

INDICE

Riassunto	3
Cap. I Introduzione	5
- 1.1 La prepro-orexina	
- 1.2 Le orexine	
- 1.3 I recettori per le orexine	
- 1.4 Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori nel sistema nervoso centrale	
- 1.5 Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori negli organi periferici	
- 1.6 Funzioni svolte dalle orexine	
Cap. II Materiali e Metodi	39
- 2.1 Immunoistochimica	
- 2.2 Trattamento preliminare dei campioni da sottoporre alle metodiche di western blotting e reverse transcriptase-polymerase chain reaction	
- 2.3 Western blotting	
- 2.4 Reverse transcriptase- polymerase chain reaction	
Cap. III Risultati	52
- 3.1 Complesso uretro-prostatico di bovino	
- 3.2 Ghiandole vestibolari maggiori di bovina	
- 3.3 Prostata di bufalo	
- 3.4 Testicolo di suino	
- 3.5 Testicolo ed epididimo di ratto	
Cap. IV Discussione e Conclusione	59
Tavole	64

Legenda tavole _____ 69

Bibliografia _____ 66

RIASSUNTO

Le orexine A (OXA) e B (OXB) sono due peptidi individuati per la prima volta nell'ipotalamo laterale di ratto che derivano da un medesimo precursore, la prepro-orexina. Esse legano due recettori definiti recettore 1 e 2 per le orexine (OX1R ed OX2R) e sono localizzate nel sistema nervoso centrale ed in organi periferici quali le ghiandole surrenali, i reni, l'intestino ed il testicolo. Le orexine influenzano numerose funzioni organiche tra le quali l'assunzione degli alimenti, il comportamento sessuale, il ritmo veglia-sonno e le relazioni neuro-endocrine. Scopo del presente lavoro è di indagare la presenza della prepro-orexina, dell'OXA e dell'OX1R in alcuni segmenti del genitale di diverse specie animali utilizzando metodiche di immunistoichimica (IHC), western blotting (WB) e reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Gli organi indagati sono il complesso uretro-prostatico del bovino, la ghiandola vestibolare della bovina, la prostata del bufalo, il testicolo di suino e di ratto e l'epididimo di ratto. Frammenti tessutali sono stati colorati con la metodica IHC all'avidina-biotina

e quelli prelevati dalla prostata del bovino sono stati sottoposti, anche, alle tecniche del WB e dell'RT-PCR.

L'OXA ed il suo recettore 1 risultano presenti diffusamente nelle cellule esocrine degli adenomeri della ghiandola prostatica e di quella vestibolare. Entrambe le sostanze sono state documentate anche nelle cellule del Sertoli, negli spermatogoni e spermatidi del testicolo di ratto e suino, mentre nell'epididimo di ratto è stata riscontrata immunopositività soltanto per il peptide.

I risultati ottenuti nel corso del presente lavoro ampliano gli scarsi dati bibliografici reperibili sull'argomento. La presenza dell'OXA e del relativo recettore 1 in vari segmenti dell'apparato genitale, autorizza l'ipotesi che i peptidi svolgano molteplici funzioni in tale apparato al momento in larga parte sconosciute. Le uniche parzialmente note riguardano il testicolo ed assegnano all'OXA un ruolo stimolante la steroidogenesi delle cellule interstiziali di Leydig ed inibente la proliferazione dell'epitelio germinativo. Ulteriori studi in corso nel nostro laboratorio tendono a chiarire tal ruolo funzionale in relazione ai vari targets qui evidenziati per il peptide.

Capitolo I

INTRODUZIONE

L'impiego delle moderne biotecnologie ed il desiderio di voler comprendere i numerosi ed intricati meccanismi che regolano l'omeostasi degli esseri viventi, nonché la loro vita di relazione, hanno fomentato negli ultimi decenni la scoperta di numerose sostanze biologicamente attive tra le quali le orexine A e B (OXA e OXB) definite anche ipocretine 1 e 2 (hpct1 e hpct2) hanno suscitato crescente interesse nel mondo scientifico.

Il termine orexine, dal greco “ορεκτέος” che significa “inducente l'appetito”, si deve al gruppo di ricerca di T. Sakurai che scoprì questi peptidi nel 1998 in corso di uno studio volto ad individuare i ligandi, fino ad allora sconosciuti, di due recettori “G-protein-coupled”. Gli autori evidenziarono che le orexine derivano da un precursore comune, la prepro-orexina, il cui RNA messaggero (mRNA) è abbondantemente e specificamente espresso nell'ipotalamo laterale del ratto ed in aree cerebrali adiacenti a

quest'ultimo e costituenti nel loro complesso il così detto "centro dell'appetito". Inoltre, si scoprì che se somministrate per via intracerebroventricolare (ICV) nella stessa specie, esse sono in grado di indurre aumento dell'assunzione dei cibi (Sakurai et al., 1998). I due relativi recettori furono definiti recettore 1 (OX1R) e 2 (OX2R) per le orexine.

Nello stesso periodo di tempo il gruppo di ricerca di L. de Lecea, effettuò una serie di scoperte destinate ad integrarsi con le precedenti. Esso, utilizzando una particolare variante della tecnica della "polymerase chain reaction" (PCR) mise in evidenza nell'ipotalamo di ratto varie sequenze di mRNA fino ad allora sconosciute una delle quali risultò particolarmente abbondante nell'ipotalamo dorsolaterale ed in grado di codificare per la prepro-ipocretina, precursore di due peptidi che avevano una sequenza aminoacidica simile alla secretina intestinale per cui vennero definite ipocretine 1 e 2 (de Lecea et al., 1998).

Ben presto divenne chiaro che queste ultime corrispondevano del tutto alle orexine evidenziate da T. Sakurai e coll. e che il gene che codifica per le prime codifica anche per le seconde. Infatti alcune differenze inizialmente descritte tra orexine ed ipocretine,

riguardanti l'azione biologica e la morfologia tridimensionale della catena polipeptidica, furono ben presto superate e le due molecole vennero definite orexine A e B perché la loro analogia con la secretina intestinale risultò in effetti, modesta.

1.1 La prepro-orexina

Il gene che codifica per la prepro-orexina è localizzato nel cromosoma 11 del topo che presenta varie analogie con il cromosoma umano 17q21-q24 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1999). Il gene è formato da due esoni ed un introne per un totale di 1432 paia di basi (pb) (Taheri and Bloom, 2001) di cui la porzione più essenziale per la trascrizione della prepro-orexina risulta essere costituita dalle 450 pb più prossimali (Kukkonen et al., 2002). A causa della sua localizzazione nel cromosoma 17q21-q24, il gene dell'uomo è stato funzionalmente coinvolto nel determinismo del gruppo di malattie neurovegetative definite "chromosome 17-linked dementiae" comprendenti il complesso di disinibizione, la demenza, il parkinsonismo e l'amiotrofia (Sakurai et al., 1998). La prepro-orexina dei mammiferi uomo, ratto, topo, cane e suino è composta da 130-131 aminoacidi (aa) (Kukkonen et al., 2002) (Fig.1), la cui sequenza è ben conservata all'interno del genoma delle specie suddette mostrando un alto grado di analogia (75%) e stretta somiglianza anche con quelli di specie inferiori quali lo *xenopus laevis* (Voisin et al., 2003). In particolare la sequenza della prepro-

orexina del ratto è per l'83% identica a quella dell'uomo e per il 95% a quella del topo.

La presenza della prepro-orexina è stata riscontrata nell'ipotalamo, nel nucleo subtalamico e nelle cellule endodermali (Sakurai et al., 1998; Kukkonen et al., 2002) e in apparati diversi dal sistema nervoso centrale, nel cuore, polmone, rene, apparato digerente, ghiandole surrenali, placenta e muscolatura scheletrica (Sakurai et al., 1998; Nakabayashi et al., 2003). Mediante la tecnica dell'RT-PCR questo prepro-ormone è stato individuato, anche, nell'epididimo e nel pene dell'uomo (Karteris et al., 2004), nelle gonadi maschili del ratto (Barreiro et al., 2005) ed in quelle del pollo in entrambi i sessi (Okhubo et al., 2003).

L'mRNA della prepro-orexina è presente nel cervello dell'embrione di ratto in basse concentrazioni a partire dal 18° giorno di sviluppo ed aumenta drasticamente dalla terza settimana post natale (de Lecea et al., 1998). Esso raggiunge livelli elevati in particolari fasi della vita quali la gestazione e la lattazione (Wang et al., 2003; Kanenishi et al., 2004).

L'assenza dei geni che codificano per la prepro-orexina provoca nell'uomo manifestazioni sintomatologiche simili alla narcolessia

(Peyron et al., 2000) diversa sotto il profilo patogenetico dalla analoga sindrome canina che è causata da una mutazione dei geni responsabili della produzione dell'OX2R.

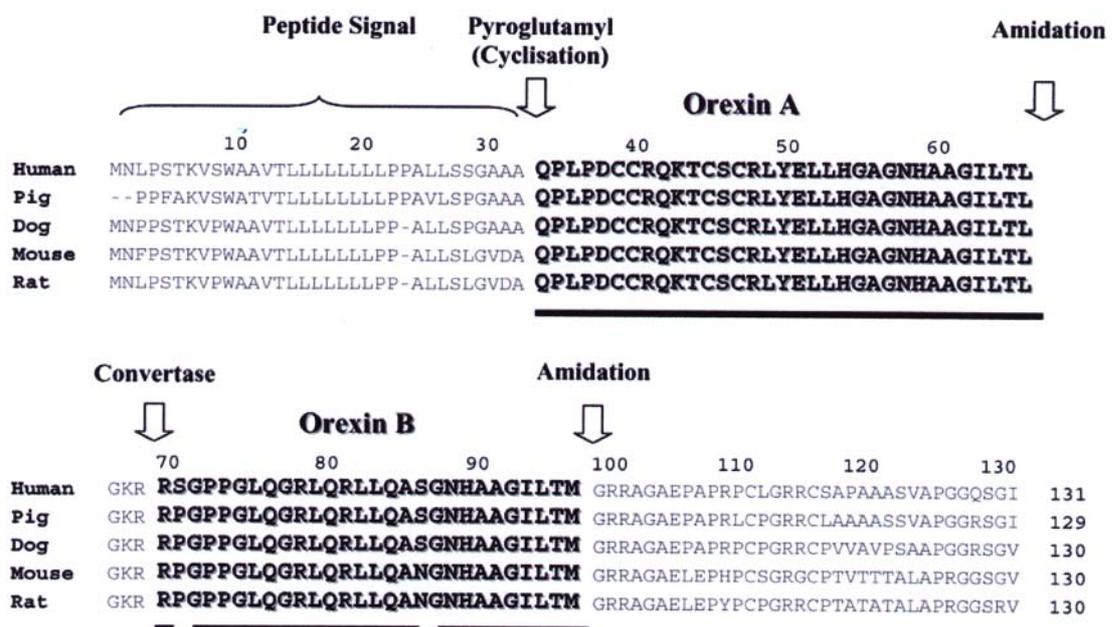


Fig. 1: Struttura della prepro-orexina e localizzazione delle sequenze aminoacidiche dell'OXA e dell'OXB in alcuni vertebrati (in grossetto). Le frecce indicano i siti di clivaggio e modificazioni chimiche, mentre gli aminoacidi sottolineati sono quelli che si conservano identici nella sequenza dei due peptidi nell'uomo, nel suino, nel cane, nel topo e nel ratto.

1.2 Le orexine

Mediante tagli proteolitici post-trascrizionali dalla prepro-orexina si ottengono l'OXA e l'OXB. L'OXA è composta da 33 aa, inizia con l'aminoacido glicina³³ che è ciclizzato in un residuo piroglutamico mediante una transamidazione enzimatica e finisce con un residuo carbossiamidato (Sakurai et al., 1998). Essa presenta all'interno della sua struttura due ponti disolfuro che si formano su quattro residui cisteinici, precisamente tra la cisteina in posizione 6 e quella in posizione 12 e tra la cisteina in posizione 7 e quella in posizione 14 (Fig. 2). Il peptide ha un peso molecolare di 3562 daltons ed una struttura terziaria ad α -elica (Voisin et al., 2003).

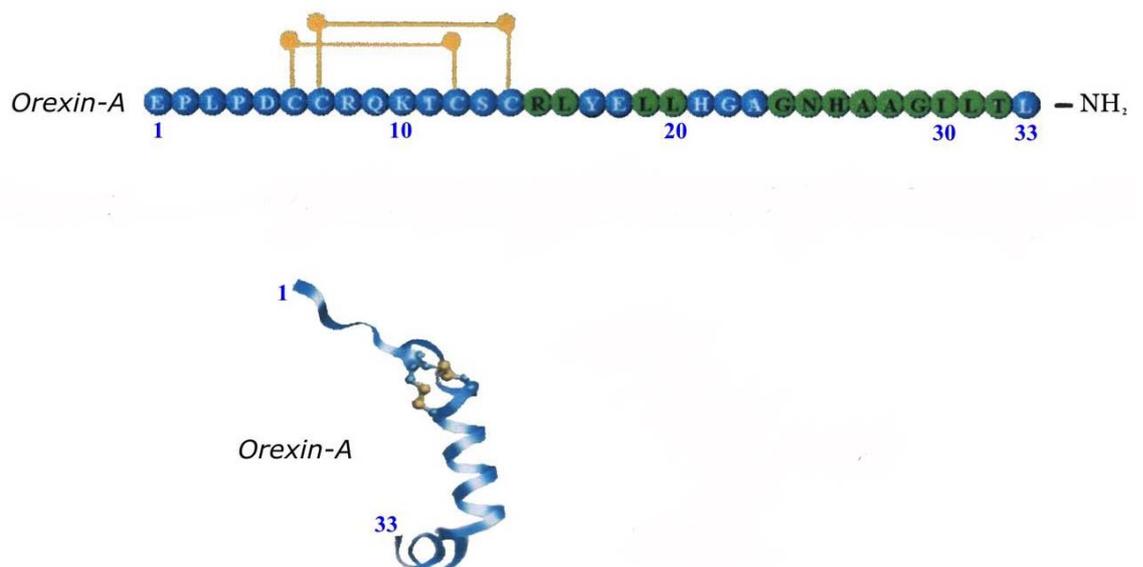


Fig. 2: Sequenza lineare e struttura terziaria dell'OXA.

La sequenza aminoacidica dell'OXA dell'uomo è identica a quella del ratto, topo, bovino e suino (Taheri and Bloom, 2001) e differisce da quella dello *Xenopus laevis* (Shibahara et al., 1999) per sei aa e per il fatto che quest'ultima è priva dei due aminoacidi NH2 terminali (Kukkonen et al., 2002) (Fig. 3).

B

human/rat/mouse/pig/dog/bovine orexin-A	qplpdccrqtcscriyellhgagnhaagiltl
xenopus orexin-A	apdccrqtcscriydlirgignhaagiltl

Fig. 3: Sequenza aminoacidica dell'OXA in diverse specie animali: uomo, ratto, topo, suino, cane, bovino e *Xenopus laevis*. Sono evidenziati, in grigio, gli aminoacidi differenti tra le varie specie.

L'OXB è un peptide lineare costituito da 28 aa, dotato di un terminale carbossiamidato e di un peso molecolare di 2937 daltons (Sakurai et al., 1998). Come l'OXA anch'esso è dotato di una struttura terziaria ad α -elica (Voisin et al., 2003) (Fig. 4).

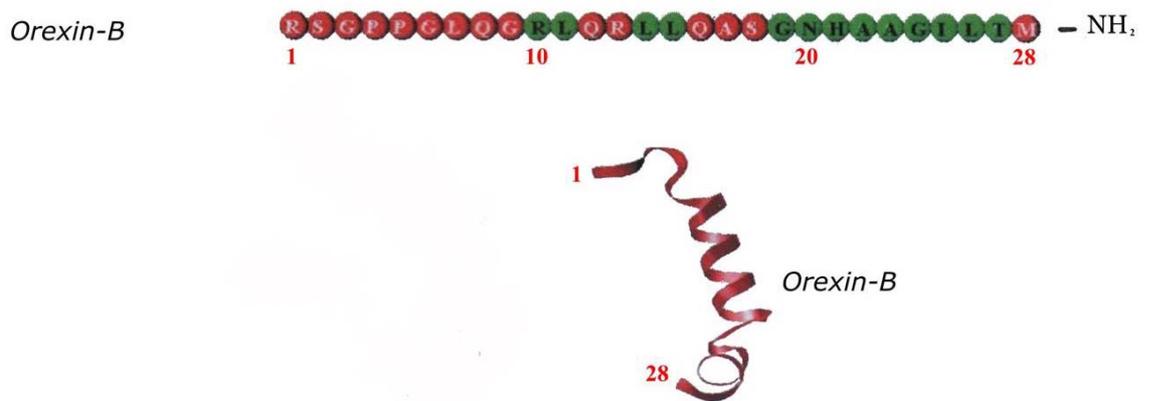


Fig. 4: Sequenza lineare e struttura terziaria dell'OXB.

La sequenza aminoacidica dell'OXB del topo è identica a quella del ratto (Sakurai et al., 1998). Quella umana differisce dalle precedenti per due sostituzioni aminoacidiche, da quella dei cani e dei suini per una e da quella dello *Xenopus laevis* per sette (Kukkonen et al., 2002) (Fig. 5).

C

human orexin-B	rsgppglqgrrlqrrllqasgnhaagiltm
pig/dog orexin-B	rp g ppglqgrrlqrrllqasgnhaagiltm
mouse/rat orexin-B	rp g ppglqgrrlqrrllq a gnhaagiltm
Xenopus orexin-B	rs d f q t m g srlqrrllq g sgnhaagiltm

Fig. 5: Sequenza aminoacidica dell'OXB in diverse specie animali: uomo, ratto, topo, suino, cane, Xenopus laevis. In grigio, sono evidenziati gli aminoacidi diversi tra le varie specie.

Degna di nota è l'analogia che l'OXB degli orsi presenta con la secretina, mentre quella umana ha soltanto sette aa in comune con l'ormone intestinale.

La presenza dei ponti disolfuro nella sequenza dell'OXA rende quest'ultima più stabile rispetto all'OXB in ambito fisiologico e le conferisce maggiore solubilità nei grassi, tale caratteristica consente all'OXA di oltrepassare la barriera emato-encefalica e di concentrarsi sensibilmente nel liquido cefalo rachidiano (Kukkonen et al., 2002). Confrontando la sequenza aminoacidica dei due peptidi nell'uomo si evidenzia che essi sono identici per il 46% (Fig. 6) della loro composizione. La porzione simile è quella responsabile del legame con l'OX2R, mentre quella diversa del legame con l'OX1R. Questo è il motivo per cui l'OXA ha una

affinità due/tre volte superiore dell'OXB per l'OX1R, ma mostra affinità di legame simile per l'OX2R (Sakurai et al., 1998). Tale ipotesi è stata maggiormente avvalorata da uno studio in vitro condotto su cellule ovariche di hamster cinese che dimostra una riduzione di potenza nel legame dell'OXA con l'OX1R in seguito al cambiamento della sequenza del peptide, mentre la capacità di legare il recettore due rimane invariata (Ammoun et al., 2003).



Fig. 6: Sovrapposizione delle strutture tridimensionali dell'OXA (in blu) e dell'OXB (in rosso).

In un recente studio si è evidenziata l'importanza svolta dagli aa compresi tra la posizione 6 e 14 di entrambe le sostanze ai fini dell'attivazione dei recettori. Allo scopo, invece, non risulta necessario che i ponti disolfuro dell'OXA siano conservati e non è

influenza la struttura terziaria dei peptidi (Lang et al., 2005). Per entrambe le molecole gli aa COOH-terminali risultano più importanti degli NH₂ (Darker et al., 2001).

1.3 I recettori per le orexine

I recettori per le orexine fanno parte della sottoclasse A delle proteine citoplasmatiche di tipo G-“protein-coupled” (Kukkonen et al., 2002). L’OX1R dell’uomo è accoppiato alla sottoclasse Gq di proteine recettoriali (Zhu et al., 2003), è costituito da 425 aa, presenta una struttura caratterizzata da più segmenti elicoidali transmembrana (Fig. 7). Esso è codificato da sei esoni (Peyron et al., 2000) ed il suo gene è localizzato sul cromosoma 1p33 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001).

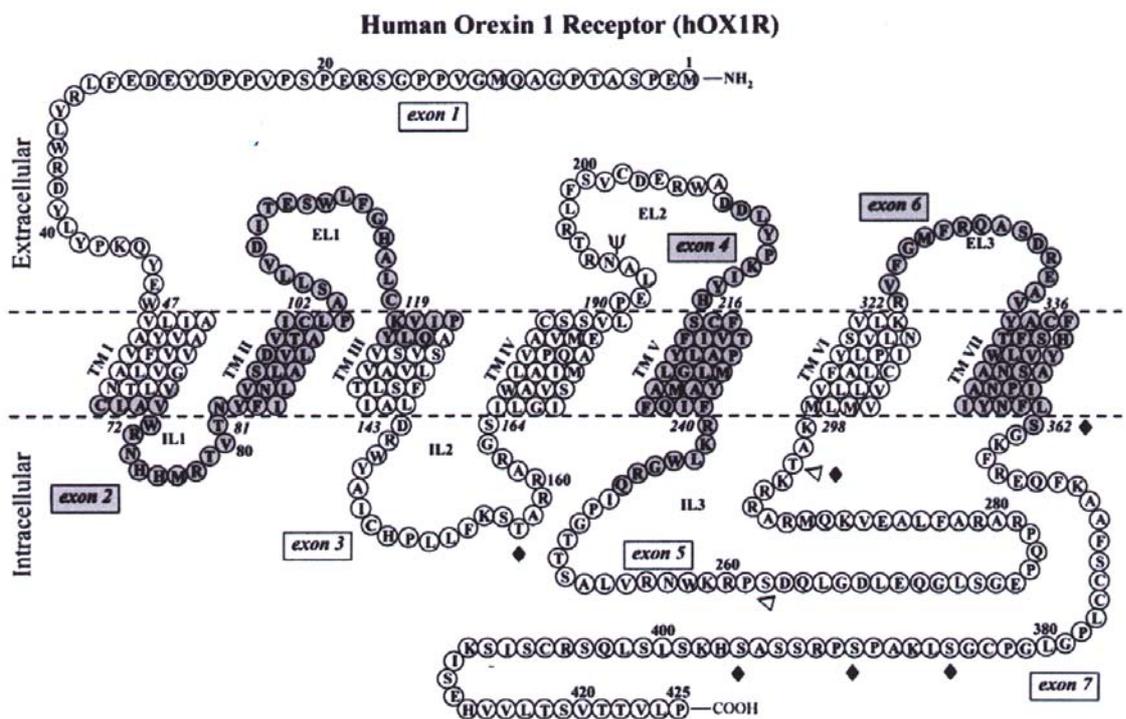


Fig. 7: Struttura secondaria dell’OX1R umano.

L'OX2R dell'uomo è accoppiato alle sottoclassi Gq e Gi/o di proteine recettoriali (Zhu et al., 2003), è composto da 444 aa e anch'esso presenta sette eliche transmembrana (Fig. 8). Questo recettore è codificato da sette esoni (Peyron et al., 2000) ed il gene relativo è localizzato sul cromosoma 6p11-q11 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001).

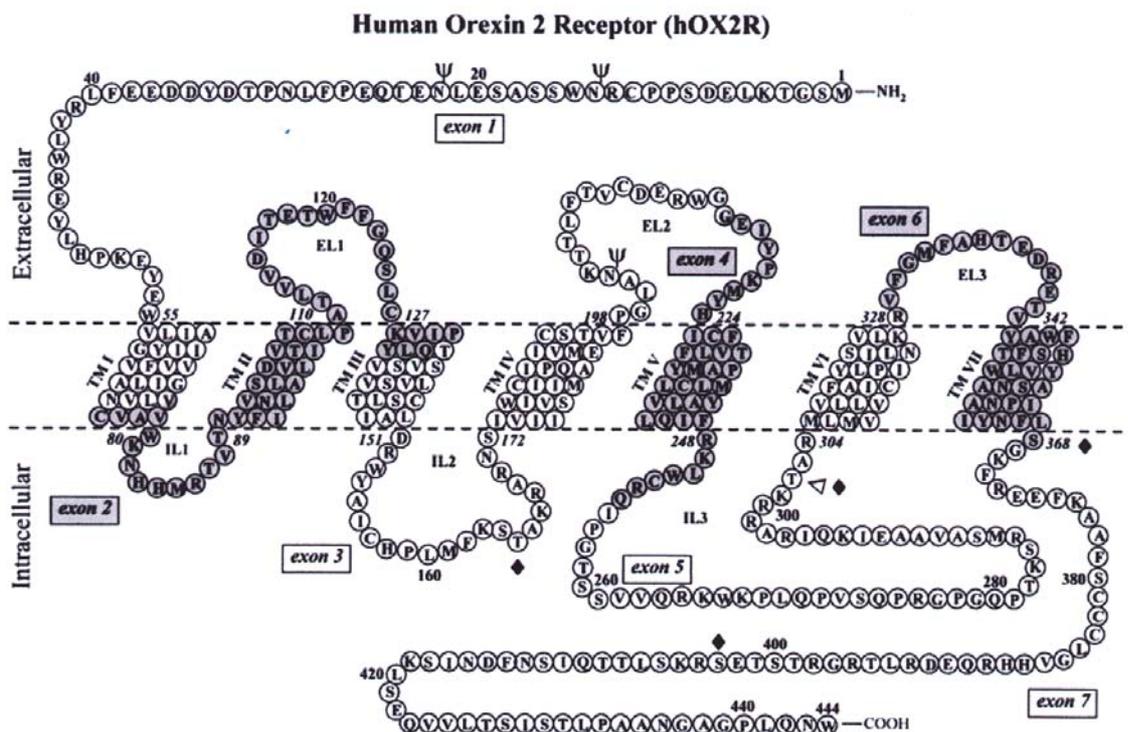


Fig. 8: Struttura secondaria dell'OX2R umano.

Entrambi i recettori hanno un peso molecolare di 50 KDa (Sakurai e et al., 1998) e mostrano comuni siti di glicosilazione e di fosforilazione per la protein chinasi A nei loops rispettivamente, extra- ed intracellulari e tre siti di fosforilazione per la protein chinasi C. La coda C-terminale dei peptidi ha localizzazione intracitoplasmatica (Spinazzi et al., 2006) (Fig. 9).

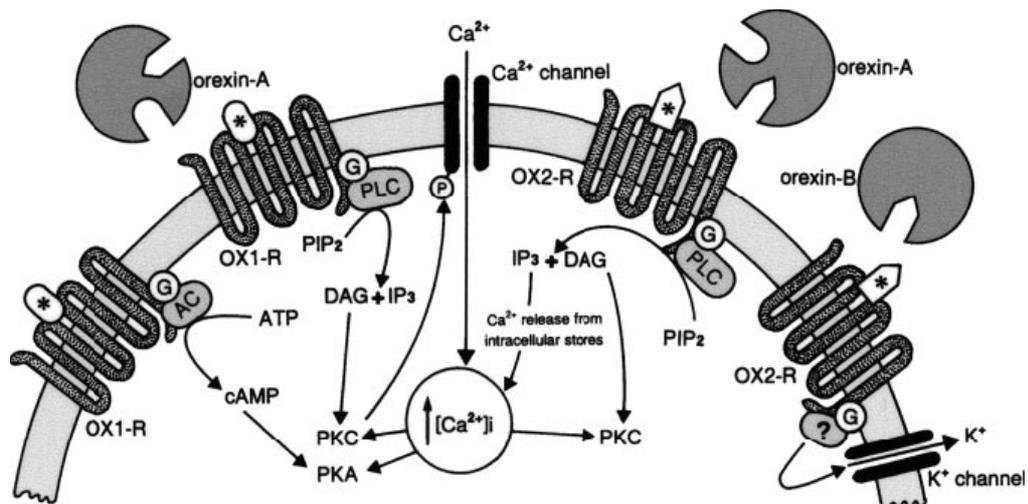


Fig. 9: Rappresentazione schematica dei principali processi di trasduzione attivati dall'interazione dell'OXA e dell'OXB con i rispettivi recettori. Abbreviazioni: G= proteina G; P= sito di fosforilazione; PKC= protein chinasi C; PKA protein chinasi A; IP₃= inositolo trifosfato; PLC= fosfolipasi C; PIP₂= fosfatidilinositolo bifosfato; DAG= diacilglicerolo.

I due recettori mostrano una omologia nella sequenza aminoacidica pari al 64% (Voisin et al., 2003) e sono altamente conservati in diverse specie di mammiferi quali l'uomo, il ratto, il topo, il cane, il suino e l'ovino (Sakurai et al., 1998; Kukkonen et al., 2002; Zhang et al., 2005) (Fig. 10)

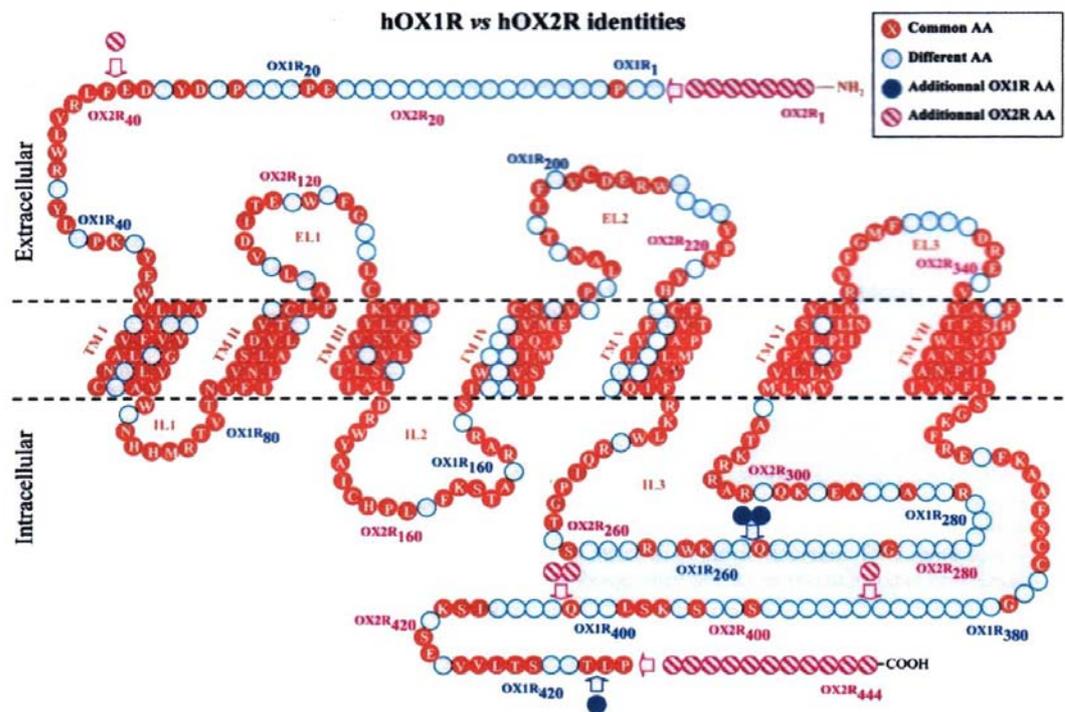


Fig. 10: Sovrapposizione della struttura secondaria dei due recettori. Gli aminoacidi cerchiati rosso sono identici per entrambi, quelli con il cerchio verde vuoto corrispondono a quelli differenti. Con il cerchio verde pieno si identificano gli aminoacidi specifici per l'OX1R, quelli per l'OX2R sono indicati con il cerchio rosso a righe trasversali.

Nel topo sono state individuate due varianti dell'OX2R: l'mOX2 α R, di 443 aa, e l'mOX2 β R, di 460 aa, per i quali sono stati ipotizzati due meccanismi d'azione differenti. Infatti, in caso di privazione dell'alimento si osserva un aumento dell'espressione genica soltanto dell' mOX2 β R ipotalamico e non della variante α o dell'OX1R (Chen and Randeva, 2004) e nel tessuto scheletrico e nel rene è stato localizzato soltanto l'mOX2 α R.

Oltre che nei mammiferi i recettori per le orexine sono stati studiati anche negli uccelli nei quali è stato identificata un'unica proteina recettoriale definita "chicken orexin receptor" (cOXR) che mostra l'80% di omologia nella sequenza aminoacidica con l'OX2R dei mammiferi. Esso è costituito da 501 aa ed è codificato da 1869 pb (Okhubo et al., 2003).

Il legame delle orexine con gli specifici recettori innesca diversi meccanismi cellulari. Tra questi va menzionato l'aumento del calcio intracellulare, sia in colture che nativamente esprimono i recettori sia in quelle in cui i recettori vengono transfettati. L'aumento dell'oligoelemento sarebbe mediato da due meccanismi differenti a seconda che risulti o non attivato l'inositoltrifosfato

citoplasmatico che genera un afflusso del calcio proveniente dal pool extracellulare (Voisin et al., 2003). Tali risultati sono stati ottenuti nel corso di ricerche sperimentali attuate utilizzando colture di cellule ovariche di hamster (Sakurai et al., 1998; Smart et al., 2001) e colture di neuroni ipotalamici di ratto. In questi ultimi, però, sono necessari l'azione diretta dell'OXA sul proprio recettore e la presenza di protein kinasi C (Van den Pol., 1998). Previo legame ai recettori specifici le orexine sono in grado di aumentare l'attività delle cellule nervose agendo sia attraverso meccanismi presinaptici sia bloccando i canali per il potassio a livello postsinaptico. Il comportamento ora descritto è tipico dei recettori legati alle proteine Gq (Mark and Herlitze, 2000). Le orexine, inoltre, determinano l'aumento di adenosin monofosfato ciclico nella corteccia adrenergica dell'uomo e del ratto (Malendowicz et al., 1999; Mazzocchi et al., 2001). Tale effetto non è stato osservato in colture primarie di neuroni ipotalamici di ratto, probabilmente perché in tali cellule sono presenti diverse isoforme di adenilato ciclasi (Kukkonen., 2002). Infine, il legame delle orexine con i propri recettori attiva l'azione delle proteinchinasi coinvolte nella crescita, differenziazione e morte cellulare (Ammoun et al., 2006) e

quella della proteinchinasi coinvolta nelle mitosi (Kukkonen.,
2002).

1.4 Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori nel sistema nervoso centrale

Oltre alla localizzazione nell'ipotalamo laterale, in cui furono inizialmente descritte, le orexine ed i relativi recettori sono state evidenziate in corpi neuronali e fibre positive presenti in diverse regioni del sistema nervoso centrale (SNC). La loro localizzazione fu, ovviamente, messa in relazione con le funzioni svolte e con i nuclei e le vie nervose in cui vennero evidenziate. Mediante tecniche di immunistochemica (IHC) e di ibridazione in situ neuroni positivi all'OXA sono stati descritti nel nucleo perifornicale e in quello ipotalamico dorsomediale e fibre positive nel bulbo olfattorio, nella corteccia cerebrale, nel talamo, nell'ipotalamo e nel midollo spinale di ratto. Nel contempo neuroni contenenti OX1R immunoreattivi sono stati descritti nelle porzioni dorsomediale e ventromediale dell'ipotalamo e nel nucleo soprachiasmatico, mentre altri OX2R-immunoreattivi nell'ipotalamo laterale e nei nuclei arcuato e tubercolomammillare (Kirchgessner, 2002). I neuroni orexinerfici presentano forma diversa sferica, fusiforme e multipolare e dimensioni variabili dai 14 ai 40 μm (Kukkonen et al., 2002).

Inoltre la presenza dei due peptidi e dei relativi recettori è stata evidenziata in aree fondamentali per il controllo del comportamento sessuale ed in particolare nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico. Neuroni immunopositivi all'OXA sono stati individuati nella zona perifornicale, nel nucleo arcuato e nell'area preottica mediale del ratto, in cui è presente anche l'ormone luteinizzante (LH) (Date et al., 1999; Kohsaka et al., 2001) e nell'eminenza mediana in cui è presente anche la prolattina (Russell et al., 2001b).

In un particolare studio il livello di mRNA dell'OX1R ipotalamico è stato messo in relazione con le fasi del ciclo estrale di femmine di ratto. L'mRNA aumenta notevolmente durante il tardo proestro e nei primi giorni di lattazione e, durante la gravidanza, la relativa immunoreattività è localizzata nel nucleo paraventricolare e, durante la lattazione, in quello sopraottico (Wang et al., 2003). Nelle aree preottiche encefaliche dell'ovino fibre immunoreattive all'OXA sono in stretta vicinanza di neuroni contenenti l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) (Small et al., 2003). Mediante tecniche di ibridazione in situ immunoreattività ai recettori per le orexine è stata evidenziata nell'area preottica, nell'eminenza mediana, nel

nucleo arcuato e nei nuclei ipotalamici laterali e ventromediali della stessa specie animale (Zhang et al., 2005).

La presenza di recettori per le orexine è stata descritta, inoltre, in aree notoriamente coinvolte nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. In particolare l'OX1R è localizzato nel locus ceruleus, nel rafe mediano e nel nucleo arcuato, mentre l'OX2R nel nucleo paraventricolare (Russell et al., 2001a).

Le orexine sono probabilmente coinvolte nella regolazione della funzione visiva in quanto esse ed il relativo recettore 1 sono presenti nella retina umana. Immunoreattività per le suddette sostanze è stata localizzata nelle cellule gangliari, nei processi cellulari interni ed esterni, nello strato plessiforme e nella porzione interna dei fotorecettori (Savaskan et al., 2004).

La presenza di mRNA sintetizzanti le orexine e i relativi recettori è stata descritta nella ghiandola pineale e nell'ipotalamo di suino (Fabris et al., 2004) mentre quella dell'mRNA sintetizzante il cOXR risulta diffusa nell'ipotalamo degli uccelli (Ohkubo et al., 2003).

1.5 Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori negli organi periferici.

Inizialmente le orexine furono considerate prodotte e localizzate solo nel SNC, ma negli ultimi anni la loro presenza è stata riscontrata sia nella componente nervosa che in cellule non neuronali di molti organi periferici, tale dato ha ampliato il loro campo d'azione e la loro importanza funzionale.

Numerosi studi sull'argomento sono stati condotti nell'apparato gastroenterico di uomo, ratto, topo e cavia in cui è stata evidenziata immunoreattività per le orexine ed i relativi recettori nei gangli mioenterici e sottomucosi intestinali con particolare intensità nel duodeno. Due popolazioni neuronali risultano contenere le orexine: la prima non colinergica che produce anche il peptide vasointestinale (VIP), e la seconda colinergica che contiene anche la sostanza P. Il primo citotipo avrebbe funzione inibitoria della contrazione muscolare ed il secondo sarebbe un afferente primario della sensibilità enterica. Le cellule endocrine della mucosa gastrica contenenti gastrina coesprimono le orexine ed il relativo recettore 1 (Kirchgessner, 2002; Ehstrom et al., 2005), mentre il recettore 2 è espresso dalle cellule endocrine producenti serotonina del piccolo

intestino (Naslund et al., 2002; Ehstrom et al., 2005). L'OXA è espressa dalle cellule pancreatiche- β (Kirchgessner, 2002; Ehstrom et al., 2005). La comparsa delle orexine nel corso dell'embriogenesi sembra essere precoce. L'OXA è evidenziabile in cellule endocrine dell'antro pilorico dell'embrione di topo, a partire dal 14° giorno di sviluppo, mentre nell'intestino compaiono al 15°. (Sanchez de Miguel and Burrell, 2002).

Altro organo in cui sono espressi entrambi i recettori per le orexine è la ghiandola surrenale. Tecniche di IHC e di RT-PCR hanno evidenziato il dato nella ghiandola di vari vertebrati quali l'uomo, il ratto, il bovino, l'ovino ed il pollo (Lopez et al., 1999; Randeva et al., 2001; Kawada et al., 2003; Ohkubo et al., 2003; Zhang et al., 2005).

Il gruppo di ricerca di Sakurai T., coautore della scoperta delle orexine e dei relativi recettori, individuò l'OXA nel testicolo di ratto (Sakurai et al., 1998). Alcuni anni dopo, il tema relativo la presenza delle orexine nell'apparato genitale maschile è stato ripreso mentre scarsissime sono le notizie al riguardo per l'apparato genitale femminile. I recettori per le orexine sono stati riscontrati nelle vescicole seminali, nel pene, nell'epididimo e nel testicolo

dell'uomo. Nella gonade, in particolare, tecniche di immunofluorescenza evidenziano la relativa positività nelle cellule di Leydig, di Sertoli e mioidi peritubulari (Karteris et al., 2004). La presenza di OXA e OXB è stata riscontrata anche nel testicolo di ratto (Mitsuma et al., 2000a; Mitsuma et al., 2000b) ed in particolare la molecola A è presente negli spermatociti in definiti stadi di meiosi: pre-leptotene, leptotene, zigotene e pachitene (Barreiro et al., 2005). Nello stesso organo è presente anche l'OX1R (Johren et al., 2001; Barreiro et al., 2004). L'mRNA di quest'ultimo è stato evidenziato anche nella gonade maschile dell'ovino e del pollo (Ohkubo et al., 2003; Zhang et al., 2005) e, in concentrazioni minori, nella gonade femminile del pollo e del ratto (Johren et al., 2001; Ohkubo et al., 2003). Nelle cellule sinciziotrofoblastiche e decidue della placenta umana è stata riscontrata immunoreattività per l'OXA (Nakabayashi et al., 2003). Altri organi nei quali è stata descritta negli ultimi anni la presenza dell'OX1R sono il rene, il polmone, il tessuto adiposo, l'ipofisi e la tiroide (Johren et al., 2001; Zhang et al., 2005; Digby et al., 2006). Nei tubuli renali dell'uomo è stata osservata immunopositività per l'OXA e la presenza del peptide è stata rilevata anche nelle urine di

maschi adulti mediante test radioimmunologico (Takahashi et al., 2005). L'OXA è normalmente presente nella circolazione sanguigna sistemica dell'uomo e del ratto (Johren et al., 2001; Voisin et al., 2003).

Infine, la tecnica dell'IHC ha evidenziato recentemente la presenza dei recettori per le orexine nelle cellule di Merkel cutanee e nelle vibrisse del suino (Beiras-Fernandez et al., 2004).

1.6 Funzioni svolte dalle orexine

Il termine orexine si deve alla capacità di queste sostanze di aumentare l'assunzione degli alimenti in varie specie animali tra cui i ratti (Sakurai et al., 1998) e gli ovini (Zhang et al., 2005). Tale effetto si riduce notevolmente nei ratti anziani a causa della diminuzione dei relativi recettori (Takano et al., 2004), non si riscontra negli uccelli (Ohkubo et al., 2003) e nei topi knockout per il gene che codifica per l'ossido nitrico sintasi (NOS) (Farr et al., 2005). Attualmente sono noti più di cinquanta fattori che agiscono sul SNC influenzando l'assunzione degli alimenti e quindi interagendo con l'azione delle orexine. Tra di esse si ricordano il neuropeptide Y, la leptina, l'ormone melanocorticotropo, il peptide regolatore del gene Agouti, la galanina, la proopiomelanocortina e la dinorfina (Taheri and Bloom, 2001; Ehrstrom et al., 2005; Kmiec, 2006). L'effetto paradossale riguardante l'assunzione degli alimenti è riportato nei topi che sovra esprimono la prepro-orexina. Tali animali perdono progressivamente peso corporeo nonostante una accresciuta assunzione di cibo, in quanto il loro metabolismo risulta decisamente superiore alla norma (Lubkin and Sticker., 1998).

In seguito alla somministrazione di OXA ICV o nel nucleo dorsale del vago è stata evidenziata una stimolazione della secrezione acida (Okumura et al., 2001) e della motilità dello stomaco (Hwang et al., 2001) e un aumento della contrattilità del duodeno, del digiuno e dell'ileo (Sato et al., 2001).

La somministrazione sottocutanea di OXA e di OXB stimola la secrezione endocrina del pancreas determinando rilascio di insulina in modo dose-dipendente (Nowak et al., 2000) e la somministrazione ICV di OXA aumenta la secrezione esocrina della ghiandola probabilmente mediante stimolazione vagale (Miyasaka et al., 2002).

Le orexine sono implicate anche nel meccanismo che regola l'assunzione dell'acqua (Kunii et al., 1999). Esse, inoltre, rivestono un ruolo importante nella dipendenza dalle droghe e nell'assuefazione all'alcool. Infatti i neuroni orexinergici possiedono recettori per gli oppioidi e risultano sensibilizzati dalla somministrazione cronica di morfina (Georgescu et al., 2003). Trattando con un antagonista dell'OX1R i ratti assuefatti all'alcool si riesce ad abolire la loro necessità di bere (Lawrence et al., 2006).

La somministrazione di OXA induce un aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca e tale effetto è probabilmente mediato dall'aumento del rilascio di adrenalina (Shirasaka et al., 1999).

Una delle prime funzioni dell'OXA indagata dal mondo scientifico negli anni successivi alla sua scoperta è la capacità di controllare il ciclo veglia-sonno. Infatti l'espressione dell'OXA e della prepro-orexina nell'ipotalamo e nel talamo mediale del ratto hanno variazioni diurne con diminuzione durante le fasi di luce ed aumento durante la notte (Taheri et al., 2000). I topi knockout per l'OXA presentano normali variazioni diurne della temperatura basale, ma il ritmo notturno della stessa, l'attività motoria e lo stato di vigilanza degli animali sono marcatamente ridotti (Mochizuki et al., 2006). Mutazioni del gene per l'OX2R provoca narcolessia nei cani (Lin et al., 1999) mentre nell'uomo essa sembra essere legata prevalentemente ad una anomalia nella produzione della prepro-orexina e dell'OXA. In topi narcolettici, privi di neuroni endogeni per le orexine, l'espressione transgenica della prepro-orexina così come la somministrazione di OXA, previene attacchi cataplettici e altre anomalie del sonno REM (Mieda and Yanagisawa, 2004).

Infine la somministrazione endovenosa di OXA, che attraversa liberamente la barriera emato-encefalica provoca la diminuzione della cataplessia e normalizzazione del sonno e della veglia nei cani con mutazioni dell'OX2R, in modo dose-dipendente (John et al., 2000).

Le orexine influenzano il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene agendo a livello centrale, ipofisario e surrenalico. La somministrazione ICV di OXA aumenta nel ratto il livello plasmatico di cortisone, corticosterone e dell'ormone adrenocorticotropo (Russell et al., 2001a; Date et al., 1999). In studi condotti su colture cellulari adrenocorticali umane e di ratto si osserva che l'aumento dei livelli degli ormoni steroidei avviene attraverso l'attivazione della cascata dell'adenilato ciclasi e dell'inositoltrifosfato (Randeva et al., 2001). Inoltre, in colture di cellule midollari di suino l'OXA stimola il rilascio di epinefrina e norepinefrina (Voisin et al., 2003) ed in colture di cellule adrenergiche bovine si osserva un aumento della produzione delle C-catecolamine soltanto se si usa come substrato la C-tirosina, probabilmente perché l'OXA attiva la tirosina idrossilasi mediante l'azione di una protein chinasi C- dipendente (Kawada et al., 2003).

Topi nei quali è stato transfettato il gene ataxina 3, che determina l'alterazione dei precursori delle orexine, mostrano a sei settimane d'età frammentazione del ciclo veglia/sonno, cataplessia, meno attività motoria e riduzione dell'appetito non associata a perdita di peso corporeo bensì ad obesità (Hara et al., 2001). Tale quadro fenotipico è determinato dalla perdita dei neuroni orexinergici che a sua volta causa assenza dell'ormone di rilascio dell'ormone corticotropo da parte dell'ipofisi. Questa sintomatologia è paragonabile a quella osservata negli uomini affetti dalla così detta "sindrome di Cushing" caratterizzata, fra l'altro, da un eccesso di cortisolo circolante (Ferguson and Samson, 2003).

L'OXA influenza il rilascio di ormoni ipotalamici e pituitari nel ratto. La somministrazione ICV del peptide inibisce il rilascio di prolattina (Russell et al., 2000) e diminuisce la secrezione basale dell'ormone della crescita, senza alterare la quantità di ormone di rilascio dell'ormone della crescita (Lopez et al., 2004). La somministrazione per via endovenosa di OXA aumenta il tasso dell'ormone di rilascio della tireotropina e diminuisce i livelli plasmatici dell'ormone stimolante la tiroide (Kukkonen et al., 2002; Martynska et al., 2006).

I dati presenti in letteratura sulle modalità con cui l'OXA influenza l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico sono numerosi ed in gran parte descrivono che l'azione ipotalamica è mediata dall'NPY e dal relativo recettore Y1NPY (Russell et al., 2001b). L'OXA stimola la produzione dell'ormone di rilascio dell'ormone luteinizzante in espianti ipotalamici di ratti maschi e femmine della stessa specie che siano in tardo proestro ma non in estro o metaestro. D'altronde controverse sono le variazioni dei livelli plasmatici dell'ormone luteinizzante (LH) in femmine di ratto ovarioisterezomizzate in seguito al trattamento con OXA e OXB. Si osserva un aumento dose dipendente, dopo somministrazione di LH soltanto negli animali pretrattati con estradiolo benzoato e progesterone, ma non in quelli non trattati con queste due sostanze (Pu et al., 1998). Se le dosi di estrogeno somministrato diminuiscono si registra una riduzione della secrezione pulsatile di LH (Furuta et al., 2002).

L'OXA stimola nel ratto la secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (Small et al., 2003), ma tale effetto non si registra in colture cellulari ipotalamiche (Yang et al., 2005). Inoltre, le orexine sono coinvolte nel favorire alcuni comportamenti legati all'attività riproduttiva. Infatti, nei topi in lattazione la somministrazione di

OXA induce alcuni comportamenti tipicamente materni quali il grooming, il licking e la durata della lattazione (D'Anna and Gamme, 2006). La somministrazione di OXA nell'area preottica mediale dell'encefalo di ratti maschi provoca l'aumento delle performances sessuali (Gulia et al., 2002). L'area segmentale ventrale è un'altra area cerebrale coinvolta in attività sessuali che si rileva sensibile alla somministrazione di OXA. Si osserva un aumento dose-dipendente delle fasi di eccitazione e attivazione dei neuroni dopaminergici che sono notoriamente coinvolti nella trasmissione degli impulsi nervosi durante il rituale dell'accoppiamento nel maschio (Muschamp et al., 2007).

L'unica funzione conosciuta e svolta dall'OXA sulla gonade maschile è quella di stimolare in modo dose dipendente la secrezione basale di testosterone da sezioni testicolari e di aumentare notevolmente i livelli plasmatici dell'ormone quando iniettata in vivo nel testicolo di ratto (Barreiro et al., 2004).

Scopo della presente tesi è esporre i risultati conseguiti dal nostro gruppo di ricerca che negli ultimi tre anni ha studiato la presenza dell'OXA e dell'OX1R in diversi segmenti dell'apparato genitale sia maschile che femminile. Il programma di lavoro è stato

espletato utilizzando tecniche di immunistochemica, di western blotting (WB) e reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR).

Capitolo II

MATERIALE E METODI

Le specie animali prese in esame in questo studio sono il bovino, il bufalo, il suino ed il ratto. I campioni tessutali utilizzati sono stati prelevati subito dopo la morte da cinque soggetti maschi per ciascuna specie considerata e da cinque femmine soltanto per quella bovina. Tutti gli animali al momento del prelievo erano in buono stato di salute e sessualmente maturi. I ratti sono stati acquistati presso la Harlan Italy SRL e sono stati sacrificati secondo le normative vigenti che tutelano il benessere degli animali da laboratorio, mentre i campioni appartenenti alle altre specie animali sono stati raccolti durante la loro regolare macellazione.

Dai bovini è stato prelevato il complesso uretro-prostatico. Esso è caratterizzato dalla porzione pelvica dell'uretra e dalla ghiandola prostatica che nei ruminanti è costituita dal corpo e dalla porzione disseminata. La componente disseminata è la più voluminosa, ha dimensioni di circa 3-4 cm di lunghezza e 1 cm di larghezza, ed è localizzata nello spessore della mucosa dell'uretra postcollicolare

delimitata da un sottile strato di tessuto connettivo. Il corpo, invece, ha dimensioni molto più ridotte. Al momento del prelievo la prostata disseminata è stata separata dallo strato epiteliale dell'uretra e campioni di entrambi i tessuti sono stati processati separatamente. Dalle femmine appartenenti alla specie bovina sono state prelevate le ghiandole vestibolari maggiori subito dopo ridotte in piccoli frammenti. Dai suini e dai ratti sono stati prelevati frammenti di testicolo ed in particolare dai ratti anche segmenti di epididimo. Il materiale prelevato è stato immerso in liquido di Bouin e successivamente processato come di seguito descritto, mentre alcuni frammenti della prostata di bovino sono stati congelati in azoto liquido per poi essere sottoposti alle tecniche di WB ed RT-PCR.

2.1 Immunoistochimica

Dopo 24-48 ore di permanenza in liquido di Bouin, i campioni sono stati disidratati in una serie ascendente di alcool ed immersi in metilbenzoato per 48 ore. Successivamente essi sono stati inclusi in paraplast e tagliati al microtomo per ottenere delle sezioni di 6 μm di spessore. Queste ultime sono state montate su vetrini porta-oggetto e colorate secondo la metodica immunoistochimica all'avidina-biotina utilizzando i diversi componenti del Vectastain Elite ABC kit PK-6101 (Vector Laboratories Inc.) per gli anticorpi ottenuti dal coniglio e PK-6105 per quelli ottenuti dalla capra (Vector Laboratories Inc.). La tecnica prevede una serie successiva di fasi che si compiono in due giorni consecutivi, come di seguito descritto.

Nel corso del primo giorno si effettuano:

- Idratazione delle sezioni attraverso xilene e scala decrescente di etanoli;
- sciacquo in acqua distillata per 5 minuti;
- trattamento delle sezioni immerse in tampone citrato 0.01 M a pH 6.0 in forno a microonde a 750W per 10 minuti;

- incubazione delle sezioni per 30 minuti in acqua ossigenata allo 0.3% per bloccare l'attività delle perossidasi endogene;
- sciacqui in phosphate buffer saline (PBS) a pH 7.2-7.4;
- incubazione delle sezioni per 20 minuti in siero normale di coniglio o capra;
- incubazione con anticorpi primari diretti contro l'OXA (sc-8070, Santa Cruz Biotechnologies), l'OX1R (sc-8073, Santa Cruz Biotechnologies) e contro la chromogranin-A (chr-A) (20086, Immunostar Inc.). I primi due anticorpi sono stati ottenuti dalla capra ed utilizzati ad una diluizione di 1:200. Il terzo è stato ottenuto dal coniglio e diluito 1:4000. Tutti sono stati incubati sulle sezioni in camera umida per 24h a 4°C.
- Nel secondo giorno si procede con :
- sciacqui in PBS;
- incubazione delle sezioni per 30 minuti con anticorpo secondario biotinilato ottenuto dal coniglio o dalla capra;
- sciacqui in PBS;
- incubazione delle sezioni per 30 minuti con il reagente contenente avidina-perossidasi;
- sciacqui in PBS;

- incubazione con 3-3' diaminobenzidina, responsabile della colorazione finale, per un tempo variabile da 2 a 10 minuti;
- disidratazione in serie ascendente di etanoli e chiarificazione in xilene;
- montaggio dei vetrini coprioggetti con Eukitt.

Il trattamento delle sezioni con il calore del forno a microonde risulta utile per smascherare antigeni tissutali parzialmente o totalmente bloccati dall'immersione del materiale in fissativo e/o dalla sua inclusione in paraffina. Talvolta il descritto trattamento è stato omesso perché non necessario.

I preparati sono stati osservati con un microscopio in luce Nikon E600 e fotografati con una fotocamera digitale Nikon Coolpix 8400.

Controlli negativi sono stati effettuati sostituendo l'anticorpo primario con siero normale o PBS oppure assorbendo l'anticorpo primario con un eccesso del peptide relativo (100µg del peptide/ml di anticorpo diluito).

2.2 Trattamento preliminare dei campioni da sottoporre alle metodiche di western blotting e reverse transcriptase- polymerase chain reaction

I campioni di prostata conservati in azoto liquido sono stati pesati, ridotti in piccoli pezzi ed immersi in un tampone di lisi (5 ml/1,5 g di tessuto) composto da PBS 1x, 1% Nonidet P-40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1 % sodio dodecil solfato (SDS), 10 mg/ml fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF). Successivamente sono stati omogenati in Ultraturrax L-407, centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti ed infine portati ad una temperatura di -80°C fino al momento dell'uso.

La quantità di proteine contenute nei campioni omogenati e nei lisati è stato determinato mediante il metodo Bio-Rad (Milano, Italia). L'assorbanza è stata misurata mediante uno spettrofotometro Varian Cary 1 ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica del campione è stata determinata confrontando il valore di assorbanza del campione in esame con una curva standard, ottenuta misurando l'assorbanza di soluzioni di BSA a concentrazione nota.

Prima di procedere alla metodica del WB è stata eseguita l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Questa metodica ha lo scopo di separare le proteine in base alle loro dimensioni, utilizzando il detergente ionico SDS che denatura le proteine e le riveste omogeneamente di cariche negative. Ogni proteina, quindi, migra verso l'anodo e la distanza percorsa nel gel è funzione della sua massa molecolare. La separazione dei complessi SDS-proteine avviene ad opera delle dimensioni dei pori del gel. Le proteine più piccole passano più facilmente attraverso i pori, mentre quelle di dimensioni maggiori sono ritardate dalle forze frizionali.

I campioni, contenenti uguali quantità di proteine totali, sono stati dapprima riscaldati per cinque minuti in un tampone contenente 50 mmol Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10 % glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5% β -mercaptoetanololo. Il β -mercaptoetanololo riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti nelle proteine destabilizzandone la struttura terziaria, mentre l' SDS, legandosi fortemente alle proteine, le denatura. Il buffer contiene un colorante tracciante ionizzabile, il blu di bromofenolo, che consente di visualizzare l'andamento della corsa elettroforetica. Si è, quindi,

effettuato il caricamento dei campioni sul gel di poliacrilammide posto in una camera per elettroforesi della Bio-Rad ed immerso nel tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS pH 8,3. I campioni da separare sono stati caricati su un gel di impaccamento al 4% di poliacrilammide che ha la funzione di restringere le proteine contenute in ciascun campione in una sottile banda prima che esse entrino nel gel di separazione. Per la rilevazione dell'OXA e dell'OX1R è stato utilizzato un gel al 12,5% di poliacrilammide. Una volta terminato il caricamento dei campioni la camera elettroforetica viene collegata ad un alimentatore di corrente elettrica. La corsa elettroforetica termina quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel di separazione.

2.3 Western blotting

Le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando un apposito apparecchio di trasferimento della ditta Bio-Rad. L'avvenuto trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 minuti del filtro di nitrocellulosa con il colorante Rosso Ponceau. I filtri sono stati saturati mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte disidratato in TBS-T 0,1% (150 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl pH 7,4, Tween-20 0,1%). Dopo il periodo di incubazione, i filtri sono stati lavati in TBS-T ed incubati per due ore a temperatura ambiente, o per tutta la notte a 4°C, con l'anticorpo specifico per la prepro-orexina (AB3069; Chemicon International Inc.) e l'OX1R, entrambi diluiti 1:1000 in TBS-T in presenza di latte disidratato al 2,5%. Successivamente sono stati effettuati lavaggi in TBS-T ed un'incubazione per un'ora con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (Sigma Chemical Co.), diluito 1:3000 in TBS-T in presenza di latte disidratato al 2,5%. Le proteine specifiche sono state visualizzate mediante un metodo di chemiluminescenza (ECL). I filtri, in seguito, sono stati sottoposti alla procedura di "stripping" che ha la funzione di

allontanare gli anticorpi primari e secondari usati nel precedente blot e, quindi, l'esecuzione di un nuovo Western per visualizzare una diversa proteina. Lo "stripping" si esegue immergendo il filtro in una soluzione contenente 100 mM β -mercaptoetanolo, 2% SDS, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8 per 20 minuti a 50-60°C. La procedura di "stripping" può essere utilizzata per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa.

La specificità dei WB è stata provata preassorbendo gli anticorpi per la prepro-orexina o l'OX1R con i relativi peptidi.

2.4 Reverse transcriptase- polymerase chain reaction

Prima di procedere alla metodica dell'RT-PCR è stato estratto l'RNA totale dai tessuti di prostata precedentemente congelati a -80°C. I tessuti sono stati incubati con Triazol (1 ml/100 mg o 1 ml/piastra) per 5 minuti a 30°C e con cloroformio per 3 minuti a 30°C. Sono state ottenute, in seguito a centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C, una fase acquosa ed una fase fenolica. La fase acquosa è stata incubata con isopropanolo per 10 minuti a 30°C e successivamente centrifugata a 14.000 rpm per 10 minuti. Il pellet di RNA ottenuto è stato lavato con etanolo al 75%, centrifugato a 8.500 rpm per 5 minuti ed incubato con acqua trattata con dietilpirocarbonato per 10 minuti a 55-60°C.

La quantità di RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro utilizzando valori di assorbanza a 260 e 280 nm. Per valutare il grado di purezza dell'RNA estratto, 5 µg di sostanza sono stati caricati su un gel di agarosio-formaldeide in condizioni denaturanti. Gli RNA ribosomiali (18 S e 28 S) apparivano chiaramente risolti. La tecnica dell'RT-PCR comprende due tappe fondamentali: la retrotrascrizione dell'RNA e l'amplificazione del cDNA ottenuto con la retrotrascrizione. Nella prima fase della

trascrizione inversa, primers non specifici o “random examers”, che consistono in piccoli oligonucleotidi, ibridizzano con l’RNA bersaglio e vengono estesi dall’enzima trascrittasi inversa dando origine a molti filamenti di cDNA. Successivamente i filamenti di cDNA così ottenuti sono utilizzati per amplificare il numero di copie delle molecole di DNA a partire dalle sequenze cDNA.

In questo studio, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 5 µg di mRNA contenuti in un volume di 5 µl di acqua sterile e “random examer”. Questa miscela è stata incubata a 70°C per 5 minuti e quindi a 4°C per 5 minuti. La miscela di reazione era costituita da un tampone di reazione 5x, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, inibitore di RNAsi e l’enzima ImProm II Reverse Transcriptase, il tutto per un volume finale di 15 µl di H₂O-DEPC. La miscela contenente l’RNA e quella di reazione sono state unite ed incubate in successione per 5 minuti a 25°C, per un’ora a 42°C e per 15 minuti a 70°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

Sono stati utilizzati i seguenti primers specifici:

prepro-orexina: 5’-ATCCTTCCTCTACAAAGGTCTCC-3’(senso),

5’-CTTGCCCAGCGTGAGGAT-3’ (antisenso);

OX1R: 5’-AGGCTGCGGTCATGGAAT-3’ (senso),

5'-TTCCTGACCAGGGCTGAC-3' (antisenso);

Il programma di amplificazione utilizzato ha previsto un'iniziale denaturazione per 2 minuti a 94°C, seguita da 35 cicli di denaturazione per 1 minuto a 94°C, "annealing" per 1 minuto a 56°C e un'estensione per 1 minuto a 72°C. Il prodotto di PCR è stato visualizzato elettroforeticamente su un gel di agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio usando una scala di 1Kb di DNA per valutare la taglia della banda. Come controllo negativo per tutte le reazioni è stata usata l'acqua distillata al posto del cDNA.

Capitolo III

RISULTATI

3.1 Complesso uretro-prostatico di bovino

Le cellule neuroendocrine (NE) (Pearse, 1977), dette anche paraneuroni, sono elementi cellulari isolati espressi nella mucosa di vari organi del corpo dell'animale. Essi elaborano peptidi ormonali e/o amine biogene che vengono secreti nel sangue, negli spazi interstiziali e probabilmente anche nel lume organico. Loro marker è la proteina acida cromogranina A (chr-A) (Deftos, 1991). Mediante la metodica IHC nell'epitelio dell'uretra pelvica dei bovini esaminati si è individuata la presenza di cellule NE immunopositive per la chr-A. Esse sono generalmente riunite in gruppi formati da pochi elementi sino a varie decine e presentano forma rotonda od irregolare con proiezioni citoplasmatiche spesso ramificate. Alcune di esse mostrano immunoreattività per l'OXA (tavola 1; foto a,b) e generalmente presentano un aspetto bipolare con propaggini citoplasmatiche sottili e dirette verso la membrana basale ed il lume uretrale. Il materiale immunopositivo è diffuso

all'intero citoplasma. Esse non esprimono mai immunopositività per l'OX1R.

Materiale immunoreattivo per l'OXA (tavola 1; foto c, d) e per il suo recettore 1 (tavola 1; foto e, f) è stato evidenziato nelle cellule esocrine costituenti il parenchima ghiandolare. Le cellule positive risultano più numerose di quelle uretrali ed hanno una distribuzione disseminata nel contesto della ghiandola. Esse presentano fini granuli citoplasmatici dotati di una intensità di colorazione variabile, evidente soprattutto negli elementi appartenenti al medesimo adenomero ghiandolare.

Mediante la metodica dell' RT-PCR in tutti i campioni di prostata esaminati è stata osservata la presenza di un frammento di 200 pb corrispondente al DNA che codifica per la prepro-orexina e un altro di 300 pb corrispondente al DNA che codifica per l'OX1R (tavola 2; blots A e B di sinistra). L'immunoblotting ha previsto l'impiego di un anticorpo in coniglio diretto contro la sequenza dei 17 aminoacidi C-terminali della prepro-orexina e di un anticorpo in capra diretto contro la sequenza C-terminale dell'OX1R. Essi hanno evidenziato la presenza nel parenchima prostatico di due peptidi i cui pesi molecolari, 16 e 55 KDa rispettivamente,

corrispondono ai pesi molecolari dei due peptidi evidenziati con la tecnica IHC (tavola 2; blots A e B di destra).

3.2 Ghiandole vestibolari maggiori di bovina

Le ghiandole vestibolari maggiori sono considerate l'analogo femminile della ghiandola prostatica. A differenza delle minori esse non sono presenti in tutte le specie animali ed in particolare nella bovina hanno dimensioni di circa 2 cm di lunghezza e 0,5 cm di larghezza. Similmente a quanto descritto per la prostata di bovino, anche in questi organi l'epitelio esocrino che costituisce la gran parte del parenchima ghiandolare mostra la presenza di cellule immunopositive per l'OXA (tavola 3; foto a-c) e l'OX1R (tavola 3; foto d-f). Esse sono numerose e diffuse sia nella componente secretrice delle ghiandole che nei dotti escretori (tavola 3; foto b,c). Il materiale immunopositivo occupa l'intero citoplasma cellulare e mostra intensità di colorazione variabile.

3.3 Prostata di bufalo

Come già descritto in precedenza la prostata dei ruminanti, e quindi anche del bufalo, è costituita da un corpo ed una porzione disseminata. Quest'ultima, nel bufalo, è più sviluppata che nel bovino raggiungendo circa 3 cm di larghezza e 10 cm di lunghezza.

Materiale immunopositivo per l'OXA (tavola 4; foto a,b) e per l'OX1R (tavola 4; foto c,d) è stato evidenziato nelle cellule esocrine degli adenomeri prostatici. Esse sono numerose e, a differenza di quanto osservato nella prostata di bovino, hanno distribuzione focale. Infatti aree ricche di cellule immunoreattive si alternano a zone prive di positività. Anche in questa specie il materiale è granulare, diffuso a tutto il citoplasma e presenta intensità di colorazione variabile anche se appartenente a cellule localizzate nello stesso adenomero ghiandolare.

3.4 Testicolo di suino

Nel testicolo di suino è stata evidenziata immunoreattività per il solo OX1R (tavola 4; foto e). Essa è localizzata nell'acrosoma di gran parte degli spermatidi osservati nell'ambito di singole sezioni tubulari, appare spesso diffusa a tutti i componenti di detta popolazione cellulare. Per tale motivo, sezioni tubulari contenenti abbondante materiale positivo si alternano a sezioni completamente prive di positività. Gli spermatidi reattivi mostrano positività finemente granulare e di differente intensità.

3.5 Testicolo ed epididimo di ratto

Materiale immunoreattivo per l'OXA (tavola 5; foto a-d) e l'OX1R (tavola 5; foto: e,f) è presente in diversi citotipi tubulari del testicolo di ratto. Le cellule contenenti OXA sono gli spermatidi in fase rotonda, od immatura (tavola 5; foto a), ed in fase allungata, o matura (tavola 5; foto b,d), e le cellule del Sertoli (tavola 5; foto c,d), mentre gli spermatogoni (tavola 5; foto e) e gli spermatociti di I ordine (tavola 5; foto f) contengono materiale immunoreattivo per il recettore 1. Nell'ambito di un singolo tubulo seminifero è di facile riscontro la presenza di positività a carico di più cellule appartenenti allo stesso citotipo. Tali positività hanno aspetto granulare, intensità di colorazione piuttosto costante ed hanno sede citoplasmatica come si evidenzia facilmente nei preparati sottoposti a colorazione nucleare di contrasto (tavola 5; foto a,d).

Materiale immunoreattivo per l'OXA (tavola 5; foto g,h) è stato osservato in cellule epiteliali dell'epididimo. Queste sono ordinate in lunghe file monostratificate alternate da elementi cellulari chiaramente privi di immunoreattività. La positività per il peptide ha localizzazione citoplasmatica e presenta aspetto finemente granulare.

Capitolo IV

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti nel presente lavoro vanno ad ampliare i dati bibliografici relativi alla presenza della prepro-orexina, dell'OXA e del suo recettore 1 nell'apparato genitale dei mammiferi. In particolare viene qui descritta per la prima volta l'esistenza di tali sostanze nel complesso uretro-prostatico e nelle ghiandole vestibolari.

Come è visto le cellule NE rilasciano i loro prodotti di secrezione nei capillari circostanti e/o negli spazi interstiziali a loro adiacenti secondo meccanismi di secrezione, rispettivamente, endocrino e paracrino. Su questa base le cellule NE contenenti OXA evidenziate nell'uretra di bovino potrebbero secernere il peptide nel circolo sanguigno genitale e/o fra le cellule epiteliali circostanti ottenendo effetti funzionali al momento sconosciuti. A supporto di questa ipotesi cellule NE contenenti OXA e serotonina sono state descritte nell'apparato gastroenterico ed ipoteticamente coinvolte nel determinismo della contrazione peristaltica gastro-intestinale

(Kirchgessner, 2002; Ehström et al., 2005). Anche le cellule cutanee di Merckel, acquisibili al tipo delle NE, contengono prepro-orexina (Beras-Fernandez et al., 2004).

L'esistenza della prepro-orexina, dell'OXA e dell'OX1R nel complesso uretro-prostatico e nelle ghiandole vestibolari del bovino, organi che notoriamente contengono cellule NE producenti 5-HT (Arrighi et al., 2004; Russo and Vittoria, 2006), enfatizza l'ipotesi dell'esistenza di un sinergismo funzionale tra le due sostanze anche nell'apparato genitale come prospettato sopra per il gastroenterico (Ehström et al., 2005) e come ipotizzato per il sistema nervoso centrale (Small et al., 2003). In particolare la 5-HT secreta dalle cellule NE dell'uretra maschile e femminile di ratto riduce la soglia del così detto "coitus reflex" che mostra similitudini con l'orgasmo della specie umana. Il riflesso consiste, nel maschio, nell'erezione, contrazione della muscolatura perineale ed eiaculazione, mentre nella femmina è caratterizzato da contrazione della muscolatura perineale e movimenti ritmici vaginali ed uterini. In entrambi i sessi il riflesso è provocato dalla stimolazione del recettore 5-HT₃ delle fibre nervose afferenti uretrali (McKenna et al., 1991).

Quanto finora descritto per il bovino ha validità anche per il bufalo, in quanto recentemente il nostro gruppo di ricerca ha individuato la presenza di cellule NE immunoreattive alla 5-HT nel complesso uretro-prostatico di questa specie animale.

Dai dati presenti in letteratura si evince che l'OXA svolge frequentemente azione stimolante su alcune funzioni organiche. In particolare il peptide aumenta la produzione di catecolamine da parte delle ghiandole surrenali di bovino attraverso l'attivazione dell'enzima tiroxina idrossilasi mediata dalla protein kinasi C (Kawada et al., 2003). Al contrario, è stato, recentemente osservato che l'OXA, posta in colture di cellule ovariche di hamster (Voisin et al., 2006), di neuroblastoma e di adenocarcinoma del colon (Rouet-Benzineb et al., 2004) attiva due potenti fattori apoptotici, definiti caspasi, determinando una drastica riduzione della crescita cellulare.

Il testicolo di ratto rappresenta l'organo genitale maggiormente studiato in relazione all'OXA ed ai relativi recettori. Il peptide aumenta in modo dose dipendente la secrezione basale di testosterone da parte delle cellule di Leydig sia in vivo, dopo iniezione intratesticolare, che in vitro, su sezioni testicolari incubate

(Barreiro et al., 2004). La fonte di produzione dell' OXA è probabilmente localizzata nel comparto tubulare in quanto dopo distruzione selettiva delle cellule di Leydig, i livelli di mRNA della prepro-orexina persistono in quantità elevata (Barreiro et al., 2005). L'azione steroidogenetica del peptide ora descritto sarebbe, quindi, almeno in parte indiretta e dovuta all'attività di un citotipo specifico intratubulare. Immunoreattività intratubulare per l'OXA è stata dimostrata negli spermatociti in fase di pre-leptotene, leptotene, zigotene e pachitene, (Barreiro et al., 2005). Nel corso del presente lavoro immunopositività per il peptide è stata evidenziata nelle cellule del Sertoli e negli spermatidi rotondi ed allungati ed immunoreattività per l'OX1R negli spermatogoni e negli spermatociti. Tali reperti confermano l'ipotesi che la maggior parte dell'OXA testicolare sia prodotta all'interno del comparto tubulare ed in particolare dalle cellule del Sertoli. Da queste ultime il peptide si irradierebbe alle cellule di Leydig dell'interstizio ed ai citotipi germinali tubulari. La maggior parte di tali "targets" sono, infatti, dotati di recettori per il peptide. Quanto appena affermato trova fondamento nel reperto che la presenza di OXA inibisce la produzione di Müllerian Inhibiting Substance e Stem Cell Factor

da parte delle cellule del Sertoli di ratto. Il primo è fattore steroidolitico ed il secondo stimola la sintesi del DNA negli spermatogoni e quindi la proliferazione dell'epitelio germinativo (Barreiro et al., 2005).

Infine nel corso del presente lavoro viene per la prima volta descritta la presenza di OXA nelle cellule epiteliali dell'epididimo di ratto e dell'OX1R negli spermatidi del testicolo di suino.

In conclusione i campi d'azione dell'orexina A sono vari e le possibili funzioni svolte da questo peptide nell'apparato genitale assumono interesse crescente. I risultati ottenuti nel corso del presente lavoro sono un contributo all'argomento e nel contempo un impegno a chiarire i ruoli funzionali svolti dal peptide nei confronti dei diversi "targets" genitali nei quali è stata evidenziata la sua presenza. Studi attualmente in corso nel nostro laboratorio tendono a chiarire tali aspetti funzionali.

Bovino

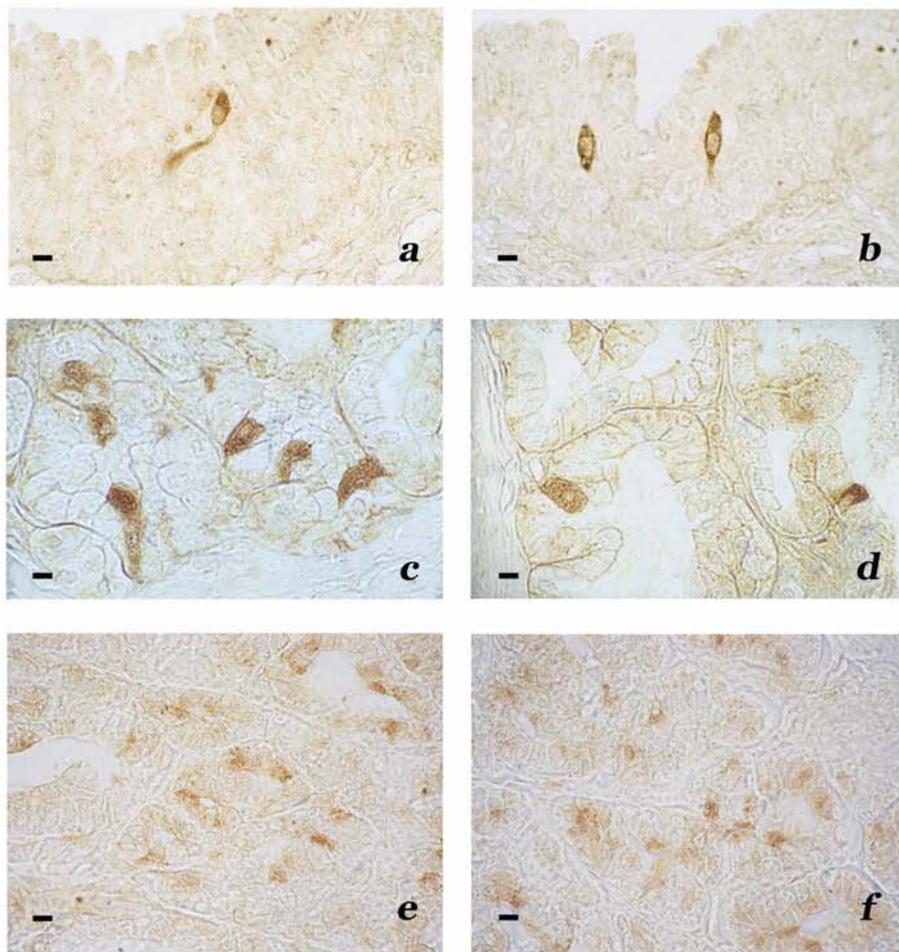


Tavola 1

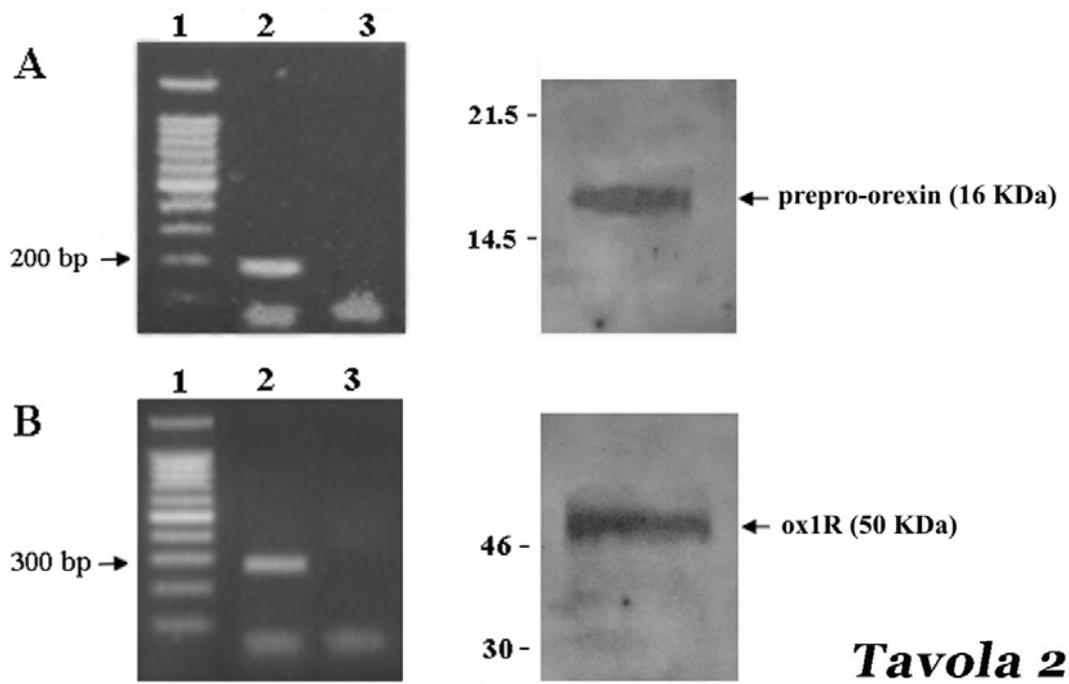


Tavola 2

Bovina

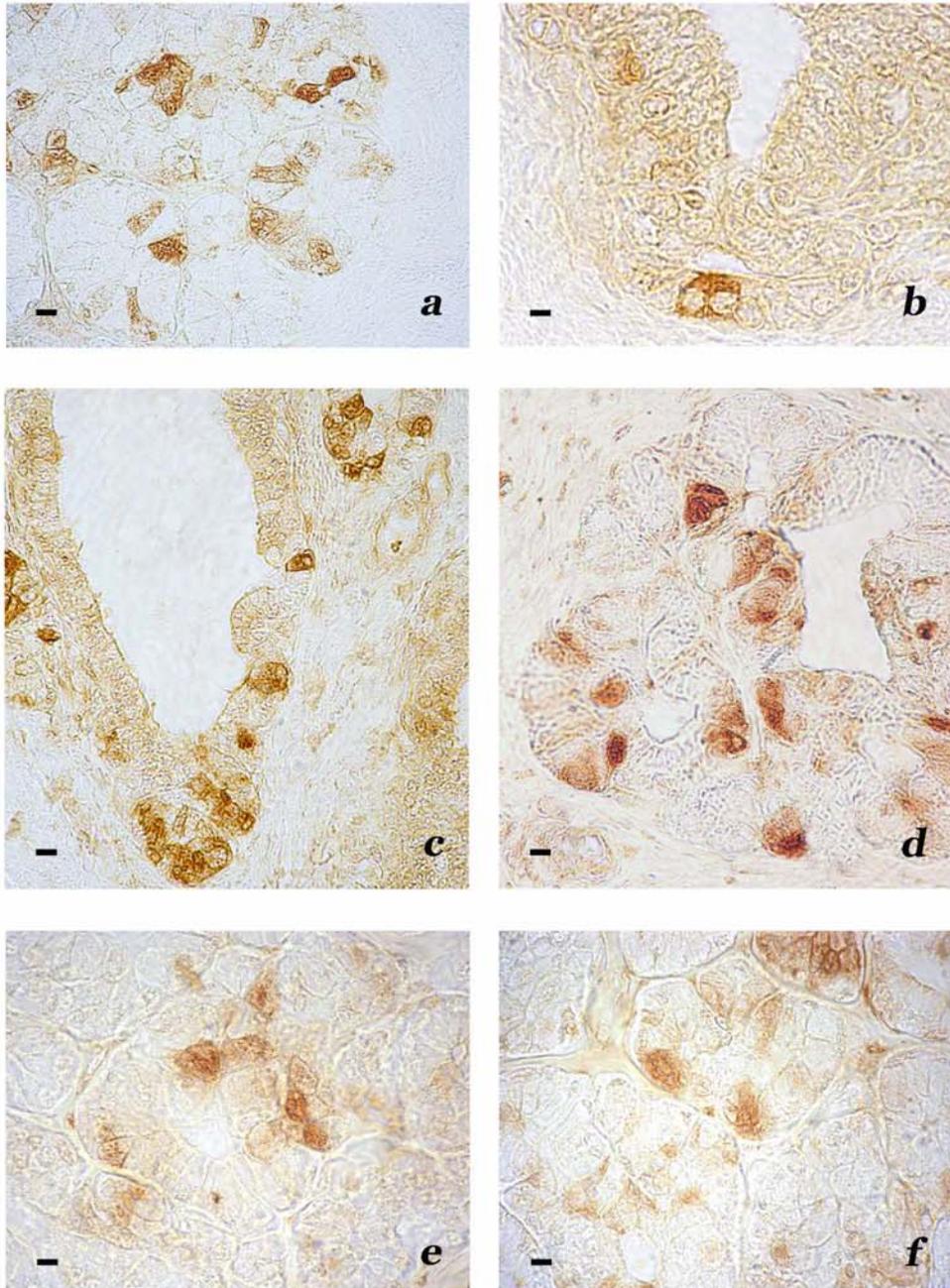
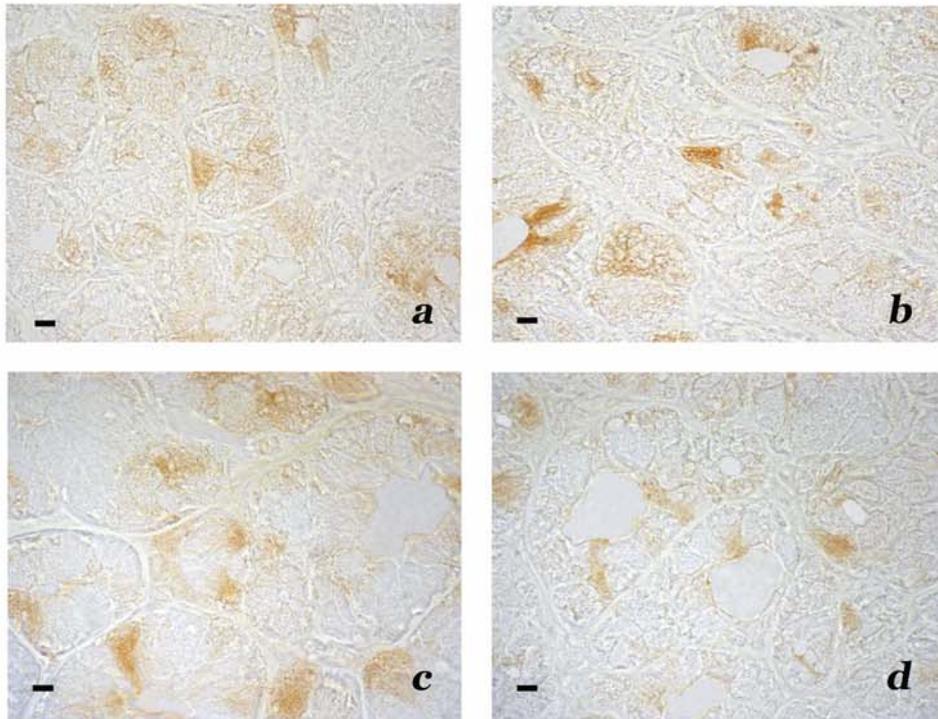


Tavola 3

Bufalo



Suino

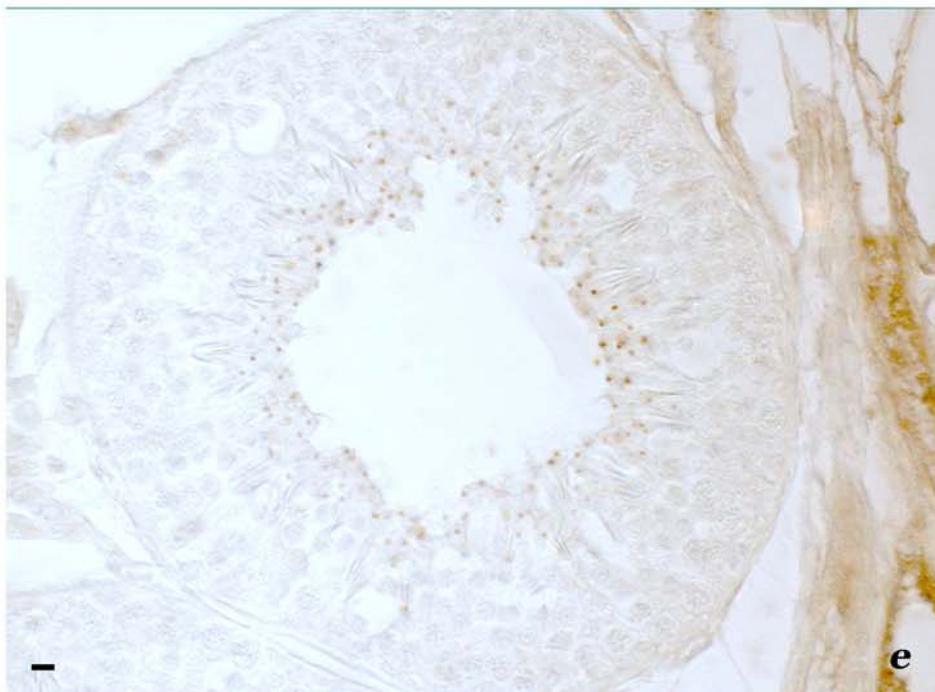


Tavola 4

Ratto

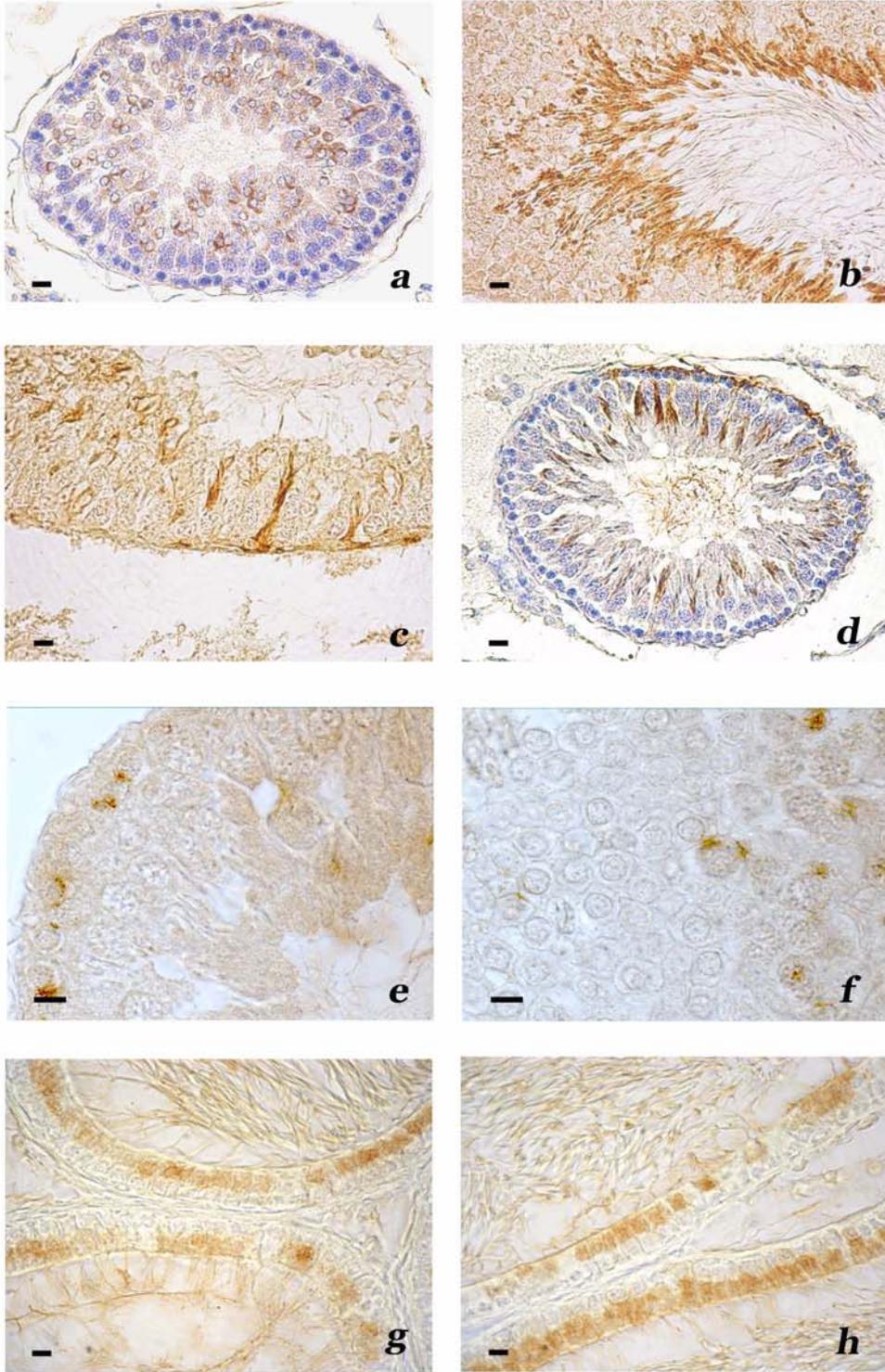


Tavola 5

LEGENDA TAVOLE

Tavola 1:

Fig. a,b: cellule neuroendocrine immunopositive all'OXA nell'epitelio dell'uretra postcollicolare di bovino; fig. c,d: cellule esocrine dell'epitelio prostatico di bovino immunoreattive all'OXA; fig. e,f: cellule esocrine dell'epitelio prostatico di bovino immunoreattive all'OX1R. (Barre micrometriche: 10 μ m).

Tavola 2:

A: blot a sinistra (RT-PCR) canale 2 banda corrispondente ad un frammento di 200 pb della prepro-orexina, canale 3 controllo negativo; blot a destra (WB) banda corrispondente alla prepro-orexina di 16 KDa.

B: blot a sinistra (RT-PCR) canale 2 banda corrispondente ad un frammento di 300 pb dell'OX1R, canale 3 controllo negativo; blot a destra (WB) banda corrispondente all'OX1R di 50 KDa.

Tavola 3:

Fig. a-c: cellule esocrine dell'epitelio delle ghiandole vestibolari maggiori di bovina immunoreattive all'OXA; fig. d-f: cellule esocrine dell'epitelio delle ghiandole vestibolari maggiori di bovina immunoreattive all'OX1R. (Barre micrometriche: 10 μ m)

Tavola 4:

Fig. a,b: cellule esocrine dell'epitelio prostatico di bufalo immunoreattive all'OXA; fig. c,d: cellule esocrine dell'epitelio prostatico di bufalo immunoreattive all'OX1R; fig. e: spermatici di suino immunoreattivi all'OX1R. (Barre micrometriche: 10 μ m)

Tavola 5:

Fig. a: spermatici di ratto in fase rotonda od immaturi immunoreattivi all'OXA; fig. b,d: spermatici di ratto in fase allungata o matura immunoreattivi all'OXA; c,d: cellule del Sertoli di ratto immunoreattive all'OXA; fig. e: spermatogoni di ratto immunoreattivi all'OX1R; fig. f: spermatici di ratto immunoreattivi all'OX1R; fig. g,h: cellule epiteliali dell'epididimo di ratto immunopositive all'OXA. (Barre micrometriche: 10 μ m)

BIBLIOGRAFIA

- Ammoun S., Holmqvist T., Shariatmadari R., Oonk H.B., Detheux M., Parmentier M., Akerman K.E., Kukkonen J.P. Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. 305: 507-514.
- Ammoun S., Lindholm D., Wootz H., Akerman K.E., Kukkonen J.P. G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and-independent cell death through p38 mitogen-/stress- activated protein-kinase. *J. Biol. Chem.* 2006. 281: 834-841.
- Arrighi S., Cremonesi F., Bosi G., Domeneghini C. Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. *Anat. Histol. Embryol.* 2004. 33: 225-232.
- Barreiro M.L., Pineda R., Navarro V.M., Lopez M., Suominen J.S., Pinella L., Senaris R., Toppari J., Aguilar E., Dieguez C., Tena-Sempere M. Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid expression and stimulation of testosterone secretion by orexin-A in rat testis. *Endocrinology.* 2004. 145: 2297-2306.

- Barreiro M.L., Pineda R., Gaytan F., Archanco M.A., Burrell M.A., Castellano J.M., Hakovirta H., Nurmio M., Pinilia L., Agiular E., Toppari J., Dieguez C., Tena-Sempere M. Pattern of orexin expression and direct biological actions of orexin-A in rat testis. *Endocrinology*. 2005. 146: 5164-5175.
- Beiras-Fernandez A., Gallego R., Blanco M., Garcia-Caballero T., Diégez C., Beiras A. Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors. *J. Anat.* 2004. 204: 117-122.
- Chen J., Randeve H.S. Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol. Endocrinol.* 2004. 18: 2790-2804.
- D'Anna K.L., Gammie S.C. Hypocretin-1-dose-dependently modulates maternal behaviour in mice. *J. Neuroendocrinol.* 2006. 18: 553-566.
- Darker J.G., Porter R.A., Eggleston D.S., Smart D., Brough S.J., Sabido-David C., Jerman J.C. Structure–activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. 11: 737-740.
- Date Y., Ueta Y., Yamashita H., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sarurais T., Yanagisawa M., Nakazato M. Orexins,

orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Sci. USA.* 1999. 96: 748-753.

- de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X-B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L.F., Gautvik V.T., Bartlett II F.S., Frankel W.N., Van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. 95: 322-327.

- Deftos L.J. Chromogranin A: its role in endocrine function and an endocrine and neuroendocrine tumour marker. *Endocrinol. Rev.* 1991. 12: 181-187.

- Digby J.E., Chen J., Tang J.Y., Lehnert H., Matthews R.N., Randeve H.S. Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J. Endocrinol.* 2006. 191: 129-136.

- Ehstrom M., Gustafsson T., Finn A., Kirchgessner A., Gryback P., Jacobsson H., Hellstrom P.M., Naslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin A on gastric emptying, plasma leptin, and

distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. 90: 2370-2377.

- Fabris C., Cozzi B., Hay-Schmidt A., Naver B., Møller M. Demonstration of an orexinergic central innervation of the pineal gland of the pig. *J. Comp. Neurol.* 2004. 471: 113-127.

- Farr S.A., Banks W.A., Kumar V.B., Morley J.E. Orexin-A-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptide.* 2005. 26: 759-765.

- Ferguson A.V., Samson W.K. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Front. Neuroendocrinol.* 2003. 24: 141-150.

- Furuta M., Funabashi T., Kimura F. Suppressive action of orexin A on pulsatile luteinizing hormone secretion is potentiated by a low dose of estrogen in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 2002. 75: 151-157.

- Georgescu D., Zachariou V., Barrot M., Mieda M., Willie J.T., Eisch A.J., Yanagisawa M., Nestler E.J., Di Leone R.J. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J. Neurosci.* 2003. 23: 3106-3111.

- Gulia K.K., Mallick H.N., Kumar V.M. Orexin A (hypocretin-1) application at the medial preoptic area potentiates male sexual behaviour in rats. *Lett. Neurosci.* 2002. 116: 921-923.
- Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.* 2001. 30: 345-354.
- Hwang L.L., Chen T.D., Dun N.J. Mechanisms of orexin-induced depolarizations in the rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. *J. Physiol.* 2001. 537: 511-520.
- John J., Wu M.F., Siegel J.M. Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Res. Online.* 2000. 3: 23-28.
- Jhoren O., Neidert S.J., Kunner M., Dendorjer A., Dininiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female. *Endocrinology.* 2001. 142: 3324-3331.
- Kanenishi K., Ueno M., Momose S., Kuwabara H., Tanaka H., Sato C., Kobayashi T., Hino O., Sakamoto H., Hata T. Prepro-

orexin mRNA expression in the rat brain is increased during pregnancy. 2004. 368: 73-77.

- Karteris E., Chen J., Randeve H.S. Expression of human prepro-orexin and signalling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. 89: 1957-1962.

- Kawada Y., Ueno S., Asayama K., Tsutsui M., Utsunomiya K., Toyohira Y., Morisada N., Tanaka K., Shirahata A., Yanagihara N. Stimulation of catecholamine synthesis by orexin-A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor 1. *Biochem. Pharmacol.* 2003. 66: 141-147.

- Kirchgessner A.L. Orexins in the brain-gut axis. *Endoc. Rev.* 2002. 23: 1-15.

- Kmiec Z. Central regulation of food intake in ageing. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006. 57: 7-16.

- Kohsaka A., Watanobe H., Kakizaki Y., Suda T., Shioth H.B. A significant participation of orexin A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Brain. Res.* 2001. 898: 166-170.

- Kukkonen J.P., Holmqvist T., Ammoun S., Akerman K.E.O. Functions of the orexinergic/hypocretinergetic system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. 283: 1567-1591.
- Kunii K., Yamanaka A., Nambu T., Matsuzaki I., Goto K., Sakurai T. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res.* 1999. 842: 256-261.
- Lang M., Bufe B., De Pol S., Reiser O., Meyerhof W., Beck-Sickingher A.G. Structural properties of orexins for activation of their receptors. *J. Pept. Sci.* 2005. 12: 258-266.
- Lawrence A.J., Cowen M.S., Yang H.J., Chen F., Oldfield B. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2006. 148: 752-759.
- Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., De Jong P.G., Nishino S., Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 1999. 98: 365-376.
- Lopez M., Soane L.M., Tovar S., Nogueiras R., Dieguez C., Senaris R. Orexin-A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin

mRNA content in a growth hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 2004. 19: 2080-2088.

- Lubkin M., Stricker-Krongrand A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. 253: 241-245.

- Malendowicz L.K., Tortorella C., Nussdorfer G.G. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signalling cascade. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999. 70: 185-188.

- Mark M.D., Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 2000. 267: 5830-5836.

- Martynska L., Polkowska J., Wolinska-Witort E., Chmielowska M., Wasilewska-Dziubinska E., Bik W., Baranowska B. Orexin A and its role in the regulation of the hypothalamo-pituitary axes in the rat. *Reprod. Biol.* 2006. 6: 29-35.

- Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Gottardo L., Aragona F., Nussdorfer G.G. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of adenylate cyclase-dependent signalling cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001. 86: 778-782.

- McKenna K.E., Knight K.C., Mayers R. Modulation by peripheral serotonin of the threshold for sexual reflexes in female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991. 40: 151-156.
- Mieda M., Yanagisawa M. Sleep, feeding and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002. 12: 339-346.
- Mitsuma T., Hirooka Y., Kayama M., Mori Y., Yokoi Y., Rhue J., Ping J., Izumi M., Ikai R., Adachi K., Nogimori T. Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci.* 2000a. 66: 897-904.
- Mitsuma T., Hirooka Y., Kayma M., Mori Y., Yokoi Y., Izumi M., Rhue N., Ping J., Adachi K., Ikai R., Kawai N., Nakayashiki A., Nogimori T. Radioimmunoassay for hypocretin-2. *Endocr. Regul.* 2000b. 34: 23-27.
- Miyasaka K., Masuda M., Kanai S., Sato N., Kurosawa M., Funakoshi A. Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas.* 2002. 25: 400-404.
- Mochizuki T., Klerman E.B., Sakurai T., Scammell T.E. Elevated body temperature during sleep in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. 291: 533-540.

- Muschamp J.W., Dominguez J.M., Sato S.M., Shen R.Y., Hull E.M. A role for hypocretin (orexin) in male sexual behaviour. *J. Neurosci.* 2007. 27: 2837-2845.
- Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T., Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003. 205: 43-50.
- Naslund E., Ehrstrom M., Ma J., Hellstrom P.M., Kirchgessner A. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002. 282: 470-479.
- Nowak K.W., Mackowiak P., Switonska M.M., Fabis M., Malendowicz L.K. Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci.* 2000. 66: 449-454.
- Ohkubo T., Tsukada A., Shamoto K. cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J. Mol. Endocrinol.* 2003. 31: 499-508.
- Okumura T., Takeuchi S., Motomura W., Yamada H., Egashira Si S., Asahi S., Kanatani A., Ihara M., Kohgo Y. Requirement of

intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. 280: 976-981.

- Pearse AGE. The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: related “endocrine” peptides in brain, intestine, pituitary, placenta and anuran cutaneous glands. *Med Biol.* 1977. 55: 115-125.

- Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcolaptic brains. *Nat. Med.* 2000. 6: 991-997.

- Pu S., Jain M.R., Kalra P.S., Kalra S.P. Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul. Pept.* 1998. 78: 133-136.

- Randeva H.S., Karteris E., Grammatopoulos D., Hillhouse E.W. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the

human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001. 86: 4808-4813.

- Rouet-Benzineb P., Rouyer-Fessard C., Jarry A., Avondo V., Pouzet C., Yanagisawa M., Laboisse C., Laburthe M., Voisin T. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *Biol. Chem.* 2004. 279: 45875-45886.

- Russell S.H., Kim M.S., Small C.J., Abbott C.R., Morgan D.G., Taheri S., Murphy K.G., Todd J.F., Ghatei M.A., Bloom S.R. Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J. Neuroendocrinol.* 2000. 12: 1213-1218.

- Russell S.H., Small C.J., Dakin C.L., Abbott C.R., Morgan D.G.A., Ghatei M.A., Bloom S.R. The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J. Neuroendocrinol.* 2001a. 13: 561-566.

- Russell S.H., Small C.J., Kennedy A.R., Stanley S.A., Seth A., Murphy K.G., Taheri S., Ghatei M.A., Bloom S.R. Orexin A

interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology*. 2001b. 142: 5294-5302.

- Russo F., Vittoria A. Neuroendocrine cells in the vestibular glands of the genital tract of cows and pigs. *Acta Histochem*. 2006. 108: 351-355.
- Sakurai T., Amameya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R., Tanaka H., Williams S., Richardson J., Kozlowski G., Wilson S., Arch J., Buckingham R., Haynes A., Carr S., Annan R., MacNulty D., Li W., Terret J., Elshourbagy N., Bergsma D., Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell*. 1998. 92: 573-585.
- Sakurai T., Moriguchi T., Furuya K., Kaijwara N., Nakamura T., Yanagisawa M., Goto K. Structure and function of human prepro-orexin gene. *J. Biol. Chem*. 1999. 274: 17771-17776.
- Sanchez de Miguel M.J., Burrell M.A. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of developing mouse gut. *J. Histochem Cytochem*. 2002. 50: 63-70.

- Satoh Y., Uchida M., Fujita A., Nishio H., Takeuchi T., Hata F. Possible role of orexin A in nonadrenergic, noncholinergic inhibitory response of muscle of the mouse small intestine. *Eur. J. Pharmacol.* 2001. 428: 337-342.
- Savaskan E., Muller-Spahn F., Meier F., Wirz-Justice A., Meyer P. Orexins and their receptors in the human retina. *Pathobiology.* 2004. 7: 211-216.
- Shibahara M., Sakurai T., Nambu T., Takenouchi T., Iwaasa H., Egashira S.I., Ihara M., Goto K. Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides.* 1999. 20: 1169-1176.
- Shirasaka T., Nazakato M., Takasaki M., Kannan H. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* 1999. 277: 1780-1785.
- Small C.J., Goubillon M.L., Murray J.F., Siddiqui A., Grimshaw S.E., Young H., Sivanesan V., Kalamatianos T., Kennedy A.R., Coen C.W., Bloom S.R., Wilson C.A. Central orexin A has a site-specific effects on luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology.* 2003. 144: 3225-3236.

- Smart D., Sabido-David C., Brough S.J., Jewitt F., Johns A., Porter R.A., Jerman J.C. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 2001. 132: 1179-1182.
- Spinazzi R., Andreis P.G., Rossi G.P., Nussdorfer G.G. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev.* 2006. 58: 46-57.
- Taheri S., Bloom S. Orexins/hypocretins: waking up the scientific world. *Clin. Endocrinol.* 2001; 54: 421-429.
- Taheri S., Ward H., Ghatei M., Bloom S. Role of orexins in sleep and arousal mechanisms. *Lancet.* 2000. 355: 847.
- Takahashi K., Arihara Z., Suzuki T., Sone M., Kikuchi K., Sasano H., Muratami O., Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides.* 2005. 27: 871-877.
- Takano S., Kanai S., Hosoya H., Ohta M., Uematsu H., Miyasaka K. Orexin-A does not stimulate food intake in old rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004. 287: 1182-1187.
- Van den Pol A.N., Gao X.B., Obrietan K., Kilduff T.S., Belousov A.B. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of

neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J. Neurosci.* 1998. 18: 7962-7971.

- Voisin T., Rouet-Benzineb P., Reuter N., Laburthe M. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. 60: 72-87.

- Voisin T., Firar A.E., Avondo V., Laburthe M. Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology.* 2006. 147: 4977-4984.

- Wang J.B., Murata T., Narita K., Honda K., Higuchi T. Variation in the expression of orexin and orexin receptors in the rat hypothalamus during the estrous cycle, pregnancy, parturition and lactation. *Endocrine.* 2003. 22: 127-134.

- Yang Y., Zhou L.B., Liu S.Q., Tang J.F., Li F.Y., Li R.Y., Song H.D., Chen M.D. Expression of feeding-related peptide receptors mRNA in GT1-7 cell line and roles of leptin and orexins in control of GnRH secretion. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005. 26: 976-981.

- Zhang S., Blache D., Vercoe P.E., Adam C.L., Blackberry M.A., Findlay P.A., Eidne K.A., Martin G.B. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Reg. Pept.* 2005. 124: 81-87.

- Zhu Y., Miwa Y., Yamanaka A., Yada T., Shibahara M., Abe Y. Orexin receptor type 1 couples exclusively to pertussin toxin-insensitive G-protein, while orexin receptor type 2 couples to both pertussin toxin-sensitive and-insensitive G-proteins. *J. Pharmacol. Sci.* 2003. 92: 259-266.