

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea in **Biologia Marina**

**Distribuzione dei neuroni che esprimono il peptide correlato al gene  
della calcitonina (CGRP) nel midollo spinale di Tursiope (*Tursiops  
truncatus*, Montagu, 1821)**

Tesi di laurea in **Adattamenti degli animali all'ambiente  
marino**

Relatore

Prof.ssa **Elena Fabbri**

Presentata da

**Valentina Caserta**

Correlatore

Prof. **Cristiano Bombardi**

II sessione

Anno Accademico 2013/2014

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>2. MIDOLLO SPINALE</b> .....	3
<b>2.1. Conformazione esterna</b> .....	3
<b>2.2. Conformazione interna e struttura</b> .....	7
2.2.1. Sostanza grigia .....	7
2.2.1.1. <i>Struttura della sostanza grigia</i> .....	9
2.2.1.2. <i>Laminazione</i> .....	10
2.2.1.3. <i>Nucleo cervicale laterale</i> .....	14
2.2.2. Sostanza bianca .....	14
2.2.2.1. <i>Cordone dorsale</i> .....	15
2.2.2.2. <i>Cordone laterale</i> .....	16
2.2.2.3. <i>Cordone ventrale</i> .....	18
2.2.2.4. <i>Fasci propriospinali</i> .....	19
2.2.2.5. <i>Fascicolo dorso-laterale (di Lissauer)</i> .....	19
<b>2.3. Caratteristiche del midollo spinale nei Cetacei</b> .....	20
<b>3. PEPTIDE CORRELATO AL GENE DELLA CALCITONINA</b> .....	22
<b>3.1. Struttura molecolare e meccanismo d’azione</b> .....	22
<b>3.2. Distribuzione e ruolo fisiologico del CGRP</b> .....	25
<b>4. OBIETTIVO DELLA RICERCA</b> .....	27
<b>5. MATERIALI E METODI</b> .....	27
<b>5.1. Colorazione istologica classica (tionina)</b> .....	27
<b>5.2. Immunoistochimica</b> .....	28
<b>5.3. Analisi dati</b> .....	29
<b>6. RISULTATI</b> .....	30
<b>6.1. Colorazione con tionina</b> .....	30
<b>6.2. Immunoistochimica</b> .....	32
6.2.1. Caratteristiche generali dell’immunoreattività per il CGRP .....	32
6.2.2. Distribuzione e caratteristiche morfologiche dei neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno dorsale .....	32
6.2.3. Distribuzione e caratteristiche morfologiche dei neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno ventrale .....	33
<b>7. DISCUSSIONE</b> .....	42
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	43

## 1. INTRODUZIONE

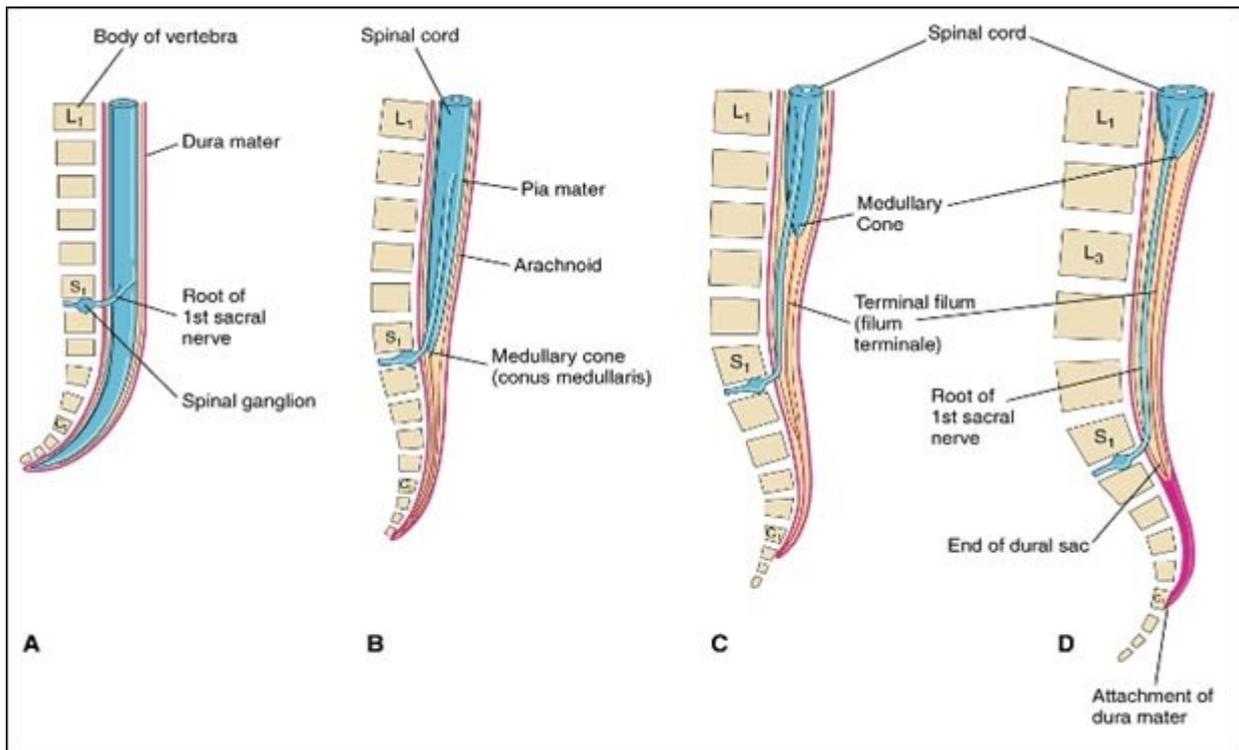
Il sistema nervoso è tradizionalmente suddiviso nel **sistema nervoso della vita di relazione** e nel **sistema nervoso autonomo**. Il sistema nervoso della vita di relazione comprende il **sistema nervoso centrale (SNC)** ed il **sistema nervoso periferico (SNP)**. Il SNC comprende l'**encefalo**, contenuto nella cavità cranica, ed il **midollo spinale**, alloggiato nel canale vertebrale. L'encefalo è composto, in direzione cranio-caudale, dal prosencefalo (suddiviso in telencefalo e diencefalo) e dal tronco encefalico (formato dal mesencefalo e rombencefalo, quest'ultimo costituito dal ponte e dal midollo allungato) a cui è annesso il cervelletto. Il SNP è rappresentato dai nervi cranici e spinali e dai gangli loro annessi. Il sistema nervoso autonomo si compone di tre parti principali, il simpatico (od ortosimpatico), il parasimpatico e l'enterico (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

## 2. MIDOLLO SPINALE

Il midollo spinale è la porzione allungata e cilindroide del SNC contenuta nel canale vertebrale. Esso è avvolto dalle meningi e si estende dal *foramen magnum* dell'osso occipitale alla regione sacrale. La sua lunghezza complessiva è in funzione delle dimensioni corporee. Il midollo spinale viene suddiviso, nei Mammiferi terrestri, in cinque tratti: cervicale, toracico, lombare, sacrale e coccigeo (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

### 2.1. *Conformazione esterna*

Il midollo spinale non è perfettamente cilindrico, ma è leggermente appiattito dorso-ventralmente e presenta due rigonfiamenti o intumescenze determinate da ammassi di pirenofori dai quali originano gli assoni che vanno a costituire i nervi destinati agli arti toracici e pelvici. La parte terminale del midollo spinale termina con il **cono midollare** che, a sua volta, si continua nel **filum terminale**. Nella sua parte più caudale il *filum terminale* viene rinforzato da una struttura meningeale simile alla **dura madre** che lo ancora all'ultimo tratto vertebrale (Figura 1).



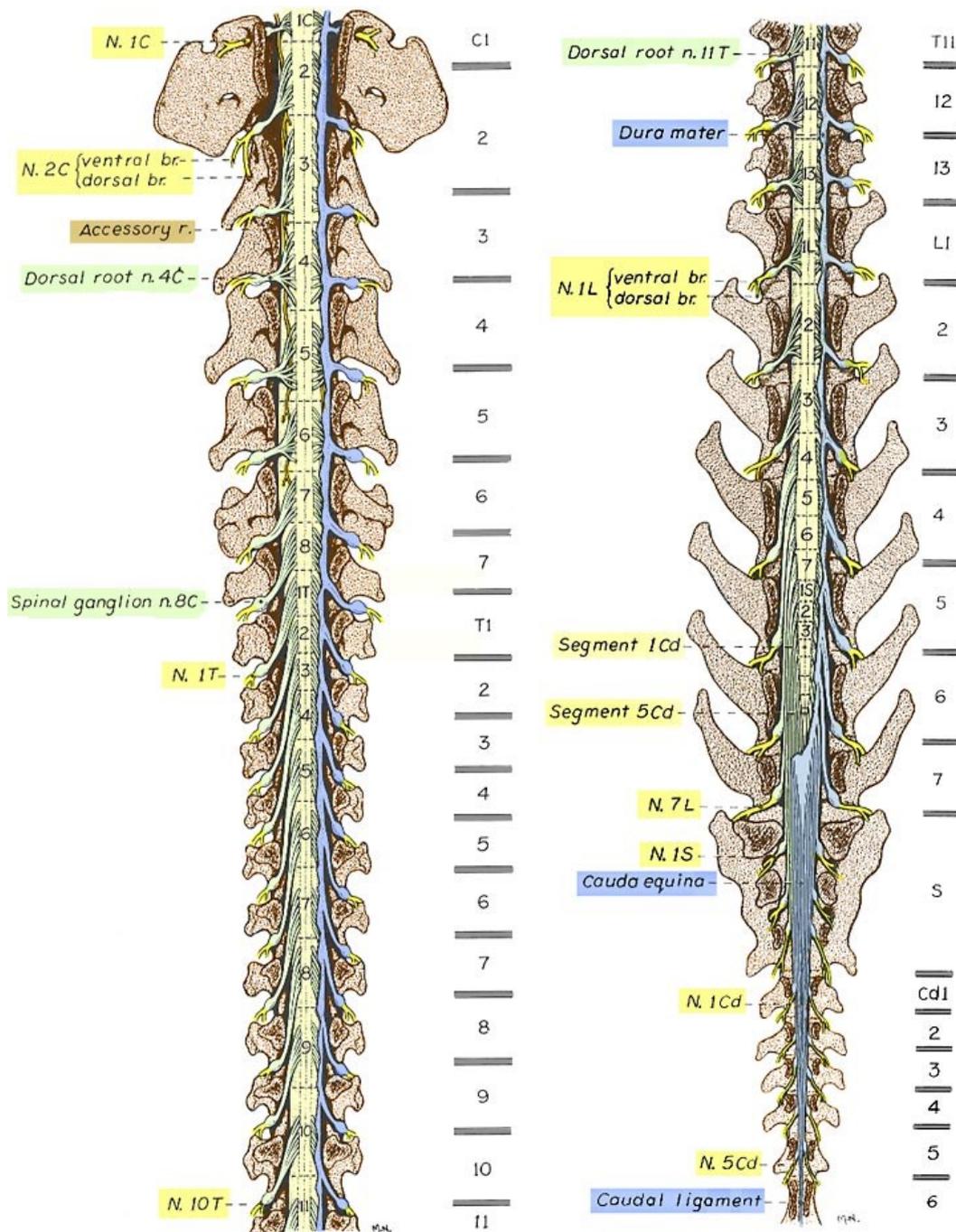
**Figura 1 - Crescita del midollo spinale e formazione della *cauda equina***

(<http://www.famema.br/ensino/embriologia/img/sistema-nervoso/tubo-neural/neurosubir7.gif>)

Da ciascun lato del midollo spinale si stacca una serie di coppie di radici appartenenti ai nervi spinali. Le radici di ciascuna coppia, una ventrale e l'altra dorsale, attraversano l'aracnoide e la dura madre e, a livello o in prossimità del corrispondente foro intervertebrale, si uniscono per formare il nervo spinale propriamente detto (che è, da un punto di vista funzionale, un nervo misto) (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Macroscopicamente, il tratto di midollo spinale connesso con una coppia di nervi spinali, uno per lato, è detto segmento spinale. Vi sono tanti segmenti spinali quanti sono i nervi spinali e vengono indicati come questi ultimi con la lettera maiuscola iniziale del tratto di midollo cui appartengono (Figura 2).

Poiché il midollo spinale è più corto della colonna vertebrale, le radici dei nervi spinali più caudali, per raggiungere i corrispondenti fori intervertebrali, discendono per tratti di varia lunghezza intorno al midollo ed oltrepassano il suo livello di terminazione: si viene così a formare, nella parte più caudale del canale vertebrale, un fascio di radici spinali divergenti, la *cauda equina* (Jenkins, 1989).



**Figura 2 - Midollo spinale di cane**

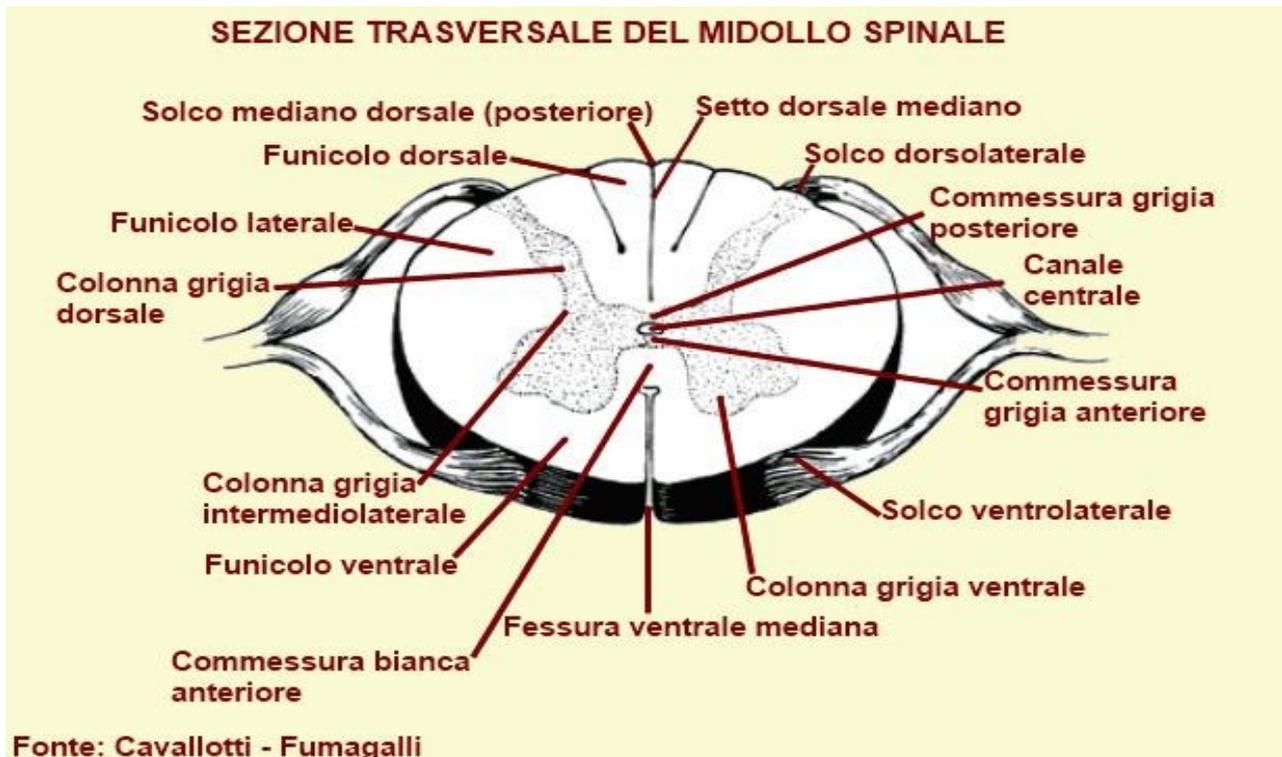
([http://1.bp.blogspot.com/-ftPmHOMvf4/TasIAJWLHeI/AAAAAAAAA\\_g/rA8jUMtD1Ko/s1600/diseagno%2Bcolonna.jpg](http://1.bp.blogspot.com/-ftPmHOMvf4/TasIAJWLHeI/AAAAAAAAA_g/rA8jUMtD1Ko/s1600/diseagno%2Bcolonna.jpg))

La superficie esterna del midollo spinale è percorsa, per la maggior parte della sua lunghezza, da fessure e solchi che nel complesso determinano la formazione di cordoni (Figura 3). La **fessura mediana** (*fissura mediana*), ventralmente, e il **solco mediano dorsale** (*sulcus medianus dorsalis*), dorsalmente, dividono quasi completamente il midollo spinale in due metà simmetriche, destra e sinistra (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). La fessura mediana si estende in profondità sulla superficie ventrale del midollo per tutta la sua lunghezza ed è delimitata

dorsalmente dalla **commessura bianca ventrale**, formata da fibre nervose a decorso trasversale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). Il solco mediano dorsale è meno profondo rispetto alla fessura precedente. Da esso si stacca un setto di nevroglia, il **setto mediano dorsale**, che si approfonda nella compagine del midollo per più della metà del suo diametro ventro-dorsale, giungendo a breve distanza dal canale centrale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Da entrambi i lati del solco mediano dorsale, si osserva il **solco laterale dorsale** (*sulcus lateralis dorsalis*) attraverso il quale entrano nel midollo spinale le radici dorsali (sensitive) dei nervi spinali, formate dai processi centrali delle cellule dei gangli spinali. Ai lati della fessura mediana ventrale troviamo, invece, i **solchi laterali ventrali** (*sulcus lateralis ventralis*) in corrispondenza dei quali emergono le radici ventrali (motorie) dei nervi spinali (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Il tratto di sostanza bianca compresa tra solco mediano dorsale e solco laterale dorsale è il **cordone dorsale** (*funiculus dorsalis*) del midollo spinale. Nei segmenti cervicali e quelli della prima metà craniale del tratto toracico, un altro solco longitudinale, il **solco intermedio dorsale**, percorre la superficie del cordone dorsale e indica la posizione di un setto gliale che, inoltrandosi nel cordone stesso, lo divide in due grossi fasci, uno mediale più ridotto, **fascicolo gracile**, l'altro laterale più esteso, il **fascicolo cuneato** (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). Tra la fessura mediana e il solco laterale dorsale troviamo due cordoni: il primo, denominato **cordone ventrale** (*funiculus ventralis*), si pone tra il solco laterale-ventrale e la fessura mediana, mentre il secondo, chiamato **cordone laterale** (*funiculus lateralis*), è compreso tra i solchi laterale-ventrale e laterale-dorsale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). A sua volta, il cordone laterale viene convenzionalmente diviso da un piano orizzontale passante per la sostanza grigia intermedia in una porzione dorsale o **cordone dorso-laterale**, posto tra il piano ora ricordato al solco laterale dorsale, e in una porzione ventrale o **cordone ventro-laterale** che si estende fino al solco laterale ventrale (Jenkins, 1989).



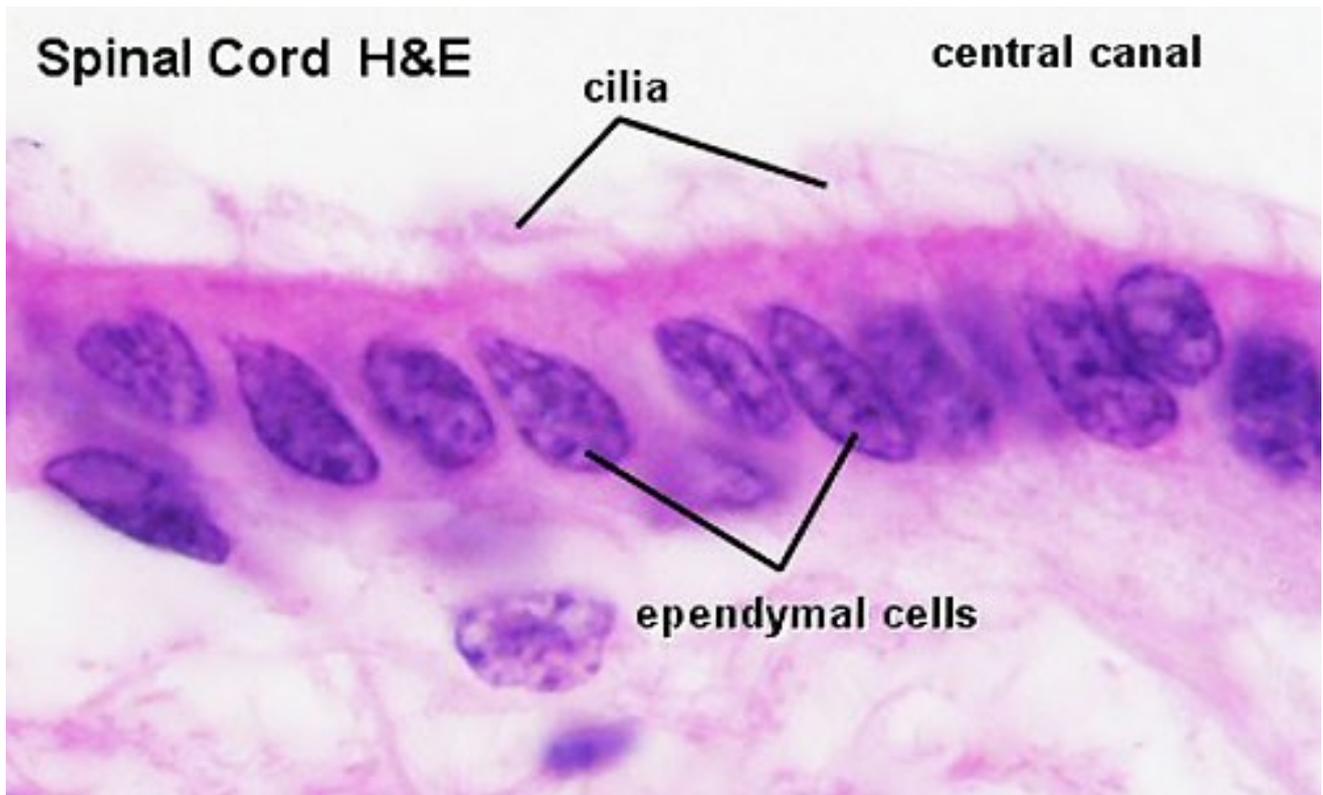
**Figura 3 - Disegno di una sezione trasversale di midollo spinale**

(<http://motricitascuola.altervista.org/attivita%20motoria/apparati%20interessati/immagini%20apparati/midollo.jpg>)

## *2.2. Conformazione interna e struttura*

### **2.2.1. Sostanza grigia**

La sostanza grigia occupa la parte centrale del midollo spinale, internamente alla sostanza bianca. Osservata in sezioni trasverse, appare costituita da due masse laterali simmetriche, una destra e una sinistra, ciascuna a forma di semiluna con concavità laterale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). Queste sono connesse da una stretta **commissura grigia trasversale**, all'interno della quale si può osservare il canale centrale del midollo spinale, definito anche **canale ependimale** (Figura 4).



**Figura 4 – Ependima presente nel canale centrale del midollo spinale**

([http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/images/b/b3/Spinal\\_cord\\_histology\\_10.jpg](http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/images/b/b3/Spinal_cord_histology_10.jpg))

La sostanza grigia, nel complesso, assume la forma della lettera H. Ciascuna massa laterale è costituita dalla colonna (corno) grigia ventrale, dalla colonna (corno) grigia dorsale. Tra corno dorsale e ventrale è presente la **sostanza grigia intermedia laterale** che medialmente si estende nella **sostanza grigia intermedia centrale**. Nel tratto toraco-lombare la sostanza grigia intermedia laterale genera un rilievo denominato **colonna (corno) laterale** (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Il corno dorsale è più stretto ed allungato di quello ventrale. Tale corno si estende con la sua parte più esterna detta “**zona spongiosa**” fin quasi alla superficie del midollo, avvicinandosi al solco laterale dorsale, da cui lo separa una sottile lamina di fibre nervose, il **fascicolo dorso-laterale di Lissauer** o **zona di Lissauer**. Procedendo ventro-dorsalmente, il corno dorsale può essere suddiviso in una base, un collo, una testa e un apice. La base è formata dalla parte espansa in continuità con la sostanza grigia intermedia; il collo si presenta alquanto ristretto; la testa è ampia, ovale e fusiforme, l’apice è incappucciato da tessuto di forma semilunare e semitrasparente (**sostanza gelatinosa di Rolando**), localizzato subito sotto alla zona spongiosa (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Le corna ventrali sono corte e larghe, e nelle sezioni trasversali si presentano di forma irregolarmente poligonale. Le loro estremità ventrali e dorsali sono dette rispettivamente testa e base (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Il corno laterale si presenta come una piccola sporgenza aguzza presente solo nei segmenti spinali toracici ed, in parte, lombari (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Nel midollo spinale, il limite tra sostanza bianca e sostanza grigia è piuttosto ben definito. Tuttavia, nel tratto cervicale, nastri di sostanza grigia protrudono dalla base del corno dorsale nel cordone laterale e vengono a trovarsi inframmezzati a fasci di fibre nervose, derivandone un aspetto simile a una rete, donde il nome **formazione reticolare**. Quest'ultima si continua nella formazione omonima del midollo allungato. E' interessante notare come formazioni simili si osservino anche nei livelli spinali più caudali (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### ***2.2.1.1. Struttura della sostanza grigia***

La sostanza grigia del midollo spinale è un insieme complesso di corpi e prolungamenti neuronali, di gliociti e di vasi sanguigni. L'aspetto grigio è dovuto alla prevalenza di pirenofori. La neuroglia (cellule gliali) forma un intricato reticolo di corpi e prolungamenti dei neuroni. I prolungamenti neuronali presenti nella sostanza grigia del midollo spinale comprendono: (1) l'inizio o la fine di assoni di fibre efferenti o afferenti del midollo spinale con tutti i loro rami collaterali; (2) gli assoni provenienti dai cordoni o diretti ai cordoni della sostanza bianca; (3) numerosi prolungamenti assonici o dendritici che restano confinati per la maggior parte del loro decorso nella sostanza grigia spinale, entrando in questo modo nella costituzione del neuropilo (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

I neuroni della sostanza grigia sono in genere multipolari (ma sono presenti anche neuroni fusiformi) e mostrano dimensioni varie. Tali cellule sono disposti in lamine e appartengono al tipo I o II di Golgi. Gli assoni dei neuroni del tipo I fuoriescono dalla sostanza grigia per portarsi nelle radici ventrali dei nervi spinali o in fasci di fibre della sostanza bianca dello stesso lato o, attraversata la commessura grigia, del lato opposto. Tali assoni tendono quindi a biforcarsi in un ramo ascendente, lungo, ed in un ramo discendente, di solito breve. Gli assoni dei neuroni del tipo II si esauriscono in prossimità del pirenoforo. Alcuni di questi assoni possono attraversare la commessura grigia e rimanere confinati nella sostanza grigia contro laterale. In questo caso i neuroni del tipo II vengono definiti commessurali. I neuroni del II tipo possono essere monosegmentari o polisegmentari. Nel primo caso, il loro assone rimane confinato all'interno di un

unico segmento spinale, mentre, nel secondo, l'assone si estende per alcuni segmenti (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

### **2.2.1.2. Laminazione**

Lo schema attualmente adottato per descrivere l'organizzazione della sostanza grigia del midollo spinale è stato originariamente proposto mediante studi sul midollo spinale di gatto (Rexed, 1952, 1954, 1964). Tale schema prevede un'organizzazione stratificata dei neuroni riconducibile a dieci lamine che si susseguono in direzione dorso-ventrale, e che si possono osservare per tutta la lunghezza del midollo stesso. Delle dieci lamine, nove appartengono a ciascun corno, mentre la decima è rappresentata dalla sostanza grigia disposta intorno al canale centrale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006). In ogni lamina, i neuroni presentano caratteristiche alquanto specifiche per quel che riguarda la loro distribuzione, morfologia ed orientamento (Figura 5).

**Lamina I:** si presenta come un sottile strato, dai limiti mal definiti, che incappuccia la testa del corno dorsale. È adiacente alla sostanza bianca nella quale possono sconfinare i suoi neuroni periferici. Ha un aspetto reticolato essendo attraversata da fasci di fibre nervose, mieliniche, grosse e sottili, che si incrociano secondo molte direzioni. I corpi cellulari contenuti hanno l'aspetto di cellule fusiformi, di piccole, medie e grandi dimensioni. Corrisponde alla zona spongiosa (o strato di Waldeyer). La lamina I riceve fibre afferenti primarie mieliniche (A $\delta$ ) che veicolano impulsi termici e dolorifici, e poche fibre amieliniche (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina II:** occupa la maggior parte della testa del corno dorsale ed è posta ventralmente alla lamina precedente. La lamina II è costituita da numerosi neuroni di piccole dimensioni e molto addensati. Tale lamina è facilmente distinguibile da quelle adiacenti, in quanto mostra un caratteristico aspetto gelatinoso (infatti comprende la maggior parte della sostanza gelatinosa di Rolando) dovuto alla pressoché completa assenza di fibre mieliniche. Gli assoni che si trovano in questa lamina la percorrono in direzione craniale e/o caudale e terminano nella stessa. A questo livello giungono solo fibre amieliniche (tipo C) che provengono dal fascicolo dorso-laterale e che veicolano impulsi termici, dolorifici, meccanici e meccanico-nocicettivi (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina III:** consta di pirenofori molto simili a quelli che formano la sostanza gelatinosa di Rolando, anche se più grandi e meno addensati. Per alcuni Autori infatti, anche questa lamina

partecipa a formare la sostanza gelatinosa. Contiene molte fibre mieliniche provenienti da recettori cutanei di vario tipo (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina IV:** più ispessita delle precedenti, è una zona eterogenea, a bassa densità neuronale e percorsa da molte fibre. I pirenofori variano molto per forma e dimensioni. Essi possono presentarsi di piccole dimensioni e sferoidali, di medie dimensioni e triangolari ed, infine, di grandi dimensioni e stellati. Alcuni neuroni, inoltre, possono mostrare un'arborizzazione dendritica assai estesa e che si estende nelle lamine più dorsali. Parte dei neuroni di tale lamina, assieme ad alcuni della lamina III, costituiscono il **nucleo proprio** del corno dorsale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina V:** spesso strato che comprende il collo del corno dorsale con un limite dorsale poco netto e uno ventrale molto evidente. Si può suddividere in una parte laterale (che comprende 1/3 di tutta la grandezza della lamina) e una parte mediale (che rappresenta i 2/3 rimanenti). Entrambe le parti sono caratterizzate da una popolazione eterogenea di corpi cellulari. La parte laterale contiene una gran quantità di grossi pirenofori frammisti a fasci di fibre mieliniche a decorso vario (trasversale, sagittale o longitudinale) che le conferiscono un aspetto reticolato. La lamina V riceve la maggior parte dei terminali delle fibre afferenti primarie propriocettive ed anche una gran quantità di fibre discendenti da aree motorie e sensitive della corteccia cerebrale e dai centri sottocorticali. Inoltre, nella lamina V sono presenti neuroni che inviano i loro assoni all'interno del fascio spino-talamico (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina VI:** ben evidente soltanto a livello delle intumescenze cervicale e lombare, corrisponde alla base del corno dorsale. Si compone di una porzione mediale più stretta (1/3 del totale), con piccoli neuroni fittamente addensati, e di una laterale più ampia (rappresentante i 2/3), con neuroni triangolari o stellati, più grandi e meno addensati. Questa lamina, al contrario di quanto si rileva nella V, si colora più intensamente nella parte mediale che nella laterale. Nella sua parte più interna giungono impulsi provenienti dalle afferenze primarie e secondarie dei fusi neuromuscolari, trasportati da grosse fibre mieliniche. La parte laterale riceve principalmente fibre discendenti (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

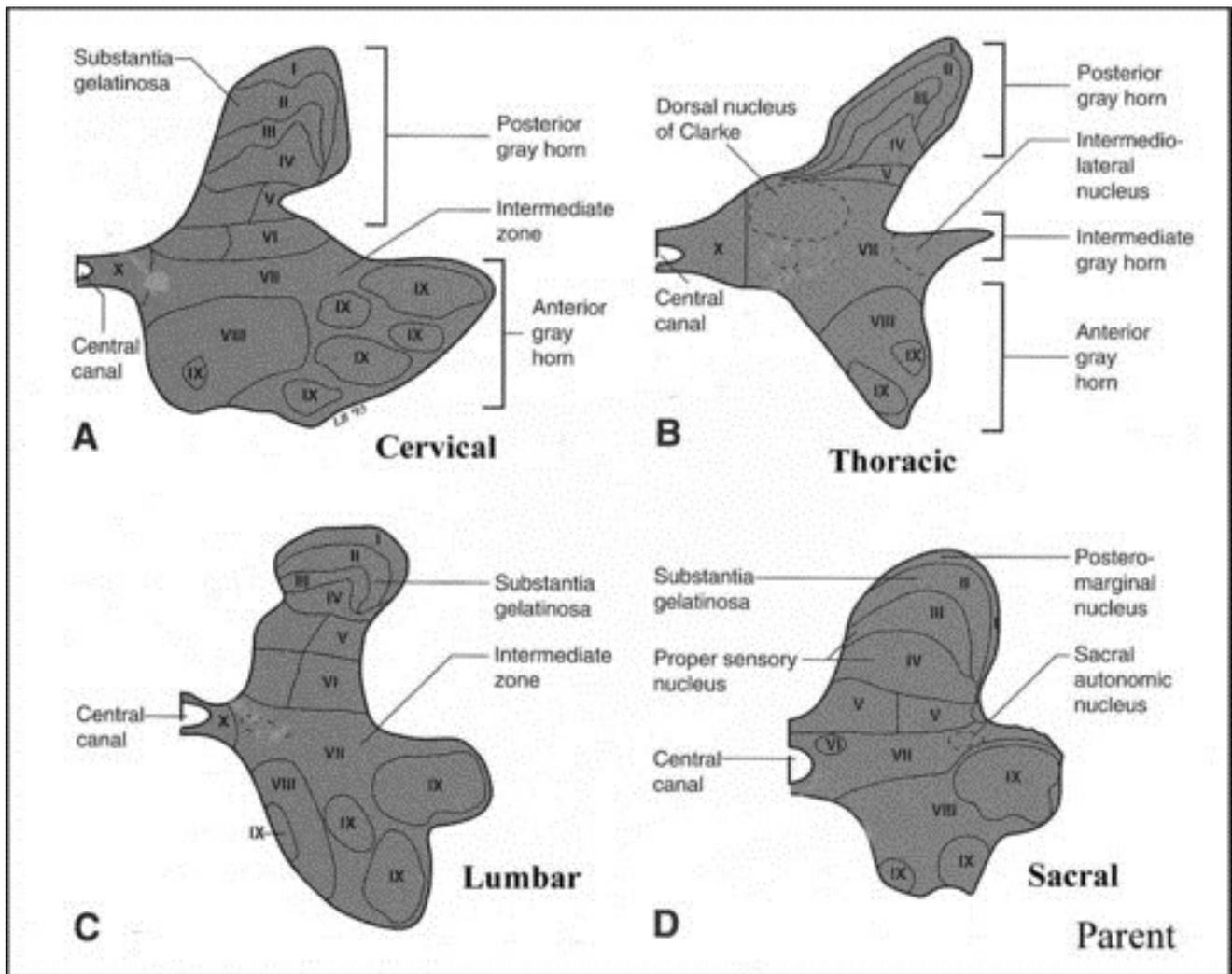
**Lamina VII:** corrisponde, in tutti i segmenti del midollo spinale, alla sostanza grigia intermedia laterale. Al suo interno è possibile individuare il **nucleo toracico (di Clark)** e, in determinati segmenti, i **nuclei intermedio laterale** (che corrisponde al nucleo laterale) e **intermedio mediale**. Sulle cellule del nucleo toracico terminano fibre che trasportano impulsi originatisi a livello delle terminazioni primarie e secondarie dei fusi neuromuscolari e degli organi tendinei di Golgi e che viaggiano nel fascicolo gracile. Nel nucleo intermedio mediale giungono

fibre radicolari che convogliano afferenze viscerali. Le cellule del nucleo intermedio laterale sono visceromotori pregangliari simpatici. Nella parte ventrale della lamina VII sono presenti piccoli interneuroni inibitori detti **cellule di Ranshaw**, che contraggono sinapsi con gli  $\alpha$ -motoneuroni. Le restanti parti della lamina contengono una popolazione piuttosto omogenea di corpi neuronali a morfologia triangolare o stellata e di media grandezza (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina VIII:** è posta nella base del corno ventrale, ventralmente alla lamina VII. La lamina VIII mostra un'estensione variabile e contiene una popolazione di pironofori eterogenea per forma e per dimensioni (da piccoli a medi). In essa risiedono numerosi neuroni propriospinali che ricevono informazioni da numerose sedi, quali: fibre originate da assoni localizzati nelle lamine vicine; fibre commessurali provenienti dalla lamina VIII controlaterale; arborizzazioni dendritiche di motoneuroni della lamina IX e, infine, terminazioni di fibre appartenenti a fasci discendenti, quali il tetto-spinale, il reticolo-spinale pontino, il vestibolo-spinale laterale e il longitudinale mediale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina IX:** è la sede dei **motoneuroni  $\alpha$**  e  $\gamma$ . I motoneuroni  $\alpha$  sono di grandi dimensioni ed danno origine ad assoni che si portano alle fibre muscolari extrafusali. I motoneuroni  $\gamma$  sono di dimensioni minori rispetto ai precedenti ed innervano le fibre muscolari intrafusali (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

**Lamina X:** è la parte di sostanza grigia che circonda il canale centrale e che comprende la commessura grigia. Questa lamina è costituita da neuroni di piccole dimensioni, disposti irregolarmente. In essa giungono afferenze primarie dai visceri che veicolano informazioni dolorifiche di origine meccanica e termica (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).



**Figura 5 - Disposizione delle lamine della sostanza grigia nei vari tratti del midollo spinale di Uomo**  
[http://o.quizlet.com/i/P19P\\_R436US9yVqLHVlepA.jpg](http://o.quizlet.com/i/P19P_R436US9yVqLHVlepA.jpg)

L'organizzazione della sostanza grigia è in stretta correlazione con quella della sostanza bianca e delle radici nervose. Lo studio delle lamine e delle loro connessioni ha permesso un approccio più preciso dei meccanismi, mediante i quali le afferenze vengono tradotte in reazioni adeguate. Schematizzando, è possibile proporre alcuni principi:

1. Ogni stimolo utilizza specifiche fibre, le cui terminazioni si distribuiscono a una o più lamine ben definite. Inoltre, quelle filogeneticamente più primitive terminano nelle lamine più dorsali, mentre quelle più evolute, giungono alle lamine più ventrali.

2. Le fibre che assicurano proiezione ai centri superiori hanno un'origine differente per ciascun tipo di stimolo e sono situate in una o più lamine; in questo modo, i neuroni ricevono impulsi di diversa provenienza. L'attività di questi ultimi è controllata, simultaneamente, sia dagli interneuroni di altre lamine sia dalla terminazione di fibre discendenti dai centri superiori.

3. I motoneuroni rappresentano gli effettori terminali della maggior parte delle lamine e delle fibre provenienti dai centri superiori. Sono sotto il controllo degli interneuroni.

4. Ogni lamina possiede un notevole contingente di interneuroni. Essi modulano la ripartizione e la propagazione degli impulsi a tutti i livelli, mediante una modificazione dell'equilibrio delle influenze facilitatorie ed inibitorie.

5. Generalmente, possono esistere delle relazioni afferenza-efferenza limitate ad un solo segmento. In realtà, la maggior parte degli impulsi è plurisegmentaria, sia a causa della suddivisione delle fibre afferenti stesse, sia a causa dell'intervento degli interneuroni (Jenkins, 1989).

### **2.2.1.3. Nucleo cervicale laterale**

Il *nucleus cervicalis lateralis* è formato da una sottile colonna di neuroni situata nel cordone laterale, ventrolateralmente al corno dorsale. Si estende nei primi segmenti cervicali e nella parte caudale del midollo allungato. Non ben visibile in tutte le specie, tale struttura appare come un esile cordone composto da gruppi di neuroni dispersi. Questi ultimi sono di due tipi: grossi di forma ovoidale e piccoli a contorno regolare, provvisti di grossi dendriti (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

Il nucleo cervicale laterale riceve numerose fibre che provengono dal midollo spinale e che, insieme, formano il tratto spinocervicale. Questo tratto veicola gli impulsi che provengono dai recettori dei follicoli piliferi, dalle terminazioni mecano-termocicettive e dai visceri. Sono state dimostrate efferenze provenienti dalla formazione reticolare parvocellulare del midollo allungato e dal nucleo del tratto spinale del nervo trigemino. Le sue proiezioni avvengono mediante il tratto cervicotalamico sul nucleo ventrale caudale del talamo del lato opposto. (Kitai et al., 1965; Truex et al., 1970; Rexed and Brodal, 1951; Brodal and Rexed, 1953; Busch, 1961; Brodal, 1969; Barr, 1974; Peele, 1977; Noback and Demarest, 1977).

### **2.2.2. Sostanza bianca**

La sostanza bianca del midollo spinale consta di fibre nervose, nevroglia e vasi sanguigni. Essa circonda la sostanza grigia e il suo colore bianco è dovuto all'alta percentuale di fibre nervose mieliniche. Le fibre nervose della sostanza bianca sono di vario calibro molte delle quali sono sottili e amieliniche. Per la maggior parte sono organizzate in fasci longitudinali, alcuni dei quali possono essere distinti per il diametro delle fibre che li costituiscono. Nella maggior parte delle regioni della sostanza bianca si rileva un ampio spettro di diametri delle fibre, da 1  $\mu\text{m}$ , o meno, fino a circa 10  $\mu\text{m}$  di diametro. In passato, la maggior parte delle informazioni sui fasci del midollo spinale è stata

desunta dagli studi, condotti su varie specie animali, eseguiti lesionando selettivamente il midollo spinale, le radici dorsali dei nervi spinali, o specifiche aree dell'encefalo che proiettano al midollo spinale. Mediante questi studi di degenerazione anterograda e retrograda, è stato possibile individuare non solo la posizione dei pirenofori da cui originano le fibre dirette al midollo spinale, ma anche l'esatta sede di terminazione delle fibre nel midollo stesso. Più recentemente, è stato possibile dimostrare, in animali da esperimento, l'origine, il decorso e la terminazione delle fibre del midollo spinale per mezzo di un gran numero di tecniche fondate sull'impiego di traccianti a trasporto retrogrado e/o anterogrado. Tra i traccianti impiegati si ricordano: la perossidasi di rafano (HRP); l'agglutinina di germe di grano (WGA) coniugata con HRP; i coloranti fluorescenti o composti marcati con sostanze fluorescenti; alcune lectine e altre sostanze trasportate da flussi assoplasmatici (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

I fasci nervosi della sostanza bianca del midollo spinale possono presentare vari comportamenti:

- nascere e terminare nel midollo spinale stesso (**fasci propriospinali**), stabilendo connessioni, intrasegmentali o intersegmentali, tra i neuroni della sostanza grigia;
- originare da pirenofori localizzati nella sostanza grigia del midollo spinale e dirigersi a diversi settori dell'encefalo (**fasci sopra spinali** o **fasci ascendenti**);
- provenire da centri sopraspinali che, istituendo sinapsi con neuroni spinali, possono influenzare motoneuroni somatici, viscerali, sensitivi primari e secondari (**fasci discendenti**);
- provenire dalle radici dorsali dei nervi spinali e proseguire nella sostanza bianca per tratti di varia lunghezza;
- giungere da neuroni radicolari delle corna ventrali della sostanza grigia e fuoriuscire dal midollo con le radici ventrali di nervi spinali (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

I fasci del midollo spinale vengono suddivisi in gruppi basandosi sulla divisione in cordoni della sostanza bianca. Di conseguenza, è possibile riconoscere i fasci appartenenti ai cordoni dorsale, laterale e ventrale (Figura 6).

### ***2.2.2.1. Cordone dorsale***

Ciascun cordone dorsale contiene due voluminosi fasci formati entrambi da fibre ascendenti: il fascicolo gracile, presente in tutti i tratti del midollo spinale, ed il fascicolo cuneato, presente in tutto il tratto cervicale e nella prima metà di quello toracico. I due fasci sono separati dal solco intermedio-dorsale. I sistemi lunghi del fascicolo gracile si portano al nucleo gracile, mentre quelli

del fascicolo cuneato proiettano ai nucleo cuneato laterale e mediale. I sistemi lunghi dei fascicoli gracile e cuneato trasportano soprattutto informazioni relative al senso cinestesico (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### **2.2.2.2. Cordone laterale**

E' il più grande dei tre cordoni e presenta la maggior parte dei fasci ascendenti e discendenti del midollo spinale.

Tra i numerosi fasci di questo cordone troviamo:

##### **- Fasci ascendenti**

*Fascio spino-cerebellare dorsale.* E' un fascio diretto che nasce da neuroni situati delle lamine V, VI e VII (nucleo toracico). Dopo aver percorso tutto il midollo spinale penetra nel cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare caudale, terminando nelle parti caudale e rostrale dell'emiverme ipsilaterale. Questo fascio veicola informazioni propriocettive incoscienti provenienti dall'arto pelvico e dalla metà caudale del tronco (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino-cerebellare ventrale.* Tale fascio è costituito da fibre crociate che originano da neuroni posti nelle lamine V, VI e VII. Entra nel cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare rostrale, per terminare nella parte rostrale dell'emiverme cerebellare. Il fascio spino-cerebellare ventrale, analogamente al precedente, veicola informazioni propriocettive incoscienti provenienti dall'arto pelvico e dalla metà caudale del tronco (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino cerebellare rostrale.* Descritto nei Carnivori, tale fascio origina da neuroni presenti nel nucleo cervicale centro basale, situato nella lamina VII, e termina nella corteccia cerebellare dopo aver attraversato il peduncolo cerebellare caudale e rostrale. Trasporta informazioni propriocettive incoscienti provenienti dagli arti toracici (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino-reticolare.* Le fibre spino-reticolari ascendono, frammiste in parte a fibre spino-talamiche, nella parte ventrale e centrale del cordone laterale. Gran parte degli assoni dei neuroni spino-reticolari, originati dalle lamine VII e VIII, scorrono sia nella parte ipsilaterale che controlaterale, per terminare poi diffusamente nella formazione reticolare. Il fascio spino-reticolare trasporta impulsi esterocettivi di qualsiasi tipo (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino-mesencefalico.* Tale fascio raggruppa un certo numero di fasci ascendenti che, originati da pirenofori delle lamine I, IV e V, proiettano a varie regioni del mesencefalo. Tra questi vi sono il fascio spino-tettale, che proietta al collicolo rostrale, e il fascio spino-anulare. Le fibre del fascio spino-mesencefalico terminano nel grigio periacqueduttale, nel nucleo parabrachiale, nei nuclei pretettali e nel nucleo di Darkschewitsch. Il fascio spino-mesencefalico veicola impulsi di natura nocicettiva ed interviene assieme al grigio periacqueduttale nella regolazione dell'intensità delle afferenze nocicettive (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino-talamico.* I corpi neuronali da cui originano gli assoni del fascio spino-talamico sono controlaterali e si trovano nelle lamine I, IV, V, VII, VIII e X. Le fibre di tale fascio raggiungono il cordone laterale del lato opposto attraverso la commessura bianca ventrale, per poi ascendere verso il talamo (parte caudale del nucleo ventroposterolaterale), dove terminano. Questo fascio trasporta informazioni tattili, termiche e dolorifiche (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio spino-cervicale.* Il nucleo cervicale laterale, che si trova nel cordone laterale, riceve fibre dal fascio spino-cervicale, il quale origina da neuroni delle lamine I, III, IV, V e ascende nella parte dorsale del cordone laterale, ipsilateralmente rispetto alle lamine di origine ed al nucleo di terminazione (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio cervico-talamico.* Formato dagli assoni dei neuroni del nucleo cervicale laterale che, decorrendo nel lemnisco mediale, proiettano al talamo controlaterale, in particolar modo alla parte caudale del nucleo ventroposterolaterale. Questo fascio, assieme a quello spino-cervicale, forma la via spino-cervico-talamica. Nel complesso la via spino-cervico-talamica trasmette informazioni tattili, termiche e dolorifiche (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### - **Fasci discendenti**

*Fascio rubro-spinale.* Le fibre di questo fascio, originate dal nucleo rosso (raggruppamento neuronale di forma ovoidale posto nel mesencefalo), si incrociano a livello mesencefalico e discendono nel midollo spinale per distribuirsi ai neuroni delle lamine V e VII. Il fascio rubro-spinale eccita i motoneuroni che innervano i muscoli flessori ed inibisce quelli destinati ai muscoli estensori (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio cortico-spinale.* Le fibre cortico-spinali originano da neuroni della corteccia cerebrale e proiettano ai neuroni del midollo spinale. Le fibre di questo fascio originano, sulla faccia ventrale del midollo allungato, da ciascun lato della fessura mediana, un rilievo triangolare ben evidente denominato piramide. A livello della giunzione tra bulbo e midollo spinale, una parte delle fibre

cortico-spinali della piramide si incrocia sul piano sagittale mediano (decussazione delle piramidi) e discende poi nel cordone laterale del lato opposto, costituendo il fascio cortico-spinale laterale. La parte di fibre che non decussa prosegue nel cordone ventrale come fascio cortico-spinale ventrale. Il fascio cortico-spinale termina nelle lamine III, IV, V, VI e VII e ha funzione eccitatoria sui motoneuroni destinati ai muscoli flessori ed inibitoria per quella dei muscoli estensori (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fibre ipotalamo-spinali.* Originano dal nucleo paraventricolare e da altre aree ipotalamiche, discendono nel midollo spinale ipsilaterale e terminano nel nucleo intermedio laterale delle lamine I, II e III (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio reticolo-spinale laterale.* Strettamente associato ai fasci rubro-spinale e cortico-spinale laterale, è formato da fibre che originano da neuroni della sostanza reticolare del midollo allungato e terminano nelle lamine VII, VIII e IX, ipsilaterali e controlaterali. Il fascio reticolo-spinale laterale eccita i motoneuroni che innervano i muscoli flessori ed inibisce quelli per i muscoli estensori (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

### 2.2.2.3. Cordone ventrale

Questo cordone presenta, nei mammiferi domestici, numerosi fasci discendenti e un solo fascio ascendente.

#### - Fascio ascendente

*Fascio spino-olivare ventrale.* In alcuni animali (gatto, coniglio, maiale), questo fascio origina da neuroni delle lamine IV, V, VII e VIII del midollo spinale, ascende ipsilateralmente nel cordone ventrale e termina in specifiche aree dei nuclei olivari accessori mediale e ventrale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### - Fasci discendenti

*Fascicolo longitudinale mediale.* È un piccolo fascio compatto che decorre in prossimità del piano mediano del cordone ventrale. Le sue fibre originano da una serie di nuclei posti a livello di rombencefalo e mesencefalo. Le fibre del fascicolo longitudinale mediale che discendono nel midollo spinale sono le seguenti: (a) fibre vestibolo-spinali mediali, in parte crociate e in parte dirette, che originano dai nuclei vestibolari mediale, rostrale, caudale e terminano nei primi segmenti toracici; (b) fibre reticolo-spinali ventrali, che originano dalla formazione reticolare del ponte e terminano ipsilateralmente e contro lateralmente nelle lamine VII, VII e IX. Tali fibre eccitano i motoneuroni che innervano i muscoli estensori; (c) fibre tetto-spinali, le quali originano negli strati intermedio e profondo del collicolo rostrale per terminare nei neuroni delle lamine VI e

VII del midollo spinale; (d) fibre interstizio-spinali, che originano dai neuroni del nucleo interstiziale (di Cajal) e terminano nelle lamine VII, VIII e IX del midollo spinale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

*Fascio vestibolo spinale laterale.* Le sue fibre originano da neuroni piccoli e grandi del nucleo vestibolare laterale ipsilaterale e terminano principalmente nelle lamine VII, VIII e IX. L'attivazione di questo fascio induce la stimolazione dei motoneuroni che innervano i muscoli estensori degli arti (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

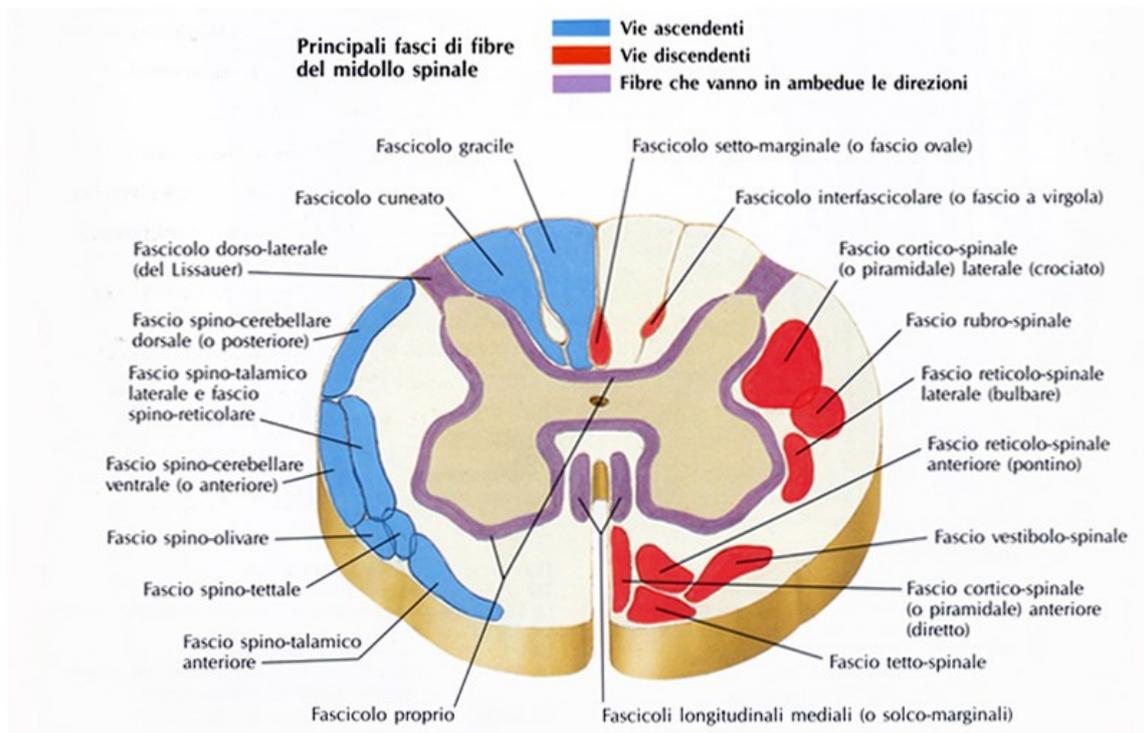
*Fascio solitario-spinale.* Formato da un piccolo gruppo di fibre che traggono origini da neuroni del nucleo del fascio solitario e terminano in diverse zone del midollo spinale (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### ***2.2.2.4. Fasci propriospinali***

In ciascun cordone del midollo spinale è presente un fascio propriospinale. Questi fasci originano da neuroni localizzati nella sostanza grigia del midollo spinale. Tali neuroni possono essere considerati neuroni internucleari in grado di connettere tra loro diversi segmenti spinali. Il sistema propriospinale permette di coordinare l'attività motoria degli arti toracici con quella degli arti pelvici. In aggiunta, interviene nel regolare numerose attività svolte dal sistema nervoso autonomo (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).

#### ***2.2.2.5. Fascicolo dorso-laterale (di Lissauer)***

Il fascicolo dorso-laterale, posto nella stretta area di sostanza bianca dorsale alla zona spongiosa del corno dorsale, è costituito da esili fibre mieliniche e amieliniche. Una parte delle fibre proviene dalle radici dorsali, mentre un'altra parte è formata da fibre proprio-spinali provenienti da neuroni localizzati nella lamina I (Bortolami e Callegari, 1999; Barone e Bortolami, 2006).



**Figura 6 - Schema della disposizione dei fasci presenti nella sostanza bianca del midollo spinale**

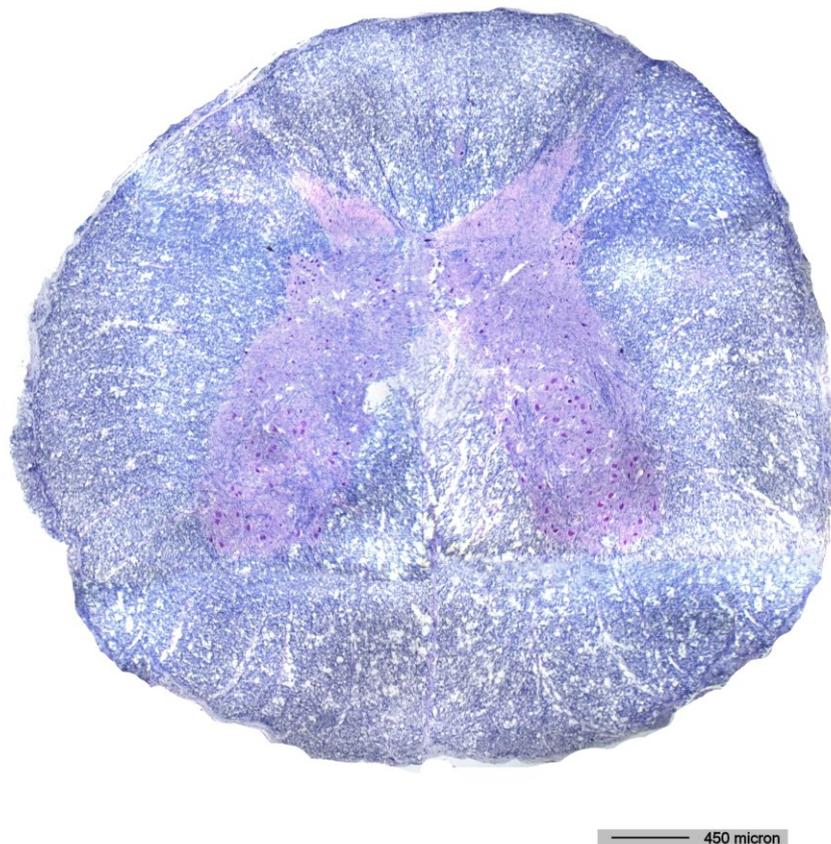
([http://medicinapertutti.altervista.org/anatomia\\_normale/anatomia\\_microscopica/img\\_anatomia\\_microscopica/fasci\\_del\\_midollo\\_spinale.jpg](http://medicinapertutti.altervista.org/anatomia_normale/anatomia_microscopica/img_anatomia_microscopica/fasci_del_midollo_spinale.jpg))

### ***2.3. Caratteristiche del midollo spinale nei Cetacei***

Le conformazioni esterna e interna descritte nei capitoli precedenti si possono ritrovare nel midollo spinale dei Cetacei, ma con alcune differenze. La prima caratteristica saliente riguarda le dimensioni delle corna dorsali, le quali mostrano, in rapporto alle ventrali, dimensioni assai ridotte rispetto a quanto si osserva negli altri Mammiferi, soprattutto nei tratti lombare e caudale (Figura 7). A questo livello, infatti, nelle corna ventrali sono ubicati numerosi motoneuroni inferiori che innervano i potenti muscoli epiassiali ed ipoassiali (Cozzi, 2005).

Nei Cetacei l'assenza dell'osso sacro permette di dividere il midollo spinale in soli quattro tratti: cervicale, toracico, lombare e coccigeo (o caudale) (Berta et al., 2005). La lunghezza del midollo spinale dei Cetacei varia molto in base alle dimensioni dell'animale. Generalmente c'è un rapporto tra lunghezza del corpo e del midollo spinale di 4:1. Tale rapporto è assai simile a quello riscontrato nell'Uomo (Jensen and Jensen, 1969).

Nei Cetacei la presenza di arti toracici di dimensioni modeste e provvisti di scarsa motilità (praticamente solo i muscoli della spalla mostrano un'evidente sviluppo) determina la presenza di un'intumescenza cervicale piuttosto ridotta. A causa dell'assenza degli arti pelvici, l'intumescenza lombare è pressoché assente. Un'altra peculiarità del midollo dei Cetacei è l'assenza del canale centrale del midollo spinale il quale è sostituito da una *rete mirabile* che lo attraversa per tutta la lunghezza (Cozzi, 2005). I fasci presenti nella sostanza bianca sono assai simili a quelli presenti nei Mammiferi terrestri; l'unica eccezione è rappresentata dal fascio cortico-spinale ventrale, il quale è molto più sviluppato nei Cetacei. Anche i nervi spinali non hanno caratteristiche peculiari, se non il maggiore sviluppo delle radici ventrali. Nei Delfinidi si riscontrano dalle 40 alle 44 paia (Flanigan, 1966).



**Figura 7 – Midollo spinale di tursiopo (tratto caudale). Notare il ridotto sviluppo delle corna dorsali rispetto a quelle ventrali. Colorazione: ematossilina-eosina (Preparato originale Prof. Cristiano Bombardi)**

### 3. PEPTIDE CORRELATO AL GENE DELLA CALCITONINA

#### 3.1. *Struttura molecolare e meccanismo d'azione*

Il peptide correlato al gene della calcitonina (*calcitonin gene-related peptide - CGRP*) è formato da 37 amminoacidi, generato dallo *splicing* alternativo del gene della calcitonina (Figura 8). Esso è contenuto in cellule specifiche presenti nel sistema endocrino, in particolare nelle cellule C della tiroide, e nei neuroni del sistema nervoso sia centrale che periferico (Amara et al., 1982; Morns et al., 1984; Rosenfeld et al., 1983, 1984). Il gene è formato da sei esoni, la cui sequenza all'interno dell'mRNA discrimina il tipo di prodotto che si otterrà alla fine della sintesi; cioè, se gli esoni contenuti saranno quelli compresi dall' 1 al 4, si otterrà la calcitonina, se invece il messaggero sarà formato dagli esoni 1, 2, 3, 5 e 6 si otterrà il CGRP (van Rossum et al., 1997).

La regolazione dell'espressione del gene calcitonina/CGRP è di tipo ormonale e biochimica. I due principali regolatori sono, rispettivamente, i glucorticoidi (Tverberg et al., 1992) e il cAMP (Wind et al., 1993). Leff et al. (1987) hanno proposto che la sintesi della calcitonina sia la via standard di espressione del gene; per questa ragione, lo *splicing* alternativo che porta alla sintesi del CGRP richiederà un fattore neuronale dominante. Esso sembra identificarsi in un componente proteico dello spliceosoma, l'SmN, in quanto proteina espressa solo in un limitato range di tessuti e cellule, come cervello e cuore (Latchman, 1990; Leff et al., 1987), dove effettivamente il CGRP sembra prevalere sulla calcitonina. Il processo sopradescritto deve essere ancora completamente compreso; sembra, comunque, che la sola inclusione dell'esone 4 richiami un accettore dotato di un braccio uridinico specifico per la calcitonina e che la coda poli (A) terminale dello stesso esone abbia un effetto regolatore intrinseco sullo *splicing* (Adema et al., 1990; Bovenberg et al., 1989; Cote et al., 1992; Emerson et al., 1989).

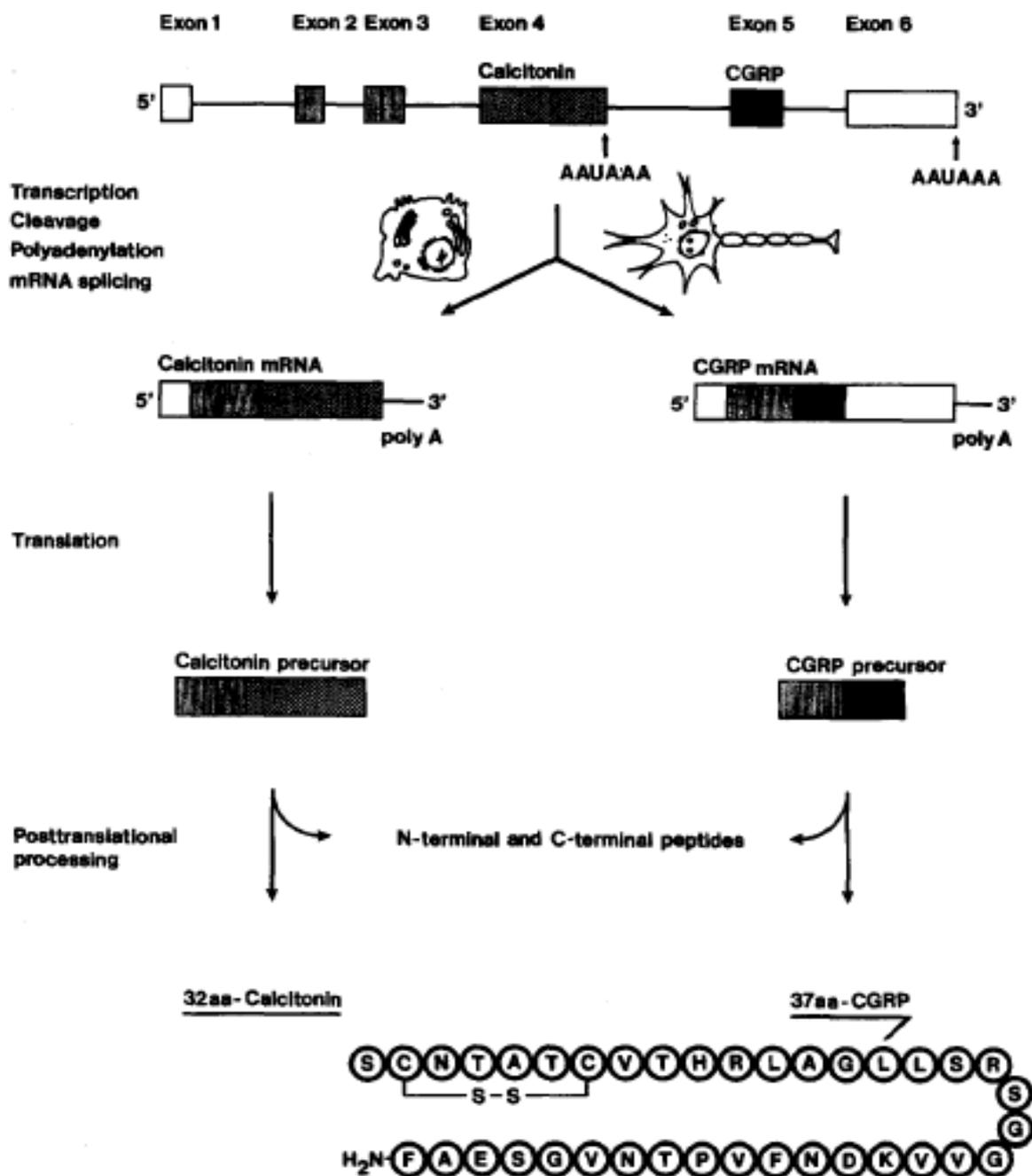


Figura 8 - Splicing alternativo del gene della calcitonina (van Rossum et al., 1997)

E' stato identificato un ulteriore mRNA, scoperto nel cervello e nella tiroide del ratto, che codifica per un peptide che si differenzia di uno (Uomo) o tre (ratto) amminoacidi dall'  $\alpha$ CGRP: il  $\beta$ CGRP (Amara et al., 1985). Esso non deriva da un meccanismo di espressione alternativo, ma da un secondo gene isolato dalla libreria cosmidica (Steenbergh et al., 1986). Se si considera la totalità del sistema nervoso, la distribuzione delle due isoforme del CGRP e dei loro recettori è simile (Amara et al., 1985) ma, nello specifico, ci sono forti differenze, soprattutto a livello di neuroni sensitivi primari (Mulderry et al., 1988), di neuroni intrinseci enterici (Sternini et al., 1992) e di

ipotalamo (Henke et al., 1987). Nei motoneuroni spinali di ratto sottoposti ad assotomia o blocco del flusso assonico i livelli di mRNA per l' $\alpha$ CGRP aumentano in concomitanza alla diminuzione o all'alterazione dell'espressione del  $\beta$ CGRP, (Katoh et al., 1992; Piehl et al., 1993; Saika et al., 1991). Inoltre, è stato dimostrato che il  $\beta$ CGRP ha attività biologiche distinte come la soppressione della secrezione gastrica (Beglinger et al., 1988, 1991).

$\alpha$ - $\beta$ CGRP appartengono ad una famiglia ben conservata di neuropeptidi, la quale include la calcitonina, l'adrenomedullina, con cui condivide il 25% delle sequenze omologhe, e l'amilina, il cui grado di omologia è del 50% (van Rossum et al., 1997; Wimalawansa, 1997; Jacques et al., 2000).

Chang et al.(1993) e Aiyar et al. (1996) hanno descritto un recettore proteina G-dipendente per il CGRP, denominato *calcitonin receptor-like receptor (CRLR)*. Il CRLR non è un recettore funzionale indipendente, ma richiede l'assistenza di due proteine accessorie: il *receptor component protein (RCP)* che associa il CRLR alla via di segnalazione cellulare, scatenata dallo stimolo infiammatorio (Luebke et al., 1996; Rosenblatt et al., 2000; Evans et al., 2000), ed il *receptor activity-modifying protein (RAMPs)*, la quale agisce come proteina accompagnatrice per il CRLR, conferendo a quest'ultimo la specificità farmacologica (McLatchie et al., 1998). Ad esempio, quando è coespresso con RAMP1, il CRLR acquisisce un'alta affinità con  $\alpha$ CGRP, mentre, quando è coespresso con RAMP2, il CRLR è affine all'adrenomedullina (Ma et al., 2003).

Ma et al. (2003) e Pokabla et al. (2002) hanno osservato che l'RCP è altamente espresso nei neuroni dei gangli spinali e in quelli del corno dorsale del midollo spinale. Quest'ultimo è il sito che contiene la maggior parte delle terminazioni degli assoni afferenti primari, fonte principale del CGRP. Questo neuropeptide, in particolare, si trova soprattutto nelle fibre afferenti di tipo C (prive di guaina mielinica) e di tipo A $\delta$  (provviste di una sottile guaina mielinica) localizzati nelle lamine I e II (Light e Perl, 1979; Sugiura et al. 1987; Assas et al., 2014). Il sottile diametro rende queste fibre gli elementi più sensibili di tutto il sistema nervoso, diventando la prima categoria di neuroni nocicettivi a registrare gli impulsi nocicettivi. Queste fibre, inoltre, esprimono sulla loro superficie il *transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)*, un sottotipo di una famiglia di canali cationici (Caterina et al., 1997) rilevatori di un danno tissutale. Inoltre, grazie al loro basso potenziale di attivazione, le fibre C e A $\delta$  giocano un ruolo importante nel monitoraggio e nell'attivazione delle difese immunitarie (Assas et al., 2014). Il rilascio di CGRP *in vivo* avviene a seguito dell'attivazione contemporanea dei canali TRPV1 localizzati nei neuroni e nelle cellule immunitarie a seguito di vari stimoli quali: capsaicina, calore (>43°C) (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998), protoni ( $\approx$  pH 4.5) (Vyklícky et al., 1998; Jordt et al., 2000), lipidi come anandamide (Olah

et al., 2001), fosfatidilinositolo(4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) (Chuang et al., 2001) e variazioni di voltaggio (Gunthorpe et al., 2000).

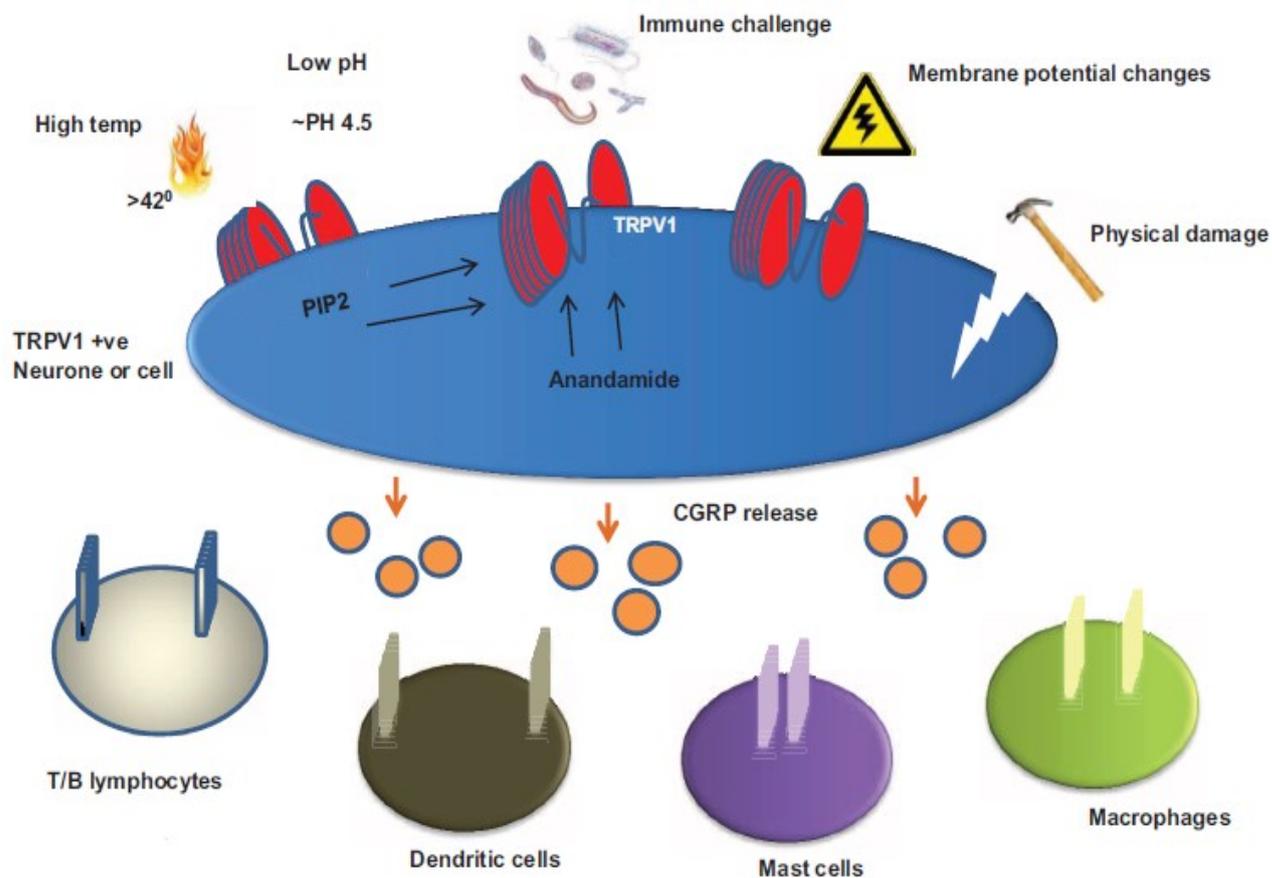


Figura 12- Meccanismo di rilascio del CGRP via TRPV1 (Assas et al., 2014)

### 3.2. Distribuzione e ruolo fisiologico del CGRP

Un'elevata quantità di CGRP si trova in corrispondenza delle lamine I e II del midollo spinale dove i terminali C e A $\delta$  costituiscono il 30% degli assoni afferenti primari (Gibson et al., 1984c; Levine et al., 1993). Oltre a questa, si riscontra immunoreattività (IR) per questo neuropeptide anche nella regione reticolata della lamina V (Gibson et al., 1984c; Skofitsch e Jacobowitz, 1985 a, b), attorno al canale centrale della lamina X (Gibson et al., 1984c; Skofitsch e Jacobowits, 1985a) e a livello dei motoneuroni  $\alpha$  della lamina IX (Unger e Langer, 1991). In generale la distribuzione del CGRP rimane costante per tutta la lunghezza del midollo spinale tranne a livello toracico, dove le fibre immunoreattive si concentrano maggiormente attorno alle cellule della colonna simpatica, e a livello sacrale, dove l'IR per questo neuropeptide è maggiore attorno al canale centrale e al nucleo parasimpatico. L'incremento presente nella parte caudale del

midollo spinale si osserva anche per altri neuropeptidi (Anand et al., 1983; Gibson et al., 1984 a, b) e, per il CGRP, sembra essere dovuto all'incremento di sostanza grigia che si osserva nei tratti più caudali del midollo stesso (Gibson et al., 1984b). I neuroni sensitivi primari CGRP-IR innervano, mediante il loro processo periferico, vari organi (Buck and Burks, 1986; Holzer, 1991; Szallasi and Blumberg, 1999). Le fibre esprimenti CGRP, in particolare, mostrano una notevole distribuzione all'interno dell'organismo (Su et al, 1986). Tutto ciò suggerisce come il CGRP sia un neuropeptide coinvolto in molteplici funzioni biologiche, quali: olfatto, udito, apprendimento, nutrimento, attività motoria, nocicezione e vasodilatazione (van Rossum et al., 1997; Jacques et al., 2000). La sua attività, inoltre, è stata studiata nei casi di emicrania e di altri disturbi, denominati '*infiammazioni neurogeniche*'. Questo termine include una serie di risposte infiammatorie generate dal rilascio di *sostanza P*, *neurochinina A* (Geppetti et al., 1996) e CGRP. I neuroni sensitivi primari esprimenti CGRP, infatti, giocano un ruolo importante nella nocicezione (Woolf and Wiesenfeld-Hallin, 1986; Cridland and Henry, 1988; Jolicoeur et al., 1992), nella vasodilatazione (Brain et al., 1985) e nell'aumento della permeabilità vascolare (Gamse and Saria, 1985), processi in atto durante le infiammazioni. Già da 30 anni, inoltre, è noto il potere vasodilatatore del CGRP (Brain et al., 1985), il quale è stato recentemente confermato da Brain e Grant (2004), in associazione all'insorgere delle forti emicranie (Olesen, 2011 a, b). Le fibre contenenti CGRP, infatti, sono presenti all'interno dello strato muscolare della maggior parte delle arteriole dove esercitano un effetto rilasciante. Quest'ultimo, però, non è scatenato direttamente da questa molecola, ma dall'azione dell'ossido nitrico (NO) (Gray e Marshall, 1992, Raddino et al., 1997). Quest'ultima molecola è stata molto studiata per ciò che concerne il controllo del flusso sanguigno nelle reti mirabili nei Cetacei, in particolare a livello del midollo spinale (Bombardi et. al, 2013).

Altri ruoli fisiologici di recente scoperta svolti dal CGRP sono:

- promozione del mantenimento dell'integrità della mucosa del tratto gastrointestinale (Szolcsanyi and Bartho, 2001);
- assistenza nella crescita e mantenimento *in vitro* delle cellule staminali (Dong et al., 2010);
- modulazione della crescita dei cheratinociti (Roggenkamp et al., 2013);
- facilitazione dell'assorbimento intraluminare degli amminoacidi nella parte distale dell'intestino (Mourad et al., 2009);
- promozione della guarigione delle ferite (Zhou et al., 2013);
- rilascio di fattori chimici che inibiscono la secrezione dei succhi gastrici (Aihara et al, 2005);
- induzione della riparazione muscolare (Aihara et al., 2006);

- monitoraggio dell'ambiente viscerale, in associazione con il sistema immunitario (Engel et al, 2010, 2011).

#### 4. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Il CGRP è presente nei neuroni del midollo spinale di diversi specie di Mammiferi, inclusi topi, ratti, conigli, cani, gatti, pecore, scimmie e Uomo. Nonostante la distribuzione di neuroni contenenti questo neuropeptide sia stata studiata in maniera dettagliata nel midollo spinale delle suddette specie, non sono disponibili, in letteratura, informazioni relative alla presenza di queste cellule nel midollo spinale dei Cetacei. Di conseguenza, è stata condotta la presente ricerca che ha avuto lo scopo di determinare, mediante metodiche di immunoistochimica, la distribuzione e la morfologia dei neuroni esprimenti il CGRP nel midollo spinale di tursiope (*Tursiops truncatus*).

#### 5. MATERIALI E METODI

Il midollo spinale è stato prelevato da tre esemplari di tursiope (*Tursiops truncatus*). Il materiale è stato fornito dalla Banca dei Tessuti per i Mammiferi Marini del Mediterraneo del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università degli Studi di Padova. Il midollo spinale è stato sezionato, a seconda dei soggetti, nei tratti **cervicale (C)**, **toracico (T)**, **lombare (L)** e **caudale (Ca)**. In particolare, dal soggetto **ID 145** sono stati utilizzati i tratti **cervicale e toracico**, dal soggetto **ID 114** sono stati utilizzati i **tratti lombare e caudale** e dal soggetto **ID 144** è stato utilizzato il **tratto caudale**. Ogni parte ha subito un processo di fissazione per immersione in una soluzione di paraformaldeide al 4% per almeno 48 ore. Dopo opportuno lavaggio in tampone fosfato (PBS pH 7.4), il materiale è stato crioprotetto in saccarosio al 30% in PBS (pH 7.4) e, infine, tagliato al microtomo congelatore (T= -27/-30°C) in sezioni trasversali con spessore medio di 80 µm. Una metà delle sezioni ottenute sono state colorate mediante tecniche di istologia classica (colorazione con tionina), mentre l'altra metà sottoposte a specifiche reazioni di immunoistochimica.

##### 5.1. Colorazione istologica classica (tionina)

La tionina è un colorante basico che mette in evidenza una sostanza intensamente colorabile e disposta a zolle presente nel citoplasma dei neuroni, che conferisce al corpo cellulare un aspetto

screziato, per cui è stata definita *sostanza tigroide* o *corpi di Nissl* (Rosati et al, 2006). Essa attribuisce alla cellula un'intensa colorazione viola o blu. Dopo aver raccolto le sezioni su vetrini gelatinizzati, il tessuto è stato progressivamente idratato mediante la serie decrescente degli alcoli (1 ora in una soluzione 1:1 alcol 100°/cloroformio, 3 minuti in alcol 100°, 2 minuti in alcol 95°, 2 minuti in alcol 90°, 2 minuti in alcol 80°, 2 minuti in alcol 70° e 2 minuti in alcol 50°), fino all'acqua distillata (per 2 minuti). Successivamente, il vetrino viene immerso in una soluzione allo 0,125% di tionina (Fisher Scientific). Dopo mezz'ora, il tessuto viene disidratato attraverso rapide immersioni in serie crescenti di alcoli e chiarificato permanendo 10 minuti in xilolo, una sostanza aromatica derivata dal benzene, altamente nociva. Infine, si procede alla chiusura del vetrino applicando come montante l'Entellan (Merk, Darmstadt, Germany).

## **5.2. Immunoistochimica**

Questa tecnica consente la localizzazione citochimica di antigeni (in genere proteine o polisaccaridi) sia al microscopio ottico (convenzionale o a fluorescenza, in funzione del marker utilizzato), sia a quello elettronico. L'antigene viene fatto reagire con l'anticorpo specifico non marcato, detto anticorpo primario, formando un complesso antigene-anticorpo. Quest'ultimo viene messo a contatto con un altro anticorpo marcato (anticorpo secondario), diretto contro l'anticorpo primario. Più copie di quest'ultimo possono legarsi all'anticorpo primario così da dare un risultato più intenso (Rosati et al., 2006).

Ogni anticorpo è specifico per una ristretta cerchia di antigeni; perciò, prima di procedere con le analisi immunoistochimiche è necessario individuare l'anticorpo giusto per il tipo di ricerca che s'intende effettuare.

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita su sezioni trasversali di midollo spinale *free-floating*, preventivamente lavate in PBS (3x10 minuti). Al fine di eliminare l'attività delle perossidasi endogene, il tessuto è stato trattato con una soluzione all'1% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, per trenta minuti a temperatura ambiente. Dopo opportuni lavaggi in PBS (6 lavaggi da 5 minuti ciascuno), le sezioni sono state incubate per due ore a temperatura ambiente in una soluzione contenente il 10% di Normal Goat Serum (Colorado Serum, Denver, CO, #CS 0922) e il 0.3% di Triton X-100 (Merck, Darmstadt), al fine di bloccare i legami non specifici. Per evidenziare i neuroni CGRP-immunoreattivi, le sezioni sono state incubate per 48 ore a 4°C con l'anticorpo primario Rabbit anti-CGRP (diluizione 1:1000; codice C8198, Sigma). Dopo lavaggio in PBS (3 x 10 minuti), le sezioni sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario biotinilato Goat anti-rabbit (diluizione 1:200; codice BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le sezioni

sono state, quindi, trasferite nel complesso avidina-biotina (ABC kit Vectastain, PK-6100, Vector, Laboratories, Burlingame, CA) per 60 minuti e la reazione dell'immunoperossidasi è stata sviluppata impiegando la 3,3'-diaminobenzidina (DAB kit, SK-4100, Vector, Laboratories, Burlingame, CA) per 3 minuti. Le sezioni, quindi, sono state, disidratate in alcool (50°, 75°, 80°, 90°, 95° e 100°), chiarificate in xilolo e montate utilizzando Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

L'anticorpo primario utilizzato è stato diluito in antibody diluent (1.8% NaCl in PBS 0.01 M contenente lo 0.1% di sodium azide) contenente l'1% di Normal Goat Serum e lo 0.3% di Triton-X100. L'anticorpo secondario utilizzato è stato diluito in PBS contenente l'1% di Normal Goat Serum e lo 0,3% di Triton X-100. La specificità della reazione dell'immunoperossidasi è stata dimostrata omettendo, durante l'esecuzione della reazione, l'anticorpo primario. In questi preparati, infatti, non si è rilevata alcuna immunoreattività.

### ***5.3. Analisi dati***

Le sezioni colorate con la tionina e con le metodiche di immunoistochimica sono state analizzate con il microscopio Leica DMRB. La distribuzione dei neuroni esprimenti il CGRP è stata rappresentata graficamente mediante l'ausilio del programma Corel Draw X3. Il software Axiovision Rel 4.8.2 è stato utilizzato per l'analisi morfometrica dei neuroni immunoreattivi localizzati nei segmenti considerati. Solo i neuroni che presentavano un nucleo evidente sono stati inclusi nell'analisi dell'area dei pirenofori. In ogni animale, l'area del pirenoforo (espressa come media +/- SD), è stata misurata su differenti sezioni dopo aver tracciato manualmente il contorno di ogni soma.

## 6. RISULTATI

### 6.1. Colorazione con tionina

Usando la colorazione con la tionina è stato dimostrato che la sostanza grigia del midollo spinale può essere suddivisa, da ciascun lato, nelle corna dorsale, laterale (cellule della colonna intermediolaterale) e ventrale (Figura 1). I nostri dati confermano ricerche precedenti che riportano come le corna ventrali siano più sviluppate di quelle dorsali per tutte l'estensione craniocaudale del midollo spinale. Usando il metodo di laminazione proposto da Rexed (1952, 1954), nella sostanza grigia del midollo spinale sono state individuate 10 lamine:

**Lamina I:** è sottile e ricopre la parte superficiale del corno dorsale. Nelle sezioni trasversali questa lamina mostra soprattutto neuroni sferoidali di piccole dimensioni. Assai raramente si osservano neuroni poligonali di maggiori dimensioni (Figure 2 e 3).

**Lamina II:** è situata ventralmente alla lamina I e presenta neuroni di piccole dimensioni e con soma sferoidale (Figura 2).

**Lamina III:** è più spessa della lamina I e, come la lamina IV, contiene neuroni di differenti dimensioni e di forma poligonale.

**Lamina IV:** contiene pirenofori sferoidali di piccole dimensioni e neuroni poligonali con dimensioni variabili.

**Lamina V:** presenta neuroni di piccole, medie e grandi dimensioni. Tali cellule non sono strettamente impacchettate e mostrano una morfologia poligonale.

**Lamina VI:** è sottile e contiene pirenofori fusiformi e poligonali di dimensioni differenti.

**Lamina VII:** è ben sviluppata e, lateralmente, contiene il nucleo intermediolaterale (che si estende da T1 a L4/L5). Le cellule presenti in questo nucleo mostrano pirenofori poligonali di grandezza media.

**Lamina VIII:** mostra neuroni poligonali di piccole, medie e grandi dimensioni.

**Lamina IX:** può essere suddivisa in tre principali gruppi neuronali (dorsolaterale, ventrolaterale e ventromediale) dove è possibile identificare corpi cellulari di dimensioni medio-grandi appartenenti ai motoneuroni (Figure 4, 5 e 6).

**Lamina X:** situata al centro della sostanza grigia, mostra neuroni sferoidali e poligonali di dimensioni che variano da piccole a medio-grandi.

Dal momento che le intumescenze del midollo spinale sono pressoché inesistenti, lo spessore delle diverse lamine è abbastanza costante lungo tutta l'estensione craniocaudale dell'organo.

La densità dei neuroni presenti nelle corna dorsale e ventrale è pari a, rispettivamente,  $40,5 \pm 31,9$  neuroni/mm<sup>2</sup> e  $73,5 \pm 42,8$  neuroni/mm<sup>2</sup>.

Le Tabelle 1 e 2 riportano i dati relativi all'area media dei pirenofori localizzati nelle corna dorsale e ventrale del midollo spinale dei soggetti analizzati.

**Tabella 1- Numero e area media dei pirenofori localizzati nelle corna ventrale e dorsale del midollo spinale.**

<b>Corno</b>	<b>ID114</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID144</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID145</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>Totale</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)
<i>Dorsale</i>	N° neuroni=54	N° neuroni=35	N° neuroni=10	N° neuroni=99
	Area media= 321,85 $\pm$ 185,69	Area media= 371,26 $\pm$ 205,54	Area media= 348,94 $\pm$ 220,93	Area media= 357,99 $\pm$ 207,82
<i>Ventrale</i>	N° neuroni=141	N° neuroni=92	N° neuroni= 34	N° neuroni=267
	Area media= 2119,32 $\pm$ 786,15	Area media= 1334,20 $\pm$ 423,31	Area media= 989,45 $\pm$ 397,22	Area media= 1702,43 $\pm$ 708,99

**Tabella 2- Numero e area media dei pirenofori localizzati nelle corna dorsale e ventrale del tratto caudale del midollo spinale.**

<b>Corno</b>	<b>ID114</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID144</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>Totale</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)
<i>Dorsale</i>	N° neuroni=54	N° neuroni=35	N° neuroni=99
	Area media= 321,85 $\pm$ 185,69	Area media= 371,26 $\pm$ 205,54	Area media= 362,43 $\pm$ 210,83
<i>Ventrale</i>	N° neuroni=141	N° neuroni=92	N° neuroni=267
	Area media= 2119,32 $\pm$ 786,15	Area media= 1334,20 $\pm$ 423,31	Area media= 1808,61 $\pm$ 706,04

## **6.2. Immunoistochimica**

### **6.2.1. Caratteristiche generali dell'immunoreattività per il CGRP**

L'immunoreattività per il CGRP appare localizzata nel corpo cellulare, nei dendriti e nei processi assonici dei neuroni. Nel corpo cellulare e, in parte, nei dendriti principali, l'immunopositività per il peptide appare sotto forma delle caratteristiche granulazioni di colore bruno intenso uniformemente distribuite nel citoplasma. Gli assoni e i rami dendritici più sottili, evidenti soprattutto in corrispondenza delle lamine I e II, appaiono sotto forma di processi e/o punti immunoreattivi di colore bruno/nero.

### **6.2.2. Distribuzione e caratteristiche morfologiche dei neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno dorsale**

I neuroni contenenti il CGRP sono localizzati nelle lamine I, II, VIII e IX (Figura 7). I neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno dorsale sono localizzati soprattutto in corrispondenza delle lamine più superficiali (lamina I e II) (Figure 8 e 9). Tali neuroni mostrano un corpo cellulare in genere di piccole dimensioni che, nelle sezioni trasversali, appare di forma poligonale o vagamente rotondeggiante (Figura 9). A causa delle piccole dimensioni l'emergenza dei dendriti primari non è sempre facilmente rilevabile. I corpi cellulari dei suddetti neuroni sono

accolti all'interno di una trama costituita da processi assonici e fini ramificazioni dendritiche che, a seconda dell'orientamento, appaiono sotto forma di processi o punti immunoreattivi (Figure 8 e 9).

La densità di neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno dorsale è pari a  $33,0 \pm 13,2$  neuroni/mm<sup>2</sup>. Lo schema 1 riporta la distribuzione dei pirenofori immunopositivi nel corno dorsale.

Le tabelle 3 e 4 riportano i dati relativi all'area media dei pirenofori localizzati nel corno dorsale del midollo spinale dei soggetti analizzati.

### **6.2.3. Distribuzione e caratteristiche morfologiche dei neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nel corno ventrale**

I neuroni immunoreattivi per il CGRP presenti nel corno ventrale sono localizzati soprattutto in corrispondenza delle lamine VIII e IX (Figure 10, 11, 12 e 13). Tali cellule, di dimensioni maggiori rispetto a quelle del corno dorsale, mostrano un pirenoforo di forma poligonale, dai cui vertici emergono un numero variabile di dendriti primari (fino a 5) in genere ispessiti (Figura 13). I neuroni presenti nella lamina VIII sono distribuiti in modo piuttosto uniforme, mentre quelli presenti nella lamina IX si uniscono a costituire tre gruppi che, in base alla posizione occupata, vengono distinti in dorsolaterale, ventrolaterale e ventromediale (Figure 10, 11, 12 e 13). Il neuropilo presente nel corno ventrale è generalmente poco immunoreattivo (Figure 10, 11, 12 e 13). Tuttavia, nella lamina X si possono osservare fibre fortemente immunoreattive localizzate in prossimità dei vasi posti al centro della sostanza grigia.

La densità di neuroni CGRP immunoreattivi presenti nel corno ventrale è di  $43,5 \pm 44,4$  neuroni/mm<sup>2</sup>. Lo schema 1 riporta la distribuzione dei corpi cellulari immunoreattivi presenti nel corno ventrale.

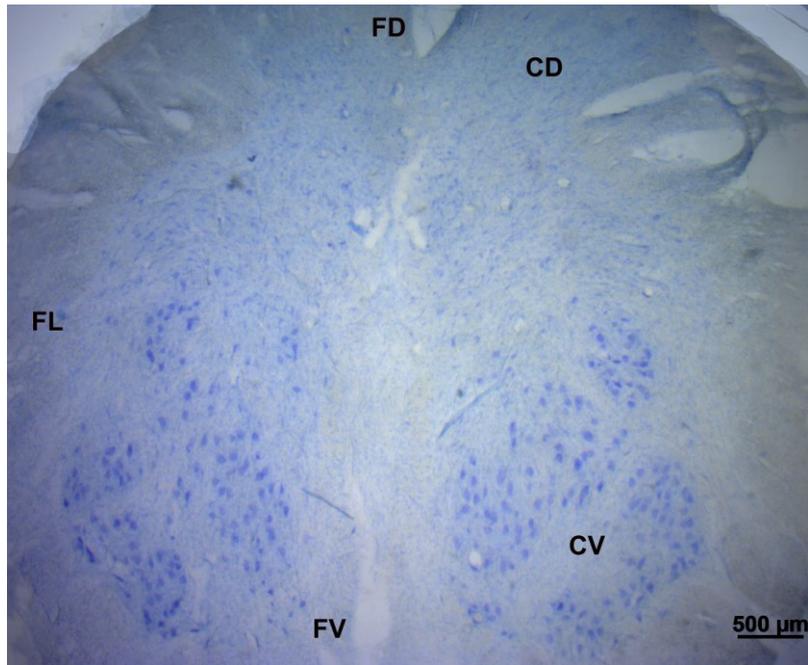
Le tabelle 3 e 4 riportano i dati relativi all'area media dei pirenofori localizzati nel corno ventrale del midollo spinale dei soggetti analizzati.

**Tabella 3- Numero e area media dei pirenofori localizzati nelle corna dorsale e ventrale del midollo spinale**

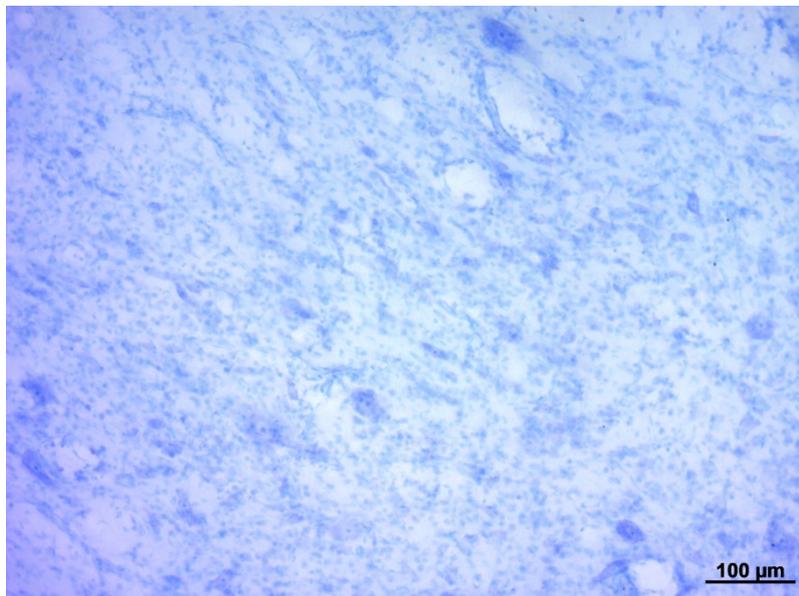
<b>Corno</b>	<b>ID114</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID144</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID145</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>Totale</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)
<i>Dorsale</i>	N° neuroni=22	N° neuroni=31	N° neuroni=54	N° neuroni=107
	Area media= 206,45 $\pm$ 69,63	Area media= 213,19 $\pm$ 73,18	Area media= 328,07 $\pm$ 215,75	Area media= 269,22 $\pm$ 170,44
<i>Ventrale</i>	N° neuroni=64	N° neuroni=178	N° neuroni= 210	N° neuroni=452
	Area media= 2343,38 $\pm$ 990,0	Area media= 1357,59 $\pm$ 568,0	Area media= 1484,85 $\pm$ 590,7	Area media= 1557,43 $\pm$ 729,9

**Tabella 4- Numero e area media dei pirenofori localizzati nelle corna dorsale e ventrale del tratto caudale del midollo spinale**

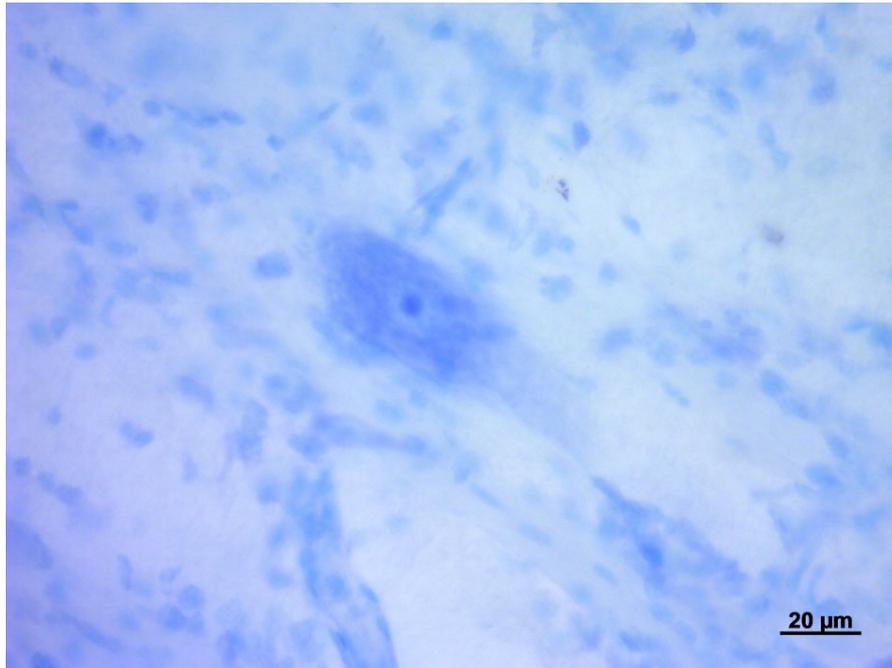
<b>Corno</b>	<b>ID114</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>ID144</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)	<b>Totale</b> (Area media pirenoforo [ $\mu\text{m}^2$ ] $\pm$ DS)
<i>Dorsale</i>	N° neuroni=22	N° neuroni=31	N° neuroni=53
	Area media= 206,45 $\pm$ 69,63	Area media= 213,19 $\pm$ 73,18	Area media= 210,37 $\pm$ 70,98
<i>Ventrale</i>	N° neuroni=64	N° neuroni=178	N° neuroni=242
	Area media= 2343,38 $\pm$ 990,0	Area media= 1357,59 $\pm$ 568,0	Area media= 1620,19 $\pm$ 827,7



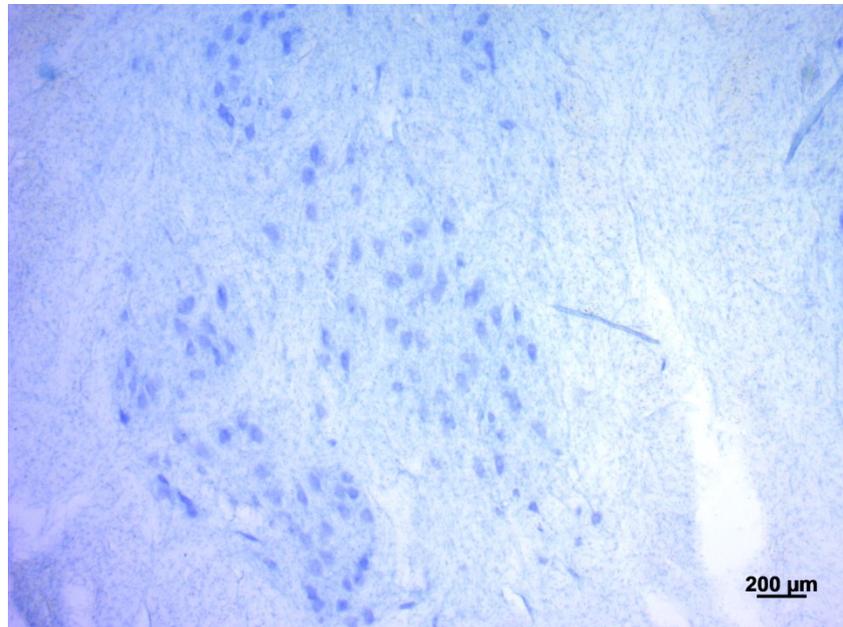
**Figura 1.** Caratteristiche citoarchitettoniche della sostanza grigia del midollo spinale di tursiope. Microfotografia del tratto caudale del midollo spinale. Notare come le corna ventrali mostrino uno sviluppo decisamente maggiore rispetto a quello delle corna dorsali. Nella lamina IX si possono osservare neuroni poligonali di notevoli dimensioni organizzati in differenti gruppi. FD, funicolo dorsale; FL, funicolo laterale; FV, funicolo ventrale; CD, corno dorsale; CV, corno ventrale. Colorazione: tionina.



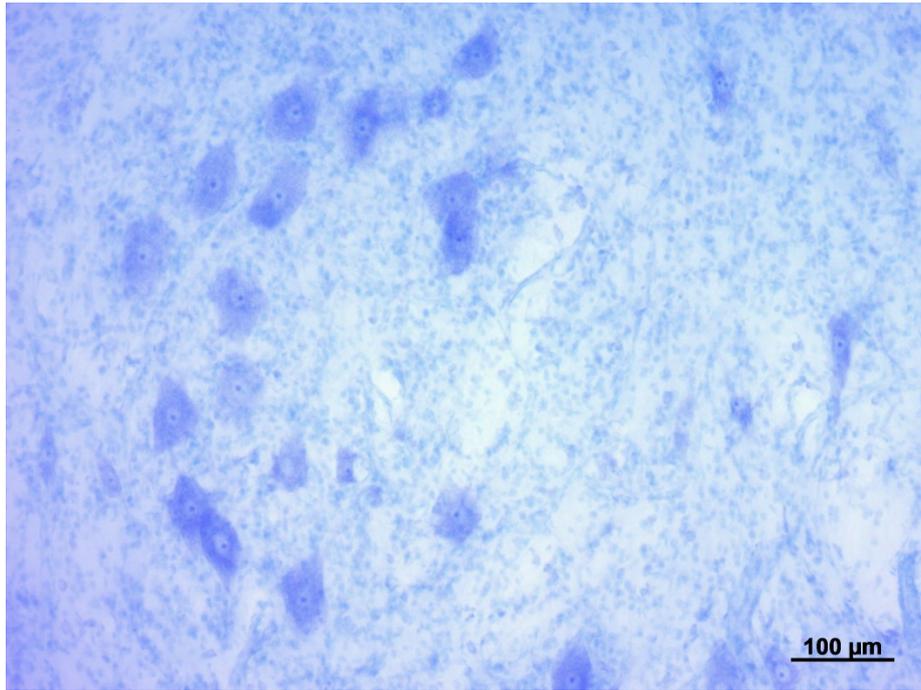
**Figura 2.** Caratteristiche morfologiche dei neuroni presenti nelle lamine I e II del corno dorsale del midollo spinale di tursiope. Notare come i neuroni mostrino pirenofori sferoidali di piccole dimensioni. Colorazione: tionina.



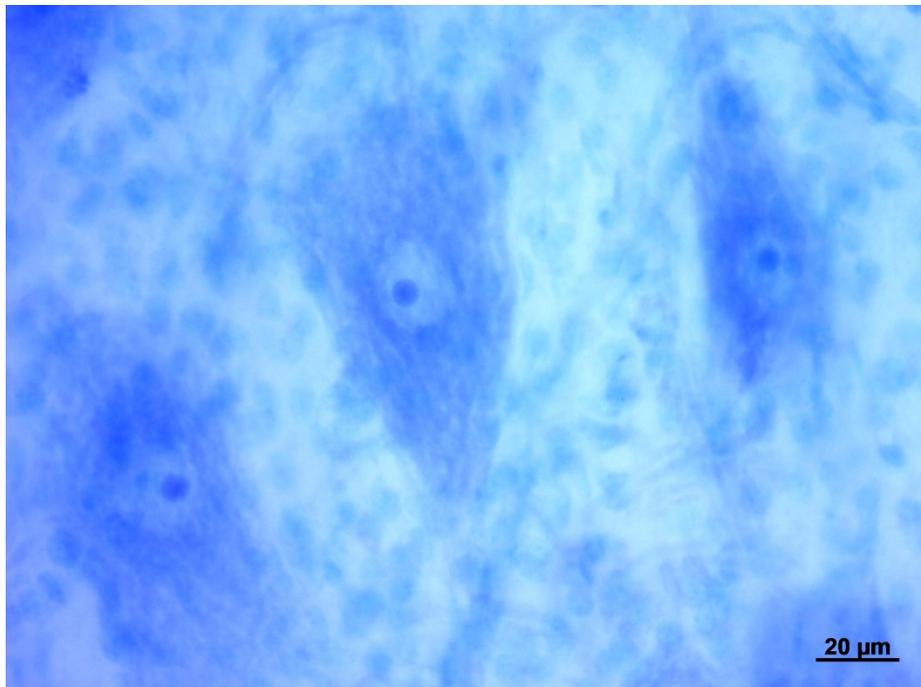
**Figura 3.** Lamina I del corno dorsale del midollo spinale di tursiope. Notare un neurone di aspetto un vagamente poligonale. Tale tipologia di neurone è presente assai raramente. Colorazione: tionina.



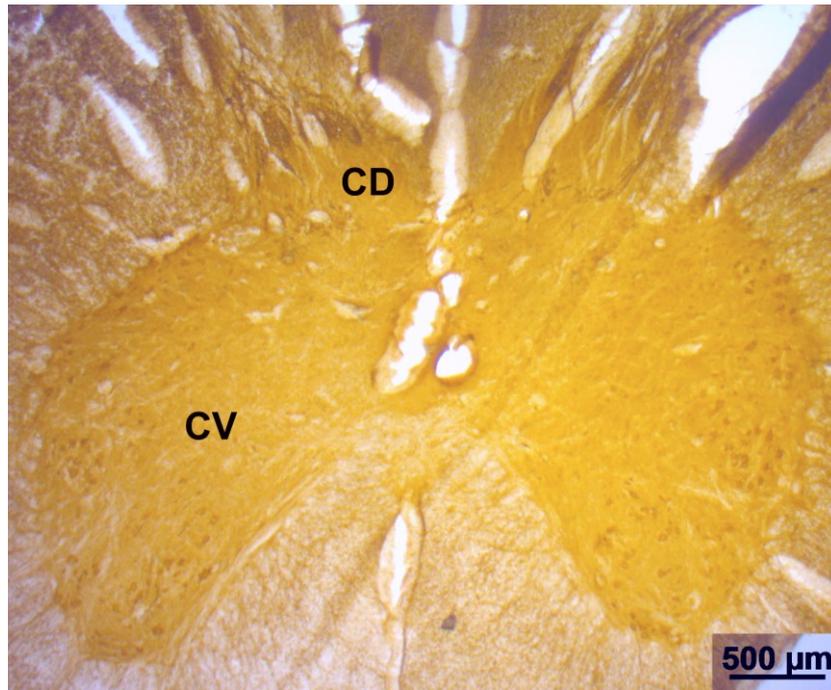
**Figura 4.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. I motoneuroni localizzati nella lamina IX si organizzano in tre principali gruppi cellulari: dorsolaterale, ventrolaterale e ventromediale. Colorazione: tionina.



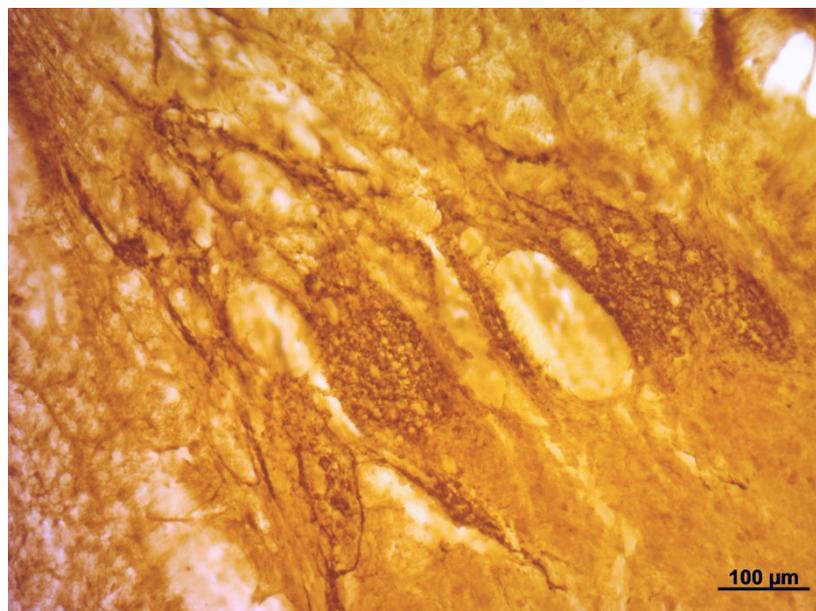
**Figura 5.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare la morfologia poligonale dei motoneuroni localizzati nel gruppo dorsolaterale. Colorazione: tionina.



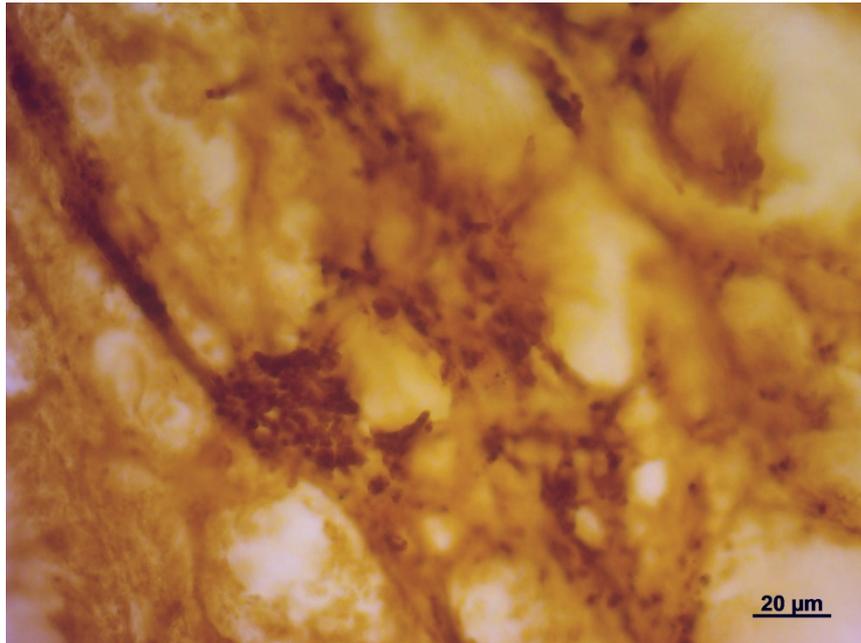
**Figura 6.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare le notevoli dimensioni e l'aspetto poligonale dei motoneuroni. Colorazione: tionina.



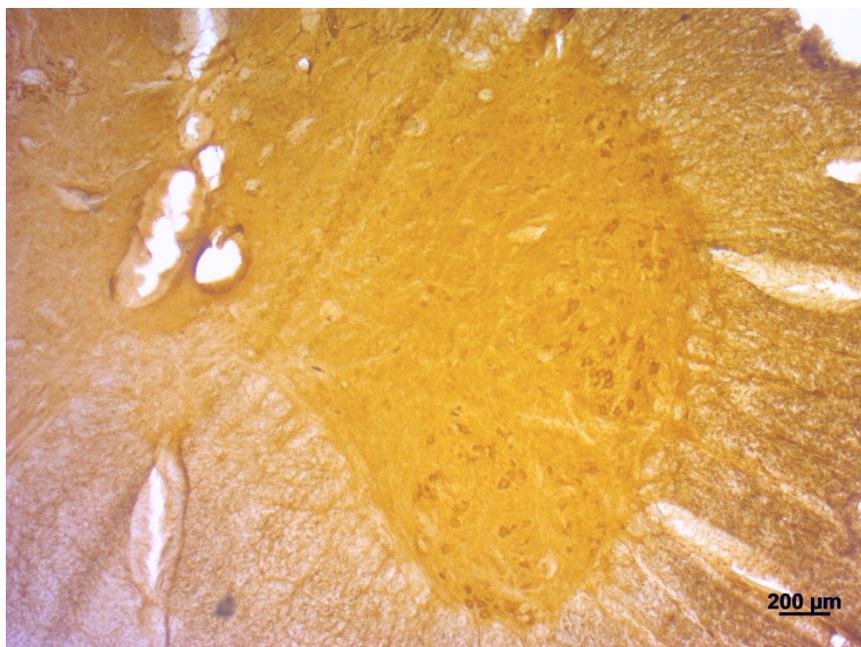
**Figura 7.** Distribuzione dei neuroni CGRP-immunoreattivi nel midollo spinale di tursiope. La maggior parte dei neuroni è localizzata nelle lamine I, II, VIII e IX. Notare, nelle lamine I e II, il neuropilo intensamente immunoreattivo. CD, corno dorsale; CV, corno ventrale. Colorazione: immunoperoxidasi.



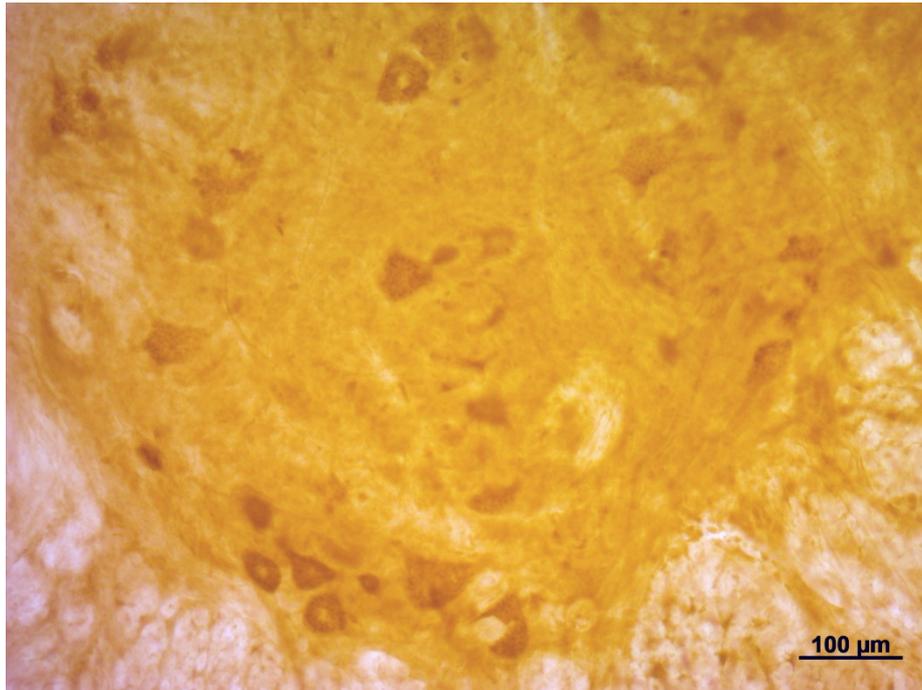
**Figura 8.** Distribuzione dell'immunoreattività per il CGRP nel corno dorsale del midollo spinale di tursiope. Notare l'intensa marcatura nelle lamine I e II. Colorazione: immunoperoxidasi.



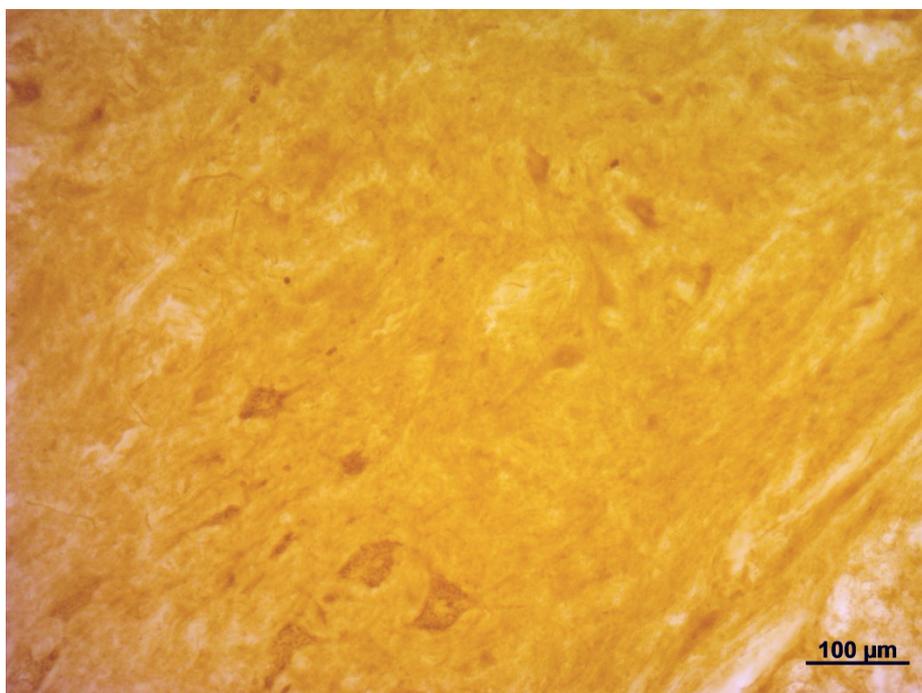
**Figura 9.** Lamina I del midollo spinale di tursiope. Notare l'abbondanza di processi e punti CGRP-immunoreattivi. I neuroni CGRP-immunoreattivi sono di piccole dimensioni e mostrano un soma sferoidale. Colorazione: immunoperossidasi.



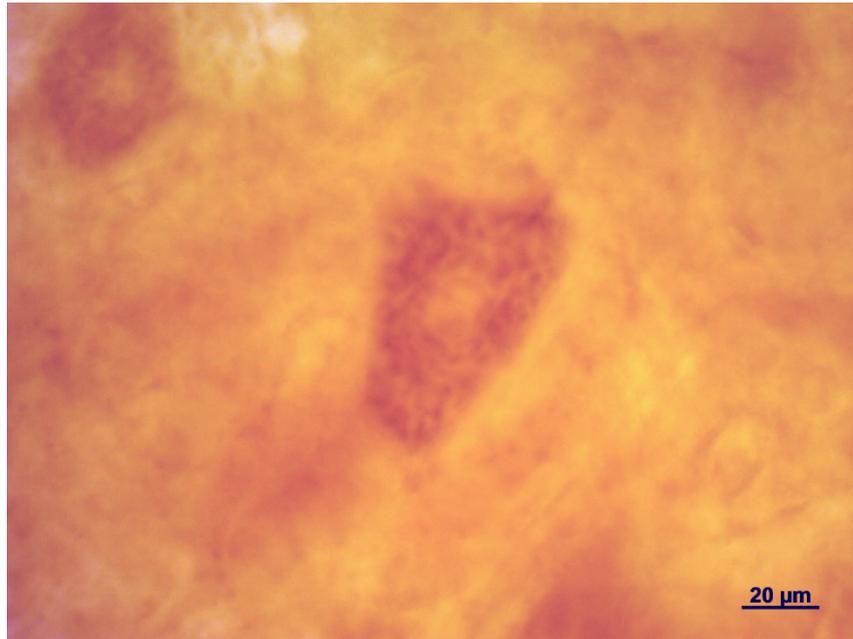
**Figura 10.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare come i neuroni CGRP-immunoreattivi siano localizzati prevalentemente nelle lamine VIII e IX. I motoneuroni localizzati nella lamina IX sono presenti nei gruppi cellulari dorsolaterale, ventrolaterale e ventromediale. Colorazione: immunoperossidasi.



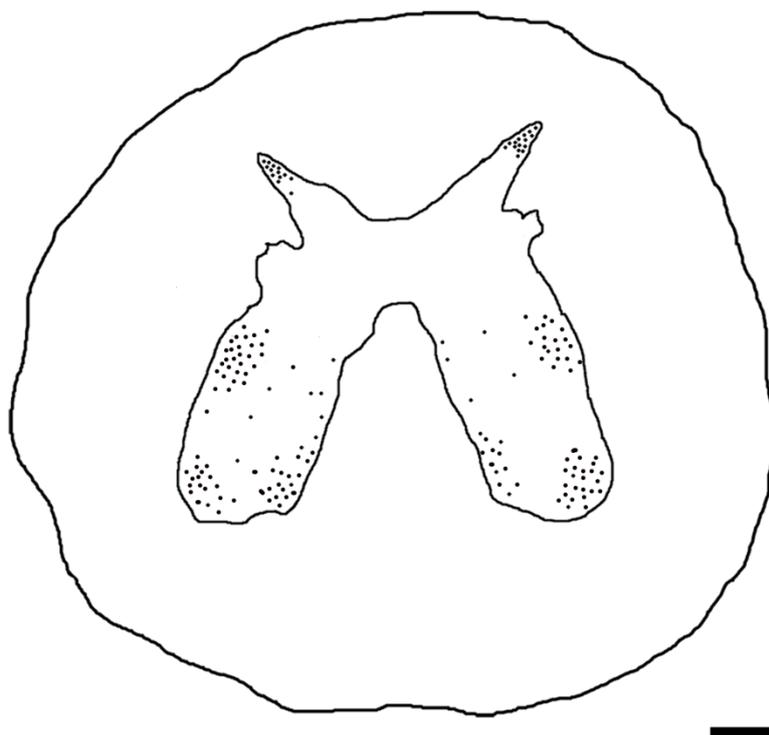
**Figura 11.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare i motoneuroni CGRP-immunoreattivi dei gruppi ventrolaterale e ventromediale. Colorazione: immunoperossidasi.



**Figura 12.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare i neuroni CGRP-immunoreattivi presenti nella lamina VIII. In basso si evidenziano alcuni motoneuroni della lamina IX. Colorazione: immunoperossidasi.



**Figura 13.** Corno ventrale del midollo spinale di tursiope. Notare un motoneuroni CGRP-immunoreattivo di grandi dimensioni e con morfologia poligonale. Colorazione: immunoperossidasi.



**Schema 1.** Rappresentazione grafica della distribuzione dei neuroni immunoreattivi per il CGRP nel midollo spinale di tursiope. Ogni punto rappresenta un neurone. Notare l'elevato numero di cellule esprimenti il CGRP nelle lamine I, II, VIII e IX. Scala bar = 500 micron.

## 7. DISCUSSIONE

Nella presente ricerca sono state studiate, mediante l'utilizzo di metodiche di immunoistochimica, la distribuzione e la morfologia dei neuroni immunoreattivi per il CGRP nel midollo spinale di tursiope. In questa specie, la distribuzione laminare dei neuroni CGRP-immunoreattivi è assai simile a quella che si osserva nei Roditori, nei Carnivori e nei Primati; infatti, i corpi cellulari immunopositivi sono localizzati soprattutto nelle lamine I, II, VIII e IX primari (Gibson et al., 1984c; Skofitsch e Jacobowitz, 1985 a, b; Unger e Langer, 1991; Levine et al., 1993). La distribuzione e la morfologia dei neuroni esprimenti CGRP nel midollo spinale di tursiope suggeriscono come tale neuropeptide possa essere coinvolto nella trasmissione delle informazioni sia sensitive (somatiche e viscerali) che motorie.

I neuroni CGRP-immunoreattivi localizzati nel corno dorsale si trovano soprattutto nelle lamine I e II, dove sono immersi in un neuropilo densamente positivo. Mediante studi condotti in altre specie animali è stato dimostrato che le cellule esprimenti CGRP presenti in queste lamine agiscono da interneuroni modulando le informazioni nocicettive che dai gangli spinali vengono trasmesse al midollo spinale (Light e Perl, 1979; Sugiura et al. 1987; Assas et al., 2014). L'abbondanza di processi immunoreattivi presenti nelle lamine I e II appartengono, oltre che ai neuroni locali, anche ai neuroni pseudounipolari dei gangli spinali che inviano il loro processo centripeto (fibra afferente primaria) nel corno dorsale. E' interessante notare come anche le fibre afferenti primarie utilizzino il CGRP per la trasmissione delle informazioni dolorifiche (Light e Perl, 1979; Sugiura et al. 1987; Assas et al., 2014).

Nel presente studio i neuroni CGRP-immunoreattivi sono stati osservati anche nel corno ventrale, soprattutto nelle lamine VIII e IX. La presenza di CGRP nei neuroni della lamina VIII potrebbe indicare come questo neuropeptide possa essere implicato nella trasmissione di segnali di natura motoria, utilizzando meccanismi presinaptici. La presenza di numerosi motoneuroni immunoreattivi per il CGRP indicherebbe un'azione diretta svolta da questo neuropeptide nell'interazione tra il motoneurone inferiore ed il muscolo scheletrico.

Fibre immunoreattive per il CGRP sono state osservate in corrispondenza della lamina X. Tale lamina riceve numerose fibre afferenti viscerali; di conseguenza il CGRP potrebbe essere coinvolto nella modulazione della sensibilità viscerale.

## 8. BIBLIOGRAFIA

**Adema, G. J.; van Hulst, K. L.; Baas, P. D. (1990)**, *Uridine branch acceptor is a cis-acting element involved in regulation of the alternative processing of calcitonin/CGRP-I pre-mRNA*. Nucleic Acids Res., 18,5365-5373;

**Aihara, E., Hayashi, M., Sasaki, Y., Kobata, A., Takeuchi, K. (2005)**, *Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315, 423–432. doi:10.1124/jpet.105.087619;

**Aihara, E., Sasaki, Y., Ise, F., Kita, K., Nomura, Y., Takeuchi, K. (2006)**, *Distinct mechanisms of acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in normal and slightly permeable stomachs*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 291, G464–G471. doi: 10.1152/ajpgi.00048.2006;

**Aiyar N, Rand K, Elshourbagy NA, Zeng Z, Adamou JE, Bergsma DJ, Li Y (1996)**, *A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor*. J Biol Chem 271:11325–11329;

**Amara, S. G.; Jonas, V.; Rosenfeld, M. G.; Ong, E. S.; Evans, R. M. (1982)**, *Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products*. Nature, 296, 240-244;

**Amara, S. G.; Arriza, J. L.; Leff, S. E.; Swanson, L. W.; Evans, R.M.; Rosenfeld, M. G. (1985)**, *Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide*. Science, 229, 1094–1097;

**Anand, P., S. J. Gibson, G. P. McGregor, M. A. Blank, M. A. Ghatei, A. J. Bacarese-Hamilton, J. M. Polak (1983)**, *A VIP-containing system concentrated in the lumbosacral region of the human spinal cord*. Nature 305: 143-145;

**Ariëns Kappers C. U., Huber G. C., Crosby E. C. (1967)**, *The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates , Including Man*. New York, Hafner Publishing Co.;

**Assas B.M., Pennock J.I., Miyan J.A. (2014)**, *Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis*. Front. Neurosci. 8:23. doi: 10.3389/fnins.2014.00023;

**Barone R., Bortolami R. (2006)**, *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Neurologia - Sistema nervoso centrale, Vol.: 6, Ed. Edagricole;

**Barr M. L. (1974)**, *The Human Nervous System*, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, Harper & Row Publishers;

**Beglinger, C.; Born, W.; Hildebrand, P.; Ensink, J. W.; Burkhardt, F.; Fischer, J. A.; Gyr, K. (1988)**, *Calcitonin gene related peptides I and II and calcitonin: Distinct effects on gastric acid secretion in humans*. *Gastroenterology*, 95, 958–965;

**Beglinger, C.; Born, W.; Münch, R.; Kurtz, A.; Gutzwiller, J.-P.; Jäger, K.; Fischer, J. A. (1991)**, *Distinct hemodynamic and gastric effects of human CGRP I and II in man*. *Peptides*, 12, 1347-1351;

**Berta A., Sumich J.L., Kovacs K.M. (2005)**, *Marine Mammals. Evolutionary biology* (Ed. II), Ed. Elsevier, pp: 158;

**Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I (1985)**, *Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator*. *Nature* 313:54–56;

**Brain, S.D., Grant, A.D.(2004)**, *Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin*. *Physiol. Rev.* 84, 903–934. doi:10.1152/phys-rev.00037.2003;

**Brodal A. (1969)**, *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*. 2<sup>nd</sup> Ed., New York, Oxford University Press;

**Brodal A. and Rexed B. (1953)**, *Spinal afferents to the lateral cervical nucleus in the cat. An experimental study*. *J. Comp. Neurol.* 98:179-211;

**Bombardi C., Grandis A.M., Gardini A., Cozzi B. (2013)**, *Nitrgenic Neurons in the Spinal Cord of the Bottlenose Dolphin (Tursiops truncatus)*, *The Anatomical Record*, 296:1603–1614;

**Bortolami R., Callegari E. (1999)**, *Neurologia ed estesiologia degli animali domestici*, Ed. Edagricole;

**Bovenberg, R. A. L.; Moen, T. C.; Jansz, H. S.; Baas, P. D. (1989)**, *In vitro splicing analysis of mini-gene constructs of the alternatively processed human calcitonin/CGRP-I pre-mRNA.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1008, 223–233;

**Buck, S.H., Burks, T.F. (1986)**, *The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations*. Pharmacol. Rev. 38, 179–226;

**Busch H. F. M. (1961)**, *An Anatomical Analysis of the White Matter in the Brain Stem of the Cat*. Assen, Van Gorcum & Co., cited in Brodal, 1969;

**Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997)**, *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature, 389:816-824;

**Chang CP, Pearse RV, O'Connell S, Rosenfeld MG (1993)**, *Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropinreleasing factor and sauvagine in mammalian brain*. Neuron 11: 1187–1195;

**Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I. et al. (2001)**, *Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition*. Nature 411, 957–962. doi: 10.1038/35082088;

**Cote,G. J.; Stolow, D. T.; Peleg, S.; Berget, S. M.; Gagel, R. F. (1992)**, *Identification of exon sequences and an exon binding protein involved in alternative RNA splicing of calcitonin/CGRP*. Nucleic Acids Res., 20, 2361–2366;

**Cozzi B. (2005)**, *Mammiferi Marini del Mediterraneo (Storia Naturale, Biologia, Anatomia, Patologia, Parassitologia)*. Editore Massimo Valdina;

**Cridland RA, Henry JL (1988)**, *Effects of intrathecal administration of neuropeptides on a spinal nociceptive reflex in the rat: VIP, galanin, CGRP, TRH, somatostatin and angiotensin II*. Neuropeptides 11: 23–32;

**Dellmann H.D., Eurell J.A. (2000)**, *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Ed. II. Casa Editrice Ambrosiana, Milano;

**Dong, J., He, Y., Zhang, X., Wang, L., Sun, T., Zhang, M. et al. (2010)**, *Calcitonin gene-related peptide regulates the growth of epidermal stem cells in vitro*. Peptides 31, 1860-1865. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.007;

**Emeson, R. B.; Hedjran, F.; Yeakley, J. M.; Guise, J. W.; Rosenfeld, M. G. (1989)**, *Alternative production of calcitonin and CGRP mRNA is regulated at the calcitonin-specific splice acceptor*. Nature, 341, 76–80;

**Engel, M.A., Becker, C., Reeh, P.W., Neurath, M.F. (2010),** *Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut.* *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1030-1033. doi:10.1002/ibd.21422;

**Engel, M.A., Khalil, M., Siklosi, N., Mueller-Tribbensee, S.M., Neuhuber, W.L., Neurath, M.F., et al. (2011),** *Opposite effects of substance and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis.* *Dig. Liver Dis.* 44, 24–29. doi:10.1016/j.dld.2011.08.030;

**Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM (2000),** *CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors.* *J Biol Chem* 275:31438–31443;

**Flanigan, N. J. (1966),** *The anatomy of the spinal cord of the Pacific striped dolphin, Lagenorhynchus obliquidens.* In “*Whales, Dolphins and Porpoises*” (K. S. Norris, ed.). pp. 207–231. University of California Press, Berkeley, CA;

**Gamse R, Saria A (1985),** *Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide.* *Eur J Pharmacol* 114:61–66;

**Geppetti P., Holzer P. (1996),** *Neurogenic Inflammation.* Boca Raton: CRC Press;

**Gibson, S. J., J. M. Polak, P. Anand, M. A. Blank, J. F. B. Morrison, J. S. Kelly, S. R. Bloom (1984a),** *The distribution and origin of VIP in the spinal cord of six mammalian species.* *Peptides* 5: 201-207;

**Gibson, S. J., J. M. Polak, T. E. Adrian, J. M. Allen, J. S. Kelly, and S. R. Bloom (1984b),** *The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals.* *J. Comp. Neurol.* 227: 78-91;

**Gibson, S. J.; Polak, J. M.; Bloom, S. R.; Sabate, I. M.; Mulderry, P. K.; Ghatei, M. A.; Morrison, J. F. B.; Kelly, J. S.; Evans, R. M.; Rosenfeld, M. G. (1984c),** *Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man and eight other species.* *J. Neurosci.*, 4, 3101–3111;

**Grant G. and Rexed B. (1958),** *Dorsal spinal root afferents to Clarke’s column.* *Brain*, 81: 567-576;

**Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Prinjha, R.K., Davis, J.B., Randall, A. (2000),** *Voltage- and time- dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVRI)*. J. Physiol. 525(Pt 3),747–759. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00747.x;

**Gray DW, Marshall I (1992),** *Nitric oxide synthesis inhibitors attenuate calcitonin gene-related peptide endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta*. Eur J Pharmacol, 212:37-42;

**Henke, H.; Sigrist, S.; Lang, W.; Schneider, J.; Fischer, J. A. (1987),** *Comparison of binding sites for the calcitonin gene-related peptides I and II in man*. Brain Res., 410,404-408;

**Holzer, P. (1991),** *Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons*. Pharmacol. Rev. 43, 143–201;

**Jacques, D, Dumont, Y, van Rossum, D, Quirion, R (2000),** *Calcitonin gene-related peptide (CGRP), amylin and adrenomedullin: anatomical localization and biological functions in the mammalian and human brains*. In: Handbook of chemical neuroanatomy, vol 16, Peptide receptors part I (Quirion R, Björklund A, Hökfelt T, eds), pp 301–374. Amsterdam: Elsevier;

**Jansen, J., and J. K. S. Jansen (1969),** *The nervous system of Cetacea*. In “*The Biology of Marine Mammals*” (H. T. Andersen, ed.), pp. 175–252. Academic Press, New York;

**Jenkins T.W. (1989),** *Neuroanatomia funzionale dei Mammiferi*. Ed. Edagricole;

**Jolicoeur FB, Menard D, Fournier A, St Pierre S (1992),** *Structureactivity analysis of CGRP's neurobehavioral effects*. Ann NY Acad Sci 657:155–163;

**Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius,D. (2000),** *Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8134–8139. doi:10.1073/pnas.100129497;

**Katoh, K.; Tohyama, M.; Noguchi, K.; Senba, E. (1992),** *Axonal flow blockade induces alpha-CGRP mRNA expression in rat motoneurons*. Brain Res., 599, 153–157;

**Kitai S. T., Ha H., Morin F. (1965),** *Lateral cervical nucleus of the dog. Anatomical and microelectrode studies*. Am. J. Physiol. 209: 307-311;

- Latchman, D. S. (1990)**, *Cell-type-specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing*. *New Biol.*, 2, 297–303;
- Leff, S. E.; Evans, R. M.; Rosenfeld, M. G. (1987)**, *Splice commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression*. *Cell*, 48,517-524;
- Levine, J. D.; Fields, H. L.; Basbaum, A. I. (1993)**, *Peptides and the primary afferent nociceptor*. *J. Neurosci.*, 13, 2273–2286;
- Light, A. R. & Perl, E. R. (1979)**, *Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers*. *Journal of Comparative Neurology* 186, 133–150;
- Luebke AE, Dahl GP, Roos BA, Dickerson IM (1996)**, *Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3455–3460;
- Ma W, Chabot J-G, Powell K.J., Jhamandas K., Dickerson I.M., Quirion R. (2003)**, *Localization and modulation of calcitonin gene-related peptide-receptor component protein-immunoreactive cells in the rat central and peripheral nervous systems*, *Neuroscience* 120 (2003) 677–694;
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998)**, *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. *Nature* 393:333–339;
- Montagu G.**, 1821. *Description of a species of Delphinus which appears to be new*. *Mem. Wenerian Nat. Hist. Soc.* 3, 75-80;
- Morns, H. R.; Panico, M.; Etienne, T.; Tippins, J.; Girgis, S. I.; MacIntyre, I. (1984)**, *Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide*. *Nature*, 308,746-748;
- Mourad, F.H., Barada, K.A., Khoury, C., Hamdi, T., Saade, N.E., Nassar, C.F. (2009)**, *Amino acids in the rat intestinal lumen regulate their own absorption from a distant intestinal site*. *Am.J.Physiol.Gastrointest.LiverPhysiol.* 297,G292–G298. doi:10.1152/ajpgi.00100.2009;
- Mulderry, P. K.; Ghatel, M. A.; Spokes, R. A.; Jones, P. M.; Pierson, A. M.; Hamid, Q. A.; Kanse, S.; Amara, S. G.; Burnn, J. M.; Legon, S.; Polak, J. M.; Bloom, S. R. (1988)**,

*Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat.* Neuroscience, 25, 195–205;

**Noback C. R. and Demarest R. J. (1977)**, *The Nervous System- Introduction and Review*. 2<sup>nd</sup> Ed., New York, McGraw-Hill Book Co.;

**Olah, Z., Karai, L., Iadarola, M.J. (2001)**, *Anandamide activates vanilloid receptor1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1*. J. Biol. Chem. 276, 31163-31170. doi:10.1074/jbc.M101607200;

**Olesen, J. (2011a)**, *Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in migraine*. Cephalalgia 31, 510. doi:10.1177/0333102410388438;

**Olesen, J. (2011b)**, *CGRP in migraine*. Cephalalgia 31, 638. doi:10.1177/0333102410395790;

**Peele T. L. (1977)**, *The Neuroanatomic Basis for Clinical Neurology*. 3<sup>rd</sup> Ed., New York, McGraw-Hill Book Co.;

**Piehl, F.; Arvidsson, U.; Johnson, H.; Culheim, S.; Dagerlind, A.; Ulfhake, B.; Cao, Y.; Elde, R.; Pettersson, R. F.; Terenius, L.; Hökfelt, T. (1993)**, *GAP-43,  $\alpha$ FGF, CCK and  $\alpha$ - and  $\beta$ -CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance*. Eur. J Neurosci., 5, 1321–1333;

**Pokabla MJ, Dickerson IM, Papka RE (2002)**, *Calcitonin gene-related peptide-receptor component protein expression in the uterine cervix, lumbosacral spinal cord, and dorsal root ganglia*. Peptides 23:507–514;

**Raddino R, Pela G, Manca C, Barbagallo M, D'Aloia A, Passeri M, Visioli O (1997)**, *Mechanism of action of human calcitonin gene-related peptide in rabbit heart and in human mammary arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 29:463-470;

**Rexed B. (1964)**, *Some aspect of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord*. In *Organization of Spinal Cord* (Eccles, J.C., and Shade, J. P., Eds.). Amsterdam/New York, Elsevier Publishing Co., Prog. Brain Res., 11: 58-92;

**Rexed B. (1952)**, *The citoarchitectonic organization of spinal cord in the cat*. J. Comp. Neurol. 96: 415-495;

- Rexed B. (1954)**, *A citoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat*, J. Comp. Nuerol. 100: 297-379;
- Rexed B. and Brodal A. (1951)**, *The nucleus cervicalis lateralis. A spino-cerebellar relay nucleus*. J. Neurophysiol., 14: 399-407;
- Roggenkamp, D., Kopnick, S., Stab, F., Wenck, H., Schmelz, M., Neufang, G. (2013)**, *Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model*. J. Invest.Dermatol. 133, 1620–1628. doi:10.1038/jid.2012.464;
- Rosati P., Colombo R., Maraldi N. (2006)**, *Istologia* (5° ed.), Edi.Ermes s.r.l., Milano;
- Rosenblatt MI, Dahl GP, Dickerson IM (2000)**, *Characterization and localization of the rabbit ocular calcitonin gene-related peptide (CGRP)-receptor component protein (RCP)*. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:1159–1167;
- Rosenfeld, M. G.; Merrnod, J.-J.; Amara, S. G.; Swanson, L. W.; Sawchenko, P. E.; Rivier, J.; Vale, W. W.; Evans, R. M. (1983)**, *Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissues-specific RNA processing*. Nature, 304, 129–135;
- Rosenfeld, M. G.; Amara, S. G.; Evans, R. M. (1984)**, *Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype*. Science, 225, 1315-1320;
- Saika, T.; Senba, E.; Noguchi, K.; Sato, M.; Kubo, T.; Matsunaga, T.; Tohyama, M. (1991)**, *Changes in expression of peptides in rat facial motoneurons after facial nerve crushing and resection*. Mol. Brain Res., 11,187–196;
- Skofitsch, G.; Jacobowitz, D. M. (1985a)**, *Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system*. Peptides,6, 721–745;
- Skofitsch, G.; Jacobowitz, D. M. (1985b)**, *Quantitative distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat central nervous system*. Peptides, 6, 1069-1073;
- Steenbergh, P. H.; Hoppener, J. W. M.; Zandberg, J.; Visser, A.; Lips, C. J. M.; Jansz, H. S. (1986)**, *Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes*. FEB.SI.ztt., 209, 97–103;

- Sternini, C.; Anderson, K. (1992)**, *Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern*. Somatosens. Mot. Res., 9, 45-59;
- Su, H. C.; Ballesta, J.; Bloom, S. R.; Ghatei, M. A.; Gibson, S. J.; Morrison, J. F. B.; Mulderry, P. K.; Polak, J. M.; Terenghi, G.; Wharton, J. (1986)**, *Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in afferent neurons supplying the urinary tract: combined retrograde tracing and immunohistochemistry*. Neuroscience, 18, 727–747;
- Sugiura, Y., Lee, C. L. & Perl, E. R. (1987)**, *Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibres innervating mammalian skin*. Science 234, 358–361;
- Szallasi, A.(1995)**, *Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man*. Acta Physiol. Scand. Suppl. 629, 1–68;
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. (1999)**, *Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms*. Pharmacol. Rev. 51, 159–212;
- Szolcsanyi, J., Bartho,L. (2001)**, *Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update*. J. Physiol. Paris 95, 181–188. doi:10.1016/S0928-4257(01)00023-7;
- Tominaga, M.,Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., et al. (1998)**, *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. Neuron 21, 531–543. doi:10.1016/S0896-6273(00)80564-4;
- Tverberg, L. A.; Russo, A. F. (1992)**, *Cell-specific glucocorticoid repression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide transcription. Localization to an 18-base pair basal enhancer element*. J. Biol. Chem., 267,17567–17573;
- Unger, J. W.; Lange, W. (1991)**, *Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord*. J. Chem. Neuroanat., 4, 299-309;

**van Rossum D., Hanisch UK., Quirion R. (1997),** *Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors.* Neurosci Biobehav Rev 21: 649–678;

**Vyklicky, L., Knotkova-Urbancova, H., Vitaskova, Z., Vlachova, V., Kress, M., Reeh, P.W. (1998),** *Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats.* J. Neurophysiol. 79, 670–676;

**Wimalawansa SJ (1997),** *Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily.* Crit Rev Neurobiol 11:167–239;

**Wind, J. C.; Born, W.; Rijnsent, A.; Boer, P.; Fischer, J. A. (1993),** *Stimulation of calcitonin/CGRP-I and CGRP-H gene expression by dibutyryl cAMP in a human medullary thyroid carcinoma (TT) cell line.* Mol. Cell. Endocrinol.,92, 25–31;

**Woolf CJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1986),** *Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat.* Neurosci Lett 66:226–230;

**Zhou, Y., Zhang,M., Sun,G.Y., Liu,Y.P., Ran,W.Z., Peng,L.,et al. (2013),** *Calcitonin gene-related peptide promotes the wound healing of human bronchial epithelial cells via PKC and MAPK pathways.* Regul.Pept. 184, 22–29. doi: 10.1016/j.regpep.2013.03.020.