

Fujita M, Shimada S, maeno H, Nishimura T and Tohyama M. (1993) Cellular localization of serotonin transporter mRNA in the rat brain. *Neurosc. Lett.* 162: 59-62.

Gasiewicz TA and Rucci G (1984) Cytosolic receptor for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo -*p*-dioxin. Evidence for a homologous nature among various mammalian species. *Molec. Pharmacol.* 26: 90-98.

Grahnmann F, Claus D, Grehl H and Neundorfer B (1993) Electrophysiologic evidence for atoxic polyneuropathy in rats after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J.Neurol. Sci.* 115: 71-75.

Grehl H, Grahnmann F, Claus D and Neundorfer B (1993) Histologic evidence for a toxic polyneuropathy due to exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Acta Neurol. Scand.* 88: 345-357.

Griebel G. (1995) 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 65:319-395.

Halliday G, Harding A and Paxinos G. (1995) Serotonin and Tachykinin systems. In: *The rat nervous system.* Academic Press, New York. pp929-974.

Hanneman W, Legare M, Barhoumi R, Wong X, Burghardt R, Tiffani-Castiglioni E and Safe S. (1993) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced elevation of intracellular calcium ions in cultured rat hippocampal neurons and astroglia. In: *Organohalogen Compounds. Vol: 13., pp. 309-312.* Abstracts of 13<sup>th</sup> Internatinal Symposium on Dioxins and Related Compounds. 1993, Vienna, Austria.

Hansson SR, Mezey E and Hoffman BJ (1998) Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-seronergic neurons. *Neuroscience* 83: 1185-1201.

Hassoun EA., Wilt SC, Devito MJ Birgelen AV, Alsharif NZ, Birnbaum LS, and Stohs SJ (1998) Induction of oxidative stress in brain tissues of mice after subchronic exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo - *p*-dioxin. *Toxicol. Sci.* 42: 23-27.

Hellendall RP, Schambra UB, Liu JP, et al (1993) Prenatal expression of 5-HT1C and 5-HT-2 receptors in the rat central nervous system. *Exp Neurol* 120:186-201.

Henry EC and Gasiewicz TA (1993) Transformation of the aryl hydrocarbon receptor to a DNA-binding form is accompanied by release of the 90kDa heat shock protein and increased affinity for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochemistry* 294: 95-101.

Henshel DS, Martin JW, DeWitt JC (1997) Brain asymmetry as a potential biomarker for developmental TCDD intoxication: a dose-response study. *Environ. Health. Perspect.* 105:718-725.

Hensler JG (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav. Rev.*30:203-214.

Hornung JP, Fritschy JM, Tork I (1990) Distribution of two morphologically distinct subsets of serotonergic axons in the cerebral cortex of the marmoset, *J. Comp. Neurol.* 297:165-181.

Huang P, Rannug A, Ahlbom E, Håkansson H, and Ceccatelli S (2000) Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the Expression of Cytochrome P450 1A1, the Aryl Hydrocarbon Receptor, and the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator in Rat Brain and Pituitary. *Toxicology and Applied Pharmacology* 169: 159-167.

Huang P, Tofighi R, Emgard M and Ceccatelli S (2005) Cell death induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8- TCDD) in AtT.20 pituitary cell. *Toxicology* 207: 391-399.

Huisman M, Koopman-Essboom C, Fidler V, Hadders-Algra M, van der Paauw C, Tunistra LGM Th, Weisglas-Kuperus, N, Sauer PJJ, Touwen BCL and Boersma ER (1995) Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effect on neonatal neurological development. *Early Human Development* 41: 111-127.

Jacobson SW, Fein GG, Jacobson JL, Schwartz PM and Dowler JK (1985) The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory, *Child. Dev.* 56: 853-860.

Jacobson JL, Jacobson S. and Humphrey HEB (1990) Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children, *J. Pediatr.* 116: 38-45.

Johnson JI, Sudheimer KD, Davis KK and Winn BM. (dal sito web) The Navigable Atlas of the Sheep Brain Radiology Department, Neuroscience Program and Communications Technology laboratory, Michigan University, East Lansing, MI with much assistance from: The Division of Integrative Biology and Neuroscience of The National Science Foundation.

Koh T, Nakazawa M, Kani K and Maeda T (1991) Investigations of origins of serotonergic projection to developing rat visual cortex: A combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain. Res. Bull.* 27: 675-684.

Kuchiiwa S, Cheng SB, Magamoto I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, Hashiguchi Wand Kuchiiwa T (2002) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases serotonin-immunoreactive neuron in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neuroscience lett.* 317: 73-76.

Kuratsune MY(1989) In: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins, and related products. pp 381-400. Elsevier, Amsterdam.

Krowke R, Abraham K, Wiesmuller T, Hagenmaier H. and Neubert D (1990) Transfer of various PCDDs and PCDFs via placenta and mother's milk to marmoset offspring, *Chemosphere*, 20: 1065-1070.



- Kwiat G and Basbaum AI (1990) Organization of tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive brainstem neurons with axon collaterals to the periaqueductal gray and the spinal cord in the rat. *Brain Res.* 528: 83-94.
- Lauder JM, Krebs H (1978) Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* 1: 15-30.
- Lauder JM, Liu J (1994) Glial heterogeneity and developing neurotransmitter systems. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2: 499-505.
- Levin ED, Schantz SL and Bowman RE (1988) Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys. *Arch. Toxicol.* 62: 267-273.
- Lilienthal H, Neuf M, Munoz C and Winneke G (1990) Behavioral effects of pre- and postnatal exposure to a mixture of chlorinated PCBs in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15: 457-467.
- Mandal PK (2005) Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol [B]*. 175: 221-230.
- Meister B, Johnson H and Ulfhake B. (1995) Increased expression of serotonin transporter messenger RNA in raphe neurons of aged rat. *Mol. Brain Res* 33: 87-96.
- Moiseiwitsch JRD and Lauder JM (1995) Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7182-186.
- Moll GH, Mehnert C, Wicker M, Bock N, Rothenberger A, Ruther M and Huether G (2000) Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. *Dev. Brain Res.* 119: 251-257.
- Molliver ME (1987) Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol* 7 (suppl): 3-23.
- Nakazawa M, Koh T, Kani K and Maeda T (1992) Transient patterns of serotonergic innervation in the rat visual cortex: Normal development and effects of neonatal enucleation. *Dev. Brain Res.* 66: 77-90.
- Olivier B, Soudijn, W and van Wijngaarden I (1999) 5-HT<sub>1A</sub> receptor and its ligands: structure and function. *Prog. Drug Res.* 52: 103-165.
- Patandin S, Lanting CI, Mulder PGH, Boersma ER, Sauer PJJ and Weisglas-Kuperus N (1999) Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J. Pediatr.* 134: 33-41.
- Paxinos G. (1995) *The rat nervous system.* Academic Press, New York.
- Paxinos G, Franklin KB (2001) *The mouse brain. The stereotaxic coordinates.* Academic Press. New York. Academic Press, New York. Pp 929-974.
- Paxinos G and Watson C (1986) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, San Diego.

Poland, A. and Knutson, J.C.(1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 517-554.

Pohjanvitra R, Vartianen T, Uusirauva A Monkkonen J, and Tuomisto J (1990) Tissue distribution, metabolism and excretion of <sup>14</sup>C-TCDD in a TCDD susceptible and TCDD resistant rat strain. *Pharmacol. Toxicol.* 66: 93-100.

Pohjanvitra R, Tuomisto J (1994) Short-term toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: Effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol. Rev.* 46: 483-549.

Rogan WJ, Gladen BC, McKinney JD, Carreras N, Hardy P, Thullen J, Tinglestad J, Tully M (1986) Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J. Pediatrics* 109: 335-341.

Roth BL, Hamblin MW, Ciaranello RD (1991) Developmental regulation of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> mRNA and receptor levels. *Dev. Brain Res.* 58:51-58.

Satoshi K, Shi-Bin C, Itsugi N, Yasuaki, Masahiro U, Masataka T, Wataru H and Toshiko K. (2002) *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases serotonin-immunoreactive neurons in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neuroscience Letters* 317: 73-76.

Saxena PR (1965) Serotonin receptors: Subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol. Ther.* 66: 339-368

Schantz SL and Bowman RE (1989) Learning in monkeys exposed perinatally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), *Neurotoxicol. Teratol.* 11:13-19.

Shuey DL, Sadler TW, Tamir H, Lauder JM (1993) Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol* 187: 78-85.

Stamford JA, Davidson C, McLaughlin DP and Hopwood SE (2000) Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT<sub>1</sub> autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? *Trends Neurosci.* 23: 459-465.

Steinbusch HWM. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat. – cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6: 557-618.

Sur C, Betz H and Schloss P (1996) Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neuroscience* 73: 217-231.

Thompson AM and Lauder JM (2005) Postnatal expression of the serotonin transporter in auditory brainstem neurons. *Dev Neurosci.* 27: 1-12.

Tilson HA Davis GJ, McLachlan JA and Lucier GW (1979) The effects of polychlorinated biphenyls given prenatally on the neurobehavioral development of mice. *Environ. Res.* 18: 466-474.

Tuomisto J, Unkila M, MacDonald E and Tuomisto J.L (1990) Changes in brain monoamines, monoamine metabolite and histamine after single administration of 2, 3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Pharmacol. Toxicol.* 67: 260-265.

Unkila M, Pohjanvirta R, Honkakoski, Torronen R and Tuomisto J. (1993) 2, 3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) and aldehyde dehydrogenase (ALDH3) activities in the brain and liver. A comparison between the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strain. *Biochem. Pharmacol.* 46: 651-659.

Unkila M, Pohjanvirta R, MacDonald E and Tuomisto J. (1994) Characterization of 2, 3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced brain serotonin metabolism in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 270: 157-166.

Unkila M, Pohjanvirta R and Tuomisto J. (1995) Biochemical effects of 2, 3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 443-455.

Van Luijckelaar MGPA, Steinbusch HWM. and Tonnare JADM (1989) Similarities between aberrant serotonergic fibers in the aged and 5,7-DHT denervated young adult rat brain. *Exp. Brain Res.* 78: 81-89.

Vergé D and Calas A. (2000) Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J. Chemical Neuroanatomy* 18: 41-56.

Vreugdenhil HJ, Lanting CI, Mulder PGH, Boersam ER, Weiglas-Kuperus N (2002) Effects of prenatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J. Pediatrics* 140: 48-56.

Wallace JA, Lauder JM (1992) Development of the serotonergic system in rat and chick embryos. In: Bjorklund A, Hokfelt T, Tohyama M, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol 10: Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p 619.

Yoshikawa Y (1968) The brain of sheep. In: *Atlas of the brain of Domestic animals.* University of Tokyo Press. Tokyo. The Pennsylvania State University Press. University Park.

## **Ringraziamenti**

Vorrei ringraziare il Prof. Giuseppe Paino per avermi dato l'opportunità di realizzare questo lavoro sotto la sua guida.

Ringrazio la Dottoressa Milena Fiorito per la sua attiva partecipazione nel progetto, per la sua estrema disponibilità, umanità e per il suo incoraggiamento.

Ringrazio la Dottoressa Sara Damiano per la sua attiva partecipazione nel lavoro e per la sua pazienza e amicizia.

Ringrazio il Prof. Roberto Di Lauro per la sua estrema umanità e generosità.

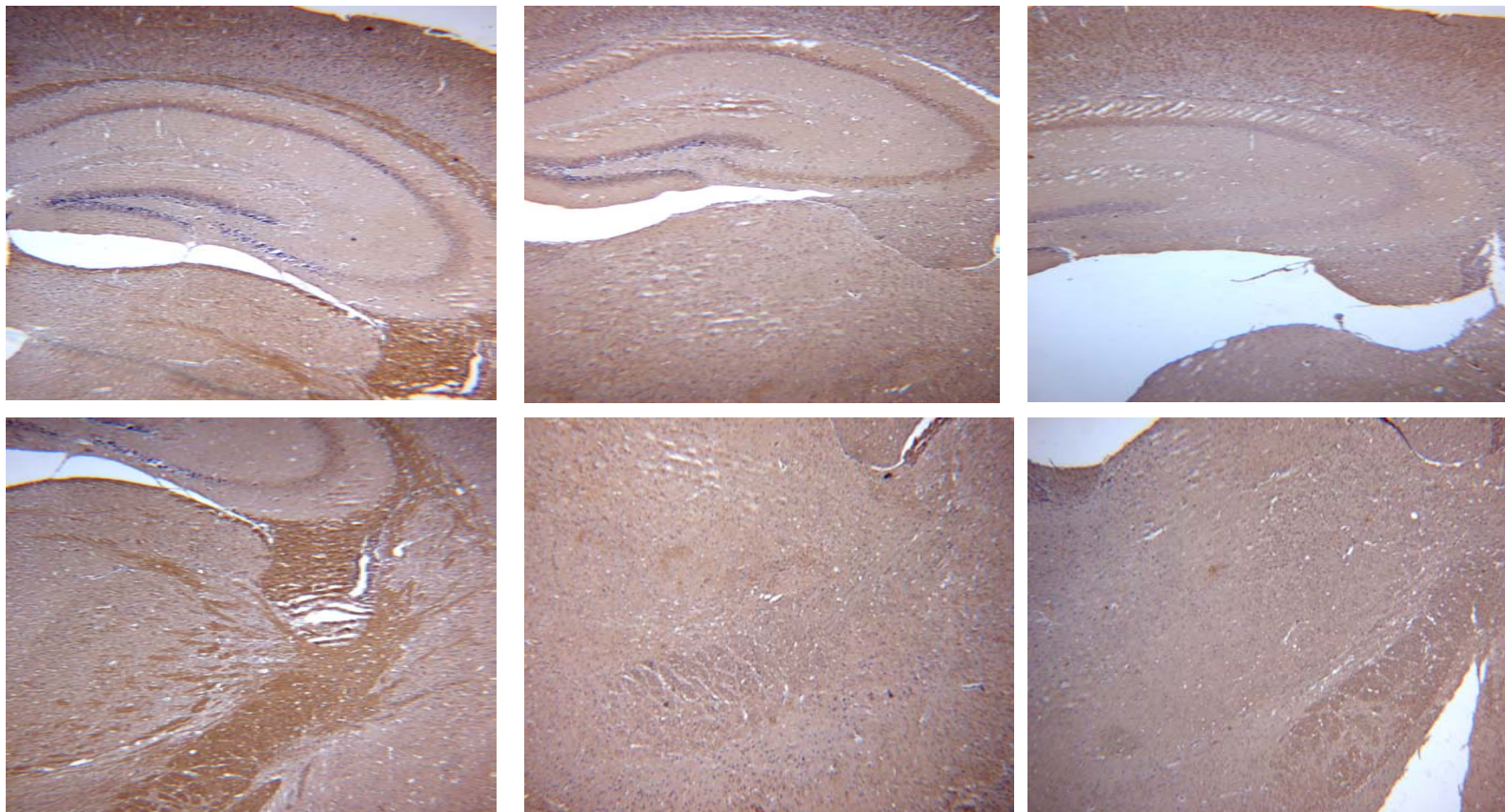
Ringrazio il Dr. V. Maharajan per avermi aiutato nella discussione dei dati sperimentali.

Ringrazio il mio caro amico Salvatore Piantedosi per i suoi validi consigli e per la sua grande pazienza.

Ringrazio i miei cari genitori e Gautam, Raju e Vidya per essere stati sempre vicini a me verso il mio traguardo.

Ringrazio le mie care amiche Teresa, Paola, Maria e Denise; senza il loro valido aiuto non avrei raggiunto la mia destinazione.

**Fig. 1- Espressione di Serotonina nella zona ippocampale di topo adulto-2.5x**

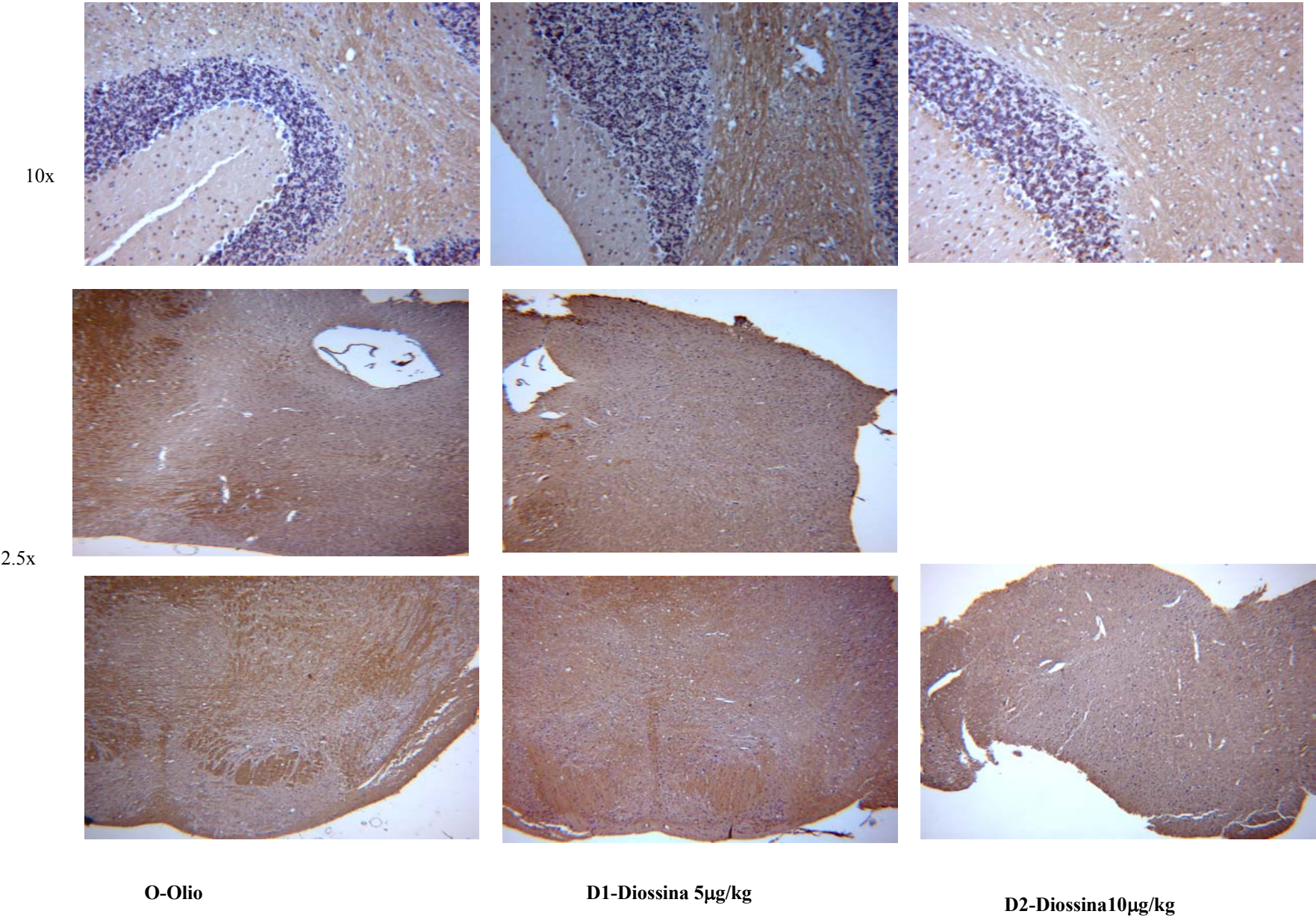


**O-Olio**

**D1-Diossina 5 µg/kg**

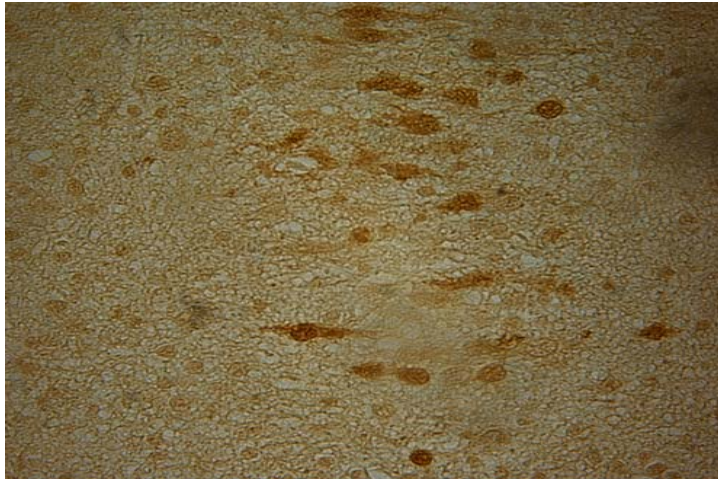
**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig. 2-Espressione di Serotonina nel cervelletto e nel tronco dell'encefalo di topo adulto-10x,2.5x**

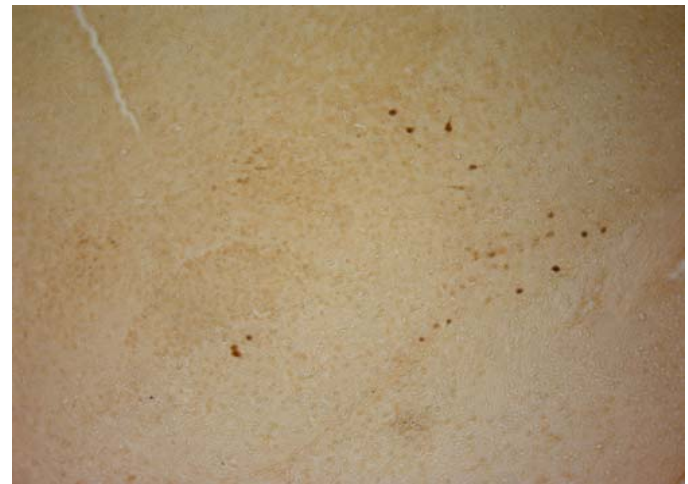
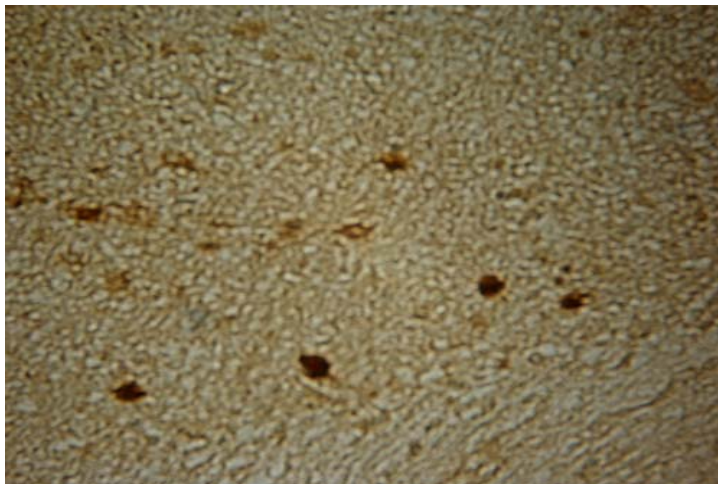


**Fig. 3-Espressione di serotonina nel tronco dell' encefalo di topo neonato- P6**

**O-Olio**



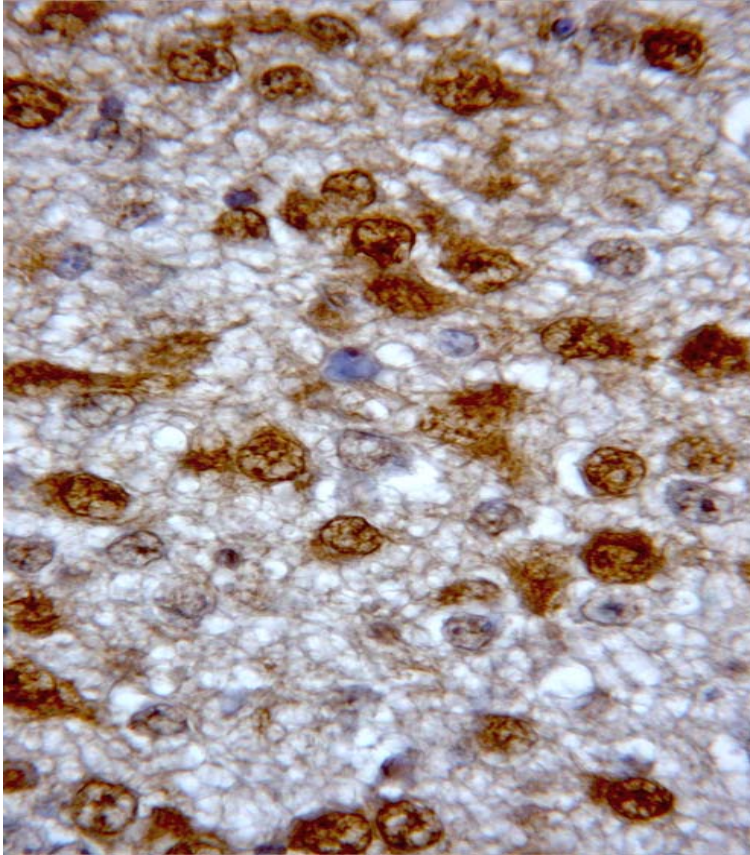
**D1-  
Diossina  
5 µg/kg**



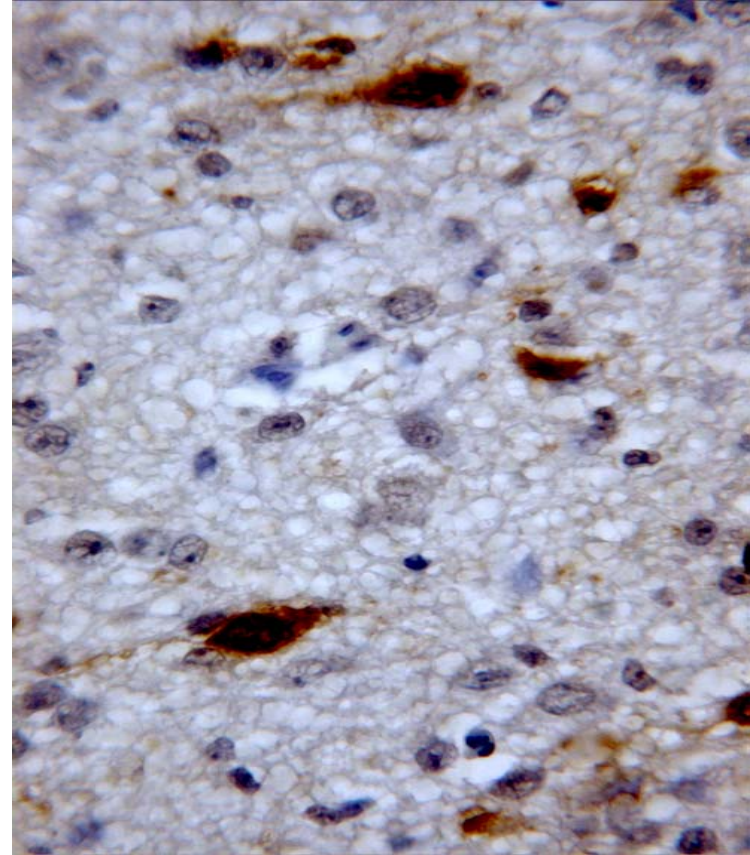
**40x**

**10x**

**Fig. 4 Espressione di serotonina nel tronco dell'encefalo di topo neonato-P6(O-D2) -40x**



**O-Olio**



**D2-Diossina 10µg/kg**



**Fig. 5 - Espressione di serotonina nell'ippocampo di topo neonato – P21- 2.5x**



**O-Olio**

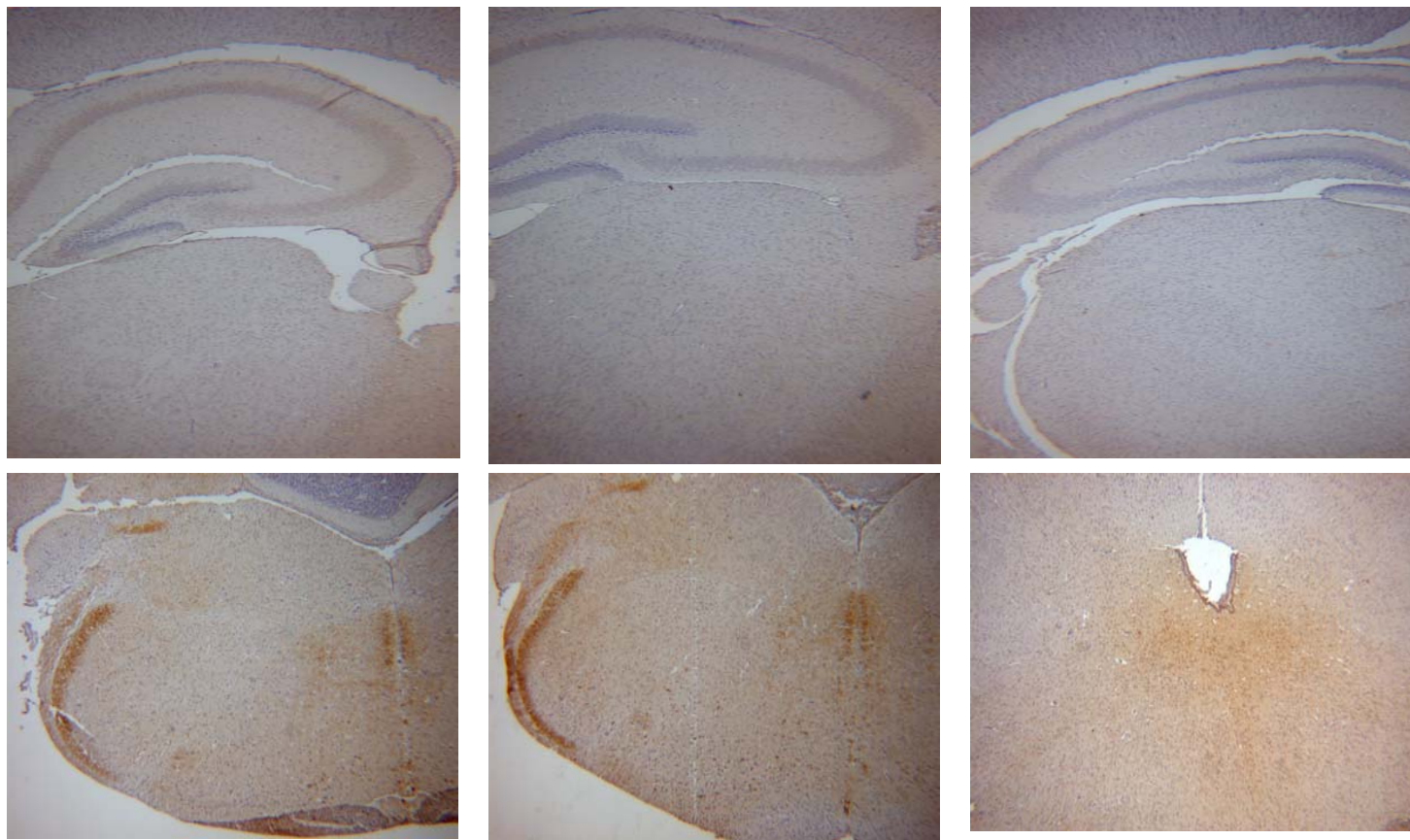


**D1  
Diossina  
5 µg/kg**



**D2  
Diossina  
10µg/kg**

**Fig. 6- Espressione di serotonina nell' ippocampo e nel tronco dell'encefalo di topo neonato-P14-2.5x**



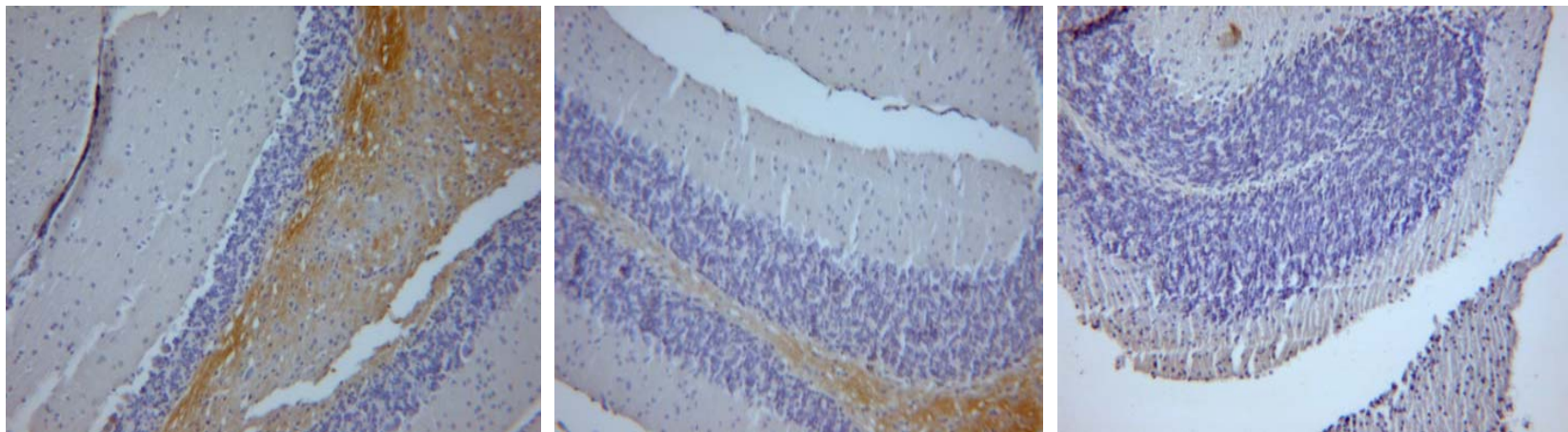
**O-Olio**

**D1-Diossina 5 µg/kg**

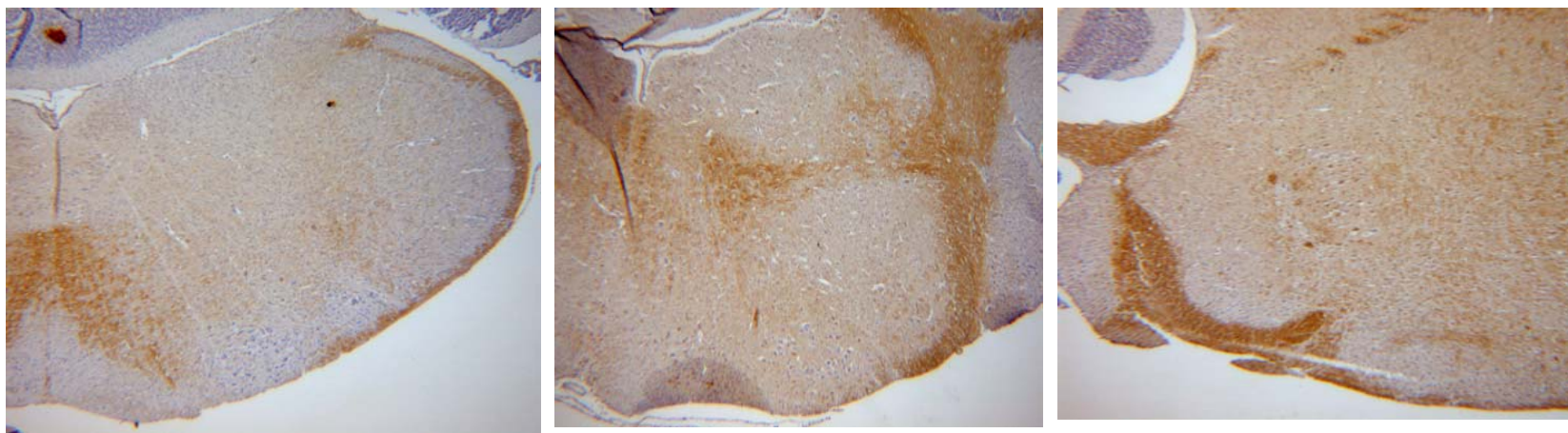
**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig. 7- Espressione di serotonina nel cervelletto e nel tronco dell'encefalo di topo Neonato-P21**

10x



2.5x

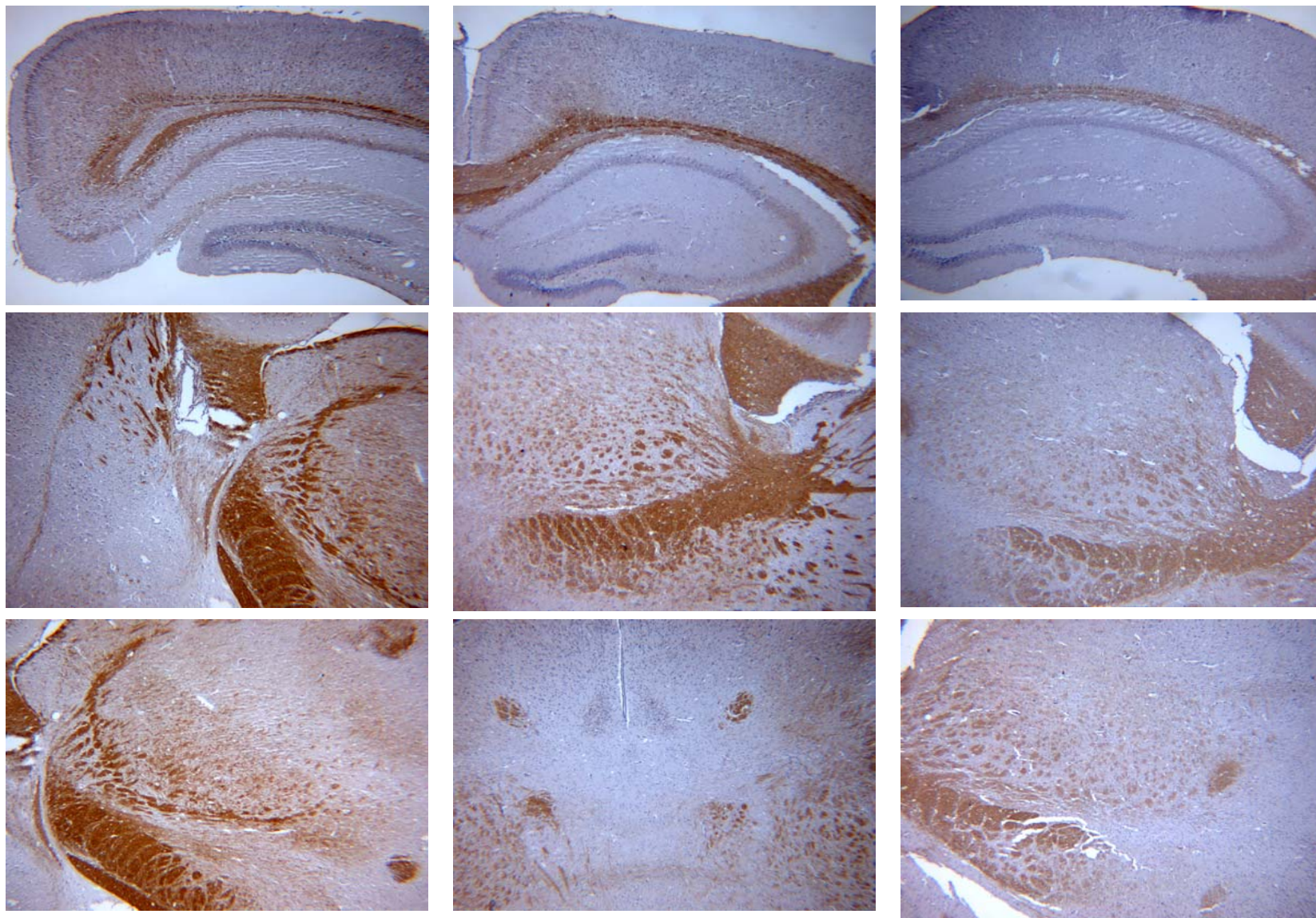


O-Olio

D1-Diossina 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$

D2-Diossina 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

**Fig. 8-Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nella zona ippocampale di topo adulto-2.5x**

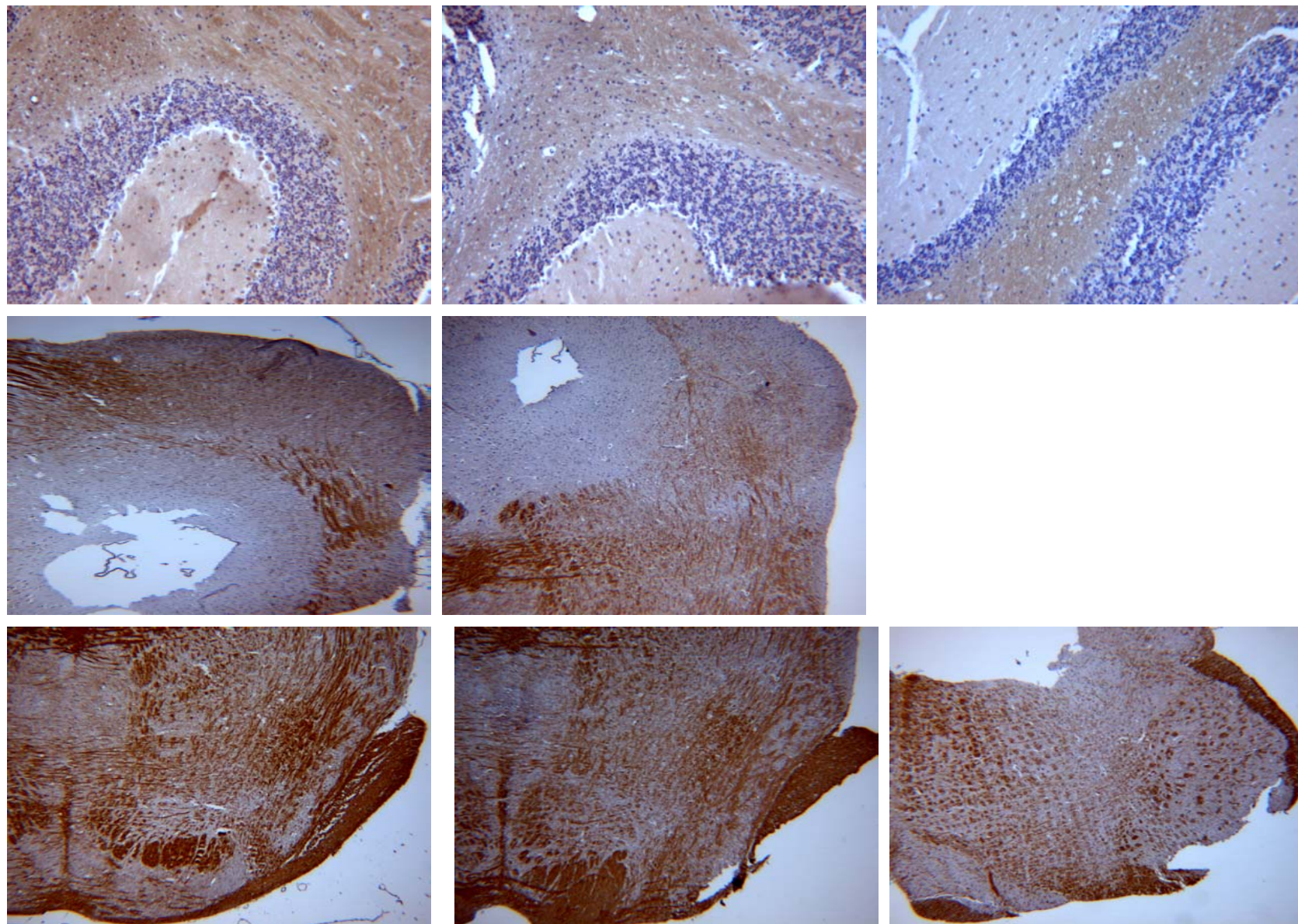


O-Olio

D1-Diossina-5µg/kg

D2-Diossina 10µg/kg

**Fig. 9** Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel cervelletto e nel tronco dell'encefalo di topo adulto-10x,2.5x



10x

2.5x

2.5x

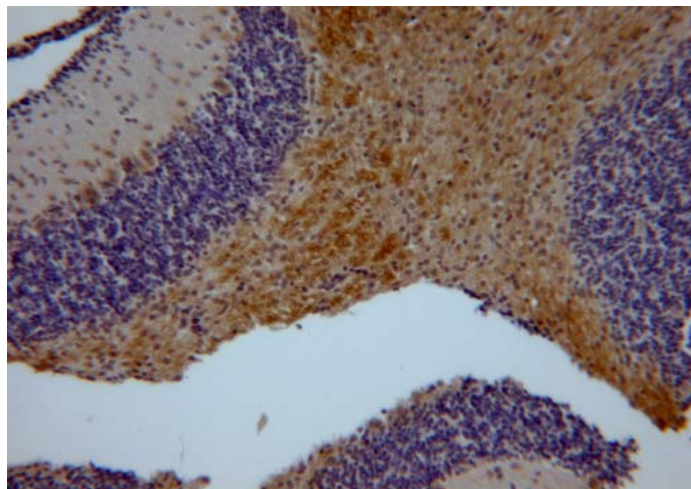
O-Olio

D1-Diossina 5µg/kg

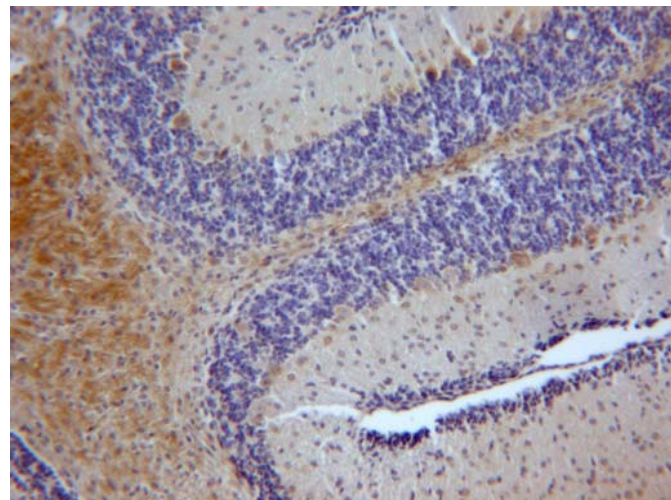
D2-Diossina 10µg/kg

**Fig. 10- Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel cervelletto e nel tronco dell' encefalo di Topo Neonato P14**

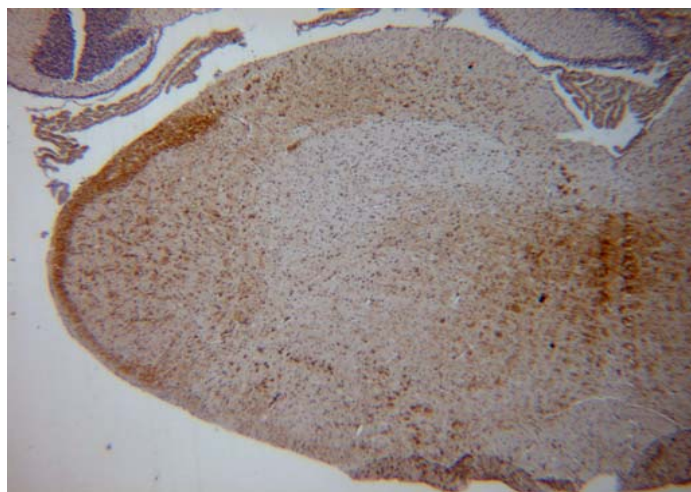
10x



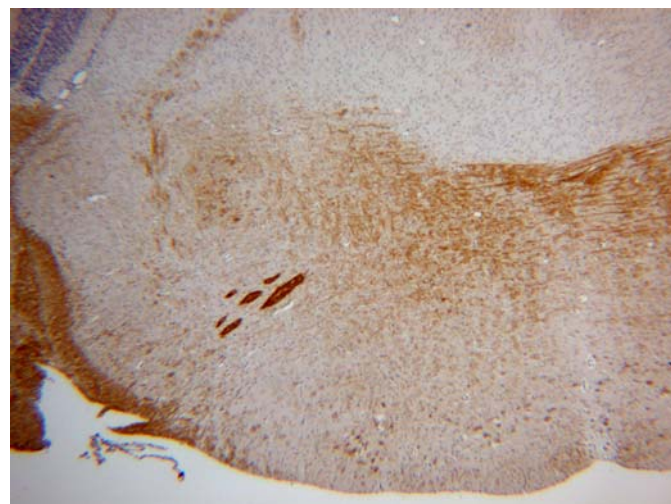
10x



2.5x



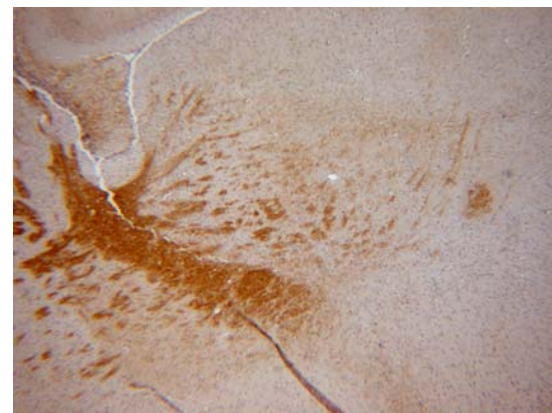
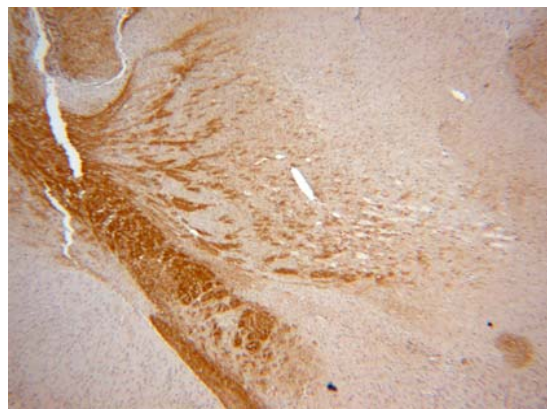
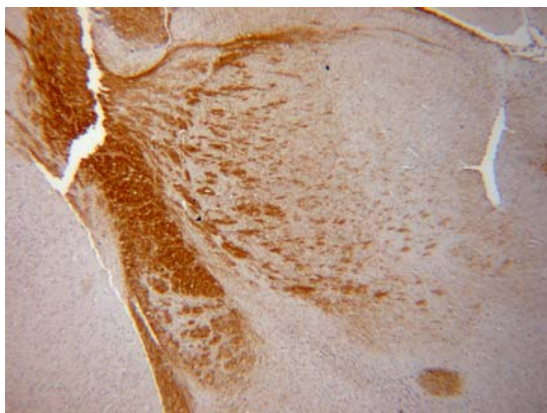
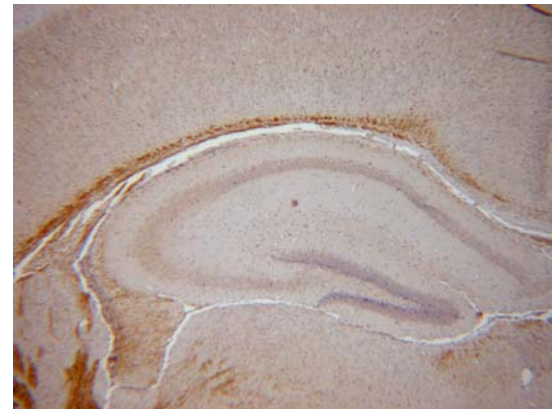
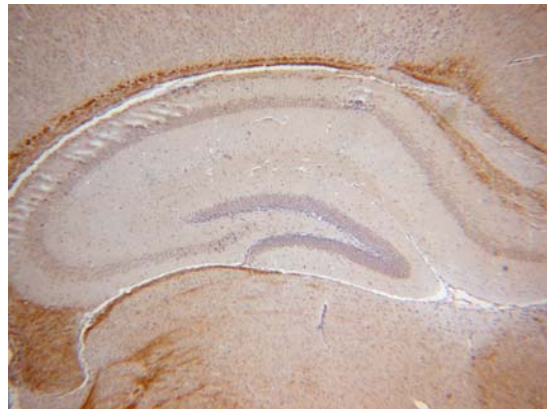
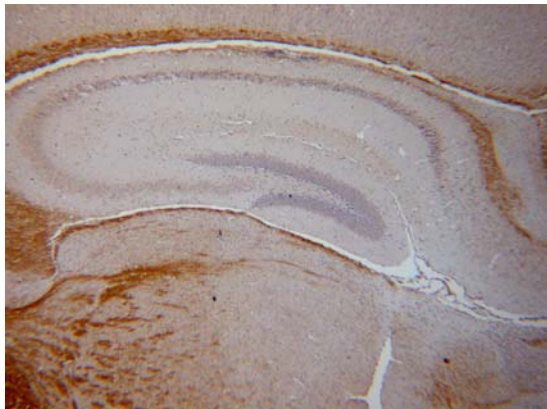
2.5x



O-Olio

D1-Diossina 5 µg/kg

**Fi. 11- Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nella zona ippocampale di topo neonato - P21 -2.5x**



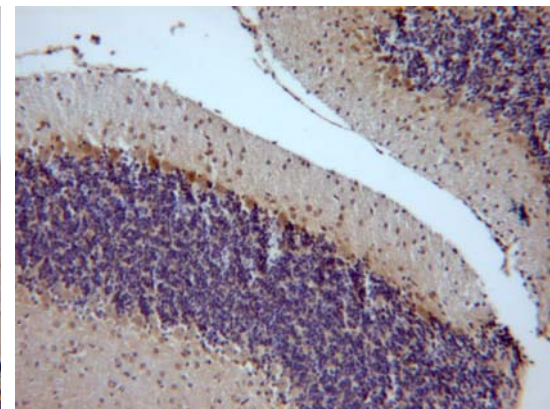
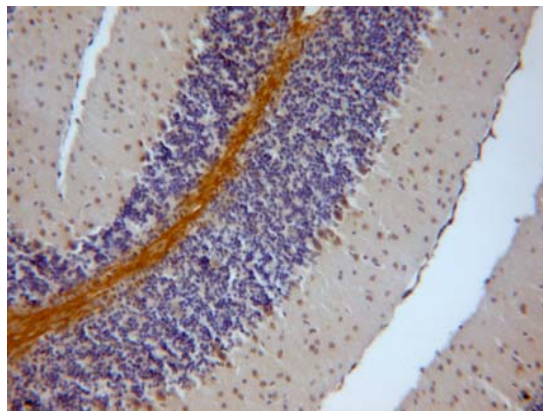
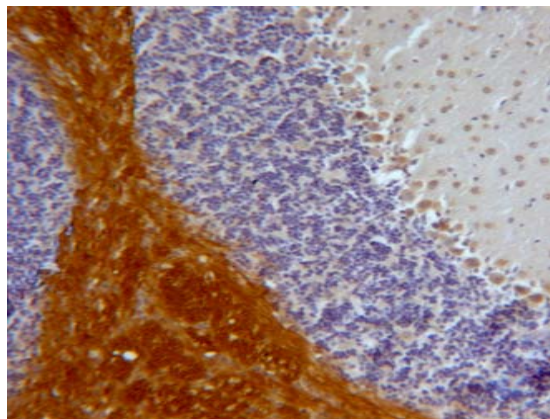
**O-Olio**

**D1-Diossina 5 µg /kg**

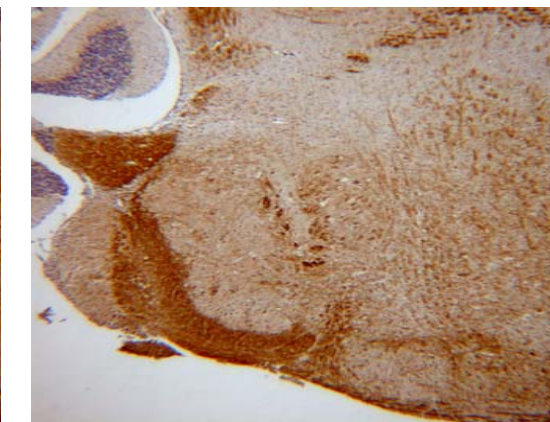
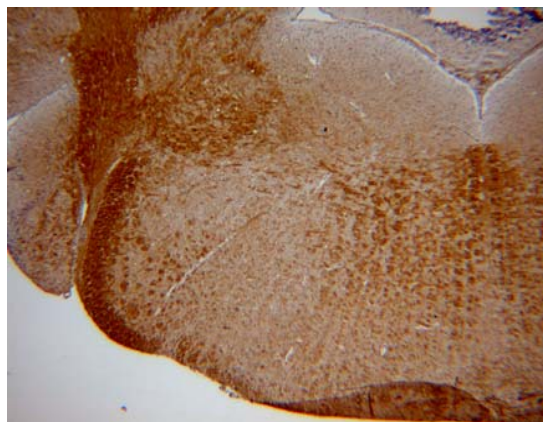
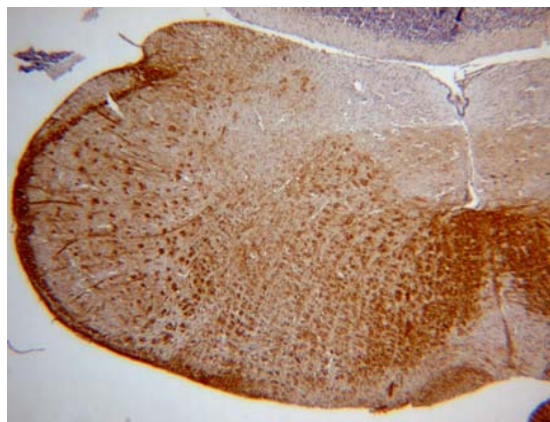
**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig. 12 -Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel cervelletto e nel tronco dell' encefalo di topo neonato- P21-10x,2.5x**

10x



2.5x



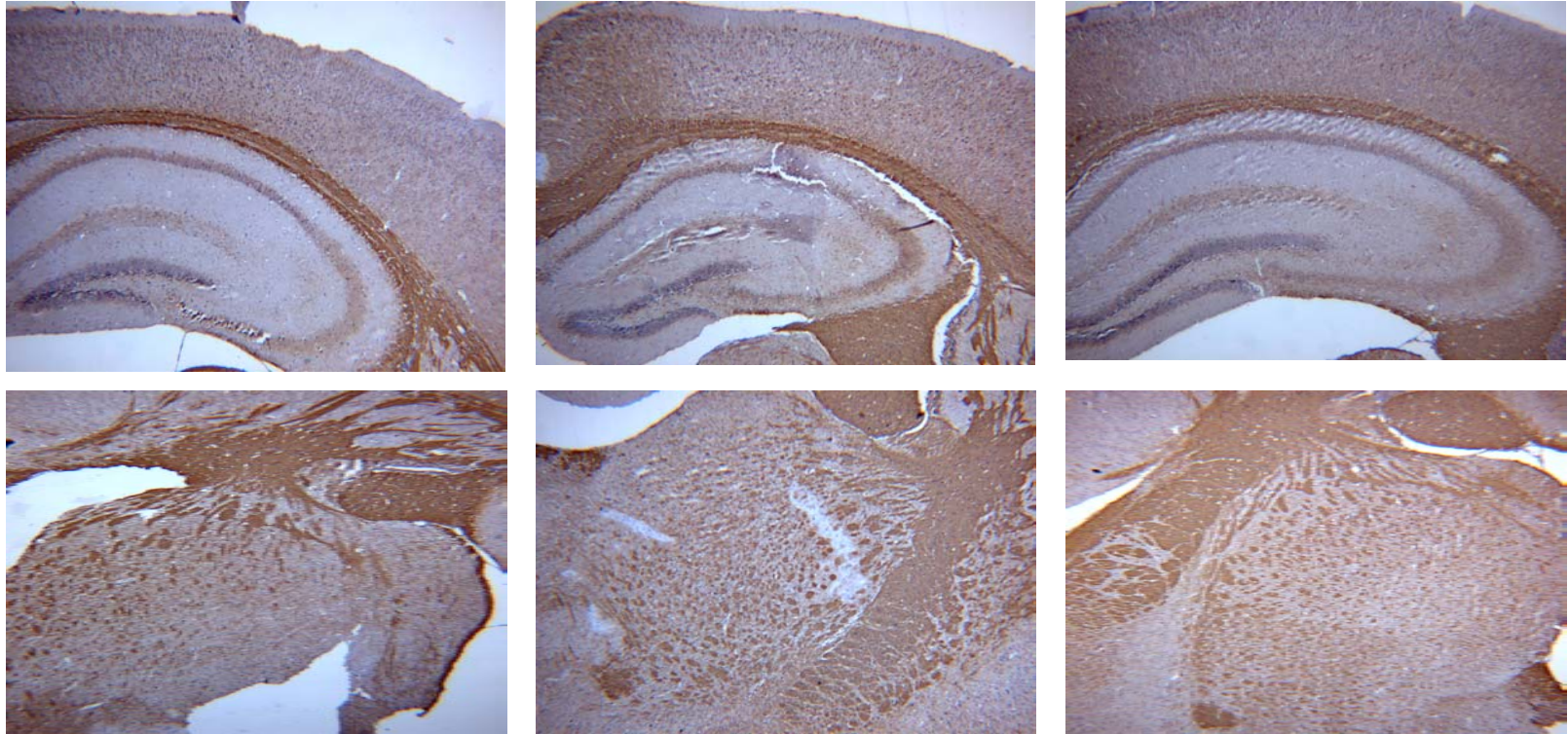
O-Olio

D1-Diossina 5 µg/kg

D2-Diossina 10 µg/kg



**Fig. 13 - Espressione di SERT nella zona ippocampale di topo adulto -2.5x**



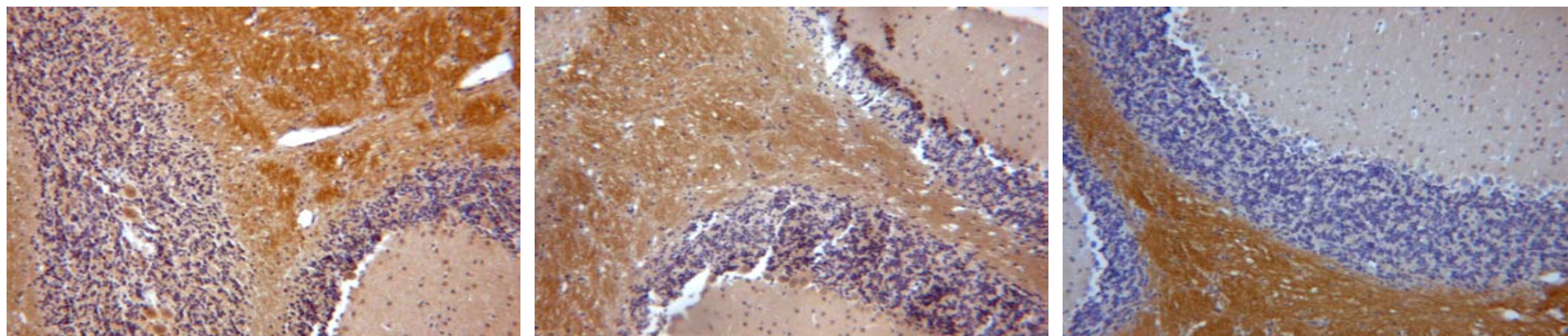
**O-Olio**

**D1-Diossina 5µg/kg**

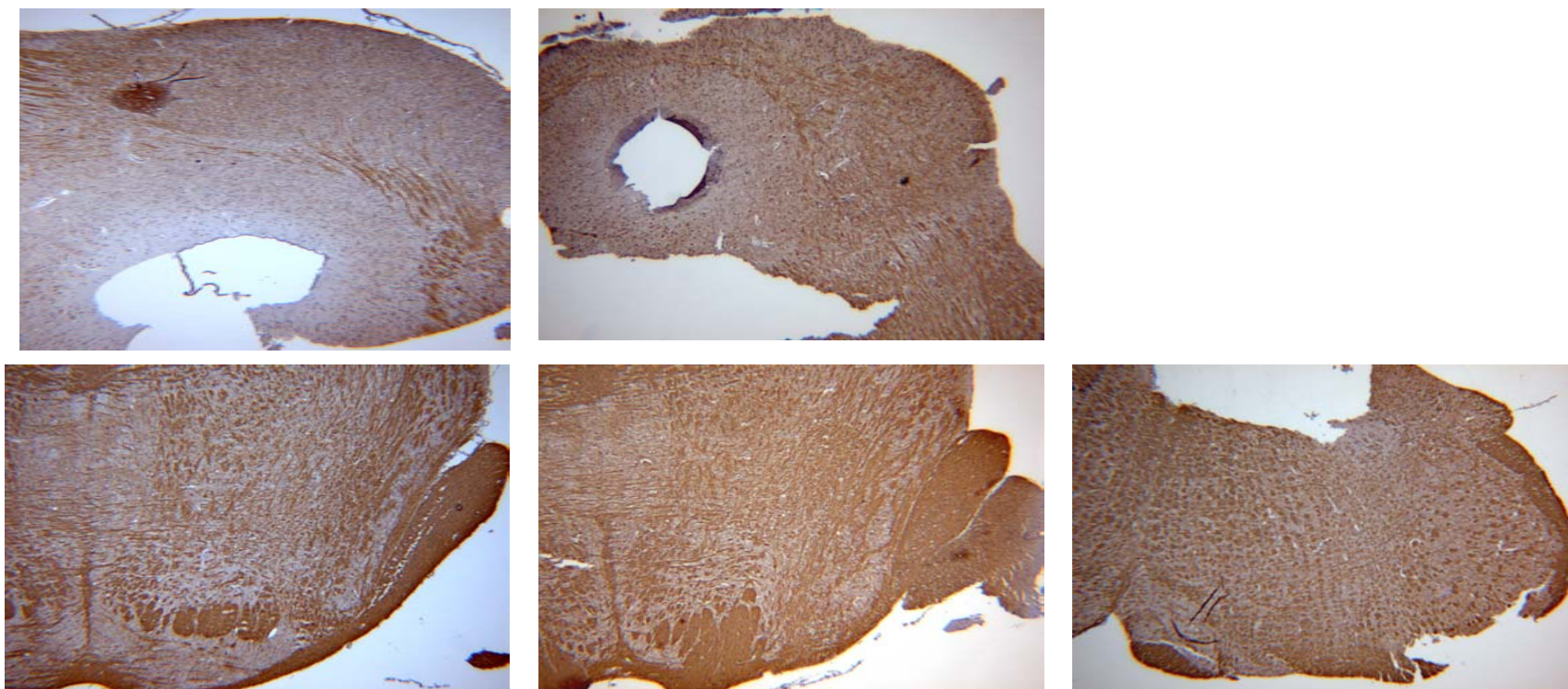
**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig 14 - Espressione di SERT nel cervelletto e nel tronco dell'encefalo di topo adulto**

10x



2.5x

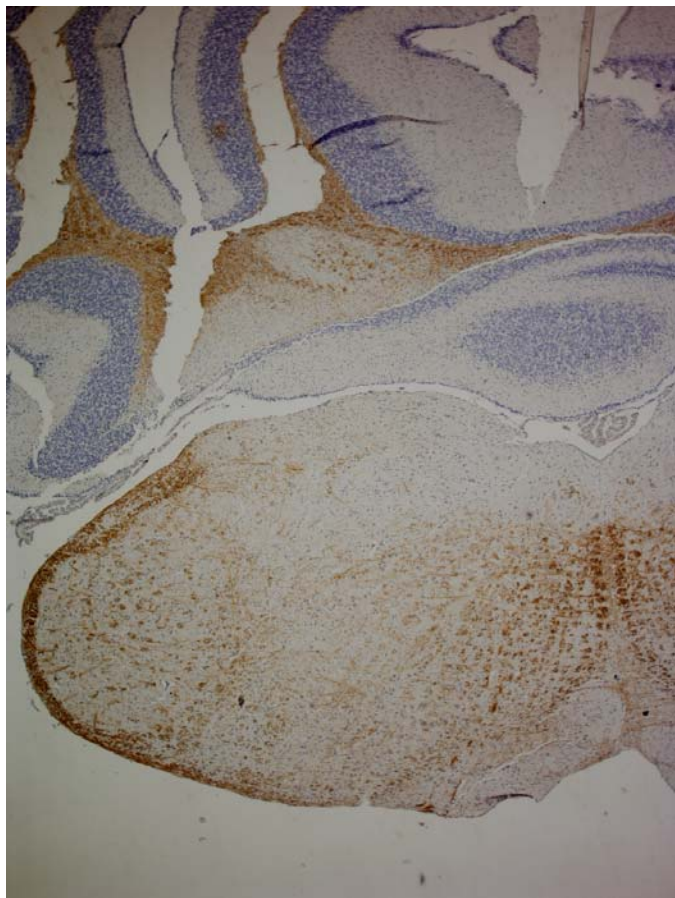


**O-Olio**

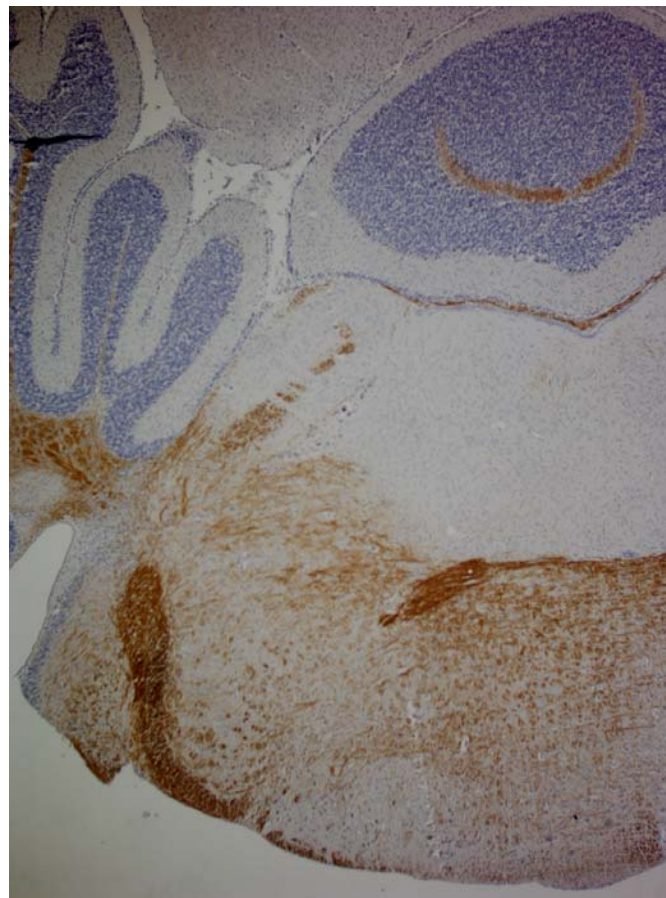
**D1-Diossina 5 µg/kg**

**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig. 15- Espressione di SERT nel tronco dell' encefalo di topo neonato P14 - 4x**

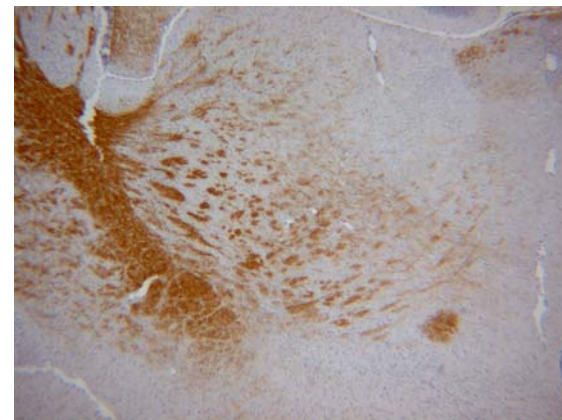
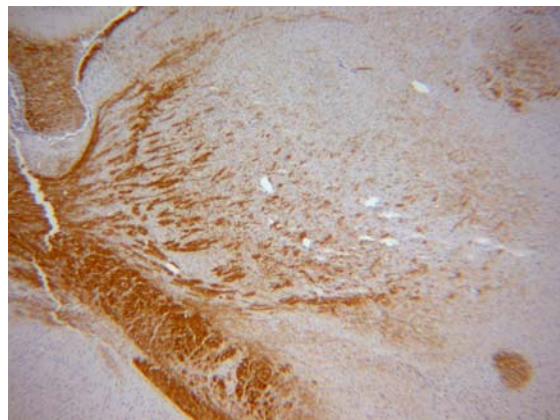
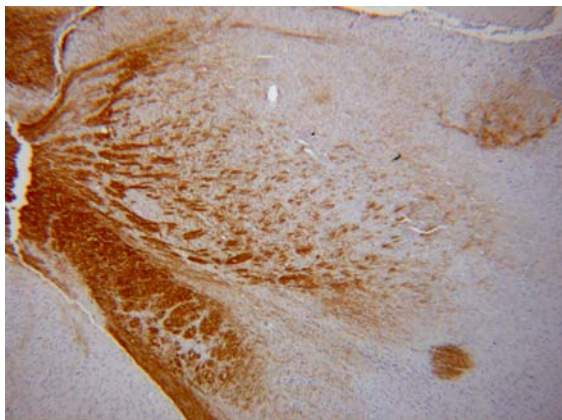
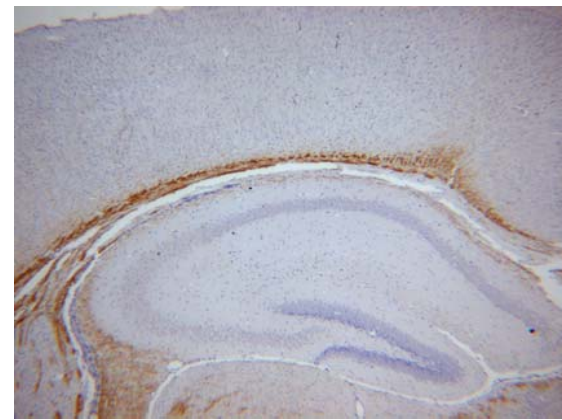
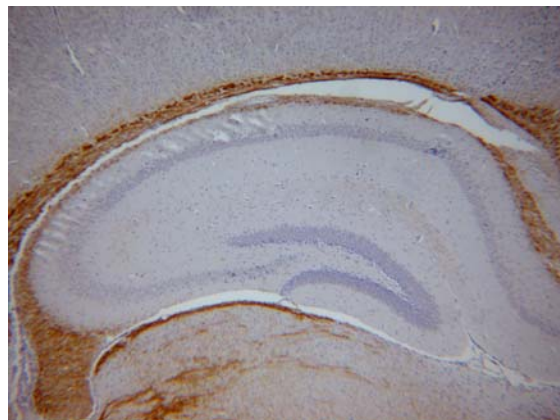
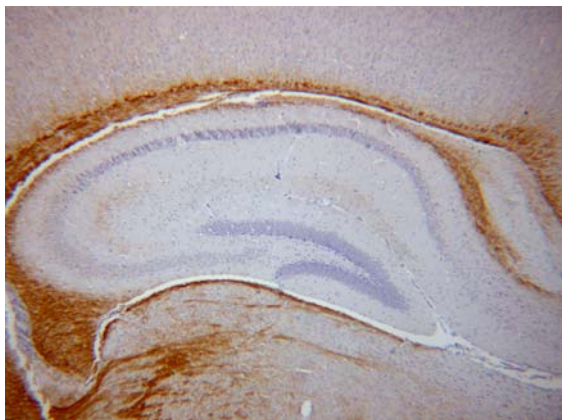


**O-Olio**



**D1 -Diossina 5 µg/kg**

**Fig. 16 - Espressione di SERT nella zona ippocampale di topo neonato P21-2.5x**



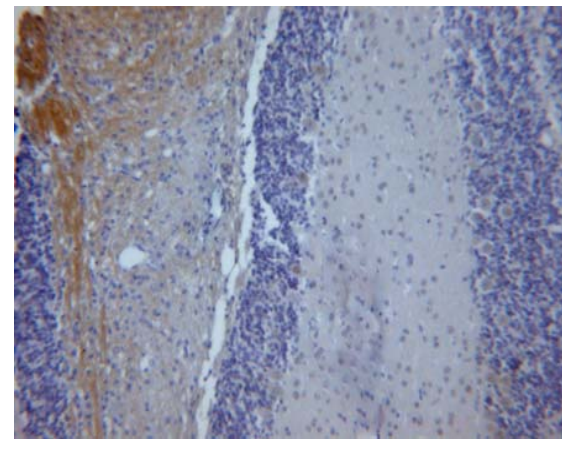
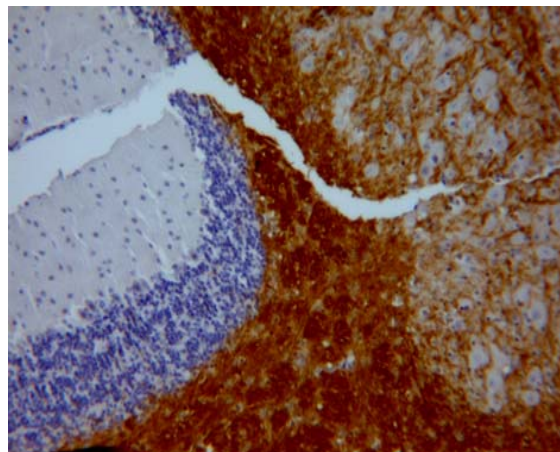
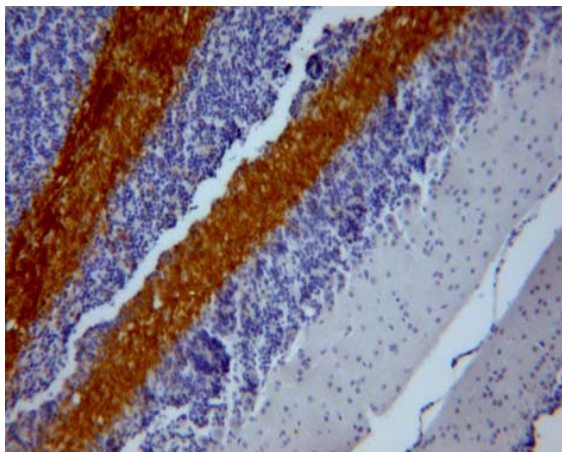
**O-Olio**

**D1-Diossina 5 µg/kg**

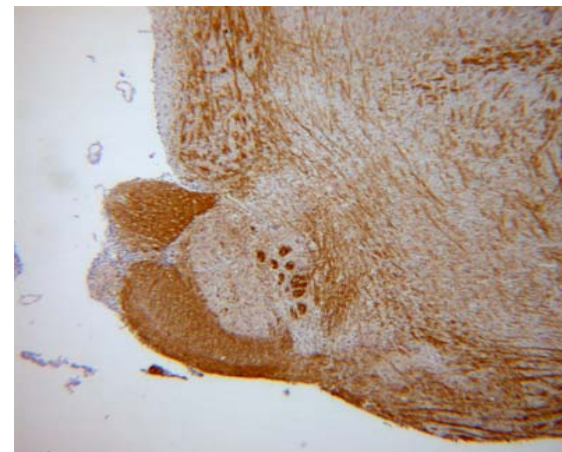
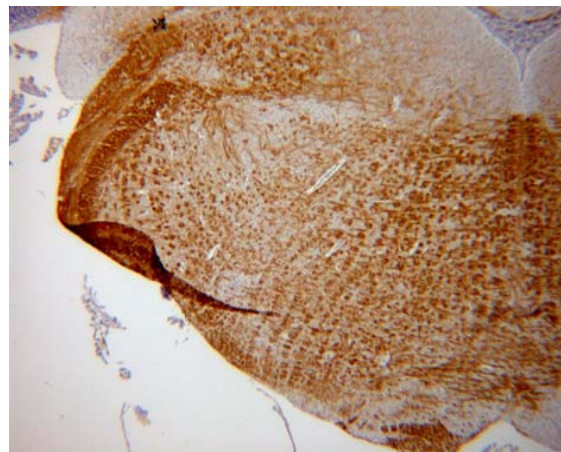
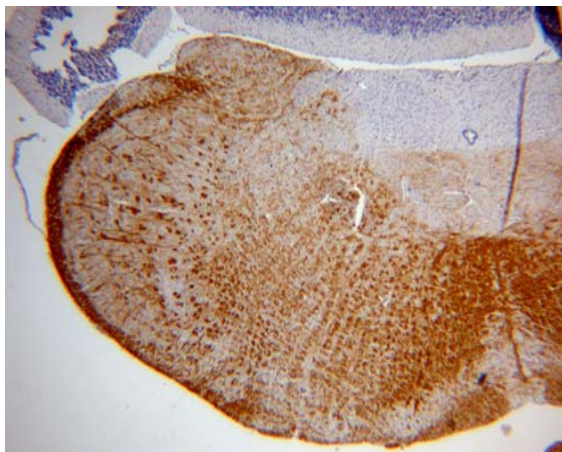
**D2-Diossina 10 µg/kg**

**Fig. 17- Espressione di SERT nel cervelletto e nel tronco dell'encefalo di topo neonato P21 -10x, 2.5x**

10x



2.5x

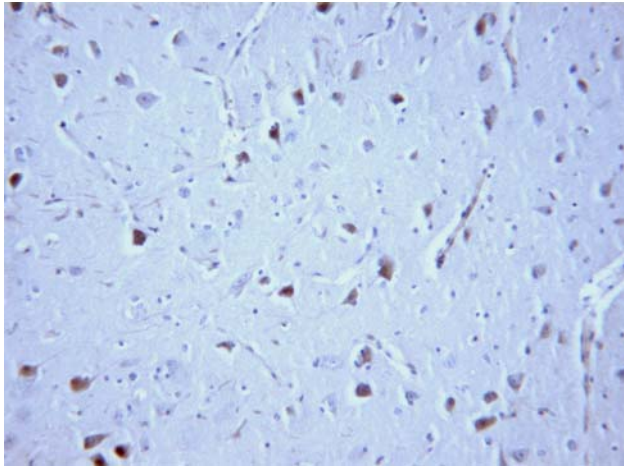


**O-Olio**

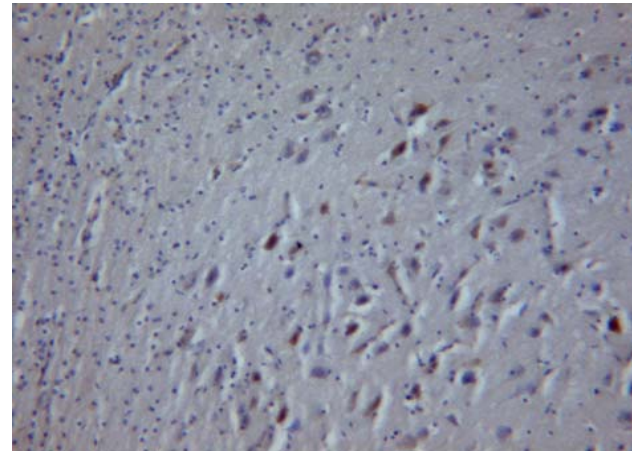
**D1-Diossina 5 µg/kg**

**D2-Diossina 10 µg/kg**

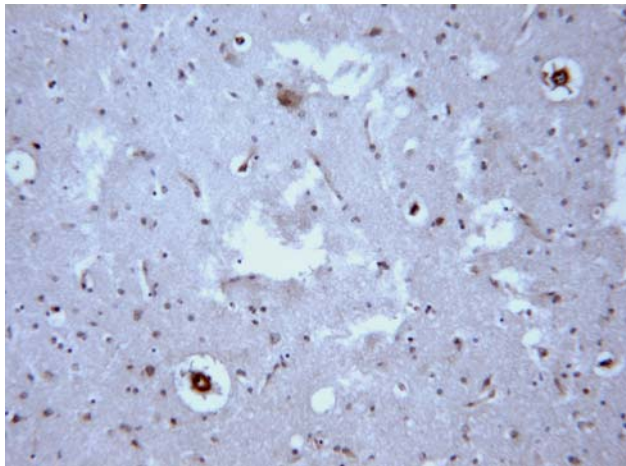
**Fig. 18-Espressione di serotonina nella corteccia frontale di pecora-10x**



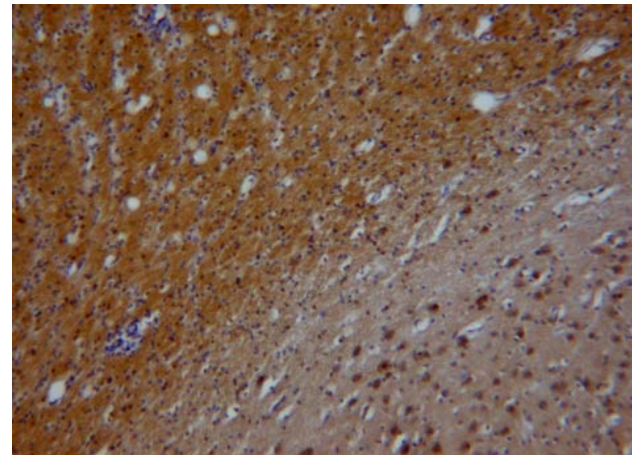
**Controllo Adulto**



**Controllo Neonato**



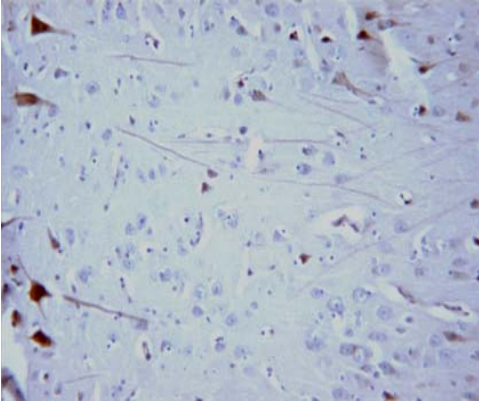
**Diossina-Adulto**



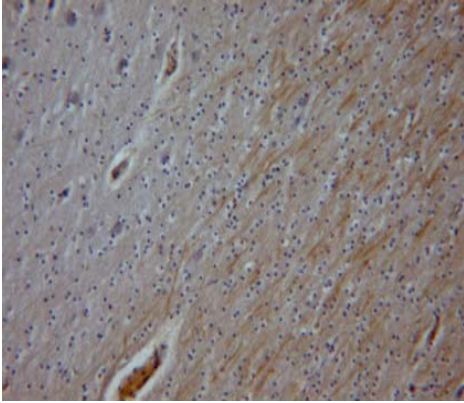
**Diossina Neonato**

**Fig. 19- Espressione di serotonina nella corteccia parietale ed occipitale di pecora-10x**

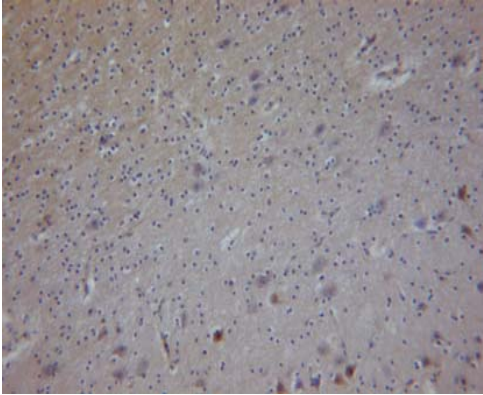
**Corteccia parietale**



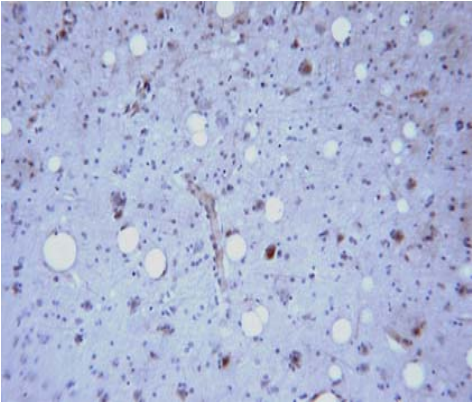
Controllo Adulto



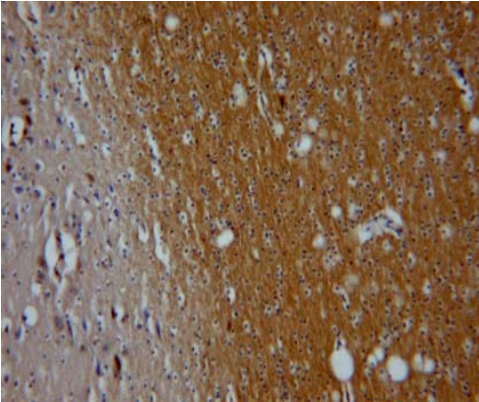
Controllo Neonato



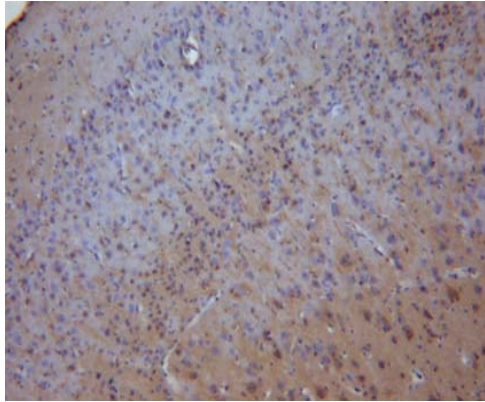
Controllo Neonato



Diossina Adulto



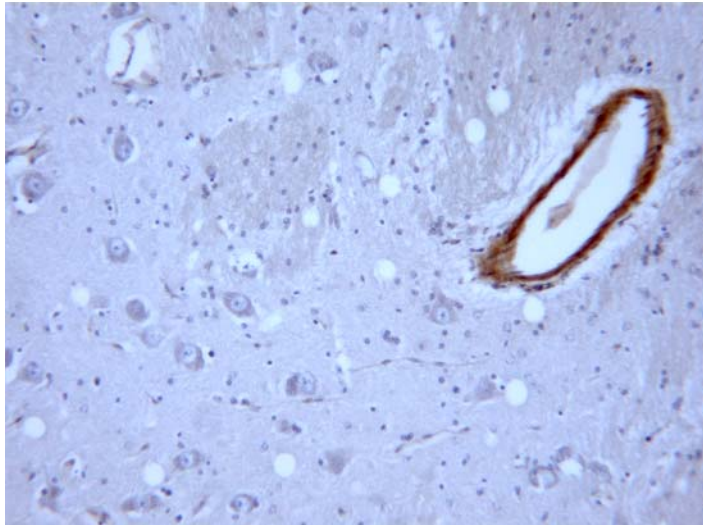
Diossina Neonato



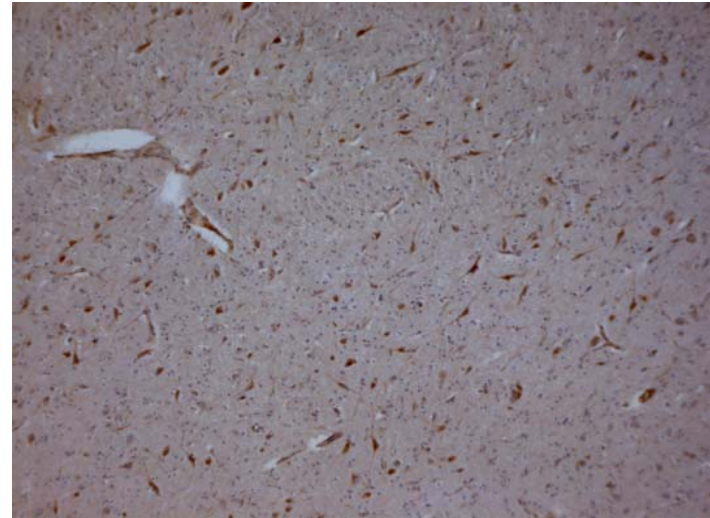
Diossina Neonato

**Fig. 20- Espressione di serotonina nel Talamo e nell'Ipotalamo di pecora**

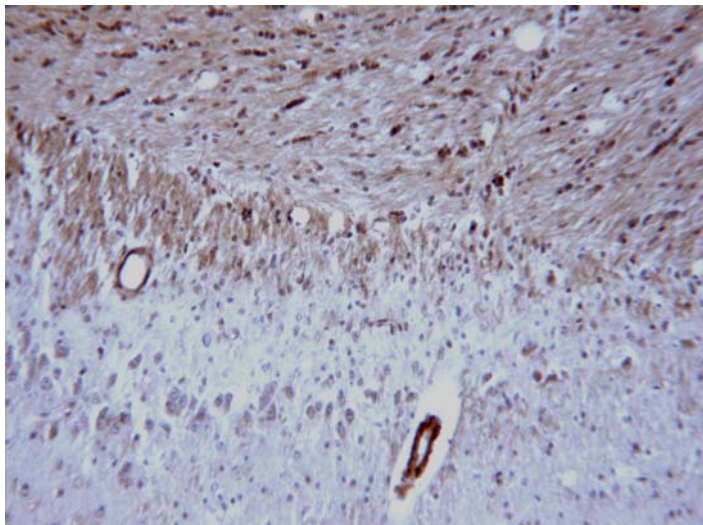
**Controllo  
Adulto  
10x**



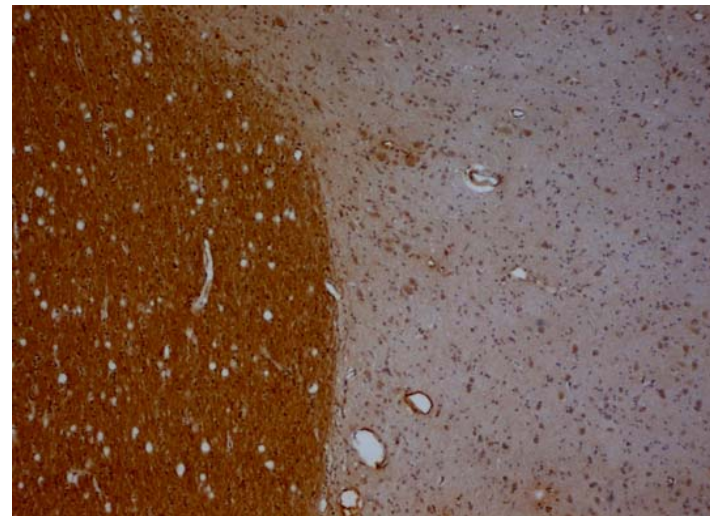
**Controllo  
Neonato  
4x**



**Diossina  
Adulto  
10x**



**Diossina  
Neonato  
4x**



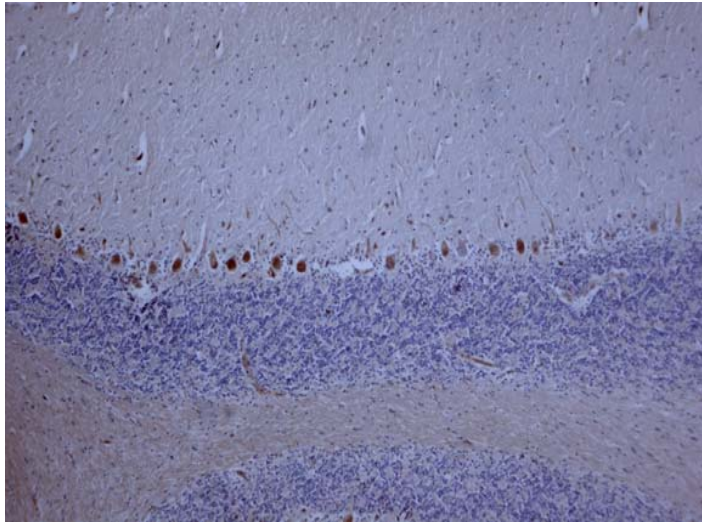
**TALAMO**

**IPOTALMO**

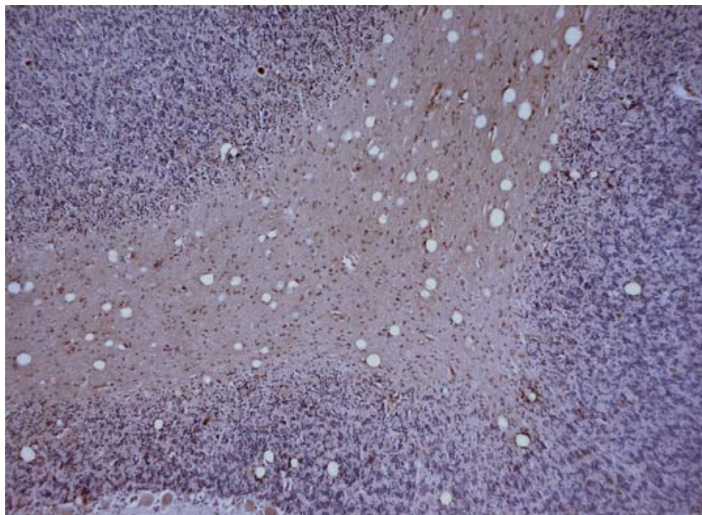


**Fig.21-Espressione di serotonina nel cervelletto di pecora**

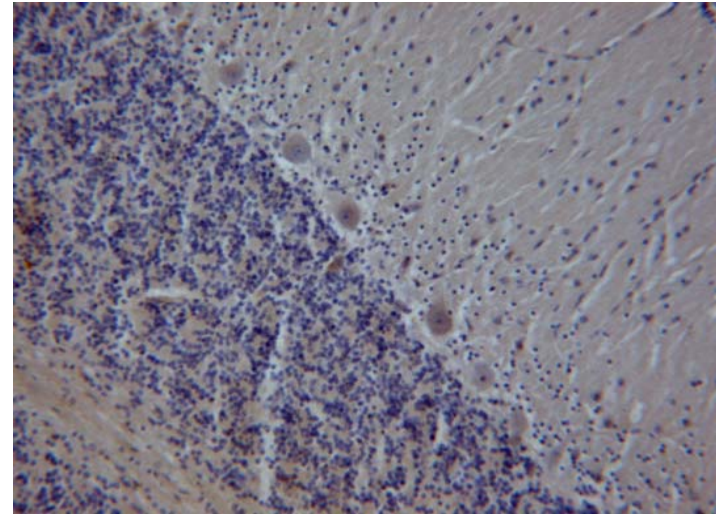
**Controllo  
Adulto  
4x**



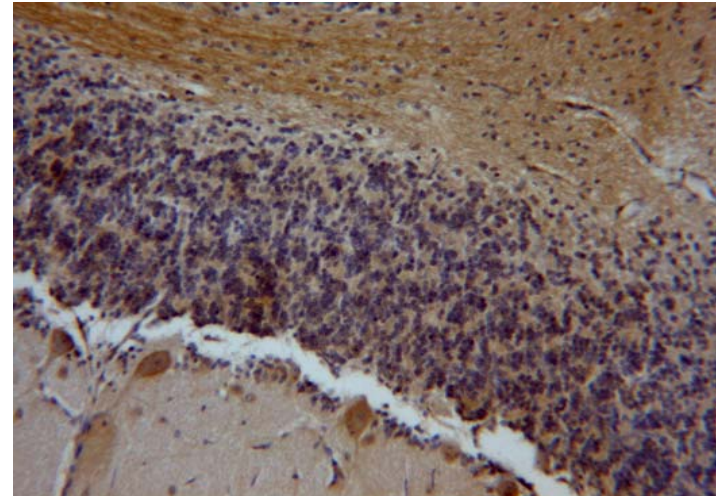
**Diossina  
Adulto  
4x**



**Controllo  
Neonato  
10x**



**Diossina  
Neonato  
10x**



**Fig. 22- Espressione di serotonina nel midollo(medulla) e nel ponte (pons) di Pecora Adulto-2.5x**

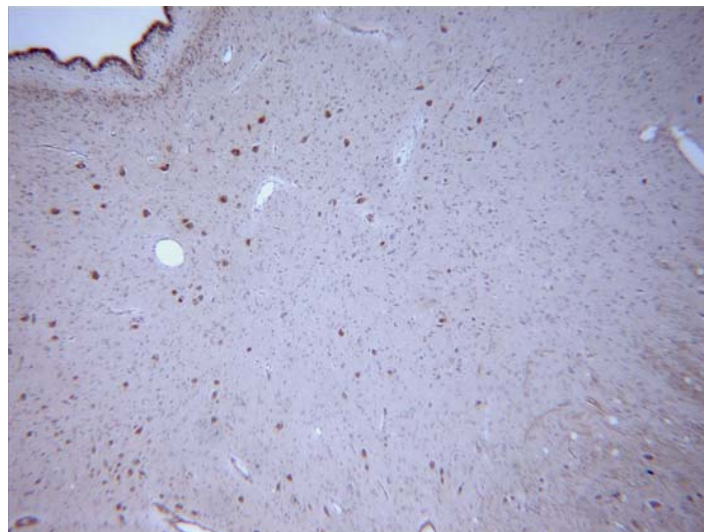
**Medulla-Adulto**

**Pons-Adulto**

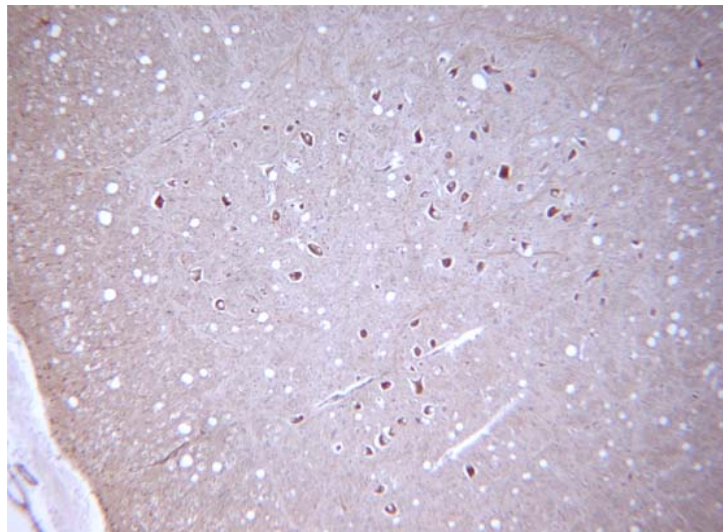
**Controllo**



**Controllo**



**Diossina**

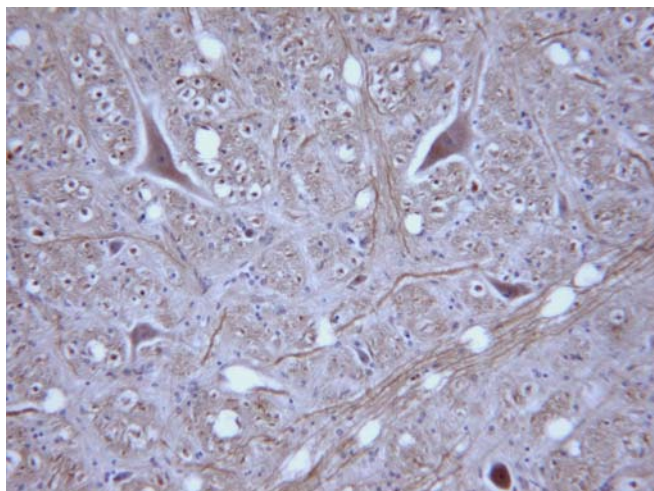


**Diossina**

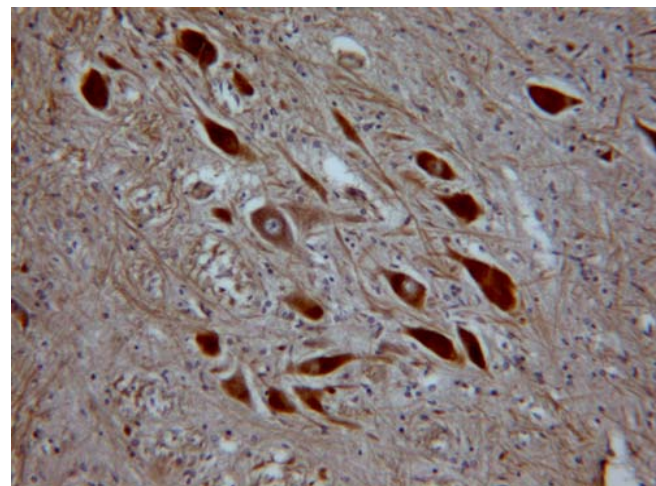


**Fig. 23- Espressione di serotonina nel midollo (medulla) di pecora -10x**

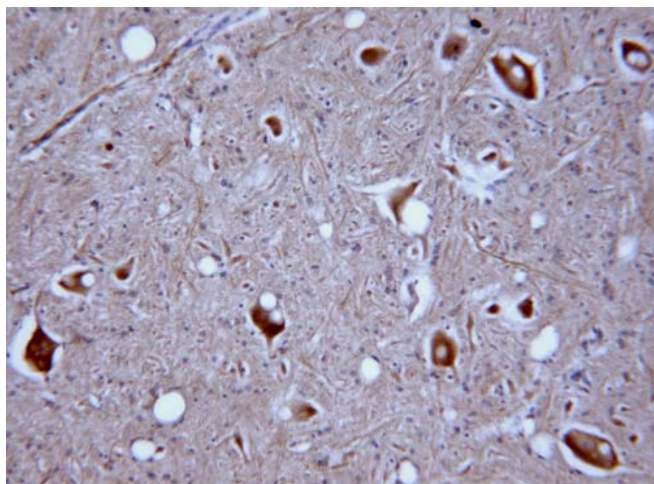
**Controllo  
Adulto**



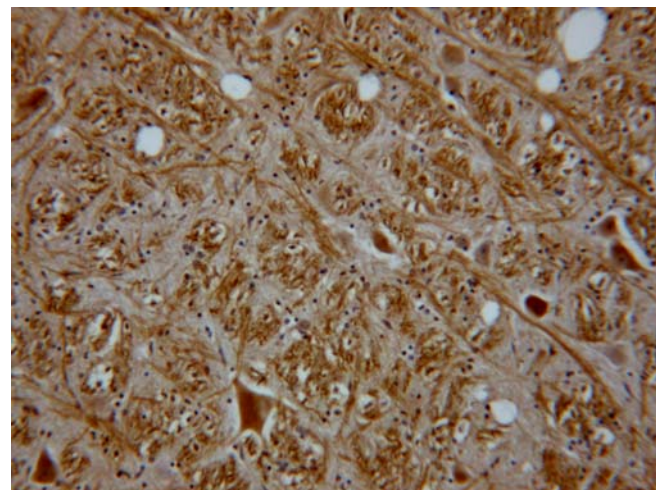
**Controllo  
Neonato**



**Diossina  
Adulto**

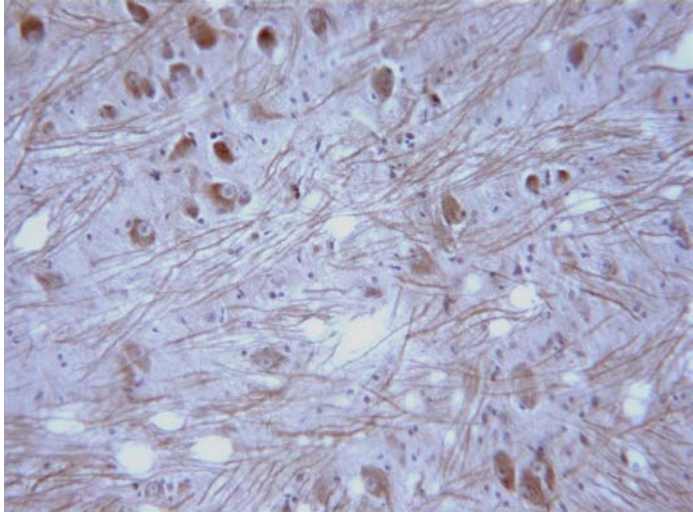


**Diossina  
Neonato**

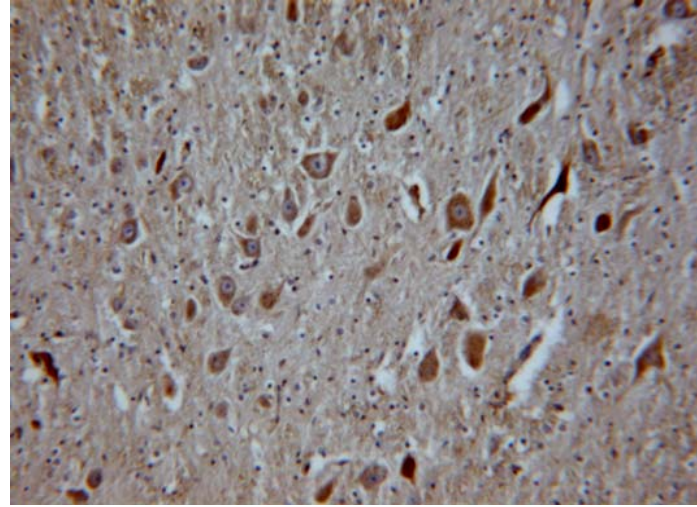


**Fig. 24- Espressione di serotonina nel ponte (pons) di pecora-10x**

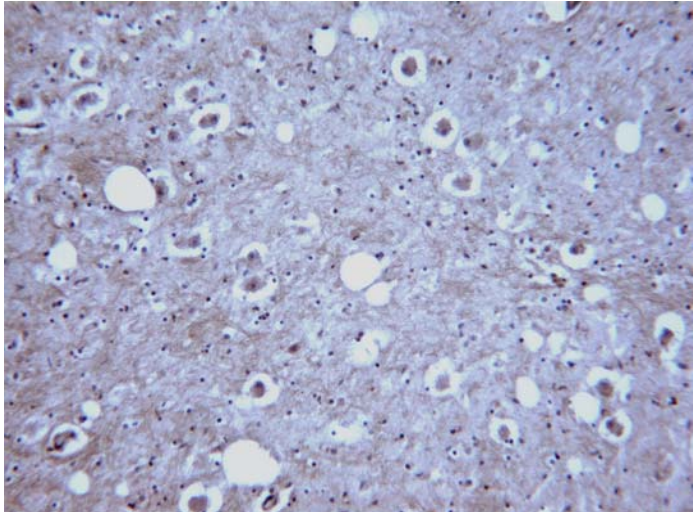
**Controllo  
Adulto**



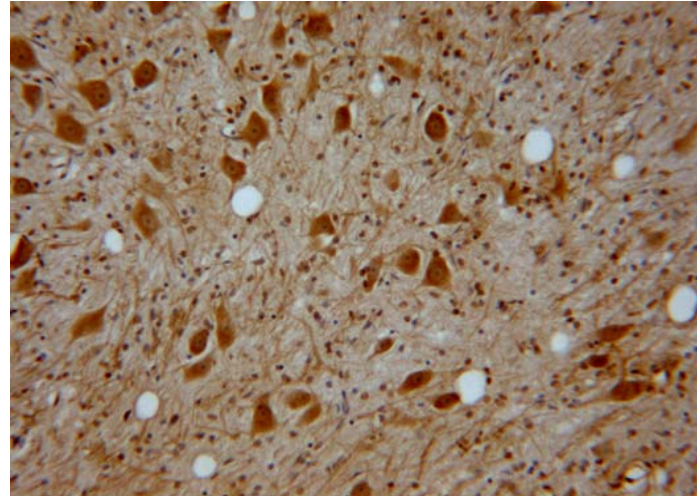
**Controllo  
Neonato**



**Diossina  
Adulto**

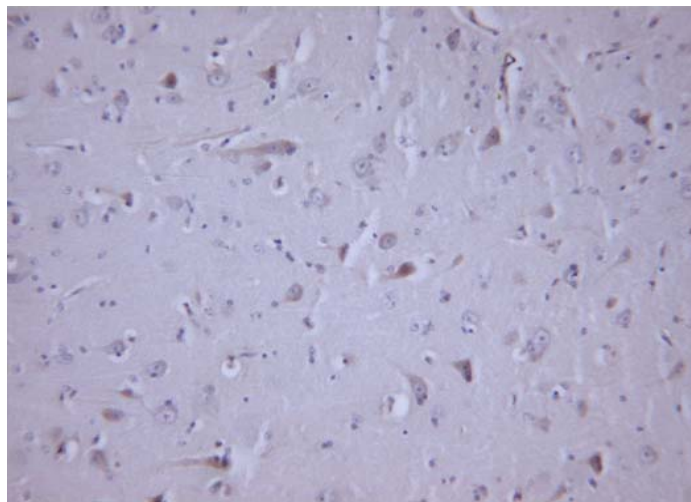


**Diossina  
Neonato**

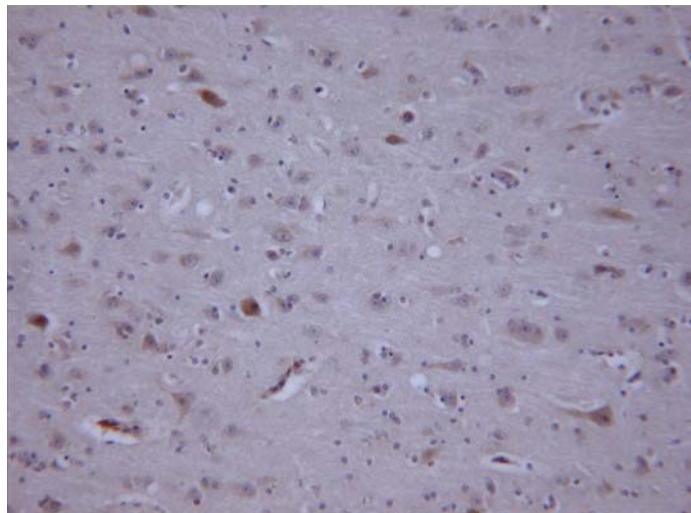


**Fig: 25-Espressione di recettore di serotonina (5HT<sub>1A</sub>) nella corteccia Frontale di pecora**

**Controllo  
Adulto  
10x**



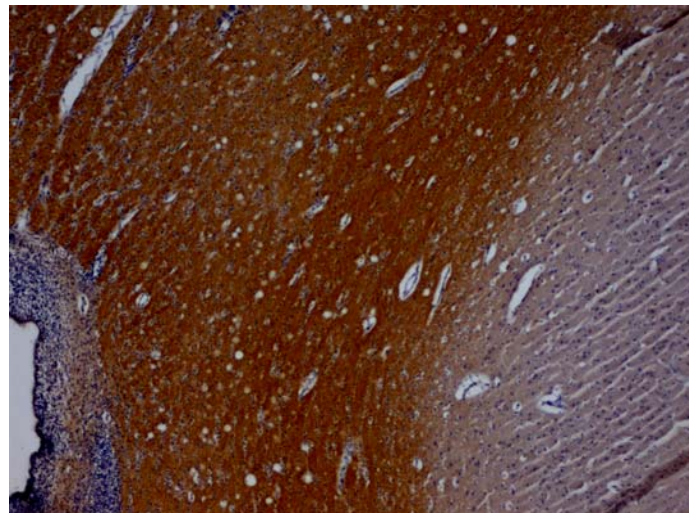
**Diossina  
Adulto  
10x**



**Controllo  
Neonato  
4x**

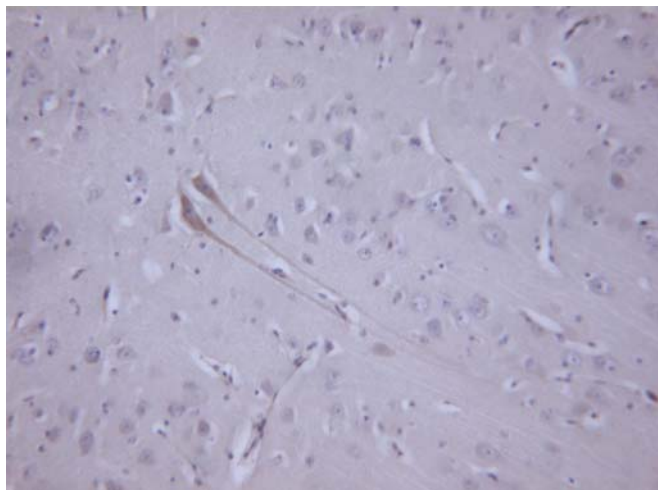


**Diossina  
Neonato  
4x**

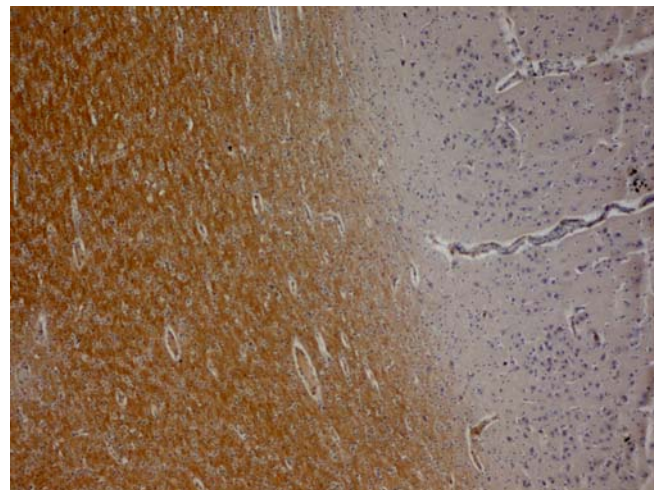


**Fig. 26- Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nella corteccia Parietale di pecora**

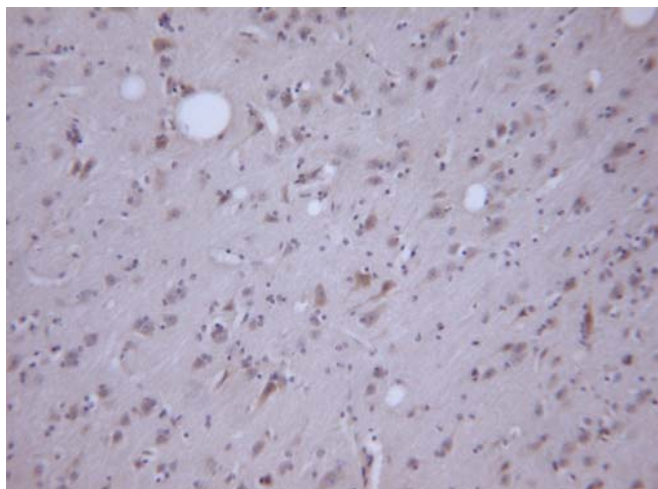
**Controllo  
Adulto  
10x**



**Controllo  
Neonato  
4x**



**Diossina  
Adulto  
10x**

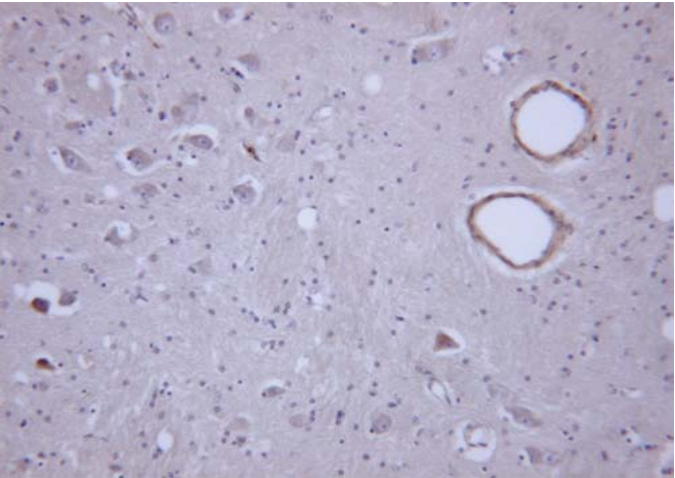


**Diossina  
Neonato  
4x**

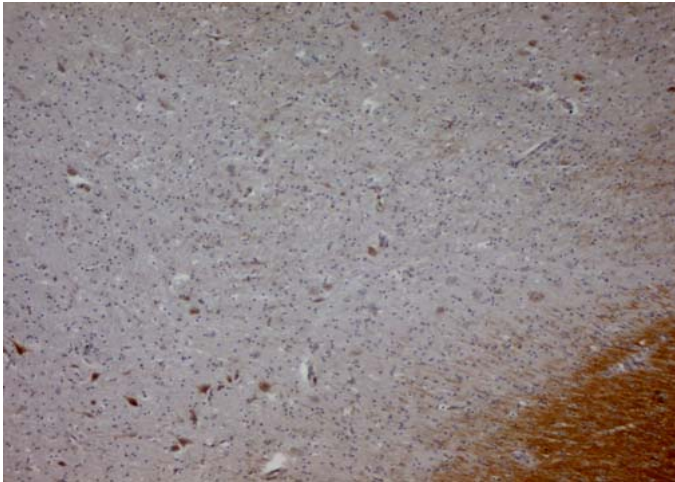


**Fig. 27- Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel Talamo e nell' Ipotalamo di pecora**

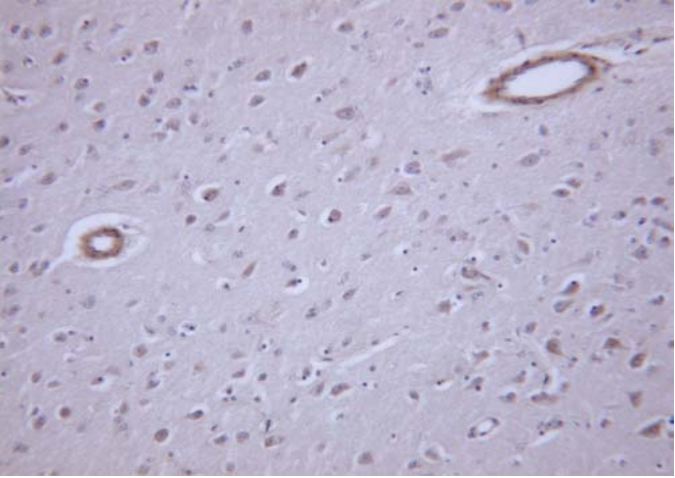
**Controllo  
Adulto  
10x**



**Controllo  
Neonato  
4x**



**Diossina  
Adulto  
10x**



**Diossina  
Neonato  
4x**

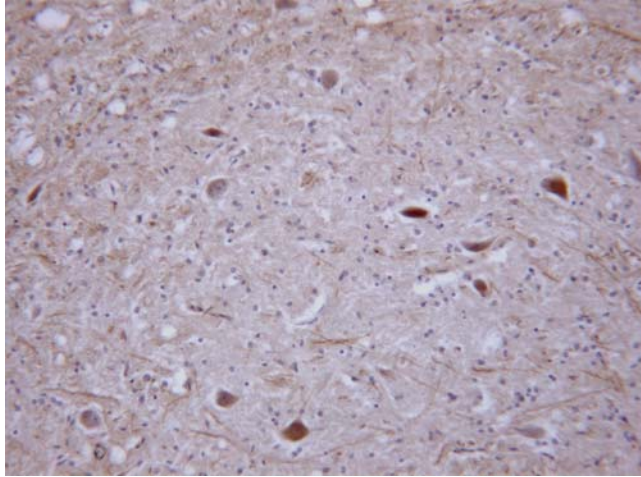


**Talamo**

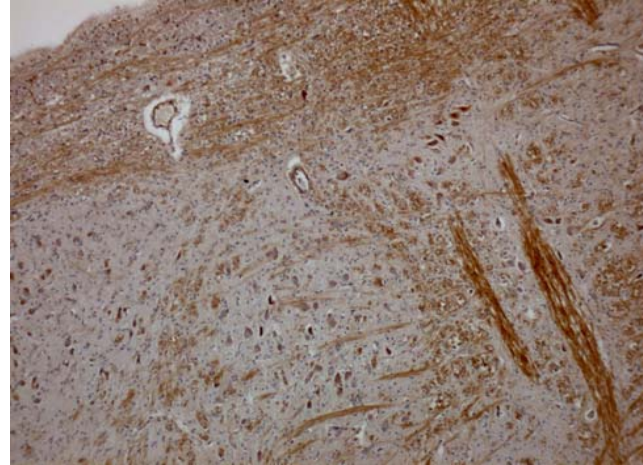
**Ipotalamo**

**Fig. 28- Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel midollo (medulla) di pecora**

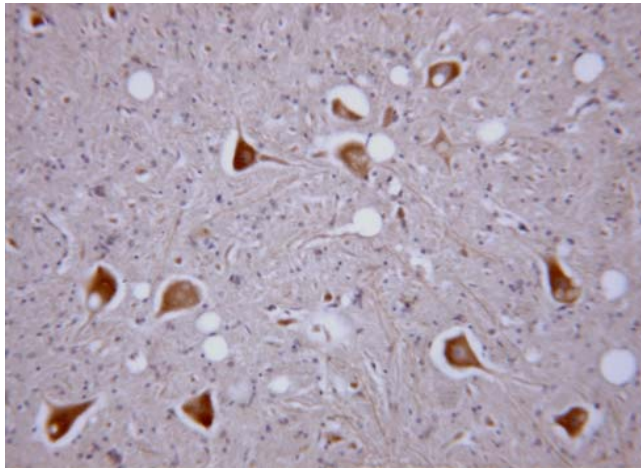
**Controllo  
Adulto  
10x**



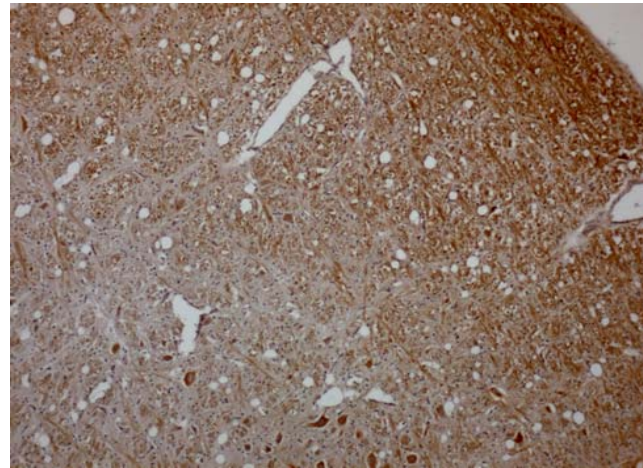
**Controllo  
Neonato  
4x**



**Diossina  
Adulto  
10x**



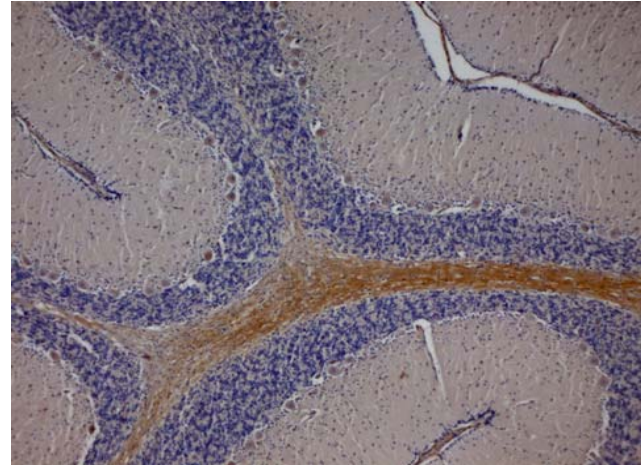
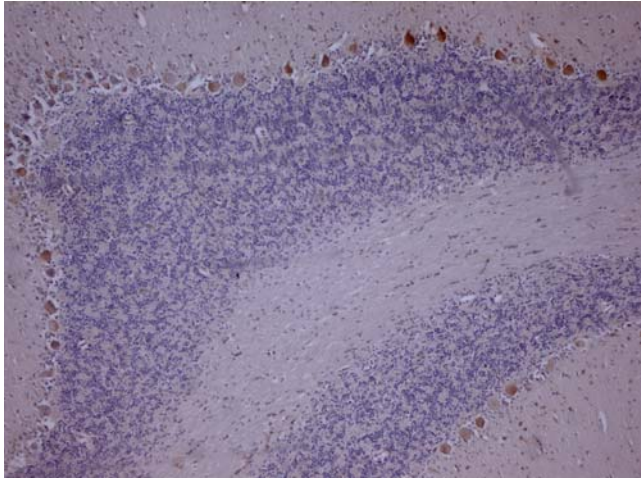
**Diossina  
Neonato  
4x**





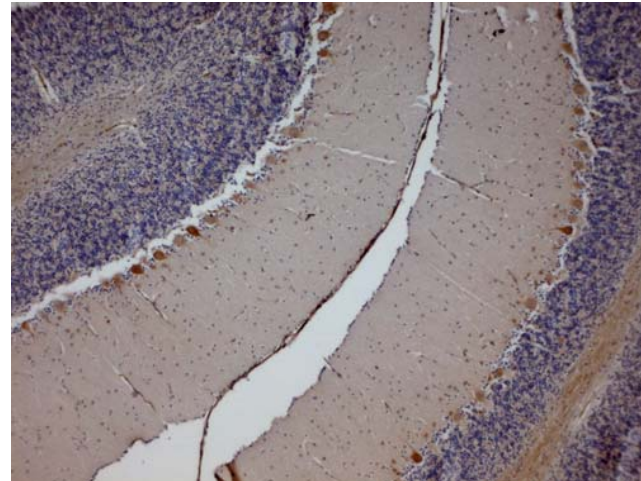
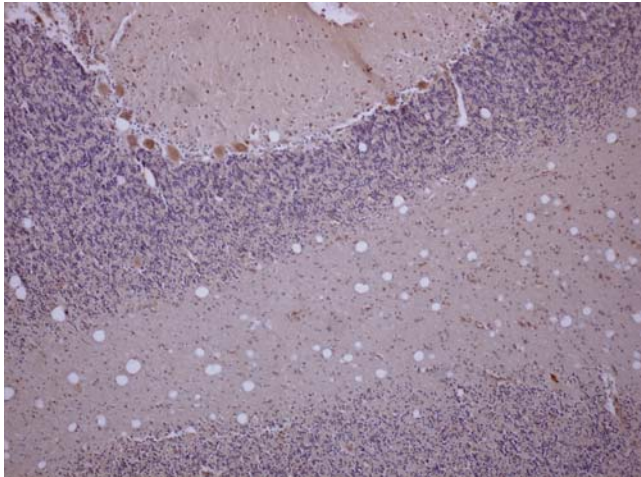
**Fig. 29-Espressione di recettore di serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) nel cervelletto di pecora-4x**

**Controllo  
Adulto**



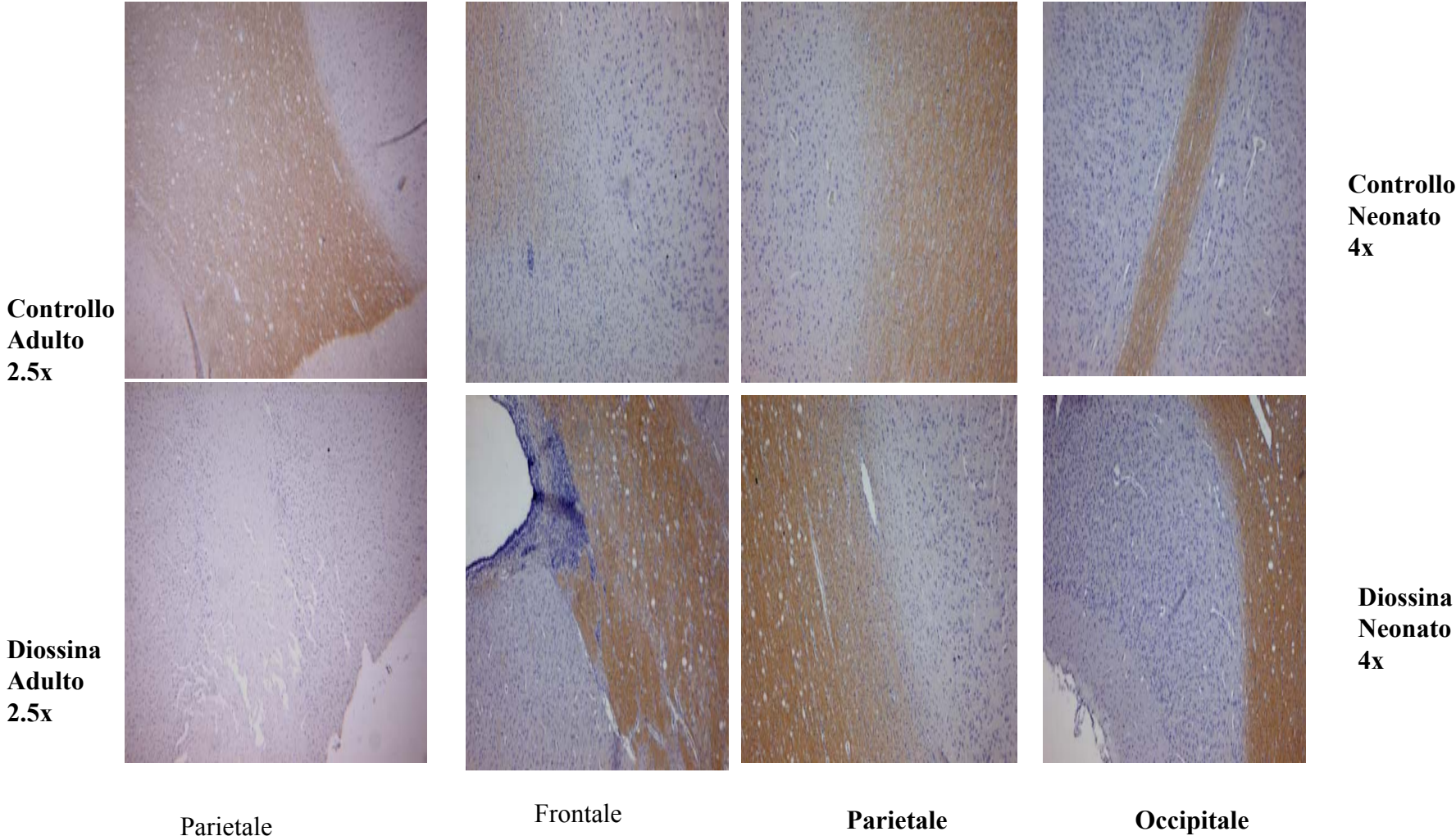
**Controllo  
Neonato**

**Diossina  
Adulto**



**Diossina  
Neonato**

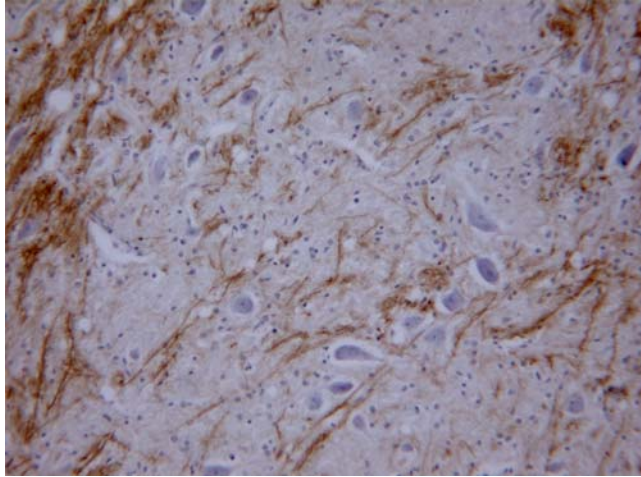
**Fig. 30- Espressione di SERT nella corteccia (Frontale, Parietale, Occipitale) di pecora**



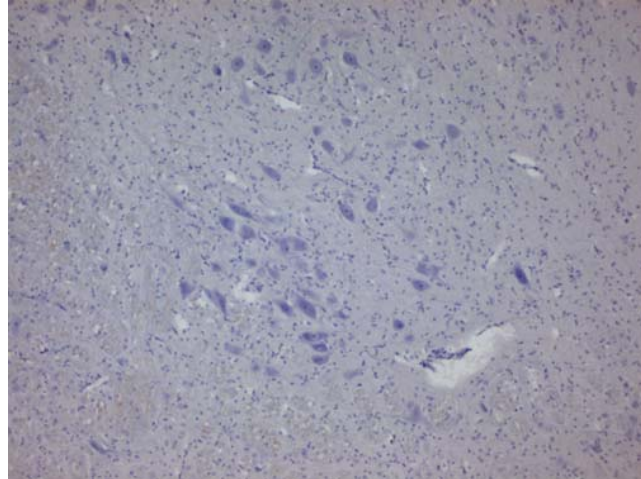
NEONATO

**Fig. 31- Espressione di SERT nel midollo( medulla) di pecora**

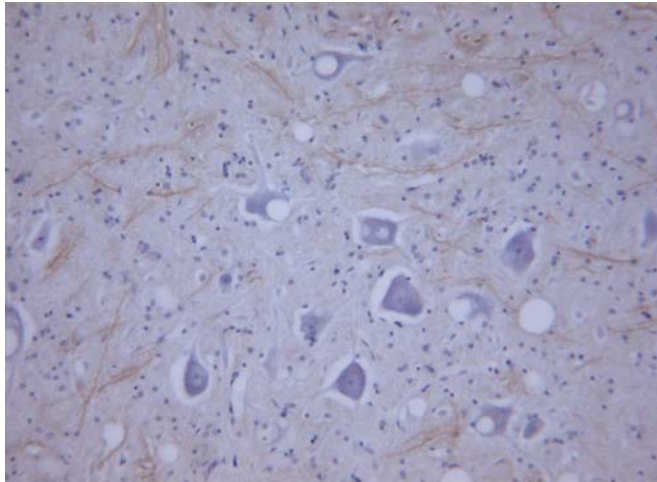
**Controllo  
Adulto  
10x**



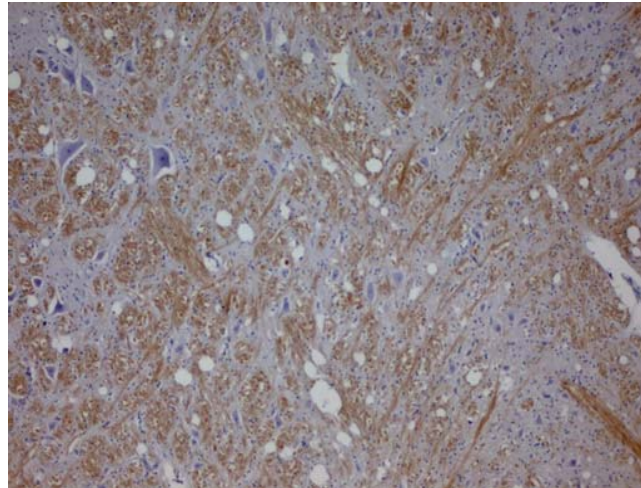
**Controllo  
Neonato  
4x**



**Diossina  
Adulto  
10x**

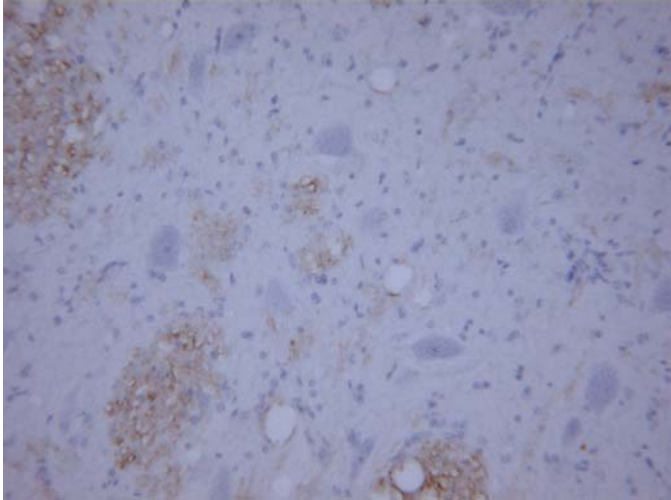


**Diossina  
Neonato  
4x**

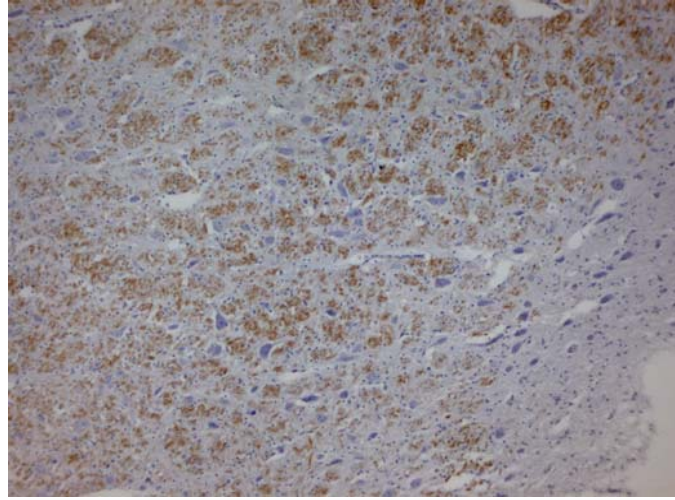


**Fig. 32- Espressione di SERT nel ponte ( pons) di pecora**

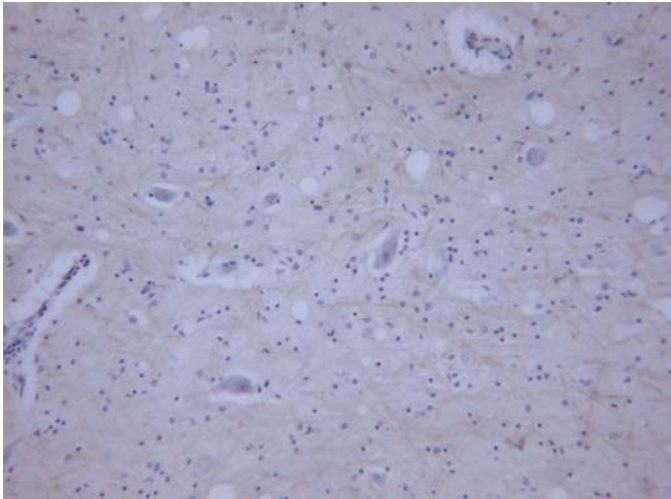
**Controllo  
Adulto  
10x**



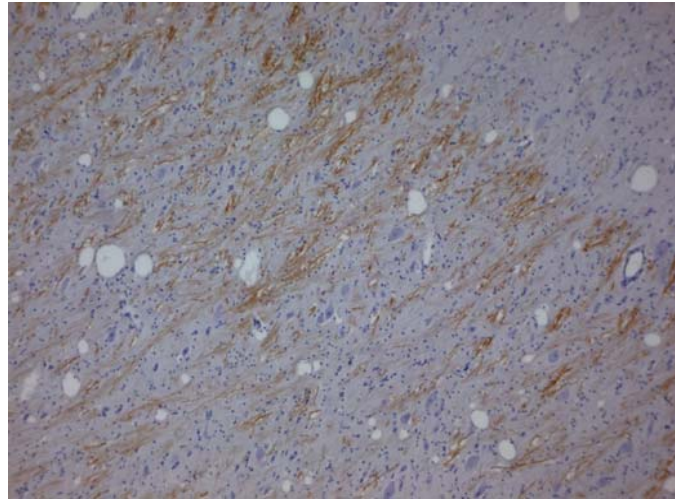
**Controllo  
Neonato  
4x**



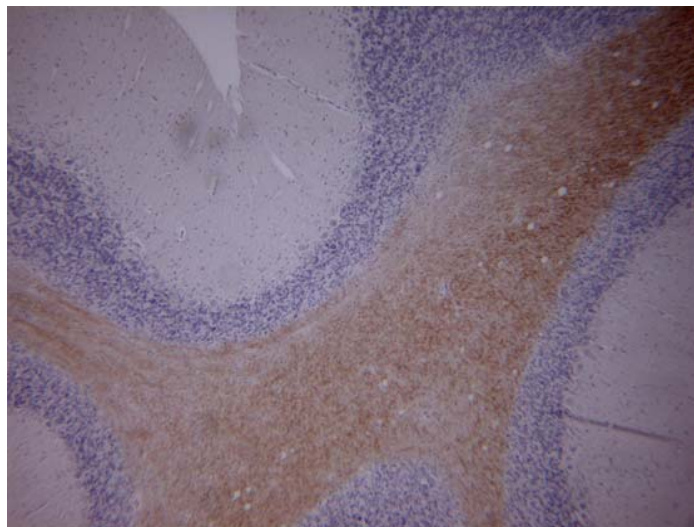
**Diossina  
Adulto  
10x**



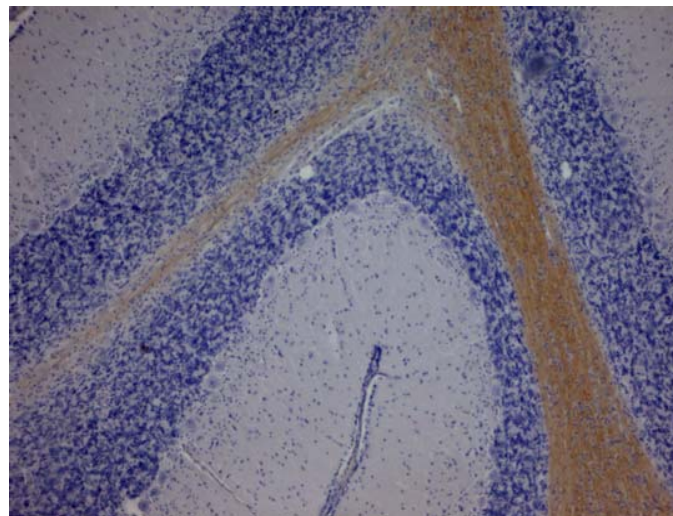
**Diossina  
Neonato  
4x**



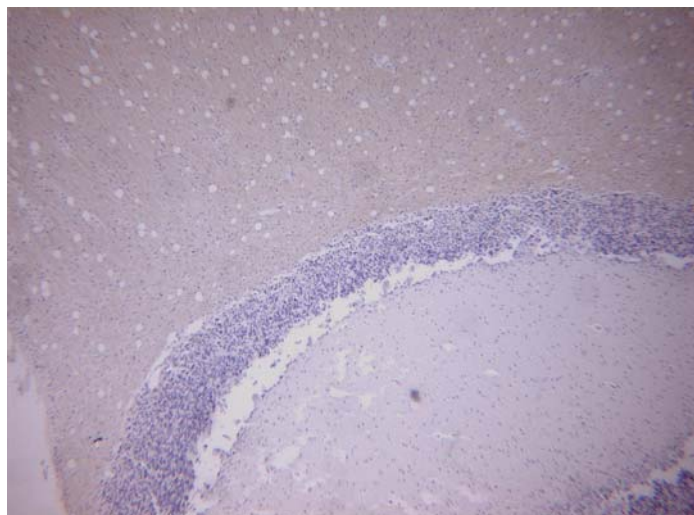
**Fig.33- Espressione di SERT nel cervelletto di pecora**



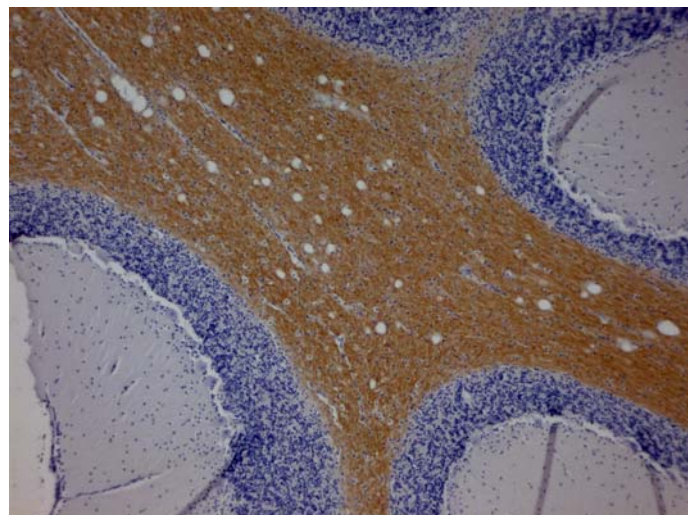
**Controllo  
Adulto  
2.5x**



**Controllo  
Neonato  
4x**



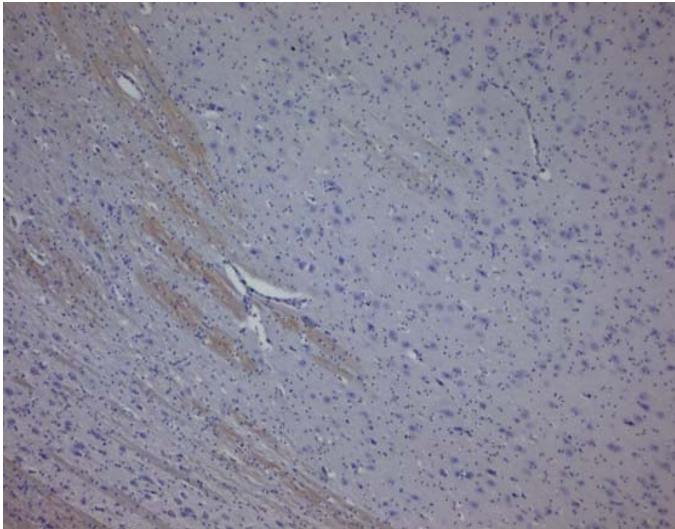
**Diossina  
Adulto  
2.5x**



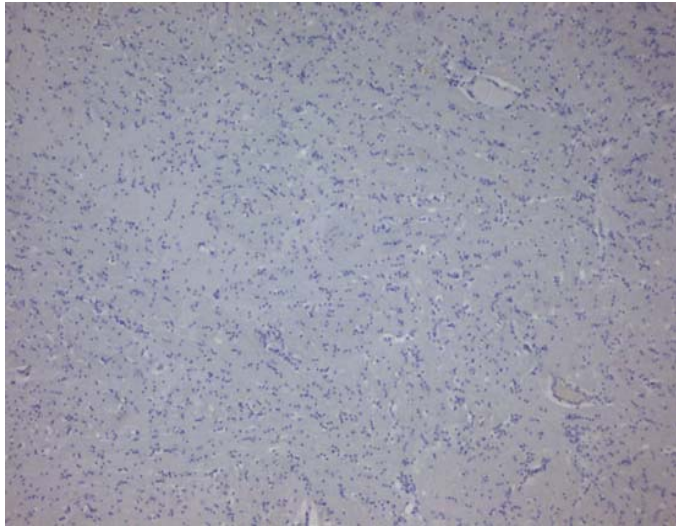
**Diossina  
Neonato  
4x**

**Fig. 34** Espressione di SERT nel Talamo e nell' Ipotalamo di pecora Neonata-4x

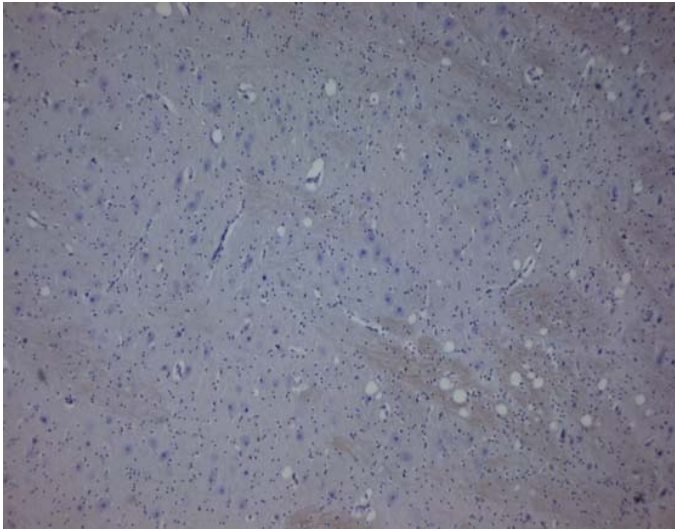
**Controllo**



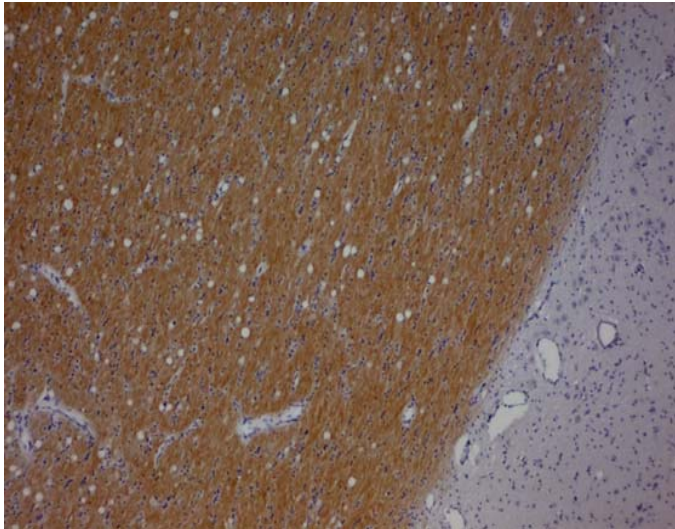
**Controllo**



**Diossina**



**Diossina**



**TALAMO**

**IPOTALAMO**