UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI STRUTTURE, FUNZIONI E TECNOLOGIE BIOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA

Coordinatore: Chiar.mo Prof. G. Paino

TESI DI DOTTORATO

"Studio dell'espressione e del ruolo fisiologico del trasportatore della serotonina SERT nello sviluppo embrionale di topo"

Docente guida:.

Chiar.mo Prof Norma Staiano

Tutor: Chiar.mo Prof.

Luigi Michele Pavone

Candidata:

Dott. Anna Spina

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sistema serotoninergico pag. 4

1.2 I recettori della serotonina pag. 10

1.3 Il trasportatore della serotonina SERT pag. 12

1.4 Il sistema serotoninergico nello sviluppo embrionale pag. 16

1.5 Il sistema serotoninergico nel cervello pag. 18

1.6 Il sistema serotoninergico nel cuore pag. 21

1.7 Il sistema serotoninergico nella tiroide pag. 23

2. SCOPO DELLA TESI pag. 26

3. MATERIALI E METODI

3.1 Anticorpi pag. 28

3.2 Modelli animali pag. 28

3.3 Preparazione dei campioni pag. 29

3.4 Immunoistochimica pag. 29

3.5 Ibridazione in situ pag. 31

3.6 Estrazione di RNA pag. 32

3.7 RT-PCR e PCR pag. 33

3.8 Estrazione di proteine pag. 34

3.9 Elettroforesi SDS-Page pag. 35

3.10 Western Blotting pag. 35

3.11 Trichrome stain (Masson) assay pag. 36

4. RISULTATI

4.1 Localizzazione e **c**aratterizzazione delle cellule cardiache che esprimono SERT nello sviluppo embrionale del topo pag. 38

4.2 Produzione di topi SERT-KO e caratterizzazione del fenotipo pag. 50
4.3 Analisi dei meccanismi molecolari con cui l'annullamento del gene SERT provoca fibrosi cardiaca pag. 53
4.4 "Cell fate map" di SERT durante lo sviluppo embrionale del cervello nel topo pag. 56
4.5 Caratterizzazione delle cellule della tiroide che esprimono SERT nello sviluppo embrionale del topo pag. 62

5. DISCUSSIONE
5.1 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi del cuore pag. 68
5.2 Ruolo di SERT nella fibrosi cardiaca pag. 71
5.3 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi del cervello pag. 74
5.4 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi della tiroide pag. 78

6. CONCLUSIONI pag. 80

7. BIBLIOGRAFIA pag. 82

8. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE pag. 96

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sistema serotoninergico

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) è un neurotrasmettitore appartenente alla classe di composti aromatici detti indoli che presentano un anello a cinque atomi contenente azoto condensato con un anello benzenico. Essa è un neurotrasmettitore sintetizzato nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale e nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale (SNC) (1-2).

La biosintesi della serotonina prevede come prima tappa l'idrossilazione del triptofano in posizione 5 per formare il 5-idrossi-triptofano (5-HTP), reazione catalizzata dalla triptofano idrossilasi (TPH). Questo enzima esiste in due isoforme che hanno una differente distribuzione nell'organismo: la TPH1 è localizzata prevalentemente nei tessuti periferici, nei fotorecettori dell'occhio e nella ghiandola pineale; la TPH2 è presente esclusivamente nei neuroni serotoninergici del SNC. Il 5-HTP viene decarbossilato dalla 5-idrossi-triptofano decarbossilasi a 5-HT. La 5-HT viene catabolizzata ad acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) tramite l'azione delle monoaminossidasi A (MAOA) (Figura 1).

La serotonina produce i suoi effetti attraverso una varietà di recettori transmembrana presenti sia nel SNC che nel sistema nervoso periferico e in tessuti non neuronali, quale l'intestino e il sistema cardiovascolare. I recettori per la serotonina sono suddivisi in 7 classi (da 5-HT1 a 5-HT7) distinte in base alle caratteristiche strutturali, funzionali e farmacologiche (3).

La serotonina, come tutte le ammine biogene, dopo il loro rilascio nel vallo sinaptico, termina la sua azione grazie all'attività di specifici trasportatori, localizzati sulla membrana plasmatica, che ne mediano il "re-uptake". Il trasportatore specifico della serotonina si chiama SERT ed appartiene alla famiglia dei trasportatori dei neurotrasmettitori Na^+/Cl^--

dipendenti; esso modula i livelli di serotonina nell'ambiente extracellulare, regolando, in tal modo, anche l'attivazione dei recettori (4). Nel citosol, la serotonina viene internalizzata, tramite l'azione di trasportatori vescicolari di monoammine (VMAT), in vescicole di deposito dove viene conservata fino al momento del rilascio (5).

Sostanze, quali la cocaina e i derivati delle anfetamine, che inibiscono il "reuptake" della serotonina e ne incrementano il rilascio, agiscono prolungando l'effetto del neurotrasmettitore (6). Allo stesso modo la maggior parte degli antidepressivi correntemente impiegati utilizzano l'inibizione specifica del trasportatore della serotonina SERT per aumentare la concentrazione di serotonina extracellulare (7). Tali farmaci sono definiti SSRI, inibitori selettivi del "re-uptake" della serotonina.

Il sistema serotoninergico è il primo ad apparire nell'embriogenesi precoce sia dei vertebrati che degli invertebrati, prima ancora del differenziamento del sistema nervoso, ed è proprio in questa fase che la serotonina raggiunge i suoi livelli più elevati di concentrazione (8-9). Negli ultimi anni sono emerse numerose evidenze a sostegno dell'ipotesi che la serotonina, prima di agire quale neurotrasmettitore per l'encefalo adulto, rappresenti un fattore determinante nella modulazione della plasticità sinaptica e dello sviluppo sia del SNC che di altri tessuti. I neuroni serotoninergici, infatti, sono tra i primi a formarsi durante lo sviluppo embrionale e la serotonina viene rilasciata dagli assoni in crescita prima che le sinapsi siano completamente formate (9). Nel SNC dei vertebrati la maggior parte dei neuroni che producono serotonina sono localizzati in una ristretta zona dell'encefalo, tra mesencefalo e romboencefalo, dove sono raggruppati nei nuclei del raphe (Figura 2). Esiste, inoltre, una piccola popolazione di questi neuroni a livello del nucleo dorso-mediale ipotalamico. Nei mammiferi, i nuclei del raphe (denominati B1-B9) compaiono a stadi molto precoci dello sviluppo e si suddividono in due gruppi in base alla posizione che assumono

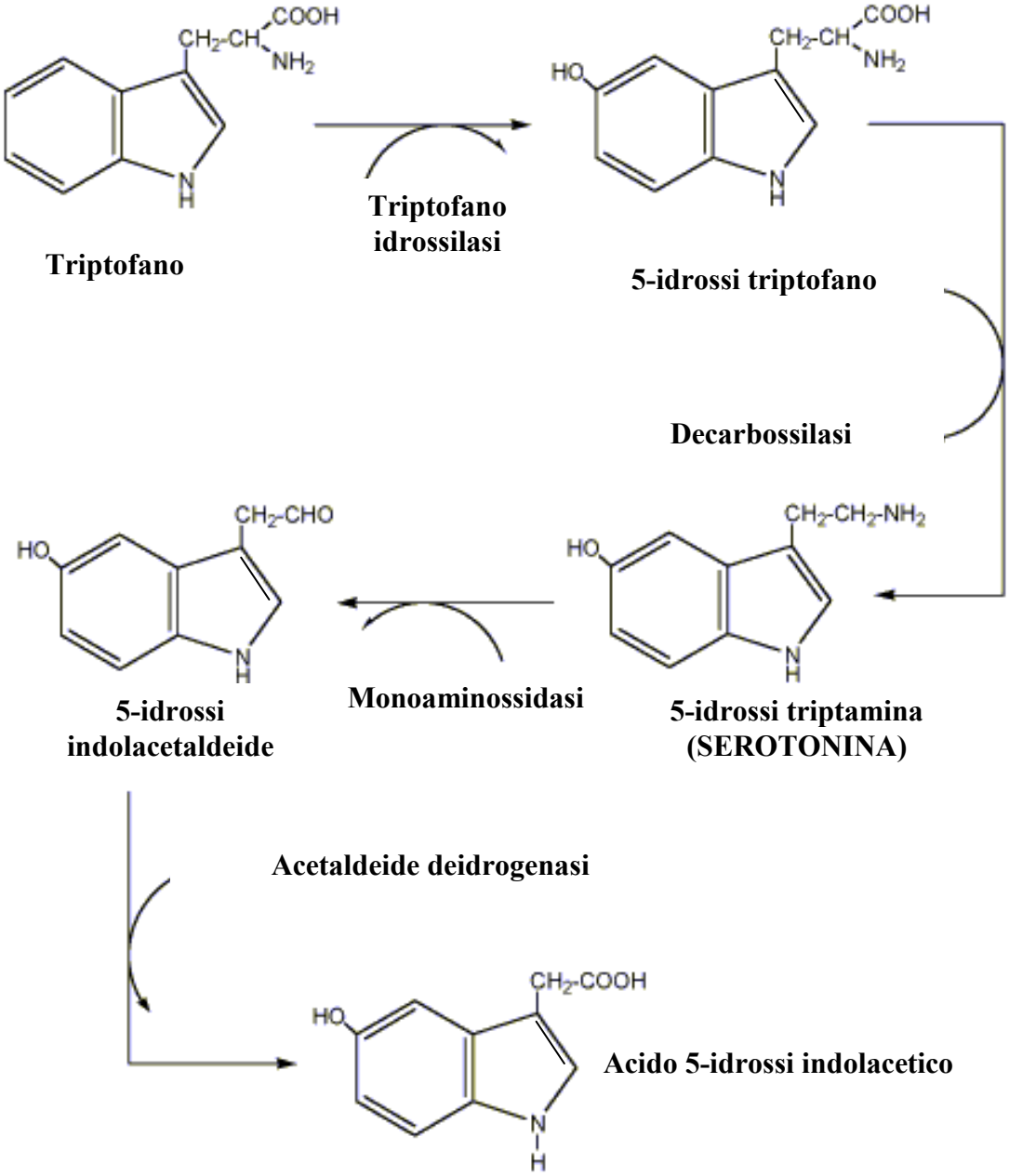
lungo l'asse rostro-caudale del tronco dell'encefalo: il gruppo rostrale comprende i nuclei B6-B9 (*raphe dorsale, caudale, ventrolaterale*), mentre quello caudale comprende i nuclei B1-B5 (*raphe magnus, obscurus, pallidus*).

La serotonina è sintetizzata anche nei fotorecettori della retina, nella ghiandola pineale, ed, a livello periferico, nelle cellule enterocromaffini dell'intestino, nei tessuti neuroepiteliali dei polmoni e nelle cellule parafollicolari della tiroide. Essa è una delle più importanti molecole presenti nell'intestino, all'interno delle cellule enterocromaffini, dove si ritrova circa il 90% del contenuto totale di serotonina corporea (1).

Nei mammiferi molto precocemente nello sviluppo, è stata riscontrata la presenza di serotonina a livello del cuore, del mesenchima craniale e della notocorda (10). Più tardivamente nell'embriogenesi, quando i neuroni serotoninergici sono differenziati, si riscontra la presenza di serotonina nel talamo, nella corteccia limbica, nell'ipotalamo, nella retina e nel nucleo olivare superiore (7). Infine, nell'organismo adulto si riscontra la presenza di serotonina nelle piastrine che la ricaptano dal circolo sanguigno e la rilasciano quando sono attivate (11).

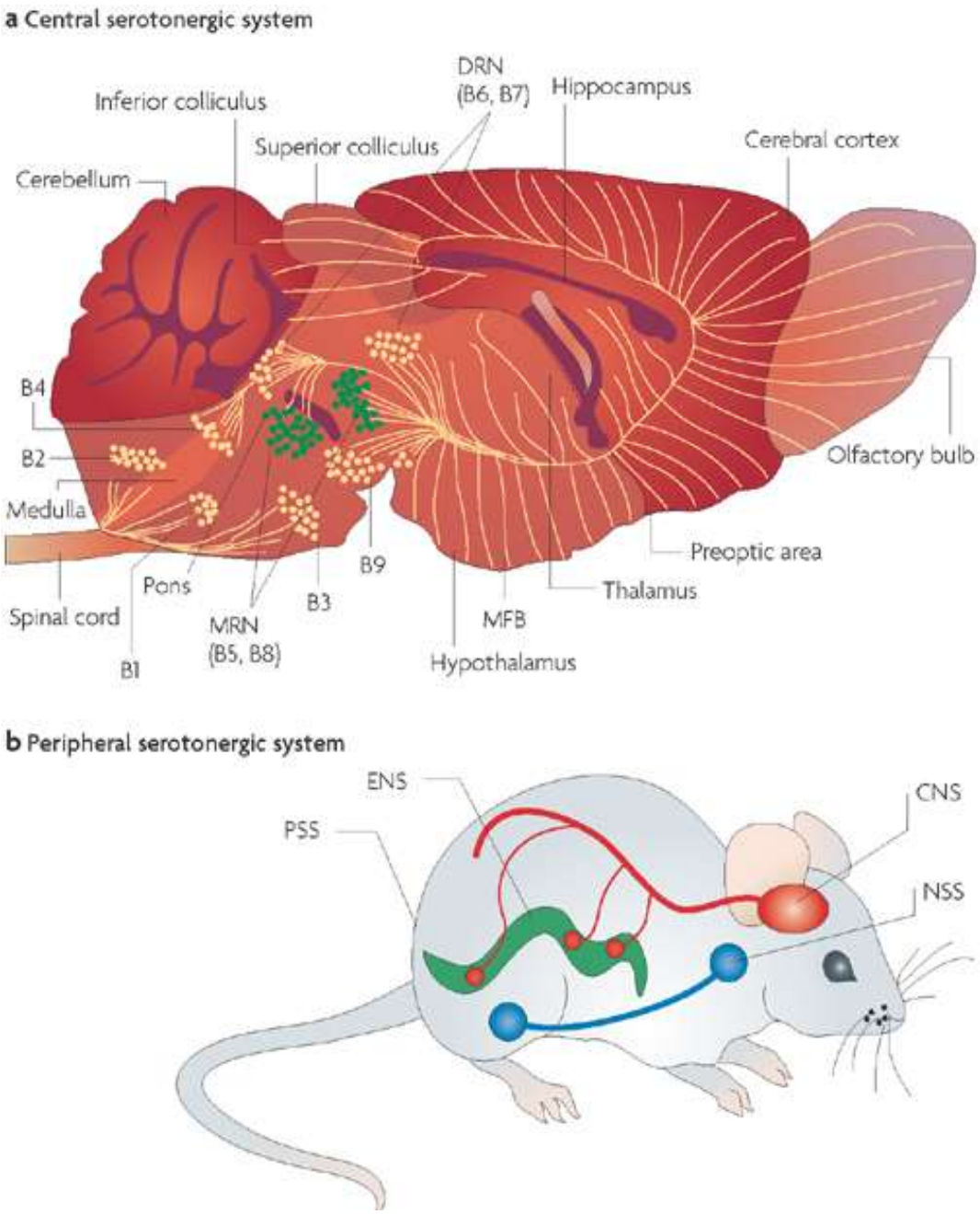
La serotonina regola numerosi processi fondamentali sia durante lo sviluppo embrionale che nell'organismo adulto. Tra le funzioni fisiologiche regolate dalla serotonina sono i processi della memoria, il ciclo sonno-veglia, la secrezione neuroendocrina, il comportamento sessuale, l'appetito, l'attività motoria, la termoregolazione e il dolore (12). La serotonina svolge, inoltre, un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività dei sistemi respiratorio, cardiovascolare e gastrointestinale (1, 13-14) (Figura 3).

Figura 1



Biosintesi e degradazione della serotonina

Figura 2

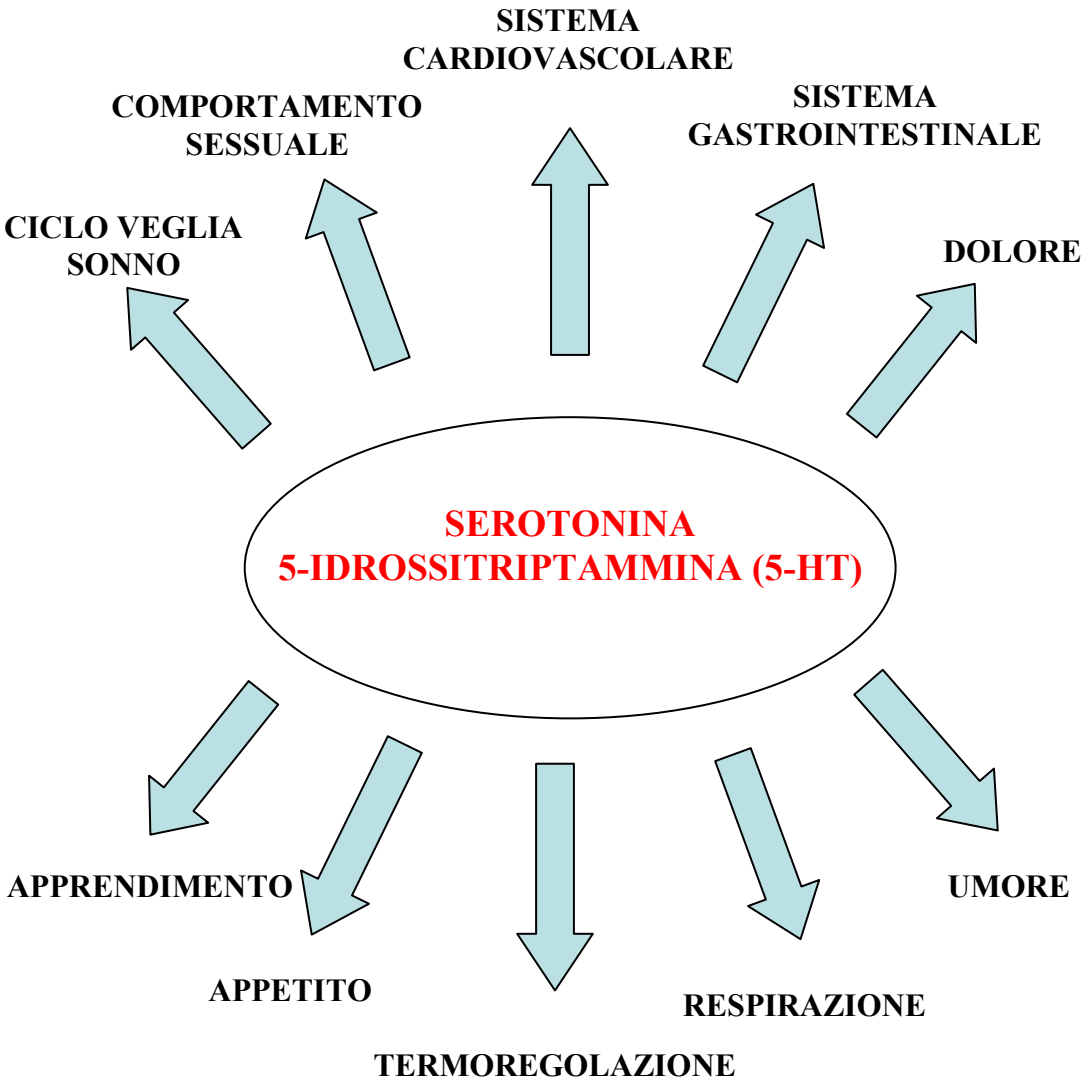


Siti di espressione del trasportatore della serotonina nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico

A. Nove gruppi di neuroni serotoninergici nel SNC: nuclei caudali del raphe (B1 – B4), con proiezioni assonali nella medulla fino alla colonna spinale. Nuclei dorsali del raphe (DRN) (B6 e B7), nuclei mediani del raphe (MRN) (B5 e B8), nuclei rostrali (B6- B9) con proiezioni assonali nel diencefalo e nel telencefalo.
B. Diramazioni serotoninergiche nel sistema nervoso enterico (ENS), nel sistema ipotalamo-pituitaria-adrenocorticale (HPA), nel sistema adrenomedullare neuroendocrino serotoninergico (NSS) e nel sistema serotoninergico periferico (PSS) che include polmoni, cuore, vasi sanguinei, pancreas, piastrine.

da: Murphy and Lesch: Nature 9: 85-96, 2008 (33).

Figura 3



Processi fisiologici regolati dalla serotonina

Un'alterata regolazione della trasmissione serotoninergica nell'uomo ha effetti su numerosi aspetti comportamentali ed è la causa di disordini dell'alimentazione e di patologie neuropsichiatriche quali, ad esempio, la schizofrenia, l'ansia, lo stress e la depressione (15-16). Molte sostanze che modulano il sistema serotoninergico sono alla base dei trattamenti farmacologici per tali malattie. E' stato, inoltre, dimostrato il coinvolgimento della serotonina in patologie quali la sindrome di Down, l'autismo, il morbo di Alzheimer e l'epilessia (17). Alterazioni dei livelli di serotonina sono ritenuti responsabili di numerose patologie dell'uomo e degli animali che comprendono disordini cardiaci, malattie gastrointestinali, tumori, miopatie e numerose altre (1, 9, 13-14).

1.2 I recettori della serotonina

La serotonina è l'unica fra le monoamine biogene ad esercitare la sua azione mediante l'attivazione di un 14 distinti recettori, suddivisi in 7 classi sulla base delle caratteristiche strutturali e funzionali (3-4). Fatta eccezione per il recettore 5-HT3, che appartiene alla famiglia dei canali ionici, tutti i recettori per la serotonina appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, e, suddivisi in ulteriori 14 sottotipi, rappresentano una delle famiglie più complesse di recettori di neurotrasmettitori.

La famiglia dei recettori 5-HT1 è composta da cinque membri (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F), che hanno un'omologia di sequenza del 40-63% nell'uomo. I recettori 5-HT1 sono accoppiati alla proteina $G_{i/o}$, enzima sensibile alla tossina della pertosse, che inibisce l'azione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione della produzione di adenosina monofosfato ciclica (cAMP).

La famiglia dei recettori 5-HT2 è costituita da tre membri, 5-HT2A, 5-HT2B e 5-HT2C. Essi sono accoppiati alla proteina $G_{q/11}$ che aumenta la concentrazione di inositolo-3-fosfato (IP3) e di calcio citosolico, in accordo

con il ruolo svolto da tali recettori nella contrattilità muscolare e nella stimolazione cerebrale. I recettori 5-HT3 appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a canali ionici e sono costituiti da cinque subunità che delimitano un canale centrale. Tali recettori sono localizzati sui neuroni centrali e periferici, dove essi causano una rapida depolarizzazione in seguito al movimento di cationi da e verso la cellula (Na^+ e Ca^{++} in entrata e K^+ in uscita). I recettori 5-HT4, 5-HT6 e 5-HT7 sono accoppiati alla proteina G_s e, tramite l'attivazione dell'enzima adenilato ciclasi, promuovono la formazione di cAMP che interagisce con vari bersagli, quali la proteina chinasi A (PKA) o canali ionici del calcio (18).

Alcuni recettori serotoninergici svolgono un ruolo chiave nello sviluppo embrionale di diversi organismi, oltre ad esplicare importanti funzioni nella fisiologia dell'adulto (19). Il recettore 5-HT1A, ad esempio, è stato clonato nei mammiferi e in *Xenopus laevis* (20) ed è espresso a stadi precoci dello sviluppo embrionale nei nuclei del raphe, nell'ippocampo e nell'occhio del ratto (21). Studi *in vivo* hanno dimostrato che la serotonina agisce attraverso tale recettore stimolando la neurogenesi nell'ippocampo (22). Topi knock-out (KO) per 5-HT1A mostrano alterazioni comportamentali legate all'ansia (23).

Il recettore 5-HT1A nell'adulto influenza le funzioni cognitive ed emozionali del SNC (18). Nei ratti, la somministrazione di agonisti del recettore 5-HT1A induce iperfagia, ipotermia ed alterazioni del comportamento sessuale (24). Studi neuroendocrini hanno dimostrato che la stimolazione del recettore 5-HT1A induce un aumento dei livelli plasmatici dell'ormone adrenocorticotropo, dei corticosteroidi e della prolattina (25). La funzione predominante di tale recettore, tuttavia, è quella connessa ai processi cognitivi e comportamentali e alla regolazione della percezione del dolore (18).

Il recettore 5-HT1B, espresso astadi precoci dello sviluppo nei nuclei del raphe, nel nucleo striato, nel cervelletto e nelle cellule gangliari della retina, agisce inibendo la produzione di cAMP e il flusso di calcio nei terminali

assonici (18). Topi nulli per tale recettore mostrano un aumento dei livelli di aggressività (26). Il recettore 5-HT2A, coinvolto nei processi di maturazione e differenziamento neuronale, regola l'espressione del fattore neurotrofico BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") nella neocorteccia e nell'ippocampo influenzandone i processi tardivi dello sviluppo (27). Numerosi studi dimostrano il ruolo del recettore 5-HT2A nella patogenesi della schizofrenia (28). Altre patologie in cui sembra essere coinvolto il recettore 5-HT2A sono la depressione, l'ansia e disordini compulsivi ossessivi (18).

La diffusa espressione del recettore 5-HT2B nell'embriogenesi precoce (cellule della cresta neurale, tubo neurale, cuore, intestino, somiti, vescicole ottiche e otiche, archi faringei, mesenchima cranio-facciale) fa supporre un ruolo fondamentale di 5-HT2B nella morfogenesi mediata dalla serotonina. Pochi, invece, sono i dati relativi agli effetti funzionali dell'attivazione di 5-HT2B nell'età adulta. Recenti studi che utilizzano agonisti di tale recettore suggeriscono un ruolo nel controllo dell'ansia (18). Il recettore 5-HT2C è coinvolto soprattutto nello sviluppo sinaptico della corteccia visiva (29). Topi nulli per 5-HT2C mostrano un deficit nel potenziamento a lungo termine dell'ippocampo (30). Esistono numerose risposte comportamentali associate all'attivazione centrale del recettore 5-HT2C, quali ipo-locomozione, ipofagia, ansia ed ipertermia (18).

1.3 Il trasportatore della serotonina SERT

Il trasportatore specifico della serotonina SERT è una proteina integrale di membrana di circa 600 amminoacidi, con dodici domini transmembrana ed i residui carbossi- ed ammino-terminale citoplasmatici (4). Nel dominio idrofilico extracellulare di SERT, tra i domini transmembrana 3 e 4, sono presenti due siti canonici di glicosilazione (Figura 4). La proteina contiene anche siti di fosforilazione ed, in particolare, tre residui per la PKA e tre per la proteina chinasi C (PKC) che regolano l'attività del trasportatore tramite due

sistemi opposti, quello del cAMP e quello del fosfaditilinositolo fosfato (PIP_2). La PKA quando è attivata dal cAMP induce un aumento del "re-uptake" della serotonina, mentre l'attivazione della PKC provoca una riduzione dello stesso (48). Il gene codificante per SERT nell'uomo SLC6A4 è localizzato sul cromosoma 17q11.2 ed è composto da 14 esoni di 14 kb; esso è soggetto ad eventi di "splicing" alternativo che riguardano gli esoni 1A, 1B ed 1C, e la regione di variabilità 3' non tradotta che regola l'espressione del gene (31).

L'espressione di SERT è stata evidenziata in diversi distretti dell'organismo a vari stadi dello sviluppo embrionale (32); il primo apparato in cui compare è il sistema gastrointestinale a cui seguono l'apparato cardiovascolare, la pelle, il fegato, la lingua, il tessuto adiposo bruno, il connettivo, il sistema nervoso periferico, la midollare del surrene, i primordi dei denti, l'orecchio interno, la tiroide. Nel SNC si ritrova nella retina, nel sistema limbico, nel nucleo cocleare, nel nucleo genicolatolaterale e nella ghiandola pituitaria (7). Nell'organismo adulto il trasportatore è localizzato nei polmoni, nell'intestino, nella milza, nei plessi enterico e mioenterico, nella corteccia frontale, nell'ippocampo, nello striato e nel rombencefalo, nella parte posteriore dell'encefalo e in corrispondenza dei nuclei del raphe dove raggiunge i livelli di massima espressione (7, 31-33). Recentemente sono state identificate alcune proteine che interagiscono con la sequenza ammino-terminale di SERT e che sono state chiamate "proteine che legano il trasportatore serotoninergico" (STBP) (34).

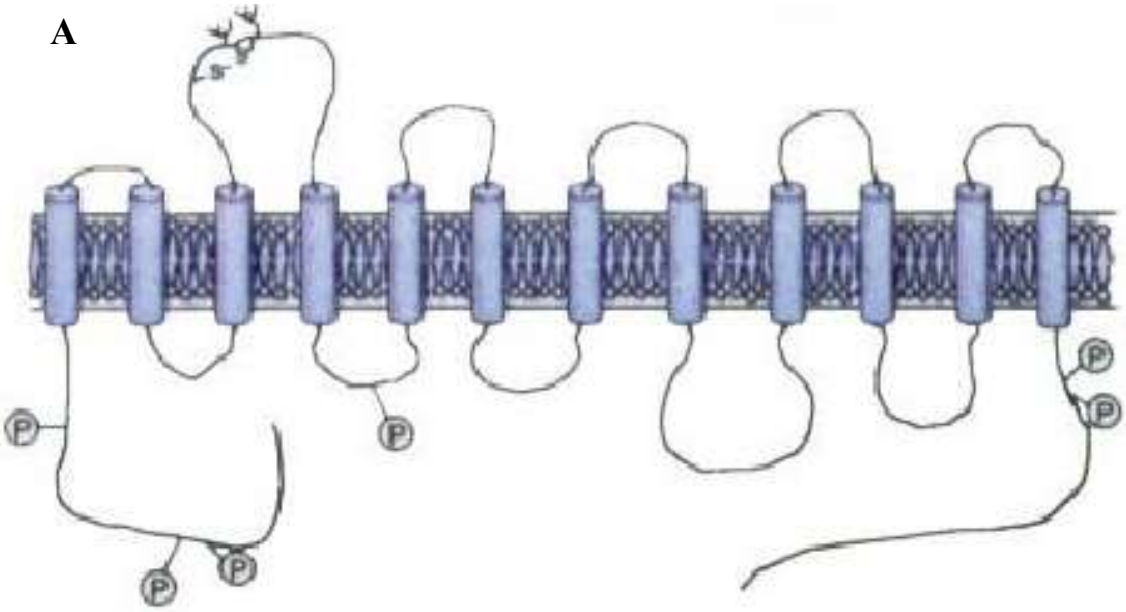
Mutazioni che causano una ridotta o completa abrogazione delle funzioni di SERT in modelli murini ha portato all'identificazione di oltre 50 differenti fenotipi che vanno dall'aumento dell'ansia e di comportamenti correlati allo stress a disfunzioni intestinali, debolezza ossea, obesità con sindrome metabolica ed altri. Tutti questi effetti, che possono essere amplificati da interazioni gene-ambiente o gene-gene, sono attribuiti ad alterazioni dei livelli intra- ed extra-cellulari di serotonina sia durante lo sviluppo embrionale che in

età adulta (33). Varianti geniche che alterano la funzionalità di SERT nell'uomo producono fenotipi simili a quelli manifestati nel topo (35). E' documentato, ad esempio, che la variazione di lunghezza in una sequenza funzionale presente nella regione di controllo della trascrizione del gene di SERT è associata ad aumento dell'ansia, depressione e aggressività. Allo stesso modo, altri tipi di variazioni nella stessa regione regolatrice o in altre regioni codificanti e non del gene sembrano avere un ruolo nella patogenesi di diverse condizioni neuropsichiatriche quali disordine bipolare, depressione, ansia (specialmente disordini ossessivo-compulsivi), tendenze suicida, disordini dell'alimentazione, disordini da abuso di droghe, autismo, deficit dell'attenzione e iperattività, disordini neurodegenerativi (7, 12, 15, 31, 33, 35). Altre patologie associate ad alterazioni nella funzionalità di SERT, ma non strettamente correlate alle funzioni del sistema nervoso, sono l'infarto del miocardio, l'ipertensione polmonare, la sindrome dell'intestino irritabile e la sindrome della morte infantile improvvisa (SIDS) (13-14, 36-37).

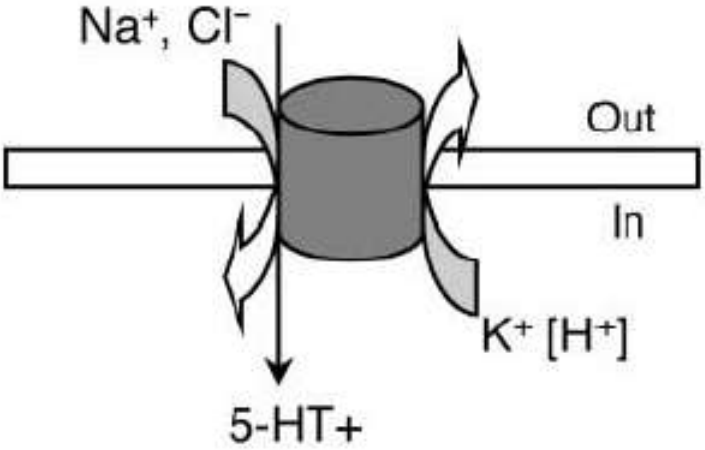
L'accertato ruolo di SERT in numerose patologie del sistema nervoso associate ad aspetti emotivi o comportamentali ha reso tale proteina un bersaglio molto utilizzato nelle terapie farmacologiche. Gli inibitori selettivi di SERT, i cosiddetti farmaci SSRI, quali, ad esempio, la fluoxetina e la paroxetina vengono ampiamente utilizzati per la cura della depressione (7, 38). SERT risulta essere inibito, oltre che da farmaci, anche da sostanze d'abuso quali l'MDMA (3,4-metilenediossimetamfetamina), più comunemente nota come Ecstasy, che agisce aumentando la concentrazione di serotonina mediante l'inibizione della sua ricaptazione dal vallo sinaptico all'interno della cellula nervosa (39).

Figura 4

A



B



A. Struttura di SERT

B. Meccanismo di trasporto della serotonina

1.4 Il sistema serotoninergico nello sviluppo embrionale

Alcuni neurotrasmettitori sono presenti in stadi molto precoci dell'embriogenesi sia dei vertebrati che degli invertebrati, prima ancora del differenziamento del sistema nervoso. Essi durante lo sviluppo embrionale svolgono un ruolo diverso da quello svolto nel sistema nervoso maturo, regolando i processi di differenziamento e/o di morfogenesi (9-10, 17, 40). Numerose evidenze dimostrano il ruolo dei neurotrasmettitori nel controllo della divisione cellulare, nei movimenti morfogenetici durante la segmentazione e la gastrulazione, nella chiusura del tubo neurale e nella neurogenesi precoce (40). Tra i sistemi monoaminergici, quello serotoninergico, che è il primo a comparire nell'embriogenesi precoce, svolge un ruolo fondamentale.

Molti fattori di crescita che influenzano lo sviluppo del sistema serotoninergico sono importanti negli eventi di plasticità sinaptica. Tra i fattori di crescita più noti è il fattore di crescita astrogliale S100β di cui la serotonina accresce la produzione, dimostrando ciò che i neuroni serotoninergici possono regolare la loro stessa crescita oltre a quella dei loro bersagli (41). Il rilascio di serotonina dai terminali sinaptici influenza i processi di neurogenesi, apoptosi, rifinimento dendritico, migrazione cellulare e plasticità sinaptica (7, 9-10, 17, 22, 29, 41).

L'inibizione della sintesi di serotonina mediante la somministrazione di paraclorofenilalanina (PCPA), un composto che blocca la TPH, provoca nei ratti un'aumento dell'espressione delle sintasi dell'ossido nitrico (NOS) nel corpo calloso, nello striato e nell'ippocampo, mettendo in evidenza l'esistenza di una stretta relazione tra il sistema serotoninergico e quello nitrergico durante lo sviluppo (42). In tali ratti la deplezione di serotonina influenza la maturazione dei motoneuroni; questi animali, infatti, mostrano disfunzioni posturali probabilmente dovute ad un arresto dello sviluppo dei motoneuroni. L'azione della serotonina sulla plasticità neuronale si esplica attraverso il

controllo dell'espressione di molecole di adesione cellulare, quali le PSA-NCAM (Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecules) (40).

La produzione di topi KO per la MAOA, l'enzima responsabile della degradazione della serotonina, ha consentito di stabilire che l'inattivazione dell'enzima porta ad un aumento pari a nove volte dei livelli di serotonina nell'encefalo durante la prima settimana dopo la nascita. In questo periodo si riscontra un forte accumulo di serotonina in tutti i neuroni che esprimono in modo transiente il trasportatore serotoninergico SERT. La corteccia somatosensoriale di questi topi non presenta la sua tipica divisione in colonne, a dimostrazione del fatto che l'aumento di serotonina compromette la corretta aggregazione e segregazione delle fibre talamocorticali (43). Simili effetti si ritrovano nel sistema visivo in cui risulta alterata la normale segregazione degli assoni retinici (9). Altre alterazioni riscontrate in questo modello riguardano l'apparato locomotore e respiratorio nei neonati (44).

I topi KO per la TPH, invece, non hanno mostrato il fenotipo atteso in quanto, in questo modello, la sintesi di serotonina nell'encefalo rimane invariata, mentre si riduce fino a quasi scomparire nell'intestino e nel sangue. Inoltre, i topi KO per la TPH non presentano differenze comportamentali rispetto ai topi di controllo. Tali risultati hanno trovato una corretta motivazione scientifica quando nel 2003 è stata clonata la seconda isoforma dell'enzima, la TPH2, espressa nei neuroni serotoninergici del SNC (45). Attualmente non esiste un modello murino TPH2- KO, ma sono stati generati topi con un polimorfismo di un singolo nucleotide nel gene che codifica per tale enzima (46). I topi omozigoti presentano una riduzione del 50-70% dei livelli di serotonina nei neuroni che proiettano a corteccia e striato e una riduzione del 40% della quantità di serotonina nei tessuti che la reinternalizzano. Inoltre, questi topi esibiscono caratteristiche comportamentali diverse dai topi di controllo e rispondono agli antidepressivi (46). Tali risultati

rappresentano l'evidenza diretta del ruolo fondamentale che TPH2 svolge nel controllo del sistema serotoninergico nell'encefalo.

Altri studi condotti su modelli murini hanno permesso di stabilire il ruolo della serotonina nella migrazione delle cellule delle creste neurali facciali (47), nella morfogenesi delle strutture craniofacciali (41) e nella proliferazione delle cellule del miocardio (14). Embrioni in coltura trattati con antagonisti serotoninergici mostrano uno sviluppo embrionale anormale caratterizzato da una deficienza del mesenchima della testa, da archi mandibolari ipoplastici, da occhi e tubo neurale anormali e da difetti cardiovascolari che includono la mancanza di trabecole e la riduzione dello spessore della parete ventricolare (48).

In conclusione, i dati attualmente disponibili dimostrano che il sistema serotoninergico è sicuramente coinvolto nei processi di formazione dei circuiti neuronali e di sinaptogenesi. Restano ancora da chiarire, però, sia il ruolo del sistema serotoninergico nello sviluppo precoce, sia i meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base della sua azione.

1.5 Il sistema serotoninergico nel cervello

Nel SNC i neuroni che producono serotonina sono localizzati nella ristretta zona dell'encefalo in cui sono raggruppati nei nuclei del raphe (Figura 2). Esiste, inoltre, una piccola popolazione di questi neuroni a livello del nucleo dorso-mediale ipotalamico. Malgrado il numero totale dei neuroni serotoninergici sia molto ridotto (circa 20.000 nel ratto) rispetto al numero totale di neuroni presenti nel SNC (circa 10^{10}), il sistema che essi formano si sviluppa in un'ampia innervazione a tutte le aree dell'encefalo e al midollo spinale. I nuclei del *raphe* rostrale producono proiezioni assonali che attraverso il fascicolo prosencefalico mediale raggiungono numerose strutture mesencefaliche e prosencefaliche quali la corteccia cerebrale, l'ippocampo, il diencefalo, i nuclei della base e il cervelletto. Gran parte di queste fibre, però,

non stabilisce un contatto sinaptico diretto con i neuroni bersaglio ma, piuttosto, rilascia la serotonina nell'ambiente extracellulare. I nuclei del *raphe* caudale, invece, si proiettano verso il midollo spinale dove raggiungono i neuroni pregangliari del simpatico, nella colonna intermedio laterale, i motoneuroni somatici e, più tardivamente, innervano le fibre a livello delle corna dorsali.

I segnali che portano alla formazione del sistema serotoninergico a partire dal tubo neurale sono molteplici e derivano da vari distretti del sistema nervoso embrionale (49). Nell'embrione, si possono distinguere due gruppi principali di cellule che producono serotonina localizzati nel romboencefalo ventrale. Il gruppo rostrale compare per primo e può essere identificato agli stadi embrionali E12-15, mentre il gruppo di cellule caudali mostra immunoreattività per la serotonina solo più tardivamente, intorno allo stadio embrionale E14. Diversi fattori sembrano essere importanti per la formazione dei neuroni serotoninergici, fra cui il morfogeno Shh (sonic hedgehog), prodotto dalla notocorda e dal pavimento del romboencefalo, FGF8, rilasciato dall'istmo al confine tra mesencefalo e romboencefalo, e FGF4, secreto dalla stria primitiva (9, 50). I fattori Shh, FGF8 e FGF4 innescano vie di trasduzione intracellulari che portano all'attivazione trascrizionale di geni coinvolti nel differenziamento dei neuroni serotoninergici. Shh è coinvolto nella regolazione del processo di crescita del tubo neurale e nell'induzione di diverse classi di neuroni tra cui i neuroni serotoninergici. FGF8 regola la localizzazione e la specificazione dei neuroni serotoninergici rostrali. Da soli Shh e FGF8, tuttavia, non sono sufficienti per la formazione di neuroni serotoninergici ectopici, ma è necessaria anche l'azione di FGF4 che, generando un pre-segnale all'interno del romboencefalo promuove la secrezione di Shh e FGF8 e, quindi, la conversione dei precursori neurali in neuroni serotoninergici nella zona più ventrale del romboencefalo (50).

I neuroni serotoninergici si generano a partire dagli stessi precursori neurali da cui, in fasi più precoci dello sviluppo embrionale, si originano i motoneuroni sia somatici che viscerali (51). Dall'analisi condotta su embrioni di topo (E9-E10.5) è emerso che, a livello del pavimento del romboencefalo, sono espressi geni indispensabili per la generazione dei motoneuroni, quali *Nkx2.2*, *Nkx2.9* e *Phox2b*. A E10.5 giorni di gestazione nel topo, la trascrizione dei geni *Phox2b* e *Nkx2.9* si conclude, mentre nella stessa zona vengono attivati per la prima volta geni utili per la specificazione, il differenziamento ed il mantenimento post-mitotico del fenotipo serotoninergico. In questi neuroni, infatti, viene attivata la trascrizione dei geni codificanti per fattori di trascrizione quali *Lmx1b*, *Pet-1*, *GATA2*, *GATA3* (52-54). *Lmx1b* è un fattore di trascrizione coinvolto nel mantenimento post-mitotico dei precursori serotoninergici. *Pet-1* è un gene indispensabile affinché i neuroni serotoninergici comincino a differenziarsi. In particolare, esso è un fattore di trascrizione essenziale per l'espressione dei geni che permettono ai precursori di diventare neuroni serotoninergici differenziati, fra cui TPH2 e ADCC (decarbossilasi degli aminoacidi aromatici) che rappresentano i due enzimi chiave attraverso cui viene effettuata la sintesi della serotonina, SERT e VMAT2 coinvolti rispettivamente nel "re-uptake" della serotonina a livello del terminale assonico e nel trasporto dal corpo cellulare dove la serotonina viene prodotta lungo l'assone. *GATA2* è richiesto per la specificazione dei neuroni serotoninergici solo del rombomero 2 e *GATA3* dal rombomero 3 in poi, come dimostrato dall'annullamento di questi due geni nel topo (53-54).

Infine, per la specificazione, il differenziamento e il mantenimento del fenotipo serotoninergico sono richieste anche diverse neurotrofine e fattori di crescita, tra cui il TGF-β ("transforming growth factor-β"), le proteine BMP ("bone morphogenetic proteins") e neurochine tra cui il CNTF ("ciliary neurotrophic factor") (55). La serotonina stessa interviene nel mantenimento del fenotipo serotoninergico attraverso l'attivazione sequenziale del recettore

5-HT1A, del BDNF e del suo recettore TrkB e, probabilmente, anche di altri processi di trasduzione del segnale (19, 27). Il BDNF svolge un ruolo critico nello sviluppo e nel mantenimento della plasticità dei neuroni serotoninergici. In particolare, il BDNF promuove il differenziamento dei neuroni serotoninergici durante lo sviluppo embrionale e protegge gli stessi dagli insulti neurotossici nell'adulto (55).

1.6 Il sistema serotoninergico nel cuore

La serotonina regola le funzioni cardiovascolari sia durante l'embriogenesi che nell'età adulta (14, 31-32, 39, 48, 56-60). Lo sviluppo cardiaco è sotto il costante controllo della serotonina e le cellule cardiache accumulano attivamente la serotonina durante tutto il periodo dello sviluppo embrionale. Alti livelli di serotonina, infatti, sono stati riscontrati nel miocardio di topi sin dagli stadi embrionali più precoci (56). Nelle prime fasi della gravidanza la serotonina è trasportata attraverso la placenta (61) e prodotta poi nell'intestino (62) e nel cervello (63). I cardiomiociti, tuttavia, sembrano non esprimere l'enzima TPH necessario per la sintesi della serotonina (56) per cui l'accumulo di serotonina nei cardiomiociti deriva da un attivo "uptake" della serotonina mediato dal suo trasportatore SERT (59). Nei primi stadi di sviluppo embrionale, l'mRNA di SERT è stato rilevato nelle cellule della cresta neurale e nel cuore (32). Da studi condotti trattando colture di cardiomiociti fetali con concentrazioni crescenti di serotonina sembra che l'ammina eserciti un effetto mitogenico su tali cellule e su cellule non muscolari (64). L'effetto della serotonina sulla proliferazione di cellule cardiache si esplica tramite l'attivazione di specifici recettori ed in particolare del recettore 5-HT2B (48). Studi condotti su topi KO per il recettore 5-HT2B mostrano il ruolo di tale recettore nello sviluppo e nel differenziamento del cuore adulto (65), mentre il recettore 5-HT1B sembra che sia coinvolto nella proliferazione delle cellule subendoteliali valvolari (66).

Presidi farmacologici che agiscono sul sistema serotoninergico sono stati associati ad un numero significativo di effetti deleteri sul sistema cardiovascolare, quali ipertensione cardiovascolare, aritmia cardiaca ed anomalie valvolari cardiache (39, 60, 67-70). Pazienti affetti da tumori carcinoidi, altri trattati con la combinazione fenfluramina/fentermina e soggetti trattati con derivati dell'ergot sviluppano cardiopatie comparabili fra loro (68-70). Nei pazienti con tumori carcinoidi è stata osservata l'associazione di alti livelli di serotonina con una fibrodisplasia principalmente delle valvole cardiache del lato destro (70); un quadro clinico paragonabile è stato anche osservato in alcuni pazienti trattati con derivati dell'ergot (69). Tali evidenze ben si correlano al profilo di espressione del gene SERT nel cuore durante lo sviluppo e nell'età adulta (71). L'osservazione che topi SERT-KO sviluppano valvulopatie e fibrosi miocardica ha fornito ulteriori chiarimenti sulle patologie cardiache valvolari associate alla serotonina e sul ruolo di SERT nella loro patogenesi (72).

Il ruolo della serotonina sui tessuti cardiaci delle valvole è esteso e complesso. L'attivazione da parte della serotonina delle vie di trasduzione di segnali mediate dalle proteine G promuove un aumento di espressione della citochina TGF-β1 (73-74). E' stato dimostrato che la serotonina promuove segnali fibrotici nelle cellule valvolari interstiziali di pecora in coltura (75-76) e nelle cellule mesangiali di rene (73) inducendo l'espressione di TGF-β1 attraverso una via di traduzione del segnale che coinvolge ERK. TGF-β1 è coinvolta nella patogenesi di numerose patologie cardiovascolari, quali l'ipertensione, restenosi, arteriosclerosi, ipertrofia cardiaca e insufficienza cardiaca (77). TGF-β1 trasmette segnali principalmente attraverso le proteine citoplasmatiche Smad, che traslocano nel nucleo cellulare e agiscono da fattori trascrizionali (78). Le proteine Smad svolgono un ruolo importante nel rimodellamento cardiaco e nell'insufficienza cardiaca attraverso la regolazione di processi fibrotici, apoptotici ed anti-ipertrofici (79). Membri della famiglia

delle protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) sono coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale TGF-β1/Smad. Nelle cellule vascolari del muscolo liscio, TGF-β1 attiva tre MAPK: ERK, p38 MAPK e JNK. E' stata dimostrata un'interazione tra ERK e Smad. L'inibizione di ERK riduce i livelli di fosforilazione di Smad indotti da TGF-β1, la produzione di collagene e la sua attività di promotore, indicando che l'attività di ERK è necessaria per un'ottimale risposta a TGF-β1 (73).

Sebbene sia stato dimostrato il ruolo significativo di TGF-β1 nella patogenesi valvolare, ulteriori studi che utilizzano modelli animali sono necessari per fornire maggiori evidenze sulla correlazione tra TGF-β1 e la fibrosi cardiaca. Topi KO per SERT hanno mostrato un aumento di accumulo di collagene nei foglietti delle valvole cardiache rispetto ai controlli (72) e miofibroblasti di valvole cardiache umane hanno dimostrato un aumento della produzione di collagene in seguito a somministrazione della serotonina (80). Lo studio dei processi dello sviluppo embrionale delle valvole cardiache in cui è coinvolta la serotonina può risultare estremamente utile ai fini di una migliore comprensione degli eventi molecolari responsabili delle patologie delle valvole cardiache.

1.7 Il sistema serotoninergico nella tiroide

Lo sviluppo embrionale della tiroide segue passaggi morfogenetici che sono molto simili tra l'uomo e il topo che è il modello animale più usato per studi di disgenesia tiroidea (81-83). A stadi molto precoci dello sviluppo embrionale, le cellule dell'endoderma del primordio anteriore del tratto gastrointestinale destinate ad assumere un fenotipo tiroideo si assemblano a formare una struttura primordiale nel pavimento faringeo (placode). A livello molecolare queste cellule sono caratterizzate dalla espressione contemporanea di alcuni fattori trascrizionali quali Nkx2-1, Foxe1 e Pax8, che giocano un ruolo importante non solo nella formazione del primordio della ghiandola, ma

anche nella differenziazione funzionale della tiroide nelle fasi più tardive dello sviluppo embrionale e nella fase postatale (84).

Successivamente, il primordio della tiroide si sposta caudalmente dal pavimento faringeo verso la regione anteriore del collo dove avviene l'espansione bilaterale del tessuto tiroideo e la fusione con i corpi ultimobranchiali, strutture da cui derivano le cellule parafollicolari. Tale fusione dà origine alla formazione dei lobi precoci della tiroide, mentre la porzione centrale del primordio rappresenta l'istmo che tiene uniti i lobi tiroidei. Solo a questo punto avviene la formazione dei follicoli tiroidei e il differenziamento delle cellule progenitrici in tireociti maturi in grado di produrre ormoni tiroidei (82, 85).

La tiroide adulta è costituita da due tipi di cellule parenchimali che differiscono per funzioni e per derivazione embrionale: le cellule follicolari di derivazione endodermica e le cellule parafollicolari (PF), definite anche cellule C, che derivano dalla cresta neurale (86). Studi precedenti hanno dimostrato che SERT è espresso nella tiroide di diversi mammiferi nelle fasi dello sviluppo embrionale e nell'adulto, ma dati controversi riguardano il tipo cellulare che esprime SERT (32, 87-88). Mentre Russo e collaboratori (88) hanno dimostrato che le cellule parafollicolari esibiscono caratteristiche simili ai neuroni serotoninergici, effettuando la sintesi della serotonina e possedendo un attivo trasportatore, Tamir e collaboratori (87) non hanno riscontrato l'espressione di SERT nelle cellule parafollicolari. Entrambi, tuttavia, hanno individuato la presenza di mRNA codificante per SERT in cellule follicolari umane e nella linea cellulare di ratto FRTL-5, consentendo di formulare l'ipotesi che le cellule parafollicolari sintetizzano e immagazzinano serotonina, mentre le cellule follicolari ricaptano la serotonina mediante il suo trasportatore.

Numerosi studi evidenziano una stretta relazione tra il sistema serotoninergico e la funzionalità tiroidea. L'impiego di ormoni tiroidei per il

trattamento di disordini associati ad alterazioni del sistema serotoninergico è ampiamente diffuso (89-92). D'altronde numerose evidenze dimostrano che la funzionalità tiroidea ha effetti sul sistema serotoninergico nell'insorgenza di patologie psichiatriche (91-92)

La definizione del ruolo del sistema serotoninergico, in generale, e di SERT, in particolare, nello sviluppo tiroideo mediante modelli murini può risultare utile per la comprensione dell'eziologia di numerose patologie associate ad alterazioni della funzionalità tiroidea.

2. **SCOPO DELLA TESI**

Un importante combributo all'avanzamento delle conoscenze sul ruolo della serotonina nello sviluppo embrionale e nella fisio-patologia di organi e apparati nei mammiferi e nell'uomo è derivato da studi che hanno utilizzato modelli murini in cui è stato annullato un gene di un componente del sistema serotoninergico, quali, ad esempio, il gene codificante per uno specifico recettore, per il trasportatore SERT, o per un'enzima fondamentale per la biosintesi o la degradazione della serotonina (9, 23, 37, 44, 72).

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un modello murino di topi knock-in per SERT per studiare il ruolo del sistema serotoninergico in generale e quello del trasportatore SERT in particolare nello sviluppo embrionale di tre organi fondamentali: cuore, cervello e tiroide. Topi knock-in $SERT^{cre/+}$ che esprimono la ricombinase Cre sotto il controllo trascrizionale del promotore di SERT (93) sono stati incrociati con topi reporter del gene della beta-galattosidasi (ß-gal) (costrutto "loxp-stop-loxp-lacZ") controllato dal promotore costitutivo del gene ROSA26R (R26R) (94). La ricombinasi Cre elimina lo stop codon che precede il gene della ß-gal e ne attiva la trascrizione. In tal modo, la Cre attiva la ß-gal solo nelle cellule che esprimono SERT per cui tali cellule risultano colorate in blu in un saggio colorimetrico. Gli embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R sono stati utilizzati per l'analisi dell'espressione di SERT nello sviluppo embrionale di tre organi fondamentali: cuore, cervello e tiroide. L'analisi di "cell fate map" di SERT è stata effettuata dagli stadi embrionali più precoci (E8,5) fino all'età adulta (stadio post-natale P30). Esperimenti di ibridazione in situ hanno permesso di verificare che la colorazione dovuta all'attivazione della ß-gal nelle cellule che esprimono SERT corrisponde effettivamente all'espressione endogena del gene.

Al fine di chiarire il ruolo del trasportatore della serotonina nella morfogenesi e in patologie genetiche o acquisite degli organi studiati, è stata

effettuata la caratterizzazione del fenotipo delle cellule che esprimono SERT a vari stadi dello sviluppo embrionale e in età post-natale dei topi $SERT^{Cre/+}$;R26R. A tale scopo sono stati effettuati esperimenti di immunoistochimica utilizzando anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro noti marcatori molecolari di diversi tipi di cellule su sezioni di tessuti di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R precedentemente processati per la visualizzazione dell'attivazione della β-gal. Tale sperimentazione ha consentito, tra l'altro, di mettere in evidenza l'origine delle cellule che esprimono SERT a vari stadi dello sviluppo degli organi studiati.

Infine, allo scopo di delucidare il meccanismo molecolare con cui la serotonina provoca fibrosi cardiaca, sono stati generati topi nulli per SERT. L'analisi del fenotipo di tale modello (topi SERT-KO) non solo ha consentito di stabilire il meccanismo molecolare con cui l'alterazione dei livelli di serotonina dovuta all'annullamento del gene SERT provoca fibrosi cardiaca nel topo, ma ha evidenziato una correlazione tra il fenotipo cardiaco e la "sudden infant death syndrome" (SIDS), la cui etiologia finora era stata attribuita solo ad alterazioni del sistema serotoninergico del SNC (95).

I risultati ottenuti dallo studio forniscono un contributo all'avanzamento delle conoscenze sul ruolo fondamentale del trasportatore della serotonina SERT nella morfogenesi del cuore, del cervello e della tiroide, mettendo in evidenza ulteriori bersagli cellulari di sostanze d'abuso quali la cocaina ed altre droghe e dei farmaci SSRI che agiscono proprio sul trasportatore alterando l'omeostasi della serotonina (6-7, 31, 39, 60, 67). Inoltre, i risultati di questo lavoro di tesi consentono di comprendere meglio il ruolo della serotonina nella patogenesi di malattie congenite o acquisite che coinvolgono il cuore, il cervello o la tiroide, aprendo la stadra allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Infine, essi dimostrano l'utilità dei modelli murini utilizzati per studi volti ad investigare il ruolo del sistema serotoninergico nell'embriogenesi precoce.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Anticorpi

Anticorpi primari usati nello studio: anticorpo monoclonale anti-*Islet1* (*Isl1*) (clone 39.4D5, Developmental Hybridoma Bank); anticorpo monoclonale anti-γ-tubulina (T6557, Sigma); anticorpo monoclonale anti-α-"smooth muscle actin" (A5228, Sigma); anticorpo monoclonale anti-fosfo-ERK1/2 (M8159, Sigma); anticorpo policlonale anti-SERT (AB1594P, Chemicon International Inc.); anticorpo policlonale anti-"Connexin"43 (Cx43) (sc-9059, SantaCruz); anticorpo policlonale anti-5-HT2A (sc-50397, Santa Cruz); anticorpo policlonale anti-fosfo-SMAD2/3 (sc-133098, Santa Cruz); anticorpo policlonale anti-ERK1/2 (9PIV114, Promega). Gli anticorpi policlonali anti-Nkx2 e anti-Pax8 sono stati gentilmente forniti dal Prof. Roberto Di Lauro (Università di Napoli Federico II). *Anticorpi secondari:* anti-"rabbit" IgG-HRP (A-0545, Sigma); anti-"mouse" IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz); anti-"rabbit" biotinilato (BA-1000, Vector Laboratories); anti-"mouse" biotinilato (BA-2000, Vector Laboratories).

3.2 Modelli animali

Topi knock-in $SERT^{cre/+}$ generati da Zhang e collaboratori (93) sono stati gentilmente forniti dalla Prof. P. Gaspar (INSERM, Parigi, Francia). Questi topi sono stati incrociati con topi reporter R26R generati da Soriano (94). Gli embrioni dal genotipo $SERT^{Cre/+}$;R26R sono stati utilizzati per gli esperimenti di "cell fate map". Topi nulli per SERT (SERT-KO) sono stati generati incrociando maschi $SERT^{Cre/+}$ con femmine dello stesso genotipo. Mediante estrazione di DNA dalla coda dei topi e analisi del genotipo è stato possibile selezionare la progenie di topi in cui l'inserzione della Cre era presente in omozigosi con conseguente annullamento della funzionalità del gene SERT.

Le colonie delle diverse linee di topi sono state allevate presso lo stabulario del Centro di Biotecnologie dell'AORN "A. Cardarelli" di Napoli. Le procedure utilizzate nella sperimentazione animale coerenti alla normativa europea ed italiana sono state approvate dagli organi preposti.

3.3 Preparazione dei campioni

Embrioni $SERT^{Cre/+}$;R26R sono stati raccolti dallo stadio embrionale E8,5 allo stadio E18,5. Embrioni interi ("whole mount") o organi prelevati dagli embrioni (cuore, cervello e tiroide) sono stati dissezionati in PBS (80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 11,5 g/l Na_2HPO_4, 2 g/l KH_2PO_4) e fissati per 30 minuti in paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS. I campioni sono stati lavati per tre volte in PBS per 10 minuti e trattati con PBS/NonidetP40/sodio deossicolato per rendere permeabili al reattivo X-Gal i tessuti embrionali. Infine, i campioni sono stati trattati con il reattivo X-Gal secondo la procedura descritta da Ishibashi (96). L'attività della ß-gal è stata osservata dopo una notte di incubazione a 30°C su embrioni interi. I campioni dopo essere stati fissati in 4% paraformaldeide (PFA)/PBS e conservati in etanolo al 70% sono stati fotografati allo stereomicroscopio (Stemi 2000C, Zeiss).

Gli embrioni sono stati, quindi, sottoposti alla procedura che consente di analizzare la colorazione delle cellule interne del tessuto in esame. Gli embrioni e gli organi sono stati disidratati con etanolo, chiarificati in xilolo, inclusi in paraffina, tagliati al microtomo in sezioni di 10 µm coronali e sagittali e sono stati sottoposti a colorazione con Nuclear Fast Red (NFR) (Vector Laboratories) che colora i nuclei. Le sezioni istologiche sono state osservate al microscopio e fotografate.

3.4 Immunoistochimica

Per determinare il fenotipo delle cellule che esprimono SERT sono stati eseguiti esperimenti di immunoistochimica con marcatori molecolari specifici.

Per i cardiomiociti sono stati utilizzati l'anticorpo monoclonale anti-*Isl1* e l'anticorpo policlonale anti-Cx43, per le cellule follicolari della tiroide gli anticorpi policlonali anti-TTF1/*Nkx2.1* e anti-Pax8. E' stato, inoltre, usato l'anticorpo anti-SERT per valutare l'effettiva presenza della proteina nelle regioni degli organi che mostravano colorazione X-Gal.

Sezioni coronali di 10 μm di embrioni $SERT^{Cre/+}$; R26R, allo stadio E12,5 previamente processati con X-Gal, sono state deparaffinizzate in xilolo, idratate con passaggi successivi in etanolo, sottoposte a due lavaggi in PBS per 5 minuti ciascuno ed uno in PBS/Triton 0,2%. Successivamente, le sezioni sono state incubate in una soluzione di tampone Na-citrato 0,01M, pH 6,0. Dopo aver incubato i vetrini nel forno a microonde per 5 minuti, sono stati effettuati lavaggi in PBS da 5 minuti.A questo punto, nel caso d'impiego di anticorpi monoclonali, i vetrini sono stati incubati per 1 ora in "M.O.M. mouse Ig blocking reagent" (Vector Laboratories) in camera umida, lavati in PBS, incubati per 5 minuti in "M.O.M. diluent" e 30 minuti con l'anticorpo primario monoclonale opportunamente diluito in "M.O.M. diluent". Sono stati effettuati altri due lavaggi in PBS seguiti da un'incubazione per 10 minuti con "M.O.M. Biotinilated Anti-mouse IgG reagent" (Vector Laboratories). Dopo due lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 10 minuti con ABC reagent (VECTASTAIN elite ABC reagent, Vector Laboratories) e lavate in PBS. Nel caso, invece, d'impiego di anticorpi policlonali i vetrini sono stati incubati per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente con una soluzione di saturazione "hystoblock", incubati per una notte a 4°C con l'anticorpo primario policlonale opportunamente diluito in "hystoblock". Il giorno successivo sono stati effettuati due lavaggi in PBS/Triton 0,2% e uno in PBS seguiti da incubazione per 1 ora con l'anticorpo secondario diluito in "hystoblock" a temperatura ambiente. In seguito ad altri due lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 1 ora con ABC reagent a temperatura ambiente e lavate in PBS.

La colorazione è stata rilevata trattando le sezioni con una soluzione di 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories) per un tempo variabile da 2 a 10 minuti sino alla comparsa di una colorazione marrone. La reazione è stata interrotta con acqua e i vetrini sono stati contro-colorati con NFR come precedentemente descritto, montati con vetrini coprioggetto, osservati al microscopio e fotografati.

3.5 Ibridazione in situ

Esperimenti di ibridazione in situ sono stati condotti su sezioni coronali (7 µm) in paraffina di tessuti da embrioni di topi a stadi molto precoci di sviluppo, utilizzando sonde non radioattive per SERT. Sono state preparate sonde marcate mediante trascrizione inversa di cloni del cDNA di SERT utilizzando il kit DIG RNA Labeling (Roche).

Le sezioni di tessuto sono state deparaffinizzate in xilolo, idratate in soluzioni di dietil-pirocarbonato (DEPC) e etanolo, lavate in PBS/DEPC e fissate in 4% PFA/PBS/DEPC per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito, sono state lavate per due volte in PBS e trattate con una soluzione di 10 mg/ml di Proteinasi K in 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, e 1 mM EDTA per 6 minuti per denaturare il tessuto, rimuovere parte delle proteine e rendere più accessibile l'RNA messaggero. Dopo un lavaggio in PBS/DEPC e fissaggio in 4% PFA/PBS/DEPC per 30 minuti, sono stati effettuati due lavaggi in PBS/DEPC e due in tampone salino di citrato di sodio (SSC) contenente 150 mM NaCl, 15 mM Na-citrato, pH 7,0. Successivamente, è stata effetuata un'incubazione per 30 minuti in tampone Tris-Glicina seguita da una pre-ibridazione di 1 ora a 48°C con una soluzione di formammide al 40%, 5x SSC, 1x Denhart's, 100 mg/ml di DNA da sperma di salmone e 100 mg/ml di tRNA.

I vetrini sono stati, poi, incubati con la stessa soluzione usata nel passaggio precedente con l'aggiunta del "riboprobe" pre-riscaldato a 95°C

per 2 minuti e lasciati a 48°C in una stufa per tutta la notte. Il giorno successivo, i vetrini sono stati lavati in SSC a temperatura ambiente per 3 volte per 20 minuti, in SSC/formammide a 60°C per 40 minuti e raffreddati fino a 37°C. Successivamente, sono stati lavati con il tampone NTE (0.5 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0, 5 mM EDTA) a 37°C per 15 minuti, trattati con Rnasi A 10 mg/ml a 37°C per 30 minuti, lavati con NTE a 37°C per 15 minuti, in SSC 20% formammide a 60°C per 30 minuti e in SSC a temperatura ambiente per 30 minuti. I vetrini sono stati, poi, incubati in 1% "blocking reagent" (Roche) in 100 mM acido maleico, pH 7,5 e 150 mM NaCl per 10 minuti. E' stato aggiunto l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina, diluito 1:100 in 1% "blocking reagent" e incubato a 4°C per tutta la notte. Il terzo giorno, le sezioni sono state lavate con TBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 250 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,5, in un litro di acqua distillata) a temperatura ambiente per 4 volte per 10 minuti, lavate con 0,1% Tween 20 e 0,5 mg/ml levamisolo in acqua per 10 minuti. La colorazione è stata evidenziata con un substrato per la fosfatasi alcalina (BM Purple, Roche) a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione dopo una notte d'incubazione. Il giorno successivo, le sezioni sono state lavate in PBS, pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0, per 10 minuti, poi lavate in 0,1% Tween 20 in acqua ed, infine, sono state montate utilizzando un montante acquoso a base di glicerolo. I vetrini sono stati osservati al microscopio e fotografati.

3.6 Estrazione di RNA

Per valutare l'assenza dell'espressione del gene SERT nei topi $SERT^{Cre/Cre}$ è stato estratto l'RNA messaggero totale da tessuti di topi adulti wild-type (WT) e KO sul quale è stata, poi, effettuata la trascrizione inversa e la PCR con "primers" specifici per il cDNA di SERT.

I tessuti, congelati a -80°C dopo il prelievo, sono stati incubati con Trizol (1 ml/100 mg) per 5 minuti e cloroformio per 3 minuti a 30°C, e centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa ottenuta in seguito a centrifugazione è stata incubata con isopropanolo per 10 minuti a 30°C e centrifugata a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il precipitato di RNA ottenuto è stato lavato con etanolo al 75%, centrifugato a 10.000 rpm per 5 minuti a 4°C e incubato con acqua/DEPC per 10 minuti a 55-60°C.

La quantità di RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro (Biomate 3, Thermo Electron Corporation) utilizzando i valori di assorbanza a 260 e 280 nm. Per valutare il grado di purezza dell'RNA estratto, esso è stato caricato su un gel all'1% agarosio-formaldeide in condizioni denaturanti. Gli RNA ribosomiali (18S e 28S) apparivano chiaramente risolti indicando una buona qualità dell'RNA estratto.

3.7 RT-PCR e PCR

Il cDNA è stato sintetizzato mediante la metodica della Reverse Trascriptase (RT) utilizzando il kit Invitrogen (SUPER SCRIPT III First-strand Synthesis System for RT-PCR), che utilizza esameri "random" per ottenere copie di cDNA della maggioranza degli RNA messageri presenti nei tessuti analizzati.

Sono stati utilizzati 5 μg di RNA, 1 μl di "random examers" e 1 μl di deossinucleotiditrifosfati (dNTPs) 10 mM, in un volume di 10 μl. La miscela è stata incubata a 70°C per 5 minuti e a 4°C per 5 minuti. Contemporaneamente è stata preparata una miscela di reazione contenente: 2 μl di tampone 10X RT, 4 μl $MgCl_2$ 25mM, 2 μl ditiotreitolo (DTT) 0,1M, 1 μl RNase OUT (40 U/ μl), 1 μl SuperScript III RT (200 U/ μl).

L'RNA è stato aggiunto alla miscela di reazione che è stata incubata per 50 minuti a 42°C e a 70°C per 15 minuti . Il cDNA ottenuto è stato messo in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di 1 μl di RNasi H, il cDNA è stato incubato a 37°C

per 20 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato in parte conservato a -20°C, in parte utilizzato per le reazioni di PCR.

Sono state condotte due differenti reazioni di PCR usando la Platinum PCR supermix (Invitrogen) con i seguenti primers:

β-actina:

5'-GGCACCCAGCACAATGAAGAT-3' (senso)

5'-CCTTCACCGTTCCAGTTTTTA-3' (antisenso).

mSERT:

5'-CCTGCAGATCCATCAGTCAA-3' (senso)

5'-TATTGGAAAAGCCGGAGTTG-3' (antisenso).

Sono stati mescolati 45 μl di Platinum PCR Supermix (contenente complesso Taq DNA polimerasi con anticorpo Platinum Taq, Tris HCl 22 mM, pH 8,4, KCl 55 mM, $MgCl_2$ 1,65 mM, dGTP 220 μM, dATP 220 μM, dTTP 220 μM, dCTP 220 μM) con 3 μl di cDNA, 1 μl di primer senso ed 1 μl di primer antisenso.

Il programma di amplificazione utilizzato per entrambe le coppie di primers ha previsto una 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 55°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. Successivamente, esso è stato estratto dal gel, purificato e sequenziato.

3.8 Estrazione di proteine

Le proteine sono state estratte da tessuti prelevati dai topi aggiungendo 3 ml di tampone RIPA (PBS, 1% NP40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% sodio dodecil solfato) per grammo di tessuto contenente inibitori di proteasi e di fosfatasi. I campioni sono stati omogenati a 4°C, incubati per 30 minuti in ghiaccio e centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il sopranatante

contenente le proteine totali è stato recuperato e conservato a -80°C. Per la determinazione della concentrazione proteica è stato utilizzato il metodo Bradford (97). Sono state preparate diverse soluzioni a concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA) per ottenere una curva standard di riferimento. Da ciascuna diluizione sono stati prelevati 800 µl a cui sono stati aggiunti 200 µl del reagente colorante di Bradford. Le soluzioni sono state trasferite in cuvette in plastica ed è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro (Cary-1, Varian) a 595 nm. I campioni di proteine estratte dai tessuti sono stati diluiti 1:200 in una soluzione contenente colorante di Bradfored è stata misurata l'assorbanza. La concentrazione di proteine del campione è stata determinata utilizzando la curva di taratura della BSA.

3.9 Elettroforesi SDS-PAGE

I campioni contenenti uguali quantità di proteine totali sono stati bolliti per cinque minuti in un tampone ("sample buffer") contenente 50 mmol Tris-HCl, pH 6,8, 2% sodio dodecil solfato (SDS), 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5% β-mercaptoetanolo. Successivamente, i campioni sono stati caricati mediante una siringa Hamilton sul gel di poliacrilammide posto in una cameretta per elettroforesi (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 ("*stacking gel"*) al 4% di poliacrilammide che ha la funzione di impaccare le proteine contenute in ciascun campione in una sottile banda prima che esse entrino nel gel di separazione ("*running gel"*). Una volta caricati i campioni la camera elettroforetica è stata collegata ad un alimentatore di corrente elettrica. La corsa elettroforetica è terminata quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel di separazione.

3.10 Western blotting

Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando una cameretta di trasferimento "trans-blot" (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.

Il filtro è stato saturato 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 l'incubazione, il filtro è stato lavato in TBS-T ed incubato per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo specifico opportunamente diluito in TBS-T, in presenza di latte disidratato al 2,5%. Successivamente sono stati effettuati lavaggi in TBS-T ed un'incubazione per 1 ora con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi, opportunamente diluito in TBS-T, in presenza di latte disidratato al 2,5%. La proteina specifica è stata visualizzata mediante il metodo della chemiluminescenza (ECL).

I filtri, una volta visualizzata la proteina mediante ECL, sono stati sottoposti alla procedura di "stripping" mediante la quale si ha l'allontanamento degli anticorpi primario e secondario usati nel precedente blot permettendo, quindi, l'esecuzione di un nuovo Western blotting sullo stesso filtro al fine di visualizzare una diversa proteina. Lo "stripping" è stato eseguito immergendo il filtro nella soluzione di "stripping" (100 mM β-mercaptoetanolo, 2% SDS, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8) per 20 minuti a 50-60°C. Il filtro, successivamente, è stato lavato abbondantemente con una soluzione tampone e sullo stesso è stato effettuato un nuovo Western blotting. La procedura di "stripping" è stata utilizzata per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali.

3.11 "Trichrome stain" (Masson) assay

Per l'analisi del fenotipo fibrotico di topi KO per SERT nella regione cardiaca, è stata usato un kit (Sigma) per la colorazione istologica, che consente di distinguere il collagene dalle fibre muscolari. La colorazione tricromica è data dal "Weigert's Iron Hematoxilyn", che colora i nuclei di verde, il "Beibrich scarlet-acid fuchsin", che colora il citoplasma e le fibre muscolari di rosso, e l'"Aniline blue" che colora il collagene di blu. Tale colorazione è stata effettuata su sezioni di cuore incluse in paraffina, tagliate in sezioni di 10 μm, allo stadio post-natale P6.

Prima di effettuare la colorazione, le sezioni sono state deparaffinizzate mediante 2 passaggi in xilolo e idratate con diversi passaggi in etanolo dal 100% al 70%. Dopo un rapido lavaggio in acqua distillata le sezioni sono state incubate in Bouin's solution per 15 minuti a 56°C, in acqua per 5 minuti e successivamente in "Weigert's Iron Hematoxilyn solution" per altri 5 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio in acqua distillata, le sezioni sono state immerse in "Briebric-Scarlet-Acid Fuching solution" per 5 minuti. Dopo i lavaggi in acqua distillata e il passaggio delle sezioni nella soluzione composta da acido fosfotungstico e molibdico per 5 minuti, le sezioni sono state immerse in "Aniline Blue solution" per 5 minuti ed in acido acetico al 2% per 2 minuti. Dopo il lavaggio in acqua distillata sono stati effettuati passaggi a ritroso dall'etanolo al 70% fino allo xilolo. Infine, le sezioni sono state montate con Eukitt, osservate al microscopio e fotografate.

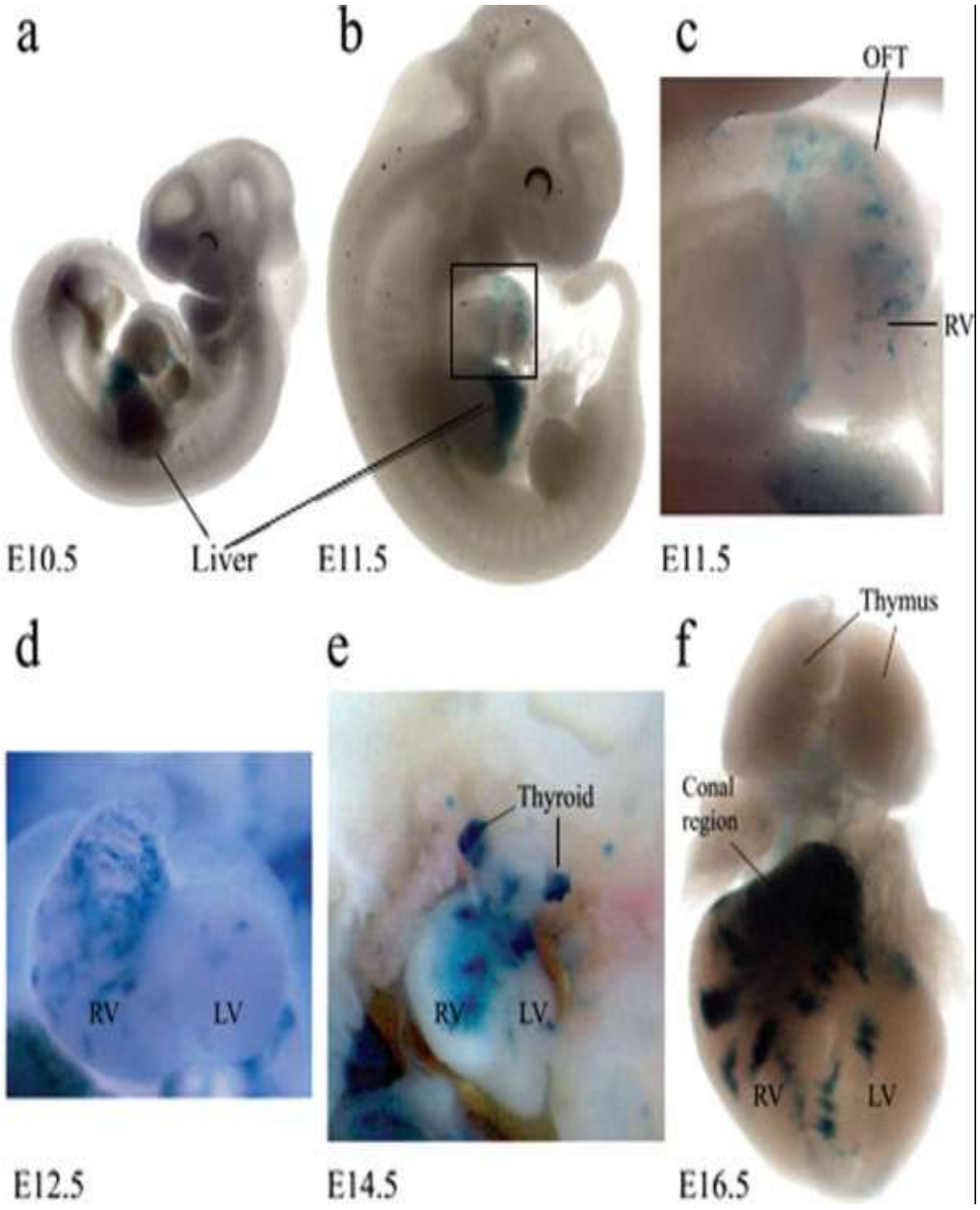
4.RISULTATI

4.1 Localizzazione e caratterizzazione delle cellule cardiache che esprimono SERT nello sviluppo embrionale del topo

Embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R sono stati trattati con X-Gal per evidenziare l'espressione della ß-gal indotta dalla Cre. Agli stadi embrionali E8,5 ed E9,5 non è stata riscontrata alcuna colorazione, mentre l'espressione della ß-gal è stata osservata per la prima volta allo stadio E10.5 nella regione del tratto di efflusso del cuore (OFT) (Figurea 5a). Un gruppo di cellule endoteliali del tronco arterioso dell'OFT è risultato positivo alla colorazione (Figura 6a-b), che ha evidenziato numerose strutture filamentose (Figura 6a-b) suggerendo una possibile origine neurale di tali cellule. Le cellule X-Gal positive mostrano la morfologia di cardiomiociti (Figura 6c-e). Risultano intensamente positive numerose cellule dei cuscinetti atrioventricolari del cuore (Figura 6c-d), mentre il sacco aortico risulta negativo. In generale, l'osservazione del cuore allo stadio E10,5 mostra un'estesa espressione di SERT in diverse regioni quali l'OFT e i cuscinetti atrioventricolari e in numerosi tipi di cellule cardiache quali le cellule endoteliali e cellule della cresta neurale.

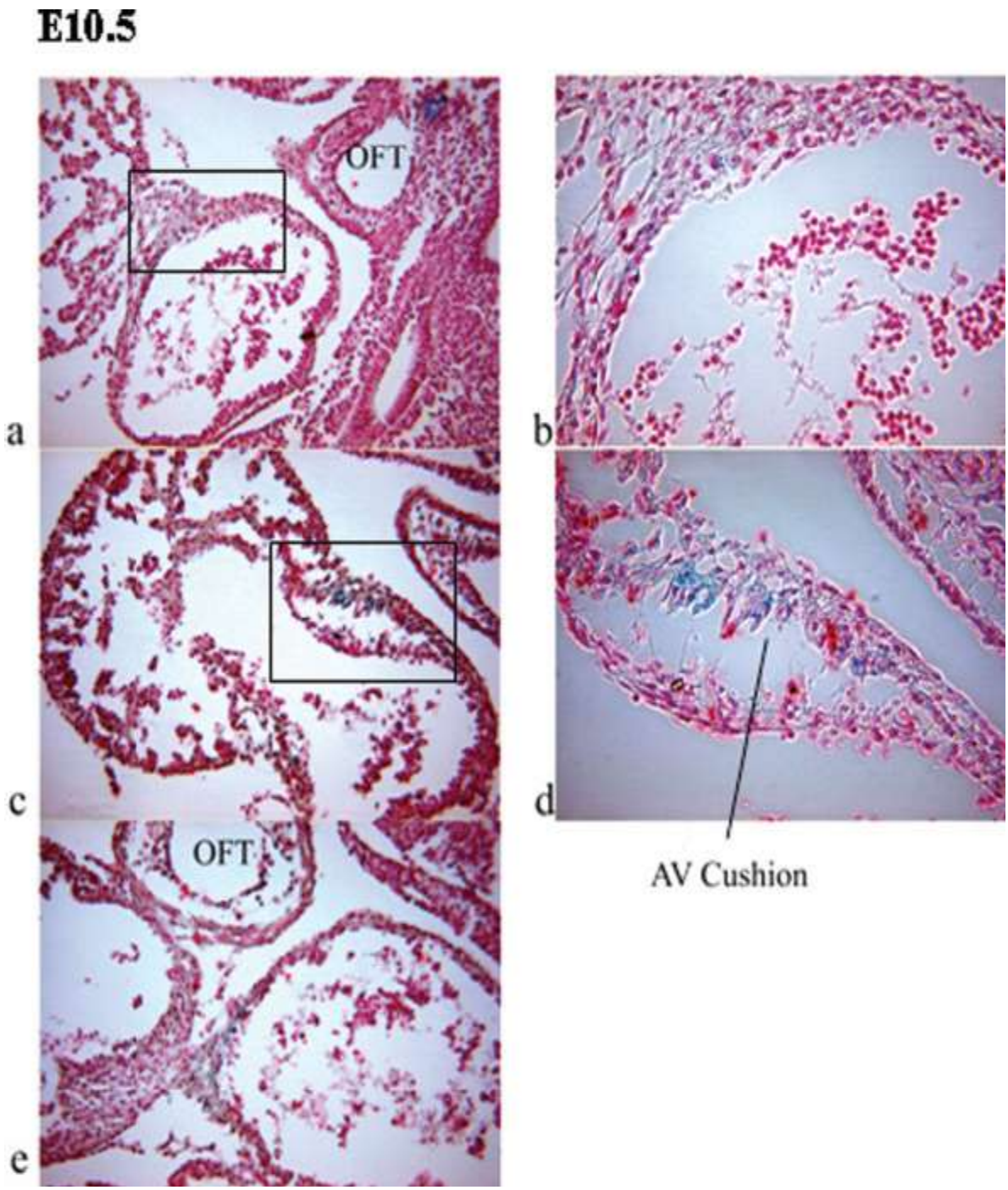
Allo stadio E11,5, la colorazione dell'OFT è risultata più intensa ed estesa di quella rilevata allo stadio E10,5 (Figura 5a). Allo stadio E12,5 sono state evidenziate cellule positive localizzate nel ventricolo destro (RV) e nell'OFT. Tali cellule risultano colorate molto intensamente facendo parte della cavità esterna del RV colorato fortemente in blu (Figura 5d). Un ristrettissimo gruppo di cellule coloratesono state evidenziate nel ventricolo sinistro (LV). Le sezioni istologiche evidenziano una colorazione delle valvole semilunari e atrioventricolari e della regione conale (Figura 7a-d).

Figura 5



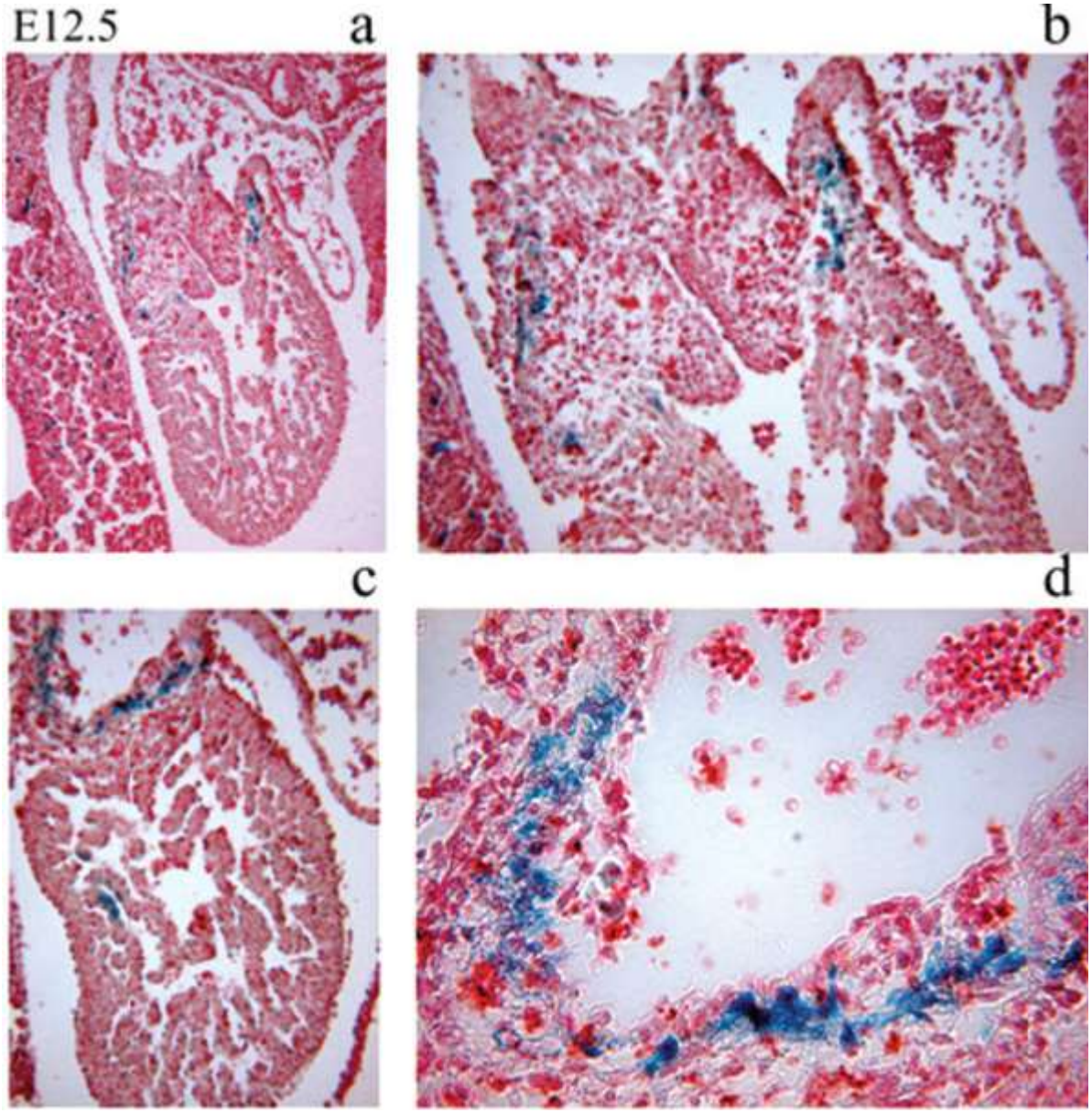
Espressione del gene SERT nel cuore di embrione di topo. Colorazione di embrioni interi ("whole mounts") di topi agli stadi E10,5, E11,5, E12,5, E14,5 ed E E16,5. (**a**) e (**b**) espressione di SERT nell'OFT del cuore rispettivamente allo stadio E10,5 ed E11,5. Anche il fegato ("Liver") appare colorato. (**c**) ingrandimento della regione del cuore allo stadio E11,5 mostrato in (b). (**d**) espressione di SERT nel RV allo stadio E12,5. (**e**) intensa colorazione del RV allo stadio E14,5. La tiroide ("Thyroid") appare intensamente colorata. (**f**) specifica colorazione della regione conale ("Conal region") e del RV a E16,5. Il timo ("Thymus") non risulta positivo. OFT, tratto di efflusso del cuore; RV, ventricolo destro; LV, ventricolo sinistro.

Figura 6



Sezioni sagittali del cuore di embrione di topo allo stadio E10,5. (**a**) positività in un gruppo di cellule endoteliali del tronco arterioso dell'OFT. (**b**) ingrandimento del riquadro indicato in (a) con numerose strutture filamentose positive nella regione atrioventricolare. (**c**) e (**e**) cellule miocardiche positive localizzate tra le due camere cardiache. (**d**) ingrandimento del riquadro indicato in (c). OFT, tratto di efflusso del cuore, AV atrioventricolare.

Figura 7



Sezioni coronali del cuore di embrione di topo allo stadio E12,5. (**a**) cellule positive circondano le strutture valvolari. (**b**) ingrandimento di una parte di (a). (**c**) forte positività nella regione conale. (**d**) ingrandimento di un particolare in (c).

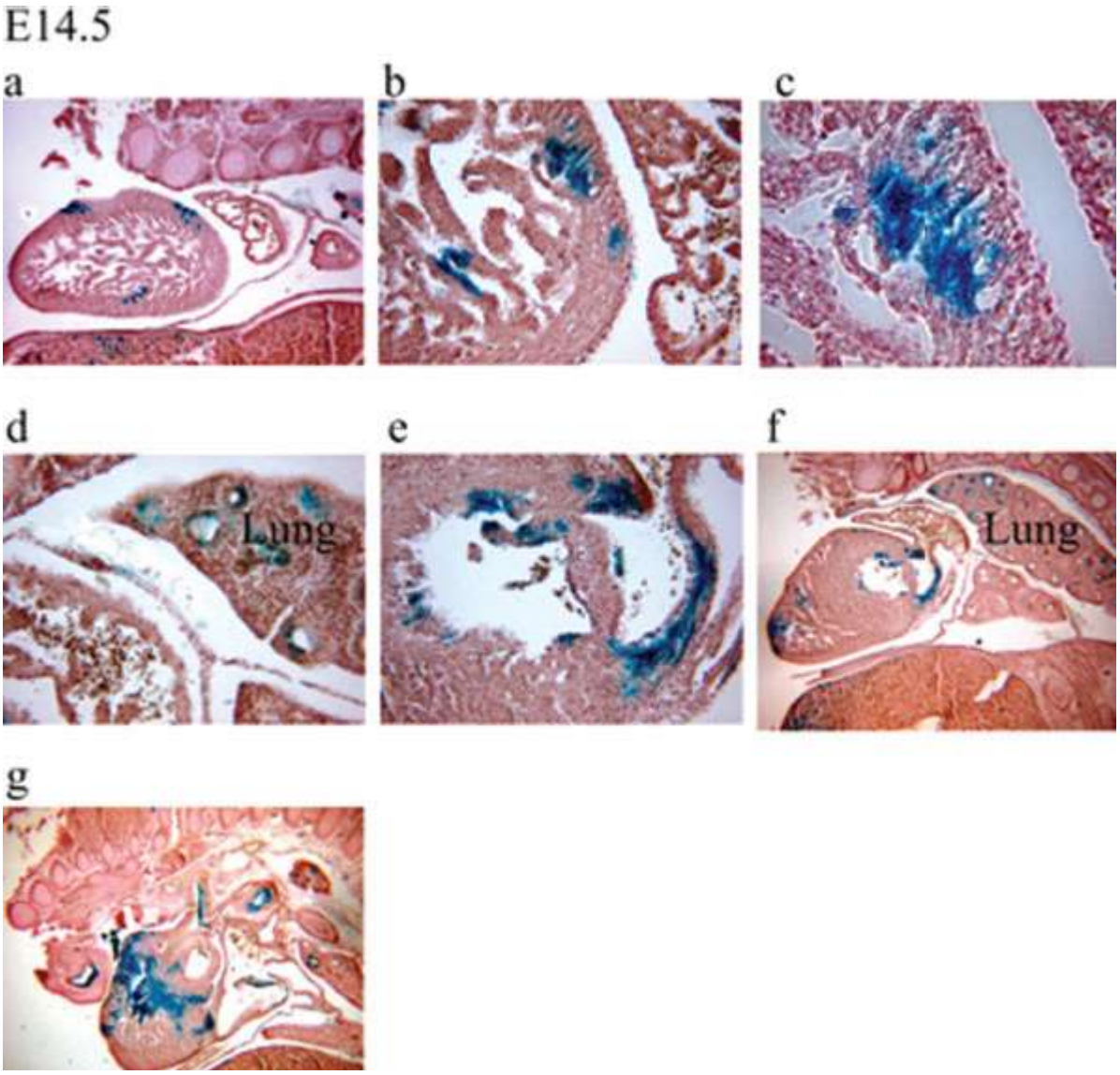
Allo stadio E14,5, il lato anteriore del RV è intensamente colorato, in particolare nella regione conale (Figure 5e, 8a,g) e nella regione all'origine dell'aorta e del tronco polmonare. Le sezioni istologiche hanno evidenziato nel RV cellule positive con una morfologia tipica di fibroblasti o cardiomiociti (Figura 8b,f). Risultano positive anche numerose cellule endoteliali nella membrana pericardica (Figura 8d) e nella regione conale (Figura 8e,f).

Allo stadio E16,5, cellule endoteliali e miocardiche che rivestono il lume del RV mostrano una forte positività (Figure 5f e 9a-f). Una colorazione positiva è stata osservata nei foglietti della valvola atrio-ventricolare sinistra (mitrale) (Figura 9g-i), nella valvola atrio-ventricolare destra (tricuspide) (Figura 9 l-n), così come nei foglietti della valvola polmonare (Figura 9c-e). La localizzazione di SERT in queste aree fornisce la spiegazione delle valvulopatie osservate nei topi nulli per SERT (72).

Allo stadio E18,5, la colorazione con X-Gal sul cuore intero ha evidenziato una marcata espressione di SERT nel RV, nella regione conale e nei vasi del cuore e l'assenza totale di SERT nel lume del LV (Figura 10a-c). La colorazione sia del cuore intero che delle sezioni del cuore di un embrione allo stadio E18,5 mostra l'espressione del gene SERT nel RV e nella regione conale (Figura 10 D-F), nel setto atriale e nelle valvole ventricolari cardiache (Figura 10 G-H,) e nel nodo sinoatriale del sistema di conduzione del cuore (Figura 10 I-J). Questi dati suggeriscono un ruolo fondamentale di SERT nei siti del cuore dove risulta fortemente espresso.

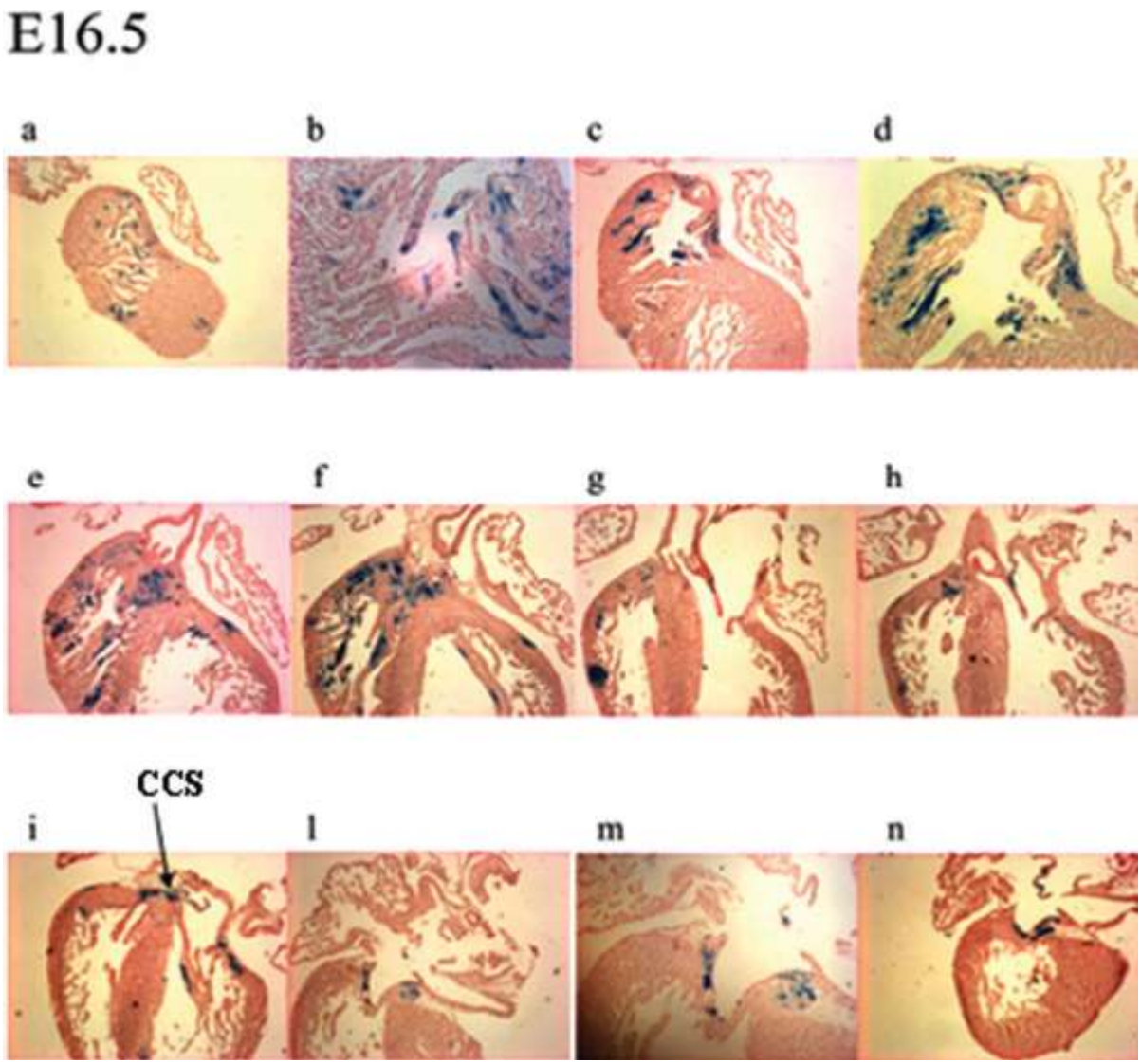
Allo scopo di verificare che il profilo di colorazione coincidesse con l'espressione endogena di SERT sono stati eseguiti esperimenti di ibridazione in situ su sezioni di embrioni allo stadio E12,5. I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di mRNA di SERT nelle stesse regioni del cuore positive alla colorazione per la ß-gal. Il segnale appare specifico nelle trabecole, nelle cellule alla base del tronco polmonare e nella regione conale del cuore (Figura 11).

Figura 8



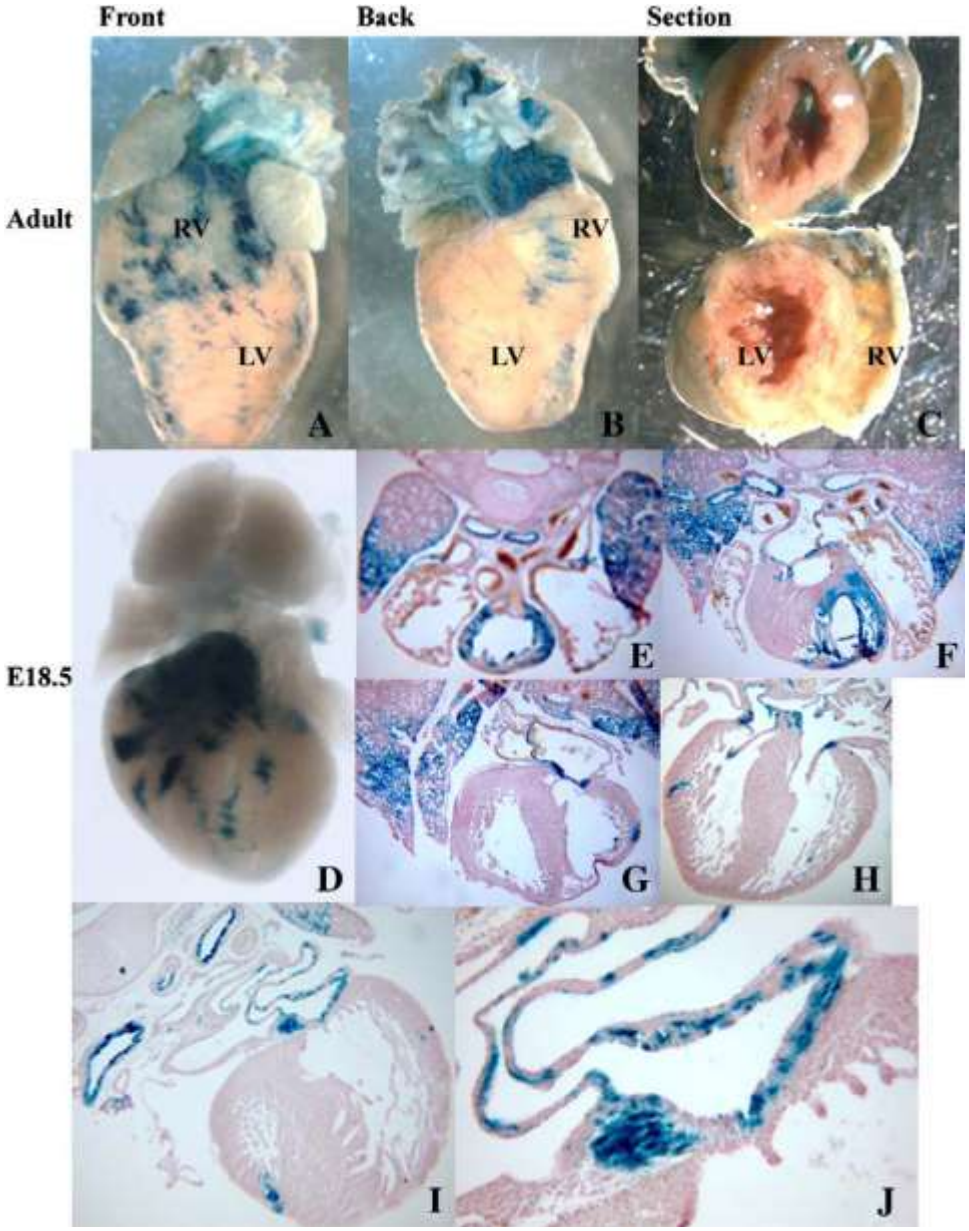
Sezioni sagittali del cuore di embrione di topo allo stadio E14,5. (**a**) e (**b**) positività di cellule simili a fibroblasti in specifici siti della regione ventricolare. (**c**) ingrandimento di un particolare di (b). (**d**) positività in cellule endoteliali della membrana pericardica. (**e**) e (**f**) due diversi ingrandimenti della regione conale con forte positività. (**g**) positività in cellule miocardiche del ventricolo destro. In (d) e (f) anche i polmoni ("Lung") appaiono colorati.

Figura 9



Sezioni coronali di cuore di embrioni di topo allo stadio E16,5. (**a-f**) forte positività in gruppi di cellule endoteliali e miocardiche nel RV; (c), (d) ed (e) cospicuo numero di cellule positive intorno all'origine della valvola polmonare. (**g-i**) positività nei foglietti della valvola atrio-ventricolare sinistra (mitrale); (i) positività anche nel sistema di conduzione cardiaco. (**l-n**) positività nella valvola atrio-ventricolare destra (tricuspide). RV, ventricolo destro; CCS, sistema di conduzione cardiaco.

Figura 10



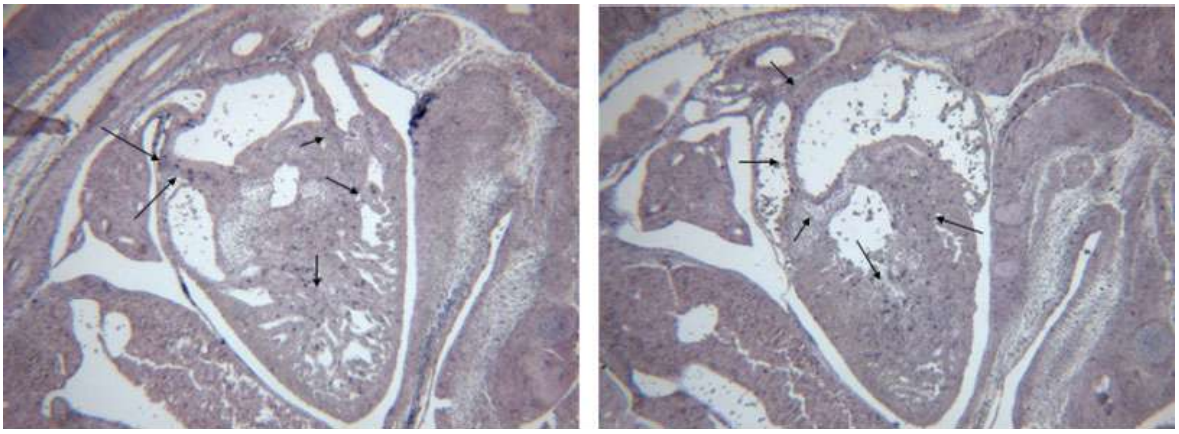
Espressione di SERT nel cuore di embrioni allo stadio E18,5 e topi adulti SERT$^{Cre/+}$;R26R. (**A, B**) Colorazione LacZ nel ventricolo destro (RV) e nella regione conale del cuore di topo adulto intero. Gli atri e il ventricolo sinistro (LV) risultano negativi mentre i vasi appaiono positivi. (**C**) Assenza di colorazione nel lume del LV e una marcata positività all'interno del RV in una sezione del cuore intero adulto. (**D**) Intensa positività nella regione del RV del cuore intero dell'embrione. (**E, F**) Sezioni coronali di cuore con forte positività nella regione ventricolare destra e nella regione conale. (**G**) Positività nel setto atriale. (**H**) Colorazione dei foglietti della valvola atrioventricolare sinistra (mitrale) e destra (tricuspide). (**I**) Marcata colorazione nel nodo sinoatriale del sistema di conduzione cardiaco. (**J**) ingrandimento del nodo sinoatriale.

Tali risultati sono in accordo con quanto precedentemente dimostrato su sezioni di cervello di embrioni di topo (93).

Il fenotipo delle cellule che esprimono SERT nel cuore di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R è stato determinato allo stadio embrionale E11,5 usando il marcatore molecolare dei cardiomiociti *Islet1* (*Isl1*). *Isl1* marca le cellule progenitrici che contribuiscono allo sviluppo embrionale del cuore, tra cui le cellule dell'OFT, del RV, di entrambi gli atri e di un ristretto numero di cellule presenti nel LV (98-99). Le cellule progenitrici che esprimono *Isl1* appartengono al "secondary heart field" (SHF); *Isl1* è necessario per la loro sopravvivenza, proliferazione e migrazione. Dal momento che la sua espressione marca cellule progenitrici differenziate e indifferenziate, *Isl1* rappresenta un eccellente marcatore di cellule cardiache mesodermiche durante l'embriogenesi. Esso è anche un marcatore per progenitori di cellule staminali cardiache (100).

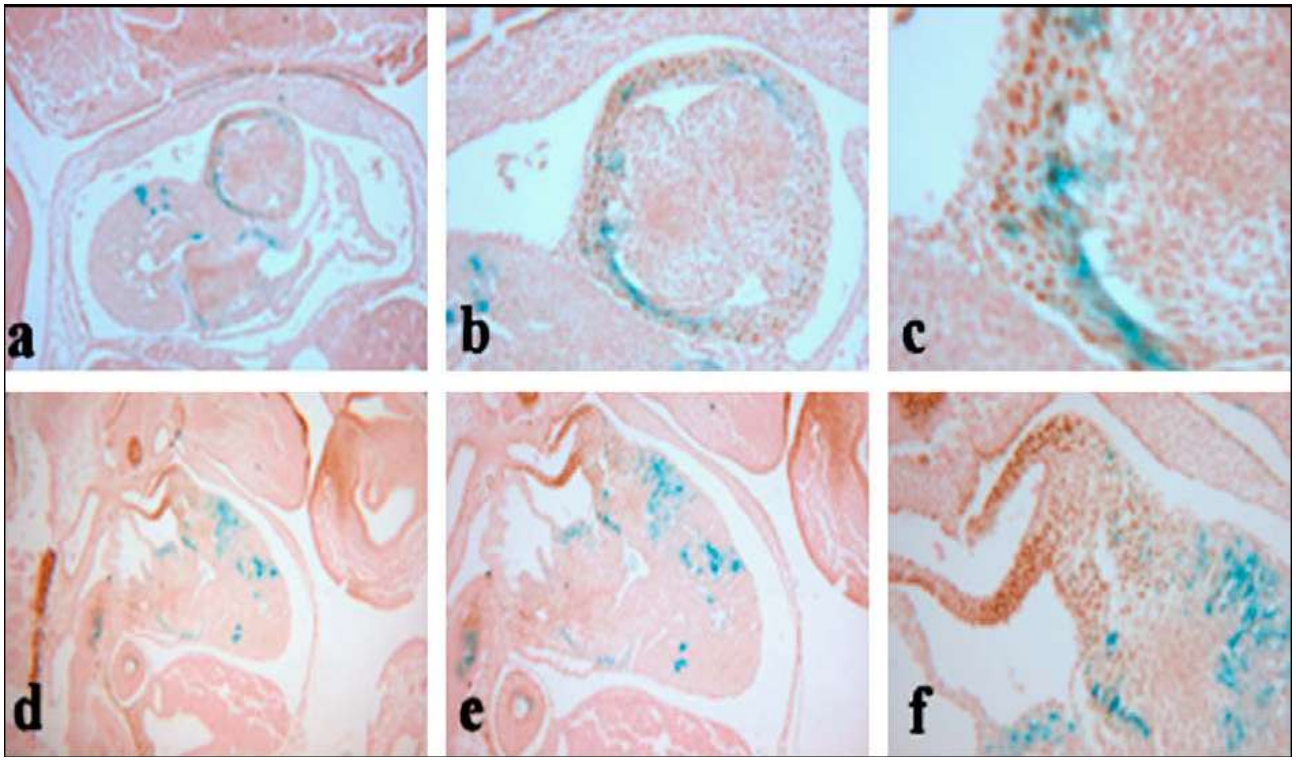
Esperimenti di immunoistochimica per *Isl1* eseguiti su sezioni coronali di cuori da embrioni di topi $SERT^{CRE/+}$;R26R allo stadio E11,5, colorati con X-Gal, evidenziano la colocalizzazione di SERT e *Isl1* nelle cellule dell'OFT, del RV e della regione conale (Figura 12a-f). Questi risultati dimostrano che le cellule che esprimono SERT in queste regioni del cuore sono cardiomiociti derivanti dal SHF, indicando ciò che tale linea cellulare non svolge solo un ruolo morfogenetico ma anche fisiologico nell'apparato cardiovascolare. L'analisi immunoistochimica effettuata mediante l'utilizzo del marcatore per i cardiomiociti Cx43 su sezioni coronali di cuore di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R colorati con X-Gal allo stadio E12.5 mostra la colocalizzazione di SERT e Cx43 nelle cellule delle valvole atrio-ventricolari (Figura 13a-d). In particolare, le cellule che esprimono SERT e Cx43 appaiono localizzate nell'area miocardica delle valvole atrio-venticolari e non in quella endocardica (Figura 13 c-d).

Figura 11



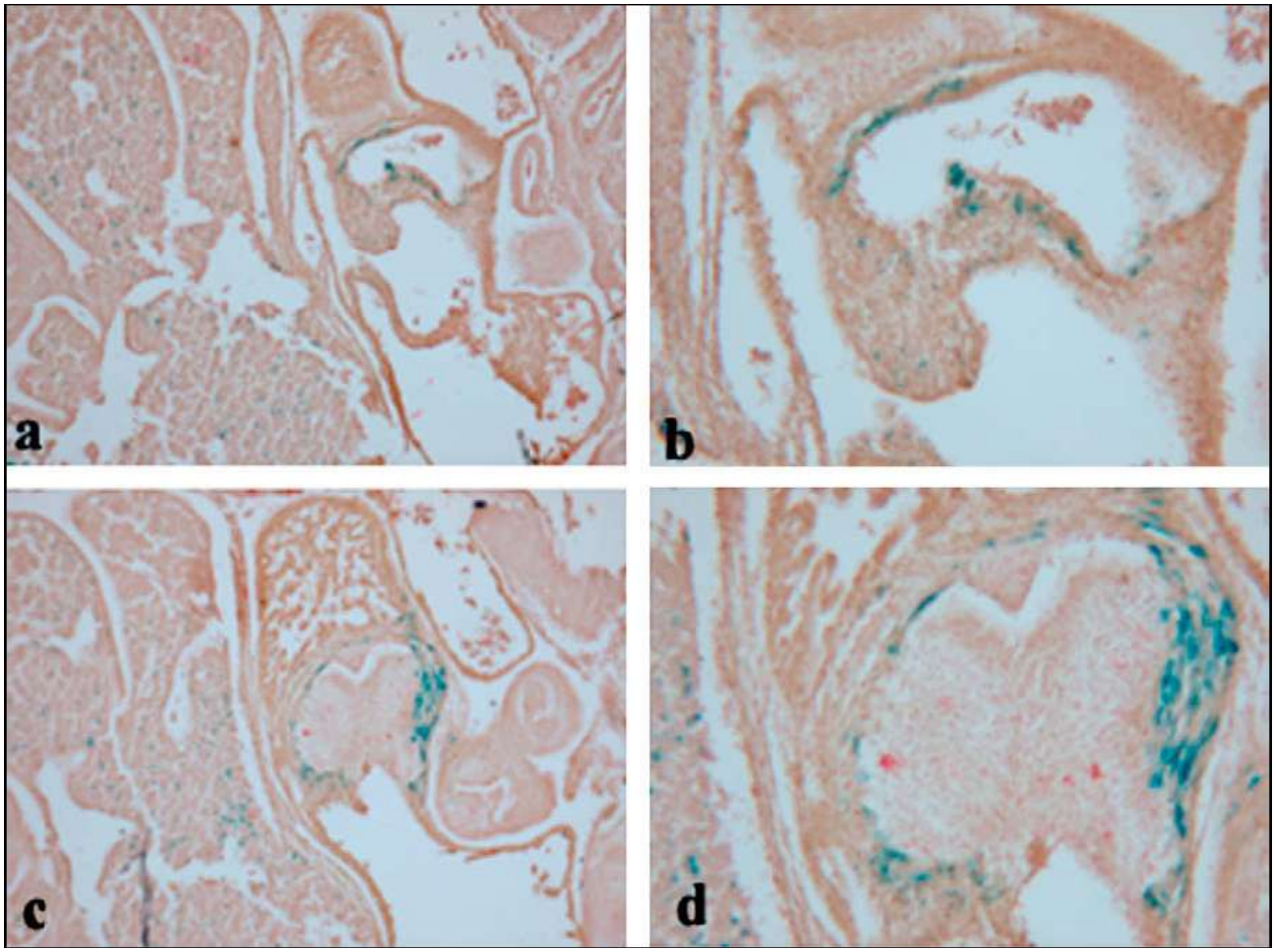
Ibridazione in situ su due sezioni in paraffina di un embrione di topo SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E12,5. L'espressione di mRNA di SERT è visibile nelle trabecole, nelle cellule alla base del tronco polmonare e nella regione conale del cuore. Le regioni positive sono indicate dalle frecce.

Figura 12



Co-localizzazione di SERT e *Islet1* (*Isl1*) nel cuore di embrione di topo SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E11,5. Immunoistochimica per *Isl1* su sezioni coronali di cuori di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E11,5 previamente colorati con X-Gal. (**a**) co-localizzazione di SERT e *Isl1* nel tratto di effuso del cuore. (**b**) ingrandimento di (a). (**c**) ingrandimento di (b). (**d**) co-localizzazione di SERT e I*sl1* nel ventricolo destro. (**e**) ingrandimento di (d). (**f**) ingrandimento di (e).

Figura 13



Co-localizzazione di SERT e connexina 43 (Cx43) nel cuore di embrione di topo SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E12,5. Immunoistochimica per la connexina 43 (Cx43) su sezioni coronali di embrioni SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E12,5 previamente colorati con X-Gal. (**a**) co-localizzazione di SERT e Cx43 nelle valvole atrioventricolari. (**b**) ingrandimento di (a). (**c**) co-localizzazione di SERT e Cx43 nell'area miocardica delle valvole atrioventricolari. (**d**) ingrandimento di (c).

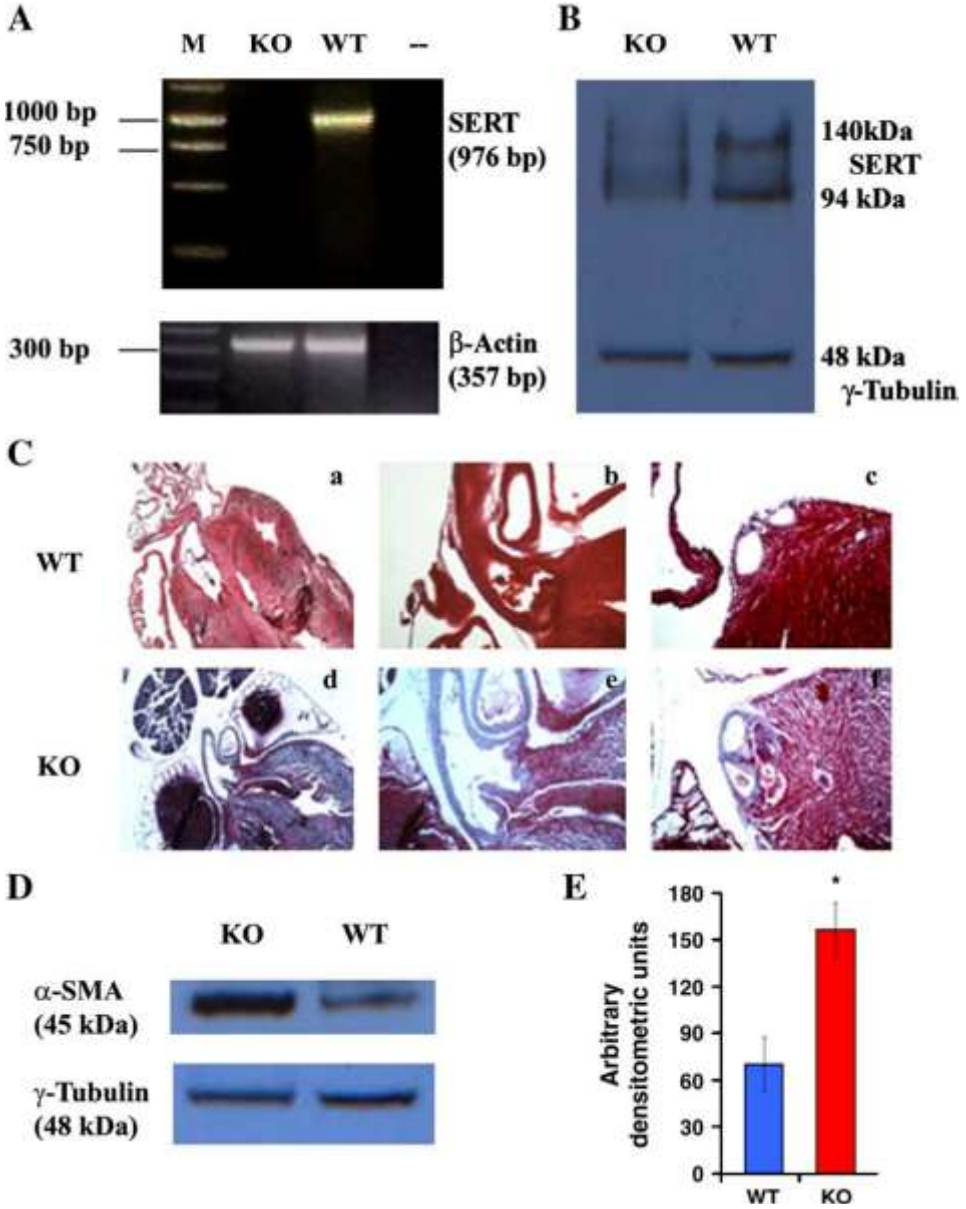
Questi risultati dimostrano che le cellule che esprimono SERT in specifiche regioni del cuore durante lo sviluppo, sin dalle fasi più precoci, sono cardiomiociti.

4.2 Produzione di topi SERT-KO e caratterizzazione del fenotipo

Allo scopo di chiarire il ruolo funzionale di SERT nello sviluppo del cuore, sono stati generati topi KO per SERT, incrociando maschi $SERT^{Cre/+}$ con femmine dello stesso genotipo. L'assenza del gene SERT nei topi KO è stata verificata mediante esperimenti di RT-PCR e Western blotting effettuati su campioni di cuore raccolti da embrioni di topo WT e $SERT^{Cre/Cre}$ allo stadio E18,5. I risultati dell'analisi di RT-PCR mostrano che l'mRNA di SERT è sintetizzato solo nel cuore degli animali WT. L'analisi del cDNA mostra l'amplificazione di uno specifico frammento di 976 bp nel tessuto di cuore dei topi WT, mentre non risulta presente alcun trascritto di mRNA per SERT nel cuore di topi SERT-KO (Figura 14, pannello A). Un trascritto di 357 bp è stato ottenuto dall'amplificazione della ß-actina (controllo interno) in tutti i campioni, sia WT che SERT-KO (Figura 14, pannello A, blot in basso).

L'analisi di Western blotting eseguita su campione di cuori WT e SERT-KO di embrioni di topo allo stadio E18,5 mostra che la proteina SERT è espressa solo nel cuore dei topi WT. Il profilo elettroforetico dei campioni di cuore degli embrioni WT, ottenuto mediante l'impiego di uno specifico anticorpo policlonale in grado di riconoscere una sequenza peptidica di 15 amminoacidi tra i domini transmembrana 7 e 8 di SERT, mostra due bande principali con peso molecolare di circa 94 e 140 KDa, probabilmente corrispondenti a due isoforme di SERT differentemente glicosilate (4). Al contrario, nei tessuti prelevati da topi $SERT^{Cre/Cre}$ la proteina non risulta presente (Figura 14, pannello B, blot in alto). Lo "stripping" del filtro e il successivo trattamento con l'anticorpo monoclonale anti-γ-tubulina dimostra

Figura 14



(**A-B**) **Espressione dell'mRNA di SERT nel cuore di embrioni di topi WT e KO allo stadio E18,5.** (A) RT-PCR. Presenza di trascritti (976 bp) nel cuore di embrioni di topi WT; assenza di trascritti nel cuore di embrioni SERT-KO. In basso, trascritti dell'mRNA della ß-actina (controllo interno) nel cuore di embrioni WT e SERT-KO. (B) Western blotting. Assenza di espressione della proteina SERT nel tessuto cardiaco dei topi SERT-KO; presenza della proteina nel tessuto cardiaco degli embrioni di topi WT.

(**C**) **Colorazione tricromica di Masson di cuori di embrioni di topi WT e SERT-KO allo stadio E18,5.** Marcato accumulo di collagene nel miocardio (**a, d**), nelle regioni cardiache valvolari (**b, e**) e perivascolari (**c, f**) dei topi SERT-KO rispetto ai topi WT .

(**D-E**) **Espressione di α-SMA nel cuore di topi SERT-KO e WT allo stadio E18,5.** (D) Western blotting. Livelli di espressione della proteina α-SMA superiori nei topi SERT-KO rispetto ai WT. (E) Analisi densitometrica delle bande del blot in (E).

che è stata caricata la stessa quantità di proteine in tutti i campioni (Figura 14, pannello B, blot in basso). Risultati simili sono stati ottenuti da esperimenti di RT-PCR e Western blotting eseguiti su campioni di cuore prelevati da topi $SERT^{Cre/Cre}$ deceduti nella prima settimana di vita e campioni prelevati da topi WT sopravvissuti ma sacrificati allo stesso stadio post-natale dei topi SERT-KO morti .

Questi risultati dimostrano che l'inserzione della ricombinasi Cre nel secondo esone del gene di SERT produce un allele nullo e che i topi $SERT^{Cre/Cre}$ usati nel nostro studio sono privi di SERT. Il risultato, però, maggiormente interessante è che i topi SERT-KO sono soggetti a una morte neonatale improvvisa. E' stata osservata, infatti, una morte prematura nel 75% dei topi SERT-KO entro la prima settimana di vita. Mentre tutti i topi WT sopravvivono, 90 topi SERT-KO sono morti nella prima settimana dopo la nascita e solo 30 dei 120 topi SERT-KO ottenuti sono sopravvissuti. Questi ultimi, probabilmente, sopravvivono grazie a processi compensativi che prevengono gli effetti dovuti alla mancata attività di SERT.

I topi SERT-KO e WT non differiscono per il peso corporeo, per il peso del cuore e per il rapporto tra peso corporeo e il peso del cuore. Macroscopicamente non si osservano anomalie morfologiche nei topi SERT-KO rispetto ai topi WT. Tuttavia, l'analisi istologica di sezioni di cuore dei topi SERT-KO ha mostrato la presenza di fibrosi. La colorazione tricomica di Masson su sezioni di cuore di embrioni SERT-KO allo stadio E18,5 ha mostrato un aumento di accumulo di collagene nel miocardio e nelle regioni valvolari e perivascolari del cuore che non si osserva, invece, nei cuori di embrioni di topi WT (Figura 14, pannello C). In particolare, nelle regioni valvolari del cuore dei topi SERT-KO è stato riscontrato un marcato accumulo di collagene nei foglietti valvolari.

Il fenotipo fibrotico dei topi SERT-KO è stato confermato anche confrontando i livelli di espressione di α-SMA del cuore dei topi SERT-KO

rispetto a quelli dei topi WT. L'aumento di espressione di α-SMA è generalmente usato come marcatore di differenziamento dei fibroblasti cardiaci in miofibroblasti (101). Omogenati di cuori prelevati da embrioni di topi SERT-KO e WT allo stadio E18,5 sono stati sottoposti a SDS-PAGE elettroforesi e Western blottting, utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la regione NH_2-terminale dell'actina. Una banda relativa ad una proteina dal peso molecolare corrispondente a quello dell' α-SMA dei mammiferi (45 KDa) è stata osservata in tutti i campioni. La proteina è risultata, tuttavia, maggiormente espressa nel cuore dei topi SERT-KO rispetto ai topi WT (Figura 14 pannello E). Lo "stripping" del filtro e il trattamento successivo con l'anticorpo monoclonale anti-γ-tubulina ha dimostrato che la stessa quantità di proteine è stata caricata in tutti i campioni (Figura 14, pannello D,blot in basso). Risultati simili sono stati ottenuti da esperimenti di Masson e Western blotting eseguiti su campioni di cuore prelevati da topi $SERT^{Cre/Cre}$ morti nella prima settimana post-natale e WT sopravvissuti ma sacrificati allo stesso stadio post-natale dei topi KO deceduti.

4.3 Analisi del meccanismo molecolare con cui l'annullamento del gene SERT provoca fibrosi cardiaca

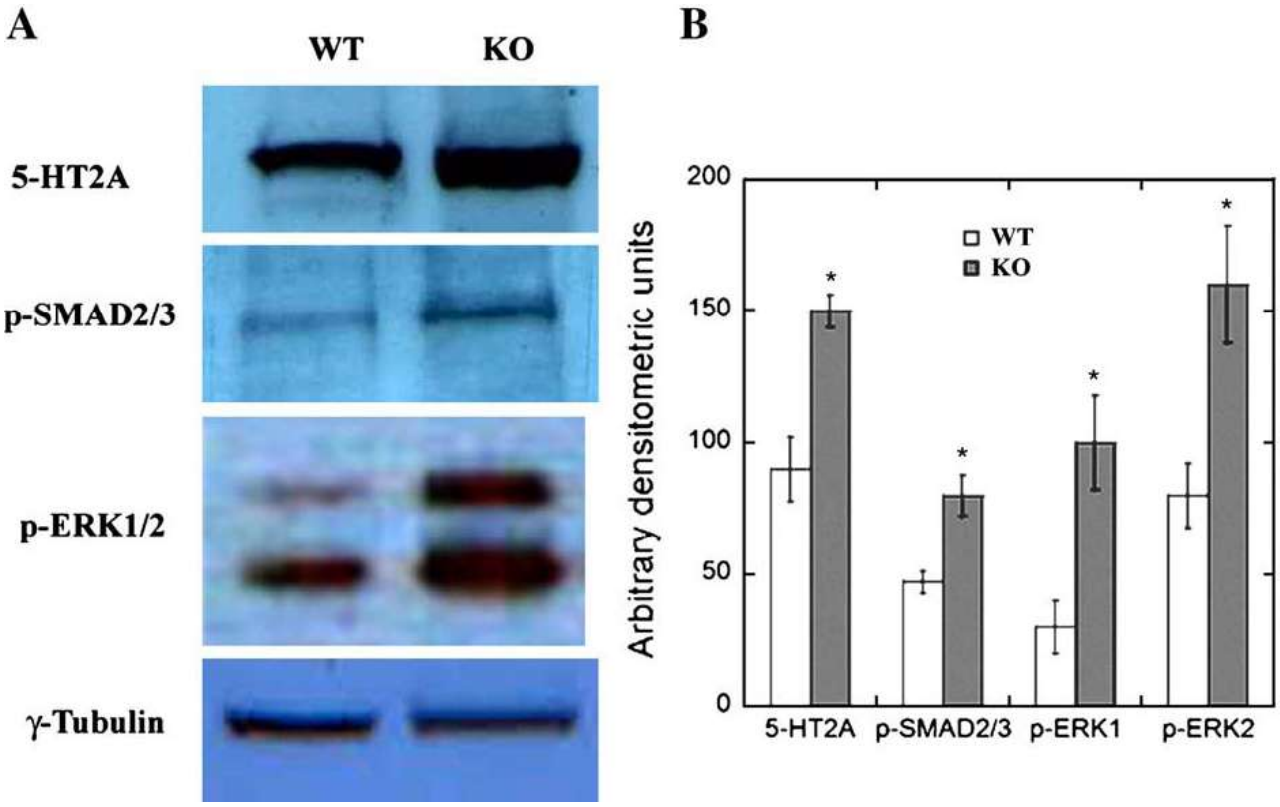
Allo scopo di stabilire il meccanismo molecolare attraverso cui l'annullamento del gene SERT promuove fibrosi cardiaca, abbiamo valutato i livelli di espressione del recettore per la serotonina 5-HT2A e i livelli di fosforilazione delle proteine di segnale SMAD2/3 e ERK1/2 nel cuore di topi WT e SERT-KO.

Omogenati di cuore di embrioni di topi WT e SERT-KO allo stadio E18.5 sono stati sottoposti a SDS-PAGE elettroforesi e Western blotting mediante l'impiego di un anticorpo policlonale diretto contro l'epitopo corrispondente agli amminoacidi 1-75 presenti nel dominio extracellulare N-terminale del recettore 5-HT2A di origine murina. In tutti i campioni analizzati

è stato osservato un incremento dei livelli di espressione del recettore 5-HT2A nel cuore dei topi SERT-KO rispetto ai topi WT (Figura 15, pannello A, blot in alto). L'analisi densitometrica delle bande ottenute ha dimostrato un aumento dell'espressione di 5-HT2A pari al 45% nel cuore di topi SERT-KO rispetto ai topi WT (Figura 15, pannello B). Lo "stripping" del filtro e il trattamento successivo con l'anticorpo monoclonale anti-γ-tubulina dimostra che le stesse quantità di proteine sono state caricate in tutti i campioni (Figura 15, pannello A, blot in basso).

Allo scopo di valutare il ruolo dei processi di trasduzione del segnale mediati da TGF-β_1 nella fibrosi cardiaca osservata nei topi SERT-KO, abbiamo valutato i livelli di fosfo-SMAD2/3 e fosfo-ERK1/2 in tessuti di cuore di embrioni di topi WT e SERT-KO allo stadio E18,5. Gli omogenati di cuore sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blotting mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale anti-fosfo-ERK1/2 diretto contro la sequenza contenente la tirosina 204 fosforilata di ERK di origine umana, e l'anticorpo policlonale diretto contro la piccola sequenza contenente le serine 423 e 425 fosforilate di Smad di origine umana. Sono state riscontrate, rispettivamente, due bande con peso molecolare di 42 e 44 kDa corrispondenti a fosfo-ERK1 e fosfo-ERK2, e una banda di 56 kDa corrispondente a fosfo-SMAD2/3 (Figura 15 pannello A, blot in alto). I livelli di tali proteine, tuttavia, risultano superiori nei cuori di topi SERT-KO rispetto ai cuori di controllo WT (Figura 15, pannello B). Lo "stripping" dei relativi filtri e la loro successiva incubazione con l'anticorpo policlonale anti-ERK1/2 e l'anticorpo monoclonale anti-SMAD2/3 dimostra che sono state caricate le stesse quantità di proteine per tutti i campioni. Risultati simili sono stati ottenuti da esperimenti di Western blotting eseguiti su campioni di cuore prelevati da topi $SERT^{Cre/Cre}$ deceduti nella prima settimana post-natale e topi WT sopravvissuti ma sacrificati allo stesso stadio post-natale dei topi KO morti .

Figura 15



Analisi della cascata di segnali che la serotonina attiva nel cuore dei topi nulli per SERT. (**A**) Analisi di Western blotting per valutare i livelli di espressione del recettore 5-HT2A ed i livelli di fosforilazione di SMAD2/3 e ERK1/2 nel cuore di embrioni di topi WT e SERT-KO allo stadio E18,5. (**B**) Analisi densitometrica delle bande dei blots in (A).

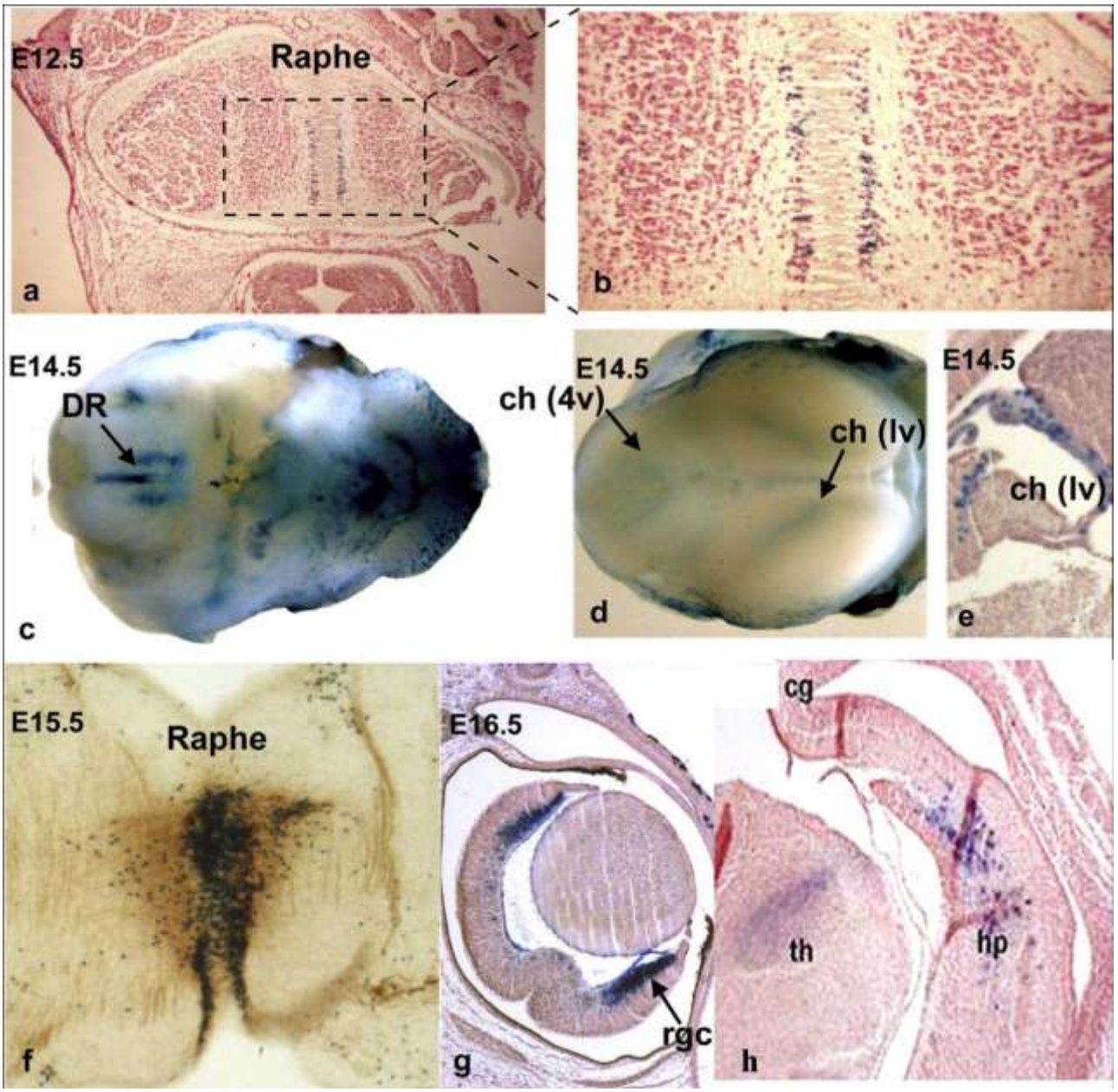
4.4 “Cell fate map” di SERT durante lo sviluppo embrionale del cervello nel topo

La distribuzione spaziale e temporale delle cellule che esprimono SERT durante lo sviluppo del SNC è stata studiata in embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R dallo stadio E8,5 fino allo stadio E16,5. Studi precedenti hanno dimostrato che i neuroni serotoninergici compaiono nel topo per la prima volta allo stadio E10,5 (63) e l’espressione del gene SERT si osserva a partire dallo stadio E11,5 (32). Nel nostro sistema sperimentale, la colorazione LacZ è stata evidenziata non prima dello stadio embrionale E12,5. A questo stadio neuroni positivi alla colorazione con X-Gal sono risultati evidenti nei nuclei del raphe (Figura 16). In particolare la parte caudale del raphe midollare (corrispondente al complesso B4-B9) e la zona latero-basale del cervello appaiono colorate bilateralmente (Figura 16a-b).

Allo stadio embrionale E13,5, numerose cellule colorate sono visibili nel derma; esse corrispondono alle cellule di Merkel nell’area del muso (Figura 17a). A questo stadio di sviluppo, SERT risulta altresì intensamente espresso nel fegato e nei polmoni oltre che nel cuore (Figura 17g).

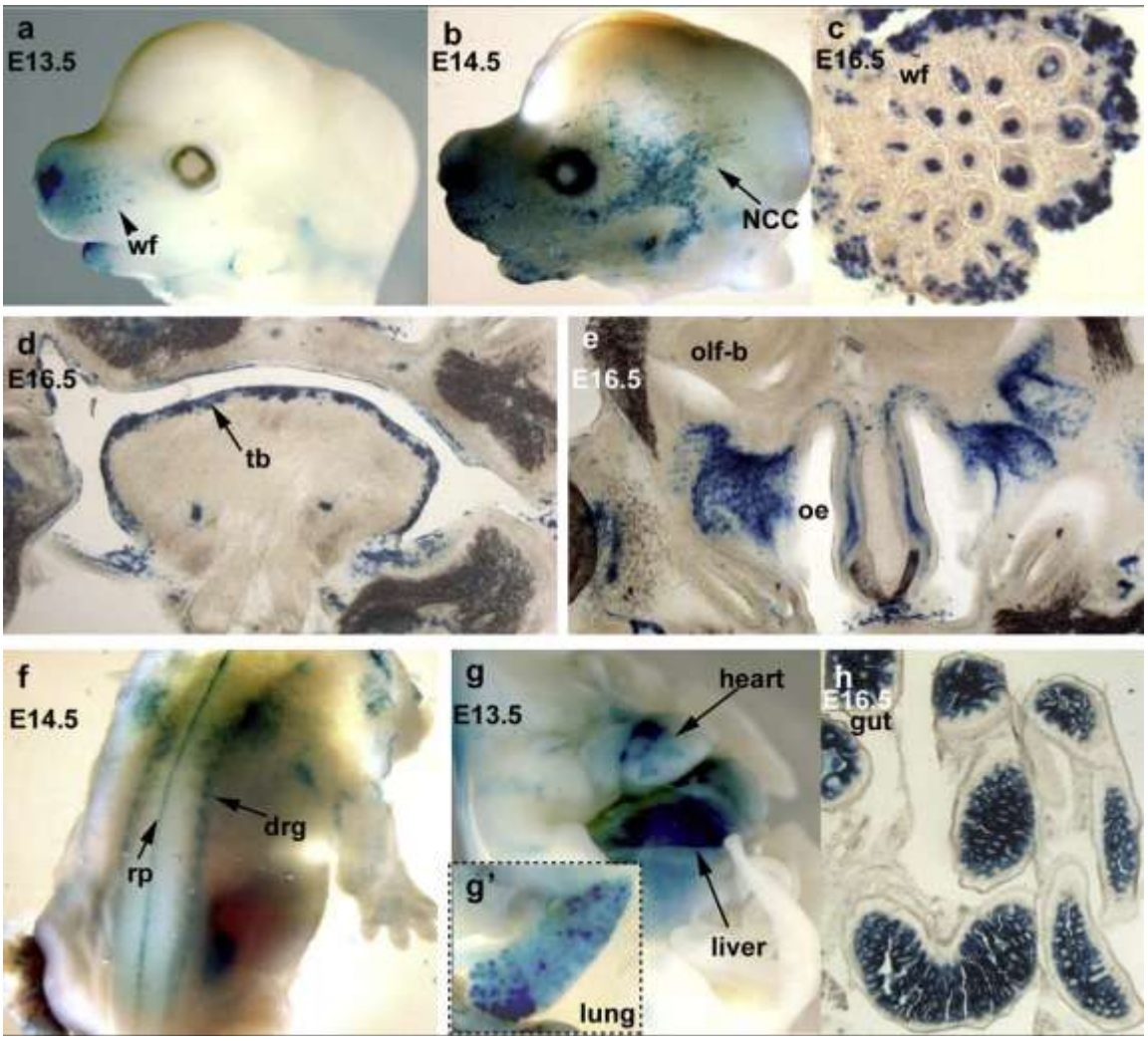
Allo stadio E14,5, il profilo di colorazione dei nuclei del raphe risulta simile a quello osservato allo stadio E12,5, seppure molto più intenso ed esteso (Figura 16c). A questo stadio, inoltre, cellule positive alla colorazione per la β-gal cominciano ad essere visibili nei plessi coroidei lungo i ventricoli laterali (Figura 16d-e) e si rileva che allo stadio E14,5 le cellule di Merkel evidenziate allo stadio E13,5 sono migrate (Figura 17b). Al confine tra romboencefalo e mesencefalo, corrispondente al tetto del quarto ventricolo, la positività si evidenzia nelle cellule centrali del tetto. La colorazione del tetto si estende dal mesencefalo alla colonna vertebrale e le cellule colorate in quest’area potrebbero derivare dalla cresta neurale (Figura 17f).

Figura 16



Espressione di SERT nel cervello di embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R. (**a, b**) colorazione LacZ dei nuclei del raphe del cervello di embrione di topo allo stadio E12,5. (**c-e**) intensa colorazione di tutte le cellule dei nuclei del raphe e dei plessi coroidei lungo i ventricoli cerebrali di embrione di topo allo stadio E14,5. (e) sezione del plesso coroideo di un ventricolo laterale. (**f**) colorazione LacZ dei nuclei del raphe del cervello di embrione di topo allo stadio E15,5. (**g**) colorazione della retina e delle cellule gangliari della retina di embrione di topo allo stadio 16,5. (**h**) colorazione del talamo dorsale e dell'ippocampo. cg, corteccia cingolata; ch (4v), plesso coroideo del quarto ventricolo; ch (lv), plesso coroideo del ventricolo laterale; hp, ippocampo, rgc, cellule gangliari della retina; th, talamo.

Figura 17



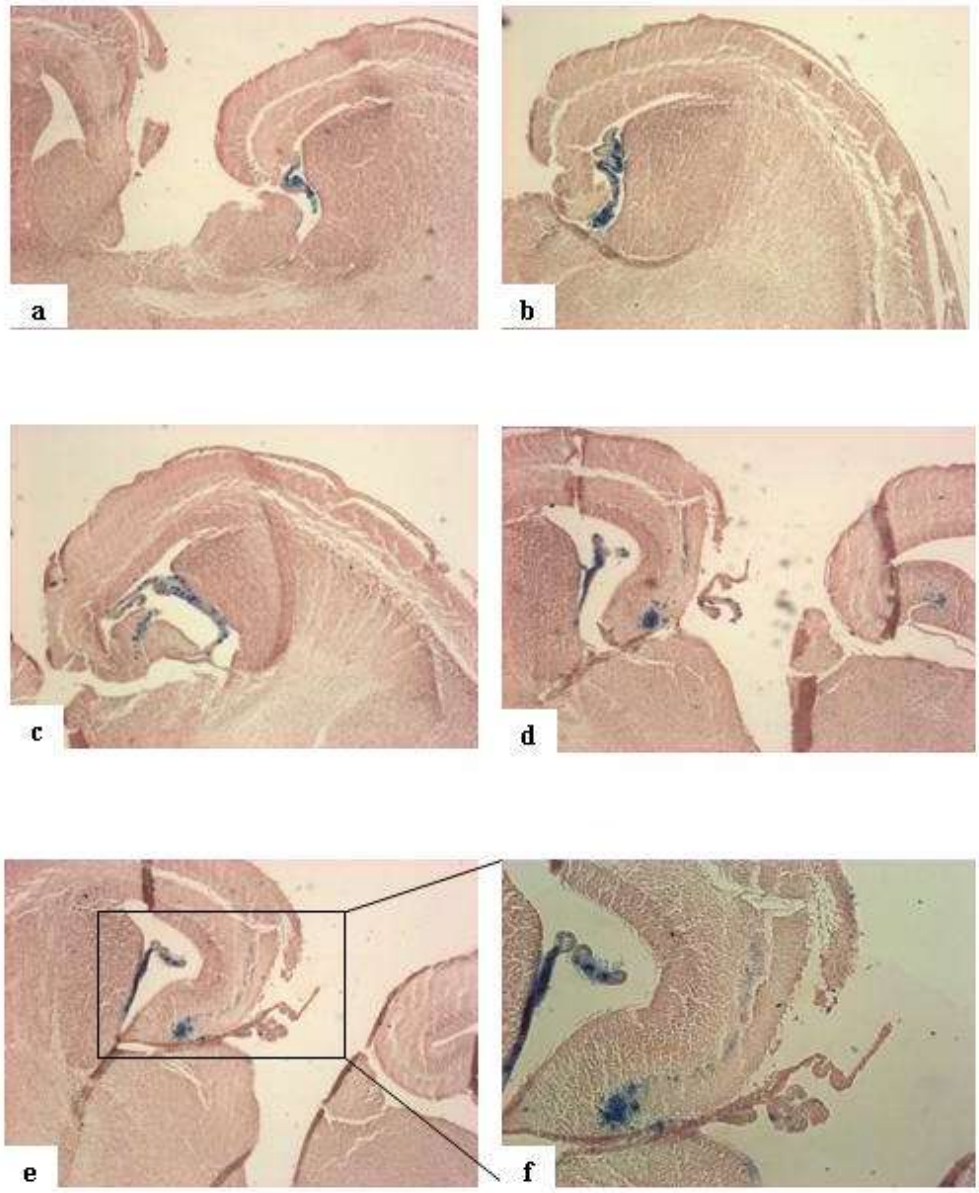
Espressione di SERT nelle strutture derivanti dalla cresta neurale e in strutture periferiche di embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E13,5, E14,5 e E16,5. (**a-c**) numerose cellule di Merkel colorate sono visibili nel derma. (b) un gruppo di cellule colorate sono visibili allo stadio (E14,5). (c) le cellule di Merkel sono maggiormente concentrate alla base dei follicoli dei capelli. (**d-e**) le cavità orali e nasali mostrano un'intensa colorazione dell'epitelio della lingua e del palato, delle strutture cartilaginee del naso e dei nervi olfattivi. (**f**) positività nei gangli della radice dorsale e nella colonna vertebrale; (**g-h**) l'espressione di SERT appare più precocemente nel fegato ("liver"), cuore ("heart"), polmone ("lung") (g') e intestino ("gut") (h). drg, gangli della radice dorsale; NCC, cellule della cresta neurale; oe, epitelio olfattivo; olf-b, bulbo olfattivo; rp, colonna vertebrale; tb, regione superficiale della lingua e del palato; wf, regione dei baffi.

La colorazione scompare a stadi embrionali più tardivi e ciò potrebbe essere dovuto alla migrazione delle cellule o a processi di apoptosi. Allo stesso stadio, è possibile osservare un'intensa colorazione del ganglio dorsale (Figura 17f).

Allo stadio 15,5 l'espressione di SERT è ancora chiaramente visibile nei nuclei del raphe e negli assoni efferenti da esso (Figura 16f). Allo stadio E16,5, oltre che nell'intestino (Figura 17h), l'espressione di SERT diventa visibile in una frazione di cellule del ganglio retinico (Figura 16g) e nel complesso olivare superiore del troncoencefalo, in numerosi neuroni non serotoninergici del talamo dorsale, nell'ippocampo e nelle strutture mediali corticali (Figura 16h). A questo stadio si osserva positività alla colorazione nelle cellule di Merkel concentrate soprattutto alla base dei follicoli piliferi (Figura 16c). La cavità orale e nasale mostrano un'intensa colorazione sull'epitelio della lingua e del palato; nel naso si osserva una forte colorazione delle strutture cartilaginee e del nervo olfattivo (Figura 17d-e).

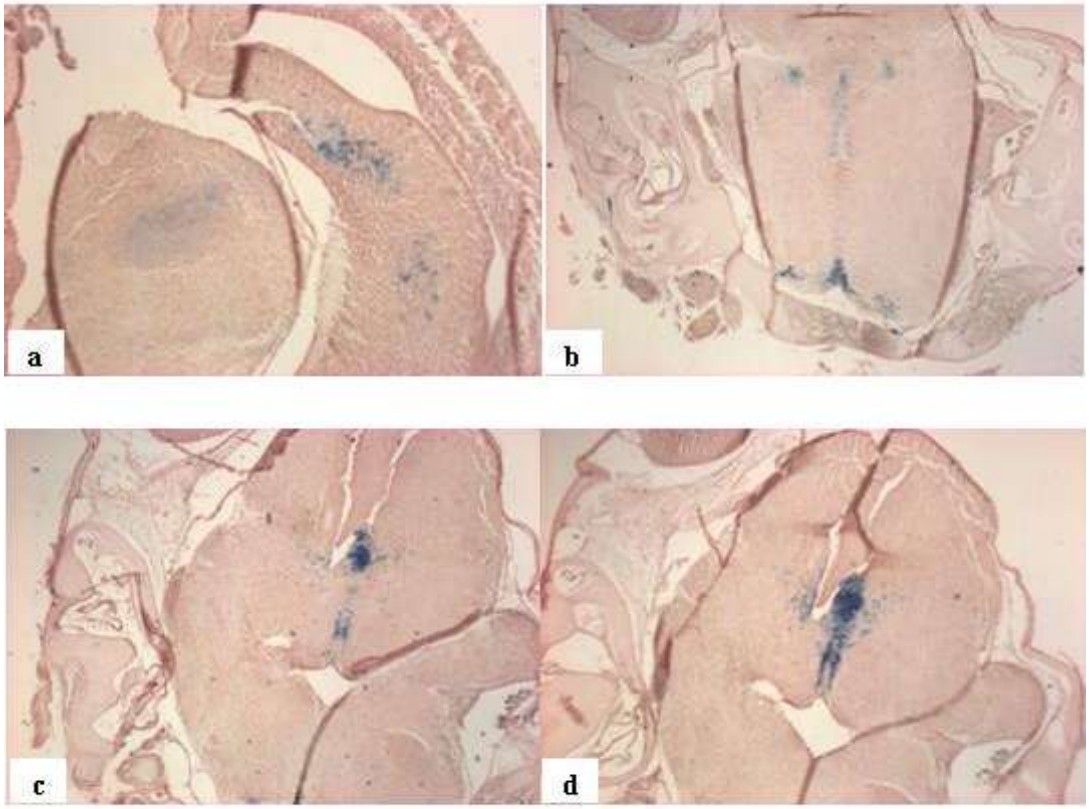
Sezioni coronali di cervelli di topi allo stadio E16,5 mostrano un'intensa colorazione dello strato di cellule epiteliali e di sottili fibre all'interno della corteccia (Figura 18a-b). È visibile, inoltre, una forte colorazione della lamina corticale, delle cellule corticali rivolte verso le cavità ventricolari e dello striato (Figura 18c-d). Un'intensa colorazione in diverse localizzazioni dei plessi coroidei si può osservare nelle sezioni di cervello a questo stadio embrionale (Figura 18e-f). Inoltre, risultano colorati l'epitelio dei lobi olfattivi, il ponte del diencefalo e le ghiandole submascellari (Figura 19a-d). Le strutture talamiche e l'ipotalamo mostrano una buona positività alla colorazione per β-gal (Figura 19a). Il giro dentato e la corteccia cingolata sono colorate negli strati più profondi. Numerose cellule nelle regioni dell'ippocampo, nel giro dentato e l'ilo in CA2 e CA3 appaiono chiaramente colorate. Cellule colorate si osservano nei nuclei del troncoencefalo che evidenziano il completo sviluppo dei nuclei del raphe (Figura 19c-d).

Figura 18



Espressione del gene SERT in sezioni coronali di cervello di embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E16,5. (**a, b**) intensa colorazione di cellule epiteliali e di sottili fibre all'interno della corteccia. (**c, d**) positività alla colorazione per la β-gal nelle cellule della lamina corticale rivolte verso le cavità ventricolari, nello striato e nel diencefalo. (**e, f**) intensa colorazione del plesso coroideo.

Figura 19



Espressione del gene SERT in sezioni coronali di cervelli embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio E16,5. (**a, b**) intensa positività alla colorazione per la β-gal nell'epitelio dei lobi olfattivi, nella corteccia cingolata, nel ponte del diencefalo e nelle ghiandole mascellari. (**c, d**) colorazione nei nuclei del raphe e nella regione del troncoencefalo.

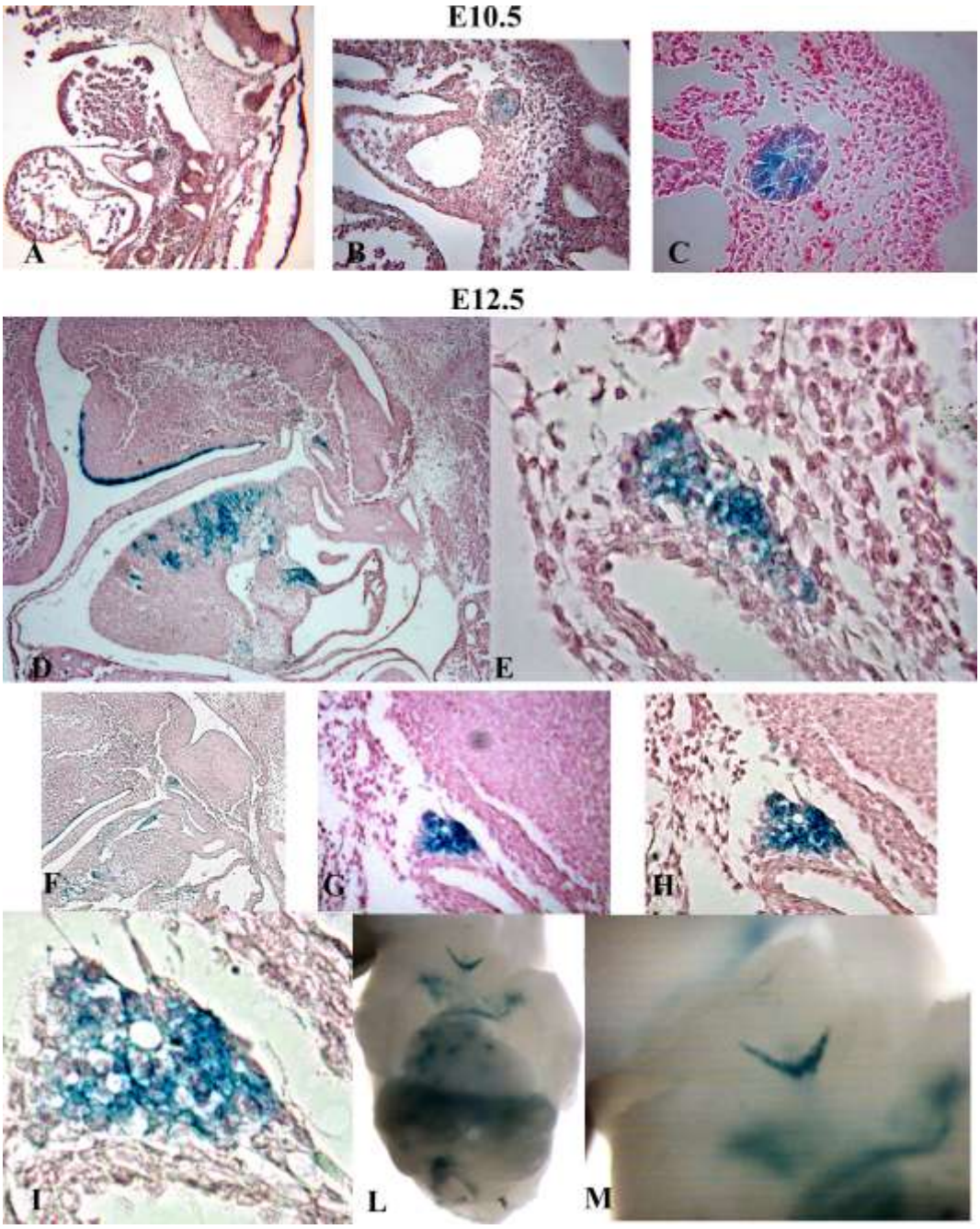
4.5 Caratterizzazione delle cellule della tiroide che esprimono SERT nello sviluppo embrionale del topo

La tiroide di embrioni di topi e topi adulti (P30) con genotipo SERT$^{Cre/+}$;R26R sono stati colorati con X-Gal per evidenziare l'espressione della β-gal indotta dalla Cre nella ghiandola tiroidea. Non è stata osservata alcuna colorazione agli stadi embrionali E8,5 ed E9,5. La colorazione β-gal è stata evidenziata per la prima volta nel primordio della tiroide allo stadio E10,5. A questo stadio, la colorazione LacZ è distintamente localizzata nell'endoderma del primordio della tiroide che si trova in opposizione al mesoderma del cuore (Figura 20 A-C). Sezioni sagittali di embrioni allo stadio E12,5 mostrano una marcata colorazione di tali cellule (Figura 20 D-I), mentre la colorazione di embrioni interi allo stesso stadio mostra chiaramente l'espressione di SERT nel primordio della tiroide che appare come una struttura simile ad un diverticolo (Figura 20 L-M).

Due giorni dopo, cellule positive alla colorazione sono osservate nel primordio della tiroide molto vicino alla trachea dell'embrione di topo allo stadio E14,5 (Figura 21 A-C). Dallo stadio E14,5 allo stadio E18,5 i lobi della tiroide si espandono notevolmente e la ghiandola assume la sua forma definitiva: due lobi connessi da un istmo sottile. Nell'embrione intero entrambi i lobi appaiono fortemente colorati (Figura 21 D-F).

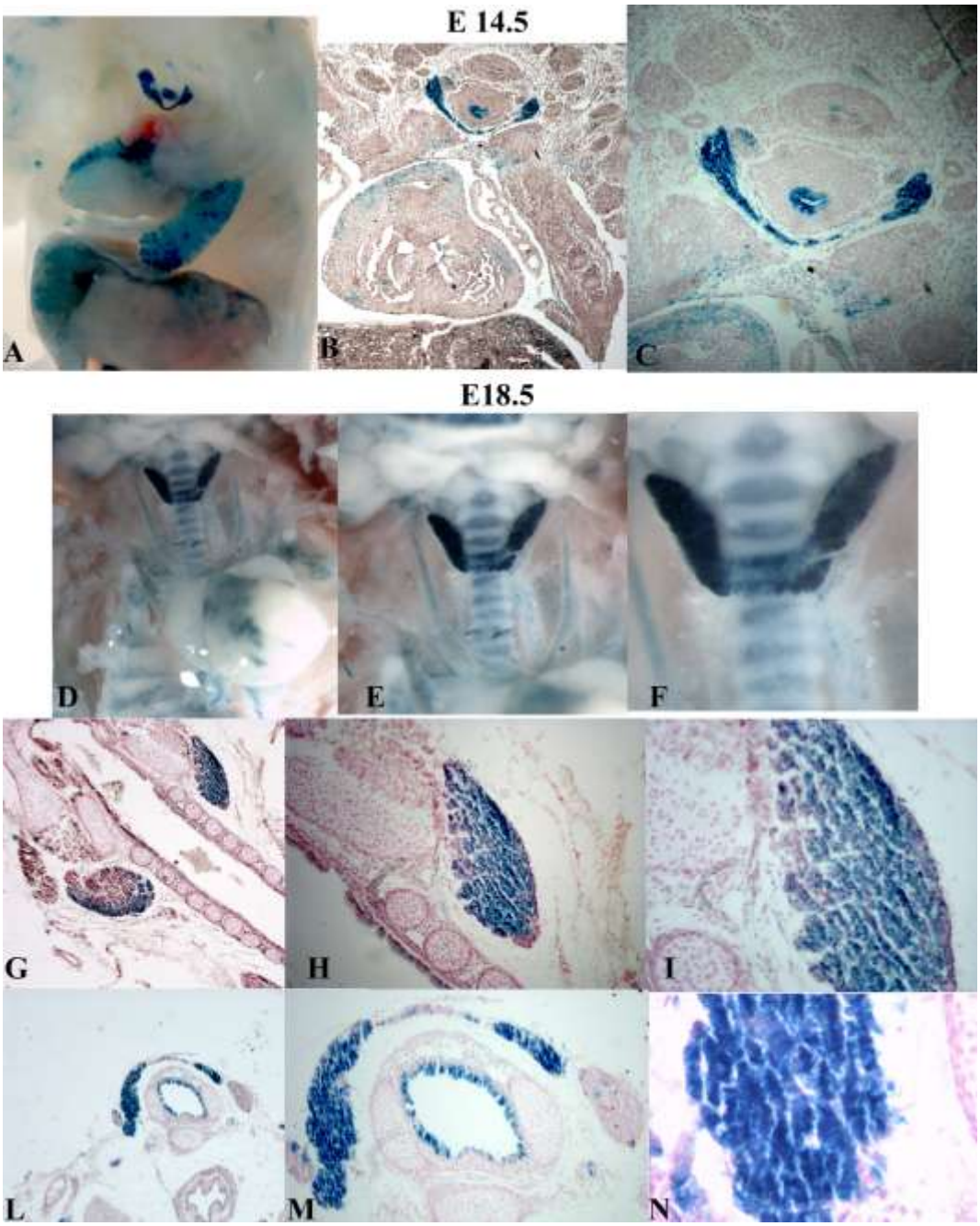
La prima evidenza dell'organizzazione follicolare appare con alcuni follicoli colorati disseminati all'interno della ghiandola degli embrioni di topi SERT $^{Cre/+}$;R26R allo stadio E18,5 (Figura 21 G-N). Infine, la colorazione sulla ghiandola murina intera e su sezioni traverse allo stadio post-natale P30 mostrano una evidente espressione di SERT nelle cellule follicolari che circondano la componente colloidale della tiroide (Figura 22 A-F). I risultati ottenuti dimostrano che SERT è presente in tutti gli stadi dello sviluppo della tiroide, fin dallo stato primordiale, durante la migrazione, e nelle cellule follicolari della ghiandola adulta.

Figura 20



Espressione di SERT nella tiroide di embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R agli stadi embrionali E10,5 ed E12,5. Sezioni sagittali di embrioni agli stadi E10,5 (**A-C**) ed E12,5 (**D-I**). (**L**) colorazione su embrione intero (whole mount") allo stadio E12,5. (**M**) ingrandimento di (L).

Figura 21

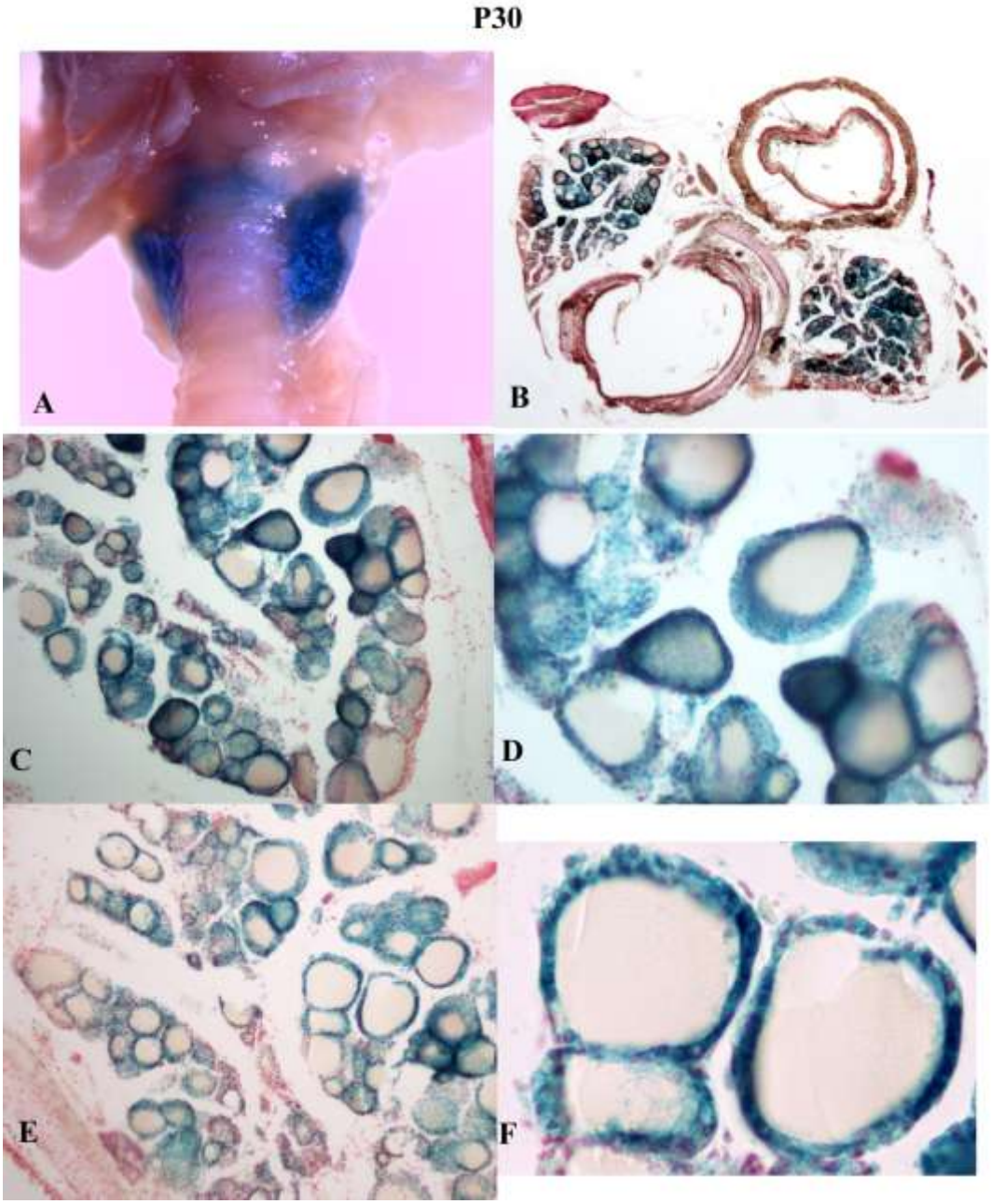


Espressione di SERT nella tiroide di embrioni di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R agli stadi embrionali 14,5 ed E18,5. (**A**) colorazione su embrione intero ("whole mount") allo stadio E14,5. (**B**) sezione transversa di un embrione allo stesso stadio. (**C**) ingrandimento di (B). (**D**) colorazione della tiroide intera di embrione allo stadio E18,5. (**E-F**) ingrandimenti di (D). (**G-I**) sezioni coronali della tiroide di embrione allo stadio E18,5 in tre differenti ingrandimenti. (**L-N**) sezioni transverse di tiroide allo stesso stadio embrionale in tre differenti ingrandimenti.

Allo scopo di caratterizzare il fenotipo delle cellule della tiroide che esprimono SERT negli embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R allo stadio E12,5, abbiamo effettuato un'analisi immunoistochimica utilizzando anticorpi diretti contro i fattori di trascrizione TTF1/Nkx2.1 e Pax8 che giocano un ruolo fondamentale nell'organogenesi e nel differenziamento della tiroide (84). Entrambi i fattori di trascrizione sono espressi dalle cellule follicolari della tiroide (102). Alterazioni nell'espressione di questi fattori di trascrizione o nella loro cooperazione sono alla base di disordini congeniti della tiroide e di carcinogenesi tiroidea (81).

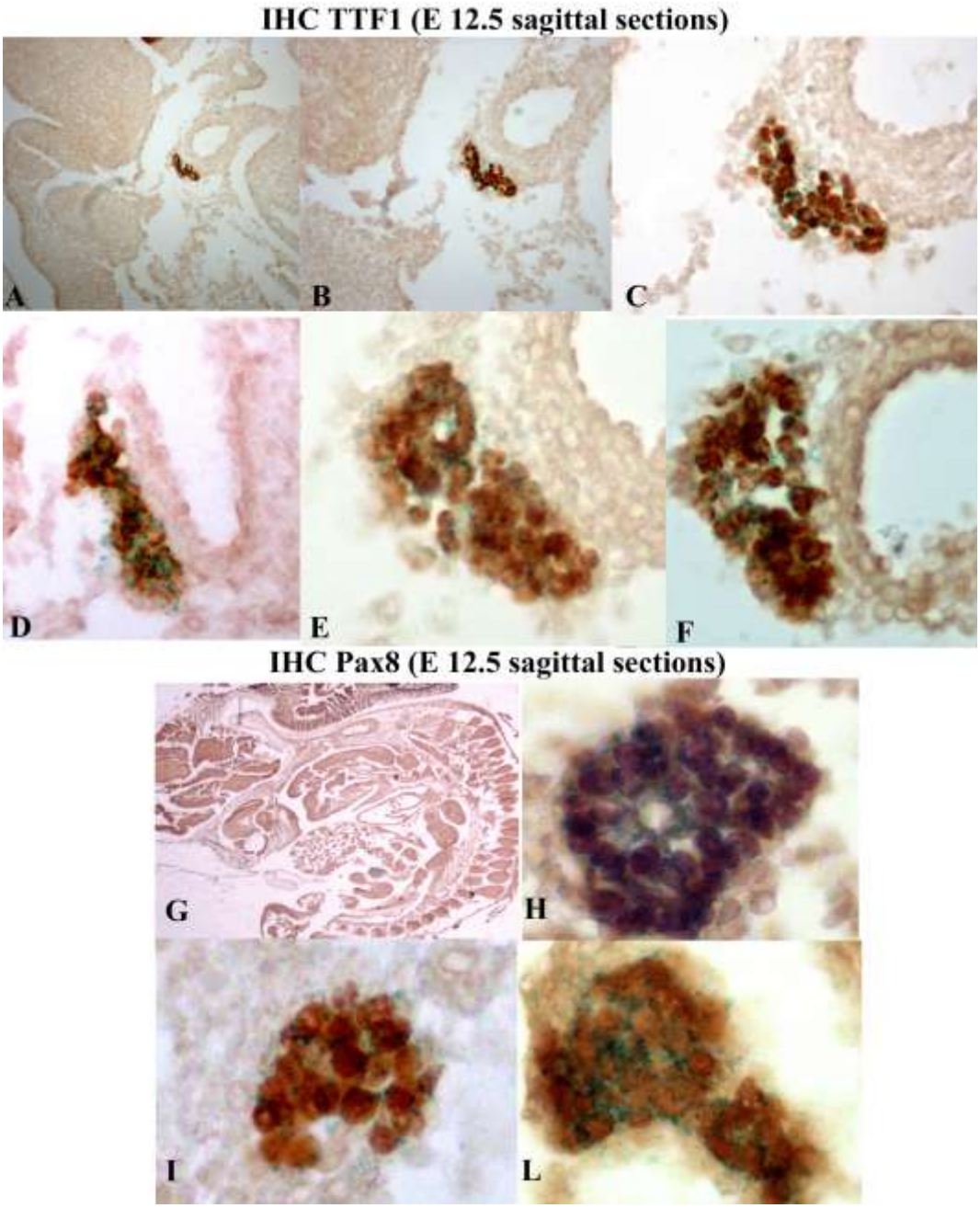
L'analisi immunoistochimica su sezioni di embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R allo stadio E12,5 trattati con X-Gal ha mostrato la co-localizzazione della colorazione LacZ con i due fattori di trascrizione TTF1/Nkx2.1 e Pax8 nei precursori delle cellule follicolari della tiroide (Figura 23). In particolare, le cellule che esprimono SERT e TTF1/Nkx2.1 (Figura 23 A-F) e Pax8 (Figura 23 G-L) sono localizzate nell'area adiacente alla parte distale del tratto di efflusso del cuore, dove la tiroide inizia il suo sviluppo prima di migrare verso la trachea. Questi risultati dimostrano che le cellule follicolari esprimono SERT fin dalle prime fasi dello sviluppo embrionale.

Figura 22



Espressione di SERT nella tiroide di topi SERT$^{Cre/+}$;R26R allo stadio post-natale P30. (**A**) colorazione della tiroide intera adulta e (**B**) una sua sezione transversa. (**C-D**) e (**E-F**) due differenti sezioni transverse della tiroide adulta con relativi ingrandimenti. Tali ingrandimenti mostrano la localizzazione di SERT nelle cellule follicolari della tiroide adulta.

Figura 23



Co-localizzazione di SERT con i fattori di trascrizione TTF1/Nkx2.1 e Pax8 nelle cellule della tiroide di embrioni di topi allo stadio E12,5. Sezioni sagittali di embrioni $SERT^{CRE/+}$;R26R, previamente colorate con X-Gal, sottoposte ad analisi immunoistochimica con anticorpi TTF1/Nkx2.1 (**A-F**) e Pax8 (**G-L**). A, B e C sono tre diversi ingrandimenti della tiroide allo stadio E12,5 marcata con TTF1/Nkx2.1 e SERT. D, E e F sono tre diverse immagini che mostrano la co-localizzazione delle due proteine nella tiroide di embrione di topo. G ed H sono due diversi ingrandimenti della tiroide allo stadio E12,5 marcata con Pax8 e SERT. I ed L sono due diverse immagini che mostrano la co-localizzazione delle due proteine nella tiroide di embrione di topo.

5. DISCUSSIONE

5.1 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi del cuore

La serotonina regola le funzioni cardiovascolari sia durante l'embriogenesi che nella vita adulta (9, 12, 14, 31-33, 37, 48, 56-60, 64-76). Tra le funzioni che la serotonina svolge nel sistema cardiovascolare vi è la regolazione del tono muscolare mediante l'azione diretta sui cardiomiociti e la stimolazione dei nervi chemosensitivi nel cuore (14, 57-58). Alterazioni della concentrazione del neurotrasmettitore provocano disordini cardiovascolari, indicando ciò che i livelli di serotonina circolante rappresentano un fattore determinante per il mantenimento della normale attività cardiovascolare. I meccanismi responsabili della patogenesi di malattie cardiache indotte dalla serotonina coinvolgono sia i recettori che il trasportatore SERT (31). L'inattivazione del gene del recettore 5-HT2B provoca morte embrionale e neonatale dovuta a difetti cardiaci (103). L'azione della serotonina mediata da specifici recettori mantiene la funzionalità cardiovascolare in risposta a stress ipossico nell'utero probabilmente mediante la regolazione ad opera di SERT della concentrazione ed il rilascio del neurotrasmettitore nel cuore (104). L'origine della serotonina nel sistema cardiovascolare, tuttavia, ed il ruolo della serotonina circolante e del trasportatore SERT nella regolazione delle funzioni cardiovascolari non sono stati del tutto chiariti.

Il ruolo di SERT nello sviluppo del cuore è stato ipotizzato sulla base delle seguenti evidenze sperimentali: (i) cellule fetali di cuore in coltura esprimono SERT; (ii) la serotonina induce un incremento della proliferazione di cellule fetali di cuore; (iii) il blocco del "re-uptake" della serotonina mediante paroxetina diminuisce la crescita delle cellule fetali cardiache (64). Tali evidenze inducono a ritenere che il trasporto della serotonina mediato da SERT piuttosto che l'attivazione dei recettori serotoninergici abbia un ruolo fondamentale nel modulare la funzione della serotonina nello sviluppo embrionale cardiaco. In questo studio, abbiamo effettuato un'analisi del "cell

fate map" di SERT nel cuore di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R che ha evidenziato una ristretta e specifica espressione di SERT nel cuore durante lo sviluppo. L'espressione di SERT nel cuore è stata evidenziata per la prima volta allo stadio embrionale E10,5. Essa è risultata localizzata nell'OFT, nella regione conale, nel RV e solo limitatamente nel LV. Particolarmente interessante è risultata l'evidenza della localizzazione di SERT nelle valvole atrioventricolari a supporto dell'osservazione di anomalie valvolari nei topi nulli per SERT (72).

I risultati sull'espressione di SERT durante lo sviluppo embrionale nel topo concordano con precedenti osservazioni in altre specie animali. L'inibizione farmacologica o genetica di SERT altera l'asimmetria del cuore in embrioni di *Xenopus* (20). Trascritti endogeni per SERT sono espressi nel nodo di Hensen fin dalle prime fasi dello sviluppo di pollo (8, 105). Inibitori di SERT impediscono lo sviluppo successivo alla blastulazione in embrioni e larve di *Lytechinus variegatus* e di altre specie di ricci di mare (106). Immunoreattività alla serotonina, ai suoi recettori e a SERT è stata osservata in embrioni prima dello sviluppo del sistema nervoso ed in larve di *L. variegatus e Strongylocentrotus droebachiensis*. Durante la gastrulazione, componenti del sistema serotoninergico sono stati ritrovati nell'archenteron (primordio dell'intestino), nelle cellule mesenchimali e nell'ectoderma apicale. Negli embrioni di ratto, SERT è espressa in molti tessuti cardiovascolari, tra cui le piastrine, il cuore, le arterie polmonari, le arterie sistemiche (aorta, anrterie superiore mesenterica e carotidee) e cellule endoteliali (32, 59). L'esposizione prenatale all'inibitore di SERT fluoxetina, un farmaco SSRI ampiamente impiegato nell'uomo, interferisce con lo sviluppo fetale causando cardiomiopatie (7, 38-39, 60, 67, 107).

L'aspetto, tuttavia, più rilevante della nostra analisi di "cell fate map" è che il profilo di espressione di SERT osservato è simile a quello di marcatori del "secondary heart field" (SHF) (98-100), indicando ciò che SERT è espresso

principalmente nelle cellule che derivano da questa linea. E'stato dimostrato che la serotonina promuove la migrazione delle cellule della cresta neurale durante lo sviluppo cranio-facciale, e l'inibizione del trasporto della serotonina determina malformazioni cranio-facciali (41). Malgrado SERT possa non essere attivo durante la migrazione precoce della cresta neurale, è noto che le cellule della cresta neurale sono in grado di effettuare il trasporto della serotonina durante la fase avanzata della migrazione, quando esse sono in prossimità della notocorda (47). I nostri risultati non evidenziano un'origine neurale delle cellule che esprimono SERT. Allo stadio embrionale E16,5, tuttavia, è stata evidenziata la localizzazione di SERT nel sistema di conduzione cardiaco (Figura 5), che potrebbe derivare dalla cresta neurale (108). L'accumulo di cellule intensamente positive intorno alla cavità cardiaca (E16,5) suggerisce la presenza di SERT attivo in questi siti e il conseguente "re-uptake" di serotonina dal flusso sanguigno già in stadi precoci dello sviluppo.

La nostra analisi ha dimostrato l'espressione di SERT in cellule derivanti dall'SHF di origine mesodermica (109-110). In generale, la distribuzione delle cellule che esprimono SERT coincide con cardiomiociti derivanti dall'SHF. Gli esperimenti di immunoistochimica dimostrano che tutte le cellule LacZ positive nel cuore allo stadio E12,5 sono positive anche ad *Isl1* e Cx43, confermando la loro origine di cardiomiociti. Tali risultati concordano con dati che riportano la sintesi della serotonina sia nella linea cellulare di cardiomiociti adulti HL-1 che in cardiomiociti neonatali del ventricolo di ratto (111). I cardiomiociti rappresentano, quindi, una risorsa locale di serotonina nel cuore. Inoltre, i risultati sull'origine dal SHF delle cellule che esprimono SERT suggeriscono che tale linea cellulare sia programmata a svolgere un ruolo non solo morfogenetico ma anche fisiologico nelle funzioni cardiache.

La presenza di cardiomiociti che esprimono SERT nelle valvole cardiache durante le fasi precoci dell'embriogenesi suggerisce un ruolo

fondamentale di SERT nello sviluppo delle valvole cardiache e nelle patologie cardiache a carico delle stesse. Malformazioni delle valvole rappresentano le più comuni anomalie congenite dei neonati e sono tra l'altro diffuse in pazienti affetti da malattie genetiche quali la sindrome di Down, le sindromi di Leopard, Holt-Oram, Noonan ed altre (112). Sebbene la patogenesi di tali malformazioni sia ancora sconosciuta, tuttavia, numerose evidenze suggeriscono che le patologie valvolari cardiache abbiano un'origine embrionale. L'esatto meccanismo molecolare alla base delle patologie valvolari indotte dalla serotonina non è ancora del tutto conosciuto.

5.2 Ruolo di SERT nella fibrosi cardiaca

Numerosi modelli animali sono stati generati principalmente per studiare il ruolo del trasportatore della serotonina nelle malattie neurologiche e psichiatriche (7, 9, 23, 33, 43-44, 93, 103, 113). Più recentemente topi nulli per SERT sono stati utilizzati per approfondire il meccanismo con cui la serotonina induce malformazioni cardiache strutturali e funzionali (37, 59, 72). Nel nostro studio, abbiamo dimostrato che nel cuore di topi $SERT^{Cre/Cre}$ non sono espressi l'mRNA codificante per SERT e la corrispondente proteina, per cui abbiamo utilizzato tale modello per chiarire il ruolo della serotonina e del trasportatore nello sviluppo del cuore e nelle malattie cardiache.

Particolarmente interessante è risultata l'osservazione che i topi SERT-KO muoiono prematuramente durante la prima settimana di vita, riproducendo in tal modo il fenotipo della SIDS. La SIDS è la causa principale di mortalità post-neonatale nei Paesi industrializzati. La patogenesi della SIDS è sconosciuta, seppure crescenti evidenze dimostrino un'alterazione delle funzioni della serotonina fra le cause della sindrome (95, 114). L'analisi post-mortem di tessuti cerebrali di vittime della SIDS ha evidenziato anomalie del sistema serotoninergico, tra cui un incremento del numero di neuroni serotoninergici, la ridotta espressione dei recettori 5-HT1A e 5-HT2A, un ridotto legame della serotonina al trasportatore SERT, un'alterata espressione

dell'enzima TPH (5) ed un anomalo turn-over della serotonina (115-118). Inoltre, studi genetici correlano la SIDS al genotipo L/L di SERT (95, 119). Altre evidenze dimostrano che l'impiego, durante la gravidanza, di farmaci antidepressivi diretti a modulare l'azione di SERT aumentano il rischio di aritmie maligne e di morte improvvisa nei neonati (7, 39, 60, 67). I risultati ottenuti in questo studio che dimostrano un fenotipo cardiaco per i topi SERT-KO che vanno incontro a morte prematura durante la prima settimana di vita, pertanto, forniscono un contributo al chiarimento del ruolo di SERT nella patogenesi della SIDS.

Nel modello sperimentale da noi utilizzato è stato evidenziato che l'annullamento del gene SERT induce fibrosi cardiaca nei topi agli stadi pre-natali, confermando il ruolo fondamentale della serotonina nello sviluppo del cuore e in specifiche patologie cardiache. L'incremento di accumulo di collagene e l'aumento di espressione di α-SMA nel cuore di embrioni di topi SERT-KO allo stadio E18,5 rispetto ai topi WT dimostrano che l'alterazione della funzionalità del trasportatore della serotonina provoca fibrosi cardiaca. I risultati ottenuti sono in accordo con le seguenti precedenti osservazioni: i) insorgenza di fibrosi cardiaca e valvulopatia in topi SERT-KO di 8-10 settimane di vita (72), (ii) induzione di malattie valvolari cardiache in ratti trattati a lungo termine con serotonina (74), (iii) potenziale associazione tra malattie cardiache congenite e l'uso di farmaci SSRI durante la gravidanza (39, 60, 67).

L'aumento di espressione del marcatore della transizione epiteliale-mesenchimale α-SMA è stimolato dai segnali di traduzione indotti dalla citochina TGF-β_1 ed è correlata ad un aumento della produzione di componenti della matrice extracellulare, tra cui diversi tipi di collagene (101, 120). TGF-β_1 sembra essere un fattore chiave nella patogenesi della fibrosi cardiaca (77). L'aumentata presenza di proteine della matrice extracellulare all'interno del miocardio porta ad alterazioni della funzionalità ventricolare causando

disfunzioni sistoliche e diastoliche. La fibrosi indotta da TGF-β_1 influenza anche la conduzione elettrica portando allo sviluppo di aritmie. Infine, la produzione eccessiva di proteine della matrice extracellulare all'interno della valvole cardiache è associata a disordini valvolari. La serotonina presenta un effetto induttore sull'espressione di TGF-β_1 in differenti sistemi cellulari quali le cellule stellate epatiche di ratto, fibroblasti cardiaci di ratto, cellule mesangiali di ratto e cellule interstiziali di valvola aortica di pecora (73, 75-76, 121-122). L'induzione dell'espressione di TGF-β_1 da parte della serotonina è stata anche dimostrata in valvole carcinoidi umane rimosse mediante intervento chirurgico (123).

Alcuni studi hanno dimostrato il coinvolgimento del recettore 5-HT2A nell'attivazione da parte della serotonina dei processi di traduzione di segnali mediati dal TGF-β_1 (75-76, 122). Il nostro studio fornisce la prima evidenza *in vivo* del meccanismo molecolare con cui la serotonina induce fibrosi cardiaca mediante l'attivazione del recettore 5-HT2A e la conseguente stimolazione del processi di traduzione di segnali dipendenti da TGF-β_1. In figura 24 è riportata una rappresentazione schematica del meccanismo proposto sulla base dei nostri dati sperimentalli. Essi supportano l'ipotesi che un aumento della concentrazione di serotonina circolante, causato da una mancata funzionalità di SERT, stimola il recettore cardiaco della serotonina 5-HT2A. Il recettore, attraverso una proteina G, attiva i segnali di trasduzione di TGF-β_1 che provocano l'aumento dei livelli di fosforilazione di SMAD2/3 e di ERK1/2 nei topi SERT-KO rispetto ai topi WT. La trasduzione del segnale mediata dal recettore 5-HT2A regola l'attivazione di ERK1/2 in cellule muscolari liscie, in fibroblasti e in cellule mesangiali (75, 124-125). La fosforilazione di ERK1/2 induce un aumento della produzione dei componenti della matrice extracellulare quali il collagene in numerosi tipi di cellule, tra cui cardiomiociti e fibroblasti. L'attivazione di ERK1/2 indotta da TGF-β_1 regola anche l'espressione di α-SMA (126). I nostri risultati *in vivo* confermano il ruolo

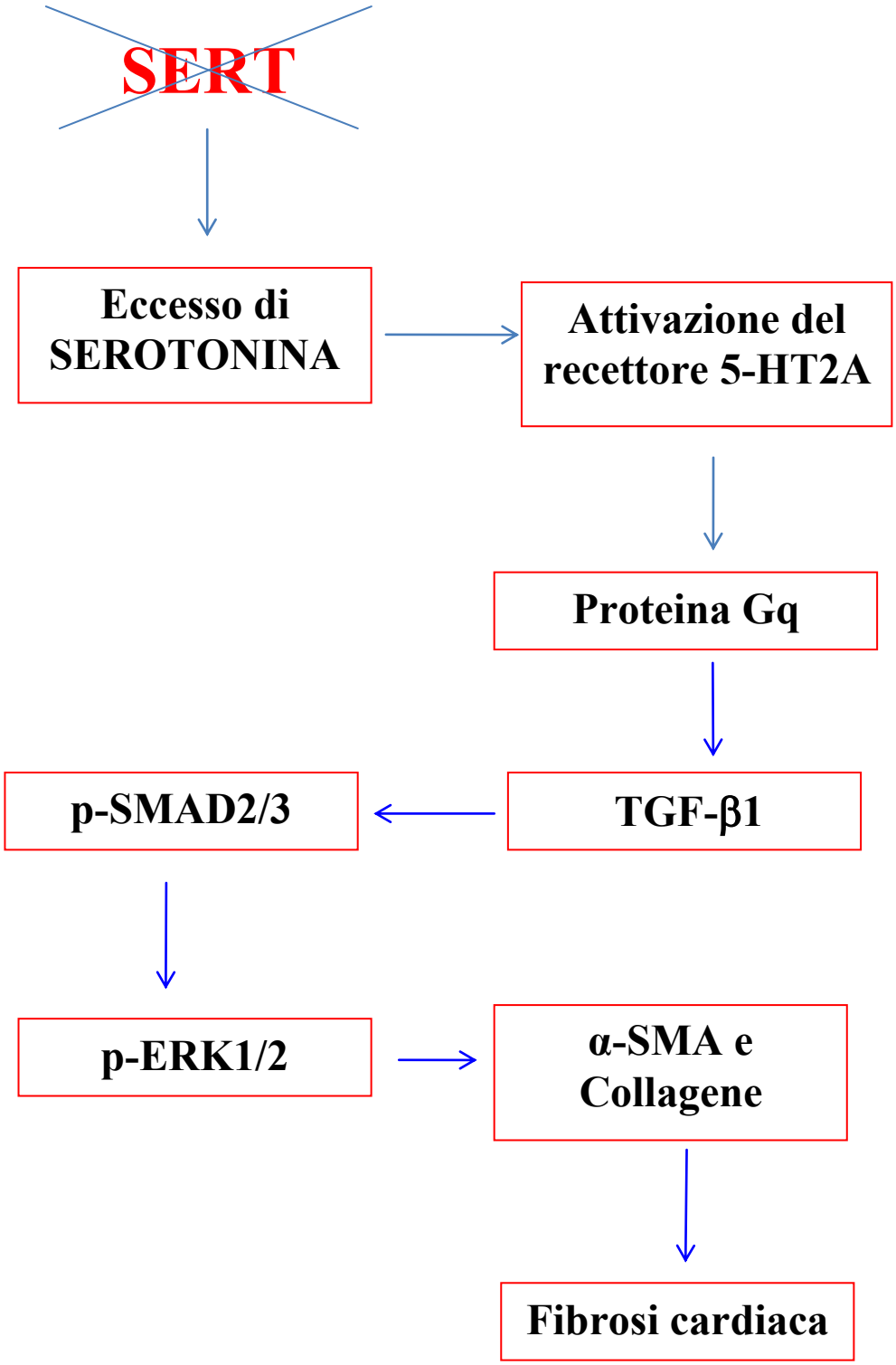
fondamentale della serotonina nell'induzione della fibrosi cardiaca mediata da TGF-β_1.

5.3 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi del cervello

La ricombinazione condizionale dei geni reporter che normalmente non sono espressi nel genoma dei mammiferi si è dimostrata un metodo efficace per marcare specifici sottotipi neuronali (7, 93). L'espressione selettiva dei geni reporter dipende dal sito di espressione della ricombinasi Cre. Nel modello utilizzato in questo studio il gene che codifica per la ricombinasi Cre è stato inserito nell'esone 2 del gene SERT, in modo da evitare profili di espressione aberranti dovuti agli effetti inserzionali del transgene (93). Inoltre, nel costrutto per la ricombinasi Cre è stata inserita una sequenza "nls"che la indirizza al nucleo rendendo, in tal modo, maggiormente efficiente la ricombinazione. Il profilo di espressione del gene lacZ si sovrappone al profilo di espressione spaziale e temporale del gene SERT sia nei neuroni serotoninergici del raphe (E12) che nei principali siti di espressione non serotoninergici di SERT, quale ad esempio il talamo (E16) (7). Questo modello di topo può, pertanto, essere utilizzato come efficiente strumento per l'annullamento di geni all'interno di specifici circuiti neuronali del talamo sensoriale, nei neuroni limbici della corteccia cingolata e nella regione CA3 dell'ippocampo.

Il profilo spaziale e temporale dell'espressione di SERT ottenuta in questo studio descrive tutte le regioni del cervello che esprimono SERT durante lo sviluppo e in particolar modo l'espressione di SERT nell'area limbica del cervello.

Figura 24



Meccanismo proposto per l'attivazione da parte di SERT della via di trasduzione del segnale di TGF-b1 in condizioni fibrotiche

Sebbene studi precedenti abbiano mostrato la presenza dell'mRNA di SERT nell'ippocampo (32, 127), non erano state evidenziate le zone di quest'area cerebrale in cui SERT è espresso. I risultati da noi ottenuti delineano chiaramente la zona CA3 dell'ippocampo quale principale sito di espressione di SERT, con inizio dell'espressione allo stadio E15. Al contrario, le zone CA1-CA2 dell'ippocampo, il giro dentato, la corteccia piriforme e l'amigdala che in precedenza si riteneva esprimessero in modo transiente SERT (32, 127-129), di fatto non sembrano esprimere SERT a nessuno stadio durante lo sviluppo.

In questo lavoro, inoltre, è stata dimostrata l'espressione transiente di SERT in aree analizzate solo in parte in precedenza, quale ad esempio la corteccia pre-frontale mediale. La positività alla colorazione in questa area è risultata particolarmente marcata. I neuroni che esprimono SERT concorrono alla formazione delle lunghe proiezioni cortico-corticali come indicato dalla positività alla colorazione degli assoni callosali. Confermando ed estendendo precedenti osservazioni (128, 130), il presente lavoro sottolinea la marcata espressione di SERT nell'intero sistema uditivo; nella coclea, nel nucleo cocleare mediale, nella porzione laterale del nucleo olivare superiore e nel collicolo inferiore. Tali osservazioni rivelano altri potenziali bersagli cellulari dei farmaci SSRI durante il periodo critico dello sviluppo.

Il ruolo funzionale dell'espressione transiente di SERT è stato ampiamente analizzato nei neuroni non serotoninergici del sistema sensoriale, a livello dei terminali assonici talamo-corticale e retino-genicolato. Sia nei neuroni talamici che in quelli retinici, l'espressione transiente di SERT sembra sia necessaria al mantenimento dell'omeostasi della serotonina nei terminali assonici in sviluppo, in particolare per promuovere l'attivazione dei recettori pre-sinaptici della serotonina. Il recettore pre-sinaptico 5-HT1B ed il trasportatore SERT sono espressi simultaneamente e presentano una localizzazione simile negli assoni retinici e talamici (9). Il recettore 5-HT1B

esercita due effetti principali: il primo è un potente effetto sul rilascio del glutammato (131-132), probabilmente attraverso la modulazione del flusso di calcio a livello pre-sinaptico e diminuendone la possibilità di rilascio; il secondo è la modulazione dei livelli di cAMP, che a sua volta può modulare la risposta degli assoni a fattori di regolazione attrattivi quali le netrine (133) o molecole repellenti come le efrine (134). Quando la funzione di SERT è annullata, l'eccessiva stimolazione del recettore 5-HT1B determina una diminuzione del rilascio del glutammato e un'alterata risposta ai fattori regolatori.

E' possibile che SERT svolga una simile funzione di regolazione per diversi recettori dalla serotonina negli altri sistemi neuronali. E' interessante sottolineare che le aree cortico-limbiche mediali esprimono alti livelli dei recettori 5-HT2A e 5-HT2C, apparentemente negli stessi neuroni che esprimono SERT. I circuiti neuronali limbici nella corteccia pre-frontale e cingolata sono coinvolti nel controllo delle emozioni e del comportamento e risultano alterati dopo un precoce trattamento di topi neonati con farmaci SSRI (7). Oltre a controllare l'eccitabilità neuronale nei neuroni della corteccia, la serotonina potrebbe anche avere effetti trofici (135). La maturazione dendritica (44) e la morte cellulare negli strati superficiali della corteccia cingolata (136) potrebbero essere modulati dall'attivazione del recettore 5-HT2. Altri eventi maturativi nell'ippocampo potrebbero coinvolgere l'interazione tra SERT e il recettore 5HT1A durante il periodo critico dello sviluppo.

Numerosi studi sono stati effettuati per valutare il rischio potenziale della somministrazione dei farmaci SSRI nell'uomo. I nati da madri trattate con paroxetina/fluoxetina durante l'ultimo trimestre di gravidanza presentano un'aumentata frequenza (>30%) di comparsa di una sindrome cosiddetta di "astinenza" caratterizzata da sintomi medio-severi quali nervosismo e disordini gastrointestinali che scompaiono dopo alcune settimane. Sindromi molto più severe quali convulsioni, iperpiressia e ipertesione polmonare persistente del

neonato sono state osservate in gran numero di studi recenti (7, 137-139). Data l'ampia espressione di SERT nello sviluppo, ulteriori studi sono necessari per stabilire gli effetti della somministrazione dei farmaci SSRI durante la gravidanza e l'infanzia nell'uomo. SERT sembra, infatti, sia espresso in maniera transiente anche nell'uomo, sebbene il periodo preciso e la localizzazione della sua espressione non siano state accertate a causa della indisponibilità del materiale per tali studi.

5.4 Espressione e ruolo di SERT nell'embriogenesi della tiroide

E' stato proposto che la serotonina abbia un ruolo nei processi di trasduzione di segnali intercellulari nella tiroide e che le cellule follicolari rappresentino il suo bersaglio (87-88). L'aumento dei livelli extracellulari di Ca^{2+} induce la secrezione di serotonina da parte delle cellule parafollicolari attraverso la via del fosfaditilinositolo-3-fosfato. Alterazioni nell'attività delle cellule parafollicolari in modelli murini di ipotiroidismo influenzano le interazioni tra le cellule follicolari e le cellule parafollicolari (140-141). I risultati ottenuti nel nostro studio relativi al profilo di espressione di SERT nella tiroide durante lo sviluppo concordano con l'ipotesi che la serotonina serva da messaggero tra le cellule parafollicolari e follicolari.

Diversi studi hanno dimostrato la relazione tra disfunzioni tiroidee e il trattamento neonatale con farmaci che impediscono la maturazione dei neuroni serotoninergici in ratti (142-143). In quanto bersaglio di sostanze quali la cocaina, derivati dell'anfetamina e farmaci antidepressivi (7), l'espressione di SERT durante lo sviluppo embrionale della tiroide può riflettere periodi critici della vulnerabilità tiroidea per l'esposizione fetale a tali sostanze. L'espressione del trasportatore SERT e la sua localizzazione nelle cellule follicolari della tiroide durante lo sviluppo suggeriscono un ruolo della serotonina nella morfogenesi della tiroide e in numerose patologie tiroidee.

6. CONCLUSIONI

L'utilizzo in questo studio del modello murino SERT-Cre ha consentito di evidenziare la distribuzione spaziale e temporale del trasportatore della serotonina SERT durante lo sviluppo embrionale di tre organi fondamentali quali il cuore, il cervello e la tiroide.

Il profilo di espressione di SERT nel cuore, evidenziato dalla colorazione LacZ negli embrioni di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R sin dagli stadi più precoci, e la caratterizzazione del fenotipo di topi SERT-KO ha fornito nuove evidenze sul ruolo di SERT nello sviluppo del cuore, nella funzionalità dell'organo e in patologie delle valvole cardiache associate ad alterazioni dei livelli di serotonina. Inoltre, il profilo di espressione di SERT durante lo sviluppo delle valvole cardiache e l'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nel processo di fibrosi cardiaca indotto dalla serotonina fornisce le basi per lo sviluppo di nuove terapie dirette alla cura e alla prevenzione di malattie cardiovascolari che interessano le valvole cardiache. Infine, il nostro studio ha fornito un ulteriore conferma sperimentale all'ipotizzata relazione causale tra alterazioni del gene SERT e l'insorgenza della SIDS.

L'analisi dell'espressione di SERT nel cervello di topi $SERT^{Cre/+}$;R26R ha permesso di identificare nuovi siti in cui il trasportatore è fortemente attivo durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale, mettendo in evidenza i potenziali rischi correlati all'abuso di cocaina o di altre droghe o di farmaci SSRI che hanno SERT quale bersaglio durante la gravidanza.

Infine, lo studio dell'espressione di SERT nella tiroide di embrioni e topi adulti $SERT^{Cre/+}$;R26R ha consentito di stabilire che le cellule follicolari della ghiandola esprimono SERT sin dagli stadi più precoci dello sviluppo, mettendo in evidenza un ulteriore sito di vulnerabilità da considerare nel rischio dell'esposizione a droghe o farmaci SSRI nel periodo prenatale. In conclusione, i risultati del nostro studio possono contribuire all'avanzamento

delle conoscenze sul ruolo della serotonina e di SERT nelle funzioni fisiologiche del cuore, cervello e tiroide dei mammiferi ed in numerose patologie correlate all'età, a fattori congeniti e all'uso di droghe e farmaci.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bertrand PP, Bertrand RL (2010) Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 153:47-57
2. Hornunge JP (2003). The human raphe nuclei and serotoninergic system. J Chem Neuroanatomy 26:331-43
3. Boess FG, Martin IL (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. Neuropharmacology 33:275-317
4. Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD (1996) Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res 43:185-92
5. Sasa M (2001) Function of monoamine neurotransmitter transporters. Nippon Rinsho 59:1457-64
6. Horne MK, Lee J, Chen F, Lanning K, Tomas D, Lawrence AJ (2008) Long term administration of cocaine or serotonin reuptake inhibitors results in anatomical and neurochemical changes in noradrenergic, dopaminergic and serotonin pathways. J Neurochem 106:1731-44
7. Narboux-Nême N, Pavone LM, Avallone L, Zhuang X, Gaspar P (2008) Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). Neuropharmacology. 55:994-1005
8. Wallace JA (1982) Monoamines in the early chick embryo: demonstration of serotonin synthesis and the regional distribution of serotonin-concentrating cells during morphogenesis. Am J Anat 165:261-76
9. Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat Rev Neurosci 4:1002-12
10. Lauder JM, Tamir H, Sadler TW (1988) Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. Development 102:709-20

11. Buczko W (1994) Serotonin-blood platelets, vessels. Acta Haem Pol 25:61-5
12. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM (2008) Serotonin: a review. J Vet Pharmacol Ther 31:187-99
13. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. J Neurosci 28:2495-505
14. Nebigil CG, Maroteaux L (2001) A novel role for serotonin in heart. Trends Cardiovasc Med 11:329-35
15. Södersten P, Bergh C. (2008). Serotonin transporter binding in eating disorders. Psychopharmacology 197:519-20
16. Nordquist N, Oreland L (2010) Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. Ups J Med Sci 115:2-10
17. Whitaker-Azmitia PM (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Brain Res Bull 56:479-85
18. Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 38:1083-1152
19. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacol Ther 92:179-212
20. Marracci S, Cini D, Nardi I (1997) Cloning and developmental expression of 5-HT1A receptor gene in *Xenopus laevis*. Brain Res Mol Brain Res 47:67-77
21. Hillion J, Catelon J, Raid M, Hamon M, De Vitry F (1994) Neuronal localization of 5-HT1A receptor mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures.Brain Res Dev Brain Res 79:195-202
22. Gould E (1999) Serotonin and hippocampal neurogenesis. Neuropsychopharmacology 21:46S-51S

23. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. Proc Natl Acad Sci USA 95:14476-81
24. Higgins GA, Bradbury AJ, Jones BJ (1988) Behavioural and biochemical consequences following activation of 5HT1-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. Neuropharmacology 27:993-1001
25. Gilbert F, Brazell C, Tricklebank MD (1988) Activation of the 5HT1A receptor subtype increases rat plasma ACTH concentration. Eur J Pharmacol 147:431-39
26. Saudou F, Amara DA, Dierich A (1994) Enhanced aggressive behaviour in mice lacking 5-HT1B receptor. Science 265:1875-78
27. Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS (1997) 5-HT2A receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. J Neurosci 17:2785-95
28. Busatto GF, Kerwin RW (1997) Perspective on the role of serotoninergic mechanisms in the pharmacology of schizophrenia. J. Psychopharmacol 11:3-12
29. Wang Y, Gu Q, Cynader MS (1997) Blockade of serotonin-2C receptors by mesulergine reduces ocular dominance plasticity in kitten visual cortex. Exp Brain Res 114:321-8
30. Edagawa Y, Saito H, Abe K (2001) Endogenous serotonin contributes to a developmental decrease in long-term potentiation in the rat visual cortex. J Neurosci 21:1532-7
31. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. Mol Interv 4:109-23
32. Hansson SR, Cabrera-Vera TM, Hoffman BJ (1998) Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. Brain Res Dev Brain Res 111:305-14

33. Murphy D, Lesch KP (2008) Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. Nature 9:85-96
34. Haase J (2001) Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. Biochem Soc Trans 29:722-8
35. Kuzelova H, Ptacek R, Macek M (2010) The serotonin transporter gene (5-HTT) variant and psychiatric disorders: review of current literature. Neuro Endocrinol Lett 31:4-10
36. Gershon MD, Tack J (2007) The serotonin signalling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. Gastroenterology 132:397-414
37. Pavone LM, Spina A, Rea S, Santoro D, Mastellone V, Lombardi P, Avallone L (2009) Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. J Mol Cell Cardiol 47:691-7
38. P. Schloss, DC Williams (1998) The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. J Pharmacol 12:115-21
39. Rothman RB, Baumann MH (2002) Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates. Pharmacol Ther 95:73-88
40. Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res 305:187-202
41. 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 (Berl) 187:75-85.
42. Ramos AJ, Tagliaferro P, Lopez-Costa JJ, Lopez EM, Pecci Saavedra J, Brusco A (2002) Neuronal and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity following serotonin depletion. Brain Res 958:112-21

43. Cases O, Vitalis T, Seif I, Sotelo C, Gaspar P (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. Neuron 16:297-307
44. Bou-Flores C, Lajard AM, Monteau R, De Maeyer E, Seif I, Lanoir J, Hilaire G (2000) Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess. J Neurosci 20:4646-56
45. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science 299:76
46. Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science 305:217
47. Moiseiwitsch JR, Lauder JM (1995) Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. Proc Natl Acad Sci USA 92:7182-6.
48. Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (1997) 5-HT2B receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardiac cells. Development 124:1745-55
49. Rubenstein JL (1998) Development of serotonergic neurons and their projection. Biol Psychiatry 44:145-15
50. Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. Cell 93:755-66
51. Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Samad OA, Krumlauf R, Rijli FM, Brunet JF, Ericson J (2003) Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. Genes Dev 17:729-37
52. Ding YQ, Marklund U, Yuan W, Yin J, Wegman L, Ericson J, Deneris E, Johnson RL, Chen ZF (2003) Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. Nat Neurosci 6:933-8

53. Craven SE, Lim KC, Yee W, Engel JD, de Sauvage F, Rosenthal A (2003) Gata2 specifies serotoninergic neurons downstream of sonic hedgehog. Development 131:1165-73
54. van Doorninck JH, van der Wees J, Karis A, Goedknegt E, Engel JD, Coesmans M, Rutteman M, Grosveld F, De Zeeuw CI (1999) GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. J Neurosci 19:1-8
55. Galter D, Unsicker K (2000) Sequential activation of the 5-HT1A serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. Am J Anat 15:446-55
56. Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW, Lauder JM (1993) Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. Teratology 47:573-84
57. Frishman WH, Grewall P (2000) Serotonin and the heart. Ann Med 32:195-209
58. Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjdani G (2004) Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. Trends Mol Med 10:232-8
59. Ni W, Watts SW (2006) 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). Clin Exp Pharmacol Physiol 33:575-83
60. Wichman CL, Moore KM, Lang TR, St Sauver JL, Heise RH Jr, Watson WJ (2009) Congenital heart disease associated with selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy. Mayo Clin Proc 84: 23-7
61. Fahim I, Robson JM, Senior JB (1966) The 5-hydroxytryptamine content of the placenta, foetus and some maternal tissues during pregnancy in the rat. Br J Pharmacol Chemother 26:237-47
62. Gershon MD, Dreyfus CF, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1977) Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: identification in gut

by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase. Proc Natl Acad Sci USA 74:3086-9

63. Lidov HG, Molliver ME (1982) Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. Brain Res Bull 9:559-604

64. Sari Y, Zhou FC (2003) Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. Int J Dev Neurosci 21:417-24

65. Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. Proc Natl Acad Sci USA 97:9508-13

66. Rajamannan NM, Caplice N, Anthikad F, Sebo TJ, Orszulak TA, Edwards WD, Tajik J, Schwartz RS (2001) Cell proliferation in carcinoid valve disease: a mechanism for serotonin effects. J Heart Valve Dis 10:827-31

67. Dubnov-Raz G, Juurlink DN, Fogelman R, Merlob P, Ito S, Koren G, et al. (2008) Antenatal use of selective serotonin-reuptake inhibitors and QT interval prolongation in newborns. Pediatrics 122: e710-5

68. Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD, Schaff HV (1997) Valvular heart disease associated with fenfluramine−phentermine. N Engl J Med 337:581–88

69. Horvath J, Fross RD, Kleiner−Fisman G, Lerch R, Stalder H, Liaudat S, Raskoff WJ, Flachsbart KD, Rakowski H, Pache JC, Burkhard PR, Lang AE (2004) Severe multivalvular heart disease: a new complication of the ergot derivative dopamine agonists. Mov Disord 19:656–62

70. Moller JE, Connolly HM, Rubin J, Seward JB, Modesto K, Pellikka PA (2003) Factors associated with progression of carcinoid heart disease. N Engl J Med 348:1005–15

71. Pavone LM, Mithbaokar P, Mastellone V, Avallone L, Gaspar P, Maharajan V, Baldini A (2007) Fate map of serotonin transporter−expressing cells in developing mouse heart. Genesis 45:689-95

72. Mekontso−Dessap A, Brouri F, Pascal O, Lechat P, Hanoun N, Lanfumey L, Seif I, Benhaiem−Sigaux N, Kirsch M, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S (2006) Deficiency of the 5−hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. Circulation 113:81-9
73. Grewal JS, Mukhin YM, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL (1999) Serotonin 5−HT2A receptor induces TGF−beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. Am J Physiol 276:F922-30
74. Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, Fossmark R, Bakke I, Syversen U, Waldum H (2005) Long−term serotonin administration induces heart valve disease in rats. Circulation 111: 1517-22
75. Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, Levy RJ (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease, I: serotonin−induced up−regulation of transforming growth factor−beta1 via G−protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. Am J Pathol 161: 2111-21
76. Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig−Lipson S, McGonigle P, Levy RJ, Liang B (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease, II: the 5−HT2 receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. Am J Pathol 161:2209-18
77. Khan R, Sheppard R (2006) Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. Immunology 118:10-24
78. Massague J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. Genes Dev 19:2783-2810
79. Euler−Taimor G, Heger J (2006) The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. Cardiovasc Res 69:15−25
80. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, Levy RJ (2003) Progression of aortic valve stenosis: TGF−beta1 is present in calcified aortic valve cusps and

promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. Ann Thorac Surg 75:457–65

81. De Felice M, Di Lauro R (2004) Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. Endocrine Reviews 25:722-46
82. Fagman H, Nilsson M (2010) Morphogenesis of the thyroid gland. Mol Cell Endocrinol 323:35-54
83. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M (2004) An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. Dev Biol 276:464-75
84. Ambroziak M, Nauman A (2005) Thyroid transcription factors involved in the thyroid hormones biosynthesis. Postepy Biochem 51:288-96
85. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. Development 113:1093-104
86. Le Douarin NM (1986) Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. Science 231:1515-22
87. Russo AF, Clark MS, Durham PL (1996) Thyroid parafollicular cells. An accessible model for the study of serotonergic neurons. Mol Neurobiol 13:257-76
88. Tamir H, Hsiung SC, Liu KP, Blakely RD, Russo AF, Clark MS, Nunez EA, Gershon MD (1996) Expression and development of a functional plasmalemmal 5-hydroxytryptamine transporter by thyroid follicular cells. Endocrinol 137:4475-86
89. Loosen PT, Garbutt JC, Dew B, Prange AJ (1987) Pituitary sensitivity to thyroid hormones in depressed patients. Pharmacopsychiatry 20:85-9

90. Duval F, Mokrani MC, Bailey P, Correa H, Diep TS, Crocq MA, Macher JP (1999) Thyroid axis activity and serotonin function in major depressive episode. Psychoneuroendocrinology 24:695-712
91. Bauer M, Heinz A, Whybrow PC (2002) Thyroid hormones, serotonin and mood: of synergy and significance in the adult brain. Mol Psychiatry 7:140-56
92. Bunevicius R (2009) Thyroid disorders in mental patients. Curr Opin Psychiatry 22:391-95
93. Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S, Hen R (2005) Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. J Neurosci Methods 143:27-32
94. Soriano P (1999) Generalized lac-Z expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 21:70-1
95. Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM (2007) Sudden infant death syndrome: review of implicated genetic factors. Am J Med Genet 143A:771-88
96. Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. EMBO J 13:1799-805
97. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54
98. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. Dev Cell 5:877-89
99. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR (2005)

Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature 433:647-53

100. Moretti A, Lam J, Evans SM, Laugwitz KL (2007) Biology of *Isl1*$^{+}$ cardiac progenitor cells in development and disease. Cell Mol Life Sci 64:674-82

101. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol 172:973-81

102. Damante G, Tell G, Di Lauro R (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 66:307-56

103. Nebigil CG, Hickel P, Messaddeq N, Vonesch JL, Douchet MP, Monassier L, György K, Matz R, Andriantsitohaina R, Manivet P, Launay JM, Maroteaux L (2001) Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. Circulation 103:2973-9

104. Hu XQ, Zhang L (1997) Chronic hypoxia suppresses pharmacomechanical coupling of the uterine artery in near-term pregnant sheep. J Physiol 499:551-9

105. Fukumoto T, Blakely R, Levin M (2005) Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos. Dev Neurosci 27:349-63

106. Buznikov GA, Peterson RE, Nikitina LA, Bezuglov VV, Lauder JM (2005) The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence. Neurochem Res 30:825-37

107. Noorlander CW, Ververs FF, Nikkels PG, van Echteld CJ, Visser GH, Smidt MP (2008) Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. PLoS One 3:e2782

108. Nakamura T, Colbert MC, Robbins J (2006) Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. Circ Res 98:1547-54

109. Yutzey KE, Kirby ML (2002) Wherefore heart thou? Embryonic origins of cardiogenic mesoderm. Dev Dyn 223:307-20

110. Dyer LA, Kirby ML (2009) The role of secondary heart field in cardiac development. Dev Biol 336:137-44

111. Ikeda K, Tojo K, Otsubo C, Udagawa T, Kumazawa K, Ishikawa M, Tokudome G, Hosoya T, Tajima N, Claycomb WC, Nakao K, Kawamura M (2005) 5-hydroxytryptamine synthesis in HL-1 cells and neonatal rat cardiocytes. Biochem Biophys Res Commun 328:522-5

112. Schoen FJ (2005) Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. Cardiovasc Pathol 14:189-94

113. Fox MA, Andrews AM, Wendland JR, Lesch KP, Holmes A, Murphy DL (2007) A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. Psychopharmacology (Berl) 195:147-66

114. Tester DJ, Ackerman M (2009) Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden, unexpected death in infants and children. Annu Rev Med 60:69-84

115. Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, et al. (2006) Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. JAMA 296:2124-32

116. Machaalani R, Say M, Waters KA (2009) Serotoninergic receptor 1A in the sudden infant death syndrome brainstem medulla and associations with clinical risk factors. Acta Neuropathol 117:257-65

117. Panigrahy A, Filiano J, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, et al. (2000) Decreased serotonergic receptor binding in rhombic lip-derived regions of the medulla oblongata in the sudden infant death syndrome. J Neuropathol Exp Neurol 59:377-84

118. Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE (2009) The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. Annu Rev Pathol 4:517-50

119. Opdal SH, Rognum TO (2004) The sudden infant death syndrome gene: does it exist? Pediatrics 114:e506-12

120. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ (2002) Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. Hypertension 39:258-63

121. Li T, Weng SG, Leng XS, Peng JR, Wei YH, Mou DC, et al. (2006) Effects of 5-hydroxytamine and its antagonists on hepatic stellate cells. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 5:96-100

122. Yabanoglu S, Akkiki M, Seguelas MH, Mialet-Perez J, Parini A, Pizzinat N (2009) Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT2A receptors. J Mol Cell Cardiol 46:518-25

123. Waltenberger J, Lundin L, Oberg K, Wilander E, Miyazono K, Heldin CH, et al. (1993) Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. Am J Pathol 142:71-8

124. Watts SW (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT2A receptor. Ann N Y Acad Sci 861:162-8

125. Garnovskaya MN, van Biesen T, Hawe B, Casañas Ramos S, Lefkowitz RJ, Raymond JR (1996) Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT1A receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. Biochemistry 35:13716-22

126. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. Circ Res 95:253-60

127. Lebrand C, Cases O, Wehrle R, Blakely RD, Edwards RH, Gaspar P (1998) Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. J Comp Neurol 401:506-24
128. Cases O, Lebrand C, Giros B, Vitalis T, De Maeyer E, Caron MG, Price DJ, Gaspar P, Seif I (1998) Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. J Neuroscience 18:6914-27
129. Zhou FC, Sari Y, Zhang JK (2000) Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. Brain Research. Dev Brain Res 119:33-45
130. Thompson AM, Lauder JM (2005) Postnatal expression of the serotonin transporter in auditory brainstem neurons. Dev Neuroscience 27:1-12
131. Rhoades RW, nett-Clarke CA, Shi MY, Mooney RD (1994) Effects of 5-HT on thalamocortical synaptic transmission in the developing rat. J Neurophysiology 72:2438-50
132. Laurent A, Goaillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N (2002) Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. J Neuroscience 22:886-900
133. Bonnin A, Toriii M, Wang L, Rakic P, Levitt P (2007) Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. Nat Neuroscience 10:588-97
134. Nicol X, Muzerelle A, Rio JP, Metin C, Gaspar P (2006) Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J Neuroscience 26:862-72
135. Vitalis T, Parnavelas JG (2003) The role of serotonin in early cortical development. Dev Neuroscience 25:245-56
136. Stankovski L, Alvarez C, Ouimet T, Vitalis T, El-Hachimi KH, Price D, Deneris E, Gaspar P, Cases O (2007) Developmental cell death is enhanced in

the cerebral cortex of mice lacking the brain vesicular monoamine transporter. J Neuroscience 27:1315-24

137. Popa D, Lena C, Alexandre C, Adrien J (2008) Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. J Neuroscience 28:3546-54

138. Ansorge MS, Morelli E, Gingrich JA (2008) Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. J Neuroscience 28:199-207

139. Lisboa SF, Oliveira PE, Costa LC, Venancio EJ, Moreira EG (2007) Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. Pharmacology 80:49–56

140. Kalisnik M, Vraspir-Porenta O, Kham-Lindtner T, Logonder-Mlinsek M, Pajer Z, Stiblar-Martincic D, Zorc-Pleskovic R, Trobina M (1988) The interdependence of the follicular, parafollicular, and mast cells in the mammalian thyroid gland: a review and a synthesis. Am J Anat 183:148-57

141. Zbucki RL, Winnicka MM, Sawicki B, Szynaka B, Andrzejewska A, Puchalski Z (2007) Alteration of parafollicular (C) cells activity in the experimental model of hypothyroidism in rats. Folia Histochem Cytobiol 45:115-21

142. Mess B, Rúzsás C, Hayashi S (1989) Impaired thyroid function provoked by neonatal treatment with drugs affecting the maturation of monoaminergic and opioidergic neurons. Exp Clin Endocrinol 94:73-81

143. Ruzsás C, Hayashi S, Mess B (1994) Long-term effect of perinatal neurochemical lesions of brain monoaminergic neurons on body growth, growth hormone secretion and thyroid activity. Acta Biol Hung 45:419-26

8. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

- **Lavori in extenso**

1. **A.Spina**, S. Rea, V. Ma stellone, L. Avallone, L.M. Pavone. Fate map of serotononin transporter (SERT)- expressing cells in developing mouse thyroid. *Anatomical Record,* inviato per la pubblicazione 2010.
2. L.M. Pavone, **A. Spina**, S. Rea, D. Santoro, V. Mastellone, P. Lombardi, L. Avallone. Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta 1 signalling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47, 691–697, 2009.
3. L.M. Pavone, **A. Spina**, V. Mastellone, R. Lo Muto, E. Fiorillo, L. Avallone. Role of the serotonin transporter in heart valve development and disease. *Vet Res Commun* 33, 117-119, 2009.
4. L.M. Pavone, S. Tafuri, R. Lo Muto, **A. Spina**, A.E. Lychkova, V. Mastellone, A. Vittoria, L. Avallone, N. Staiano. Expression of the serotonin transporter SERT in the genital tract of cattle. *Regul Peptides* 154, 1-4, 2009.
5. S. Tafuri, L.M. Pavone, V. Mastellone, **A. Spina**, L. Avallone, A. Vittoria, N. Staiano, G. Scala. Expression of orexin A and its receptor 1 in the choroid plexuses from buffalo brain. *Neuropeptides* 43, 73-80, 2009.
6. L.M. Pavone, **A. Spina**, R. Lo Muto, D. Santoro, V. Mastellone, L. Avallone. Heart valve cardiomyocytes of mouse embryos express the serotonin transporter SERT. *Biochem Bioph Res Commun* 377, 419-422, 2008.
7. L.M. Pavone, P. Mithbaokar, V. Mastellone, R. Lo Muto, **A. Spina**, V. Maharajan, G. Paino, L. Avallone. Expression of the serotonin transporter (SERT) gene during mouse development. *Vet Res Commun* 32, 5167-5169, 2008.

- **Comunicazioni a congressi internazionali**

1. L.M. Pavone, L. M. Pavone; F. Trapani, **A. Spina**, S. Rea, L. Avallone, S. Papparella, O. Paciello. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of fibrosis in canine idiopathic inflammotory myopathies. Proceedings of the XII International Congress on Neuromuscolar diseases, 17-22 July 2010, Naples (Italy).

2. F. Cattaneo, S. Rea , **A. Spina**, L.M. Pavone, R. Ammendola. Intracellular signaling cascades triggered by FPRL1 in human prostate cells. Proceedings of the 35th FEBS Congress Molecules of Life, June 26-July 1, 2010, Göteborg (Sweden).

3. L.M. Pavone, **A. Spina**, R. Lo Muto, V. Mastellone, L. Avallone, A. Baldini. Serotonin transporter role in heart development focusing on cardiac valve and conduction system. Proceedings of the Bi-annual Meeting of the Working Group on Developmental Anatomy and Pathology, March 2008, Alberobello (Ba) (Italy), p. 40.

- **Comunicazioni a congressi nazionali**

4. **A. Spina**, S. Rea, E. Sauchelli, V. Mastellone, S. Tafuri, L. Avallone, L.M. Pavone. Espressione del trasportatore della serotonina SERT nello sviluppo della tiroide nel topo. Atti delle Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università di Napoli Federico II, Novembre 2010, Napoli.

5. S. Rea, F. Cattaneo, **A. Spina**, V. De Pasquale, S. Tafuri, R. Ammendola, L.M. Pavone. Il dominio NK1 di HGF conferisce proprietà invasive alle cellule epiteliali umane di prostata PNT1A. Atti delle Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università di Napoli Federico II, Novembre 2010, Napoli.

6. L.M. Pavone, V. Mastellone, S. Rea, F. Cattaneo, **A. Spina,** V. De Pasquale, R. Ammendola, L. Avallone. Il dominio NK1 del fattore di crescita epatocitario HGF promuove la trasformazione e la crescita neoplastica in cellule epiteliali di prostata umana. Atti del Congresso Nazionale So.Fi.Vet. 2010, 11 Giugno 2010, Torino.

7. **A. Spina**, D. Santoro, V. Mastellone, L. Avallone, L.M. Pavone. Ruolo del trasportatore della serotonina nella fibrosi cardiaca. Atti delle Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università di Napoli Federico II, Dicembre 2008, Napoli.

8. S. Tafuri, L.M. Pavone, E. Fiorillo, **A. Spina**, G. Andreozzi, R. Della Morte, P. Lombardi, N. Staiano, A. Vittoria. Espressione del trasportatore della serotonina (SERT) nell'apparato genitale del bovino. Atti del LXII Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Settembre 2008, San Benedetto del Tronto, pp. 37-38.

9. L.M. Pavone, **A. Spina**, V. Mastellone, R. Lo Muto, E. Fiorillo, L. Avallone. Ruolo del trasportatore della serotonina nella regolazione delle funzioni cardiovascolari. Atti del LXII Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Settembre 2008, San Benedetto del Tronto, pp. 89-90.

10. **A. Spina**, R. Lo Muto, D. Santoro, E. Fiorillo, S. Tafuri, R. Della Morte, L.M. Pavone, N. Staiano. Serotonin transporter (SERT) expression and role in mouse heart and brain development. Atti del Retreat del Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Eremo SS. Salvatore, Aprile 2008, Napoli, p. 25.