

Università della Calabria

Dottorato di Ricerca in

Biologia Animale

XXII Ciclo

Dr. Michele Crudo

*Meccanismi di Cross-talking tra i sistemi
Orexinergico e GABAergico nei teleostei.*

Tutor:

Dr. Rosa Maria Facciolo

Coordinatore:

Prof. Marcello Canonaco

Settore disciplinare BIO/06

Dipartimento di Ecologia

Laboratorio di Neuroanatomia Comparata – UNICAL

*"The sum of the whole
is greater than its parts"*

*"It's not enough to believe what you see,
you must also understand what you see"*

Sommario

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	9
PRIMO CAPITOLO.....	13
<i>IL SISTEMA OREXINERGICO</i>	14
1.1 La struttura delle Orexine	14
1.2 Aspetti evolutivi del sistema Orexinergico.....	18
1.3 Principali processi mediati dal sistema ORXergico	26
1.4 Interazioni tra il sistema Orexinergico ed altri sistemi di neurotrasmissione.....	41
SECONDO CAPITOLO	42
INTERAZIONI TRA IL SISTEMA OREXINERGICO ED IL SISTEMA GABAERGICO.....	43
<i>IL SISTEMA GABAERGICO</i>	43
2.2 Ruolo del GABA nei vertebrati acquatici.....	55
2.3 Interazioni tra il sistema ORXergico e GABAergico	57
MATERIALI E METODI	62
3.1 Caratteristiche generali di <i>Thalassoma pavo</i>	63
3.2 Il Sistema Nervoso Centrale di <i>Thalassoma pavo</i>	65
3.3 Caratteristiche generali di <i>Carassius auratus</i>	74
3.4 L'Encefalo dei cipriniformi	76
3.5 Modelli sperimentali.....	94
3.6 Trattamenti farmacologici	94
3.7 Alterazioni delle condizioni fotoperiodiche ambientali.....	95
3.8 Analisi comportamentale.....	96
3.9 Analisi statistica.....	100
3.10 Analisi molecolare.....	101
3.11 Analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).....	111
RISULTATI	113
4.1 Caratterizzazione molecolare di PPORX e ORXR.....	114
4.2 Pattern di espressione di PPORX e ORXR	124
4.3 Analisi comportamentale.....	126
4.3.1 Effetti dell'ORX-A in <i>Thalassoma pavo</i>	127
4.3.2 Effetti dell'ORX-A in <i>Carassius auratus</i>	129
4.4 Effetti di ORX-A sul pattern di espressione di ORXR.....	131
4.5 Effetti del fotoperiodo sulle attività dell'ORX-dipendenti in <i>Thalassoma pavo</i>	135

4.6 Azione di GABA _A R sulle attività comportamentali	138
Subunità β di GABAAR: Muscimol e Bicucullina.....	138
Subunità α di GABAAR: Zolpidem e Diazepam	146
4.7 Correlazione tra STF e quantità di cibo consumata.....	150
4.8 Analisi delle funzioni complesse	151
4.8.1 Capacità di apprendimento: T-maze test	151
4.8.2 Processi di ricompensa: Conditioned Place Preference.....	153
DISCUSSIONE	156
BIBLIOGRAFIA	168

RIASSUNTO

Le Ipocretine/Orexine (ORX) sono conosciute per la loro azione sulle attività stato-dipendenti quali il ciclo sonno-veglia, l'omeostasi energetica ed i processi di ricompensa/dipendenza. Ad oggi, la maggior parte degli studi si sono concentrati sullo studio delle funzioni del sistema ORXergico nei mammiferi, mentre solo recentemente l'attenzione è stata focalizzata sul ruolo svolto da tale sistema nei vertebrati acquatici. Alla luce di ciò, gli obiettivi di questo lavoro sono stati concentrati sulla valutazione degli effetti dell'ORX-A sulle attività comportamentali e neuronali di due teleostei, il teleosteo marino *Thalassoma pavo* ed il teleosteo d'acqua dolce *Carassius auratus*. A tale scopo, un'analisi comportamentale, molecolare e neurodegenerativa è stata condotta in seguito al trattamento intraperitoneale con le dosi ottimali di ORX-A, di un'agonista (MUS) ed antagonista (BIC) della subunità β di GABA_AR, e di due agonisti per la subunità α di GABA_AR, e precisamente il diazepam (DZP), una classica benzodiazepina, e lo zolpidem (ZOL), un agonista non-benzodiazepinico. Lo studio condotto sul comportamento esplorativo (swimming towards food sources; STF), sul nuoto (free swimming, FS) e sul tempo di inattività (resting states, R), ha evidenziato che l'ORX-A induceva un incremento molto elevato ($p < 0.001$) di STF in entrambi i teleostei, associata ad una diminuzione molto elevata ed elevata ($p < 0.01$) in R rispettivamente in *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*. È interessante notare come gli effetti dell'ORX-A siano risultati fortemente influenzati dalle condizioni fotoperiodiche ambientali, come evidenziato dalle alterazioni comportamentali e a livello del pattern di espressione di ORXR, osservate durante le condizioni di luce/buio costante in *Thalassoma pavo*. In tale contesto, le attività motorie ORX-A/fotoperiodo-dipendenti potrebbero essere riconducibili ad una dicotomia strutturale e funzionale di alcune aree encefaliche responsabili del controllo motorio nei teleostei. In particolare, durante il giorno, l'ORX-A promuoverebbe lo stato di veglia attraverso siti recettoriali ORXR a bassa affinità a livello ipotalamico (HTH) e mesencefalico (MES), promuovendo così i comportamenti di STF e FS. D'altro canto, durante la notte l'ORX-A indurrebbe la promozione di R principalmente attraverso l'attivazione di siti telencefalici ad alta affinità. Per quanto riguarda l'influenza di GABA_AR sulle attività comportamentali ORX-indotte, è stato possibile osservare che il MUS era capace di indurre un moderato ($p < 0.05$) incremento in STF, sottolineando non solo l'alto livello di conservazione dell'influenza del GABA sul comportamento alimentare, ma soprattutto che tale attività si esplicherebbe mediante la modulazione di ORXR in molteplici aree encefaliche nei teleostei. Inoltre, è stato verificato che tale agonista di GABA_AR sia in grado di mediare un effetto neuroprotettivo attraverso la modulazione di ORXR, come suggerito sia dalla riduzione delle *down-regulation* di ORXR BIC-dipendenti, che dalla modesta reazione argirofilica osservata a livello di alcune aree encefaliche, negli animali trattati con MUS+BIC. Quando gli incrementi di STF sono stati associati con la quantità di cibo consumata dagli animali, è stato notato che l'ORX-

A, il MUS e la BIC, non inducevano alcuna modificazione significativa in tale parametro. Al contrario, la modulazione della subunità α di GABA_AR era in grado di influenzare non solo STF, ma anche la quantità di cibo ingerita dagli animali, come dimostrato dagli incrementi molto elevati in STF, associati con un elevato e molto elevato incremento della quantità di cibo consumato dagli animali trattati rispettivamente con ZOL e DZP. Risulta interessante notare, come l'iperfagia ZOL/DZP-dipendente fosse correlata con modificazioni nel pattern di espressione di ORXR principalmente a livello di HTH e MES, aree conosciute per la loro azione nella regolazione dell'omeostasi energetica e della attività motorie nei teleostei. Sulla base di tali dati, è stato intrigante valutare se, analogamente a quanto osservato nei mammiferi, gli effetti dell'ORX-A e di GABA_AR su STF fossero mediati dalla loro azione sui pathways neuronali responsabili dei processi di ricompensa. A tale scopo sono stati applicati i paradigmi comportamentali quali il T-maze test ed il Conditioned Place Preference (CPP). Mediante tale analisi è stato evidenziato che l'ORX-A era responsabile di un moderato miglioramento nelle performance degli animali al T-maze; tale miglioramento diventava elevato quando venivano utilizzati stimoli visivi di diverso colore, suggerendo che, anche nei teleostei, l'ORX-A potrebbe operare a livello dei processi di apprendimento. Inoltre, l'analisi del CPP, alla quale è stato possibile evidenziare come l'ORX-A sia il principale fattore responsabile di un elevato incremento di un cambio di Place Preference (PP) colore-dipendente, suggerirebbe che sia proprio tale neuropeptide, ma non l'azione di GABA_AR, ad indurre un potenziamento dei circuiti della ricompensa in *Carassius auratus*. Anche in questo caso, le performances comportamentali erano giustificate con le up-regulations di ORXR osservate in alcune aree telencefaliche e nel nucleo del tubercolo posteriore periventricolare, aree rispettivamente omologhe dell'amigdala/ippocampo e dell'area ventrale tegmentale, che nei mammiferi sono note modulare i processi di apprendimento e ricompensa. È interessante notare come il DZP era responsabile solo di un moderato incremento del cambio di PP, mentre la BIC bloccava completamente il cambio di PP ORX-A-dipendente, suggerendo la presenza di un meccanismo di neurotrasmissione duale tra il sistema ORXergico e l'azione delle subunità α/β di GABA_AR a livello dei circuiti responsabili dei processi motivazionali e della ricompensa.

Nel complesso i risultati ottenuti in questo lavoro evidenziano, per la prima volta, non solo il ruolo determinante dell'azione ORXergica sul comportamento alimentare nei teleostei, ma soprattutto il coinvolgimento di tale sistema nel controllo dei processi motivazionali, analogamente a quanto osservato nei mammiferi.

ABSTRACT

The neuropeptides hypocretins/orexins (ORX) are known to control state-dependent activities such as sleep-wakefulness, energy homeostasis and reward/addiction processes. To date, interests regarding ORXergic neuronal functions have mostly dealt with mammals, while only recently attention is beginning to be directed towards aquatic vertebrates. On this basis, the intention of the present study was to evaluate ORX-A effects on behavioral and neuronal activities in marine (the ornate wrasse, *Thalassoma pavo*) and freshwater (the goldfish, *Carassius auratus*) teleost fishes. To achieve such aims behavioral, molecular and neurodegenerative analysis were performed following intraperitoneal injections of not only the most effective doses of ORX-A, but also of GABA_AR β subunit agonist muscimol (MUS) and antagonist bicuculline (BIC) as well as a classical benzodiazepine, diazepam (DZP), and a non benzodiazepine, zolpidem (ZOL), that are instead agonists of the GABA_AR α subunits.

Behavioral studies on explorative behaviors (swimming towards food sources; STF), free swimming (FS) and on resting states (R) displayed that ORX-A was responsible for very great ($p < 0.001$) enhancements of STF in both teleosts while similarly very great and great ($p < 0.01$) reduction of R was detected in wrasse and goldfish, respectively. Interestingly, ORX-A effects showed to be strongly influenced by environmental photoperiodic conditions as pointed out by behavioral and ORXR expression relationships in wrasses during constant light/dark conditions. In this case, ORX-A/photoperiodic-dependent motor behaviors might be related to a structural-functional dichotomy of some motor-controlling brain regions. Indeed during the day, ORX-A might be very likely promoting the awakening state via low-affinity ORXR sites at hypothalamic (HTH) and mesencephalic (MES) levels so inducing the promotion of STF and FS. On the other hand, during the night ORX-A might result in a promotion of R via activation of mostly telencephalic (TEL) high-affinity sites.

As far as GABA_AR influence is concerned, MUS was capable of inducing a moderate ($p < 0.05$) increase in STF and this tends to not only underlie a highly conserved GABA stimulus on feeding but also that such an activity relies on the involvement of ORXR in most brain regions of both fish models. Moreover, it was also possible to observe that such a GABA_AR agonist elicits a neuroprotection via ORXR as suggested by both the reduction of BIC-dependent mRNA down-regulations and the very low argyrophilic reactions in brain regions of MUS+BIC-treated fish. When the increase of STF was next checked to see whether it was linked to an enhancement of food consumption, I observed that ORX-A and GABA_AR β drugs (MUS and BIC) did not modify this activity. On the other hand, GABA_AR α subunits appeared to not only influence STF maneuvers but also food consumption as demonstrated by ZOL and DZP evoking very great increases in STF coupled with great and very great amounts of food consumption, respectively. Interestingly, also in

this case ZOL- and DZP-dependent hyperphagia seemed to be correlated to ORXR expression variations in mostly HTH and MES, brain areas that are involved in energy homeostasis and motor activities.

At this point it was interesting to investigate if ORX- and GABA_AR-induced STF effects were mediated through rewarding pathways like that reported for mammals. With such an aim, T-maze and Conditioned Place Preference (CPP) paradigms were performed. For this part, ORX-A accounted for a moderate improvement of T-maze performances that became great when associated to color visual stimuli, suggesting that ORX-A might be operating on memory processes also in fish. Moreover from CPP analysis in which ORX-A acted as a main agent responsible for great increase of color-dependent change in CPP, it seems that this neuropeptide and not GABA_AR drugs, might be potentiating reward pathways in goldfish. Also in this case, behavioral performances are consistent with ORXR up-regulations in some TEL regions and in the nucleus of the posterior tuberculum, homologous of the amygdala plus hippocampus and ventral tegmental area that in mammals control learning and reward processes. It is worthy to note that DZP only accounted for a moderate increase in CPP change while BIC completely blocked ORX-A-induced change in CPP and this tends to point to a dual neurosignaling mechanism between ORX circuit and GABA_AR α/β subunits on motivational-reward behaviors. Overall these results highlight, for the first time, not only an ORX neuronal driving force operating on feeding behaviors in goldfish, but above all its participation in the control of goal-oriented behaviors like in mammals.

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni è andato sempre più ampliandosi l'interesse per la comprensione degli intimi meccanismi che guidano l'assunzione di cibo, il mantenimento dell'omeostasi energetica e la modulazione del ciclo sonno-veglia, ed è stato così messo in risalto il complesso sistema di interazioni che si realizza tra gli stimoli ambientali e il Sistema Nervoso Centrale (SNC), inoltre risulta sempre più chiara l'importanza del ruolo che quest'ultimo gioca nell'economia dell'organismo. È ora mai assodato che nei vertebrati il principale centro di regolazione del comportamento alimentare è situato a livello dell'ipotalamo (HTH) e numerosi neuropeptidi ipotalamici intervengono nella regolazione dell'assunzione di cibo, stimolando o inibendo tale comportamento. Tra i neuropeptidi capaci di influenzare tale attività ci sono sicuramente sia le Orexine (ORXs), sia il neuropeptide Y (NPY) i quali inducono un potente effetto nello stimolare l'assunzione di cibo, mentre CART (*cocaina and amphetamine-related transcript*) porta ad una inibizione di tale comportamento (Volkoff, 2006). Il sistema ORXergico, dalla sua recente scoperta ad oggi, è stato protagonista di numerose indagini volte alla sua caratterizzazione, che sempre di più hanno messo in risalto la sua importanza in numerosi processi biologici (Sakurai, 2005b; Burdakov e Alexopoulos, 2005; Taylor e Samson, 2003; Nakamachi *et al.*, 2006). A tal proposito diverse aree ipotalamiche sembrano essere implicate in tali regolazioni come l'area ipotalamica laterale (LHA), l'area perifornicale (PFA) e l'ipotalamo dorsomediale (DMH) nelle quali sono confinati i neuroni ORXergici. In particolare l'ipotesi che le ORXs siano in grado di stimolare l'assunzione di cibo è supportata dalle evidenze sperimentali che mettono alla luce le ricche innervazioni che arrivano al nucleo parvocellulare, al nucleo ipotalamico ventromediale (VMN), al nucleo paraventricolare ed al nucleo arcuato (ARC), i quali sono tutti raggiunti da fibre ORXergiche provenienti da LHA (Date *et al.*, 1999). Accanto alla regolazione alimentare, un altro effetto delle ORXs ugualmente caratterizzato e senza ombra di dubbio la modulazione del ciclo sonno-veglia. Le ORXs, infatti, intervengono promuovendo lo stato di veglia, sostenendo la veglia attiva ed impedendo all'animale di addormentarsi durante un periodo prolungato di veglia attiva (Saper *et al.*, 2005), disfunzioni di tale sistema si è visto essere alla base di disordini del sonno come la narcolessia (Lin *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000). Le ORXs derivano dalla scissione proteolitica di unico precursore chiamato prepro-orexina (PPORX), la quale scindendosi produce due peptidi biologicamente attivi l'Orexina-A (ORX-A) e l'Orexina-B (ORX-B). Diverse sono le funzioni svolte dalle ORXs nei mammiferi e questo è possibile grazie alla loro interazione con due recettori, il recettore di tipo 1 (ORX1R) e il recettore di tipo 2 (ORX2R), entrambi appartenenti alla classe dei recettori orfani accoppiati alle proteine G (GPCR), ampiamente distribuiti a livello cerebrale e che in diversi casi mediano azioni di diversa natura (Sakurai, 2005b). Da un punto di vista evolutivo, il sistema ORXergico è da considerarsi filogeneticamente antico in quanto la sua origine è stimata prima ancora della

divergenza tra la linea evolutiva dei vertebrati terrestri e quella dei vertebrati acquatici (Alvarez e Soutcliffe, 2002). Molteplici studi dimostrano che diversi fattori, ed importanti sistemi neuronali, interagiscono con il sistema ORXergico (Kaslin *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006; Volkoff, 2006; Sakurai, 2007) inibendo o attivando tale sistema per via di particolari neurotrasmettitori e distinte fibre provenienti da diversi distretti cerebrali. Sicuramente una particolare attenzione deve essere rivolta alle interazioni che intercorrono tra il sistema GABAergico ed il sistema ORXergico (Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006; Song *et al.*, 2006) dove diversi aspetti comportamentali hanno subito delle modifiche, quali il *feeding* (Kokare *et al.*, 2006; Thorpe *et al.*, 2006), l'attività locomotoria (Kotz *et al.*, 2006) ed il ciclo sonno-veglia (Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006) che sono regolati attraverso le connessioni reciproche che intercorrono tra neuroni GABAergici e ORXergici (Alam *et al.*, 2005; Kokare *et al.*, 2006; Kotz *et al.*, 2006). L'acido γ -amminobutirrico (GABA) è il principale amminoacido inibitorio del SNC e svolge un ruolo cruciale nel controllo di molteplici funzioni cerebrali e nella fisiopatologia di numerose malattie mentali e neurologiche (Baron *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2004). Il GABA viene sintetizzato a livello del SNC per decarbossilazione dell'acido glutammico catalizzata dalla glutammico decarbossilasi (GAD). Un'alta concentrazione di GABA si ritrova nel *globus pallidus*, in HTH, nell'ipofisi, nei corpi quadrigemini, nella *substantia nigra* (SN), nella corteccia cerebrale e in HIP a differenza di zone come il ponte e il bulbo dove le concentrazioni sono più basse. Gli effetti inibitori del GABA sul SNC sono mediati dall'attivazione di due classi di recettori, i recettori ionotropi GABA_ARs, GABA_CRs e i recettori metabotropi GABA_BRs. Tra questi indubbiamente i GABA_ARs costituiscono la grande maggioranza di tutti i recettori per il GABA mediando l'ingresso di ioni Cl⁻ all'interno della cellula. Essi inoltre rappresentano il principale sito d'azione delle benzodiazepine (BZD), dei barbiturici, degli anestetici e dell'etanolo, oltre ad avere una elevata sensibilità per il muscimol, la bicucullina e lo zolpidem. Essendo il GABA un messaggero ubiquitario, l'attivazione o l'antagonismo a livello dei suoi recettori è il meccanismo d'azione di un gran numero di farmaci sedativi, miorilassanti, ipnotici, antiepilettici e per la terapia di alcune patologie convulsive. In aggiunta, tale sistema gioca un ruolo fondamentale nel bilancio alimentare e nel ciclo sonno-veglia, svolgendo un'azione modulatoria sull'attività di importanti nuclei encefalici come il *locus coeruleus* (LC), il nucleo del *raphe* e il nucleo tuberomammillare (TMN) (Backberg *et al.*, 2002; Cluderay *et al.*, 2002). A tal proposito si è ipotizzato che l'ORX-A possa influenzare l'assunzione di cibo mediante una riduzione del tono GABAergico all'interno della regione rostrilaterale dell'HTH (Thorpe *et al.*, 2006), ipotesi supportata dalle evidenze sperimentali osservate in seguito a somministrazione di GABA in LHA la quale conduce ad una riduzione dell'assunzione di cibo (Thorpe *et al.*, 2003). Inoltre, la somministrazione di ORX-A induce, durante la prima ora, una

notevole diminuzione del rilascio di GABA nelle regioni in cui sono prevalentemente localizzati i neuroni ORXergici, come PFA e LHA, evidenziando in tal modo un effetto inibitorio di ORX-A sui neuroni GABAergici. Accanto a tale effetto il sistema ORXergico, come già detto, ed il sistema GABAergico rivestono, all'interno dell'ampio *network* neuronale, un ruolo cruciale anche per la modulazione del ciclo sonno-veglia (Liu *et al.*, 2002; Korotkova *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006). La stretta sinergia tra il sistema ORXergico e quello GABAergico è attiva anche in regioni cruciali per la modulazione dell'attività locomotoria. Al momento risultano scarse le informazioni relative all'organizzazione neurobiologica di tali sistemi nei pesci, organismi che nascondono dietro un'apparente semplicità morfologica una grande complessità ed adattabilità anche a livello encefalico. I pesci teleostei per la loro variabilità filogenetica e per le loro molteplici strutture e specializzazioni, rappresentano un interessante modello per le ricerche neuroanatomiche, come si è già dimostrato con *Thalassoma pavo* (Giusi *et al.*, 2007), e per la caratterizzazione dei sistemi neuronali coinvolti nella regolazione del comportamento alimentare, come evidenziato nel caso di *Carassius auratus* (Popesku *et al.*, 2008). Sulla base di tali presupposti per questo lavoro sperimentale, il cui obiettivo rappresenta una prima caratterizzazione del sistema ORXergico e del *cross-talking* con il sistema GABAergico, sono stati scelti come modelli sperimentali proprio *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*. I molteplici approcci metodologici ed il complesso disegno sperimentale che caratterizza questo lavoro potranno fornire utili informazioni riguardanti il *cross-talking* morfo-funzionale tra il sistema ORXergico ed il sistema GABAergico che caratterizza il comportamento alimentare nei nostri modelli sperimentali.

PRIMO CAPITOLO

IL SISTEMA OREXINERGICO

Le ORXs vennero identificate per la prima volta da un gruppo di ricerca che individuò due peptidi, uno di 33 e l'altro di 28 amminoacidi (aa), ligandi endogeni per due recettori orfani accoppiati alle proteine G (GPCR) (Sakurai *et al.*, 1998); i due peptidi derivavano dalla scissione proteolitica di un precursore unico di 130 aa (Edwards *et al.*, 1999). Dal momento che iniezioni intracerebroventricolari (i.c.v.) inducevano un notevole aumento dell'assunzione di cibo nel ratto, si è pensato di assegnare a questi peptidi il nome di ORXs, dal greco *orexina* che vuol dire appetito (Sakurai *et al.*, 1998). Il peptide precursore fu chiamato prepro-orexina (PPORX) e i peptidi di 33 e 28 aa rispettivamente orexina-A (ORX-A) e orexina-B (ORX-B). Diversi studi hanno dimostrato che la PPORX è localizzata nell'area ipotalamica laterale (LHA) e nelle aree adiacenti a questa (De Lecea *et al.*, 1998).

Contemporaneamente, un altro gruppo di ricerca identificò nell'encefalo di ratto un nuovo mRNA codificante per un propeptide di 130 aa; questo propeptide scindendosi produceva due peptidi biologicamente attivi, uno di 33 e l'altro di 29 aa. Il nome che venne dato a questi peptidi fu quello di ipocretine per la somiglianza che questi avevano con le incretine (da *hypothalamic incretin*: hcrt, incretina ipotalamica). Il propeptide venne chiamato preproipocretina (prepro-hcrt) e i due peptidi rispettivamente ipocretina-1 (hcrt-1) e ipocretina-2 (hcrt-2; De Lecea *et al.*, 1998). Si capì, quindi, che, molto probabilmente, i peptidi isolati dai due gruppi di ricerca non erano altro che gli stessi peptidi biologici.

Le ORXs giocano un ruolo importante perché intervengono in diversi fattori: nell'assunzione di cibo, influenzando la secrezione ormonale in particolare nella risposta a determinati stress (Kukkonen *et al.*, 2002); nella regolazione del ciclo sonno-veglia, dove è stato osservato che un'anomalia del sistema, nell'uomo e in altri mammiferi, è alla base della narcolessia (Lin *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000). Ultimamente si è visto, anche, che esse sono coinvolte nei comportamenti di dipendenza, nella coordinazione delle emozioni e nei processi di ricompensa (Boutrel *et al.*, 2005; Harris and Aston-Jones, 2006; Narita *et al.*, 2006).

1.1 La struttura delle Orexine

Dalla sua scoperta fino ad oggi il sistema ORXergico è stato studiato in maniera approfondita nei mammiferi; in particolare, è stato osservato che, nell'uomo, il gene per la PPORX è localizzato sul cromosoma 17q21 ed è costituito da due esoni e un introne distribuiti su 1432 paia di basi (bp), una

regione promotrice di 3200 bp e una sequenza regolatrice di 450 bp (Waleh *et al.*, 2001). Tale complesso codifica per una proteina di 131 aa (Sakurai *et al.*, 1999) mentre nel ratto il gene per la PPORX è lungo 585 bp e codifica per una proteina di 130 aa (Sakurai *et al.*, 1998), (Fig. 1.1).

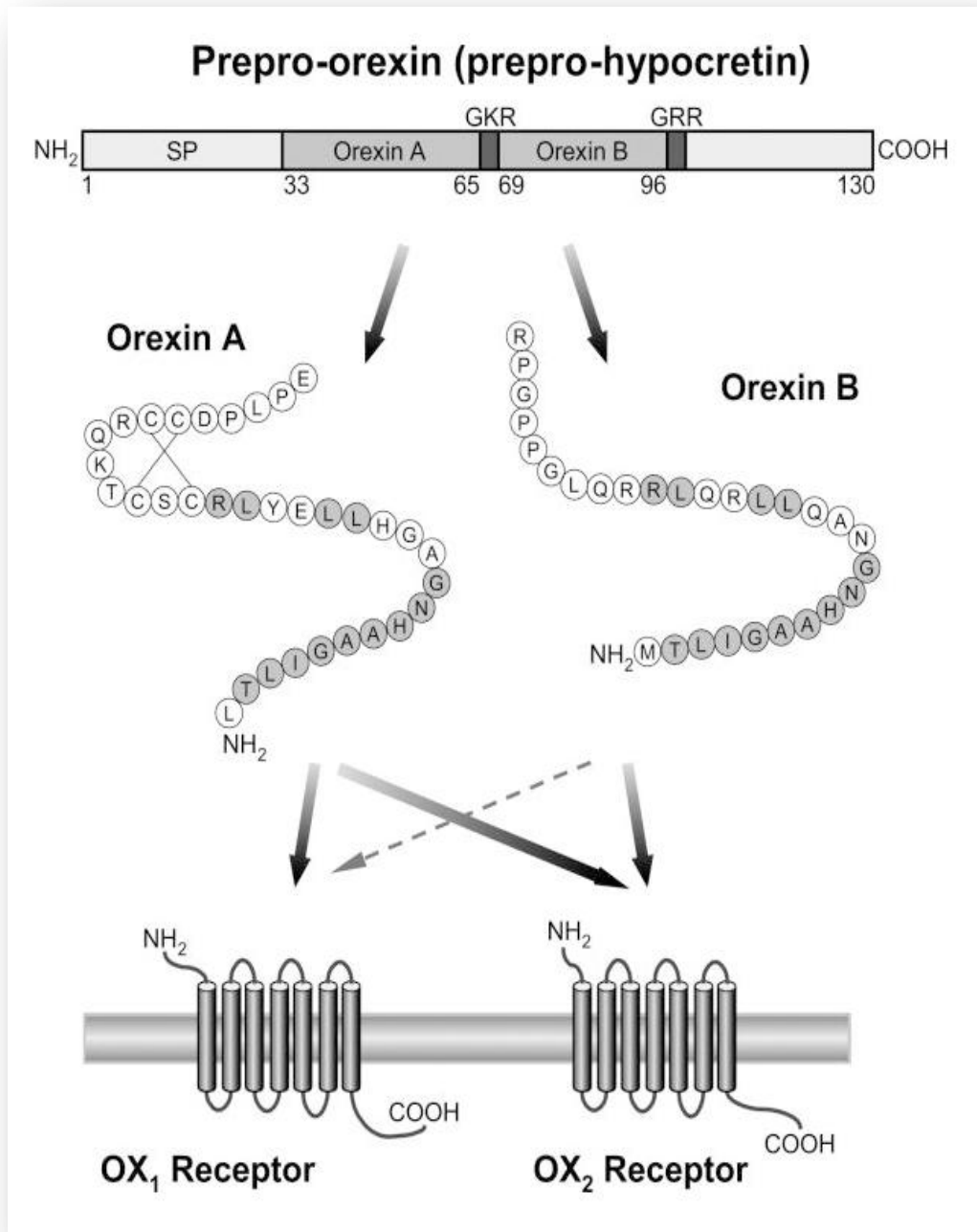


Fig. 1.1 Rappresentazione schematica del sistema ORXergico. ORX-A e ORX-B derivano da un peptide precursore comune. L'azione delle ORXs è mediata attraverso due complessi recettoriali accoppiati a proteine G chiamati ORX1R e ORX2R. ORX1R è un recettore selettivo solo per l'ORX-A a differenza di ORX2R che non è un recettore selettivo per nessuna ORX.

La sequenza amminoacidica di PPORX umana presenta un'identità dell'83% con il topo e addirittura del 95% con il ratto e la maggior parte delle sostituzioni amminoacidiche sono localizzate sulla porzione C-terminale (Sakurai *et al.*, 1998).

Nel ratto ORX-A è un peptide di 33 aa, il cui peso molecolare è pari a 3562 Da e presenta due ponti disolfuro intracatena situati tra i residui di cisteina (Cys) in posizione 6, 7, 12, 14. La sequenza di ORX-A inizia con un residuo di Glutamina (Gln) in posizione 33 di PPORX e termina con la Glicina (Gly) in posizione 66; questa Gly molto probabilmente funge da donatrice del NH₂ per l'ammidazione del C-terminale. La sequenza peptidica di ORX-A è molto conservata in molte specie di mammiferi (uomo, ratto, topo, pecora, cane e maiale; Sakurai *et al.*, 1998). Inoltre possiede una buona solubilità nei lipidi che le permette, a differenza di ORX-B, di superare la barriera emato-encefalica (Kunii *et al.*, 1999).

L'ORX-B, sempre nel ratto, è un peptide di 28 aa il cui peso specifico è pari a 2937 Da con un'omologia del 46% (residui 13/28) con l' ORX-A. L' ORX-B umana, rispetto a quella del ratto, del topo, del maiale e del cane, differisce solo di 1 o 2 aa (Mondal *et al.*, 1999a, b). In certe aree del sistema nervoso centrale (SNC) l' ORX-B risulta più espressa dell' ORX-A (Mondal *et al.*, 1999a,b; Date *et al.*, 2000a, b). I residui amminoacidici che formano la superficie idrofobica al C-terminale di ORX-A sono ben conservati anche nell' ORX-B mentre uno studio, focalizzato sull'analisi della struttura secondaria dell' ORX-A umana, ha evidenziato che la porzione N-terminale di ORX-A, che comprende i due ponti disolfuro intracatena, è notevolmente differente rispetto alla porzione N-terminale di ORX-B. Per quanto riguarda i vertebrati non-mammiferi, il sistema ORXergico è stato studiato anche in alcuni pesci quali *Fugu rubripes*, *Danio rerio* (Kaslin *et al.*, 2004) e *Gadus morhua* (Xu e Volkoff, 2007), negli anfibi (*Xenopus laevis*, Shibahara *et al.*, 1999) ed anche negli uccelli (*Gallus gallus*; Ohkubo *et al.*, 2002). In *Danio rerio*, il gene per la PPORX è formato da un solo esone con entrambe le estremità C-terminale e N-terminale che hanno un elevato grado di variabilità rispetto a quelle dei mammiferi. Il gene per la PPORX in *Gadus morhua* codifica per un peptide di 143 aa che, scindendosi, produce ORX-A e ORX-B di 50 e 29 aa. In tale teleosteo ORX-A è un peptide di 47 aa, simile per il 42% all'ORX-A di *Fugu rubripes* mentre, in posizione N-terminale, è priva di 2 aa rispetto ai mammiferi. Nei mammiferi, l' ORX-A presenta quattro residui di Cys che formano due ponti disolfuro intracatena; nei pesci studiati è stato però osservato che sono presenti solo tre Cys in quanto, sia in *Danio rerio* che in *Fugu rubripes*, manca il residuo di Cys che corrisponde a quello localizzato in posizione 12 della sequenza dell' ORX-A umana. Nei pesci, tuttavia, la sequenza di ORX-A possiede un residuo aggiuntivo di Cys in posizione 19 in *Danio rerio*, e in posizione 21 in *Fugu rubripes* (Kaslin *et al.*, 2004; Xu e Volkoff, 2007).

Sia in *Danio rerio* che in *Fugu rubripes*, l' ORX-A contiene anche una sequenza spaziatrice non presente in altri vertebrati, compresa tra i residui amminoacidici 24 e 25 della corrispondente sequenza dei mammiferi (Alvarez e Soutcliffe, 2002) (Fig.1.2).

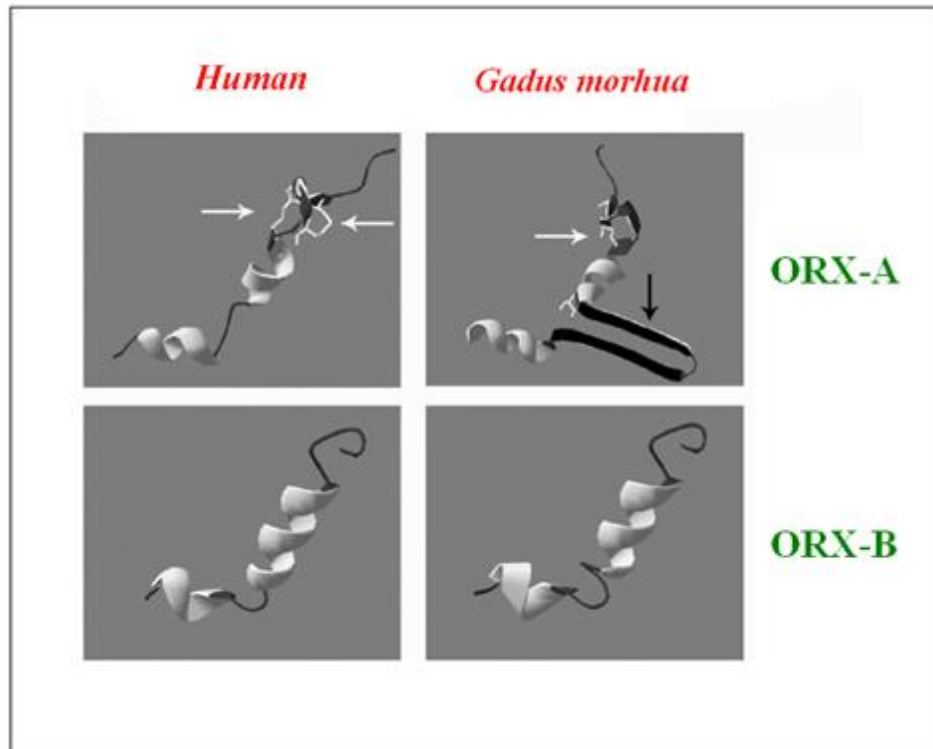


Fig. 1.2 Struttura di ORX-A ed ORX-B nell'uomo e *Gadus morhua* a confronto.

L' ORX-B in *Danio Rerio* è un peptide lineare di 28 aa e mostra il 64% di identità con ORX-B di *Fugu rubripes*; la porzione N-terminale presenta una maggiore variabilità rispetto alla porzione C-terminale (Kaslin *et al.*, 2004). Anche in *Gadus morhua* ORX-A presenta solo tre Cys e possiede, a differenza dei mammiferi, un solo ponte disolfuro formato da Cys in posizione 7 e in posizione 14. Come nel caso di *Danio rerio* e *Fugu rubripes*, è presente, inoltre, una sequenza spaziatrice compresa tra la Gly 63 e l'istidina 76 (Hys) di PPORX, che non è stata trovata in altri vertebrati e che non mostra un'alta omologia di sequenza con la sequenza spaziatrice delle altre specie di pesci considerate (Xu e Volkoff, 2007). Tale caratteristica suggerisce che, quasi sicuramente, la sequenza spaziatrice non è importante per l'attività dell' ORX-A ma serve solo per preservare la struttura di questo peptide (Alvarez e Soutcliffe, 2002; Kaslin *et al.*, 2004; Xu e Volkoff, 2007). L'ORX-B invece ha una struttura che in *Gadus morhua* ha una ridotta variabilità per cui, tale peptide, risulta molto conservato tra le specie durante la filogenesi (Xu e Volkoff, 2007).

Per quanto riguarda gli anfibi, è stato osservato che in *Xenopus laevis* la PPORX ha un'identità del 56% con la PPORX umana. Negli anfibi l' ORX-A è un peptide di 31 aa privo di 2 aa in posizione N-terminale contenente 6 sostituzioni amminoacidiche rispetto all' ORX-A umana. L' ORX-B in *Xenopus laevis* è costituita da 28 aa e presenta anch'essa 6 sostituzioni amminoacidiche sempre rispetto all'ORX-B umana. Entrambe le ORXs, in questa specie, presentano un ammidazione in posizione C-terminale simile a quello che avviene nei mammiferi (Shibahara *et al.*, 1999).

Negli uccelli sono stati condotti degli studi su *Gallus gallus* in cui è stato osservato che la PPORX ha un'omologia, rispetto a quella umana, del 55%; il trascritto è lungo 658 bp e codifica per una proteina di 148 aa nella quale la maggior parte delle sostituzioni sono localizzate in posizione C-terminale. In tale specie è dimostrato che l' ORX-A ha un'omologia dell'85% mentre l' ORX-B ha un'omologia del 65%, sempre rispetto alle ORXs dei mammiferi (Ohkubo *et al.*, 2002).

1.2 Aspetti evolutivi del sistema Orexinergico

Si pensa che tale sistema sia nato e si sia completato circa 650 milioni di anni fa in un protocordato, antenato comune ai vertebrati acquatici e terrestri (Alvarez e Soutcliffe, 2002). È stata, infatti, dimostrata la presenza di tale sistema nei pesci, come *Fugu rubripes* e *Danio rerio*, ma non nell'urocordato *Ciona intestinalis*, appartenente al primo ramo divergente dai vertebrati all'interno dei cordati. Il fatto che i peptidi ORXergici presentano un'alta conservazione lungo la filogenesi fa pensare, inoltre, che il gene per la PPORX sia comparso prima della differenziazione tra vertebrati acquatici e terrestri (Huesa *et al.*, 2005).

Dai diversi studi condotti sulle ORXs, si nota come ci sia una forte corrispondenza tra le anse N-terminale e C-terminale di tali proteine con quelle appartenenti alla famiglia delle incretine e in particolare tra l' ORX-B e la secretina (SCRT). Ad oggi, l'ipotesi più avvalorata è che le ORXs derivino da una duplicazione in tandem di un gene primordiale simile a SCRT (Alvarez e Soutcliffe, 2002); è molto probabile, quindi, che a livello evolutivo le ORXs rappresentino uno dei membri della superfamiglia dell' incretine.

Inoltre, il fatto che la sequenza amminoacidica delle ORXs sia altamente conservata tra le varie classi di vertebrati, lascia pensare che, le ORXs, possano svolgere funzioni simili nelle diverse classi di vertebrati (Alvarez e Soutcliffe, 2002), tra cui un importante ruolo di neuromodulazione (Ohkubo *et al.*, 2002).

1.2.1 I recettori ORXergici

Diverse sono le funzioni svolte dalle ORXs nei mammiferi e questo è possibile grazie alla loro interazione con due recettori, il recettore di tipo 1 (ORX₁R) e il recettore di tipo 2 (ORX₂R), entrambi appartenenti alla classe dei GPCR. Tali recettori presentano sequenze molto conservate nei mammiferi nei quali si nota un'omologia del 94% e 95%, rispettivamente, di ORX₁R e ORX₂R tra l'uomo e il ratto (Sakurai *et al.*, 1998). Il gene per ORX₁R nell'uomo è localizzato a livello del cromosoma 1 mentre quello per ORX₂R si trova nel cromosoma 6 (Kukkonen *et al.*, 2002).

A livello genomico, entrambi i recettori, presentano una sequenza regolatrice non tradotta al 5' e sono codificati da sette esoni separati da sei introni. I due recettori per le ORXs hanno una struttura omologa: sono provvisti di sette domini transmembrana che possiedono un dominio extracellulare amminoterminale e un dominio idrofilico carbossiterminale nel lato citoplasmatico (Sakurai *et al.*, 1998). È stato osservato che, per attivare gli ORXR, è necessaria la presenza della sequenza amminoacidica presentenella porzione C-terminale dei peptidi ORXergici e che, tali segmenti peptidici, siano costituiti almeno da 19 aa, per l' ORX-A, e da 21 aa per l' ORX-B (Lang *et al.*, 2004); tuttavia, l'attività funzionale di tali segmenti risulta ridotta se paragonata all'attività dei peptidi integri. La conservazione della completa attività dell' ORX-A richiede che la sequenza amminoacidica di tale peptide sia completa, mentre si è visto che i due ponti disolfuro intracatena non sembrano essere necessari per il mantenimento di tale attività (Lang *et al.*, 2006). E' stato notato che diversi residui amminoacidici sono importanti per il riconoscimento e il legame con l' ORX-A e che la sostituzione di uno solo di questi residui porta ad un abbattimento dell'affinità, mentre si è constatato come altre porzioni siano meno importanti e una loro sostituzione non vari affatto l'affinità di legame (Takai *et al.*, 2006). I residui amminoacidici localizzati nella regione C-terminale dell' ORX-B, al contrario, sono importanti nell'interazione sia con l' ORX₁R che con ORX₂R (Lang *et al.*, 2004). È stato inoltre osservato che l' ORX₁R lega con un'affinità dieci volte superiore l' ORX-A rispetto all' ORX-B, mentre l' ORX₂R lega entrambe le ORXs apparentemente con uguale affinità (Sakurai *et al.*, 1998; Kukkonen *et al.*, 2002).

L'attivazione dei recettori ORXR provoca, a livello cellulare: un accumulo di Ca²⁺ extracellulare all'interno delle cellule esprimenti tali recettori (Lund *et al.*, 2000), un'attivazione della fosfolipasi Cβ-inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3)-Ca²⁺ (Lund *et al.*, 2000; Holmqvist *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2001) ed un coinvolgimento nella via dell'adenilato ciclasi con un innalzamento di adenosinmonofosfato ciclico (cAMP) (Malendowicz *et al.*, 1999; Mazzocchi *et al.*, 2001a); tuttavia non tutti gli studi sono concordi su questo ultimo effetto (Van den Pol *et al.*, 1998).

La maggior parte degli studi su ORXRs è stata condotta su encefalo di ratto in cui è stato osservato che tali recettori si distribuiscono negli stessi siti dove poi si dirigono le proiezioni dei neuroni ORXergici (Kukkonen *et al.*, 2002), (Fig.1.3).

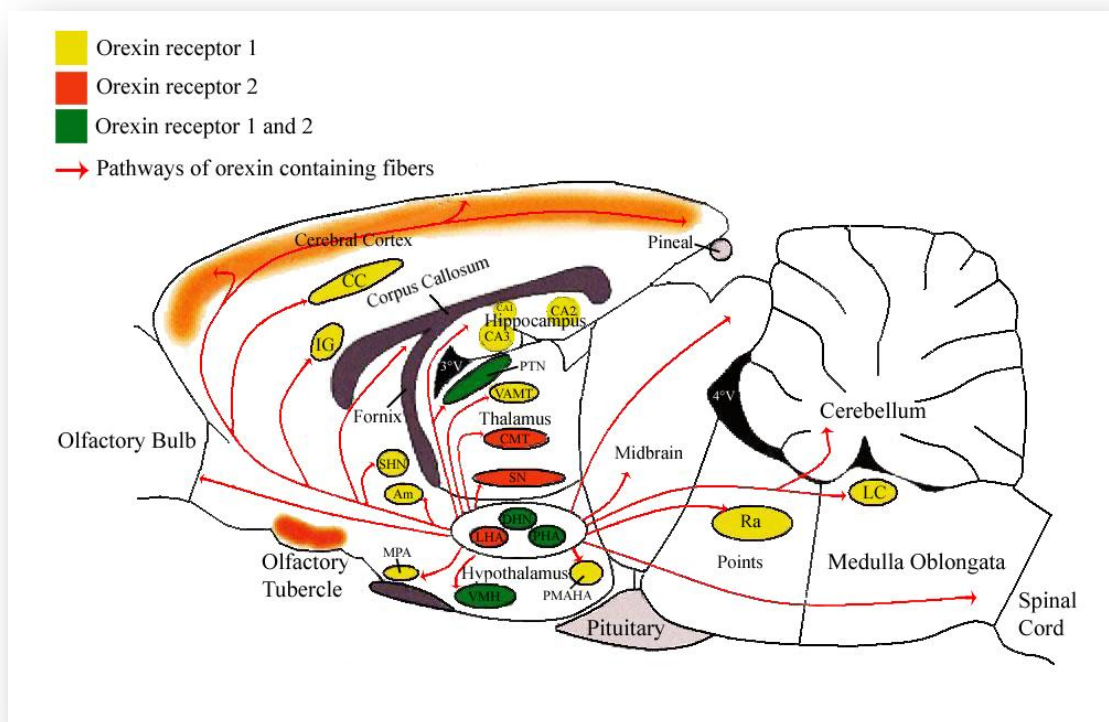


Fig. 1.3 Rappresentazione schematica delle principali proiezioni dei neuroni ORXergici e della principale distribuzione dei ORXRs lungo il SNC di ratto. Am= amigdala; CA1, CA2, CA3 = aree ippocampali CA1, CA2, e CA3; CC = Corteccia del cingolo; CMT = nucleo talamico centro mediale; DHN = nucleo ipotalamico dorsomediale; IG = indusium griseum; LC = locus ceruleus; LHA = area ipotalamica laterale; MPA = area preottica mediale; PHA = area ipotalamica posteriore; PMAHA = area amigdalopocampale posteromediale; PTN = nucleo talamico paraventricolare; Ra = nucleo del raphe; SHN = nuclei sottoippocampali; SN = nucleo subtalamico; 3V = terzo ventricolo; 4V = quarto ventricolo; VAMT = porzione ventrale del nucleo anteriore mediale; VMH = nucleo ipotalamico ventromediale.

Inoltre, i ORXRs sono stati evidenziati anche in altri tipi di tessuti periferici come: pancreas, tratto gastrointestinale (Kirchgeßner e Liu., 1999; Naslund *et al.*, 2002) e ghiandola pituitaria (Blanco *et al.*, 2001; Jöhren *et al.*, 2001). Per quanto riguarda il solo ORX₁R è stata evidenziata la sua presenza anche a livello del testicolo, nella ghiandola surrenale (Jöhren *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2002), del tessuto renale e della tiroide, mentre, l' ORX₂R, è stato trovato a livello polmonare (Jöhren *et al.*, 2001).

I ORXRs sono stati caratterizzati anche in *Mus musculus* (Chen e Rendevea, 2004) e, tra i vertebrati non-mammiferi, in *Danio rerio* (Prober *et al.*, 2006) e *Gallus gallus* (Ohkubo *et al.*, 2003). In *Mus musculus*, il gene per ORX₁R è costituito da 9 esoni, localizzato sul cromosoma 4 e

codifica per un polipeptide maturo che risulta costituito da 416 aa mentre, per quanto riguarda il trascritto di ORX₂R, questo va incontro a *splicing* alternativo formando due sottotipi recettoriali: ORX_{2 α} R, costituito da 443 aa, ed ORX_{2 β} R, costituito da 460 aa. Il ORX₁R, ORX_{2 α} R e ORX_{2 β} R sono ampiamente distribuiti sia a livello encefalico che periferico, con una distribuzione che è tessuto-specifica, in particolare, ORX_{2 α} R è stato ritrovato principalmente nel muscolo scheletrico e nel rene. Parallelamente a ciò, è stato dimostrato che la privazione di cibo porta ad un maggiore aumento nell'ipotalamo (HTH) dell'espressione del gene per ORX_{2 β} R piuttosto che per ORX_{2 α} R ed ORX₁R, ciò fa capire che, in *Mus musculus*, ORX_{2 β} R svolge un ruolo fisiologico più importante nel comportamento alimentare rispetto alle altre isoforme recettoriali (Chen e Randeva, 2004).

In *Gallus gallus* si è notato che esiste un solo tipo di ORXR chiamato con il nome *chicken* ORXR (cORXR), il cDNA è lungo 1869 bp e il polipeptide maturo è lungo 501 aa. Tale recettore ha un omologia dell'80% con ORX₂R dei mammiferi ed è espresso maggiormente nel HTH, nel telencefalo, nel tetto ottico (OTec; Ohkubo *et al.*, 2003), ma anche nei tessuti periferici come: la ghiandola pituitaria, il surrene e nelle gonadi, dove risulta maggiormente espresso nei testicoli rispetto alle ovaie. Queste informazioni fanno capire che le ORXs in questa specie svolgono un'azione di tipo neuroendocrino e che gli ormoni sessuali steroidei possono regolare l'espressione dei cORXR (Ohkubo *et al.*, 2003), come già osservato per i mammiferi (Johren *et al.*, 2001).

In *Danio rerio* è stata osservata la presenza di un solo ORXR, che ha un omologia di sequenza del 70% e del 60% rispettivamente con ORX₂R e con ORX₁R dei mammiferi (Prober *et al.*, 2006). Questi Autori dimostrarono che tale recettore era espresso principalmente nel telencefalo, nel diencefalo, ed in particolare nei neuroni dopaminergici e noradrenergici del *locus coeruleus* (LC); nei neuroni aminergici, i quali ricevono dense proiezioni dalle cellule ORXergiche; nei nuclei monoaminergici e colinergici, che svolgono un importante ruolo nella regolazione del risveglio comportamentale; nel *raphe* serotoninergico (SR) e nei neuroni istaminergici del nucleo tuberomammillare (TMN). Recenti studi condotti su embrioni di *Danio rerio*, hanno invece messo in evidenza la mancanza di ORXR nei neuroni adrenergici, dopaminergici, istaminergici e serotoninergici, così come nella maggior parte dei neuroni dopaminergici del diencefalo e del LC (Yokogawa *et al.*, 2007). La distribuzione embrionale di ORXR viene mantenuta anche nella specie adulta di tale teleosteo, in particolare nel telencefalo (HTH), nel tubercolo posteriore (TP), nell'ipofisi e in alcuni nuclei del tronco encefalico. Per verificare tale pattern di espressione sono state utilizzate, accanto alla sonda per ORXR, diverse sonde quali quelle per Adra2a per il recettore α 2-A adrenergico; Gad67 per l'acido glutammico decarbossilasi isoforma 67; ChAT per la colina acetiltransferasi ; Glyt2 per il trasportatore T2 della Gly. Si è potuto perciò osservare che la maggior parte delle cellule esprimenti ORXR sono cellule GABAergiche esprimenti Gad67 ad eccezione di

quelle localizzate a livello dell'ipofisi e della porzione ventrale di TP. Inoltre, una sottopopolazione di cellule GABAergiche esprimenti ORXR, nell'area ipotalamica anteriore, esprime anche Adra2a. A livello diencefalico ORXR è presente anche in cellule del sistema colinergico. Nel midollo spinale, i neuroni esprimenti ORXR sono localizzati vicino ad uno strato di neuroni primari sensoriali (Yokogawa *et al.*, 2007), una regione che molto probabilmente è equivalente alla seconda lamina dei mammiferi, area implicata nei processi secondari delle informazioni sensoriali come il dolore (Grudt *et al.*, 2002).

Nell'ipotalamo anteriore e nel nucleo ventrale talamico, la maggior parte delle cellule esprimenti ORXR sono GABAergiche, mentre nel diencefalo posteriore solo una piccola regione del nucleo talamico centrale posteriore (NTcP) è positiva sia per ORXR sia ad Adra2a e a Gad67. Infine, la colocalizzazione tra il sistema colinergico e ORXR è stata osservata solo in poche aree e principalmente, nella zona della sostanza grigia periferica del tetto ottico e nell'ipotalamo periventricolare (Yokogawa *et al.*, 2007).

1.2.2 Fibre nervose e neuroni ORXergici

Diversi studi sono stati effettuati al fine di evidenziare la struttura e la distribuzione a livello cerebrale dei neuroni e delle fibre ORXergiche. Si è visto che i neuroni ORXergici hanno un diametro che varia tra i 15 e i 40 μm con una forma che può essere sferica, fusiforme o multipolare (Chen *et al.*, 1999; Cutler *et al.*, 1999; Date *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 1999). Si stima che nel ratto siano tra i 1100 e i 3400 (Harrison *et al.*, 1999), circa 20000 nel cane e tra 50000 e 83000 nell'uomo (Broberger *et al.*, 1998; Bayer *et al.*, 2000; Ripley *et al.*, 2001).

Studi più approfonditi hanno dimostrato che nel ratto i neuroni ORXergici sono localizzati prevalentemente in HTH, in particolare in LHA, nell'area perifornicale (PFA) e nell'ipotalamo dorsomediale (DMH). In HTH i neuroni ORXergici sono interposti con le cellule che producono l'ormone concentrante la melatonina (MCH) (Chen *et al.*, 1999); queste cellule se pur possiedono qualche proprietà simile (Abrahamson *et al.*, 2001b) sono nettamente distinte da quelle ORXergiche (Hakansson *et al.*, 1999). Le cellule ORXergiche sono state ritrovate anche in altri distretti cerebrali: nell'eminenza mediana, HTH posteriore e dorsale, DMH, nel nucleo arcuato (ARC) (Peyron *et al.*, 1998a) e anche nel sistema amigdaloido, dove sono stati identificati due gruppi di cellule ORXergiche che esprimono solo ORX-B. In particolare si ritrovano prevalentemente nella divisione laterale del nucleo centrale dell'amigdala (CeL), mentre un gruppo più piccolo ma distinto, si trova nel sottonucleo anterolaterale del *bed nucleus* della *stria terminalis* (BNST), immediatamente adiacente alla capsula interna (Ciriello *et al.*, 2003).

Nel ratto le fibre nervose ORXergiche si proiettano in tutto il SNC, ma le più importanti proiezioni si ritrovano nell'area ipotalamica, in particolare LHA, PFA, nel nucleo ipotalamico ventromediale (VMN), DMH, ARC, nell'area preottica (AP) e nell'eminenza mediana, mentre le regioni ipotalamiche rimanenti ricevono un modesto numero di fibre ORXergiche (Kukkonen *et al.*, 2002). Diverse fibre ORXergiche proiettano ai nuclei talamici ed in particolare al nucleo paraventricolare (PVN) ed al nucleo centromediale (CMN), al tronco encefalico, precisamente al *locus coeruleus* (LC), ai nuclei aminergici del *raphe*, al nucleo vagale, parabranchiale e trigeminale, al nucleo del tratto solitario (NTS), alla formazione reticolare, al *tegmentum* e per tutta la lunghezza del midollo spinale. Rispetto a tali aree sono meno numerose le fibre ORXergiche che proiettano nelle aree corticali, lungo il sistema olfattivo, nell'ippocampo (HIP), nell'amigdala (AMY) e nei gangli della base (Ciriello *et al.*, 2003); al cervelletto invece giungono solo un numero esiguo di fibre ORXergiche (Sakurai *et al.*, 1998; Kummer *et al.*, 2001). Le fibre ORXergiche raggiungono anche all'ipofisi, il che fa comprendere come le ORXs siano coinvolte anche nella regolazione della secrezione degli ormoni ipofisari (Van den Pol *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 2001). Studi condotti su altri mammiferi come il cane, il criceto e l'uomo, hanno evidenziato che le aree ricche di proiezioni ORXergiche sono molto simili a quelle osservate nel ratto (Cutler *et al.*, 1999; Date *et al.*, 2000b).

Studi condotti sempre sul ratto hanno dimostrato che i neuroni ORXergici ricevono diverse proiezioni afferenti dal setto laterale (LS), AP, BNST, e HTH posteriore. Qui è stato notato come le fibre nervose dirette ai neuroni ORXergici, che originano nelle regioni ipotalamiche, raggiungano preferibilmente i neuroni ORXergici di HTH mediale, DMH e PFA, a differenza delle fibre che originano dalle zone telencefaliche, diencefaliche e del tronco che invece innervano i neuroni ORXergici di LHA. Le fibre dirette ai neuroni ORXergici che raggiungono HTH mediale provengono dall'area preottica mediale (MPO), dalla preottica laterale (LPO) e dall'area preottica ventrolaterale (VLPO) e innervano massicciamente i neuroni ORXergici localizzati in HTH mediale e in PFA, mentre innervano poco i neuroni ORXergici di LHA.

Poche afferenze dirette ai neuroni ORXergici di HTH mediale originano dall'area ipotalamica anteriore (AHA) e dalla zona subparaventricolare (SPZ). Da HTH ventromediale sono invece molto dense e abbondanti le proiezioni che arrivano ai neuroni ORXergici di HTH mediale, così come da DMH parte un copioso numero di innervazioni che arrivano ai neuroni ORXergici di HTH mediale, PFA e LHA. All'innervazione dei neuroni ORXergici di HTH mediale, PFA e LHA partecipa anche il nucleo supramammillare (SuM). Molteplici afferenze provengono anche da altre regioni del cervello e innervano principalmente i neuroni ORXergici localizzati in LHA, mentre poche afferenze raggiungono i neuroni ORXergici in PFA, e solo scarse afferenze extra-ipotalamiche innervano i neuroni ORXergici in HTH mediale, ad eccezione della parte intermedia del setto

laterale (LSI) che invece innerva abbondantemente i neuroni ORXergici in HTH mediale. I neuroni ORXergici sia di HTH mediale sia di LHA sono innervati anche dalla parte dorsale del setto laterale (LSD), dalla corteccia infralimbica (IL) e da BNST. Ai neuroni ORXergici di LHA giungono innervazioni provenienti inoltre da CeL, dalla divisione mediale del nucleo centrale dell'amigdala (CeM), dall'amigdala mediale (MeA), in particolare dall'amigdala mediale anterodorsale (MeAD), e dal nucleo *accumbens* (Acb). Anche dal tronco encefalico ed in particolare dalla *pars reticulata* della *substantia nigra* (SNRP), VTA, sostanza grigia periacqueduttale (PAG) e più lievemente dal DR, giungono delle afferenze che si propagano fino ai neuroni ORXergici di LHA e molto meno ai neuroni ORXergici di HTH mediale (Yoshida *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda i vertebrati non mammiferi diversi studi sono stati condotti sui pesci, rettili, anfibi e uccelli. Per studiare la caratterizzazione del sistema ORXergico nei pesci sono stati usati maggiormente due teleostei d'acqua dolce appartenenti tutti e due all'ordine dei ciprini forni: *Carassius auratus* (Huesa *et al.*, 2005) e *Danio rerio* (Kaslin *et al.*, 2004). E' stato osservato che in queste due specie il sistema ORXergico ha una organizzazione simile a quella dei mammiferi (Kaslin *et al.*, 2004). Infatti, l'mRNA per la PPORX si trova maggiormente nei neuroni localizzati di HTH, in particolare LHA e PFA. In *Carassius auratus* sono stati trovati neuroni ORXergici anche in DMH frapposti a cellule che producono MCH (Huesa *et al.*, 2005), in maniera simile a quanto riportato in *Danio rerio*, nel quale è stato inoltre osservato che, un gruppo di neuroni ORXergici, è situato anche a livello di HTH posteriore.

In *Carassius auratus* le fibre nervose ORXergiche si spingono in numerose aree del telencefalo dorsale (D) e ventromediale. Molte invece innervano la zona diencefalica, in particolare l'area ipotalamica, il talamo periventricolare, il nucleo talamico ventrolaterale (NVL), l'area pretettale e il nucleo del tubercolo posteriore periventricolare (TPp). Nel mesencefalo raggiungono i tori semicircolari (TS), l'area tegmentale, il tronco encefalico e il nucleo del fascicolo longitudinale mediale (Nmlf). Innervano inoltre anche i nuclei viscerali primari e secondari (Huesa *et al.*, 2005). Nonostante siano molte le aree raggiunte dal sistema ORXergico in *Carassius auratus* resta ancora comprensibilmente limitata la distribuzione di queste fibre, se paragonata a quella dei mammiferi (Horvath *et al.*, 1999a; Peyron *et al.*, 1998a,b; Nambu *et al.*, 1999).

In *Danio rerio*, le fibre ORXergiche innervano molte aree telencefaliche, OTec, TS, ARC e PVN. Molte sono le proiezioni verso l'ipofisi, suggerendo un coinvolgimento tra il sistema ORXergico e la secrezione ormonale (Kaslin *et al.*, 2004). Si è visto, inoltre, che le fibre ORXergiche innervano i neuroni istaminergici, localizzati a livello di HTH ventrale, i neuroni noradrenergici (Kaslin *et al.*, 2004) del *tegmentum* e del midollo spinale (Kaslin e Panula, 2001), SR, *clusters* cellulari mesopontini, dei neuroni del *nucleus lateralis valvola*, ed in misura minore

LC (Kaslin *et al.*, 2004). Oltre a ciò, i neuroni ORXergici di *Danio rerio* proiettano a numerosi neuroni aminergici (Kaslin e Panula, 2001), ai nuclei catecolaminergici diencefalici, e in particolare ai nuclei talamici anteriori (NTA), intermedio (NTI) e ventromediale (NVM; Kaslin *et al.*, 2004), e anche a NVL (Kaslin *et al.*, 2004). Tali fibre aminergiche e colinergiche innervavano a loro volta i nuclei ORXergici ipotalamici e preottici (Kaslin e Panula, 2001), facendo capire che esiste una stretta relazione tra i vari sistemi neuronali in codesto teleosteo (Kaslin *et al.*, 2004).

Pochissime sono le informazioni che si hanno sul sistema ORXergico nei rettili: l'unica specie fino ad oggi studiata è l'*Anolis carolinensis* della famiglia dei Guanidi, appartenente all'ordine degli Squamati. In questa specie i corpi cellulari ORXergici sono raggruppati in una singola popolazione localizzata lungo il terzo ventricolo all'interno del PVN, mentre le loro fibre ORXergiche proiettano verso HTH, AP, talamo (TH), setto e corpo striato (Farrell *et al.*, 2003), similmente a quanto avviene nei mammiferi e negli anfibi (Nambu *et al.*, 1999; Mintz *et al.*, 2001).

Diversi studi sono stati condotti sugli anfibi in cui sono state inizialmente osservate delle differenze specie-specifiche tra le specie *Xenopus laevis* (Shibahara *et al.*, 1999) e *Rana ridibunda* (Galas *et al.*, 2001). Si è visto che, in *Xenopus laevis*, i neuroni ORXergici sono localizzati soprattutto nel nucleo ipotalamico ventrale (VHN) (Shibahara *et al.*, 1999), mentre, in *Rana ridibunda*, i neuroni ORXergici si concentrano a livello del nucleo sovrachiasmatico (SCN). Nonostante la differente localizzazione dei neuroni ORXergici, la distribuzione delle fibre nervose ORXergiche tra le due specie mostra poche differenze, tra cui la ridotta innervazione che giunge al pallio mediale (Dm) ed al setto di *Rana ridibunda* (Galas *et al.*, 2001). Originariamente si ipotizzò che tali differenze a livello della distribuzione dei neuroni ORXergici fossero dettate da differenze filogenetiche tra le due diverse specie, successivamente gli studi condotti su *Hyla cinerea*, appartenente all'ordine degli Anuri, hanno permesso di chiarire queste differenze nella distribuzione del sistema neuronale ORXergico tra *Xenopus laevis* e *Rana ridibunda*. Nello studio su *Hyla cinerea* è stato fatto uso, infatti, della diaminobenzidina, per la tecnica DAB-labeling, che rappresenta un metodo ottimale per l'identificazione delle fibre ORXergiche nell'encefalo, rispetto all'immunofluorescenza (Singletary *et al.*, 2005),

Il sistema ORXergico è stato studiato anche in alcune specie di uccelli come *il Gallus gallus* (Ohkubo *et al.*, 2002) e *il Coturnix coturnix japonica* (Phillips-Singh *et al.*, 2003), appartenenti entrambi ai Galliformi. Da questi studi è emerso che l'organizzazione dei neuroni ORXergici è ancora una volta simile a quella vista dei vertebrati mammiferi e di altri non-mammiferi (De Lecea e Soutcliffe, 1999; Sakuray, 1999; Shibahara *et al.*, 1999; Galas *et al.*, 2001) nei quali la maggior parte dei neuroni si concentra nell'area ipotalamica e precisamente in PVN e LHA (Ohkubo *et al.*, 2002; Phillips-Singh *et al.*, 2003). Stessa osservazione è stata effettuata per la specie selvatica *dwl*

Carpodacus mexicanus, appartenente ai Passeriformi. Nonostante che il *Carpodacus mexicanus* sia filogeneticamente distinto dal *Gallus gallus* e dal *Coturnix coturnix japonica*, le tre specie mostrano una distribuzione simile dei neuroni ORXergici, suggerendo così un elevato livello di conservazione anche all'interno degli uccelli (Singletary *et al.*, 2006).

1.3 Principali processi mediati dal sistema ORXergico

1.3.1 Risposte fisiologiche a livello cellulare

Le ORXs sono capaci di indurre molte risposte fisiologiche a livello cellulare, queste risposte fisiologiche che sono molto lente, con un avvio che varia dai 10 secondi ai 4 minuti e una fase di recupero che è ancor più lenta (Antunes *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2001; Burlet *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2002). Ciò ha fatto intuire che le ORXs potessero svolgere un processo fosforilazione-mediato capace di indurre l'apertura dei canali ionici e che non agissero, invece, attraverso la diretta interazione tra le proteine G e i ORXR (Korotkova *et al.*, 2002).

Studi effettuati sul ratto hanno dimostrato che le ORXs mediano processi di depolarizzazione (Bayer *et al.*, 2000), la cui ampiezza massima è tra 3- 10 mV ,producendo un potenziale d'azione in HTH (Eggermann *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2001; Yamanaka *et al.*, 2002) e più precisamente in TMN (Bayer *et al.*, 2001) in PVN, in ARC, nei neuroni HTH glucosio-sensibili (Ivanov e Aston-Jones, 2000; Liu *et al.*, 2001; Soffin *et al.*, 2002) e nel midollo spinale (Antunes *et al.*, 2001).

Non è ancora chiaro come le ORXs agiscano, tuttavia si pensa che esse provochino, attraverso l'attivazione di una via presinaptica o mediando una depolarizzazione postsinaptica, un rilascio di neurotrasmettitori e quindi un incremento dell'attività neuronale; questa modalità è, però, ad oggi ancora sconosciuta (Horvath *et al.*, 1999a; Kirchgeßner e Liu., 1999). Contemporaneamente all'inibizione dei canali per il K⁺, le ORXs possono attivare anche i canali K⁺Ca²⁺-dipendenti (Ichinose *et al.*, 1998), come avviene a livello del LC, lasciando in tal modo supporre che esse non inducano un innalzamento della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare in tutti i siti d'azione. È anche possibile che in tali siti intervengano altri segnali generati dall'attivazione dei ORXR in grado di contrastare gli effetti dell'innalzamento della concentrazione di Ca²⁺ ORX-indotti (Kukkonen *et al.*, 2002).

Nel ratto, le ORXs portano ad un aumento della frequenza dei potenziali eccitatori postsinaptici (EPSC) spontanei in HTH e nelle corna dorsali superficiali del midollo spinale (Burlet *et al.*, 2002). Provocano inoltre un incremento della frequenza dei potenziali inibitori postsinaptici (IPSC) nei neuroni ipotalamici e nelle corna dorsali superficiali del midollo spinale (Gao e Van den Pol., 2001).

Sempre nel ratto, utilizzando neuroni ipotalamici embrionali in coltura, si è visto che ORX-B porta ad un innalzamento della frequenza sia di EPSC che di IPSC. In tali neuroni embrionali la frequenza di EPSC è attenuata dal blocco dei recettori GABAergici, mentre la frequenza di IPSC è attenuata dal blocco del recettore ionotropico per il Glu e, a livello delle corna dorsali superficiali, l'incremento della frequenza di IPSC è attenuato dal blocco del recettore per la Gly (Van den Pol *et al.*, 1998; Gao e Van den Pol, 2001).

1.3.2 Bilancio energetico e comportamento alimentare

Nei mammiferi il principale sistema che regola l'assunzione alimentare e l'omeostasi energetica è quello della melanocortina (CMS; Cone, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Accanto a questo sistema se ne associano altri che intervengono attraverso importanti mediatori come il neuropeptide Y (NPY), la leptina (Broberger *et al.*, 1998; Beck e Richy, 1999; Horvath *et al.*, 1999b; Yamamoto *et al.*, 1999), la bombesina (Huesa *et al.*, 2005) e, come visto di recente, anche le ORXs (Burdakov e Alexopoulos, 2005). In particolare, studi sui mammiferi dimostrano che il sistema ORXergico svolge un ruolo importante nella regolazione alimentare, stimolando l'assunzione di cibo (Sakurai *et al.*, 1998). Infatti è stato dimostrato che a livello ipotalamico la sola ORX-A è in grado di stimolare l'assunzione di cibo se iniettata in regioni specifiche come PFA, LHA, DMH e PVN, ma non porta ad alcun incremento dell'assunzione di cibo se iniettata in AP, ARC o VMN (Sweet *et al.*, 1999). Il ruolo mediato dall'ORX-A attraverso il ORX₁R nella regolazione alimentare, è stato dimostrato anche attraverso il trattamento con un antagonista del ORX₁R, SB-334867, che induce un'inibizione del comportamento alimentare e dell'aumento fisiologico di peso (Haynes *et al.*, 2000; Rodgers *et al.*, 2001). Non è tuttavia da escludere che parte degli effetti siano mediati dal ORX₂R, visto che tutti e due i sottotipi recettoriali sono espressi nei nuclei coinvolti nella regolazione alimentare (Marcus *et al.*, 2001; Trivedi *et al.*, 1998).

Le fibre ORXergiche raggiungono anche la zona periferica del nucleo esterno dell' *accumbens* (AcbSh) (Sweet *et al.*, 1999), un'area che sembra essere importante nel modulare il processo di motivazione il quale è associato al comportamento alimentare (Kelley, 2004). A tal proposito, le ORXs sarebbero in grado di modulare l'appetito agendo a livello di AcbSh aumentando l'assunzione di cibo, infatti, la somministrazione di SB-334867 in tale area inibisce tale risposta (Sweet *et al.*, 2004). Le ORXs all'interno di AcbSh svolgono un'azione inibitoria potenziando la corrente GABAergica e portando ad una diminuzione della trasmissione mediata dal N-metil-D-aspartato (NMDA; Martin *et al.*, 2002), come dimostrato dall'aumento del comportamento alimentare in seguito al trattamento con muscimol, un agonista del GABA (Stratford e Kelley, 1997; Basso *et al.*, 1999; Stratford e Kelley, 1999).

Si è visto inoltre che l'ipoglicemia è capace di aumentare l'espressione di mRNA per *c-fos* e per la PPAR α in una sottopopolazione di cellule di HTH laterale (Lopez *et al.*, 2000; Briski e Sylvester, 2001a; Cai *et al.*, 2001; Kurose *et al.*, 2002), mentre il digiuno abolisce la variazione circadiana dei livelli di ORXs nel fluido cerebrospinale (CSF; Fujiki *et al.*, 2001).

In LHA, così come in diverse altre regioni ipotalamiche, sono presenti popolazioni neuronali attivate da bassi livelli di glucosio ("neuroni glucosio-sensibili"), mentre altre popolazioni neuronali sono attivate da elevati livelli di glucosio ("neuroni glucosio-responsivi"; Levin *et al.*, 1999). Nel ratto, circa la metà dei neuroni ORXergici presenti in LHA risponde direttamente alle basse concentrazioni di glucosio extracellulare attraverso un incremento del Ca²⁺ citosolico (Muroya *et al.*, 2001) e sono stati identificati anche neuroni glucosio-responsivi, che rispondono alle ORXs depolarizzandosi (Liu *et al.*, 2001).

Variazioni del bilancio energetico corporeo possono modificare le connessioni sinaptiche tra i neuroni ORXergici, infatti è stato osservato che, nel ratto, la privazione di cibo induce la formazione di un numero maggiore di sinapsi di tipo eccitatorio (Horvath e Gao, 2005). Una tale situazione potrebbe portare ad una sovra-eccitazione di questi neuroni con conseguenti disturbi, tipo l'insonnia o l'obesità (Spiegel *et al.*, 2004; Taheri *et al.*, 2004; Horvath e Gao, 2005). Durante il periodo che precede l'assunzione di cibo i neuroni ORXergici sono più attivi (Mieda *et al.*, 2004) e animali privi di questi neuroni mostrano un'incapacità nel rispondere al digiuno con un incremento del periodo di veglia (Yamanaka *et al.*, 2003; Mieda *et al.*, 2004).

Inoltre, un aumento delle concentrazioni di glucosio plasmatico porterebbero ad un'inibizione del sistema ORXergico e quindi un aumento della sonnolenza. A sostegno di ciò sono ormai presenti numerose evidenze, come il fatto che i pasti ricchi di carboidrati o grassi inducono una sensazione di sonnolenza a differenza di pasti più ricchi di proteine (Sakurai, 2005).

Tuttavia, ancora oggi gli effetti indotti dalle ORXs sul comportamento alimentare sono oggetto di discussione. Alcuni dati indicano, infatti, che le ORXs non agiscono regolando l'appetito, ma l'assunzione di cibo sarebbe solo un effetto acuto della stimolazione del sistema ORXergico, effetto che sarebbe successivamente compensato da una riduzione dell'assunzione di cibo durante l'arco della giornata (Dube *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 1999). Per di più l'assunzione di cibo, indotta dalle ORXs, sarebbe solo un effetto secondario dovuto all'aumento della veglia attiva e dell'attività locomotoria. Le ORXs potrebbero intervenire nella regolazione a breve termine dell'omeostasi energetica, incitando l'assunzione di cibo in risposta al calo delle concentrazioni di glucosio durante la veglia. In seguito all'assunzione di cibo e al conseguente aumento della concentrazione del glucosio e dei segnali di sazietà forniti dalla leptina e dai segnali viscerali, si avrebbe una diminuzione dei livelli di ORXs, la cui azione sul comportamento

alimentare terminerebbe quindi dopo l'ingestione di cibo (Cai *et al.*, 1999; Griffond *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000; Willie *et al.*, 2001). E' da considerare, inoltre, che le ORXs non agiscono solo a livello cerebrale ma anche a livello del tratto gastrointestinale, dove è stata verificata la presenza di neuroni e cellule endocrine capaci di esprimere le ORXs (Kirchgessner e Liu., 1999; Naslund *et al.*, 2002).

Valutando infine la collocazione neuroanatomica, le diverse capacità e le proprietà dei neuroni ORXergici, il sistema ORXergico è l'unico sistema in grado di coordinare la risposta alle informazioni metaboliche prodotte dall'organismo, agendo sia sul bilancio energetico, che sulle funzioni cerebrali superiori (Burdakov e Alexopoulos, 2005). Infatti, l'attività dei neuroni ORXergici stimola in maniera maggiore la spesa energetica attraverso un incremento del metabolismo associato allo stato di veglia attiva (Burdakov e Alexopoulos, 2005), ed è proprio questo sistema, almeno nei mammiferi, che può agire come sensore dello stato nutrizionale (Sakurai *et al.*, 1998; Willie *et al.*, 2001; Yamanaka *et al.*, 2003).

1.3.3 Bilancio energetico e comportamento alimentare nei pesci

Il comportamento alimentare indotto dalle ORXs è stato osservato anche nei vertebrati non mammiferi. La specie maggiormente studiata a tal proposito è il *Carassius auratus*, un Teleosteo d'acqua dolce. In tale teleosteo iniezioni i.c.v. di ORX-A ed ORX-B provocano un aumento dell'assunzione di cibo, un incremento dell'appetito (Volkoff *et al.*, 1999; Nakamachi *et al.*, 2006) e anche dell'attività locomotoria. Il digiuno è in grado di accrescere l'immunoreattività ORX-simile nelle cellule ipotalamiche, mentre iniezioni di glucosio sono in grado di sopprimere tale immunoreattività, facendo diminuire quindi l'ingestione di cibo. Perciò, in *Carassius auratus*, sembra esistere una precisa relazione tra la densità dell'immunoreattività ORX-simile, la sintesi delle ORXs ed il comportamento alimentare, in quanto anche l'espressione dell'mRNA per le ORXs nell'encefalo è in funzione dello stato nutrizionale.

È stato osservato che nei pesci a digiuno è presente un aumento significativo di cellule che esprimono le ORXs in HTH, mentre una notevole diminuzione di questa espressione si ha quando i pesci subiscono iniezioni di glucosio. Il livello di espressione di mRNA per le ORXs nell'encefalo dei pesci a digiuno risulta invece aumentato a confronto dei pesci alimentati. È stato inoltre dimostrato che in *Carassius auratus* la responsività alle ORXs è strettamente dipendente dalle dimensioni degli animali, in quanto i pesci più piccoli risultano meno responsivi alle iniezioni di ORXs (Nakamachi *et al.*, 2006).

Gli studi condotti hanno dimostrato che la somministrazione di ORXs e NPY stimola l'ingestione di cibo, effetto opposto si osserva invece somministrando CART (*cocaine and*

amphetamine-related transcript). Oltre a questo, altri fattori endocrini periferici sono in grado di modulare l'assunzione di cibo, come l'ormone adipocitario leptina e l'amilina (Volkoff, 2006). Sebbene vi siano molti studi sui meccanismi con cui le ORXs potrebbero modulare l'attività delle altre vie orexinogeniche (Volkoff e Peter, 2001), il meccanismo preciso non è ancora completamente chiaro. Per valutare le interazioni tra il sistema ORXergico ad altri sistemi quali NPY e galanina (GAL) sull'alimentazione, sono stati studiati gli effetti su *Carassius auratus* di antagonisti specifici per il recettore NPY (BIBP 3226) e GAL (M40), sia nel caso in cui l'assunzione di cibo era stimolata da ORX-A, sia in seguito agli effetti di desensibilizzazione dei recettori per le ORXs quando l'alimentazione era indotta da NPY e GAL. È stato così possibile verificare che quando l'antagonista BIBP 3226, selettivo per il recettore Y₁ di NPY, veniva somministrato a basse concentrazioni non influenzava il comportamento alimentare, facendo capire che l'inibizione dell'assunzione di cibo ORX-indotta e NPY-indotta non è legata esclusivamente agli effetti farmacologici prodotti su tale recettore. Una coiniezione di ORX-A e NPY a basse dosi provocava invece un aumento nell'assunzione di cibo. Anche l'espressione di mRNA per NPY aumentava nel telencefalo e HTH, rispettivamente 2 e 6 ore dopo l'alimentazione nei pesci trattati con ORX a confronto con i pesci trattati con sola soluzione salina. Il trattamento con ORX non influiva invece, sui livelli dell'mRNA per NPY a livello di OTec. Questo potrebbe indicare che gli effetti delle ORXs sul sistema NPYergico siano di tipo sito-specifici e di lunga durata (Volkoff e Peter, 2001).

Nonostante gli studi dimostrino che il blocco dei recettori per GAL non influenzino l'assunzione di cibo indotta da ORX, la coiniezione di ORX-A con M40 provoca una riduzione significativa dell'assunzione di cibo indotta dalle ORXs. Tutto questo suggerisce che, anche se minima, una piccola interazione tra il sistema ORXergico e GALergico esiste (Hakansson *et al.*, 1999). Inoltre, il trattamento con alte dosi di ORXs porta ad una desensibilizzazione dei ORXR e, nei pesci, questo si traduce in una inibizione dell'alimentazione indotta da NPY e GAL (Volkoff *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000). Al momento dell'alimentazione, i livelli di NPY sono elevatissimi nell'area telencefalica, AP, HTH e OTec, per decrescere poi tra le 2 e le 6 ore post-prandiali (Silverstein *et al.*, 1998; Narnaware *et al.*, 2000); è stato inoltre osservato che NPY ha un'azione orexinogenica significativamente più potente rispetto a ORX-A e GAL (Edwards *et al.*, 1999; Ida *et al.*, 1999).

Questi risultati indicano che NPY ed, in parte, GAL svolgono una coazione con OXR-A per stimolare l'assunzione di cibo. In più, gli effetti di OXR-A sono mediati, almeno in parte dall'azione di NPY. Ciò suggerisce un'interdipendenza funzionale fra questi tre sistemi peptidergici nel controllo del bilancio energetico in *Carassius auratus* (Volkoff e Peter, 2001).

1.3.4 Regolazione del Ciclo sonno-veglia

È stato ipotizzato che il meccanismo che regola l'alternarsi degli stati di sonno e veglia possa essere assimilato ad un circuito di tipo bistabile detto anche "switch a flip-flop". Un tale circuito tende a produrre delle transizioni rapide tra le diverse fasi e grazie a ciò, gli animali possono spendere solo una piccola quantità del loro tempo nella transizione tra questi stati (Saper *et al.*, 2001).

L'azione meglio definita del sistema ORXergico è senza dubbio la modulazione del ciclo sonno-veglia (Sakurai, 2007), (Fig.1.4).

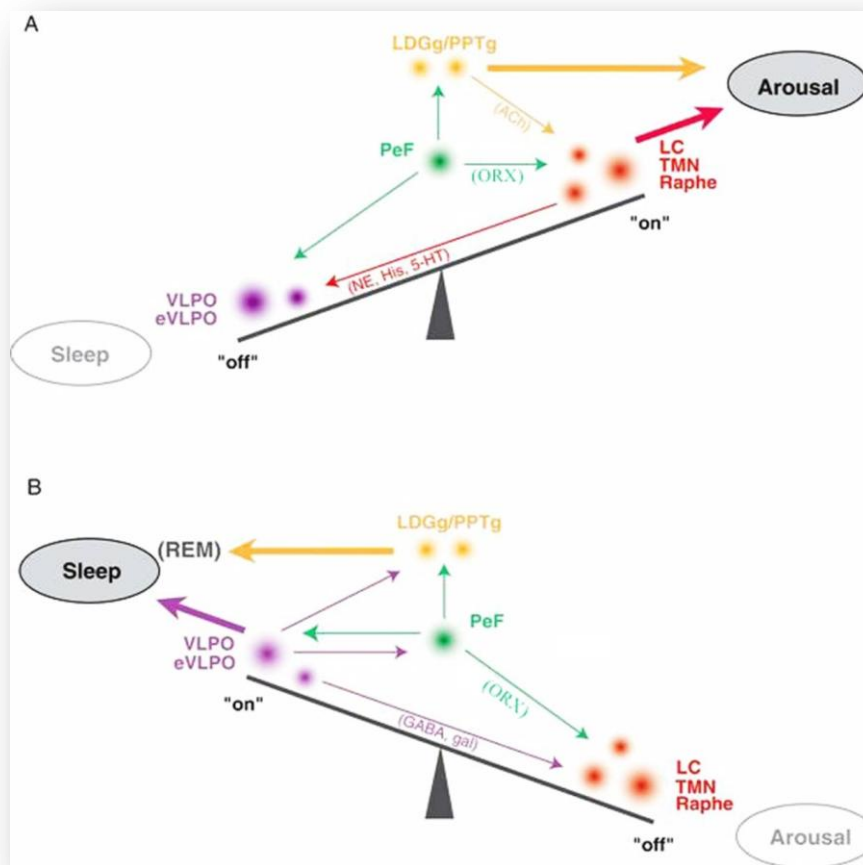


Fig. 1.4 Azione di ORX sul circuito bistabile caratteristico del ciclo sonno-veglia.

Diversi studi legano in maniera ormai inconfutabile questo sistema all'insorgenza di particolari patologie come la narcolessia, sia nell'uomo (Peyron *et al.*, 2000) sia in altri animali (Hara *et al.*, 2001), in quanto è stato dimostrato che l'assenza dei peptidi ORXergici conduce all'insorgenza della sintomatologia tipica di tale patologia (Peyron *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2001). Si è notato che nei ratti la somministrazione di ORXs durante le ore di luce, quindi, nel periodo in cui tali animali

risultano inattivi, induce un aumento nella durata della veglia associata ad una diminuzione del sonno REM (*rapid-eye-movement*) e non REM (Hagan *et al.*, 1999).

L'attività dei neuroni ORXergici varia a secondo dello stato di attività degli animali. In particolare, durante lo stato di veglia si ha un rapido tasso di scarica di tali neuroni: questo tasso diminuisce drasticamente durante il sonno non REM e si arresta completamente durante la fase REM. Un successivo aumento si osserva prima della fine della fase di sonno REM indicando quindi un ritorno ad uno stato di veglia (Sakurai, 2007). Anche le concentrazioni di mRNA per PPORX e ORX-A variano durante il ciclo giornaliero. In HTH di ratto tali concentrazioni aumentano raggiungendo il loro massimo durante l'inizio della fase luminosa e il minimo durante la fine della fase luminosa (Fujiki *et al.*, 2001; Taheri *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001). Regioni come PVN, ARC, LC, il nucleo dorsale del *raphe* (DR) e TMN sono abbondantemente innervate da fibre ORXergiche che svolgono un ruolo importante nello stimolare la fase di veglia (Peyron *et al.*, 1998a; Peyron *et al.*, 2000). La distribuzione dell'mRNA per l'ORXR_s risulta analoga a quella dei siti di proiezione delle fibre ORXergiche (Sakurai, 2007). L'mRNA per ORX₁R e ORX₂R è, di fatto, abbondantemente espresso rispettivamente in LC ed TMN, mentre DR e l'area tegmentale ventrale (VTA), contenente neuroni dopaminergici, coesprimono l'mRNA per entrambi i ORXR_s (Marcus *et al.*, 2001). Ciò suggerisce che i neuroni ORXergici esercitino, sui neuroni monoaminergici, un'influenza di tipo eccitatorio, sostenendone l'attività (Sakurai, 2007). I neuroni ORXergici esercitano un potente e diretto effetto eccitatorio anche sui neuroni colinergici del proencefalo basale (BF: Eggermann *et al.*, 2001), un'area cerebrale importante nel mantenimento dello stato di veglia (Alam *et al.*, 1999).

Si è osservato che le fibre ORXergiche proiettano anche verso i neuroni del nucleo tegmentale laterodorsale (LDT) e verso il nucleo tegmentale peduncolopontino (PPT). Studi effettuati sul gatto dimostrano che l'ORX-A in LDT produce un incremento della durata della veglia attiva (Xi. *et al.*, 2001) ed è inoltre in grado di inibire i neuroni colinergici in PPT, agendo attraverso i neuroni GABAergici situati in SNRP (Takakusaki *et al.*, 2005). Questi dati fanno supporre che il sistema ORXergico sia in grado di modulare l'attività dei neuroni colinergici in LDT ed in PPT, sia direttamente sia indirettamente, influenzando così il risveglio e le fasi di sonno REM (Sakurai, 2007). Recentemente è stato visto che i neuroni ORXergici esprimono il recettore per l'adenosina A₁, facendo così pensare che tali neuroni possano essere inibiti dall'adenosina, considerata la principale molecola sonno-promotrice (Liu e Gao, 2007).

È stato dimostrato che, in natura, i mammiferi quando si trovano in uno stato di bilancio energetico negativo, ad esempio quando si trovano in assenza di cibo, aumentano la fase di veglia attiva, per incrementare il tempo che possono spendere nella ricerca del cibo (Challet *et al.*, 1997).

Tale processo biologico è sostenuto dall'azione dei neuroni ORXergici che durante una fase di digiuno portano ad aumento dello stato di veglia, permettendo all'animale di affrontare una più lunga ricerca di cibo. I neuroni ORXergici forniscono, quindi, un collegamento cruciale tra il bilancio energetico e la modulazione del ciclo sonno-veglia (Sakurai, 2005), (Fig. 1.5).

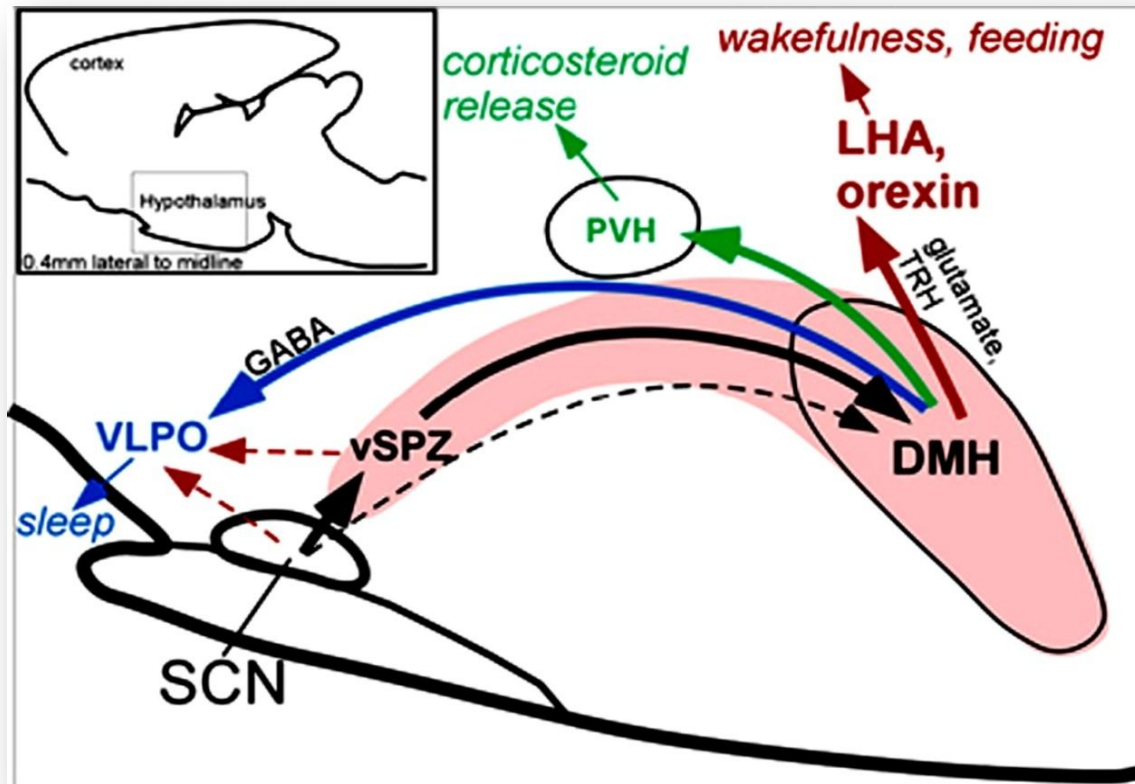


Fig. 1.5 Meccanismi d'integrazione degli stimoli luminosi ed alimentari e risposte fisiologiche evocate dai centri ipotalamici.

Seppure per i vertebrati non mammiferi non si possa parlare di un vero e proprio stato di sonno, così come è conosciuto per i mammiferi, il sonno, o comunque una fase di riposo (*rest*) molto simile ad uno stato di sonno, è un processo biologicamente conservato tra le diverse classi di vertebrati (Hendricks *et al.*, 2000; Greenspan *et al.*, 2001). I vertebrati non-mammiferi presentano periodi di ridotta attività, soprattutto durante la notte, ma non mostrano i complessi *pattern* del sonno tipici dei vertebrati amnioti (Kavanau, 1998; 2002). Non è, perciò, ancora chiaro se i meccanismi neuronali che regolano il ciclo attività-riposo siano equivalenti tra le diverse classi di vertebrati (Panda *et al.*, 2002). Ciò che è chiaro è che gli Uccelli mostrano complessi *patterns* del sonno tipici dei mammiferi, anche se alcuni Uccelli dalle abitudini diurne presentano meccanismi neuronali che regolano il ciclo attività-riposo paragonabili a quelli dei Pesci. Il passero migratore, *Zonotrichia*

leucophrys gambelii, per esempio, è in grado di sopravvivere per lunghi periodi di tempo senza dormire, comportamento questo che è regolato dalle condizioni ecologiche e dal diverso fotoperiodo (Rattenborg *et al.*, 2004). Anche in *Columba livia* il sonno è modulato dalle condizioni di luce ed oscurità (Rattenborg *et al.*, 2005) e la melatonina può favorirlo, sopprimendo la veglia (Mintz *et al.*, 1998). Non si hanno al momento informazioni riguardo ad Anfibi e Rettili.

1.3.5 Regolazione del Ciclo sonno-veglia nei pesci

Il sonno, o comunque uno stato di riposo sonno-simile (*rest*), è un processo biologico fondamentale che risulta filogeneticamente conservato tra le varie classi di vertebrati (Hendricks *et al.*, 2000; Greespan *et al.*, 2001).

Nei pesci, come ad esempio in *Danio rerio*, diversi meccanismi controllano il ciclo *rest*-veglia, ciclo che risente molto dei ritmi circadiani (Whitmore *et al.*, 1998; Cahill, 2002). Tra i diversi meccanismi che regolano tale ciclo sembra essere presente anche uno di tipo omeostatico (Zhdanova *et al.*, 2001). Tuttavia recentemente è stato visto che il ciclo *rest*-veglia dei pesci è controllato in maniera determinante dal fotoperiodo, infatti esposizioni prolungate alla luce sopprimono il sonno, mentre il buio favorisce l'instaurarsi di una fase di *rest* (Yokogawa *et al.*, 2007).

Uno studio condotto sempre su *Danio rerio* dimostra che una over-espressione dei peptidi ORXergici porta all'instaurarsi di un fenotipo insonnia-simile (Prober *et al.*, 2006). Tuttavia si è osservato che iniezioni i.c.v. di ORX-A, ma non di ORX-B, riducono l'attività locomotiva e promuovono il sonno in condizioni di buio (Yokogawa *et al.*, 2007).

Analogamente a quanto visto nei mammiferi (Sakurai, 2007), anche in *Danio rerio* è stata dimostrata un'interazione tra il sistema ORXergico, aminergico e colinergico. Di fatto si è visto che le fibre ORXergiche innervano diverse aree coinvolte nel ciclo *rest*-veglia tra le quali il *raphe*, LC, l'area mesopontino-simile, diversi nuclei aminergici e *cluster* neuronali dopaminergici ed istaminergici. Queste informazioni suggeriscono che anche nei pesci, come nei mammiferi, esiste un meccanismo di *cross-talking*, in cui il sistema ORXergico è coinvolto nel regolare la fase di veglia e di *rest* (Kaslin *et al.*, 2004).

1.3.6 Interazione delle ORXs con il sistema neuroendocrino

Le ORXs sono in grado di modulare la secrezione ormonale HTH-ipofisaria attraverso una interazione diretta con i circuiti nervosi con cui interagiscono (Taylor e Samson, 2003). È stato infatti dimostrato che nelle cellule acidofile dell'ipofisi esiste una coespressione dell'ormone della

crescita (GH) e del ORX₁R, mentre nelle cellule basofile dell'adenoipofisi sono coespressi l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e il ORX₂R (Date *et al.*, 2000b). Le fibre ORXergiche sembrerebbero essere presenti anche a livello della lamina esterna dell'eminenza mediana (Date *et al.*, 2000b), il sito da cui i fattori neuroendocrini diffondono all'interno del sistema portale ipofisario e che mette in comunicazione HTH con il lobo anteriore dell'ipofisi. Tutto questo sembra confermare che le ORXs siano implicate anche nella modulazione del sistema neuroendocrino. Studi condotti sul ratto dimostrano che iniezioni dell'ORX-A, a livello intravenoso e all'interno di PVN, portano ad una diminuzione nel rilascio dell'ormone tireotropo (TSH) (Mitsuma *et al.*, 1999; Russel *et al.*, 2000), mentre iniezioni i.c.v. di ORX-A portano ad una diminuzione dei livelli di secrezione di GH (Hagan *et al.*, 1999).

L'influenza delle ORXs sulla secrezione ormonale dell'asse HTH-ipofisi-surrene è ulteriormente confermata da numerosi studi (Taylor e Samson, 2003); iniezioni i.c.v. dell'ORX-A, nel ratto, incrementano i livelli plasmatici del fattore di rilascio delle corticotropine (CRF), ACTH, corticosterone, vasopressina ed epinefrina. Tuttavia si è notato che, *in vivo*, la capacità delle ORXs di stimolare il rilascio di ACTH e corticosterone (Hagan *et al.*, 1999; Jasberenyi *et al.*, 2000; Kuru *et al.*, 2000; Samson *et al.*, 2002) potrebbe riflettere uno stato di stress generalizzato indotto dalla somministrazione di peptidi esogeni iniettati a livello centrale (Shirasaka *et al.*, 1999), piuttosto che rispecchiare il ruolo endogeno delle ORXs sull'asse HTH-ipofisi-surrene. Nonostante ciò, il coinvolgimento di vie complesse attivate dalle ORXs nella modulazione neuroendocrina è evidenziata dall'effetto inibitorio esercitato su tali vie dagli antagonisti per i recettori dopaminergici e serotoninergici (Duxon *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda i vertebrati non mammiferi, su *Rana catesbeiana*, è stato osservato che l'ORX-A è presente anche nelle cellule luteotrope dell'adenoipofisi e ciò suggerisce che l'ORX-A possa regolare la secrezione ormonale in maniera autocrina o paracrina. Inoltre iniezioni intraperitoneali (i.p.) di prolattina (PRL) causano un aumento del peso corporeo accompagnato da un aumento del contenuto di acqua, un aumento della resistenza elettrica nel tegumento ed una diminuzione della permeabilità della pelle (Yamamoto *et al.*, 2004). Negli anfibi, la PRL svolge un ruolo molto importante nella crescita (Kikuyama *et al.*, 2003a), nella riproduzione (Kikuyama *et al.*, 2003b; Polzonetti-Magni *et al.*, 1995) e nella metamorfosi; quindi la presenza di ORXs in queste cellule fa pensare che, almeno nella *Rana catesbeiana*, esse possano interagire nel controllo di importanti processi biologici insieme al PRL (Yamamoto *et al.*, 2004).

1.3.7 Sistema ORXergico e meccanismi di dipendenza e ricompensa

E' noto come l'assunzione occasionale di droghe d'abuso può determinare lo sviluppo di stati di dipendenza, caratterizzati da un incontrollabile desiderio di assumere queste droghe. Lunghi periodi di astinenza possono aiutare a uscire da questa dipendenza. Tuttavia, l'esposizione alla droga o ad ambienti a essa associati può portare a un'immediata ricaduta nell'uso di droghe (Harris e Aston-Jones, 2006). Tra i circuiti cerebrali che modulano i meccanismi di ricompensa e di dipendenza, il sistema ORXergico sembra avere un ruolo cruciale. Recenti studi hanno, infatti, individuato in LHA una sottopopolazione di neuroni ORXergici coinvolti nei meccanismi di ricompensa associati all'assunzione di droghe d'abuso o di cibo (Harris e Aston-Jones, 2006). Precedenti lavori avevano dimostrato che le proiezioni dei neuroni ORXergici di LHA raggiungono Acb e VTA, regioni anch'esse strettamente associate ai processi di dipendenza (Nakamura et al., 2000). Inoltre, i neuroni ORXergici di LHA che proiettano nel VTA mostrano una maggiore induzione del gene *cfos* negli animali sottoposti a una protratta astinenza dalla morfina, rispetto ai neuroni ORXergici che non proiettano al VTA. Questa evidenza suggerisce che il VTA è un importante sito di azione per le ORXs impegnate nei processi di ricompensa, come risulta anche dal fatto che la stimolazione dei neuroni ORXergici di LHA o le iniezioni di ORX direttamente in VTA riattivano la ricerca di droghe, in animali che l'avevano precedentemente estinta (Harris et al., 2005). E' possibile ipotizzare che gli stimoli associati alle droghe d'abuso attivano i neuroni ORXergici in LHA, determinando un aumento della sintesi e della secrezione delle ORXs. Quest'ultime vanno ad attivare i neuroni dopaminergici del VTA (Harris e Aston-Jones, 2006; Sakurai, 2007) che, a loro volta, inducono riabilitazione nella ricerca di cibo o droghe, anche in animali astinenti (Boutrel et al., 2005; Harris et al., 2005; Sakurai, 2007). L'azione delle ORXs a livello dei neuroni dopaminergici è mediata da ORX1R, attraverso il potenziamento della risposta dei recettori ionotropici per il glutammato (GLU), AMPA (acido alpha-ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolo propionico) e NMDA (N-metil D-aspartato) (Borgland et al., 2006). Il principale meccanismo di azione delle ORXs è caratterizzato da un aumento della responsività del glutammato nei neuroni dopaminergici (Borgland et al., 2006). La somministrazione di SB 334867, antagonista del recettore ORX1R, blocca la ricerca di cocaina indotta da stimoli esterni discreti e contestuali, quali stimoli luminosi o di altra natura, ma non ha lo stesso effetto sulla ricerca indotta dalla somministrazione stessa di cocaina (Smith et al., 2007). L'antagonista SB 334867, infatti, non interferisce con la diretta attivazione dei neuroni dopaminergici, ma riduce gli effetti eccitatori dell'ORX su questi neuroni. La cocaina esercita, invece, un'azione diretta sulle terminazioni dopaminergiche senza richiedere la mediazione della trasmissione ORXergica (Massi et al., 2007).

È stata inoltre evidenziata l'interconnessione tra i neuroni ORXergici in PFA e DMH e i neuroni che producono il fattore rilasciante le corticotropine (CRF) (Winsky-Sommerer et al., 2004; Boutrel et al., 2005). Difatti, iniezioni i.c.v. di ORXs, sia in PVN che nel nucleo centrale dell'amigdala (CeA) attivano i neuroni che producono CRF (Sakamoto et al., 2004). Queste osservazioni hanno portato a credere che i comportamenti tipici dello stress, della ricerca di droghe e della ricaduta alla ricerca di droghe in animali astinenti possono essere associati all'attivazione dei neuroni che sintetizzano CRF (Boutrel et al., 2005). Perciò si può suggerire che il sistema ORXergico giochi un ruolo fondamentale nel regolare i meccanismi alla base della ricompensa, attraverso due vie: direttamente, tramite i neuroni localizzati in PFA e DMH e indirettamente attraverso l'attivazione di particolari circuiti implicati nella ricompensa (Harris e Aston-Jones, 2006).

A tal proposito, alcuni studi hanno evidenziato l'importanza degli inputs che dalla corteccia prefrontale mediale (mPFC) raggiungono il VTA, per la funzione del sistema dopaminergico, incluso il suo ruolo nella ricompensa e nell'abuso di farmaci. Studi condotti sull'uomo hanno rilevato un decremento dell'attività metabolica dell'mPFC durante i periodi di astinenza (Goldstein and Volkow, 2002) e un ampio incremento nell'attività dell'mPFC, in seguito all'esposizione allo stimolo (Childress et al., 1999). Infatti, le afferenze che dall'mPFC raggiungono il VTA rappresentano una potenziale sorgente di glutammato nel VTA che è implicato nel ristabilimento, nell'apprendimento e nell'espressione dei comportamenti di dipendenza (Harris et al., 2005).

Pochi sono i dati sulle proprietà motivazionali della nicotina anche se alcuni importanti risultati sono emersi negli ultimi anni. È stato visto, per esempio, come il danneggiamento della corteccia insulare causa la perdita della dipendenza dal tabacco nei fumatori, grazie ad una spontanea cessazione dell'abitudine al tabacco e ad un persistente decremento dello stimolo al fumo (Naqvi et al., 2007). Tuttavia, sono poche le conoscenze circa i meccanismi neurobiologici attraverso i quali la corteccia insulare può controllare il mantenimento dell'abitudine al tabacco. È stato dimostrato che le proiezioni dei neuroni ORXergici innervano densamente la corteccia insulare, che le cellule all'interno di questa struttura esprimono il recettore ORX1R e che il blocco della trasmissione ORXergica nella corteccia insulare determina una diminuzione dell'assunzione di nicotina nei ratti (Hollander et al., 2008). Inoltre, la somministrazione di nicotina incrementa l'espressione di cfos nei neuroni ORXergici dell'LHA (Pasumarthi et al., 2006), supportando la teoria per la quale la nicotina può potenziare la trasmissione ORXergica. La diretta somministrazione di SB 334867 a livello della corteccia insulare, ma non dell'adiacente corteccia somatosensoriale, diminuisce in maniera dose-dipendente l'auto-somministrazione di nicotina nei ratti (Hollander A et al., 2008). Tutti questi dati dimostrano che la trasmissione ORXergica insulare gioca un ruolo permissivo sulle

proprietà motivazionali della nicotina e che la nicotina può essere un substrato neurobiologico necessario per il mantenimento della dipendenza dal tabacco.

1.3.8 Effetti mediati dalle ORXs sulla memoria e l'apprendimento

La principale sede coinvolta nell'apprendimento e nella memoria è HIP (Malenka e Nicoll, 1999; Kandel, 2001), i cui livelli di acetilcolina (ACh) sono molto elevati durante la fase di veglia attiva (Frey *et al.*, 2001). A livello ippocampale le fibre ORXs (Selbach *et al.*, 2004), così come anche gli ORXR_s (Marcus *et al.*, 2001), presentano una distribuzione regionale e strato dipendente.

Attualmente si ritiene che nel HIP le ORXs agiscano a livello presinaptico, in quanto si è visto che sui neuroni ippocampali in coltura queste non inducono alcun effetto postsinaptico diretto (De Lecea *et al.*, 1998), mentre è stato dimostrato che il sistema ORXergico ha un'azione eccitatoria di tipo presinaptico sulle sinapsi talamo-corticali (Lambe e Aghajanian, 2003); si ritiene perciò che anche a livello ippocampale le ORXs possano agire secondo questa via (Selbach *et al.*, 2004).

Nelle strutture infralimbiche coinvolte nel risveglio emozionale, nell'attenzione, nell'apprendimento e nella memoria, è stata osservata un'abbondante espressione di ORXR_s insieme a quella per le ammine biogene. (Graves *et al.*, 2003; Cirelli *et al.*, 2004).

La banda mediale del setto diagonale di Broca (MSDB) invia fibre colinergiche e GABAergiche a HIP attraverso la via settoippocampale e controlla i ritmi θ di HIP e le funzioni mnemoniche ad essi associate. I ritmi θ sono caratteristici del comportamento esplorativo e del sonno REM, e sono soppressi dalle lesioni di MSDB. I neuroni GABAergici settoippocampali sono innervati da fibre ORXergiche, esprimono il ORX₂R e sono eccitati dalle ORXs. Inoltre, anche altre popolazioni neuronali non-GABAergiche, che sono localizzate in MSDB, esprimono il ORX₂R, e tra queste la principale è costituita dai neuroni colinergici settoippocampali (Wu *et al.*, 2004). Iniezioni di ORXs all'interno del proencefalo basale incrementano la veglia (Thakkar *et al.*, 2001), mentre iniezioni di ORXs all'interno del MSDB potenziano gli indici comportamentali ed elettrici tipici dello stato del risveglio (España *et al.*, 2001). È stato osservato che le ORXs sono in grado di indurre una notevole attivazione sui neuroni colinergici dell'area settoippocampale. Il rilascio di ORXs all'interno di MSDB, insieme all'influenza dei neuroni ORXergici sui neuroni GABAergici settoippocampali, produce quindi una notevole attivazione sulle due maggiori sottopopolazioni neuronali che proiettano a HIP (Wu *et al.*, 2004). Circa il 90% dei neuroni colinergici settoippocampali sono attivati dalle ORXs mediante un meccanismo di azione postsinaptico e tramite l'azione esercitata dal ORX₂R espresso in concentrazioni elevate in MSDB (Cluderay *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002b), a differenza del ORX₁R la cui presenza non è stata ancora verificata in questa regione (Hervieu *et al.*, 2001). Agendo su tali aree le ORXs sono perciò in grado di indurre a livello di HIP una notevole spinta verso il risveglio, sia attivando direttamente i neuroni colinergici settoippocampali, sia

controbilanciando la spinta al sonno per mezzo della disinibizione dei neuroni GABAergici settoippocampali (Wu *et al.*, 2004).

Si è visto che l'attivazione dei recettori muscarinici di ACh, produce potenti onde θ le quali portano ad una eccitazione dei neuroni settoippocampali GABAergici e a uno stato di inibizione dei neuroni settoippocampali colinergici (Wu *et al.*, 2000). La chiusura dei canali per il K^+ mediata dalle ORXs potrebbe essere il meccanismo ionico che viene esercitato sui neuroni settoippocampali, assicurando così un potente segnale di "veglia" ad HIP (Wu *et al.*, 2004). Le ORXs, quindi, producendo un potenziamento della via GABAergica e colinergica settoippocampale potrebbero promuovere la disinibizione di HIP ed i ritmi θ (Gerashchenko *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002b), inducendo una oscillazione comportamentale stato-dipendente associata con l'altissima plasticità sinaptica ed i processi legati alla memoria che si verificano durante il sonno REM o durante il comportamento esplorativo (Buzsaki, 1998; Xu *et al.*, 1998).

La presenza dei recettori ORXergici è stata riscontrata anche in VTA, un'area importante nella regolazione degli stati emozionali, ed in particolare questi recettori sono stati individuati a livello dei neuroni dopaminergici positivi per la tirosina idrossilasi (TI). L'azione di ORX-A e ORX-B su tali neuroni provoca un aumento notevole nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , mediata da una via proteina G-dipendente. Microiniezioni di ORXs all'interno di VTA sono in grado di indurre un aumento dei livelli di dopamina e di TI e ciò suggerisce che le ORXs possano indurre un'attivazione dei neuroni dopaminergici mesolimbici a livello somatodendritico (Fig.1.6). È da ricordare che i neuroni dopaminergici di VTA esprimono anche i recettori per i μ -oppioidi, responsabili degli effetti di ricompensa dagli oppioidi (Narita *et al.*, 2006); è stato osservato che la presenza degli oppioidi endogeni è indispensabile per scatenare la risposta alimentare indotta dalle ORXs (Clegg *et al.*, 2002). L'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico da parte della morfina, che agisce come agonista per i recettori dei μ -oppioidi, potrebbe essere regolata in modo diretto o indiretto da parte del sistema ORXergico. Di fatto, a livello di VTA, i recettori dei μ -oppioidi sono espressi abbondantemente a livello degli interneuroni GABAergici. Si ritiene tuttavia che l'attivazione dei neuroni dopaminergici, indotta dalla morfina, derivi essenzialmente da un'inibizione dell'attività degli interneuroni GABAergici attraverso l'attivazione dei recettori dei μ -oppioidi. È probabile quindi che, almeno in parte, l'attivazione morfina-indotta dei neuroni dopaminergici mesolimbici sia regolata direttamente dall'attivazione dei neuroni ORXergici attraverso la via di segnalazione eccitatoria mediata dai recettori dei μ -oppioidi (Narita *et al.*, 2006).

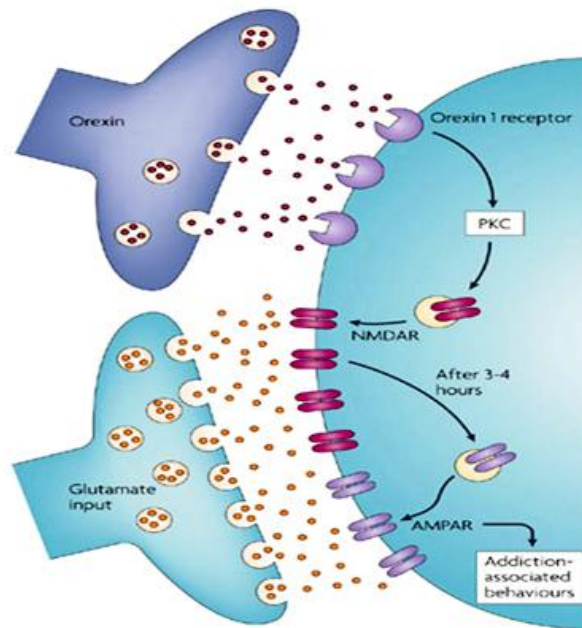


Fig. 1.6 *Rappresentazione schematica di alcune afferenze ORXergiche che innervano dall'ipotalamo laterale i neuroni GLUergici dell'area tegmentale ventrale.*

1.4 Interazioni tra il sistema Orexinergico ed altri sistemi di neurotrasmissione

Molteplici studi dimostrano che diversi fattori, ed importanti sistemi neuronali, interagiscono con il sistema ORXergico (Kaslin *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006; Volkoff, 2006; Sakurai, 2007). In particolare ci sono fattori umorali metabolici che possono influire su tale sistema come il glucosio (Burdakov *et al.*, 2005), la ghrelina e la leptina (Yamanaka *et al.*, 2003). Ad esempio una diminuzione di glucosio extracellulare porta ad una depolarizzazione delle cellule ORXergiche con conseguente aumento della frequenza dei potenziali d'azione; diversamente, un aumento di glucosio causa una iperpolarizzazione (Burdakov *et al.*, 2006). La ghrelina prodotta nello stomaco causa una depolarizzazione dei neuroni ORXergici, mentre la leptina ne causa una iperpolarizzazione (Yamanaka *et al.*, 2003). Per quanto riguarda i neurotrasmettitori è stato osservato che gli agonisti dei recettori per il Glutammato AMPA e NMDA eccitano i neuroni ORXergici a differenza degli antagonisti per gli stessi recettori, come AP5 (Acido D-2-ammino-5-fosfonovalerico), CNQX o NBQX (6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalin-2,3-dione), che invece ne riducono l'attività (Li *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2003). Questo suggerisce che i neuroni GLUergici possono modulare l'azione dei neuroni ORXergici. Altri sistemi, a parte quello GLUergico, possono influire sull'attività del sistema ORXergico (Sakurai, 2007), ad esempio la neurotensina, la vasopressina, l'ossitocina e una forma ottapeptide-solfato della colecistochinina (CCK-8S), tutte capaci di attivare i neuroni ORXergici (Tsujino *et al.*, 2005), a differenza del GABA, della serotonina, della noradrenalina e della dopamina che invece inibiscono i neuroni ORXergici (Sakurai, 2007). Recentemente è stato visto che esistono delle connessioni importanti tra il sistema ORXergico e quello GABAergico, a tal proposito è stato visto che i due sistemi almeno nei ratti interagiscono nella regolazione del ciclo sonno-veglia (Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006), nel *feeding* (Kokare *et al.*, 2006), e in processi di ricompensa (Balcita-Pedicino e Sesack, 2007).

SECONDO CAPITOLO

INTERAZIONI TRA IL SISTEMA OREXINERGICO ED IL SISTEMA GABAERGICO

IL SISTEMA GABAERGICO

L'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il principale aminoacido inibitorio del SNC dal momento che all'incirca il 20-50% delle sinapsi del SNC sono GABAergiche (Korpi *et al.*, 2002). Il GABA svolge un ruolo cruciale nel controllo di molteplici funzioni cerebrali e nella fisiopatologia di numerose malattie mentali e neurologiche (Baron *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2004).

2.1.1 Sintesi, metabolismo e secrezione del GABA

La sintesi del GABA avviene a livello del SNC per decarbossilazione dell'acido glutammico da parte dell'enzima acido glutammico decarbossilasi (GAD), un enzima localizzato esclusivamente nei terminali presinaptici dei neuroni GABAergici e che, come altre decarbossilasi degli aminoacidi, richiede la presenza di piridossal-fosfato come cofattore (Fig.2.1).

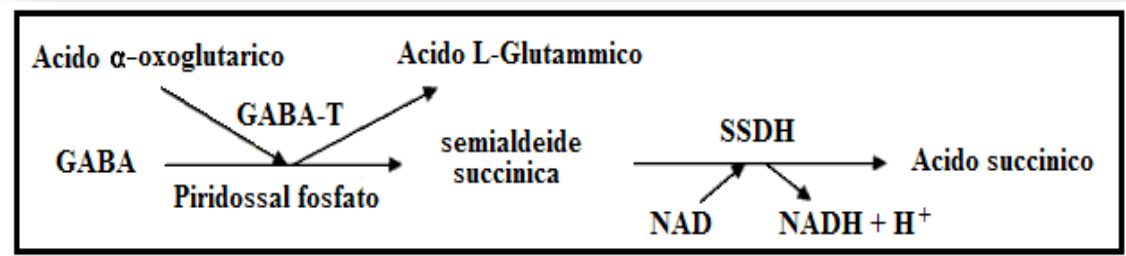


Fig. 2.1 *Metabolismo dell'acido γ -aminobutirrico GABA; GABA- α -chetoglutarico transaminasi GABA-T; semialdeide-succinico-deidrogenasi SSDH.*

La principale via metabolica del GABA prevede una transaminazione da parte dell'enzima GABA- α -chetoglutarico transaminasi (GABA-T), con formazione della semialdeide succinica e rigenerazione del glutammato che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA. La semialdeide succinica viene successivamente ossidata ad acido succinico ad opera di una semialdeide-succinico-deidrogenasi (SSDH) NAD-dipendente. A differenza del GAD, la GABA-T è ampiamente diffusa nei tessuti dell'organismo. Il GABA, sintetizzato nel citoplasma, viene successivamente immagazzinato nelle vescicole sinaptiche presenti nella porzione terminale degli assoni.

È stato dimostrato che il GABA viene rilasciato sia spontaneamente sia in seguito a stimolazione nervosa, ma il rilascio di GABA in seguito a depolarizzazione, a differenza di quello spontaneo, è un fenomeno Ca^{2+} -dipendente. Esistono molteplici proteine trasportatrici (GAT-1, GAT-2, GAT-3 e BGT-1) che a livello delle terminazioni GABAergiche rimuovono rapidamente il GABA dallo spazio sinaptico attraverso un cotrasporto tra GABA, Cl^- e Na^+ . Tali trasportatori sono presenti sia a livello delle terminazione nervose, sia sulle cellule gliali e si ritiene che il mantenimento delle basse concentrazioni del GABA negli spazi extracellulari sia dovuto soprattutto all'attività dei trasportatori sulle cellule gliali (Paoletti *et al.*, 2004); la durata d'azione del GABA sembra infine essere determinata più dalla velocità di questo processo di “*re-uptake*” che dalla velocità del metabolismo stesso (Fig.2.2).

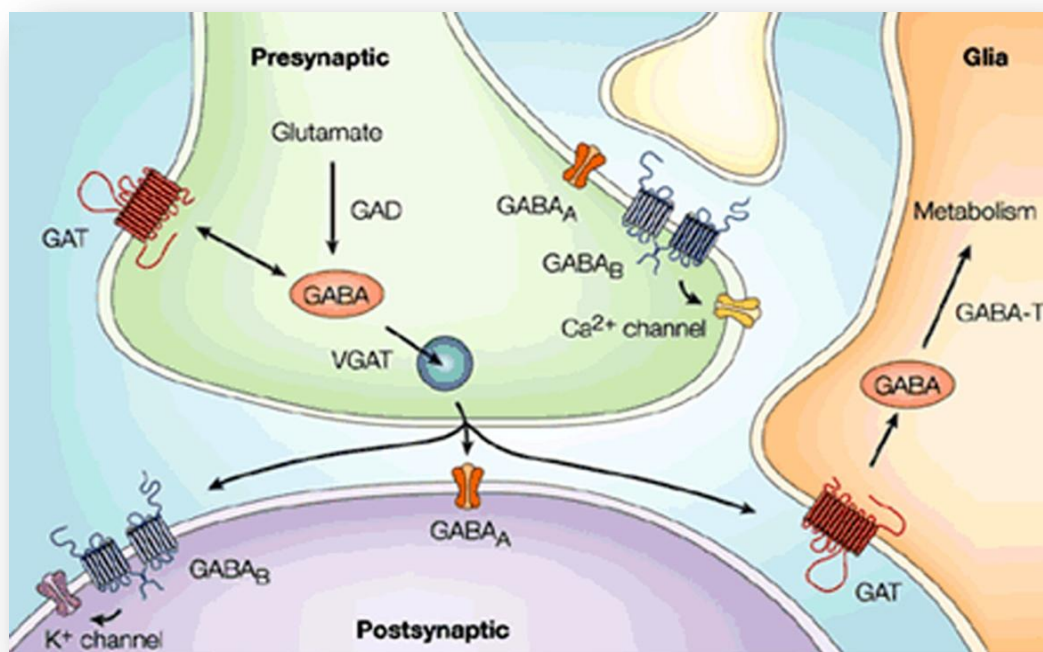


Fig.2.2 Schema di una sinapsi GABAergica.

2.1.2 Distribuzione dei neuroni GABAergici a livello del SNC

All'interno del SNC la distribuzione di GABA e di GAD non è uniforme. Un'alta concentrazione si ritrova nel *globus pallidus*, in HTH, nell'ipofisi, nei corpi quadrigemini, nella *substantia nigra* (SN), nella corteccia cerebrale e in HIP a differenza di zone come il ponte e il bulbo dove le concentrazioni sono più basse. Specifici interneuroni GABAergici sono presenti in HIP, nei quali

formano sinapsi con le cellule piramidali ippocampali. I neuroni GABAergici presenti nello striato danno origine alla via GABAergica striato-nigrale, che ha la sua origine nel nucleo caudato e nel *globus pallidus* e proiettano al SN. Dal SN hanno origine le vie nigro-collicolare e nigro-talamica, che dalla *pars reticulata* proiettano agli strati profondi del collicolo superiore e ai nuclei ventromediale, medio-dorsale ed intralaminare del talamo, e la via nigro-tegmentale che proietta al tegmento ponto-mesencefalico.

Nel cervelletto, il GABA è presente principalmente a livello dello strato delle cellule del Purkinje e a livello dei nuclei profondi dove proiettano gli assoni GABAergici delle cellule del Purkinje. Elevate concentrazioni di GABA si riscontrano anche nelle cellule a canestro e stellate, con cui le cellule del Purkinje contraggono collegamenti sinaptici, e nelle cellule del Golgi di tipo II che sono in contatto sinaptico con i dendriti delle cellule dei granuli (Paoletti *et al.*, 2004).

2.1.3 Recettori per il GABA

Gli effetti del GABA sul SNC sono mediati dall'attivazione di due classi di recettori: i recettori ionotropi, GABA_ARs e GABA_CRs, ed i recettori metabotropici, GABA_BRs. I GABA_ARs appartengono alla superfamiglia dei recettori-canali ionici attivati da un ligante, attivi a livello postsinaptico, sono costituiti dall'assemblaggio eteropentamerico delle principali subunità di tipo α , β e γ ; tali recettori mediano l'ingresso di ioni Cl⁻ e risultano sensibili al muscimol, allucinogeno con azione di agonista isolato dalla specie *Amanita muscaria*, e alla bicucullina, antagonista selettivo ed ad alta affinità per il sito di legame per il GABA. I GABA_ARs contengono inoltre siti specifici di legame per le benzodiazepine (BZD) ed i barbiturici, che ne modulano la funzione. I GABA_BRs sono recettori di tipo metabotropico collegati a canali per il Ca⁺⁺ e per il K⁺; sono accoppiati alle proteine G ed attivi sia a livello pre-sinaptico sia post-sinaptico. Tali recettori sono attivati selettivamente dal baclofen, ma sono insensibili al muscimol ed alla bicucullina. I GABA_CRs sono recettori canale ionotropi attivi a livello post-sinaptico che mediano l'ingresso di ioni Cl⁻ all'interno della cellula iperpolarizzandola. Si differenziano dai GABA_ARs poiché sono formati da subunità oomooligomeriche (Martin e Dunn, 2002).

I GABA_ARs costituiscono la grande maggioranza di tutti i recettori per il GABA, rappresentano il principale sito d'azione delle BZD e sono responsabili della maggior parte della trasmissione sinaptica inibitoria che si realizza all'interno del SNC (Krasowsky, 1998).

2.1.4 Il complesso recettoriale GABA_ARs

Strutturalmente, i GABA_ARs sono eterooligomeri pentamerici, caratterizzati da cinque subunità che concorrono a formare il canale ionico per il Cl⁻ (Martin e Dunn, 2002). La struttura di questi recettori è molto simile a quella del recettore per Gly e a quella del recettore nicotinico per ACh. Fino ad oggi, sono stati identificati 19 distinti tipi di subunità raggruppate in diverse classi: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , ρ_{1-3} e π (Simon *et al.*, 2004).

L'espressione di queste subunità varia molto nelle diverse aree del cervello, suggerendo quindi che, a livello encefalico, possano essere presenti numerosi sottotipi recettoriali GABA_AR. In assoluto, le subunità che presentano una più elevata espressione nel SNC dei mammiferi sono α , β , γ assemblate con composizione $(\alpha_1)_2(\beta_2)_2(\gamma_2)$ (Whiting, 2003). Sebbene le combinazioni di subunità possibili siano migliaia, non si arriva a superare i 100 sottotipi recettoriali GABA_AR funzionanti (Martin e Dunn, 2002). Ogni subunità risulta molto conservata ed è formata da circa 450 aa, con un grande loop N-terminale extracellulare necessario per il legame con il GABA e altri ligandi, quattro domini transmembrana, ed un grande loop intracellulare tra il III e IV dominio transmembrana che contiene il sito per la fosforilazione proteica ad opera delle protein chinasi (Moss e Smart, 2001). A livello del complesso GABA_AR sono presenti diversi siti di legame specifici per differenti molecole. La subunità α è importante per l'interazione con BZD; la subunità β invece media l'interazione con il GABA e il muscimol che si traduce nell'apertura del canale ionico con conseguente iperpolarizzazione della membrana (Jensen *et al.*, 2002), mentre la bicucullina blocca con meccanismo competitivo l'interazione GABA-recettore; la subunità di tipo γ è necessaria per il legame delle BZD che rafforzano l'efficacia del GABA ed è importante nel mediare il raggruppamento sinaptico dei GABA_ARs (Lorez *et al.*, 2000).

L'assemblaggio del GABA_ARs si verifica all'interno del reticolo endoplasmico (ER), dove la presenza di specifici motivi funzionali, presenti a livello del dominio N-terminale, è necessaria per il giusto orientamento delle subunità (Bollan *et al.*, 2003). Anomalie quali l'epilessia, l'ansietà e la depressione sono legate a mutazioni a carico proprio di questi motivi funzionali responsabili dell'assemblaggio delle subunità e del loro trasporto (Kittler and Moss, 2003; Mizielinska *et al.*, 2006). Una volta assemblati, i GABA_ARs sono trasportati verso l'apparato del Golgi e da qui raggiungono la membrana postsinaptica (Essrich *et al.*, 1998). Anche tali processi sono regolati da specifiche proteine che interagiscono con i GABA_ARs modulando il loro assemblaggio, trasporto e inserimento nella membrana (Bedford *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2002).

Diversi ligandi riescono ad interagire con i GABA_ARs, tra questi, particolare importanza rivestono le BZD, i neurosteroidi, gli anestetici, i barbiturici, le betacarboline e l'etanolo (Fig.2.3).

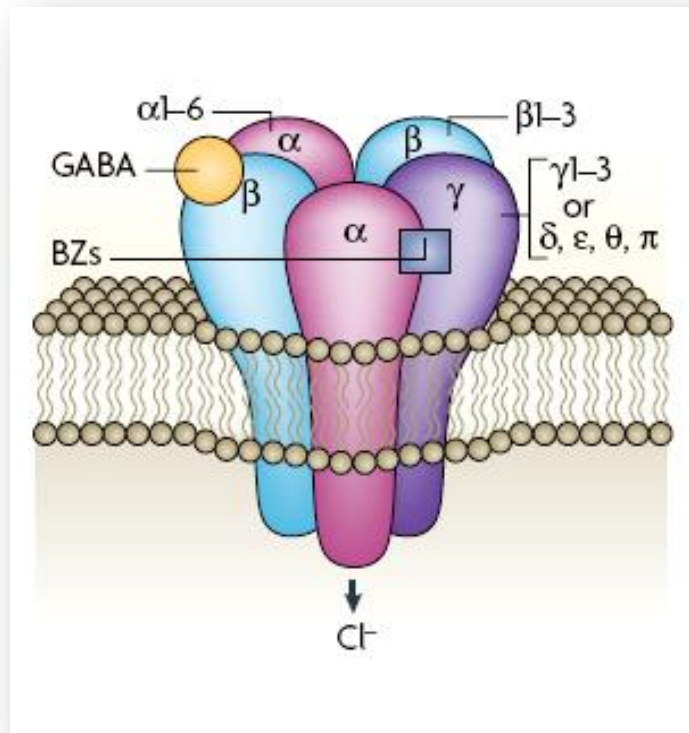


Fig.2.3 Rappresentazione schematica di $GABA_A R$

Questi ligandi si suddividono in: agonisti, i quali inducono un aumento della conduttanza al Cl^- , come le BZD, i barbiturici, gli steroidi ed il muscimol; agonisti inversi, che portano ad una diminuzione della conduttanza al Cl^- , come Ro 15-4513; antagonisti (come ad esempio, la picrotoxina, la bicucullina ed il *t*-butilbicciclofosforotionato, TBPS), che impediscono il legame degli agonisti e degli agonisti inversi oltre ad impedire il legame dello stesso GABA (Ben-Ari *et al.*, 2007).

2.1.5 Farmacologia della trasmissione GABAergica

Essendo il GABA un messaggero ubiquitario, l'attivazione o l'antagonismo a livello dei suoi recettori è il meccanismo d'azione di un gran numero di farmaci sedativi, miorilassanti, ipnotici, antiepilettici e per la terapia di alcune patologie convulsive. In seguito, la scoperta di molecole appartenenti ad altre categorie farmacologiche come gli anestetici, gli steroidi e l'etanolo, che potenziano l'azione del GABA, ha permesso di definire con maggior chiarezza il ruolo farmacologico che i $GABA_A R$ s svolgono nel SNC dei mammiferi (Szabadi, 2006).

Le Benzodiazepine

Le BZD sono una classe di farmaci con proprietà sedative, ipnotiche, ansiolitiche, anticonvulsive, anestetiche e miorilassanti. Esse sono spesso usate per il trattamento a breve termine degli stati di ansia o insonnia grave o inabilitante. Trovano altresì impiego nel trattamento delle crisi convulsive e come coadiuvanti nell'induzione dell'anestesia. A lungo termine può essere problematico l'uso di tali sostanze per lo sviluppo della tolleranza e per il rischio che s'instauri uno stato di dipendenza, fisica e psichica.

Le BZD hanno dei siti di legame su GABA_AR distinti da quello per il GABA. L'attivazione del sito di legame per le BZD potenzia la funzione di GABA_AR facilitando l'interazione del GABA col proprio recettore, ciò si traduce in un aumento della frequenza dell'apertura del canale ionico (Ben-Ari *et al.*, 2007). Quindi le BZD, pur interagendo con siti di legame diversi da quelli del GABA, riescono a modularne positivamente la trasmissione GABAergica (modulazione allosterica). Il sito di legame per le BZD, ed altre molecole BZD-sintetiche (zolpidem, zopiclone) è situato nell'interfaccia tra le subunità α_1 e γ , a differenza del GABA e di farmaci GABA-mimetici (muscimol) e GABA-antagonisti (bicucullina), il cui legame avviene nell'interfaccia tra la subunità β e la subunità α (Besnard *et al.*, 1996).

Al momento sono stati riconosciuti sui GABA_ARs due principali siti di legame per le BZD: il primo, denominato recettore di tipo centrale (BZC), localizzato prevalentemente nei neuroni della corteccia cerebrale, del sistema limbico, del talamo, del nucleo caudato e del *putamen*. Il secondo, chiamato generalmente recettore di tipo periferico o mitocondriale (BZM), si trova associato alla membrana mitocondriale esterna delle cellule gliali e di tessuti periferici quali il fegato, i reni, i testicoli, i polmoni, le ovaie ed il surrene (Szabadi, 2006).

Altri ligandi come β -carboline e RY080, con azione di agonisti inversi sui GABA_ARs possono essere riconosciuti dal sito di legame delle BZD; questi ligandi sono capaci di ridurre l'interazione del GABA con il proprio sito di riconoscimento ed indurre effetti (ansia, convulsioni) opposti a quelli delle BZD (Skolnick *et al.*, 1997). Per tale motivo, il legame degli agonisti inversi induce una conformazione "negativa" tale da sfavorire l'interazione con il GABA e, quindi, ridurre la capacità di apertura del canale ionico (Biggio *et al.*, 2007).

Barbiturici

I barbiturici sono GABA-agonisti e interagiscono specificatamente con GABA_AR, aumentando la conduttanza agli ioni Cl⁻. L'aumento del passaggio di questi anioni provoca depressione dell'attività neuronale e, tra le altre cose, anche sonnolenza. La loro somministrazione provoca

un'attivazione funzionale delle sinapsi GABA-ergiche centrali con depressione generalizzata, dose-dipendente, del SNC e successivo blocco dei centri respiratori e morte ad elevati dosaggi. Le BZD, al contrario, hanno effetti autolimitanti sul SNC: infatti, se la sinapsi è inibita al punto di non liberare GABA, l'effetto delle BZD scompare, ed in genere esse non sono in grado di condurre a morte per depressione respiratoria (Szabadi, 2006).

Steroidi, anestetici generali ed etanolo

Gli steroidi sembrano possedere dei siti di legame specifici a livello di GABA_ARs ed inducono effetti simili alle BZD (anestetico, sedativo, anticonvulsivo e ansiolitico), facilitando la trasmissione GABAergica e aumentando la frequenza e la durata di apertura del canale per il Cl⁻. La concentrazione gioca un ruolo molto importante nel meccanismo d'azione molecolare degli steroidi: infatti, mentre basse concentrazioni potenziano l'attività del canale, inducendo una facilitazione allosterica sui GABA_ARs, alte concentrazioni sono capaci di attivare direttamente il canale in maniera analoga ai barbiturici.

Gli anestetici generali potenziano l'attività di GABA_AR con un'efficacia molto superiore a quella delle BZD e, a concentrazioni superiori, possono attivare direttamente il canale del Cl⁻ svolgendo un'azione GABA-mimetica. Il recettore GABA_AR è un importante sito d'azione anche per l'etanolo il quale possiede delle caratteristiche in parte sovrapponibili a quelle delle BDZ e dei barbiturici (Follesa *et al.*, 2006). La modulazione positiva o negativa della funzione dell'attività del recettore-canale GABA_AR può presentarsi attraverso molteplici vie e può derivare dal fatto che, l'attivazione o l'inibizione di un sito di legame per GABA, BDZ, barbiturici e steroidi, da parte di agonisti o antagonisti, determini una variazione nella capacità di altri siti ad interagire con i propri specifici ligandi (Szabadi, 2006).

2.1.6 Principali funzioni regolate dal sistema GABAergico

Come suddetto, il sistema GABAergico è uno dei più importanti sistemi di neurotrasmissione all'interno del SNC dei vertebrati (Korpi *et al.*, 2002): esso regola importanti meccanismi neuroendocrini come lo sviluppo, il differenziamento, la riproduzione (Mananos *et al.*, 1999; De Fazio *et al.*, 2002) e la risposta allo stress (Miklos e Kovacs, 2002). È stato dimostrato, infatti, che tale sistema è implicato nella regolazione dell'asse HTH-ipofisi, dove è coinvolto principalmente nella modulazione del rilascio delle gonadotropine grazie alle connessioni neuronali tra le fibre nervose GABAergiche, che originano in AP, e le cellule gonadotrope dell'adenoipofisi secernenti l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) (Trudeau *et al.*, 2000). In aggiunta, tale sistema

gioca un ruolo fondamentale nel bilancio alimentare e nel ciclo sonno-veglia, svolgendo un'azione modulatrice sull'attività di importanti nuclei encefalici come il LC, il nucleo del *raphe* e TMN (Backberg *et al.*, 2002; Cluderay *et al.*, 2002). Nel ratto il sistema GABAergico influenza la risposta neuroendocrina allo stress, grazie all'innervazione GABAergica su HTH ed in particolare sui neuroni responsabili della sintesi di CRF (Martyniuk *et al.*, 2005).

2.1.7 Il muscimol: struttura e azione biologica

Il muscimol, un alcaloide isossazolico presente nell'*Amanita muscaria* e nell'*Amanita pantherina*, insieme all'acido ibotenico, è il principale responsabile degli effetti psicoattivi prodotti da tali funghi. Il suo nome IUPAC è 5-(Amminometile)-3(2H)-isossazolone (Fig.2.4).

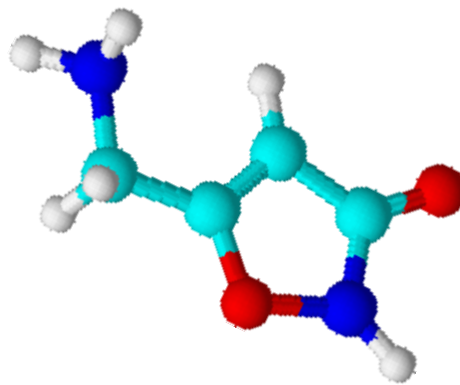


Fig.2.4 Formula di struttura del 5-(Amminometile)-3(2H)-isossazolone (Muscimol).

Il muscimol è un agonista selettivo dei GABA_ARs capace di indurre stati di irascibilità o ilarità e allucinazioni seguite da stato di torpore, spossatezza, atassia, bradicinesia e in modo dose-dipendente, una riduzione o aumento dell'attività locomotoria. Nel ratto il muscimol, così come anche le BZD, somministrate a livello del nucleo basolaterale di AMY, inducono uno sviluppo d'ansia (Bueno *et al.*, 2005). Il muscimol attiva direttamente i GABA_ARs legandosi all'interfaccia tra le subunità β e α di tali recettori (Besnard *et al.*, 1996). Ciò provoca un aumento della conduttanza al Cl⁻ e, quindi, in una iperpolarizzazione della membrana cellulare (Ben-Ari *et al.*, 2007).

Gli effetti comportamentali del muscimol, come anche del GABA, sono di tipo dose-dipendente e differiscono a secondo del sito di iniezione. Ad esempio, nel ratto, come anche nel gatto, iniezioni di muscimol ad alta concentrazione all'interno di HTH posteriore causano una notevole riduzione dell'attività locomotoria. Per quanto riguarda i teleostei, è stato visto che iniezioni i.c.v. di

muscimol a bassa concentrazione sono in grado di indurre in modo acuto e dose-dipendente l'incremento dell'attività locomotoria (Clements e Schreck, 2001). Il muscimol influenza anche l'attività dei centri del sistema limbico, una regione cerebrale considerata come la sede delle emozioni e delle sensazioni, come la fame e la sete, ma soprattutto la sede della memoria e dell'apprendimento. È infatti responsabile di ciò che un individuo "sente o prova". In tale regione, costituita dalla corteccia prefrontale, dal prosencefalo basale, da HIP e AMY, il muscimol agisce, in particolare, su HIP, area implicata maggiormente nei processi di memorizzazione e nel mantenimento della coscienza, inattivando tale area attraverso l'interazione con i GABA_ARs espressi dai neuroni appartenenti a questa regione (Ma e Leung, 2005).

Attualmente, il muscimol è utilizzato anche a scopo terapeutico: tale composto viene utilizzato nel trattamento dell'epilessia ed è in sperimentazione anche per la cura del morbo di Parkinson, dal momento che l'infusione di muscimol nel nucleo subtalamico e nel pallido interno produce un miglioramento della bradicinesia (Baron *et al.*, 2002) e le infusioni fatte su pazienti parkinsoniani durante la stimolazione cerebrale hanno portato a notevoli progressi clinici (Levy *et al.*, 2001).

2.1.8 La bicucullina: struttura e azione biologica

La bicucullina è un alcaloide isolato, inizialmente, da alcune piante che contengono alcaloidi tossici e, successivamente, dalle specie *Dicentra cucullaria* e *Adlumia fungosa*, nonché da molte altre appartenenti alla famiglia delle Fumariacee ed al genere *Corydalis* (Fig.2.5). È stata identificata per la prima volta nel 1932 ed ha la caratteristica di essere una molecola fotosensibile che risulta insolubile in acqua (Paletti *et al.*, 2004). E' un antagonista competitivo dei GABA_ARs che va a bloccare l'azione inibitoria dei GABA_ARs promossa dal GABA e dal muscimol. La bicucullina si lega direttamente nell'interfaccia tra la subunità β e la subunità α di tali recettori (Besnard *et al.*, 1996) e induce una diminuzione della conduttanza al Cl⁻ e, quindi, una depolarizzazione della membrana cellulare (Paoletti *et al.*, 2004). Inoltre legandosi esclusivamente e ad alta affinità a tali recettori, impedisce il legame del GABA, degli agonisti e degli agonisti inversi bloccando in tal modo gli effetti di tali composti (Clements e Schreck, 2001). Essendo un potente antagonista dei GABA_ARs, molti effetti indotti dalla bicucullina sono opposti a quelli indotti dagli agonisti di tali recettori o dallo stesso GABA. Ciò nonostante, gli effetti prodotti dalla bicucullina si possono generalmente osservare solo se questa viene somministrata ad alte concentrazioni: è stato analizzato, appunto, che tale composto porta all'insorgenza di crisi epilettiche solo quando utilizzata a concentrazioni elevate (*convulsant doses*) mentre a basse concentrazioni (*subconvulsant doses*) non porta alla manifestazione di tali crisi (Schneider e Rodríguez de Lores Arnaiz, 2006).

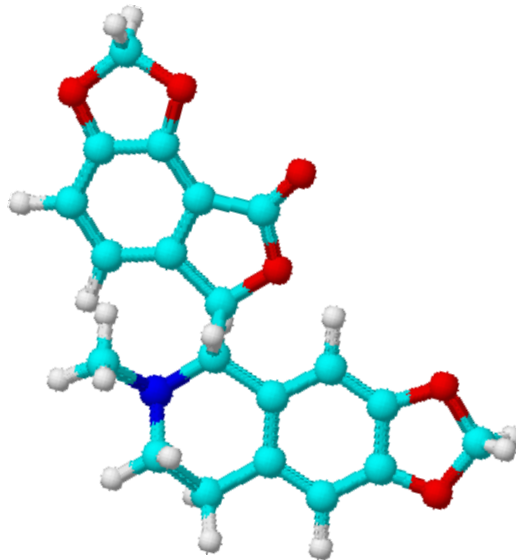


Fig.2.5 Formula di struttura della bicucullina.

La bicucullina gioca un ruolo importante anche nella regolazione del ritmo respiratorio, come dimostrato da studi condotti sulla lampreda in cui, alte dosi di tale sostanza inducevano un incremento della frequenza e dell'ampiezza del ritmo respiratorio (Bongianni *et al.*, 2006).

Nei pesci elettrofori, in particolare in *Gymnotus carapo* ed in *Gymnarchus niloticus*, che possiedono un organo elettrico in grado di generare autonomamente dei campi elettrici, è stato osservato che microiniezioni di bicucullina ad alte concentrazioni provocano una riduzione di scarica elettrica nell'organo, anche se non è stato ancora chiarito come tale sostanza possa indurre un tale effetto (Duarte *et al.*, 2006; Zhang e Kawasaki, 2007).

2.1.9 Zolpidem: struttura e azione biologica

Lo zolpidem appartiene alla famiglia delle imidazopiridine, una classe di farmaci ad elevata specificità, con caratteristiche ipnoinducenti (Fig.2.6). Tali farmaci facilitano l'isorgenza di uno stato di sonno molto simile a quello fisiologico, senza avere effetti miorilassanti e anticonvulsivanti e con una debole attività ansiolitica. Essi non creano dipendenza e non danno tolleranza; tuttavia dosi eccessive possono indurre uno o più effetti negativi, come allucinazioni e/o amnesia. L'effetto dello zolpidem è abbastanza immediato (generalmente entro i primi 15 minuti dall'assunzione) ed ha una durata media abbastanza breve che varia dalle 2-3 ore. Lo zolpidem, pur non appartenendo alla famiglia delle BZD, si lega con un'alta affinità sul loro sito di legame localizzato precisamente nella subunità $\alpha 1$, provocando così un aumento della frequenza d'apertura dei canali al Cl^- e modulando positivamente l'affinità del GABA con il $GABA_A R$ (Rogers *et al.*, 1994; Study e Barker, 1981).

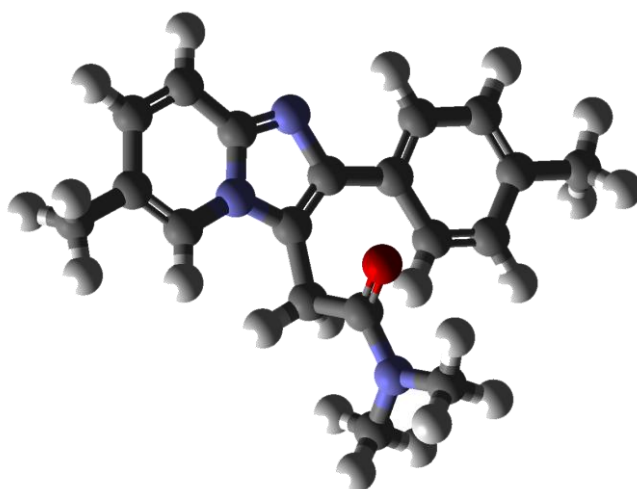


Fig.2.6 Formula di struttura dello zolpidem.

Come la maggior parte delle BZD lo zolpidem non ha affinità per la subunità α_4 e α_6 di tale recettore (Wafford *et al.*, 1996).

È stato osservato che esiste un forte legame dello zolpidem a livello di SNRP. Infatti, la somministrazione di zolpidem induce un notevole potenziamento della corrente del GABA, inibendo in tal modo l'attività dei neuroni di SNRP (Zhang *et al.*, 2008). Uno studio condotto sui ratti, inoltre, ha evidenziato che l'attivazione dei siti BZD, attraverso somministrazione di zolpidem, induce un aumento della trasmissione del GABA nel *globus pallidus* (Chen *et al.*, 2004). In questo contesto, alcuni referti medici hanno indicato che lo zolpidem esercita un effetto terapeutico su alcuni gruppi di pazienti affetti da Parkinson (Daniele *et al.*, 1997; Farver *et al.*, 2001).

2.1.10 Diazepam

Il diazepam è un composto appartenente alla famiglia delle 1,4-benzodiazepine, il cui nome chimico completo è 7-cloro-1-metil-5-fenil-1,2-diidro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one. La sua funzione si esplica mediante il legame specifico al sito benzodiazepinico (BZD) di GABA_AR, potenziando la neurotrasmissione GABA_AR-mediata.

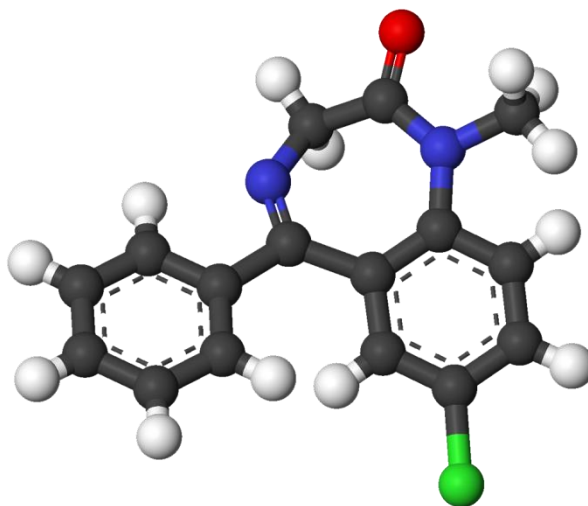


Fig. 2.5 Formula di struttura del diazepam.

2.1.11 Flumazenil: struttura e azione biologica

Il flumazenil, conosciuto anche come flumazepil o anche come Ro 15-1788, appartiene alla famiglia delle imidazo-BZD. Chimicamente il flumazenil è un etil 8-fluoro-5,6-di-idro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a](1,4) benzodiazepine-3-carbossilasi. È una base debole e liposolubile con un peso molecolare di 303,3 dalton, inoltre la molecola a basse concentrazioni è solubile in acqua.

Il flumazenil è un antagonista competitivo delle molecole che si legano nel sito delle BZD; non è dotato di attività intrinseca sul recettore, ma ha solo la capacità di competere con le altre molecole per il legame al sito tra le subunità α e γ . Si lega, quindi, ai recettori per le BZD con un'elevata affinità spiazzando gli agonisti. Risulta inoltre attivo anche nei confronti di farmaci non correlati alle BDZ come lo zolpidem, mentre sembra non avere alcuna interazione con farmaci quali i barbiturici. Il flumazenil ha un'emivita di 1-2 ore e dopo una rapida fase di distribuzione passa nel SNC e si concentra a livello della sostanza grigia cerebrale. Il farmaco viene impiegato per antagonizzare l'azione depressiva delle BZD sul SNC, sulla funzione muscolare e su quella respiratoria. Le sue indicazioni cliniche comprendono, infatti, il trattamento del sovradosaggio e la neutralizzazione degli effetti prolungati o indesiderati di questi farmaci.

Si è osservato che il flumazenil, a livello del cervelletto e del midollo spinale, si lega maggiormente alla subunità α_1 del GABA_AR, sebbene la maggior parte dei GABA_AR esprima la subunità α_6 (Atack *et al.*, 1999). Studi condotti sui ratti hanno dimostrato che, a livello dell'ippocampo, il flumazenil riesce a bloccare gli effetti anticonvulsivi dello zolpidem. (Tietz *et al.*, 1999). L'uso del flumazenil come tracciante ha permesso l'identificazione di diversi siti BZD nel teleosteo *Mullus surmuletus*, un'alta concentrazione di tale siti è stata riscontrata a livello del lobo ottico e nel bulbo olfattivo, mentre una concentrazione più bassa è stata osservata a livello del midollo allungato del cervelletto e del midollo spinale. (Giannaccini *et al.*, 1997).

2.2 Ruolo del GABA nei vertebrati acquatici

Il sistema GABAergico, data la sua notevole importanza, è stato da sempre uno dei sistemi maggiormente studiati, il suo ruolo e la sua localizzazione sono stati analizzati, oltre che nei mammiferi, anche in altri vertebrati, tra cui i teleostei. Da questi studi è emerso che il GABA agisce come neurotrasmettitore a carattere inibitorio anche nei teleostei (Kim *et al.*, 2004; Root *et al.*, 2004) e il suo meccanismo non varia significativamente rispetto a quello dei mammiferi (Martyniuk *et al.*, 2007).

La presenza di neuroni GABAergici è stata dimostrata in diverse aree encefaliche ed in particolare nei nuclei telencefalici e nel diencefalo di embrioni sia di *Danio rerio* (Higashijima *et al.*, 2004), che di *Gasterosteus aculeatus*, (Wouterlood *et al.*, 2000; Higashijima *et al.*, 2004). È stato inoltre osservato che in *Danio rerio* il numero di corpi cellulari GABAergici aumenta durante lo sviluppo (Doldan *et al.*, 1999). Se si considerano gli studi effettuati su animali adulti, è stato osservato che la trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*, presenta un numero di neuroni e fibre GABAergiche abbondanti nella ghiandola pineale. Inoltre a livello cerebrale è stata accertata anche la presenza degli enzimi GAD e GABA-T sia in *Oncorhynchus mykiss*, sia nel pesce gatto, *Ictalurus punctatus*.

Mediante l'uso di anticorpi anti-GABA, sono state ottenute numerose informazioni circa la distribuzione dei neuroni GABAergici nel telencefalo e nel diencefalo di *Carassius auratus* e di *Danio rerio*. Gli studi hanno dimostrato che i neuroni GABAergici sono distribuiti in maniera paragonabile tra pesci e mammiferi. Come visto nei mammiferi, anche in *Carassius auratus* e in *Danio rerio* i neuroni GABAergici sono stati identificati nei bulbi olfattivi, nel telencefalo, in HTH e nei lobi ipofisari (Kim *et al.*, 2004). In particolare, in *Carassius auratus* la presenza di neuroni GABAergici è stata riscontrata principalmente lungo la linea mediana del telencefalo, nel nucleo

midollare della linea mediana, chiamato nucleo pacemaker (PMN), e nel nucleo *lateralis tuberis*, omologhi rispettivamente a PVN ed ARC dei mammiferi. A livello talamico, in particolare in NVM, nel nucleo talamico dorsolaterale (NDL) e dorsomediale (NDM) è stata evidenziata una densa popolazione di neuroni GABAergici. Inoltre, anche il lobo anteriore e la *pars intermedia* dell'ipofisi ricevono una abbondante innervazione GABAergica, probabilmente analoga a quella osservata rispettivamente nell'eminenza mediana e nel lobo intermedio dell'ipofisi dei mammiferi. In *Carassius auratus* si è osservato che la temperatura dell'acqua riesce ad influenzare la sintesi del GABA: uno studio condotto su tale specie ha infatti, dimostrato che in animali mantenuti a 24° C si verificava un incremento più consistente della sintesi di GABA nel telencefalo e in HTH rispetto ad altri animali mantenuti in acque con temperatura inferiore (Fraser *et al.*, 2002).

Un possibile coinvolgimento del GABA nella regolazione neuroendocrina ipofisaria viene suggerito dalla presenza di neuroni GABAergici in HTH e di terminazioni assoniche GABAergiche nell'ipofisi dei teleostei (Martyniuk *et al.*, 2007), situazione analoga a quanto osservato nei mammiferi (Trudeau *et al.*, 2000). Sempre in *Carassius auratus*, oltre alla sintesi di GABA, la temperatura dell'acqua sembra anche influenzare il rilascio di GnRH e l'azione del GABA stesso sulle cellule gonadotrope. Studi condotti su femmine di *Carassius auratus* hanno dimostrato che sia la temperatura dell'acqua, sia le somministrazioni di un composto analogo al GABA, il γ -vinil GABA (GVG), provocano un incremento della sintesi di GnRH nell'ipofisi; nei maschi della stessa specie la temperatura dell'acqua non sembra influenzare il rilascio di GnRH mentre il GVG incrementa la concentrazione di GnRH solo se la temperatura dell'acqua è mantenuta a 24° C (Fraser *et al.*, 2002). Anche in *Petromizon marinus*, la lampreda comune, è stato osservato un possibile coinvolgimento del sistema GABAergico nella regolazione ipofisaria e nel rilascio di GnRH. Infatti, in tale specie, somministrazioni di GABA e muscimol, sia *in vitro* che *in vivo*, inducono un sostanziale incremento nel rilascio di GnRH, a differenza del trattamento con bicucullina durante il quale non si è osservato un evidente cambiamento nella concentrazione di GnRH (Root *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda lo studio della distribuzione dei recettori per il GABA, nei teleostei si hanno poche informazioni. Un recente studio condotto su *Cyprinus carpio* ha messo in evidenza che nell'encefalo di tale specie è presente BZC soprattutto in OTec e nei lobi vagale, faciale e glossofaringeo, mentre risulta scarsa la presenza di tale recettore nel cervelletto (Pirone *et al.*, 2006). In *Carassius auratus* è stato osservato che il GABA riesce a modulare anche l'espressione di geni coinvolti nella trasmissione sinaptica GABAergica, sia in HTH sia nel telencefalo. Infatti, iniezioni di GVG a femmine di *Carassius auratus* inducono in HTH una diminuzione dei livelli dell'mRNA per la subunità β_4 del GABA_AR, mentre a livello telencefalico si ha, rispettivamente, un

incremento ed una diminuzione dei livelli dell'mRNA per CRF e per la subunità β_2 del GABA_AR. Tuttavia, dopo la somministrazione di GVG, sia a livello ipotalamico sia a livello telencefalico, i geni per GAD e GABA-T e per altri peptidi, che svolgono un ruolo cruciale nel *feeding* e nella riproduzione, non subiscono alterazioni nel loro *pattern* di espressione (Fraser *et al.*, 2002).

Sempre in *Carassius auratus* è stato dimostrato che iniezioni i.p. di muscimol inducono, dopo 6-7 ore dall'iniezione, un incremento nella concentrazione dell'ormone luteinizzante (LH) di tre volte rispetto agli animali controllo, suggerendo quindi che tale composto, così come il GABA, stimoli il rilascio ipofisario di LH attraverso l'interazione con i GABA_ARs. Inoltre, in tale specie, il muscimol sembra essere in grado di influenzare anche la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi e nella degradazione del GABA, come il gene che codifica per GAD e per GABA-T. Infatti, a livello telencefalico, iniezioni i.p. di muscimol inducono una riduzione rispettivamente di dieci e quindici volte dei livelli di mRNA per GAD e GABA-T. Tale trattamento sembra modulare anche l'espressione del gene che codifica l'enzima tirosina idrossilasi, riducendo nel telencefalo i livelli dell'mRNA per tale enzima, fino a tre volte rispetto ai controlli. Tuttavia, la somministrazione di muscimol non sembra influenzare i livelli di mRNA per GnRH nel telencefalo di tale teleosteo (Martyniuk *et al.*, 2007).

2.3 Interazioni tra il sistema ORXergico e GABAergico

Molteplici studi, condotti in diversi nuclei cerebrali dei mammiferi, hanno evidenziato le interazioni che intercorrono tra il sistema GABAergico ed il sistema ORXergico (Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006; Song *et al.*, 2006). Da questi studi è emerso che diversi aspetti comportamentali, quali il *feeding* (Kokare *et al.*, 2006; Thorpe *et al.*, 2006), l'attività locomotoria (Kotz *et al.*, 2006) ed il ciclo sonno-veglia (Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006), sono regolati attraverso le connessioni reciproche che intercorrono tra neuroni GABAergici e ORXergici (Alam *et al.*, 2005; Kokare *et al.*, 2006; Kotz *et al.*, 2006).

2.3.1 Modulazione del comportamento alimentare

Studi condotti sui ratti, nei quali la somministrazione dell'ORX-A nella regione rostrilaterale viene preceduta da baclofen, da bicucullina e da muscimol, evidenziano che mentre il baclofen e la bicucullina non influenzano l'appetito ORX-A-indotto, il muscimol è in grado di inibire tale comportamento. Inoltre, la bicucullina sembra inibire l'iperfagia ORX-indotta a differenza dei trattamenti con muscimol, i quali potenziano l'effetto iperfagico sempre ORX-A-indotto (Kokare *et al.*, 2006). La somministrazione dell'ORX-A induce, durante la prima ora, una notevole

diminuzione del rilascio di GABA nelle regioni in cui sono prevalentemente localizzati i neuroni ORXergici, come PFA e LHA, evidenziando in tal modo un effetto inibitorio dell'ORX-A sui neuroni GABAergici. Si è ipotizzato che l'ORX-A possa influenzare l'assunzione di cibo mediante una riduzione del tono GABAergico all'interno della regione rostrolaterale dell'HTH (Thorpe *et al.*, 2006). L'ipotesi trova conferma nei risultati osservati in seguito a somministrazione di GABA in LHA che riduce l'assunzione di cibo, a differenza della somministrazione di bicucullina nell'area rostrolaterale ipotalamica la quale induce un aumento dell'assunzione di cibo (Sweet *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2003).

A differenza degli effetti del GABA, in LHA e nell'area rostrolaterale, la stimolazione del *feeding* prodotta dalle ORXs in ARC può essere promossa anche dal rilascio di GABA indotto dalle ORXs in tale regione (Kokare *et al.*, 2006). In ARC, infatti, sono presenti neuroni GABAergici, che esprimono il ORX₂R; le ORXs rilasciate in ARC interagiscono con il ORX₂R di tali neuroni, inducendo l'attivazione di una pompa di scambio Na⁺-Ca²⁺ con conseguente depolarizzazione della membrana cellulare e incremento della frequenza di scarica da parte dei neuroni GABAergici (Burdakov *et al.*, 2003). Tale attivazione porta ad un aumento della concentrazione extracellulare di GABA che rimane elevata per tutto il tempo di azione delle ORXs (Viggiano *et al.*, 2004). Il GABA così rilasciato promuove gli effetti delle ORXs sull'assunzione di cibo agendo sui GABA_ARs presenti sui neuroni di ARC, uno dei principali siti per la regolazione del *feeding*. Studi condotti su ratti trattati con ORX-A, hanno evidenziato, inoltre, che iniezioni i.c.v. di muscimol inducono, in modo dose-dipendente, un potenziamento degli effetti iperfagici provocati dalla somministrazione di ORX-A, a differenza del trattamento con bicucullina il quale induce una riduzione di tale effetto. Questo indica come ARC sia un sito-chiave per la regolazione ORX e GABA-dipendente dell'assunzione di cibo nei mammiferi (Kokare *et al.*, 2006).

Da questo si deduce non solo che le ORXs possono influenzare l'attività del sistema GABAergico, ma anche che il GABA può modulare l'azione dei neuroni ORXergici (Baldo *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2005; Henny e Jones, 2006). A tal proposito si è osservato che la stimolazione dei GABA_ARs tramite somministrazione di muscimol in AcbSh, una regione coinvolta nella regolazione del comportamento alimentare, conduce ad iperfagia (Sakurai *et al.*, 1998). Tale effetto è generato attraverso le interazioni neuronali che intercorrono tra AcbSh ed LHA, producendo una inattivazione dei neuroni presenti in tale area e inducendo l'attivazione della popolazione neuronale ORXergica tramite l'aumento dell'espressione del gene *fos* nei neuroni ORXergici di LHA. In aggiunta, il muscimol oltre ad agire sui neuroni ORXergici di LHA provoca un aumento dell'espressione di *fos*, anche nei neuroni di ARC, tramite le connessioni reciproche con i neuroni ORXergici di LHA (Baldo *et al.*, 2004).

2.3.2 Modulazione del ciclo sonno-veglia

Il sistema ORXergico ed il sistema GABAergico rivestono, all'interno dell'ampio *network* neuronale, un ruolo cruciale anche per la modulazione del ciclo sonno-veglia (Liu *et al.*, 2002; Korotkova *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006).

Si è osservato che i neuroni ORXergici, insieme all'azione diretta sui neuroni istaminergici di TMN, modulano l'attività dei neuroni GABAergici che innervano estensivamente TMN. Nei mammiferi i neuroni istaminergici, come anche i neuroni ORXergici in TMN, giocano un ruolo chiave nella regolazione del ciclo sonno-veglia; si è osservato, infatti, che la frequenza di scarica di tali neuroni aumenta durante la veglia per poi diminuire durante la fase di sonno REM. È noto che il rilascio di istamina, così come gli agonisti del recettore H₁ per l'istamina, da parte di TMN, inducano il mantenimento di uno stato di veglia attiva. Sempre in TMN i neuroni istaminergici sono innervati da neuroni GABAergici, i cui corpi cellulari sono localizzati in VLPO. Questi neuroni inibiscono i neuroni istaminergici grazie all'attivazione dei GABA_ARs presenti su tali neuroni promuovendo così il sonno (Eriksson *et al.*, 2004). I neuroni istaminergici sono ampiamente innervati anche da neuroni ORXergici i quali coesprimono oltre alle ORXs, anche la dinorfina (Chou *et al.*, 2001). La dinorfina e l'ORXs sono implicate nella regolazione dei meccanismi alla base del sonno e della veglia attraverso la loro azione su TMN, agendo in sinergia nel promuovere uno stato di veglia attiva. Gli effetti indotti dalle ORXs sui neuroni istaminergici sono sostenuti dalla dinorfina, la quale agisce sulle terminazioni nervose GABAergiche che innervano TMN. In questo modo mentre le ORXs attivano i neuroni istaminergici, la dinorfina inibisce il rilascio del GABA in TMN (Eriksson *et al.*, 2004).

Un recente studio condotto sui ratti ha evidenziato che un'interazione funzionale tra il sistema GABAergico ed ORXergico è presente anche nella corteccia prefrontale (PFC) (Song *et al.*, 2006), un'area cerebrale importante nella regolazione del ciclo sonno-veglia (Paus *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2002; Lambe *et al.*, 2003) che inoltre gioca un ruolo cruciale in diverse funzioni cognitive, come l'attenzione e la memoria (Goldman-Rakic, 1995). In tale area la somministrazione di ORX-A induce, in modo dose-dipendente, un aumento dell'eccitabilità dei neuroni GABAergici ed ORXergici presenti in questa regione. Di fatto, il GABA induce uno stato di iperpolarizzazione inattivando i neuroni presenti in PFC, al contrario l'ORX-A, sugli stessi neuroni, ha la capacità di stimolarne l'attivazione. È stato notato che, anche in presenza del GABA, l'ORX-A riesce ad attivare i neuroni piramidali di PFC, suggerendo che l'inibizione GABAergica su tali neuroni possa essere parzialmente bloccata dall'azione di ORX-A. I neuroni GABAergici in PFC risultano attivi durante il sonno, bloccando l'attività dei neuroni piramidali in tale regione. Durante la fase di transizione tra sonno e veglia, l'aumento della concentrazione di ORX-A in PFC

porta all'inibizione dei neuroni GABAergici e quindi all'attivazione dei neuroni piramidali in PFC, stimolando in questo modo lo stato di veglia (Song *et al.*, 2006).

Studi condotti sul ratto hanno evidenziato che l'azione del GABA modula l'attività dei neuroni ORXergici in PFA e nella regolazione del sonno e della veglia. Di fatto l'attività dei neuroni ORXergici in LHA ed in PFA può essere modulata sia da interneuroni GABAergici locali, presenti in queste aree cerebrali, sia da neuroni GABAergici localizzati in regioni encefaliche implicate nella regolazione del sonno e della veglia, come AP (Alam *et al.*, 2005), i quali inviano dense proiezioni ai neuroni ORXergici ipotalamici (Abrahamson e Moore, 2001; Gong *et al.*, 2002, 2004). In PFA ed LHA il GABA che viene rilasciato si lega ai GABA_ARs espressi sia sui neuroni ORXergici, sia sui neuroni MCHergici, inducendo una inibizione attraverso l'iperpolarizzazione della membrana cellulare. L'inattivazione dei neuroni ORXergici in LHA ed in PFA da parte del GABA porta ad una diminuzione della durata della veglia a vantaggio del tempo trascorso negli stati di sonno REM e non REM (Alam *et al.*, 2005).

I neuroni ORXergici, durante la regolazione del ciclo sonno-veglia, modulano l'attività dei neuroni colinergici di LDT e PPT ancora una volta attraverso la mediazione del sistema GABAergico (Sakurai, 2007). Infatti, è stato osservato che l'ORX-A inibisce i neuroni colinergici in PPT sia attraverso l'attivazione di interneuroni locali GABAergici, sia attraverso i neuroni GABAergici di SNRP (Takakusaki *et al.*, 2005).

I neuroni ORXergici, nella regolazione del ciclo sonno-veglia, sono influenzati anche dai neuroni GABAergici localizzati a livello di BF i quali inviano dense proiezioni ai neuroni ORXergici (Henny e Jones, 2006). BF è una regione encefalica importante nella regolazione del ciclo sonno-veglia in cui sono presenti soprattutto neuroni colinergici suddivisi in vari nuclei che proiettano alla corteccia cerebrale (Jones, 2004). BF contiene inoltre anche neuroni GLUergici e GABAergici (Lee *et al.*, 2004; Jones, 2005) che innervano densamente i neuroni ORXergici di PFA. Quando è necessario mantenere uno stato di veglia attiva si ha un aumento dell'attività dei neuroni GLUergici che attivano a loro volta i neuroni ORXergici. Quando invece si entra in uno stato di sonno, i neuroni GABAergici di BF tendono ad inibire i neuroni ORXergici, i quali, a loro volta, riducono la loro frequenza di scarica, l'espressione di *fos*, che si traduce in una promozione del sonno (Henny e Jones, 2006).

Anche in vertebrati non-mammiferi, quali il teleosteo *Danio rerio*, è stato evidenziato come il ciclo veglia-*rest* sia modulato dal sistema ORXergico mediante la connessione con i neuroni GABAergici in AHA. Infatti, la perdita di funzionalità di ORXR sui neuroni GABAergici produce un'alterazione del *pattern* di veglia-*rest* tipico di questo teleosteo (Yokogawa *et al.*, 2007). È da notare inoltre che proprio la regione di AHA di *Danio rerio* è ritenuta omologa sia ad AP e, più

precisamente, ai nuclei preottici mediano e ventrolaterale, che a BF, ritenuta nei mammiferi una delle aree più importanti nell'interazione tra il sistema ORXergico e GABAergico (Henny e Jones, 2006; Yokogawa *et al.*, 2007).

MATERIALI

E METODI

Per condurre tale studio sono stati utilizzati come modelli sperimentali un teleosteo marino, *Thalassoma pavo*, e uno d'acqua dolce, *Carassius auratus*. La scelta di tali modelli è dovuta alle peculiari caratteristiche di tali modelli, di cui il primo riveste un importante ruolo ecologico (Zander e Sötje, 2002) e si è dimostrato essere un valido modello sperimentale per studiare i processi di stress ambientale e gli eventi neurodegenerativi nei vertebrati acquatici (Giusi *et al.*, 2005; 2007). Il secondo si è rivelato un ottimo modello per studiare l'influenza il comportamento alimentare (Matsuda, 2009), ed inoltre, la sua adattabilità alle condizioni sperimentali lo rendono un valido modello per studiare pattern comportamentali complessi in laboratorio (Romaguera *et al.*, 2008).

3.1 Caratteristiche generali di *Thalassoma pavo*

All'interno del subphylum dei vertebrati, i teleostei formano una delle più importanti e ramificate classi. In particolare la famiglia dei labridi, tassonomicamente classificata nell'ordine dei perciformi, comprende diverse specie, tra cui *Thalassoma pavo*, il cui habitat spazia dai fondali a scoglio ai fondali sabbiosi di mari ed oceani temperati e tropicali (fig 3.1). I pesci appartenenti a tale famiglia vivono quindi a stretto contatto con il fondale e generalmente costituiscono branchi di piccole dimensioni. In generale essi sono animali ermafroditi proteroginici di tipo diandrico, in cui la maggior parte degli individui si sviluppano e riproducono in un primo momento come femmine ed in età avanzata possono mutare il loro assetto sessuale da femminile a maschile, qualora la popolazione di individui sessualmente maschile diventi esigua. La maggior parte di essi esibisce colori vivaci, le cui livree sono estremamente varie ed indicatrici di fenomeni di dimorfismo sessuale, che appare essere molto spiccato durante il periodo della cova (Alonzo e Warner, 2000). Negli ultimi decenni l'innalzamento della temperatura caratteristica del Mar Mediterraneo, già caratterizzato da una abbondantissima biodiversità, ha agevolato l'immigrazione di nuove specie prima tipicamente confinate alle fasce tropicali. Una di queste specie di labridi è *Thalassoma pavo*, che oggi popola il Mar Mediterraneo e le fasce tropicali e subtropicali dell'Atlantico orientale. Conformemente alle caratteristiche tipiche della sua famiglia, *Thalassoma pavo* è una specie ermafrodita proteroginica, caratterizzati da un corpo allungato e fusiforme, e da una piccola bocca fornita di una sola fila di denti piccoli ma aguzzi.

Phylum	Cordati
Subphylum	Vertebrati
Superclasse	Gnatostomi
Classe	Osteitti
Infraclasse	Teleostei
Ordine	Perciformi
Famiglia	Labridi
Specie	<i>Thalassoma pavo</i>

Fig. 3.1 Classificazione sistematica di *Thalassoma pavo*.



Fig.3.2 Foto di *Thalassoma pavo*.

Negli ultimi decenni l'innalzamento della temperatura caratteristica del Mar Mediterraneo, già caratterizzato da una abbondantissima biodiversità, ha agevolato l'immigrazione di nuove specie prima tipicamente confinate alle fasce tropicali. Una di queste specie di labridi è *Thalassoma pavo*, che oggi popola il Mar Mediterraneo e le fasce tropicali e subtropicali dell'Atlantico orientale. Conformemente alle caratteristiche tipiche della sua famiglia, *Thalassoma pavo* è una specie ermafrodita proteroginica, caratterizzati da un corpo allungato e fusiforme, e da una piccola bocca fornita di una sola fila di denti piccoli ma aguzzi. La pinna dorsale è unica e presenta un'altezza

pressoché uniforme, la pinna caudale degli esemplari adulti presenta lobi appuntiti che si presentano più allargati rispetto alle forme giovanili; da adulti gli esemplari di questa specie possono raggiungere una lunghezza massima di venti-venticinque centimetri. La livrea di *Thalassoma pavo* è caratterizzata da due principali foggie con tonalità variabili in base al sesso femminile (fig.3.2). Il suo habitat è generalmente costituito da acque poco profonde, tende ad affondarsi nella sabbia, e predilige i fondali rocciosi e ricoperti di alghe dove si nutre di molluschi e piccoli crostacei. La scelta *Thalassoma pavo* come modello sperimentale di questo lavoro poggia su varie considerazioni di ordine sia puramente teorico che più strettamente pratiche. *Thalassoma pavo* grazie alla sua collocazione tassonomica si presta perfettamente allo studio della neurobiologia nei teleostei, ancora così poco esplorata, ed in particolare allo studio di un sistema, quale quello Orexinergico che, come ampiamente illustrato, risulta essere parte attiva nei processi di regolazione dei principali stati comportamentali che caratterizzano la vita animale oltre a possedere caratteristiche filogenetiche molto antiche. Inoltre, la facile reperibilità, la sua notevole adattabilità alle condizioni di laboratorio, nonché le recenti evidenze sperimentali che dimostrano come *Thalassoma pavo* costituisca un valido modello sperimentale negli studi neurotossicologici (Giusi *et al.*, 2005), hanno indirizzato la scelta su questo valido e versatile modello sperimentale.

3.2 Il Sistema Nervoso Centrale di *Thalassoma pavo*

Per l'analisi della struttura ed organizzazione delle principali aree cerebrali nel teleosteo *Thalassoma pavo*, l'encefalo è stato rapidamente prelevato e congelato a -20°C. Per le analisi istologiche, tale encefalo viene tagliato al criostato (Microm HM505E), in sezioni seriali il cui spessore varia a seconda della tecnica applicata. Per la valutazione morfometrica delle principali aree cerebrali, le sezioni di 14 µm sono state sottoposte alla colorazione del cresil violetto, un colorante basico che anche nell'encefalo dei vertebrati acquatici evidenzia intensamente il corpo cellulare dei neuroni legandosi in maniera specifica al reticolo granulare ed ai ribosomi liberi fortemente basofili. Le analisi microscopiche consentono l'individuazione delle principali aree encefaliche (5X) e nel particolare la localizzazione dei nuclei cerebrali (10-40X) nell'encefalo di *Thalassoma pavo* (fig. 3.3).

Il Telencefalo

Nei pesci a pinne raggiate, l'eversione della metà dorsale delle pareti laterali del prosencefalo dorsolaterale porta alla formazione di due strutture solide che circondano un'unica cavità ventricolare. Nei pesci a pinne raggiate, gli emisferi telencefalici e l'ependima sono considerati rispettivamente strutturalmente omologhi al subpallio ed al pallio dei vertebrati terrestri, tuttavia nel caso dei pesci non è ancora noto con precisione il confine ed il numero di cellule che caratterizzano le due regioni anatomiche, numero di cellule che tende a crescere durante la filogenesi. Il telencefalo di *Thalassoma pavo* è costituito da due bulbi olfattivi localizzati rostroventralmente rispetto agli emisferi cerebrali, ed è diviso in due principali regioni, il telencefalo ventrale e dorsale; queste due regioni telencefaliche sono considerate omologhe rispettivamente al subpallio e al pallio degli altri vertebrati e comprendono totalmente ventidue diversi nuclei. Nei pesci, il telencefalo dorsale mostra variazioni nella composizione istologica e morfologica più evidenti rispetto a quelle del telencefalo ventrale. In *Thalassoma pavo* i bulbi olfattivi occupano la regione più rostrale dell'encefalo e prendono contatto con gli emisferi cerebrali attraverso lunghi e sottili peduncoli che circondano le estensioni dei ventricoli emisferici. I bulbi olfattivi sono strutture sessili con una struttura caratterizzata da cinque lamine concentriche ordinate secondo una direzione centripeta in cui si susseguono: lo strato delle fibre olfattive primarie (OLN), lo strato glomerulare (GL), lo strato cellulare esterno (ECL), lo strato di fibre olfattive secondarie (SOF), e lo strato cellulare interno (ICL). Caudalmente, l'organizzazione concentrica dei bulbi tende a sfumarsi e le cellule dello strato cellulare interno si congiungono al telencefalo ventrale. Il telencefalo ventrale è composto da quattro ammassi cellulari periventricolari: i nuclei dorsale, ventrale, sopracommissurale e postcommissurale, e da quattro popolazioni cellulari disposte in posizione laterale: i nuclei laterale, centrale, intermedio ed entopeducolare. Questa regione è suddivisa in due regioni: le regioni pre- e post-commissurali. Ai nuclei precommissurali appartengono: il nucleo dorsale (Vd), il nucleo ventrale (Vv) ed il nucleo laterale (Vl). Il Vd che occupa la regione più rostrale del telencefalo ventrale ed è composto da cellule di media dimensione. Il Vv, in posizione più caudale rispetto a Vd, è costituito da cellule di piccole dimensioni e meno compatte di quelle del nucleo dorsale. Uno strato di cellule endodimali che corrisponde alla parte più dorsale di Vv riveste il ventricolo, questa regione prende il nome di organo settale laterale (LSO) per la somiglianza con la omonima struttura descritta negli Uccelli.

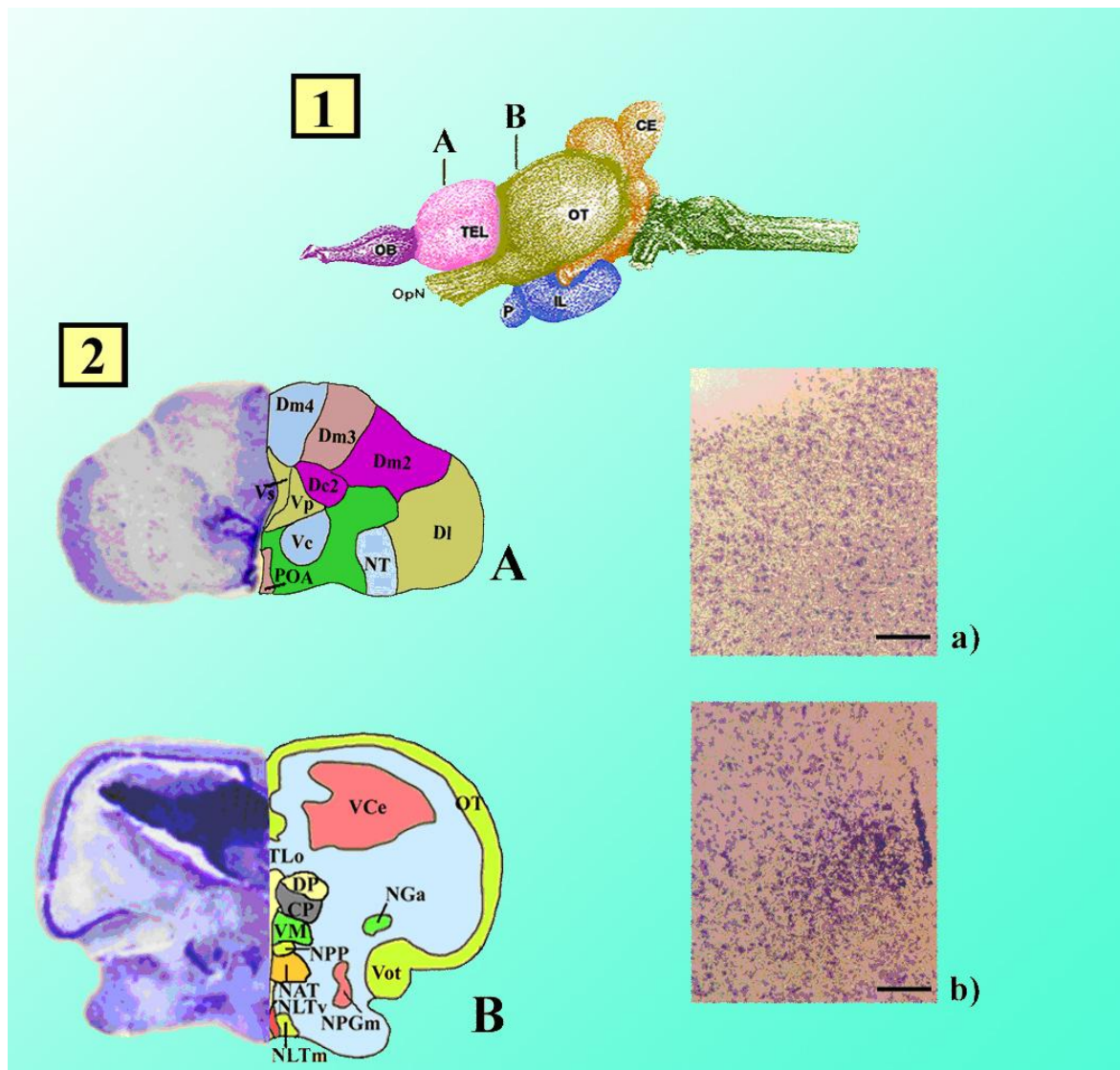


Fig. 3.3 1) Encefalo di *Thalassoma pavo* e relativi piani di taglio a livello delle aree telencefaliche (A) e di encefaliche (B). 2) Sezioni trasversali dell'encefalo; A: area telencefalica e particolare di Dm (a); B: area diencefalica con particolare di NAT (b). Abbreviazioni: CE: cervelletto; CP: nucleo talamico centrale posteriore; Dc2: seconda parte centrale del telencefalo dorsale; Dl: parte laterale del telencefalo dorsale; Dm2, Dm3, Dm4: seconda, terza e quarta parte mediale del telencefalo dorsale; DP: nucleo talamico dorsale posteriore; IL: lobo inferiore dell'HTH; OB: bulbi olfattivi; OpN: nervo ottico; NAT: nucleo anteriore periventricolare; NPGm: nucleo preglomerulare mediale; NLTm: parte mediale del nucleo laterale tuberale; NLTv: parte ventrale del nucleo tuberale laterale; NPP: nucleo posteriore periventricolare; NT: nucleo tenia; OT: OT; P: ipofisi; POA: area preottica; TEL: telencefalo; TLo: toro longitudinale; Vc: nucleo centrale; VCe: valvola del cervelletto; VM: nucleo talamico VMN; Vp: nucleo postcommissurale; Vs: nucleo sopra commissurale.

Infine il VI, è costituito da neuroni piccoli, sparsi localizzati dorsomedialmente al solco esterno. A livello commissurale si ritrovano il nucleo centrale (Vc) ed il nucleo sopra commissurale (Vs). Il Vc è localizzato caudalmente e dorsolateralmente a VI, mentre il Vs occupa la posizione rostrale della commissura anteriore, ed è costituito da cellule più piccole e

meno compatte rispetto a Vc. In posizione post-commissurale, infine, è possibile riconoscere: il nucleo post-commissurale (Vp), nucleo intermedio (Vi) ed il nucleo entopeduncolare (E). Il Vp, è caratterizzato da piccole cellule organizzate in gruppi che delimitano la regione di transizione tra le regioni telencefaliche e quelle diencefaliche. Il Vi, è localizzato nella regione caudale del telencefalo ventrale, in posizione dorsomediale rispetto alla porzione laterale del cervello anteriore. Infine, E affianca la regione laterale VMN, ed è costituito da cellule molto piccole e densamente raggruppate. La porzione dorsale del telencefalo in *Thalassoma pavo* è formata da tredici nuclei, organizzati in cinque principali regioni: le regioni mediale, dorsale, laterale, centrale e posteriore. In questa area sulla superficie dell'emisfero cerebrale si distinguono tre principali solchi: il solco *ipsiliforme*, sulla superficie dorsale del telencefalo, il solco *limitans*, nella zona mediale, che delimita medialmente le aree telencefaliche dorsali e ventrali ed il solco *esterno*, una profonda fessura nella regione basale che segna i confini ventrolaterali tra il telencefalo dorsale e ventrale. Il telencefalo dorsale è formato da cinque popolazioni cellulari: la parte mediale (Dm); la parte dorsale (Dd); la parte centrale (Dc), che riempie la regione centrale del telencefalo dorsale compresa tra Dm e Dd; la parte laterale (Dl), che costituisce uno degli elementi più estesi del telencefalo dei pesci, e la parte posteriore (Dp), in posizione caudale. La regione telencefalica posteriore è costituita dal nucleo tenia (NT), dove risiede la tela coroidea.

Il diencefalo

Nei Teleostei il diencefalo, compreso tra il telencefalo sul lato rostrale, ed il mesencefalo sul lato caudale, è la regione encefalica più complessa, comprendendo centri di integrazione neuronale delle informazioni gustative, olfattive, riproduttive e, soprattutto, visive. L'organizzazione diencefalica varia considerevolmente tra le diverse specie di pesci a pinne raggiate, anche se le differenze interspecifiche si concentrano generalmente in determinate regioni diencefaliche, come il tubercolo posteriore ed il pretetto, che costituiscono le regioni più variabili nei Teleostei. Il diencefalo è strutturalmente e funzionalmente suddiviso in otto regioni che comprendono: l'area preottica (POA), il talamo ventrale e dorsale, l'epitalamo, HTH, il tubercolo posteriore, il sinencefalo, il pretetto ed i nuclei ottici accessori. Il diencefalo ed il pretetto mostrano complessivamente una organizzazione simile con una maggiore conservazione della struttura di POA, del talamo dorsale e ventrale, dell'epitalamo e del sinencefalo, che ricalcano lo stesso pattern istologico in tutti i Teleostei e che invece mostrano il maggior grado di variazione a livello di HTH (Cerdà-Reverter *et al.*, 2001b). Le variazioni più considerevoli nel diencefalo si osservano a livello del HTH posteriore, epitalamo e sinencefalo, oltre che nel HTH ventrale e dorsale e tubercolo

posteriore. In *Thalassoma pavo* POA avvolge il recesso preottico del terzo ventricolo e confina rostralmente con la commissura anteriore, dorsalmente con il telencefalo, con il talamo ventrale e con il tubercolo posteriore, ventralmente con il chiasma ottico e con HTH dorsale. Nella regione più anteriore di POA, in posizione caduale rispetto alla commissura anteriore, si trova il nucleo preottico parvocellulare (NPO), che circonda la parte rostrale del recesso preottico, che per le differenze funzionali e morfologiche è suddiviso in due parti: la anteroventrale (NPOav) e parvocellulare (NPOpc). NPOav è costituito da cellule piccole, densamente stipate contro la parete del recesso preottico, mentre NPOpc contiene piccole cellule, anch'esse densamente compatte, che si dispongono in lamine longitudinali a ridosso del ventricolo. Il nucleo preottico magnocellulare (PM) è localizzato più ventralmente rispetto a NPOpc ed è suddiviso in tre regioni: una regione parvocellulare (PMpc) ed una magnocellulare (PMmc), localizzate cadualmente al nucleo periventricolare anteriore (NAP), ed una gigantocellulare (PMgc), situata all'estremità caudale di POA, dorsalmente alla suddivisione magnocellulare, caratterizzata da cellule giganti. I nuclei PMpc e PMmc sono costituiti da cellule di grandi dimensioni che nel PMmc si organizzano in una lamina di maggiore spessore formata da tre o quattro cellule. Il nucleo periventricolare anteriore (NAPv) confina dorsalmente con il PMgc e ventralmente con il nucleo *sovrachiasmatico* (NSC), ed è caratterizzato da cellule di medie e grandi dimensioni organizzate in lamine parallele. Al polo caudale di POA, al confine della regione ipotalamica, NAP è sostituito dal nucleo periventricolare posteriore (NPPv). Il talamo ventrale è costituito da quattro principali nuclei che si dispongono in senso rostro-caudale: il nucleo dell'eminenza talamica (N_{Te}), nella parte più rostrale del talamo ventrale, caratterizzato da cellule piccole e intensamente colorate; il nucleo talamico VMN (VM), costituito da un ispessimento dello strato ependimale composto da piccole cellule saldamente aggregate contro la superficie ventricolare; il nucleo talamico ventrolaterale (VL), disposto lateralmente a VM, e costituito da neuroni fusiformi con processi dendritici laterali; il nucleo talamico intermedio (I), collocato ventralmente all'abenula ipotalamica e dorsalmente al nucleo talamico VM, che non mostra più la connessione con la superficie ventricolare. Le cellule sono solo apparentemente simili a quelle di VM, ma presentano in realtà differenze significative in quanto i loro processi dendritici sono proiettati in direzione laterodorsale e le cellule più densamente colorate. L'organizzazione strutturale del talamo dorsale, è caratterizzata in direzione anteroposteriore, da tre nuclei: il nucleo talamico anteriore (A), disposto ventrocaudalmente all'abenula, costituito da cellule piccole e arrotondate; il nucleo talamico posteriore dorsale (DP), che prende origine in posizione VMN rispetto al fascicolo retroflesso, e mostra cellule di piccole dimensioni disposte lungo la parete ventricolare e densamente colorate; il nucleo talamico posteriore centrale (CP), che giace ventralmente a DP ed è costituito rostralmente da due o più

lamine con orientamento dorso-ventrale in cui le cellule mostrano lunghi prolungamenti dendritici laterali (Cerde-Reverter *et al.*, 2001b). Tra le regioni diencefaliche che mostrano una grande variabilità nei teleostei, si ritrova l'epitalamo che è costituito dalle abenule, dalla commissura abenulare e dall'epifisi. Le abenule sono una struttura pari e simmetrica che giacciono dorsalmente al talamo ventrale, nell'area dorsale del diencefalo rostrale ed hanno la stessa grandezza in entrambi i lati del cervello; i nuclei abenulari appaiono divisi in parte dorsale (NHd) e ventrale (NHv). Nel diencefalo, HTH emerge centralmente al polo caudale di POA ed è costituito da un lobo tuberale mediale e da due lobi inferiori. Il lobo tuberale confina con il terzo ventricolo, che si espande lateralmente a livello rostrale dando origine a due diverticoli, noti come recessi laterali, mentre la parte caudale del ventricolo ipotalamico forma il recesso posteriore, che spesso mostra diverticoli diretti ventrolateralmente. Nel lobo tuberale mediale si possono distinguere diversi raggruppamenti neuronali che costituiscono: il nucleo tuberale laterale (NLT), il nucleo tuberale anteriore (NAT), il nucleo del sacco vascoloso (NSV). Il NLT occupa la parte rostrale di HTH ed è diviso in quattro parti: laterale, mediale, ventrale, dorsale. La parte laterale del nucleo tuberale laterale (NLTl) è costituita da cellule disposte rostro-lateralmente al ventricolo ipotalamico ed è costituita da cellule molto grandi e densamente colorate, mentre le parti mediale e ventrale iniziano in corrispondenza del punto in cui ha origine il ventricolo ipotalamico, in particolare la parte ventrale delimita la porzione ventrale del ventricolo e la mediale è disposta lateralmente alla suddivisione ventrale; la parte dorsale di tale nucleo determina il confine dorsale del ventricolo ipotalamico e giace ventralmente al polo caudale di POA e dorsalmente alla parte ventrale di NLT. Lateralmente alla parte dorsale di NLT appaiono cellule sparse e fusiformi, a tipica forma triangolare, che costituiscono il NAT. A livello caudale di NAT, il ventricolo ipotalamico mostra un solco dorsale ed uno ventrale, associati rispettivamente con le parti dorsali e ventrali di NLT. Lateralmente a tali solchi, si estendono due gruppi cellulari, costituiti da cellule caratterizzate da un alto grado di densità nella loro porzione mediale rispetto alla porzione più laterale, che costituiscono il NRP, che compare come un ispessimento dello strato ependimale, caratterizzato dalla presenza di piccole cellule aggregate in posizione VMN. Ancora più caudalmente, le cellule di questo nucleo si espandono lateralmente ed adottano una disposizione colonnare lungo i diverticoli laterali del recesso posteriore. Sempre a livello di HTH posteriore, la porzione dorsale del ventricolo ipotalamico appare rivestita dalle cellule del NSV. Questo nucleo è costituito da cellule intensamente colorate e strettamente aggregate che costituiscono un ispessimento dello strato cellulare ependimale. In HTH, i lobi bilobari inferiori comprendono il nucleo diffuso del lobo inferiore (NDLi) e le sue suddivisioni: la suddivisione laterale di NRL anteriormente e più caudalmente il nucleo centrale del lobo inferiore (NCLi), ed il nucleo mediale del lobo inferiore

(NMLi). La regione encefalica che costituisce il tubercolo posteriore è suddivisa in un'area periventricolare ed in un'area migrata. L'area periventricolare comprende: il nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp), caratterizzato da cellule di piccole e media grandezza fusiformi o ovoidali; l'organo paraventricolare (PVO), formato da cellule molto piccole che formano una banda spessa lungo la superficie ventricolare. Più caudalmente entrambi i lati dell'encefalo si fondono medialmente e PVO viene separato in una componente dorsale e una ventrale, mentre lateralmente a PVO si ritrova il nucleo dell'organo paraventricolare (nPVO), nel quale le cellule neuronali sono di grandi dimensioni e possiedono un citoplasma granulare. Dorsalmente a NSV e ventralmente a TPp, si ritrova il nucleo tuberale posteriore (NPT), che comprende cellule di medie e grandi dimensioni evidenti nel punto di congiunzione degli emisferi diencefalici lungo la linea mediale. All'interno del tubercolo posteriore, l'area migrata è formata da un complesso nucleare preglomerulare, suddiviso a sua volta in quattro nuclei che, in senso rostro caudale comprendono: il nucleo preglomerulare anteriore (NPGa), situato a livello della superficie ventrale dell'encefalo; il nucleo preglomerulare laterale (NPGl), collocato all'inizio del ventricolo ipotalamico e centralmente a NPGa; il nucleo gustativo terziario (NGT), localizzato tra NPGa e NPGl; il nucleo mediale preglomerulare (NPGm), che giace nella regione mediale e che si espande caudalmente assumendo una posizione più mediale. Il nucleo glomeruloso (NG) risulta suddiviso in una parte anteriore (NGa) e una posteriore (NGp): NGa giace caudalmente alla superficie intermedia del nucleo pretettale ed in posizione più caudale si estende ventralmente fino a fondersi con NGp, possiede una forma larga ed arrotondata che domina la porzione caudale del diencefalo. Infine, il nucleo caudo-mediale consiste di raggruppamenti cellulari collocati in posizione mediale: il nucleo preglomerulare commisurale (NPGc), dorsalmente, ed il corpo mammillare (CM), centralmente a NPGC e collocato dorsalmente rispetto al polo caudale della parte inferiore di NLT. Tra il diencefalo e il mesencefalo si trova il sinencefalo, costituito da cinque suddivisioni principali: l'organo subcommissurale (SCO), che emerge caudalmente rispetto all'abenula e ventralmente alle fibre della commissura posteriore; il nucleo pretettale periventricolare dorsale (PPd), che giace in posizione caudale all'abenula e latero-ventrale a SCO; il nucleo pretettale periventricolare ventrale (PPv), che sorge in corrispondenza delle regioni medioventrali e ventrali del fascicolo retroflesso; il nucleo paracommissurale (NP), in posizione dorsolaterale alla commissura posteriore e ventrale al OT; il nucleo del fascicolo longitudinale mediale (nMLF), che inizia al polo caudale della commissura posteriore, sulla superficie dorsale del diencefalo. La porzione più caudale del diencefalo è costituita infine dal pretetto, in cui si riconoscono diversi nuclei cellulari tra cui alcuni sono di origine sinencefalica, mentre altri di origine mesencefalica. Il primo di essi è il nucleo parvocellulare pretettale superficiale (PSp), che segue il nucleo pretettale centrale (NPC) e che si colloca nell'area pretettale

rostrale dove rappresenta il più grande nucleo di questa regione; il nucleo corticale (NC), che si estende lateralmente a NPC, formando una caratteristica lamina cellulare che si espande dorsolateralmente. Questo nucleo è riconoscibile grazie alla forma arrotondata delle sue grandi cellule incastrate nel polo rostrale del OT. Gli altri nuclei di questa regione diencefalica comprendono il nucleo pretettale superficiale intermedio (PSi), posto ventromedialmente alla terminazione caudale di PSp; il nucleo pretettale superficiale magnocellulare (PSm), un cospicuo nucleo ventrale a NC, laterale a NPC e dorsale a PSp, ed infine il nucleo pretettale accessorio (AP), in posizione dorsocaudale alla terminazione posteriore di PSp.

Il Tetto Ottico

OTec è costituito da una struttura bilaterale, a forma di conchiglia, che poggia sul tegmento mesencefalico. Esso costituisce il più importante centro visivo in *Thalassoma pavo* e riceve numerosi input dalla retina controlaterale ed anche un numero più basso di proiezioni non retinali dalle principali regioni encefaliche che mediano le informazioni di tipo sensoriale. Gli output tettali sono diretti principalmente alla regione pretettale, al talamo, a Tlo ed al tetto controlaterale. OTec è organizzato in strati concentrici, che dall'esterno verso l'interno formano: lo strato marginale (SM); lo strato ottico (SO); lo strato fibroso grigio esterno (SFGS); lo strato grigio centrale (SGC), la cui metà superiore è rappresentata dallo strato plessiforme interno (Ipl); lo strato albino centrale (SAC) e lo strato periventricolare (SPV). Nel complesso è caratterizzato dalla presenza di cinque tipi cellulari: neuroni piriformi, piramidali, fusiformi, multipolari ed orizzontali. Circa il 90% dei neuroni sono di tipo piriforme e presentano numerosi dendriti secondari. Le cellule piramidali sono rare e localizzate principalmente nella zona bianca profonda, mentre quelle fusiformi caratterizzano la zona bianca e grigia superficiale ed i neuroni multipolari occupano gli strati più superficiali del tetto. SM è ricco di assoni amielinici, detti fibre marginali, che originano dai neuroni di Tlo, una struttura cilindrica pari, che si estende longitudinalmente sotto la commissura intertettale. Raggiunto lo strato marginale, le fibre marginali corrono lateralmente e parallele tra di loro. Queste fibre sono paragonabili alle fibre parallele del cervelletto, sia dal punto di vista morfologico che elettrofisiologico. SM contiene inoltre l'arborizzazione dei lunghi e sottili processi dei neuroni piriformi di SGC. La regione più profonda di SM contiene diramazioni orizzontali dendritiche che potrebbero derivare dai corpi cellulari localizzati a livello di SAC. SO è diviso in tre strati: la parte superficiale, la parte intermedia e la parte profonda. La parte superficiale è ricca di assoni mielinici, di cui quelli di dimensioni piccole e medie sono afferenze retinotettali; quelli di dimensioni maggiori costituiscono l'85% degli assoni della parte profonda. La parte intermedia è formata da

neuropili che contengono pochi assoni mielinizzati e abbondanti neuroni amielinici; essa inoltre contiene tre tipi di terminazioni assoniche: le terminazioni del nervo ottico, le terminazioni con vescicole sinaptiche arrotondate, le terminazioni che derivano dagli assoni mielinici, con vescicole ovoidali. SFGS è caratterizzato da abbondanti assoni mielinici ed è inoltre ricco di corpi cellulari. La maggior parte degli assoni mielinici costituiscono afferenze retinotettali che formano sinapsi di tipo asimmetrico sia con i dendriti dei neuroni localizzati nella parte più profonda del tetto, sia con un piccolo numero di terminazioni ricche in vescicole appiattite, sia con il corpo cellulare e l'albero dendritico superficiale dei neuroni piramidali. In SFGS sono presenti altri tre tipi di terminazioni sinaptiche, alcune, più numerose, ricche di vescicole arrotondate e regolari, mentre altre, meno numerose, sono ricche di vescicole a forma irregolare (Cerde-Reverter *et al.*, 2001b). L'elemento cellulare più cospicuo in SFGS sono i neuroni piramidali, il cui corpo cellulare è localizzato nella regione profonda di SFGS ed hanno la tipica forma a piriforme o piramidale. SFGS contiene anche piccoli neuroni bipolari insieme a due tipi di cellule orizzontali con un soma sferoidale, distinte in chiare e scure. Le cellule scure somigliano ad oligodendrociti, mentre le chiare sono caratterizzate invece da una bassa densità elettronica e terminazioni sinaptiche che contengono vescicole piccole ed arrotondate sulla loro superficie. SGC è costituito da una porzione superiore che costituisce Ipl, e uno più interno denominato strato grigio interno. Lo strato Ipl è un intricato neuropilo che parte dal confine con SFGS e raggiunge la regione basale dei neuroni piramidali; è caratterizzato da pochi assoni mielinizzati e corpi cellulari. Gli elementi più abbondanti di questa regione sono i dendriti che presentano un orientamento verticale e che provengono principalmente dalle cellule periventricolari piriformi. Nella parte intermedia di SGC i dendriti formano una banda orizzontale, ed in questo strato risiede inoltre il soma di diversi tipi cellulari: i grandi neuroni fusiformi, i piccoli neuroni piriformi, i piccoli neuroni multipolari ed i neuroni orizzontali. SAC è caratterizzato da abbondanti fasci di assoni mielinici e da pochi fasci amielinici, ed ospita il corpo cellulare dei neuroni multipolari e gangliari e un intricato neuropilo, oltre ai prolungamenti dendritici orizzontali e verticali e cellule ependimo-gliali. Alcuni degli assoni originano nella retina controlaterale, altri nel telencefalo ipsilaterale. Sono state identificate in questa regione tre tipi di terminazioni sinaptiche: terminazioni con vescicole arrotondate grandi e piccole ed ampie terminazioni con vescicole irregolari ed appiattite. Infine SPV è un'ampia regione costituita da cellule molto compatte, dove il corpo cellulare dei neuroni periventricolari contiene un nucleo arrotondato ricoperto da un sottile strato di citoplasma e sono presenti pseudodesmosomi e giunzioni serrate tra dendriti e dendriti e tra dendriti e soma (Cerde-Reverter *et al.*, 2001b).

3.3 Caratteristiche generali di *Carassius auratus*

Il pesce rosso o carassio rosso o ciprino dorato (*Carassius auratus auratus*) è un pesce d'acqua dolce, appartenente alla famiglia dei *Ciprinidi* (Fig. 3.4). È una versione domestica della Carpa grigioverde originaria dell'Asia orientale. Allevato e selezionato nel X secolo in Cina e diffuso in Europa alla fine del XVII secolo. Il corpo è tozzo, alto, con peduncolo caudale corto e spesso. Testa a forma triangolare, lo spazio interorbitale è vasto, il muso è lungo quanto il diametro dell'occhio. La bocca è terminale, piuttosto piccola, priva di barbigli, con labbra piuttosto sottili, mostra un accenno di inclinazione verso l'alto. I mascellari giungono posteriormente all'altezza della narice o in vicinanza dell'orbita. L'occhio ha medie dimensioni. I denti faringei sono piastriformi e disposti in una sola serie su ciascun lato. Il profilo della pinna dorsale è di solito lievemente concavo. Le pinne dorsali ed anali sono provviste di un raggio dentellato e robusto e la coda si presenta biloba con gli apici arrotondati. La colorazione della forma selvatica può assumere varie tonalità: dal grigio verde al grigio azzurro, fino a dorata: sul dorso è più scura e sfuma gradatamente sui fianchi fino a diventare biancastra sul ventre. Le popolazioni d'allevamento hanno un numero grandissimo di tinte e sfumature, da rosso acceso a bianco, da nero a pezzato. Il pesce rosso è una specie di taglia media: normalmente la lunghezza totale massima è di 35 cm e pesa circa 1 kg; in casi eccezionali raggiunge la lunghezza totale di 45 cm e il peso di circa 3 kg. Sono riconosciute 5 sottospecie:

- *Carassius auratus argenteaphthalmus*
- *Carassius auratus auratus*
- *Carassius auratus buergeri*
- *Carassius auratus grandoculis*
- *Carassius auratus langsdorfii*

Parte della sua popolarità è dovuta alla sua resistenza, si tratta infatti di un pesce di acqua dolce e fredda che può sopravvivere perfino a brevi periodi di ghiaccio superficiale, sempre che l'acqua contenga sufficiente ossigeno e non geli completamente. Il loro habitat ottimale prevede una temperatura compresa tra i 14 e i 22°C, durezza dell'acqua tra 10-20° dGH, pH intorno a 7. La maturità sessuale viene raggiunta in 2-4 anni, in primavera, da maggio a luglio, in acque piuttosto calde (almeno 20 °C); le uova sono deposte in più riprese, in numero di circa 200.000 per femmina ed aderiscono alla vegetazione acquatica. Le larve si schiudono dopo 5-8 giorni e misurano 3-4 mm. Il dimorfismo sessuale è scarso e solo in esemplari sessualmente maturi esiste una differenza evidente nella conformazione della zona anale, che nel maschio risulta leggermente concava mentre nella femmina un po' sporgente. Durante il periodo della riproduzione il maschio presenta delle protuberanze biancastre sugli opercoli branchiali e sui primi raggi delle pinne pettorali, mentre la

femmina, indipendentemente dalla specie, si distingue nello stesso periodo per il ventre tondeggiante ed asimmetrico dovuto alle numerosissime uova.



REGNO	<i>Animalia</i>
PHYLUM	Cordata
CLASSE	Osteiti
SOTTOCLASSE	Actinopterygii
SUPERORDINE	Teleostei
ORDINE	Cypriniformes
FAMIGLIA	Cyprinidae
GENERE	<i>Carassius</i>
SPECIE	<i>Carassius auratus</i>
SOTTOSPECIE	<i>Carassius auratus auratus</i>

Fig. 3.4 Foto rappresentativa di un esemplare di *Carassius auratus* e sua collocazione sistematica.

3.4 L'Encefalo dei cipriniformi

L'encefalo dei Cipriniformi è avvolto da una capsula cartilaginosa od ossea, denominata *neurocranio*. L'encefalo può essere suddiviso in telencefalo, diencefalo, mesencefalo e cervelletto o metencefalo. Il cervello anteriore, il telencefalo, è interamente al servizio dell'organo olfattivo, ed è assai sviluppato nei pesci che hanno sviluppato particolarmente tale senso; esso porta il primo paio di nervi cefalici, i nervi olfattivi. Oltre all'odorato, il telencefalo influenza e dirige il comportamento dei pesci durante il periodo della fregola e delle cure dedicate alle uova ed ai piccoli. Il telencefalo è formato da due bulbi olfattivi (OB) che sono localizzati rostroventralmente e che si accoppiano agli emisferi cerebrali. Si distingue un telencefalo dorsale ed un telencefalo ventrale e complessivamente in questa area encefalica si ritrovano 22 nuclei. Il diencefalo nei pesci è separato dal telencefalo da un'incisura dorsolaterale e spesso anche da una pronunciata costrizione laterale. Dorsalmente il parancefalo, o sacco dorsale sottile, forma la volta della cavità all'interno del diencefalo, detta anche terzo ventricolo. In diverse specie di pesci il sacco dorsale è allargato e si estende lateralmente e frontalmente anche sopra il telencefalo. Il diencefalo è diviso macroscopicamente in area preottica (AP), talamo (TH), epitalamo, ipotalamo (HTH), tubercolo posteriore (TP), sinencefalo e pretetto. I nervi ottici entrano incrociati anteriormente al diencefalo e, posteriormente, questa regione del cervello è collegata alla porzione ventrale del mesencefalo. Il TH è un centro di relazione per il trasferimento degli impulsi olfattori e del corpo striato ai tratti midollari e spinali. In queste regioni ventrali, si trova il nucleo genicolato che riceve dei nervi ottici (Il paio nervi cranici). Il diencefalo dei pesci sembra esser un importante centro di correlazione per i messaggi in entrata ed uscita relativi all'omeostasi interna. In special modo l'HTH agisce sul sistema endocrino attraverso la mediazione dell'ipofisi che si trova ventralmente ad esso. La ghiandola pineale dei pesci, nonostante i numerosi studi, non ha ancora un inequivocabile significato funzionale. Le ipotesi più accreditate danno alla ghiandola una funzione principalmente sensoriale, ipotizzata dalla presenza di strutture fotosensibili, e un'altra che le dà un significato secretorio. Il mesencefalo nei pesci è relativamente grande e consiste nel tetto ottico (OTec) composto da una zona dorsale, due lobi ottici e il tegmento ventrale. È stato dimostrato che il OTec contiene delle unità funzionali che correlano le impressioni visive con le risposte muscolari come per esempio, nel fronteggiare la preda o nelle tecniche di procurarsi il cibo. A causa delle importanti attività funzionali del OTec in diverse specie di pesci e delle diffuse connessioni con diversi strati di cellule nervose, il OTec può esser comparato alla corteccia cerebrale dei mammiferi. Il cervelletto si sviluppa dalla sottostante medulla come un rilievo dorsale del margine superiore del quarto ventricolo del cervello. Ha diverse finalità funzionali come l'equilibrio nel nuoto, mantenimento del

tono muscolare e senso dell'orientamento nello spazio. Diversi strati di cellule nervose possono esser distinti quali le cellule recettive principali e le cellule del Purkinje che assumono una rilevante importanza nei vertebrati filogeneticamente più recenti. Nei pesci ossei il cervelletto acquisisce una caratteristica proiezione in avanti e la valvola cerebellare si estende sotto il OTec. La funzione principale del metencefalo è di coordinare il tono muscolare e i movimenti del nuoto.

Telencefalo

Il telencefalo di *Carassius auratus* è formato da due OB e da due emisferi telencefalici. Gli OB, che si dipartono anteriormente agli emisferi telencefalici e si estendono rostroventralmente agli stessi, presentano quattro strati concentrici: lo strato olfattivo dei nervi primari (più periferico), lo strato glomerulare, lo strato delle cellule mitrali e lo strato delle cellule dei granuli (il più profondo). Gli assoni dei nervi olfattivi primari formano contatti sinaptici con i dendriti delle cellule mitrali a livello glomerulare. Sono state osservate delle sinapsi reciproche tra i dendriti delle cellule mitrali e i dendriti delle cellule dei granuli nello strato delle cellule mitrali. Gli assoni delle cellule mitrali formano i tratti olfattivi che raggiungono gli emisferi cerebrali.

Gli OB si proiettano bilateralmente alle zone ventrali e dorsolaterali del telencefalo; ulteriori proiezioni includono i nuclei preottici periventricolari e un nucleo caudale olfattivo vicino ai nuclei tuberose posteriori nel diencefalo. Il bulbo controlaterale e le commissure anteriori (AC) inoltre ricevono input dagli OB. Le proiezioni controlaterali attraversano la parte rostrale e caudale delle AC e della commissura abenulare (HC). I neuroni che si proiettano da OB sono molto più numerosi dal lato ipsilaterale piuttosto che dall'emisfero controlaterale. I collegamenti reciproci fra OB ed il campo terminale posteriore suggeriscono una struttura laminata nel telencefalo dorsolaterale. Il telencefalo viene suddiviso in due porzioni importanti: la porzione dorsale e quella ventrale. Il pallio, anche chiamato zona dorsale Telencefalica (D), può essere diviso in quattro divisioni importanti: mediale (Dm), dorsale (Dd), laterale (Dl) e posteriore (Dp) (Northcutt, 2006; Fig. 3.5). La ricostruzione delle relative posizioni di queste divisioni indicano che Dm e Dl formano il polo rostrale, mentre Dp forma il polo caudale. Le divisioni palliali Dm e Dl possono essere rispettivamente divise in suddivisione rostrale (Dmr), caudale (Dmc), dorsale (Dld) e ventrale (Dlv). Dm è caratterizzato da uno strato superficiale di cellule addensate molto simili ai granuli, che ricopre uno strato di cellule più grandi, queste cellule aumentano di dimensioni gradualmente con la profondità. La suddivisione Dmr si sposta lateralmente e contemporaneamente è sostituita gradualmente dalla suddivisione Dmc.

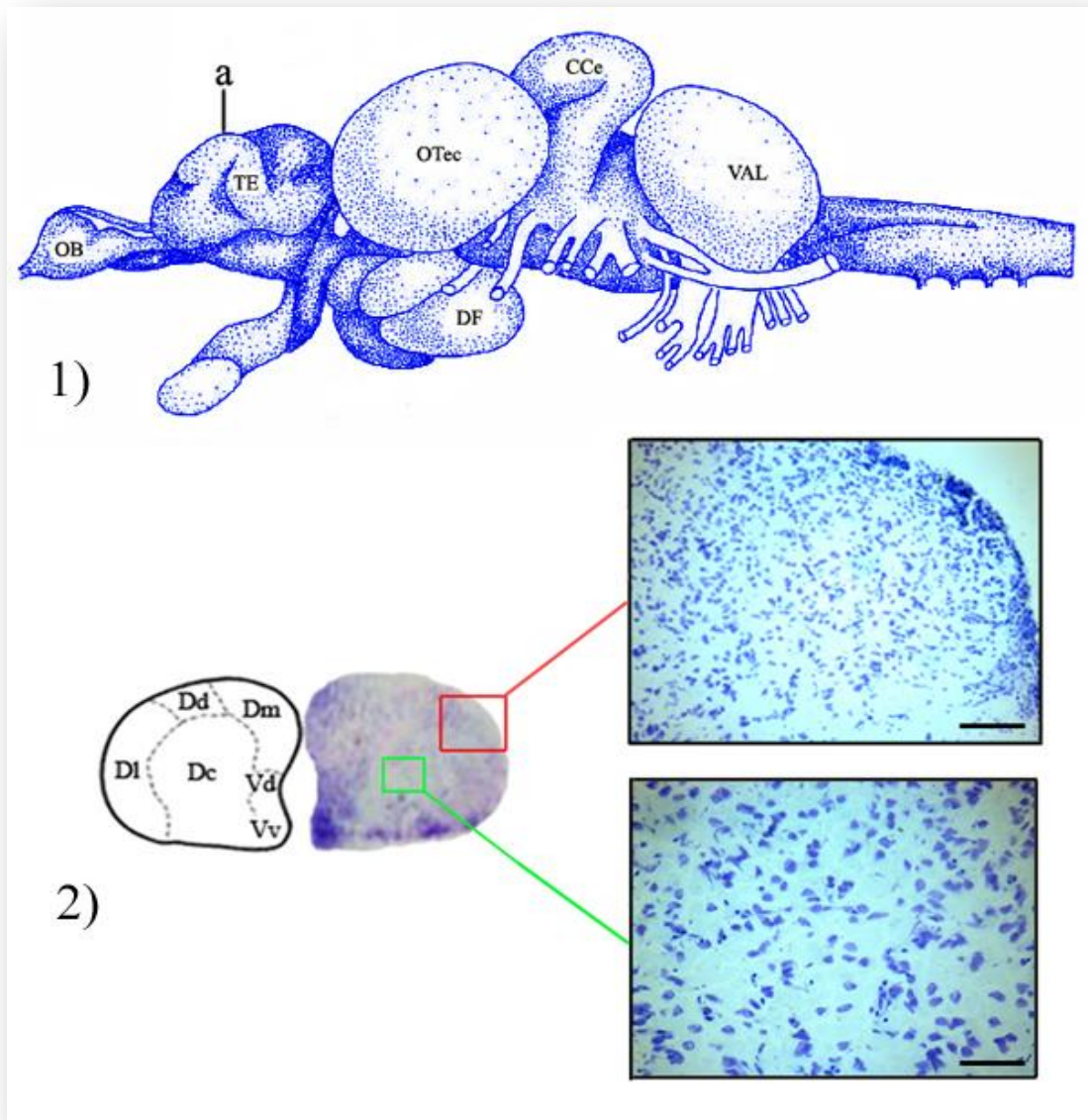


Fig. 3.5 Veduta laterale dell'encefalo di *Carassius auratus* (1) con piano di taglio (a) di una rappresentativa sezione trasversale effettuata a livello telencefalico anteriore. Sezione trasversale colorata con il metodo di Nissl (2): la metà sinistra rappresenta una schematizzazione dei principali gruppi cellulari. Abbreviazioni: Dc: divisione palliata centrale; Dd: parte dorsale dell'area dorsale telencefalica; Dl: parte laterale dell'area dorsale telencefalica; Dm: parte mediale dell'area dorsale telencefalica; Vd: parte dorsale dell'area telencefalica ventrale; Vv: parte ventrale dell'area telencefalica ventrale. A destra sono riportati due particolari della sezione, in rosso Dl ed in verde Dc. Scale bar: in rosso a 20 µm; in verde a 40 µm.

La suddivisione Dmc può essere distinta citologicamente da Dmr da uno strato superficiale di cellule che sono molto più grandi delle cellule superficiali Dmr, come per Dmr anche in Dmc il formato delle cellule aumenta gradualmente con l'aumentare della profondità. Le cellule più profonde di Dmc sono tra le più grandi cellule del pallio e sono state tradizionalmente indicate come le cellule che separavano la divisione palliale centrale (Dc). Tutte le divisioni palliali, con l'eccezione del Dd, hanno una popolazione di cellule di grandi dimensioni. Rostralmente, Dl si distingue da Dm da un solco ipsiliforme poco profondo e tramite un evidente aumento delle dimensioni delle cellule che caratterizzano il bordo mediale di Dl. Caudalmente, Dl può essere distinto facilmente da Dm da una lamina di cellule di medie dimensioni addensate tra di loro che vanno a costituire Dd. A differenza della maggior parte delle divisioni palliali, le cellule di grandi dimensioni in Dl si presentano nella zona mediale e non nella zona centrale, fatta eccezione per una banda superficiale che forma uno strato dallo spessore di 3-4 cellule simile alla corteccia. E' difficile da distinguere il margine esatto tra Dld e Dlv. Inoltre Dlv può essere ulteriormente suddiviso in una parte dorsale e in una ventrale. La parte dorsale di Dlv è formata da cellule sparse di grandi dimensioni, mentre la parte ventrale di Dlv è formata da cellule addensate di piccole dimensioni simili ai granuli. Sicuramente il margine palliale più difficile da distinguere è il margine fra Dlv e Dp; nelle sezioni trasversali del telencefalo si nota come sia Dld e Dlv tendono a scomparire velocemente spostandosi in posizione caudale. A livello della commessura anteriore possono essere visualizzati sia le parti dorsali e ventrali di Dlv che di Dld. In posizione caudale rispetto alla commessura anteriore le due suddivisioni di Dl si riducono e a questo livello è possibile osservare solo una piccola striscia degli strati più esterni di Dlv mentre comincia a delinearsi Dp. A livello del telencefalo caudale non c'è traccia di suddivisioni di Dl ed il polo caudale ventrale è dominato da un anello superficiale di cellule di medie dimensioni che circondano un nucleo di neuroni addensati di maggiori dimensioni che caratterizzano Dp. La transizione da Dlv a Dp è molto chiara, una volta che l'encefalo viene osservato sul piano orizzontale. Si può notare come il polo caudale di Dlv è contrassegnato da un solco distinto mentre una sottile zona fra Dlv e Dp risulta priva di cellule. L'altra importante area del telencefalo è l'area telencefalica ventrale (V) o subpallio, anche questa area ha diverse suddivisioni morfo-funzionali. Nella parte rostrale si evidenzia la componente dorsale (Vd); in tale area quando è osservata in sezioni trasversali è possibile riconoscere tre subnuclei: dorsale, intermedio e ventrale. Il subnucleo dorsale è formato da cellule di dimensioni maggiori rispetto alle cellule rostrali Dm. Il subnucleo ventrale è una piccola zona che contiene la maggior parte delle cellule di Vd che si proiettano indietro su OB. Come nella maggior parte dei teleostei, il nucleo sovracommissurale (Vs) occupa la maggior parte della parete dorsomediale caudale del telencefalo. Spostandosi verso la zona caudale si formano i nuclei dorsali

e ventrali di Vd mentre in posizione ventrale si forma la zona ventrale (Vv). Lateralmente a questi nuclei c'è la parte centrale (Vc), che caudalmente viene sostituita dal nucleo entopeduncolare (NE) (Fig. 3.6). In posizione ventrocaudale rispetto a Vs si forma la regione postcommissurale (Vp) e, lateralmente ad esso, la parte intermedia (Vi). La comparsa di Vp è fondamentale perchè delimita il passaggio tra telencefalo e diencefalo (Northcutt, 2006). A livello delle divisioni palliali Dl e Dm giungono principalmente fibre provenienti dai nuclei preglomerulari, che inviano prolungamenti fibrosi principalmente a Dm e ricevono un complesso di afferenze comprendenti informazioni di natura uditiva nel nucleo preglomeruloso anteriore (NPGa) nel sottonucleo caudale del nucleo preglomeruloso laterale (NPGl), oltre che chemosensoriale a livello del nucleo preglomeruloso mediale (NPGm) e nucleo subglomeruloso (SG), mentre i complessi preglomerulari che inviano prolungamenti principalmente a Dl ricevono informazioni provenienti dalla linea laterale, sia di natura visiva nella parte dorsale del sottonucleo rostrale del nucleo preglomeruloso laterale (rPGL-d) che auditiva nella parte ventrale del sottonucleo rostrale del nucleo preglomeruloso laterale (rPGL-v). A livello di Dm giungono ancora delle informazioni di natura sensoriale aggiuntive, come ad esempio quelle visive o provenienti dalla linea laterale, parliamo in questo caso però di connessioni minori. Dm riceve anche informazioni gustative attraverso il nucleo talamico posteriore (NTP). Benché non sia stato ancora verificato un coinvolgimento nella ricezione degli stimoli di natura auditiva in Dl, è stato dimostrato un suo legame con il sistema olfattivo attraverso OB. In definitiva, i meccanismi attraverso i quali le divisioni palliali Dm e Dl potrebbero realizzare la modulazione delle informazioni sensoriali non sono stati ancora del tutto chiariti, sebbene anche in questo teleosteo si ipotizzi l'esistenza di cellule in grado di processare stimoli di varia natura, definite cellule multimodali. Tuttavia, un'altra possibilità è che le varie modalità di risposta siano separate spazialmente all'interno delle divisioni Dm e Dl (Northcutt, 2006).

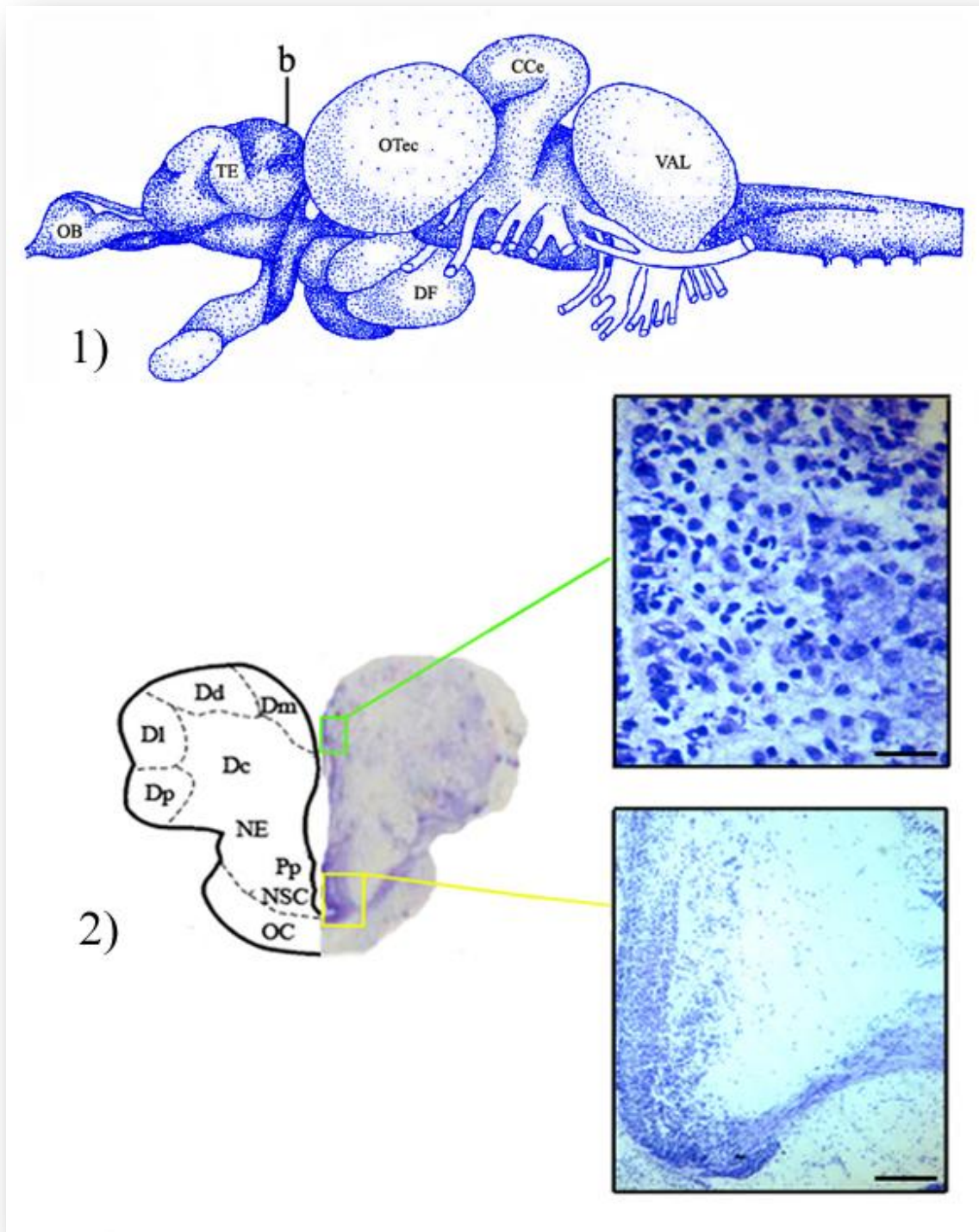


Fig. 3.6 Veduta laterale dell'encefalo di *Carassius auratus* (1) con piano di taglio (b) di una rappresentativa sezione trasversale effettuata a livello telencefalico posteriore. Sezione trasversale colorata con il metodo di Nissl (2): la metà sinistra rappresenta una schematizzazione dei principali gruppi cellulari. Abbreviazioni: Dc: divisione palliale centrale; Dd: parte dorsale dell'area dorsale telencefalica; Dl: parte laterale dell'area dorsale telencefalica; Dm: parte mediale dell'area dorsale telencefalica; Dp: parte posteriore dell'area dorsale telencefalica; NE: nucleo entopeduncolare; Pp= nucleo preottico parvocellulare, NSC= nucleo sovra-chiasmatico; OC= chiasma ottico. In verde particolare di Dm; in giallo di NSC. Scale bar: in verde 63 μ m; in giallo 20 μ m.

Nei mammiferi è stata suggerita l'esistenza di differenti sistemi preposti all'apprendimento, localizzati a livello telencefalico e che comprendono aree quali l'ippocampo e l'amigdala (Portavella and Vargas, 2005). In particolare, è stato osservato che mentre l'ippocampo presiede l'apprendimento spaziale, relazionale e/o contestuale (Burgess *et al.*, 1999; Eichenbaum *et al.*, 1999; Jeffery *et al.*, 2004), l'amigdala è invece responsabile dell'apprendimento delle emozioni (LeDoux, 1995; Gallagher & Chiba, 1996).

Per quanto riguarda i vertebrati non-mammiferi, dagli studi condotti sugli uccelli e sui rettili, è stato possibile evidenziare che sia l'amigdala che l'ippocampo presentano delle omologie strutturali in tutti i vertebrati terrestri studiati, suggerendo così anche una conservazione funzionale di tali regioni encefaliche (Sherry e Duff, 1996; Bingman *et al.*, 1998; Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Lòpez *et al.*, 2001). Nei vertebrati acquatici, come i teleostei, analizzando le alterazioni comportamentali in seguito alla lesione di diverse aree telencefaliche è stato possibile osservare che i danni a livello telencefalico alterano i comportamenti aggressivi e riproduttivi (Portavella and Vargas, 2005), così come i vari tipi di apprendimento, come le attività bidirezionali e l'apprendimento spaziale (Lòpez *et al.*, 2000a,b; Salas *et al.*, 1996a, b; Portavella *et al.*, 2003). Tali alterazioni comportamentali non si sono riscontrate quando le lesioni erano a carico di altre regioni encefaliche (Portavella and Vargas, 2005), confermando il ruolo cruciale del telencefalo nell'instaurazione di queste attività comportamentali.

Date le diverse modalità di sviluppo embrionale tra i teleostei ed i mammiferi, in quanto nei primi si assiste ad un processo di eversione contrariamente all'evaginazione che caratterizza lo sviluppo dei mammiferi, è difficile stabilire con precisione l'omologia tra le zone palliali dei pesci e quelle dei mammiferi. Tuttavia, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che le aree palliali laterali e mediali dei pesci siano omologhe rispettivamente all'ippocampo ed all'amigdala dei vertebrati terrestri (Braford, 1995; Northcutt, 1995; Butler, 2000), suggerendo al contempo che già 400 milioni di anni fa l'antenato comune tra pesci e vertebrati terrestri presentasse le regioni che hanno portato al successivo sviluppo del sistema limbico dei vertebrati terrestri (Portavella e Vargas, 2005).

Diencefalo

Il diencefalo rappresenta un importante centro di mantenimento dell'equilibrio interno, è inoltre la sede del sistema gustativo, dell'integrazione delle informazioni visive e riproduttive ed è collegato a tutto il sistema endocrino. Le sue pareti danno, per evaginazione, le vescicole ottiche che sono all'origine della retina e, dal diencefalo origina anche il secondo nervo cefalico pari, il nervo ottico. Nei pesci il diencefalo sembra essere un importante centro di correlazione per i messaggi in entrata ed uscita relativi all'omeostasi interna, principalmente grazie all'azione di HTH sull'ipofisi e di conseguenza sul sistema endocrino. Il diencefalo è situato nella parte caudale del telencefalo, tra il telencefalo ed il mesencefalo, ed è suddiviso in sette importanti aree: AP, TH, l'epitalamo, HTH, TP, il sinencefalo e il pretetto. Il terzo ventricolo compare sulla linea mediana nella parte rostrale del diencefalo, mentre nella parte caudale si espande trasversalmente dividendosi e formando l'infundibolo e i recessi laterali (Wullimann *et al.*, 1996).

Area preottica. In AP sono raggruppati il nucleo preottico magnocellulare (PM), il quale si suddivide ulteriormente nel nucleo preottico magnocellulare con giganto-cellule (PMg) e nel nucleo preottico magnocellulare (PMm) con magno-cellule; il nucleo preottico parvocellulare (Pp) suddiviso in tre porzioni: il nucleo preottico parvocellulare anteriore (PPa), il nucleo preottico parvocellulare posteriore (PPp) e infine il nucleo preottico (NPO). Pp e PM sono allineati rostralmente lungo il terzo ventricolo, Pp centralmente e PM dorsalmente. In AP, il margine ventrale del terzo ventricolo è circondato da NSC (Wullimann *et al.*, 1996).

Talamo. TH è situato in posizione caudale rispetto all'epitalamo, ed è delimitato inferiormente da AP. TH si divide in DT e talamo ventrale (VT). DT emerge sotto la porzione caudale del nucleo abenulare ventrale (NHv) ed è formato da un nucleo anteriore e da altri due nuclei caudali: il nucleo talamico dorsale posteriore (NTdP) e il nucleo talamico centrale posteriore (NTcP). VT è formato da tre sottonuclei: il nucleo intermedio, il nucleo ventromediale talamico (NVM) e il nucleo ventrolaterale talamico (NVL). VT è localizzato ventralmente al DT e si estende caudalmente da esso. La parte rostrale di VT è localizzata direttamente sotto la parte rostrale di NHv. NTP si estende anche nella regione preglomerulare del diencefalo (Rink *et al.*, 1998; Fig. 3.7).

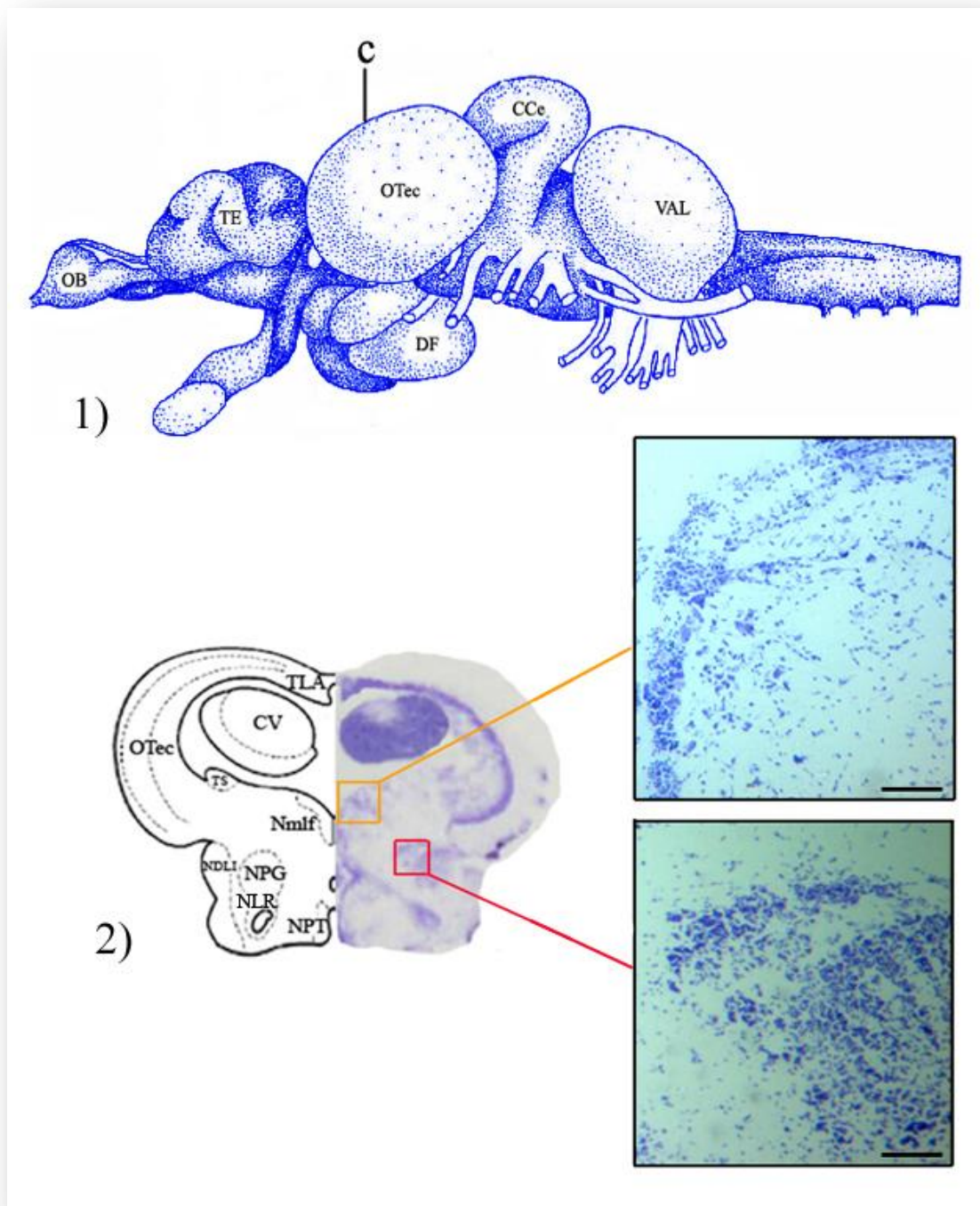


Fig.3.7 Veduta laterale dell'encefalo di *Carassius auratus* (1) con piano di taglio (c) di una rappresentativa sezione trasversale effettuata a livello diencefalico intermedio. Sezione trasversale colorata con il metodo di Nissl (2): la metà sinistra rappresenta una schematizzazione dei principali gruppi cellulari. Abbreviazioni: CV: valvola del cervelletto; NDLI: nucleo diffuso del lobo inferiore; Nmlf: nucleo del fascicolo mediale longitudinale; NPG: nuclei preglomerulari; NPT: nucleo tuberale posteriore; NLR: nucleo del recesso laterale; OTeC: tetto ottico; TLA: tori laterali; TS: tori semicircolari. In arancione particolare di Nmlf; in rosso di NPG. Scale bar: in arancione 40 μm ; in rosso 5 μm .

Epitalamo. L'epitalamo è formato dal nucleo abenulare (NH) a sua volta suddiviso in nucleo abenulare dorsale (NHd), NHv, dal sacco dorsale (SD) e dall'epifisi (o ghiandola pineale). I due NH hanno dimensioni simili e sono connessi tra di loro dalla HC. SD si proietta rostralmente e copre il ventricolo telencefalico ed il terzo ventricolo (Wullimann *et al.*, 1996).

Ipotalamo. Come in altri teleostei, l'HTH di *Carassius auratus* costituisce la più grande regione diencefalica, ed è costituito da una zona dorsale, una ventrale ed una caudale. Mentre la zona ventrale e caudale formano la maggior parte della porzione cerebrale mediale di HTH, la zona dorsale si espande lateralmente e comprende le coppie di lobi inferiori o (laterali) di HTH che sono separate dalla porzione tuberale di HTH attraverso un profondo solco ventrale. In ciascuna delle tre regioni ipotalamiche sono presenti agglomerati di cellule periventricolari primarie che sono fiancheggiate lateralmente da nuclei di cellule migrate. La zona ventrale ipotalamica insieme al nucleo periventricolare costituiscono la zona rostrale di HTH, mentre lateralmente ad essa si trovano il nucleo anteriore tuberale (NAT) e il nucleo ipotalamico laterale. La porzione mediale di HTH è formata dal nucleo tuberale laterale (NLT), da NAT, dal nucleo del recesso posteriore (NRP) e dal nucleo del sacco vascoloso (NSV). NLT costituisce la parte più rostrale dell'HTH e comprende quattro sottonuclei: la parte anteriore del nucleo tuberale laterale (NLTa), la parte inferiore del nucleo tuberale laterale (NLTi), la parte laterale del nucleo tuberale laterale (NLTl) ed infine la parte posteriore del nucleo tuberale laterale (NLTp). Il lobo ipotalamico inferiore riceve afferenze supplementari dalla zona mediale dell'area telencefalica dorsale, così come da NSC, dal pretetto posteriore, da NTcP, dal nucleo pregglomerulare caudale, dai due nuclei segmentali e dal corpo mammillare (CM) e scarsamente anche dalla valvola cerebellare, rappresentando così un centro multisensoriale di informazione. Il lobo inferiore comprende il nucleo anteriore dell'ipotalamo (NAH), il nucleo diffuso del lobo inferiore (NDLI), il nucleo del recesso laterale (NLR) ed il nucleo cerebellare dell'ipotalamo (NCH). Più caudalmente, la zona ipotalamica dorsale forma una coppia di recessi ventricolari laterocaudali. Accanto a tali nuclei, si trovano altri due nuclei derivati presumibilmente dalla migrazione delle cellule periventricolari: il nucleo diffuso, costituito da cellule di piccole dimensioni, e centrale, formato da cellule di maggiori dimensioni del lobo ipotalamico inferiore.

Il prolungamento caudale del lobo inferiore giace centralmente al tegmento e comprende nella sua zona dorsomediale il CM, nuclei che molto probabilmente sono parte di TP. La zona ipotalamica caudale inizia rostralmente con il nucleo sottile periventricolare situato ventralmente al nucleo tuberale posteriore (NPT) di TP. Più caudalmente, l'HTH caudale consiste in una coppia di recessi posteroventricolari circondati da nuclei periventricolari. La ghiandola pituitaria è connessa ventralmente alle zone ipotalamiche ventrali e caudali (Wullimann *et al.*, 1996). In posizione

ventromediale di HTH si trova il sacco vascoloso (SV) che a livello caudale assume una posizione dorsale rispetto a HTH. Da un punto di vista funzionale i lobi inferiori rappresentano un importante centro di integrazione multisensoriale; ad essi pervengono informazioni provenienti dal nucleo gustativo secondario, dal nucleo pretettale posteriore, da NSC, dal tegmento e dalla zona centrale dell'area dorsale del telencefalo; e a sua volta tale regione invia proiezioni alla formazione reticolare della porzione rostrale del peduncolo cerebrale.

Tubercolo posteriore. Così come in altri teleostei, anche in *Carassius auratus* TP occupa una area encefalica molto vasta. TP è situato caudalmente a VT e si estende caudalmente al terzo ventricolo. La parte rostrale di TP è costituita dal nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp) e da NPT. TPp è localizzato ventralmente al nucleo centrale del talamo posteriore mentre l'organo paraventricolare (PVO) è localizzato ventralmente a NPT. Il complesso preglomerulare, localizzato in questa regione encefalica, è stato identificato solo nei teleostei ed in un unico pesce a pinne raggiate non teleosteo, lo storione (*Acipenser sturio*; Rupp e Northcutt, 1998). I nuclei che si trovano in posizione più periferica del TP includono soprattutto i nuclei preglomerulari (NPG), classificati come: nucleo preglomerulare anteriore (NPGa), nucleo preglomerulare laterale (NPGl), nucleo preglomerulare mediale (NPGm), nucleo preglomerulare caudale (NPGc) e il nucleo gustativo terziario preglomerulare (pTGN). Ventrolateralmente al NPGc si trovano i CM. I nuclei supplementari che fanno parte di TP sono NTP, SG e i tori laterali (TLA). TLA come anche i lobi inferiori ipotalamici hanno delle afferenze ai nuclei gustativi terziari e a NTP, così come a HTH dorsale e alla formazione reticolare superiore. I TLA ricevono afferenze supplementari anche dal nucleo viscerale generale secondario e scarse afferenze dal nucleo tegmentale dorsale (DTL) (Rink *et al.*, 1998). Il principale nucleo di TLA è rappresentato dal nucleo diffuso dei tori laterali (NDTL). In posizione più caudale, tra pTGN e TLA si forma NTP (Yamamoto e Ito, 2005). L'area periventricolare del TP include sia TPp che PVO.

Sinencefalo. Il sinencefalo comprende una serie di strutture localizzate tra il diencefalo dorsale ed il mesencefalo, e più nelle vicinanze della commissura posteriore (PC) e includono Nmlf, il pretetto periventricolare, il nucleo paracommissurale (PCN) e l'organo subcommissurale (SCO). Secondo il modello neuomerico di Puelles e Rubenstein (1993), il sinencefalo è il prosomero più caudale e origina tutti i nuclei del pretetto.

Pretetto. Il pretetto è una delle regioni più variabili del cervello nei teleostei (Wullimann *et al.*, 1996). Tale regione comprende: un pretetto periventricolare, un pretetto centrale e un pretetto superficiale. Nei teleostei, il nucleo corticale come quello glomeruloso sono assenti. Il pretetto superficiale è incluso nel tratto ottico (OT) e comprende i nuclei parvocellulare (PSp) e magnocellulare (PSm). Il PSm caudalmente è contiguo al nucleo posteriore del pretetto (PO), le cui

cellule sembrano essere leggermente meno grandi e meno ordinate intorno al neuropilo centrale, se paragonate con quelle di PSm. Il nucleo centrale del pretetto (CPN) si trova in posizione dorsale rispetto a PSm e a PO, mentre il nucleo accessorio del pretetto sta dorsolateralmente al nucleo posteriore del pretetto. Accanto a tali strutture due ulteriori nuclei sono considerati, da alcuni Autori, parte del pretetto: il nucleo ottico accessorio dorsale, che è adiacente ventralmente a PSm e PO, ed il nucleo ottico accessorio ventrale localizzato più ventromedialmente. Tutti i nuclei del pretetto potrebbero derivare dal primo prosomero ed essere considerati parte del sinencefalo (Wullimann *et al.*, 1996). Un'altra ipotesi è che i nuclei superficiali del pretetto potrebbero essere omologhi al *griseum tectale* degli uccelli (Marian e Puelles, 1994), in questo caso i nuclei superficiali del pretetto sarebbero derivati dalle vescicole mesencefaliche (mesomeri) e non dal primo prosomero (Wullimann *et al.*, 1996).

Partendo dal telencefalo, entrambi i fasci sia quello mediale che quello laterale si estendono fino ad arrivare al diencefalo, il laterale arriva all'area glomerulare mentre il mediale arriva a NPT. Ventralmente alla regione anteriore preottica, il nervo ottico interagisce con OC e raggiunge il lato controlaterale del cervello. Oltre OC, le fibre ottiche sono denominate anche OT, e si suddividono in tratto ottico ventromediale (VOT) e tratto ottico dorsomediale (DOT). Il DOT cammina dorsalmente lungo la superficie laterale della regione talamica posteriore preottica verso OTec, mentre il VOT scorre caudalmente lungo il contorno ventrale di OTec. Il pretetto si origina dal nucleo superficiale magnocellulare e si continua attraverso PO per terminare in CM. I fasci che originano da NH si proiettano attraverso il nucleo del fascicolo retroflesso, mentre le fibre che partono da HC camminano tra i due NHd. Subito caudalmente a OC si trova la grande commissura post-ottica. Le commissure secondarie e trasversali sono incluse in questa commissura post-ottica. Ventralmente alla commissura post-ottica, la commissura orizzontale (HOC) attraversa la linea centrale all'interno della zona ipotalamica ventrale. I tratti che formano la HOC scorrono caudalmente da ogni lato del cervello, ventralmente all'area preglomerulare, dove girano prima dorsalmente e poi rostralmente verso la punta anteriore del talamo del OTec. Una terza commissura diencefalica si trova caudalmente al NPT cioè la commissura del TP (Wullimann *et al.*, 1996).

Mesencefalo

Il mesencefalo di *Carassius auratus* è costituito da tre strutture principali: dorsalmente OTec (multisensoriale) e ventralmente il tegmento e i tori semicircolari.

Tetto ottico. OTec è sicuramente la struttura encefalica più complessa ed è costituito da strati cellulari concentrici che dall'esterno verso l'interno sono: lo strato marginale (SM), lo strato ottico (SO), lo strato fibroso grigio esterno (SFGS), lo strato grigio centrale (SGC), la cui metà superiore è rappresentata dallo strato plessiforme interno (Ipl), lo strato albino centrale (SAC) e lo strato periventricolare (SPV; Herrero *et al.*, 1999). Le cellule distribuite in SPV hanno un corpo cellulare piriforme e i dendriti apicali scendono verso lo SGC dove subiscono una deviazione della traiettoria. Le cellule presenti in SGC sono invece di tipo multipolare il cui soma ha una forma sferica. I due lobi ottici sono interconnessi da una commessura composta da due fasci di fibre assoniche (Herrero *et al.*, 1999). Le cellule di OTec che si proiettano attraverso il tratto discendente controlaterale verso le strutture più caudali del peduncolo encefalico inviano un numero limitato di assoni collaterali alle proiezioni tettotettali. Nei teleostei, al contrario di tutti gli altri vertebrati lo strato più superficiale del tetto non consiste nelle fibre della retina, ma questo strato superficiale consiste in assoni di cui i corpi cellulari sono localizzati a livello del toro longitudinale. L'ultimo strato cellulare è costituito da una coppia di eminenze longitudinali di cellule granulari attigue al tetto ed è localizzato a livello del ventricolo mediale del tetto (Wullimann *et al.*, 1996; Fig. 3.8).

Toro semicircolare. Il toro sensoriale semicircolare (TS) è il bersaglio mesencefalico del sistema ottavolaterale ascendente è sta all'apice del tegmento laterale da dove sporge fuori e si affaccia nel ventricolo del tetto. Nei ciprinidi, compreso *Carassius auratus* (Ma e Fay, 2002), il nucleo semicircolare centrale (TSc) è implicato con l'udito, mentre il nucleo semicircolare ventrolaterale (TSvl) è coinvolto nella mecano-recezione (McCormick e Hernandez, 1996). In tutti i teleostei TS riceve, in aggiunta alle informazioni provenienti dal sistema della linea laterale, anche proiezioni ascendenti auditive (Meek e Nieuwenhuys, 1998). TS rappresenta un centro di collegamento per almeno due o tre modalità sensoriali, in base al gruppo di teleostei considerato.

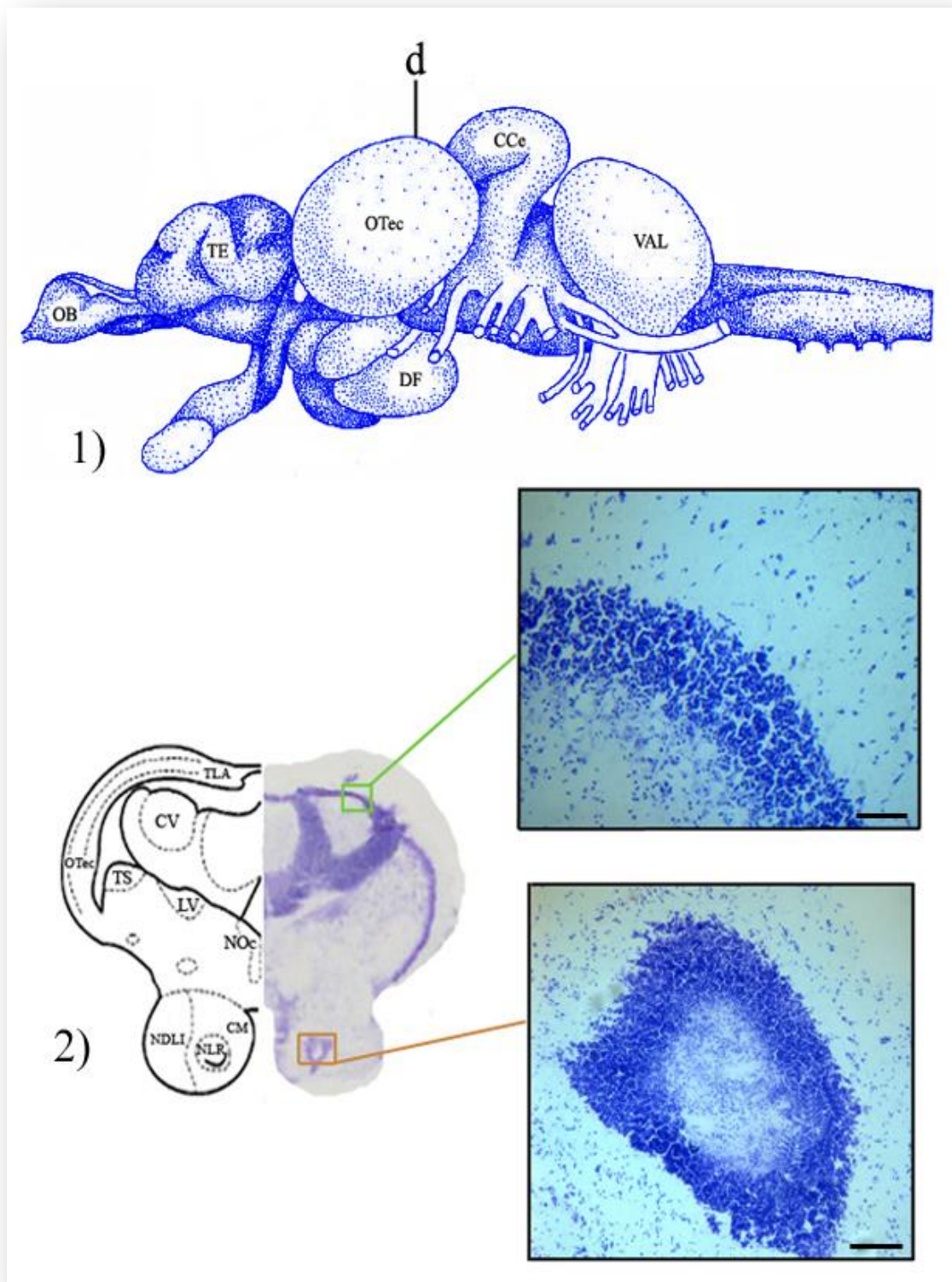


Fig. 3.8 Veduta laterale dell'encefalo di *Carassius auratus* (1) con piano di taglio (d) di una rappresentativa sezione trasversale effettuata a livello diencefalico posteriore. Sezione trasversale colorata con il metodo di Nissl (2): la metà sinistra rappresenta una schematizzazione dei principali gruppi cellulari. Abbreviazioni: CM: corpo mammillare; CV: valvola del cervelletto; LV: nucleo laterale della valvola del cervelletto; NDLI: nucleo diffuso del lobo inferiore; NOc: nucleo oculomotore; NLR: nucleo del recesso laterale; OTec: tetto ottico; TLA: tori laterali; TS: tori semicirculari. In verde particolare di CV-OTec; in marrone di NLR. Scale bar: 20 μ m.

Tegmento. Nei mammiferi, il tetto del mesencefalo è costituito dal collicolo superiore (OTec di altri vertebrati che fa parte del sistema visivo) e collicolo inferiore (toro semicircolare di altri vertebrati che fa parte del sistema uditivo). Il mesencefalo ventrale separato dal tetto, grazie al ventricolo, forma il tegmento che ha un ruolo predominante nelle funzioni motorie (Wullimann *et al.*, 1996). A differenza di OTec e del toro semicircolare, che sono connessi alle funzioni sensoriali e che derivano embriologicamente dalla lamina alare, il tegmento origina embriologicamente dalla lamina basale ed include molte strutture motorie, come i nervi dei nuclei oculomotore (NOc) e trocleare (N IV), il nucleo parasimpatico di Edinger-Westphal, il nucleo rosso e più rostralmente la formazione superiore reticolare. Esso da inoltre origine ai nuclei dorsali e rostrali tegmentali, al nucleo perilemniscale (PL), al nucleo del lemnisco laterale (NLL) e al nucleo interpeduncolare (NIn). Il nucleo rostrale tegmentale risulta omologo al nucleo laterale talamico dei mammiferi (Braford e Northcutt, 1983). Grover e Sharma (1981) hanno inoltre dimostrato sia che dal nucleo tegmentale rostrale ha origine una delle principali proiezioni verso OTec, sia che il nucleo del lemnisco laterale proietta verso il midollo spinale (Wullimann *et al.*, 1996). Mentre gli assoni del nervo oculomotore si dirigono ventralmente tra il tegmento e il lobo inferiore, il nucleo motorio trocleare manda i suoi assoni dorsalmente, questi dopo aver decussato nella valvola del cervelletto, girano caudolateralmente ed escono dal cervello come nervo trocleare tra il toro semicircolare e il romboencefalo. Il tegmento confina rostralmente con il sinencefalo, il talamo dorsale e il TP, ventralmente con HTH e dorsalateralmente con il toro semicircolare. Caudalmente il tegmento è contiguo al midollo allungato senza un limite morfologico ben definito; tuttavia, NIn e il nucleo trocleare sono spesso considerati come i nuclei che costituiscono l'estremità caudale del tegmento. Sebbene il *griseum* romboencefalico centrale, così come la formazione reticolare, si estenda rostralmente sopra tale livello, è stata dimostrata l'esistenza di un gradiente embrionale polarizzato che agisce sulla differenziazione delle strutture mesencefaliche del cervello di uccelli. Da ciò, il limite tra mesencefalo e romboencefalo viene da alcuni Autori spostato più rostralmente, a livello del confine tra il nucleo oculomotore e motorio trocleare e rostralmente al NIn (Marin e Puelles, 1994).

Romboencefalo

Tale struttura viene generalmente suddivisa in metencefalo che occupa la regione rostrale e mielencefalo che occupa la zona caudale. Tuttavia, i termini metencefalo e mielencefalo sono significativi solo se applicati ai mammiferi e agli uccelli. In quanto, in tali vertebrati il metencefalo sembra essere chiaramente separabile dal mielencefalo, come dimostra un largo cervelletto dorsale e il ponte ventrale, che consiste di neuroni di collegamento per le fibre corticali che vanno verso il cervelletto.

Cervelletto. Come in tutti i teleostei, il cervelletto di *Carassius auratus* è suddiviso in tre regioni: il lobo vestibololaterale, comprendente il lobo mediale caudale e una coppia di eminenze laterali granulari; il corpo del cervelletto (CCe) e la valvola del cervelletto, suddivisa in porzione mediale e laterale (Vam e Val, rispettivamente). La commissura cerebellare è localizzata all'interno della zona di confine tra la valvola e il corpo del cervelletto. Sebbene la valvola si estenda all'interno del ventricolo del tetto, la sua istologia (presenza di strato granulare e molecolare, più aggregazioni di grandi cellule del purkinje ed euridendroidi) ed il relativo collegamento caudale con la parte rostrale del midollo allungato fanno supporre che questa porzione sia a tutti gli effetti parte del cervelletto. Nonostante il lobo vestibololaterale e il corpo del cervelletto hanno omologie con gli altri vertebrati, la valvola del cervelletto è presente unicamente nei pesci (Fig. 3.9). La morfologia delle cellule euridendroidi è stata evidenziata in alcuni studi usando la tecnica del Golgi (Ikenaga *et al.*, 2005). Esse hanno un grande soma e dei lunghi prolungamenti dendritici che si estendono perpendicolarmente al piano trasversale di tale area. Le cellule euridendroidi del corpo cerebellare sono state classificate in tre tipi: fusiformi, poligonali e monopolari. Le cellule monopolari di *Carassius auratus* si distribuiscono esclusivamente nella parte ventrocaudale del corpo cerebellare. Murakami e Morita (1987) hanno classificato le cellule euridendroidi del cervelletto di *Sebastiscus marmoratus* in due diversi tipi A e B. Il tipo A si caratterizza per avere un dendrite primario, con una distribuzione limitata al lobo caudale. Le somiglianze morfologiche fra il tipo monopolare di *Carassius auratus* e i neuroni di tipo A di *Sebastiscus marmoratus* hanno suggerito che molto probabilmente i due tipi di neuroni corrispondono. Sia le cellule fusiformi che poligonali probabilmente corrispondono al tipo B delle cellule di *Sebastiscus marmoratus*. Generalmente, le cellule euridendroidi sono situate nello strato delle cellule di Purkinje (Ikenaga *et al.*, 2005), tuttavia, si è visto che le cellule euridendroidi si trovano anche negli strati delle cellule molecolari e dei granuli.

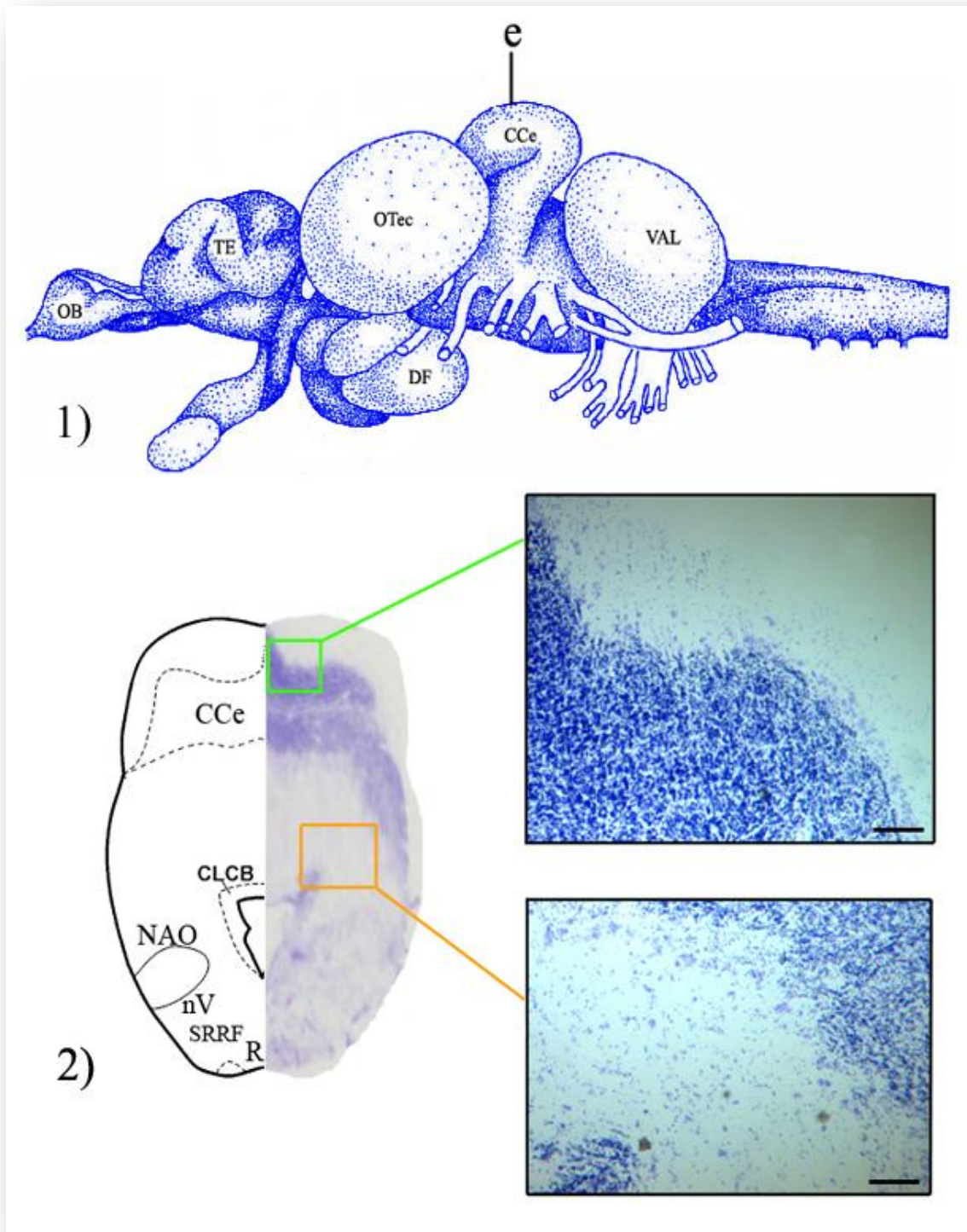


Fig. 3.9 Veduta laterale dell'encefalo di *Carassius auratus* (1) con piano di taglio (e) di una rappresentativa sezione trasversale effettuata a livello mesencefalico. Sezione trasversale colorata con il metodo di Nissl (2): la metà sinistra rappresenta una schematizzazione dei principali gruppi cellulari. Abbreviazioni: CCe: corpo cerebellare; CLCB: lobo caudale del corpo cerebellare; NAO: nucleo anteriore octavale; R: nucleo del raphe; SRRF: formazione reticolare superiore romboencefalica; nV: nucleo motorio trigeminale; In verde particolare di CCe e in arancione di CLCB-CCe. Scale bar: 5 μ m.

I loro dendriti si estendono per gran parte nello strato molecolare, in questo modo è possibile che queste cellule ricevano input dalle fibre parallele, come succede nello strato delle cellule del Purkinje. È stato, inoltre, dimostrato che le cellule euridendroidi dello strato dei granuli hanno caratteristiche simili a quelle trovate nello strato delle cellule di Purkinje. Poiché questi neuroni hanno espanso la loro zona dendritica nello strato delle cellule dei granuli, si pensa che potrebbero ricevere anche input differenti ed avere funzioni diverse dalle cellule euridendroidi distribuite negli strati molecolari e negli strati delle cellule di Purkinje. Nei tetrapodi, le cellule di Purkinje si proiettano dalla corteccia cerebellare ai nuclei cerebellari profondi e da qui i neuroni dei nuclei cerebellari profondi proiettano ad altre regioni del cervello (Altman e Bayer, 1997). Nel cervelletto dei teleostei, nessuna struttura corrisponde ai nuclei cerebellari profondi, le cellule del Purkinje si proiettano alle cellule euridendroidi che, a loro volta, si proiettano ad altre regioni del cervello (Meek e Nieuwenhuys, 1998). Nei teleostei, le attività delle cellule di Purkinje sono condivise con quelle delle cellule euridendroidi, rendendo difficile capire e associare le varie attività alle diverse cellule. Nei mammiferi, le cellule di Purkinje, le cellule stellate, le cellule dei canestri e le cellule del Golgi sono neuroni inibitori che utilizzano principalmente il GABA come trasmettitore neurale, mentre le cellule dei granuli sono neuroni eccitatori glutammatergici. I neuroni dei nuclei cerebellari profondi ricevono input GABAergici dalle cellule del Purkinje. Gli studi immunostochimici indicano che i nuclei cerebellari profondi contengono grandi neuroni che principalmente utilizzano l'aspartato come neurotrasmettitore, mentre i neuroni più piccoli usano il GABA o la glicina. Tuttavia, non ci sono molti studi circa i neurotrasmettitori utilizzati dalle cellule euridendroidi dei teleostei, anche se è stato dimostrato che anche in *Carassius auratus* le cellule stellate, di Golgi e di Purkinje sono di tipo GABAergico (Ikenaga *et al.*, 2005).

3.5 Modelli sperimentali

I pesci *Thalassoma pavo*, di peso 15-25 g e lunghezza 8-12 cm, sono stati prelevati dal mar Tirreno e trasportati nel laboratorio di Neuroanatomia Comparata e stabulati per un periodo di acclimatazione di una settimana in acquari marini della capacità di 150 L, ad una temperatura di 21-22°C ed a pH 8. Gli animali sono stati alimentati con trito di gamberetti somministrato a giorni alterni e per preservare il più possibile intatte le condizioni ambientali, gli acquari sono stati sottoposti a quotidiano ricambio dell'acqua e purificazione mediante filtraggio. Per ogni gruppo sperimentale gli animali sono stati acclimatati per un periodo di almeno una settimana.

Gli esemplari di *Carassius auratus*, acquistati presso un rivenditore locale specializzato, di peso 7-10 gr e lunghezza 6-8 cm, sono stati stabulati per un periodo di acclimatazione di una settimana in acquari d'acqua dolce dalla capacità di 150 L, ad una temperatura di 21-22°C ed a pH 8. Gli animali sono stati alimentati con Friskies multigran alimento completo per pesci rossi (NPPI, MN, Italy) più volte al giorno. Gli acquari sono stati sottoposti a quotidiano ricambio dell'acqua e purificazione mediante filtraggio.

Il mantenimento degli animali e tutte le procedure sperimentali sono stati condotti in accordo con le Linee-Guida per la Cura e l'Uso degli Animali da Laboratorio, secondo il Consiglio Direttivo della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Gli esperimenti sono stati effettuati cercando di ridurre al minimo la sofferenza e il numero dei campioni usati.

3.6 Trattamenti farmacologici

ORX-A

Gli esemplari di *Thalassoma pavo* sono stati trattati i.p. quotidianamente con ORX-A alle dosi di 1, 50, 100 e 150 ng/gr di peso corporeo (BW) per un periodo da 1 a 7 giorni. Per le successive analisi, sulla base dei risultati ottenuti dal *time-course* e dalla curva dose-risposta, il trattamento i.p. è stato effettuato quotidianamente con ORX-A 100 ng/gr di BW per un periodo di 4 giorni. Nel caso di *Carassius auratus*, durante lo screening preliminare, gli animali sono stati trattati i.p. con una singola dose di ORX-A 1, 5, 10, 50 e 100 ng/gr di BW. Nelle fasi successive dello studio gli animali hanno ricevuto una singola iniezioni i.p. con ORX-A 10 ng/gr di BW.

MUS

Durante lo screening preliminare gli animali sono stati trattati i.p. con MUS 0.05, 0.1, 0.5, 1 µg/gr di BW; nelle fasi successive, e per le indagini molecolari e neurodegenerative, gli effetti sono stati osservati dopo una singola iniezione di MUS 0.1 µg/gr di BW, in *Carassius auratus*, ed in seguito a 4 giorni di trattamento i.p. con MUS 0.1 µg/gr di BW, in *Thalassoma pavo*.

BIC

Durante lo screening preliminare gli animali sono stati trattati i.p. con BIC 0.5, 1, 2, 5 µg/gr di BW; nelle fasi successive, e per le indagini molecolari e neurodegenerative, gli effetti sono stati osservati dopo una singola iniezione di BIC 1 µg/gr di BW, in *Carassius auratus*, ed in seguito a 4 giorni di trattamento i.p. con BIC 1 µg/gr di BW, in *Thalassoma pavo*.

ZOL

Durante lo screening preliminare gli animali sono stati trattati i.p. con ZOL 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µg/gr di BW; nelle fasi successive, e per le indagini molecolari, gli effetti sono stati osservati dopo una singola iniezione di ZOL 1 µg/gr di BW in *Carassius auratus*.

DZP

Durante lo screening preliminare gli animali sono stati trattati i.p. con DZP 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µg/gr di BW; nelle fasi successive, e per le indagini molecolari, gli effetti sono stati osservati dopo una singola iniezione di DZP 5 µg/gr di BW in *Carassius auratus*.

FLU

Gli effetti sono stati osservati dopo una singola iniezione di FLU 4 µg/gr di BW in *Carassius auratus*.

3.7 Alterazioni delle condizioni fotoperiodiche ambientali

Gli animali, *Thalassoma pavo*, sono stati suddivisi in tre categorie sperimentali:

1. pesci mantenuti per l'intera durata del trattamento, 96 ore, in condizioni di fotoperiodo naturale (12h:12h);

2. pesci mantenuti per tutto il periodo di trattamento, 96 ore, ad un regime di fotoperiodo alterato di sola luce (light period; LP);
3. pesci mantenuti per tutta la durata del trattamento, 96 ore, in condizioni alterate di fotoperiodo caratterizzato da completo buio (dark period, DP).

Ciascuno di questi gruppi è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi, il primo dei quali è stato trattato quotidianamente con ORX-A 100 ng/gr di BW, mentre il secondo con soluzione salina (NaCl 0,9%).

Gli animali appartenenti a ciascuna delle sei categorie sperimentali sono stati stabulati in specifici acquari, i quali sono stati collocati in ambienti appositamente allestiti, al fine di garantire le condizioni di fotoperiodo necessarie all'impianto sperimentale.

3.8 Analisi comportamentale

Per la realizzazione dello studio comportamentale in *Thalassoma pavo*, sono state condotte quattro osservazioni giornaliere della durata di un'ora cadauna, distribuite lungo l'arco della giornata, per ciascuna categoria sperimentale, mediante utilizzo di videocamera (Panasonic NV-7; Tokio, Japan). Nel caso di *Carassius auratus*, durante la fase dello screening preliminare, per tutti i farmaci testati gli animali sono stati osservati per tutta la prima ora post-trattamento, e con successive osservazioni della durata di 15 min durante la seconda, la quarta, la sesta e la ventiquattresima ora post-trattamento, mediante utilizzo di videocamera (Kodak EasyShare Z1275; Rochester, NY, USA). Le immagini acquisite sono state successivamente digitalizzate ed elaborate con l'ausilio di uno specifico software comportamentale (Etholog 2.2.5), che ha permesso di classificare il comportamento degli animali osservati in apposite categorie comportamentali, nonché di misurare con elevata precisione temporale la quantità di tempo trascorsa da ogni animale in ciascuna categoria comportamentale (Ottoni, 2005). Le categorie comportamentali prese in esame per questo studio riflettono il disegno sperimentale che ci si è proposti di realizzare in questo lavoro e sono state così classificate:

➤ *Nuoto (Free Swimming, FS)*: l'animale si presenta attivo nuotando all'interno dell'acquario e mostrando un atteggiamento esplorativo nello spazio a sua disposizione;

➤ *Stato di inattività (Rest, R)*: l'animale è quasi completamente immobile, salvo qualche lieve e momentaneo spostamento corporeo, tende ad adagiarsi sul fondo e ad appoggiarsi alle pareti laterali dell'acquario;

➤ *Comportamento alimentare ed esplorativo (Swimming towards food, STF)*: l'animale nuota in direzione della superficie o del fondo dell'acquario manifestando il tipico atteggiamento esplorativo e di ricerca e cattura del cibo.

➤ *Quantità di cibo ingerita dall'animale*: la quantità di cibo somministrata agli animali all'inizio di ogni sessione di osservazione è stata pesata su una bilancia analitica, ed il cibo non consumato alla fine della stessa sessione accuratamente rimosso dall'acquario e pesato.

3.8.1 T-maze test

L'utilizzo della metodica del T-maze ci ha consentito inoltre di analizzare le capacità di apprendimento e le capacità motivazionali di *Carassius auratus*, tramite l'analisi del condizionamento mediante l'associazione di un evento di "ricompensa" con stimoli positivi di natura spaziale e/o visiva, in maniera simile a quanto riportato per *Danio rerio* (Colwill *et al.*, 2005). In questo studio è stato utilizzato un apparato costituito da un *four-arm* T-maze (Fig) adattato per il nostro modello sperimentale e costituito da un compartimento di start (40 x 40 cm), da un lungo corridoio (40 x 20 cm) e da 3 bracci di uguale lunghezza (20 x 20 cm) (Fig. 3.10). Come ricompensa, in questo lavoro sperimentale è stata scelta la disponibilità di cibo, infatti solo gli animali che rispondevano positivamente al processo di condizionamento avevano accesso al cibo, che veniva localizzato solo in uno delle tre braccia dell'apparato. Per verificare la natura degli stimoli in grado di indurre un condizionamento efficace nel nostro modello sperimentale, gli animali sono stati sottoposti a diversi stimoli associati a una ricompensa alimentare. Per questa fase dello studio, gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali così classificati:

- a) Animali condizionati in assenza di stimoli visivi con il cibo localizzato nel braccio destro o sinistro dell'apparato;
- b) Animali in cui il braccio dell'apparato associato alla ricompensa alimentare era distinto dalla presenza di un faretto bianco che lo illuminava;
- c) Animali le cui braccia del maze erano illuminate con faretto di diverso colore (rosso/blu) e di cui solo 1 era associato alla presenza della ricompensa alimentare.

La scelta di quale braccio del maze da associare alla ricompensa alimentare era soggettiva per ogni animale e adottata in seguito ad uno *screening* comportamentale in cui veniva verificata la preferenza di ciascuno animale, in seguito al quale il cibo veniva associato al braccio/stimolo di non preferenza. Il protocollo sperimentale per tale paradigma comportamentale prevedeva:

- 1) Una sessione di pre-training, in assenza di ogni stimolo, in cui i pesci erano lasciati liberi di muoversi nell'apparato per 10 min.

- 2) Pre-test: gli animali venivano monitorati per 10 min nei quali veniva misurato tempo impiegato per raggiungere il braccio associato alla ricompensa alimentare (tempo di latenza), prima del condizionamento.
- 3) Training: 7 sessioni consecutive di 10 min cadauna in cui gli animali venivano condizionati ad associare 1 braccio del maze contraddistinto da stimolo spaziale o visivo con un rinforzo positivo fornito dalla presenza di cibo.
- 4) Test: in cui gli animali venivano monitorati per 10 min e le performance misurate come tempo di latenza.

Durante le sessioni di training e la sessione di trattamento gli animali erano posizionati nel compartimento di start che per un minuto veniva tenuto bloccato mediante l'utilizzo di una porta mobile che isolava il resto del *four-arms* T-maze, trascorso il quale la porta mobile del compartimento di start veniva rimossa e il pesce aveva libero accesso all'intero apparato per 10 minuti in modo da poter raggiungere il braccio del maze associato allo stimolo condizionante e consumare la ricompensa alimentare ad esso associata. Durante tale tempo gli animali venivano monitorati al fine di verificare il tempo impiegato a raggiungere e consumare la ricompensa alimentare e quindi la forza del condizionamento operato.

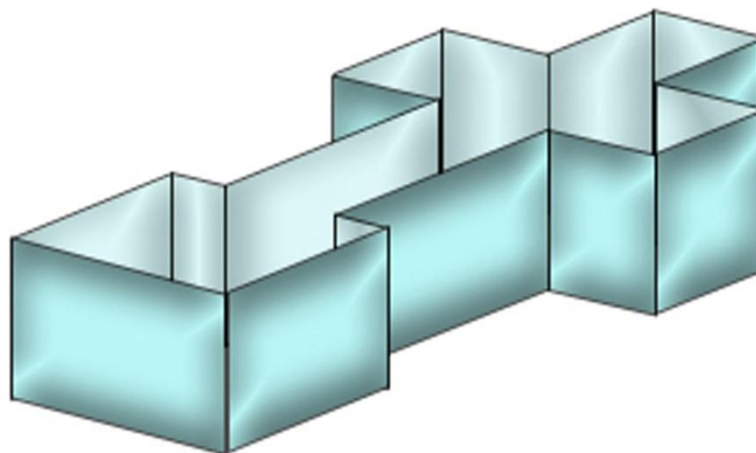


Fig. 3.10 *Figura rappresentativa del four-arm T-maze.*

3.8.2 *Conditioned Place Preference (CPP)*

Il CPP è considerato un valido paradigma sperimentale per analizzare gli effetti dei differenti trattamenti farmacologici sui processi di ricompensa indotti dal cibo o dalle droghe di abuso non solo nei mammiferi (Tzschentke, 1998; Tzschentke, 2007), ma anche nei teleostei (Ninkovic e Bally-Cuif, 2006). Tale paradigma si basa sull'analisi degli effetti dei diversi trattamenti farmacologici sull'induzione di un processo di condizionamento, volto ad associare un evento di ricompensa/avversione ad una specifica sezione dell'apparato. L'apparato, nel nostro caso era costituito da un acquario di 150 L, suddiviso da 2 setti di plexiglas trasparenti, inseriti verticalmente, in tre sezioni di uguali dimensioni, di cui una centrale (start) e le due laterali contraddistinte illuminate da faretti di colore diverso (rosso/blu). Tutte le camere dell'apparato erano tra loro comunicanti così da permettere il libero movimento degli animali (Fig. 3.11). La scelta delle fonti luminose colorate come stimoli discriminanti tra i diversi comparti dell'apparato, e come stimoli condizionanti/discriminati si è basata sui risultati ottenuti al T-maze test. Il protocollo sperimentale di tale paradigma prevede:

- 1) Una sessione di pre-training, in cui gli animali sono liberi di esplorare l'apparato, privo di qualsiasi stimolo luminoso della durata di 15 min.
- 2) Determinazione del PP: gli animali sono posti nel compartimento di start, e lasciati liberi di muoversi nell'apparato per 15 min, in cui sono già presenti gli stimoli luminosi, e durante i quali viene misurato il tempo speso dagli animali in ogni compartimento dell'apparato associato ad uno specifico stimolo luminoso, al fine di determinare in quale di questi comportamenti ogni animale trascorre la maggior parte del proprio tempo.
- 3) Condizionamento: gli animali sono trasferiti in un nuovo acquario, dove sono condizionati ad associare lo stimolo visivo presente nel lato dell'apparato di non preferenza con la presenza di cibo, mediante l'attivazione di tale stimolo luminoso pochi secondi prima la somministrazione del cibo. Il segnale luminoso, specifico il comparto di preferenza degli animali veniva invece attivato casualmente lungo l'arco della giornata. Tale processo è stato ripetuto ad intervalli regolari per un totale di 8 sessione di condizionamento.
- 4) Test: gli animali sono nuovamente riportati nell'apparato, posti nel compartimento di start, e lasciati liberi di muoversi per 15 min in tutto l'apparato, in cui sono già presenti gli stimoli visivi. Durante questa fase viene misurato il tempo speso dagli animali in ogni compartimento dell'apparato, associato ad uno specifico stimolo luminoso, e l'efficacia del condizionamento espressa come % di cambio del PP (Δ PP).

Per ogni trattamento testato, sono stati utilizzati 2 sottogruppi sperimentali di cui il primo veniva trattato i.p. con il farmaco di interesse ed il secondo sottogruppo riceveva un'iniezione i.p. di NaCl 0.9%, un'ora prima di ogni sessione di condizionamento.

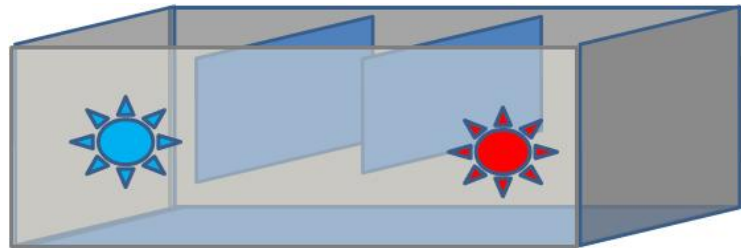


Fig. 3.11 Figura rappresentativa dell'apparato per l'analisi del CPP

3.9 Analisi statistica

Per l'analisi comportamentale sono stati utilizzati gruppi sperimentali di 6 esemplari per gruppo, e gli esperimenti ripetuti in duplicato. Per le analisi molecolari e neurodegenerative, sono stati utilizzati gli encefali di almeno 3 animali, e ogni lettura è stata eseguita all'analizzatore, in doppio, è stata ripetuta almeno 5 volte su ogni nucleo o area encefalica considerata. I dati ottenuti così ottenuti sono stati successivamente elaborati mediante l'utilizzo di opportuni test statistici quali l'analisi della varianza (ANOVA) e *post-hoc* test (Dunnett's test/ Newman-Keul's test/ Sheffe's test) al fine di garantire un'accurata caratterizzazione delle differenze significative osservate nelle diverse categorie sperimentali analizzate.

3.10 Analisi molecolare

3.10.1 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando il kit TRIreagent (Sigma). L'estrazione da TRIreagent si basa sul metodo classico di estrazione di RNA totale di Chomczynski e Sacchi (1987) che associa fenolo e guanidina isotiocianato 4M in una soluzione monofasica per facilitare l'inibizione immediata dell'attività RNAsica. Tale tecnica necessita della massima sterilità e del mantenimento di una temperatura ottimale alla quale vengono congelati gli encefali destinati a tale trattamento (-80 °C). Nella prima fase della procedura sperimentale sono stati prelevati encefali interi di *Carassius auratus* ed immediatamente conservati a -80°C. In seguito, i tessuti sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido e trasferiti in un'ependorf sterile. Stimato il peso dei campioni in esame, per ogni 100 mg di tessuto è stato aggiunto 1 ml del suddetto buffer di estrazione TRIreagent (fenolo e guanidina-isotiocianato 4M). Al tessuto omogeneizzato sono stati aggiunti per 1 ml, 0.2 ml di cloroformio e, successivamente, l'omogenato è stato centrifugato a 14.000 rpm (4°C) per 10 min. A seguito della centrifugazione i campioni presentano una tripla stratificazione nella quale è possibile distinguere una fase acquosa superiore, contenente RNA, una fase rossa inferiore (cloroformio-fenolo) contenente proteine ed una fase intermedia contenente DNA. La fase acquosa è stata quindi accuratamente prelevata e trasferita in un nuovo tubo dove è stato aggiunto 0.5 ml di isopropanolo per 1 ml di TRIreagent, consentendo in tal modo la precipitazione dell'RNA. In seguito, il campione è stato nuovamente centrifugato a 14.000 rpm (4°C) per 15 min ed al termine della centrifugazione è stato rimosso il sovrantante. Il pellet rimanente contenente RNA è stato lavato con etanolo 75% (1 ml di ETOH/ml di TRIreagent), asciugato al flusso per 30 min e disciolto in H₂O contenente dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che agisce sui residui di istidina, fondamentali per l'attività catalitica dell'RNAsi. L'RNA estratto è stato conservato a - 20°C.

3.10.2 Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

Per valutare l'integrità dell'RNA estratto, successivamente, è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa dello stesso attraverso l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop ND-3300 (*software*: ND-1000 v. 3.2.1) il quale, grazie all'efficienza del sistema di ritenzione consente di effettuare misurazioni entro un largo range di lunghezze d'onda usando quantità relativamente molto piccole (1-2 µl) di campione. Il *software* utilizzato per le misurazioni fornisce, accanto alla concentrazione in ng/µl del campione, anche informazioni circa la qualità dello stesso attraverso la valutazione dei parametri: OD_{260/280} ed OD_{260/230}. Valori di OD_{260/280} prossimi a 1,8 e di

OD_{260/230} compresi nell'intervallo 1.8-2.2 garantiscono circa la purezza del campione di RNA rispetto ad eventuali contaminazioni sia da DNA che da proteine.

3.10.3 L'estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando il kit TRIreagent (Sigma). L'estrazione da TRIreagent si basa sul metodo classico di estrazione di RNA totale di Chomczynski e Sacchi (1987) che associa fenolo e guanidina isotiocianato 4M in una soluzione monofasica per facilitare l'inibizione immediata dell'attività RNAsica. Tale tecnica necessita della massima sterilità e del mantenimento di una temperatura ottimale alla quale vengono congelati gli encefali destinati a tale trattamento (-80 °C). Nella prima fase della procedura sperimentale sono stati prelevati encefali interi di *Carassius auratus* ed immediatamente conservati a -80°C. In seguito, i tessuti sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido e trasferiti in un'ependorf sterile. Stimato il peso dei campioni in esame, per ogni 100 mg di tessuto è stato aggiunto 1 ml del suddetto buffer di estrazione TRIreagent (fenolo e guanidina-isotiocianato 4M). Al tessuto omogeneizzato sono stati aggiunti per 1 ml, 0.2 ml di cloroformio e, successivamente, l'omogenato è stato centrifugato a 14.000 rpm (4°C) per 10 min. A seguito della centrifugazione i campioni presentano una tripla stratificazione nella quale è possibile distinguere una fase acquosa superiore, contenente RNA, una fase rossa inferiore (cloroformio-fenolo) contenente proteine ed una fase intermedia contenente DNA. La fase acquosa è stata quindi accuratamente prelevata e trasferita in un nuovo tubo dove è stato aggiunto 0.5 ml di isopropanolo per 1 ml di TRIreagent, consentendo in tal modo la precipitazione dell'RNA. In seguito, il campione è stato nuovamente centrifugato a 14.000 rpm (4°C) per 15 min ed al termine della centrifugazione è stato rimosso il sovrantante. Il pellet rimanente contenente RNA è stato lavato con etanolo 75% (1 ml di ETOH/ml di TRIreagent), asciugato al flusso per 30 min e disciolto in H₂O contenente dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che agisce sui residui di istidina, fondamentali per l'attività catalitica dell'RNAsi. L'RNA estratto è stato conservato a -20°C.

3.10.4 Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

Per valutare l'integrità dell'RNA estratto, successivamente, è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa dello stesso attraverso l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop ND-3300 (*software*: ND-1000 v. 3.2.1) il quale, grazie all'efficienza del sistema di ritenzione consente di effettuare misurazioni entro un largo range di lunghezze d'onda usando quantità relativamente molto piccole (1-2 µl) di campione. Il *software* utilizzato per le misurazioni fornisce, accanto alla concentrazione in ng/µl del campione, anche informazioni circa la qualità dello stesso attraverso la valutazione dei parametri: OD_{260/280} ed OD_{260/230}. Valori di OD_{260/280} prossimi a 1,8 e di OD_{260/230}

compresi nell'intervallo 1.8-2.2 garantiscono circa la purezza del campione di RNA rispetto ad eventuali contaminazioni sia da DNA che da proteine.

3.10.5 Trascrizione inversa (RT-PCR)

La trascrizione inversa (RT) è una tecnica che permette di ottenere una doppia elica di DNA (cDNA) da uno stampo di mRNA per azione dell'enzima trascrittasi inversa. Per la reazione di trascrizione inversa occorre utilizzare 10 µg di RNA totale, 20 U di trascrittasi inversa, i quattro desossiribonucleotidi, un particolare innesco ed un apposito tampone di reazione (contenente MgCl₂), il tutto in un volume finale di 20 µl. L'innesco (*primer*) è costituito da un oligo dT (deossitimina) in grado di appaiarsi, per complementarietà delle basi, all'estremità 3' della molecola di mRNA da trascrivere, caratterizzata in tutti gli eucarioti da una coda di poliA, in modo da dare inizio alla sintesi in direzione 5'-3' della nuova molecola di DNA. L'enzima trascrittasi inversa più comunemente utilizzato è quello del virus della leucemia murina di Moonley (MuLV-RT), che catalizza la reazione portando alla formazione di un temporaneo *eteroduplex* mRNA-cDNA. L'mRNA viene successivamente allontanato mediante l'utilizzo di una RNasi H che digerisce in modo specifico l'RNA legato al DNA nell'ibrido mRNA-DNA, oppure sottoponendo l'RNA a trattamento alcalino al fine di ottenere un singolo filamento di cDNA. Per la reazione di RT è stato utilizzato il Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). Sono stati prelevati 10 µl di RNA totale estratto dall'encefalo di *Carassius auratus* e sono stati aggiunti 0,8 µl di dNTP Mix 25X (100 nM), 2 µl di RT Random Primers, 1 µl di RNase inhibitor ed acqua nuclease-free, fino a raggiungere un volume di 20 µl per ciascun campione. La miscela è stata a questo punto posta nel termociclatore PTC 100 (CELBIO) per il primo step a 25°C per 10 minuti, il secondo step a 37°C per 120 minuti e infine l'ultimo step a 85°C per 5 sec. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C ed un'aliquota è stata prelevata e fatta correre su gel d'agarosio all'1,5% al fine di valutarne la concentrazione.

3.10.6 La reazione a catena della DNA polimerasi

La reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) è una tecnica efficace che permette di amplificare *in vitro* grandi quantità di una determinata sequenza di DNA a partire da piccole quantità di uno specifico stampo. I requisiti essenziali della PCR sono due inneschi oligonucleotidici di sintesi (*primers*) complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza del DNA bersaglio e che, dopo l'ibridazione con il DNA stampo, abbiano le proprie estremità ossidriliche 3' orientate l'una verso l'altra; una sequenza bersaglio nel

campione di DNA che si collochi tra l'uno e l'altro innesco; i quattro desossiribonucleotidi ed infine una DNA polimerasi termostabile capace di resistere a 95°C. La tipica reazione di PCR consiste nella ripetizione di un certo numero di cicli, ognuno dei quali si suddivide in tre fasi: una fase di denaturazione generalmente a 94°C per separare le due eliche di DNA, una fase di ibridazione (*annealing*) dei *primers* alla sequenza bersaglio ed una fase di sintesi detta anche estensione del DNA. In condizioni saline opportune ed in presenza di appropriate concentrazioni di deossinucleotidi trifosfati, la DNA polimerasi catalizza, a temperature nuovamente elevate, la sintesi di nuove molecole corrispondenti alle sequenze al 3' rispetto agli inneschi e ad ogni ciclo i frammenti neosintetizzati servono a loro volta da stampo per la sintesi di nuove molecole. Dopo pochi cicli di amplificazione il prodotto predominante è un frammento di DNA di lunghezza corrispondente alla distanza tra i due oligonucleotidi di innesco. Ogni ciclo raddoppia la quantità di DNA sintetizzato nel ciclo precedente, permettendo di ottenere in 30 cicli 105-106 volte la sequenza bersaglio. Un maggior numero di cicli non aumenta, tuttavia, la quantità di prodotto finale in quanto si raggiunge un *plateau* con amplificazione sempre meno efficiente. La DNA polimerasi generalmente utilizzata è la *Taq polimerasi*, un enzima del batterio *Thermophilus aquaticus* che risulta essere stabile ad alte temperature e che, dunque, può essere sottoposto a ripetuti cicli di denaturazione senza perdere la propria attività. L'azione della *Taq polimerasi* dipende dalla concentrazione di ioni magnesio (Mg²⁺) che ne potenziano la reattività, per cui occorre evitare elevate concentrazioni di questo ione che possono determinare l'amplificazione di frammenti aspecifici. La scelta dei *primers* da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR. Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza d'interesse, tralasciando le sequenze aspecifiche. I *primers* devono pertanto possedere requisiti specifici quali la lunghezza, che non deve essere superiore ai 25 nucleotidi per sequenze bersaglio di DNA appartenenti a genomi complessi (al fine di diminuire la probabilità di appaiamento con regioni che presentano una sequenza simile ma non di interesse) e non deve essere inferiore ai 16 nucleotidi (al fine di non pregiudicare la specificità del processo). I *primers* non devono contenere sequenze tra loro complementari oppure sequenze ripetute, invertite, per evitare che si formino aggregati di *primers* (detti dimeri) o strutture a forcina che riducano l'efficienza dell'amplificazione ed il contenuto in GC dei *primers* deve essere compreso tra il 50-60% per dare maggiore stabilità. Un altro importante parametro da tenere in considerazione è la temperatura di *melting* (T_m; valore di temperatura cui il DNA è parzialmente svolto) che deve essere simile per la coppia di *primers*.

In questo lavoro sperimentale si è voluto verificare la presenza dei sottotipi recettoriali per le ORXs e la presenza del peptide precursore PPORX nei teleostei *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*. Per la caratterizzazione delle PPORX, è stata utilizzata una coppia di primers per il gene di tale

neuropeptide utilizzati in un precedente lavoro sui teleostei (Miura *et al.*, 2007; Nakamachi *et al.*, 2006). Le sequenze nucleotidiche di queste coppie di *primers* sono le seguenti:

PPORX for: 5'- ACTGCACAGCCAAGAGAGTTCA- 3'

PPORX rev: 5'- GTTATTAAAGCGGCCGATATGC - 3'

Con un prodotto atteso di 188 bp.

Per la caratterizzazione molecolare di ORXR di *Thalassoma pavo* è stata utilizzata una coppia di *primers* degenerati costruiti su una regione conservata della sequenza completa del cds di ORX1R *Rattus norvegicus*, complementari alla regione compresa tra il residuo nucleotidico 485 e 504 per il *primer forward* (for), ed alla regione che comprende la regione tra il residuo in posizione 1213 a quello in posizione 1237 per il *primer reverse* (rev). Il prodotto di amplificazione atteso con l'utilizzo di tali *primers* è di 726 bp (fig. III.5); la sequenza dei *primers* degenerati è la seguente:

ORXR for:: 5' GTGGCTCCATCCTNGGNAT

ORXR rev: 5' GCTCAGAGACTTTGGANACNGAAC

Nel caso di *Carassius auratus* sono stati studiati, mediante specifici software (Primer Premier 5.0; Beacon Designer 8.0, Premierbiosoft), una coppia di *primers* costruita su regioni altamente conservate della sequenza nucleotidica di ORX2R di *Rattus norvegicus* (*Gene bank*; *accession number*: [NM_013074](#)), complementari ai residui nucleotidici 336-360 per il primer forward e 791-810 per il reverse, con un prodotto atteso di 473 bp. La sequenza nucleotidiche di tale coppia di *primers* è la seguente:

ORXR for: 5'- GTTGTTGACATCACNGARACNTG - 3'

ORXR rev: 5'- TGCGGYTGYTTCCAYTTT - 3'

Per ottimizzare la reazione di PCR sono state eseguite diverse prove in cui sono state ottimizzate sia la temperatura di annealing per ogni singola coppia di primers testata, sia il tempo di estensione in base alla lunghezza del prodotto di amplificazione atteso. In seguito a diversi tentativi per stabilire le condizioni ideali alla reazione, il programma di amplificazione è stato ottimizzato.

Per verificare che la reazione di amplificazione del frammento genico atteso sia avvenuta correttamente, un'aliquota del prodotto della PCR è stata sottoposta a corsa elettroforetica su un gel d'agarosio (2%), stimando in tal modo la purezza e la lunghezza del frammento atteso.

3.10.7 Purificazione del prodotto di PCR

Il frammento genico ottenuto dalla PCR deve essere sottoposto a purificazione prima di poter procedere con la reazione di sequenza. In tale fase è stato utilizzato il kit *Widard SV gel and PCR clean up system* che permette di estrarre e purificare frammenti di DNA della lunghezza compresa tra 100bp e 10kb da gel d'agarosio mediante l'azione di tris-acetato (TAE) o di tris-borato (TBE) o, in alternativa, di purificare prodotti di PCR direttamente rimuovendo in ambedue i casi l'eccesso di nucleotidi e di *primers*. Completata la corsa elettroforetica, la banda è stata prelevata dal gel, trasferita in un'*ependorf* e disciolta in presenza di guanidina isotiocianato (*membrane binding solution*), di cui se ne sono aggiunti 10 µl ogni 10 mg di gel d'agarosio, sciolta a 50°C. La miscela di gel disciolto è stata trasferita in una SV minicolonnina ed il campione è stato sottoposto a lavaggi successivi con una soluzione di *membrane wash solution*, precedentemente diluita con etanolo 95% per favorire la rimozione dei sali. Al termine di una serie di centrifugazioni, il DNA purificato è stato diluito in 50 µl di H₂O *nuclease-free* e conservato a -20°C. In seguito, è stato possibile effettuare anche la precipitazione di tale campione aggiungendo 1/10 di volume di sodio acetato (concentrazione finale 0.3M) e due volumi di etanolo 100% freddo. Dopo tre centrifugazioni consecutive, seguite ognuna dalla rimozione del sovrantante, in fase finale il pellet di DNA è stato risospeso in H₂O *nuclease-free* ed il prodotto ottenuto è stato spedito alla ditta BMR Genomics che ha provveduto al sequenziamento del campione in esame.

3.10.8 Analisi di ibridazione in situ

L'ibridazione *in situ* (ISH) è una tecnica biomolecolare che consiste nel legame tra una sonda di acido nucleico a sequenza nota (*probe*) e l'mRNA endogeno presente nel tessuto e codificante per la proteina di interesse, mediante formazione di nuovi legami idrogeno tra le basi complementari. Per la realizzazione di tale tecnica, dopo il prelievo gli encefali sono stati immediatamente congelamenti a -21°C e successivamente tagliati al criostato, e le sezioni (16 µm) poste su vetrini polilisinati sono conservate a -21°C. Per realizzare la fase di ibridazione vera e propria è necessario preliminarmente marcare la sonda oligonucleotidica mediante terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), un enzima che catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati all'estremità 3'OH libera del filamento. Per la reazione di marcatura è stata utilizzata la digossigenina (DIG), un aptene derivato

da un alcaloide vegetale e legato mediante un braccio spaziatore di 11 atomi di carbonio alla posizione C-5 del nucleotide uridina.

In questo lavoro sperimentale è stata utilizzata una sonda diretta verso la sequenza di mRNA codificante per PPORX e per ORXR di *Carassius auratus* e *Thalassoma pavo*; le sequenze *probe* sono state disegnate sulla base della complementarità al frammento genico di tale specie.

Le sequenze oligonucleotidiche usate come *probe* in questo studio sono le seguenti:

PPORX 5'-AGCAGCAGGTGGGCACGCCCTCCGCGTCCCGCGCCAGGTG-3'

Thalassoma pavo:

ORXR 5'-GGCCCGGGCTTGGGGGTCTGTACAGAGCCCCTGGTGCTGAGCCTC-3'

Carassius auratus:

ORXR 5'-AACATCAAAGGGTGACAAATGGCGTACCATCGGTCCAAGG-3'

Il legame tra il *probe* e la sequenza bersaglio è stato rilevato grazie al legame di un anticorpo (Ab) specifico anti-digossigenina coniugato alla fosfatasi alcalina opportunamente diluito (1:100). La fosfatasi alcalina coniugata all'Ab, in presenza di un opportuno substrato colorimetrico, fornito dai cromofori 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, 4 toluidina (BCIP, 4 toluidina) e Nitroblu tetrazolo cloruro (NBT), porta alla formazione un precipitato colorato stabile che si deposita nel sito di localizzazione dell'enzima.

Il protocollo sperimentale consta di una serie di step condotti tutti in condizioni RNAsi-free e per tale motivo sia le soluzioni che tutto il materiale da laboratorio sono stati autoclavati e sterilizzati prima dell'uso. Questa tecnica prevede le seguenti fasi:

- **Reazione di marcatura della sonda e Dot Blot** per tale reazione ad 1 µl di oligonucleotide 100 pmol sono stati aggiunti 4 µl di buffer TdT (potassio cacodilato 1M, Tris-HCl 125 mM pH 6.6), 4 µl di CoCl₂, 2µl di DIG 1 µl di TdT e acqua distillata, fino ad un volume di 20 µl. Successivamente, l'oligo è stato incubato per 30 min a 37°C e per bloccare la reazione sono stati aggiunti 2 µl di EDTA 0.2 M pH 8.0. Per verificare l'avvenuta reazione di marcatura della sonda è stato effettuato un Dot Blot mediante la membrana Hybond N+ (Amersham International). Tale membrana è stata imbibita in una capsula Petri con il buffer 1 (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5; NaCl 0.15 M) per 15 min agitando gentilmente e poi incubata con l'anticorpo anti-DIG per 30 min a 37°C e sottoposta a due lavaggi nel buffer 1 per 5 min. La pellicola è stata in seguito trasferita nel buffer 3 (tris-HCl 0.1 M pH 9.5; NaCl 0.1 m; MgCl₂ 0.05 M) per 2 min in una nuova capsula Petri nella quale sono stati posti i reagenti utili per

la rilevazione colorimetrica (BCIP e NBT). La piastra è stata lasciata al buio affinché si possa verificare un pieno sviluppo della colorazione, che consiste di un colore “rosa-violetto”.

- **Preparazione del tessuto:** l'encefalo prelevato dagli animali appartenenti alle diverse categorie sperimentali, è stato tagliato al criostato e le sezioni encefaliche trasversali dello spessore di 14 μm sono state montate su vetrini polilisinati per garantire una migliore adesione delle sezioni sul vetrino;
- **Preibridazione:** portati i vetrini a temperatura ambiente, sono stati lavati in SSC2X per 30 min e fissati in paraformaldeide 4% per 10 min allo scopo di preservare l'integrità del tessuto; sono stati sottoposti a tre lavaggi in PBS 1X (contenente NaCl 1,3 M, NaH_2PO_4 70 mM e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 mM), quindi immersi in una soluzione di acetilazione con trietanolamina 0,1 M (pH 8) ed anidride acetica 0,25% per 10 min e disidratate con passaggi di 30 sec in etanolo a diverse concentrazioni (30, 60, 70, 80, 95 e 100%). Infine, i vetrini sono stati ricoperti con 300 μl di buffer di preibridazione (formammide deionizzata, SSC5X, destrano solfato e DDT 50 mM in un rapporto 1:50) per 2 h a 50°C.
- **Ibridazione:** le sezioni sono incubate con il buffer di ibridazione (100 μl) in camera umida *overnight* a 50°C, diluendo il probe nel buffer di preibridazione (2.5 μl di oligo/50 μl di buffer).
- **Postibridazione:** trascorso il periodo di incubazione *overnight* è stato effettuato un primo lavaggio in SSC2X per 1 h a 50°C in continua agitazione e poi due passaggi in NTE1X (contenente Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, NaCl 2.5 M) per 5 min a 37°C, seguiti dalla fase di bloccaggio che consiste nell'immersione dei vetrini per 50 min in una soluzione di Blocking Reagent 0.5% sciolto in Tris-HCl 100 mM pH 7.5 e NaCl 50mM, al fine di prevenire la fase un elevato effetto di background.
- **Rilevazione immunologia:** dopo due lavaggi in buffer 1 per 2 min a temperatura ambiente i vetrini sono stati ricoperti con 200 μl di buffer 1 in cui sono diluiti BSA 1% + 0.3% Triton X100. Successivamente i vetrini sono stati incubati per 2 h con l'anticorpo anti-DIG coniugato alla fosfatasi alcalina (1:100) diluito nello stesso buffer e quindi sottoposti a tre lavaggi di 15 min in buffer 1 ed un lavaggio di 2 min in buffer 3 (Tris-HCl 100mM pH 9.5, NaCl 100mM). Le sezioni sono state così incubate per 72 h al buio con una soluzione contenente un substrato specifico per la fosfatasi alcalina, vale a dire il colorante BCIP\NBT (1:1.3) diluito in buffer 3. Al termine di tale periodo di incubazione, la reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in una soluzione di buffer 4 (Tris-HCl 100mM pH 8.5, EDTA

1 mM) per 15 min. A questo punto, è stato possibile osservare la reazione immunologica al microscopio Dialux EB 20 (Leitz) con obiettivo a contrasto di fase 16X. Al fine di determinare l'esistenza di variazioni significative nell'espressione genica dei trattati rispetto ai ctrl, è stata condotta un'analisi quantitativa dei valori di densità ottica (OD) mediante analizzatore di immagine (Scion-Image 2.0).

3.10.9 Amino cupric silver stain (ACS)

Per verificare un eventuale associazione tra le anomalie comportamentali e la presenza di danno neuronale è stata eseguita la colorazione istologica *amino cupric silver stain* (ACS), una tecnica di colorazione in grado di mettere in evidenza la degenerazione neuronale, grazie alla capacità dei sali d'argento di reagire con i neuroni degenerati, depositandosi in essi e venendo ridotti ad argento metallico. Per la realizzazione di tale colorazione, dopo il prelievo gli encefali di *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus* sono stati immediatamente congelamenti a -21°C e successivamente tagliate al criostato, le sezioni tagliate al criostato a 30 μ m vengono conservate in frigo a 4°C e dopo 1-3 mesi sono stati colorati mediante l'ACS. Il procedimento sperimentale è stato realizzato mediante i seguenti passaggi sperimentali:

- **Preimpregnazione:** le sezioni sono state trattate con la soluzione P (nitrato d'argento, acqua distillata, dl-alanina, nitrato di rame 0,5%, nitrato di cadmio 0,5%, nitrato di lantanio 0,5%, rosso neutro 0,5%, piridina, trietanolammina, isopropanolo) e poste ad incubare a 50°C per 50 min e successivamente raffreddate a temperatura ambiente per 2-3 ore;
- **Impregnazione:** le sezioni sono state risciacquate in acetone per 30 secondi ed immerse nella soluzione I (nitrato d'argento, acqua distillata, etanolo 100%, acetone, idrossido di litio 0,4%, idrossido d'ammonio) per 45 min;
- **Riduzione:** le sezioni sono state trasferite in 200 ml di soluzione R (formalina 10%, acido citrico monoidrato 1%, etanolo 100%, acqua distillata) e incubate a 32°C per 25 min; agitati per i primi 2 min; dopo i primi 5 minuti è stata aggiunta ad intervalli di 5 min e per 4 volte 0,3 ml per volta della soluzione I. Trasferite in acqua distillata per 1,5 min e poi in acido acetico 0,5% per 1,5 min. Sciacquate in acqua per 1 ora con 2 passaggi di cui il primo di 15 min e conservate in acqua distillata *overnight*;
- **Chiarificazione:** le sezioni sono state ricoperte con la soluzione C1 (ferrocianuro di potassio 6%, clorato di potassio 4%, acido lattico) per 90 secondi a temperatura ambiente; sciacquate in acqua distillata e ricoperte per 90 secondi in soluzione C2 (permanganato di potassio 0,06%, acido solforico 6%) e trasferite in acqua distillata (2 cambi) per 3 min a temperatura ambiente;

- **Stabilizzazione:** le sezioni sono state trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2%, agitate per 2 min e risciacquate in acqua distillata per 3 min; trasferite in *Rapid Fixer* (Kodak) per 4 min; sciacquate in acqua distillata; immerse per 20 min in rosso neutro 0.5% (*Thermo Electron Corporation, Milan, Italy*); sciacquate 2 volte in acqua distillata e passate per 20 secondi in alcool 50%, 70%, 95%, 100%; e differenziate in alcool-xylene (1:1) e 2 volte in xylene puro.

3.11 Analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Per verificare la presenza di alterazioni ultrastrutturali nell'encefalo di *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*, gli encefali dopo il prelievo dalla scatola cranica, è stato suddiviso, in senso antero-posteriore e destro-sinistro nelle diverse porzioni perfettamente simmetriche, dalle dimensioni idonee al trattamento per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). I suddetti campioni sono stati trattati, seguendo un protocollo sperimentale opportuno, che prevede le seguenti fasi:

• Fissazione aldeidica e post-fissazione

consente di modificare artificialmente l'ambiente cellulare, di immobilizzare i componenti molecolari e macromolecolari della cellula arrestandone le attività metaboliche. Tale fase prevede ulteriormente 4 passaggi, così schematizzati:

1. Prima fissazione: 2 ore in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C;
2. Lavaggio: 3-4 passaggi di 30 min in tampone fosfato 0,15 M;
3. Post-fissazione: 2 ore in tetrossido di osmio 1% in tampone fosfato 0,1 M a 4°C;
4. Lavaggio: 3-4 passaggi di circa 10 min in tampone fosfato 0,15 M.

• Disidratazione

prevede la completa rimozione dei liquidi presenti nel tessuto. Gli agenti disidratanti sono:

1. EtOH 30%: 2 passaggi per 5 min;
2. EtOH 50%: 2 passaggi per 5 min;
3. EtOH 70%: 2 passaggi per 5 min;
4. EtOH 90%: 2 passaggi per 5 min;
5. EtOH 100%: 2 passaggi per 5 min.

• Inclusione

consiste nella graduale sostituzione del disidratante con il mezzo di inclusione; generalmente i mezzi più utilizzati sono monomeri di resine sintetiche, di ridotte dimensioni, in grado di impregnare completamente il tessuto. Le resine vengono di solito miscelati con agenti induritori ed acceleratori. Queste miscele polimerizzando si trasformano in un blocchetto solido di inclusione. L'inclusione prevede 4 fasi, di cui le prime 3 sono condotte sotto cappa mentre l'ultima, che prevede il realizzarsi della polimerizzazione, in stufa:

1. 3 passaggi di 10 min ciascuno in ossido di propilene a 4°C;
2. 2-6 ore in ossido di propilene + resina al 50% a 4°C;

3. almeno 12 ore in sola resina a temperatura ambiente;
4. 3 giorni in stufa a 60°C.

• Taglio all'ultramicrotomo

dopo la rimozione di parte della resina che ricopre i campioni, in modo da conferire ad essi una forma ed una dimensione adeguati per il taglio, questi sono successivamente sezionati utilizzando un ultramicrotomo. Il taglio all'ultramicrotomo permette di realizzare sezioni semifini la cui osservazione è necessaria per verificare la buona riuscita dei processi di fissazione ed inclusione ma soprattutto per localizzare la zona del campione oggetto della ricerca; a questo scopo, le fettine ottenute vengono fatte aderire su un vetrino portaoggetti per poi essere colorate con Azzurro II, blu di metilene o fucsina basica. Le sezioni adatte all'osservazione al TEM sono quelle ultrafini, per l'allestimento delle quali non vengono utilizzati i comuni vetrini portaoggetti, ma dei sottilissimi dischetti di rame, a maglie molto strette e del diametro di soli 3mm, chiamati griglie o retini. Tali sezioni non vengono sottoposte ad un vero e proprio processo di colorazione ma alla seguente fase di contrastazione.

• Contrastazione

consiste nel trattamento del campione con metalli pesanti in grado di fissarsi alle strutture subcellulari. Tale fase prevede i seguenti passaggi:

1. 10 min in acetato di uranile in soluzione al 2%. I sali di uranio si fissano in particolare agli acidi nucleici, evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi;
2. 10 min in citrato di piombo in soluzione al 2%. I sali di piombo potenziano l'azione dell'osmio e dell'uranio evidenziando l'ultrastruttura cellulare.

• Metallizzazione

è realizzata con l'ausilio di uno specifico strumento che è il metallizzatore, costituito da due elettrodi di grafite posti in sottovuoto e portati a temperature talmente elevate da permettere la sublimazione del carbone che forma un sottilissimo film sul retino. Questo trattamento preserva il campione da eventuali danni provocati dall'impatto con il fascio elettronico.

Le fettine contrastate e metallizzate sono state osservate al TEM.

RISULTATI

4.1 Caratterizzazione molecolare di PPORX e ORXR

L'utilizzo dei *primers* riportati nella sessione materiali e metodi ha permesso di individuare per la prima volta un frammento nucleotidico per la PPORX e per ORXR in *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%) ed in seguito all'estrazione dei frammenti dal gel e purificazione degli estratti, i campioni sono stati sequenziati (BMR Genomics - Pd). Tali sequenze parziali sono state allineate con le sequenze note di PPORX e ORXR, identificate in altri vertebrati e presenti in banca dati, mediante la funzione BLASTN di cui si può usufruire *on line* ([http:// workbench.sdsc.edu](http://workbench.sdsc.edu)). Opportunamente editate ed inserite in banca dati. Per la PPORX tali sequenze sono risultate:

> *Partial cds PPORX Carassius auratus:*

```
GGCGCTGCTGGCGCACCTGGCGCGGGACGCGGAGGGCGTGCCACCTGCTGCTCGAGCGCGTCAAGGTCTGCA  
AAATTATACAAGATTCTGTGCCGCGCGGGACGCCAAAACGACACGTCCATCGCCAGGCATATCGGCCGCAAAA  
AAAACA
```

> *Partial cds PPORX Thalassoma pavo:*

```
TGCTTTCCTTCTTCGGCCGCTGCTGGTGCACCTGGCGCGGGACGCGGAGGGCGTGCCACCTGCTGCTCG  
AGCGCGTCAAGGTCTGCAAATTATACAAGATTCTGTGCCGCGCGGGACGCCAAAACGACACGTCCATCG  
CCAGGCATATCGGCCGCAAAAAACA
```

Utilizzando la funzione SIXFRAME disponibile *online* sullo stesso sito, si sono ottenute le sequenze aa parziali di tali neuropeptidi:

> *Partial aa PPORX Carassius auratus:*

```
ALLAHLARDAEGVPTCCSSASRSCKLYKILCRAGRQNDTSIARHIGRKKN
```

> *Partial aa PPORX Thalassoma pavo:*

```
AFLLRPLLVLHLARDAEGVPTCCSSASRSCKLYKILCRAGRQNDTSIARHIGRLKN
```

Mediante il software BIOEDIT *Sequenze Alineament Editor* abbiamo ottenuto l'allineamento tra la sequenze aa parziali di *Carassius auratus* e *Thalassoma pavo* con le sequenze aa note appartenenti ai mammiferi e ad alcuni vertebrati acquatici, ricavando in tal modo il grado di identità e similarità tra le sequenze aa considerate, come riportato nelle seguente tabella:

<i>Carassius auratus</i> PPORX (FJ_392655.1)	Similarity	Identity
<i>Thalassoma pavo</i> PPORX (GQ_382184.1)	87%	85%
<i>Danio rerio</i> PPORX (NM_001077392.1)	90%	68%
<i>Gadus morhua</i> PPORX (DQ486137.1)	53%	29%
<i>Rattus norvegicus</i> PPORX (NM_013064.1)	41%	23%

È da notare, che entrambe le sequenze parziali per la PPORX da noi individuate presentano al loro interno la sequenza dell'ORX-A (evidenziata in verde), e l'epitopo (evidenziato in azzurro) altamente conservato in prossimità dell'estremità N-terminale che caratterizza la sequenza di ORX-A, sia nei teleostei che nei mammiferi:

> **Partial aa PPORX *Thalassoma pavo*:**

AFLLRPLLVLHLDARDAEGVPTCCSSASRSCKLYKILCRAGRQNDTSIARHIGRLKN

> **Partial aa PPORX *Carassius auratus*:**

ALLAHLARDAEGVPTCCSSASRSCKLYKILCRAGRQNDTSIARHIGRKKN

Inoltre, la predizione della struttura secondaria di ORX-A, utilizzando il programma *online* GOR4 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl; Combet *et al.*,2000), ha permesso di verificare l'alto livello di conservazione di tale neuropeptide nei teleostei. Infatti, anche nei nostri modelli è stata confermata la presenza di un residuo di Cys in posizione 19 e di un solo ponte di solfuro tra la Cys 5 e la Cys 12. Inoltre è possibile notare come, anche nelle sequenze da noi individuate, sia presente una sequenza spaziatrice in accordo con i risultati ottenuti in *Danio rerio* e *Fugu rubripes* (Alvarez e Soutcliffe, 2002), come mostrato sotto sulla sequenza di *Carassius auratus*:

10 20 30
 | | |
 VPTCCSSASRSCKLYKILCRAGRQNDTSIARHIGRKKN
 cccccccccccchhhhhhccccccchhhhhceeeec

Sequence length : 38

GOR4 :

Alpha helix	(Hh)	:	12	is	31.58%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	3	is	7.89%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	23	is	60.53%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

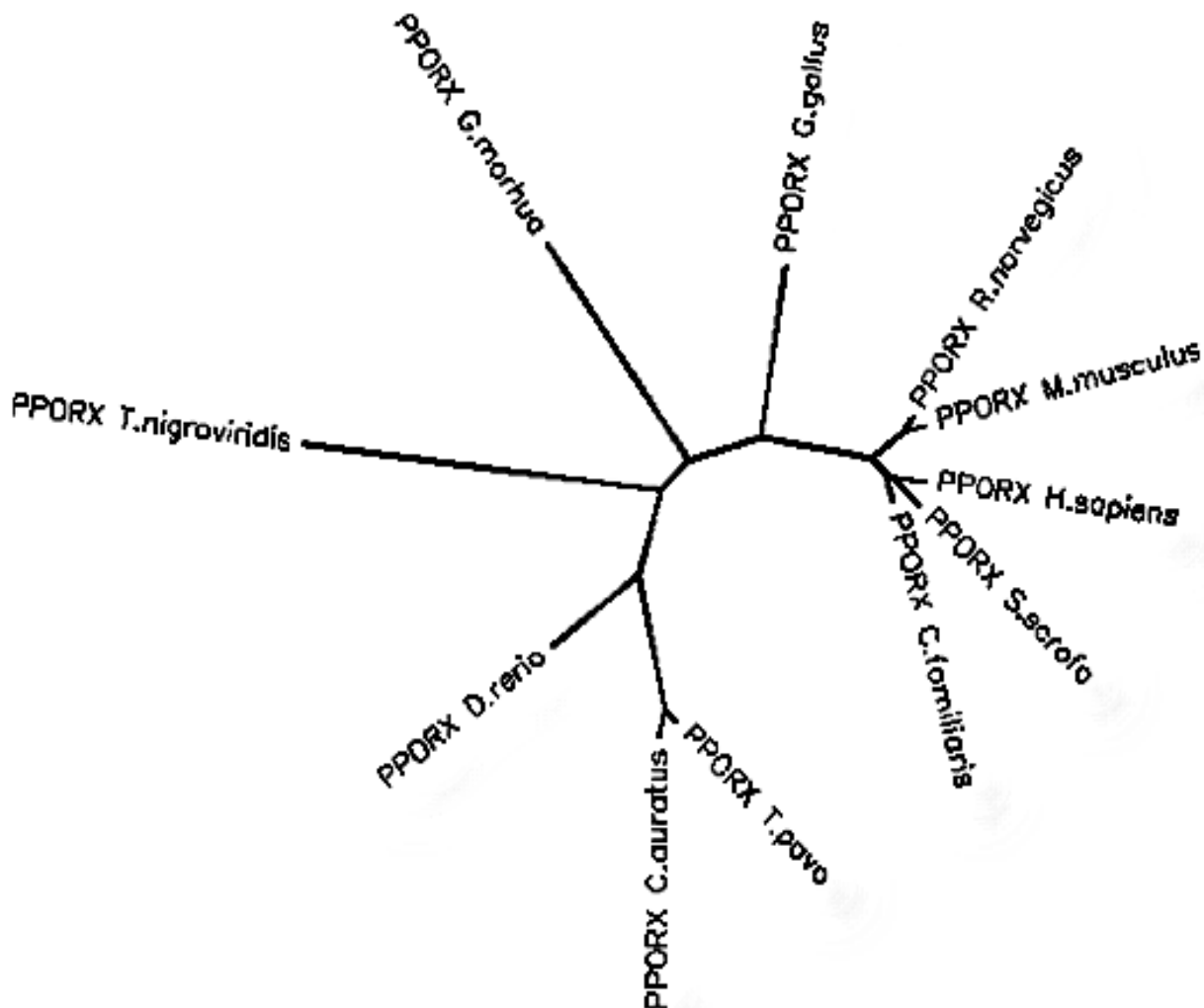


Fig . 4.1: Rappresentazione della struttura secondaria di ORX-A in *Carassius auratus*, in cui sono riportati i valori percentuali delle strutture secondarie assunte da tale peptide. In verde sono evidenziati le Cys presenti nella sequenza, in giallo la sequenza spaziatrice contenuta nell'ORX-A. Sotto: albero filogenetico individuato per la PPORX sulla base delle sequenze amminoacidiche note.

Per quanto riguarda i recettori ORXergici, delle diverse coppie testate di *primers* degenerati, nel caso di *Thalassoma pavo* è stato possibile ottenere un'unica sequenza codificante per ORXR attraverso una coppia di primers costruiti sulla base della sequenza per ORX1R di *Rattus norvegicus*. Grazie a tali primers è stato individuato un frammento nucleotidico di 651 bp, la cui sequenza parziale è risultata:

> *Partial cds PPORX Thalassoma pavo:*

```
GAGGGTCCATGCTTGGGATCTGCGCCGTGTCCCTGGCCGTCATGGTTCCGCAGGTTGCCGAAATGGAATGGAGCAGT
GTACCGCCGCTGTTAGCCAAACGCACACGGCTCTTCTCTGTTTGTGATGAACGGTTGGGAGTTGAACTCTAGCCTAA
CATCTACCAGAGGTGCTTTTTTTTTCGTTAACTACCCGGCCCCGCTTGGCCTCATTCCGATGGCCAATTTCCAGACCT
TCCCCAACCTCTGCGGGCCCCAAATCCCCGGGACCACATCGGCCTTCTGGGCAAGTGGAAAGCGACCCCTCCGAGCAC
CTGGAGGCTCAGCACCAGGGGCTCTGTACAGACCCCCAAGCCCGGGCCCCGAGCCTTTCTTCGCGAAGTGAAACAGAT
GCGAGCTCGGAGGAAGACTGCGAAGATGCCGATTGTGGTGCTGCTGATTACGCGCTCTGTTATCTACCAATGAGTG
TTCTCAATGGCCTTAAAAGCGTTTTTGGGATATTTGGCCAAGCGAGCGATCGAGAGGCCGTCTAATTTGATTCACA
TTTTACCATGGCTGAATTACGCCAATAGAGCAGCTACGCCAATCATATACAACGATCTTAGTGGGAAGTTTCGCGA
CCATTTCAAGCCTGCATTCTTCTGGTGGCTCTCAC
```

Mediante la funzione SIXFRAME, è stato possibile ottenere la seguente sequenza aa parziale di tale recettore :

> *Partial aa ORXR Thalassoma pavo:*

```
GSMLGICAVSLAVMVPQVAEMEWSSVPLLAKRTRLFSVCDERLGVELYPNIIYQRCFFFVNYPAPLGLIPMANFQTF
PNLCGPQIPGTTSAFLGKWKRPSEHLEAQHQGLCTDPQARARAFLEVKQMRARRKTAKMPIVVLLIHALCYLPMSV
LNGLKSVFGIFGQASDREAVFACFTFSPWLNANRAATPIIYNDLSGKFRDHFKPAFFFWWS
```

Il calcolo del livello di similarità ed identità, mediante il software BIOEDIT *Sequenze Alineament Editor*, ha rivelato un elevato livello di similarità ed identità tra il recettore da noi individuato e le sequenze depositate per alcuni mammiferi e *Danio Rerio*, dimostrando la massima identità e similarità con la sequenza di ORX1R di *Rattus Norvegicus*, come evidenziato nella seguente tabella:

<i>Thalassoma pavo</i> ORXR (EF_547365.1)	Similarity	Identity
ORXR <i>D. rerio</i> (NM_001079868.1)	57%	48%
ORX1R <i>R. norvegicus</i> (NM_013064.1)	86%	82%
ORX2R <i>R. norvegicus</i> (NM_013074.1)	68%	49%

```

ORXR T.pavo          G S M L G I C A V S L A V M V P Q V A E M E W S S V P L L A K R T R L F S V C D E R L G V E L Y P N I Y Q R C F F F V
ORXR D.rerio        K S I V L I W L V S C I M M I P Q A V V M E S S L M P E L T N K T S L F T V C D E Q W P D E I Y P K V Y H T C F F I V
ORX1R R.norvegicus G S I L G I W A V S A L V M V P Q A A V M E C S S V L P E L A N R T R L F S V C D E R W A D E L Y P K I Y H S C F F F V
ORX2R R.norvegicus N S I V V I W I V S C I I M I P Q A I V M E R S S M L P G L A N K T T L F T V C D E R W G G E V Y P K M Y H I C F F L V
*:: * ** :*:*. ** **: * *::: * **::*: **::*: **::*:

```

```

ORXR T.pavo          N Y P A P L G L I P M A N F Q T F P N L C G P Q I P G T T S A F L G K W K R P S E H L
ORXR D.rerio        T Y F A P L C L M V L A Y I Q I C H K L W C Q Q I P G S S S V L Q R Q W K S L -- Q C
ORX1R R.norvegicus T Y L A P L G L M G M A Y F Q I F R K L W G P Q I P G T T S A L V R N W K R P S E Q L
ORX2R R.norvegicus T Y M A P L C L M V L A Y L Q I F R K L W C R Q I P G T S S V V Q R K W K Q P -- Q -
.* *** * : : * : * : * ****::*.. : ** :

```

Fig.4.2 Tabella riassuntiva delle percentuali di identità e similarità calcolate tra la sequenza proteica di *Thalassoma pavo* e quella di tutte le altre specie prese in esame. SOTTO: Allineamento tra la sequenza aa di ORXR in *Thalassoma pavo* con le altre specie (a): gli asterischi in azzurro indicano un residuo aa completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto blu la conservazione di gruppi deboli

Lo studio della sequenza di ORXR di *Thalassoma pavo* è stato arricchito con la predizione della struttura secondaria, al fine di valutare se la stessa fosse mantenuta rispetto alla sequenza con la quale mostrava il maggior livello di identità che in questo caso è si è rivelata essere ORX1R di *Rattus norvegicus*. La sequenza aa parziale di ORXR di *Thalassoma pavo* è stata elaborata attraverso il programma GOR3, disponibile *on line* al sito http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. Il confronto tra le due predizioni di struttura secondaria ha evidenziato come in ambedue le sequenze siano presenti le medesime tipologie di struttura secondaria della proteina, in percentuali paragonabili (Fig.4.3).

Rattus norvegicus ORX1R

```

          10         20         30         40         50         60         70
          |         |         |         |         |         |         |
MEPSATPGAQPGVPTSSGPEFHLPPDYEDFLRYLWRDYLKQYEWVLIAAYVAVFLIALVGNLTLVCLA
ccccccccccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhccchehhh
VWRNHHMRTVTNYFIVNLSLADVLVTAICLPASLLVDITSWLFGHALCKVIPYLQAVSVSAVLTLSFI
hhhhcccccccccheeeeChhhhhhhhhhhcccccccchhhhhhhhchhhhcccccccccccccccccccccccccccc
ALDRWYAICHPLLFKSTARRARGSILGIWAVSLAVMVPQAAMVMECSVLPPELANRTRLFSVCDERWADEL
hhhhhhhhhhchhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
YPKIYHSCFFVFTYLAPLGLMGMAFYQIFRKLWGPQIPGTTSAIQRNWKRPSEQLEAQHQGLCTEPQPRA
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
RAFLAEVKQMRARRKTAKMLMVLLVLFALCYLPISVNLVLRVFGMFRQASDREAVYACFTFSSHVLYAN
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
SAANPIIYNFLSGKFRQFKAAFSCCLPGLGPSSARHKSLSLQSRCSVSKVSEHVVLTTVTTLVLS
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

```

Sequence length : 416

GOR3 :

Alpha helix	(Hh)	:	204	is	49.04%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	88	is	21.15%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	124	is	29.81%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

Thalassoma ORXR

```

          10         20         30         40         50         60         70
          |         |         |         |         |         |         |
GSMLGICAVSLAVMVPQVAEMEWSSVPELLAKRTRLFSVCDERLGVELYPNIIYQRCFFVNYPPAPLGLIP
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
MANFQTFPNLFCGPQIPGTTSAFLGKWKRPSEHLEAQHQGLCTDPQARARAFLEVKQMRARRKTAKMPIV
hhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
VLLIHALCYLPSVLNGLKSVFIFGQASDREAVFACFTFSPWLNANRAATPIIYNDLSGKFRDFKPA
hhhhhhhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
FFWWLS
hhhhhh

```

Sequence length : 216

GOR3 :

Alpha helix	(Hh)	:	94	is	43.52%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	43	is	19.91%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	79	is	36.57%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

Fig 4. 3 Confronto tra la struttura secondaria di ORXR in Rattus norvegicus e Thalassoma pavo, in cui sono riportate, in valori percentuali, le strutture secondarie assunte da tali proteine nelle due specie.

Nel caso di *Carassius auratus*, analogamente a quanto verificato in *Thalassoma pavo*, è stato possibile identificare la sequenza per un unico ORXR; tuttavia, in questo caso la coppia di primers, che ci ha permesso di ottenere un frammento nucleotidico per tale recettore di 450 pb, era stata disegnata su una regione altamente conservata di ORX2R di *Rattus norvegicus*. La sequenza nucleotidica identificata, riportata di seguito, è stata opportunamente editata e depositata in banca dati:

> **Partial cds ORXR *Carassius auratus*:**

```
CATGAATCGATGGCTCGTCTGATATGTCTCCCTTATTTACAGACTGTGTCAGTGTCTGTGTCTGTTCTTA
CATTGAGCTGCATTGCCTTGGACCGATGGTACGCCATTTGTCACCCTTTGATGTTCAAGAGCACAGCCAA
ACGGGCTCGAAACAGCATCGTTGTCTGATCTGGATCGTCTCCTGCATCATAATGATTCCCTCAAGCCATTGTC
ATGGAGCGCAGCAACATGCTCCCTGGCCTAGCCAATAAAACCACCCTCTTTACAGTCTGCGATGAACGCT
GGGGAGGTGAAGTTTACCCAAAGATGTACCACATCTGCTTCTTTCTGGTGAAGTACATGGCACCCCTGTG
TCTTATGGTATTGGCTTATCTCCAAATATTCCGTAAGTCTGGTGCAGACAGATTCCCAGAACTTCTTCT
GTGGTTCATAGAAAATGGAAACAACCGCAA
```

La funzione SIXFRAME ha restituito la seguente sequenza aa:

> **Partial aa ORXR *Carassius auratus*:**

```
HESMARLICLPYLQTVSVSVSVLTLSCIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIVSCIIMIPQAIIV
MERSNMLPGLANKTTLFTVCDERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLMVLAYLQIFRKLWCRQIPGTSS
VVHRKWKQPQ
```

Tale sequenza, all'analisi con BIOEDIT *Sequenze Alineament Editor*, ha mostrato livelli di identità elevate con le sequenze identificate sia in *Danio rerio* che da noi in *Thalassoma pavo*, e un'identità superiore all'80% con ORX2R di *Rattus norvegicus*, come illustrato dagli allineamenti e dalla seguente tabella (Fig.4.4):

a) Sequence alignment OX₁R

Consensus key

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

```
ORXR C.auratus      HESMARLICLPYLQTVSVSVSVLTLSCIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIVS
ORXR T.pavo         -----GSMLGICAVS
                                     .*:: * **

ORXR C.auratus      CIIMIPQAIIVMERSNMLPGLANKTTLFTVCDERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLMV
ORXR T.pavo         LAVMVPQVAEMEWSSVPLLAKRTRLFSVCDERLGVLEYPNIYQRCFFVFNYPAPLGLIP
                                     :*:* . ** *.: * **::* **:* ** * :*:*:*: **:*.* ** * :

ORXR C.auratus      LAYLQIFRKLWCRQIPGTSSVVHRKWKQPQ-----
ORXR T.pavo         MANFQTFPNLCGPQIPGTTSAFLGKWKRPSEHLEAQHQGLCTDPQARARAFLEVKQMR
                                     :* :* * :* *****:.. **:*.
```

<i>Carassius auratus</i> ORXR (FJ_392656.1)	Similarity	Identity
ORXR <i>T. pavo</i> (EF_547365.1)	70%	55%
ORXR <i>D. rerio</i> (NM_001079868.1)	78%	63%
ORX2R <i>R. norvegicus</i> (NM_013074.1)	84%	81%

a) Sequence alignment OX₁R

Consensus key

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

```

ORXR C. auratus -----HESMARLICLP-----
ORX2R R. norvegicus GYIIVFVVALIGNVLVCVAVWKNHMRVTVTNYFIVNLSLADVLVTITCLPATLVVDITET
ORXR D. rerio GYILVFLVSLVGNLTVCFVWKNHMRVTVTNYFIVNLSFADILVTITCLPASLVVDITET
ORX1R R. norvegicus AYVAVFLIALVGNLTVCLAVWRNHMRVTVTNYFIVNLSLADVLVTAICLPASLLVDITES
                                : : .   ***

ORXR C. auratus -----YLQTVSVSVSVLTLSCIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIV
ORX2R R. norvegicus WFFGQSLCKVIPYLQTVSVSVSVLTLSCIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIV
ORXR D. rerio WFFGQTLCKILPYLQTVSVSVSVLTLSCIAQDRWYAICHPLKFKSTAKRARKSIVLIWLV
ORX1R R. norvegicus WLFGHALCKVIPYLQAVSVSVAVLTLSFIALDRWYAICHPLLFKSTARRARGSILGIWAV
                                ***::****:***** ** ***** *****:*** **: ** *

ORXR C. auratus SCIIIMPQAIVMERSNMLPGLANKTTLFTVCDERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLM
ORX2R R. norvegicus SCIIIMPQAIVMERSNMLPGLANKTTLFTVCDERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLM
ORXR D. rerio SCIMMIPQAVVMESSLMPELTNKTSLFTVCDQWPDEIYPKVVYHTCFFIVTYFAPLCLM
ORX1R R. norvegicus SLAVMVPQAAVMECSSVLPPELANRTRLFSVCDERWADELYPKIYHSCFFFVTYLAPLGLM
*  :*:*** ** * .::* *:*: * *:***:* .*:***:* *:***:*** ** **

ORXR C. auratus VLAYLQIFRKLWCRQIPGTSSVVHRKWKQP--Q-----
ORX2R R. norvegicus VLAYLQIFRKLWCRQIPGTSSVVQRKWKQP--QPVSQPRGSGQQSKARISAVAAEIKQIR
ORXR D. rerio VLAYIQICHKLWCQIPGSSSVLQRQWKSLL--QCSAHAVGSGESVKVRTSTVSAEAKQVK
ORX1R R. norvegicus GMAYFQIFRKLWGPQIPGTTSALVRNWKRPSEQLEAQHQGLCTEPQPRARAFLAEVKQMR
*:**:* :*** *****:*.: *:** *

```

Fig. 4.4 Tabella riassuntiva delle percentuali di identità e similarità calcolate tra la sequenza proteica di *Carassius auratus* e quella di tutte le altre specie prese in esame. SOTTO. Allineamento tra la sequenza aa di ORXR in *Carassius auratus* con le altre specie (a): gli asterischi in azzurro indicano un residuo aa completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto blu la conservazione di gruppi deboli. (b)

Anche nel caso di *Carassius auratus* lo studio della sequenza di ORXR è stato arricchito con la predizione della struttura secondaria, al fine di valutare se la stessa fosse mantenuta rispetto a quella nota in *Rattus norvegicus*. La sequenza aa parziale di ORXR, elaborata attraverso il programma GOR3 (Combet *et al.*,2000), ha mostrato come in ambedue le sequenze siano presenti le medesime tipologie di struttura secondaria, quali l'alfa elica, filamento disteso ed avvolgimento casuale, nello stesso frammento proteico in percentuali paragonabili.

```

Rattus norvegicus ORX2R
      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
MSSTKLEDSLPRRNWSSASELNETQEPFLNPTDYDDEEFLRYLWREYLHPKEYEWVLIAGYIIVFVVALI
ccccccccccccccccccccchhchhccccccccchhhhhhhhhhhhhchhhhhhhhhhhheeeeecc
GNVLVCVAVWKNHHMRTVTNYFIVNLSLADVLVTITCLPATLVVDITETWFFGQSLCKVIPYLQTVSVSV
ccheehhhhhhhccccccccchhhhchhhhhhhccccccccchehehhhcccccccccccccccccccc
SVLTLSICIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIVSCIIMIPQAIVMERSSSMLPGLANKTTLFTVC
eeeeehhchccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
DERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLMVLAYLQIFRKLWCRQIPGTSSVVQRKWKQPQPVSQPRGSGQ
ccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
QSKARISAVAAEIKQIRARRKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRIVFGMFTHTEDRETVYAWFTFSH
ecchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
WLVIYANSAANPIIYNFLSGKFFREEFKAAFSCCLGVHRRQGDRLARGRTSTESRKSLLTQISNFDNVSKLS
hhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
EHVALTSISTLPAANGAGPLQNWYLQGGVPSLLSTWLEW
hhhhhchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

```

Sequence length : 460

```

Carassius auratus ORXR
      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
HESMARLICLPYLQTVSVSVSVLTLSICIALDRWYAICHPLMFKSTAKRARNISIVVIWIVSCIIMIPQAI
hhhhhhccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccch
MERSNMLPGLANKTTLFTVCDERWGGEVYPKMYHICFFLVTYMAPLCLMVLAYLQIFRKLWCRQIPGTSS
hhhhhhchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
VVHRKWKQPQ
eeeeehcccc

```

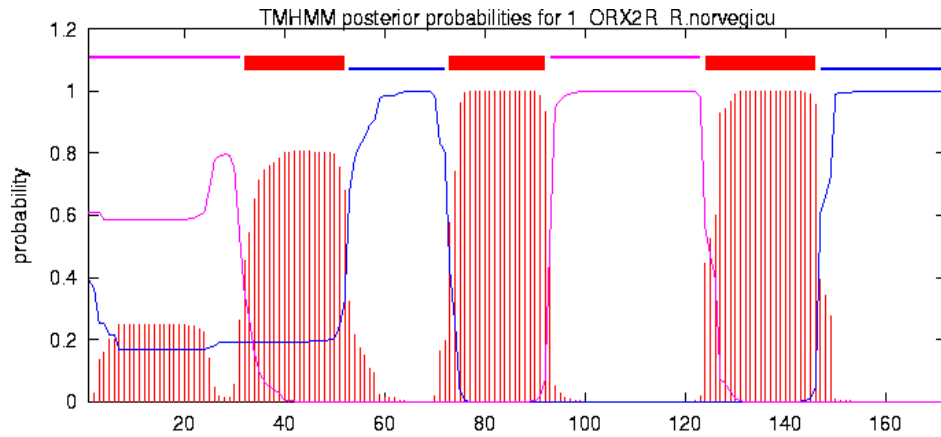
Sequence length : 150

GOR3 :

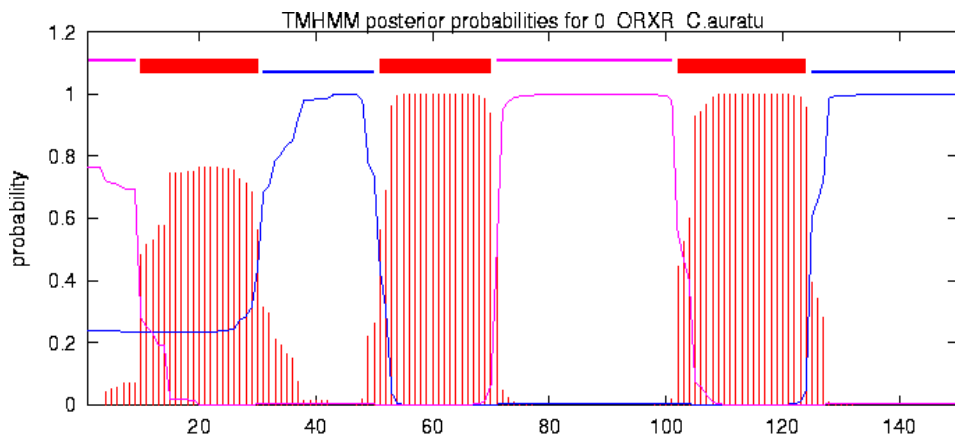
Alpha helix	(Hh) :	52 is	34.67%
3 ₁₀ helix	(Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee) :	48 is	32.00%
Beta turn	(Tt) :	0 is	0.00%
Bend region	(Ss) :	0 is	0.00%
Random coil	(Cc) :	50 is	33.33%
Ambiguous states (?)	:	0 is	0.00%
Other states	:	0 is	0.00%

Fig.4.5 Confronto tra la struttura secondaria di ORXR in *Rattus norvegicus* e *Carassius auratus*, in cui sono riportate, in valori percentuali, le strutture secondarie assunte da tali proteine nelle due specie.

Il livello di conservazione aa di tale recettore si è rivelato non solo di tipo strutturale ma soprattutto di tipo funzionale, come verificato dalla predizione dei domini transmembrana che tale recettore andava a formare, confrontandoli sempre con quelli di *Rattus norvegicus*, utilizzando il software TMHMM disponibile sul sito <http://workbench.sdsc.edu>. (Fig.4.6)



	transmembrane	—	inside	—	outside	—
Outside	1	31	Outside	93	123	
TMhelix	32	52	TMhelix	124	146	
Inside	53	72	Inside	147	172	
TMhelix	73	92				



	transmembrane	—	inside	—	outside	—
Outside	1	9	Outside	71	101	
TMhelix	10	30	TMhelix	102	124	
Inside	31	50	Inside	125	150	
TMhelix	51	70				

Fig. 4.6 Confronto tra la struttura secondaria di ORXR in *Rattus norvegicus* e *Carassius auratus*, in cui sono rappresentati i domini transmembrana, quelli extracellulari ed intracellulari presenti all'interno dei tale recettore nelle due diverse specie.

4.2 Pattern di espressione di PPORX e ORXR

La caratterizzazione molecolare della PPORX e del ORXR in *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus* ha consentito di costruire specifiche sonde oligonucleotidiche *anti-sense* per ibridazione *in situ*. L'utilizzo di tale metodica ha permesso di indagare il pattern di distribuzione sito-specifico sia per PPORX che per ORXR, in entrambi i nostri modelli sperimentali. La sonda per la PPORX ci ha permesso di verificare che, sia in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*, l'espressione di tale gene è confinata all'interno della regione ipotalamica, dove livelli di espressione elevati sono stati riscontrati in LHA (Fig. 4.7):

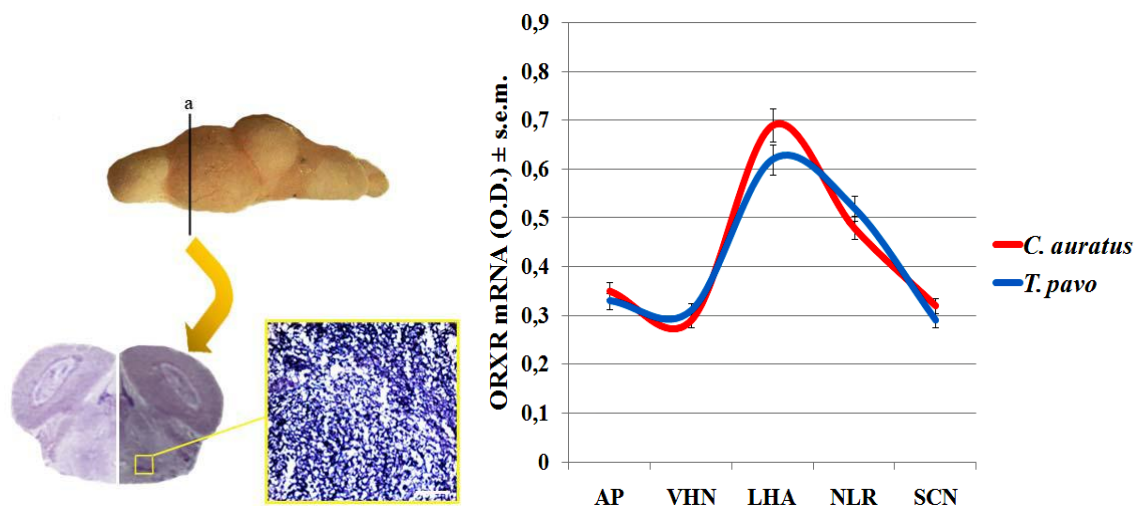


Fig. 4.7 Sinistra: Veduta laterale rappresentativa di un encefalo di uno dei due modelli utilizzati (*Carassius auratus*) con piano di taglio (a) di una sezione trasversale di controllo (NaCl 0,9%) effettuata a livello ipotalamico e sottoposta ad ibridazione *in situ* con probe anti-sense a destra e sense a sinistra. Nel riquadro è riportato un particolare di LHA. **Destra:** Pattern di espressione di PPORX a livello ipotalamico in *Thalassoma pavo* (in blu) e *Carassius auratus* (in rosso). Scale bar: a 40 μ m. Abbreviazioni AP= area preottica; LHA= area ipotalamica laterale; NRL= nucleo del recesso laterale; SCN= nucleo sovrachiasmatico; VHN= nucleo ipotalamico ventrale.

Per quanto riguarda il pattern di espressione di ORXR in entrambi i teleostei è emersa la presenza di un gradiente di espressione antero-posteriore. In *Thalassoma pavo*, livelli elevati di espressione (≥ 0.5 optical density, O.D.) sono stati rilevati nei nuclei diencefalici NPO, VM e NAT, ed a livello telencefalico (Dm). Livelli intermedi ($\leq 0.50 \geq 0.25$ O.D.) caratterizzano a livello diencefalico NSC, NLTm ed NPGm, mentre a livello mesencefalico SGC e Tlo. Per quanto riguarda *Carassius auratus*, la regione telencefalica è caratterizzata da bassi livelli di trascritto per ORXR. Livelli eterogenei, da intermedi ad elevati, caratterizzano sia l'area diencefalica, come osservato a livello di NRL ed LHA rispettivamente, che l'area mesencefalica, come riportato rispettivamente in TLA ed OTec. Livelli intermedi sono stati riportati anche a livello di CV (Fig. 4.8).

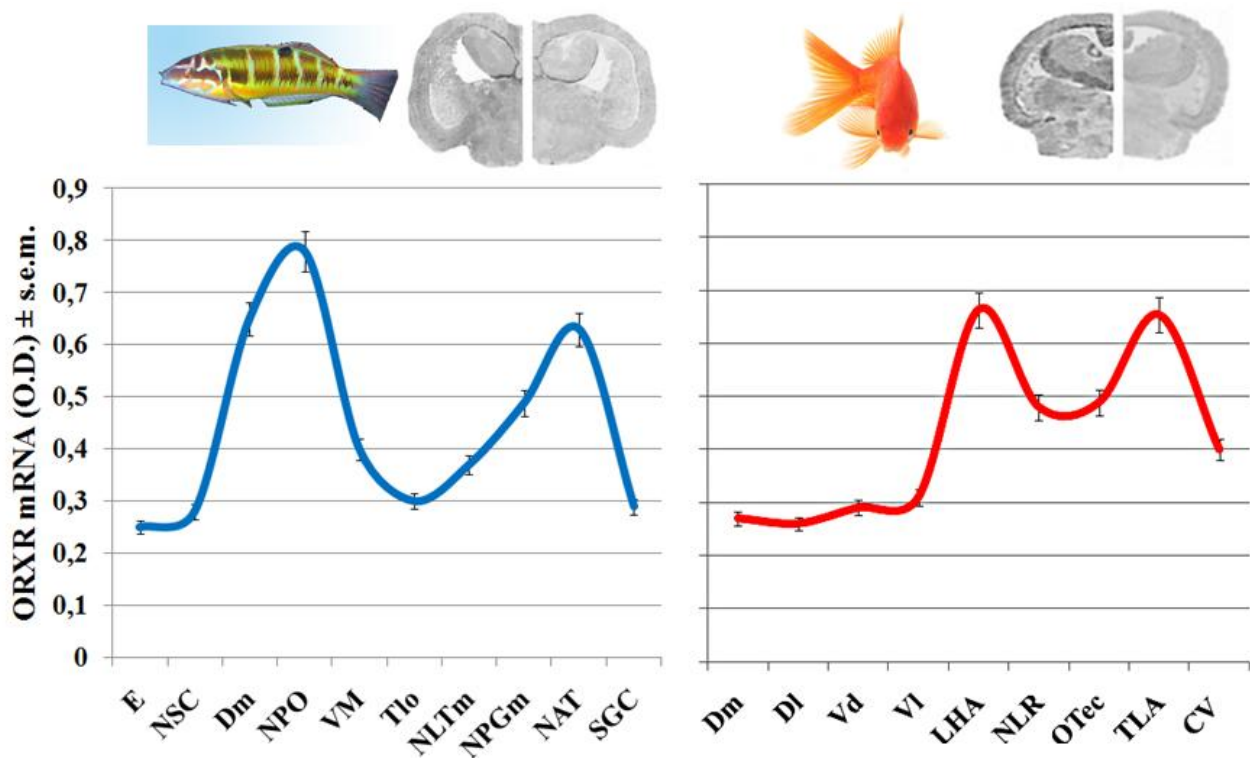


Fig. 4.8 *Sopra*: sezioni trasversali di controllo (NaCl 0,9%) rappresentative dell'encefalo di *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus* sottoposte ad ibridazione in situ con sonda anti-sense (sinistra) e sense (destra). *Sotto*: pattern di espressione di ORXR in alcune aree encefaliche di *Thalassoma pavo* (sinistra) e *Carassius auratus* (destra). Abbreviazioni: CV= valvola del cervelletto; Dm e Dl= nuclei mediale e laterale del telencefalo dorsale; E= nucleo entopeduncolare; LHA= area ipotalamica laterale; NAT= nucleo anteriore tuberale; NPO= nucleo preottico; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; NLTm= parte mediale del nucleo tuberale laterale; NRL= nucleo del recesso laterale; SGC= strato grigio centrale; TLA= tori laterali; Tlo= tori longitudinali; Vd e Vl= nuclei dorsale e laterale del telencefalo ventrale; VM= talamo mediale.

4.3 Analisi comportamentale

In una prima fase sono state valutate le principali attività comportamentali dei nostri modelli sperimentali in esemplari controllo (trattati solo con soluzione salina NaCl 0,9 %). L'analisi comportamentale è stata realizzata valutando il comportamento alimentare ed esplorativo (STF), il nuoto (FS) e l'inattività (R), misurando il tempo trascorso dagli animali in ciascuna delle tre categorie comportamentali considerate. Da questa prima analisi è emerso che mentre *Thalassoma pavo* spendeva la maggior parte del tempo nella fase di R (60% ± 5%) e in FS (35% ± 3%) e solo una piccola percentuale di tempo era impiegata in STF (5% ± 1%). Nel caso di *Carassius auratus*, gli animali trascorrevano la maggior parte del tempo (63% ± 4%) in FS, mentre circa la stessa quantità di tempo era spesa in STF e R (rispettivamente 18% ± 2% e 19% ± 2%) (Fig. 4.9).

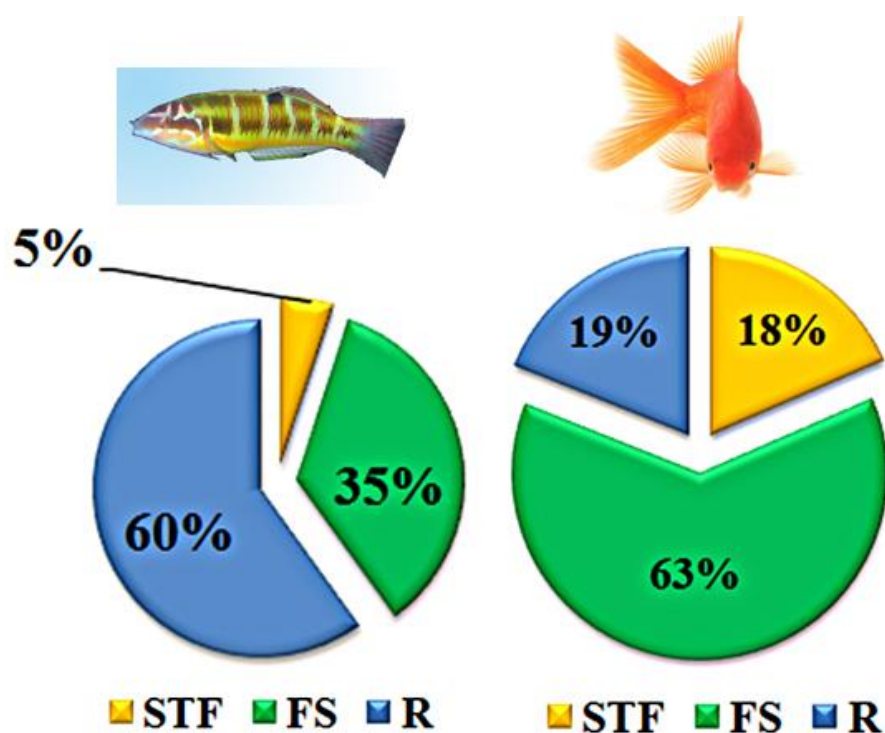


Fig.4.9 Tempo (%) speso da *Thalassoma pavo* (sinistra) e *Carassius auratus* (destra) nelle principali attività comportamentali prese in esame negli animali controllo (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta attraverso 4 osservazioni di un'ora nell'arco della giornata; le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$.

4.3.1 Effetti dell'ORX-A in *Thalassoma pavo*.

Al fine di verificare gli effetti dell'ORX-A sulle attività comportamentali e neuronali di *Thalassoma pavo*, in una prima fase è stato condotto uno *screening* per stabilire la concentrazione ottimale di ORX-A capace di indurre variazioni biologiche significative. Sono state testate le dosi da 1 a 150 ng/gr di peso corporeo (BW) monitorando il BW degli animali per un periodo da 1 a 7 giorni di trattamento. Da tale screening è emerso che ORX-A è in grado di indurre un aumento significativo del BW dopo 7 giorni di trattamento, a partire dalla dose di 100 ng/gr di BW (Fig.). Tale dose è stata successivamente testata sulle attività comportamentali del nostro modello, monitorando tutta l'attività locomotoria, per un periodo di 7 giorni al fine di individuare il periodo ottimale per osservare i massimi effetti comportamentali indotti dall'ORX-A. Dal *time-course* è emerso che già dopo 24 ore di trattamento, l'ORX-A induceva un moderato ($p<0.05$) incremento dell'attività locomotoria di *Thalassoma pavo*. Tale incremento era costante dopo 48 e 72 ore di trattamento per diventare molto elevato ($p<0.001$) dopo 96 ore e mantenersi di tale entità fino a 120 ore, superate le quali gli effetti comportamentali indotti dall'ORX-A tornavano ai livelli del controllo (Fig.4.10)

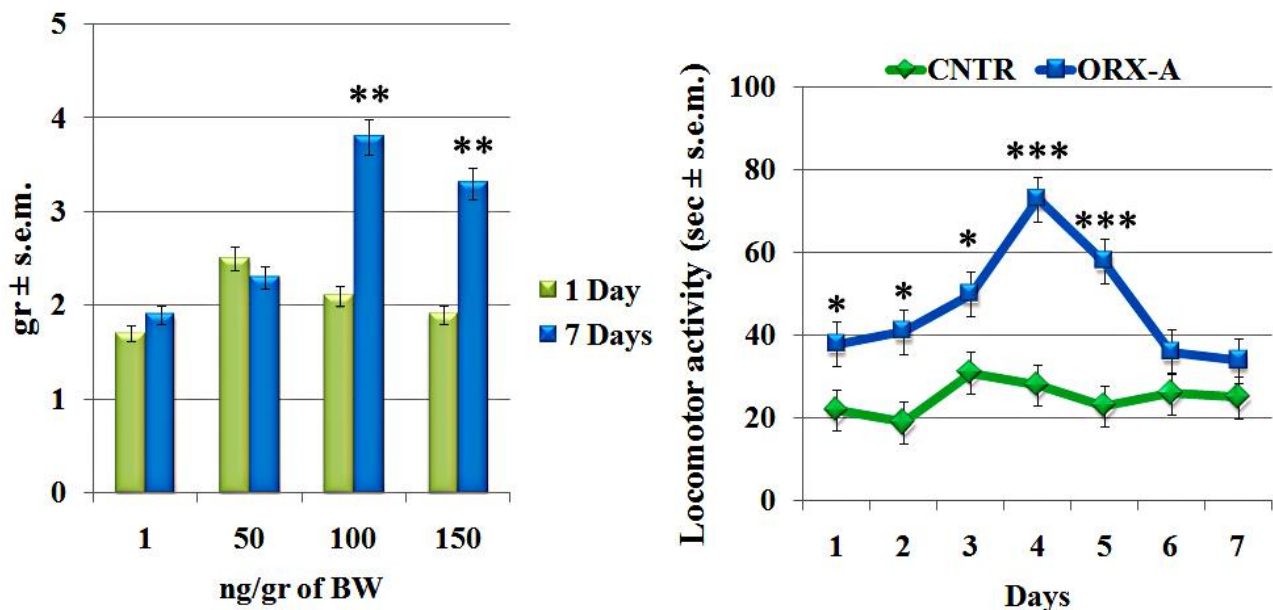


Fig.4.10 Sinistra: Effetti delle differenti dosi di ORX-A testate sulle variazioni del BW di *Thalassoma pavo*, in seguito a un singolo trattamento ed in seguito a 7 giorni di trattamento giornaliero i.p., espressi in grammi (gr) di peso corporeo \pm s.e.m. Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – T-test: ** $p<0.01$. **Destra:** Time-course dell'attività locomotoria, espressa in secondi (sec) \pm s.e.m, in animali trattati i.p. con ORX-A 100 ng/gr di BW rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta per un periodo di 7 giorni; le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ - Sheffe's test; * $p<0.05$; *** $p<0.001$.

Sulla base dello screening e del *time-course* sono stati monitorati, in maggior dettaglio, gli effetti dell'ORX-A sulle principali attività comportamentali di questo modello sperimentale e, in particolare, STF, FS ed R, in seguito a 96 ore di trattamento con ORX-A (100 ng/gr di BW). In seguito a tale trattamento, l'ORX-A induceva un incremento molto elevato sia in STF che nel FS, tale effetto si accompagnava ad un decremento molto elevato del R (Fig.4.11):

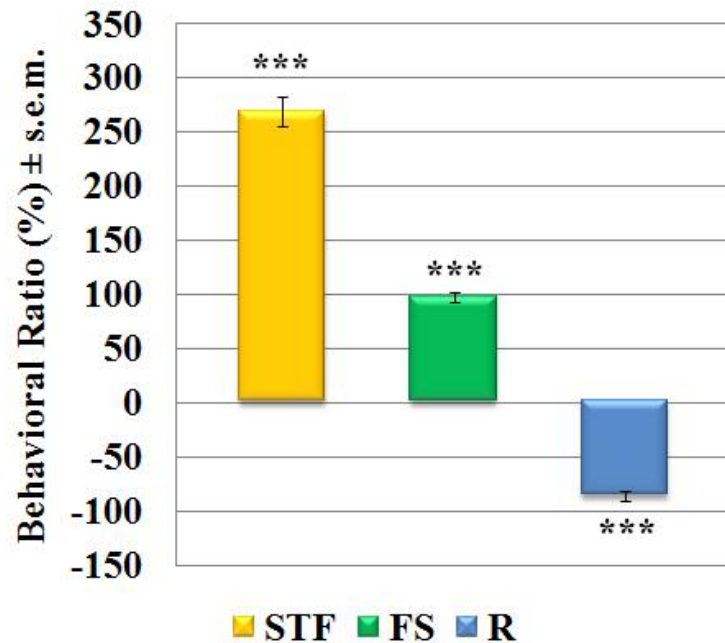


Fig.4.11 Gli effetti dell'ORX-A sulle attività comportamentali di *Thalassoma pavo*, dopo 4 giorni di trattamento i.p. con ORX-A 100 ng/gr di BW, sono mostrate come ratio (%) ± s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta mediante 4 osservazioni giornaliere da 60 min, e le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ - Dunnett's test; *** $p<0.001$.

4.3.2 Effetti dell'ORX-A in *Carassius auratus*

Anche nel caso di *Carassius auratus*, al fine di verificare quale fosse la concentrazione ottimale di ORX-A capace di indurre variazioni comportamentali significative, è stato condotto uno *screening* comportamentale in cui sono state testate diverse concentrazioni di tale neuropeptide. In tale teleosteo, tuttavia, non è stato possibile eseguire un trattamento cronico, poiché gli animali sottoposti a trattamenti ripetuti presentavano evidenti segni di lesioni corporee nel sito di iniezione; perciò, in tale teleosteo gli effetti dell'ORX-A sono stati testati in seguito ad una singola iniezione di ORX-A.

Lo screening comportamentale ha permesso di verificare che mentre basse dosi di ORX-A non inducevano variazioni significative in STF, la concentrazione di 10 ng/gr di BW era in grado di indurre un incremento molto elevato di tale attività comportamentale, effetto associato ad un elevato decremento del tempo trascorso nella fase di R. Un simile incremento, se pur di minore intensità, è stato indotto anche dalla dose di 50 ng/gr di BW la quale era in grado di indurre un incremento molto elevato di STF e un decremento moderato di R. Alla dose più alta da noi testata (100 ng/gr di BW), l'ORX-A non ha indotto variazioni comportamentali significative, rispetto ai controlli. In seguito a tale screening, è stata scelta la dose di 10 ng/gr di BW come ottimale nell'indurre variazioni comportamentali significative in seguito ad una singola somministrazione i.p. (Fig.4.12). Per tale dose è stata successivamente valutata la durata temporale dell'azione dell'ORX-A sulle attività comportamentali, monitorando gli animali durante la prima, la seconda, la quarta e la sesta ora post-trattamento. È stato così possibile osservare come tale dose sia capace di indurre un incremento molto elevato di STF nella prima e seconda ora post-trattamento, in seguito alla quale l'effetto si riduceva rapidamente e già alla quarta ora di osservazione non era possibile osservare alcuna variazione significativa rispetto ai controlli (Fig.4.13).

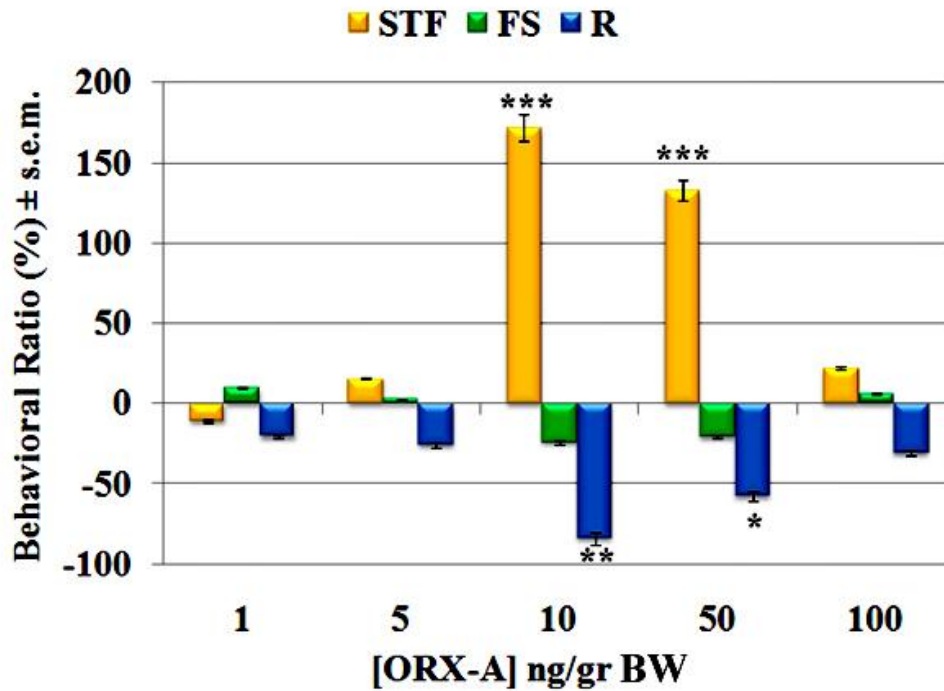


Fig.4.12 Effetti delle differenti dosi di ORX-A testate sulle attività comportamentali di *Carassius auratus*, in seguito a singolo trattamento i.p., espressi come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta monitorando gli animali durante la prima ora post-iniezione; le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

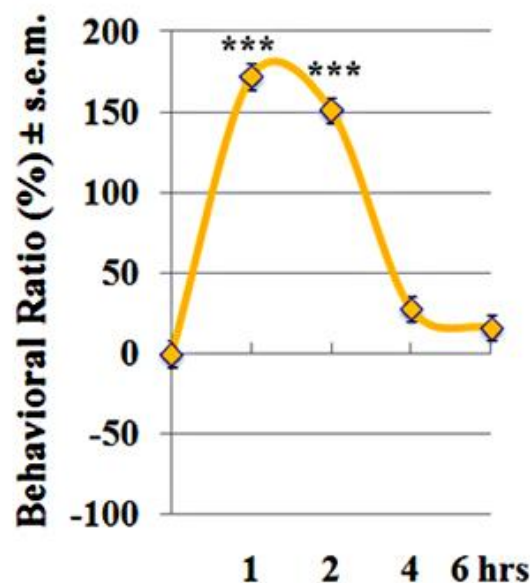


Fig.4.13 Time-course degli effetti dell'ORX-A 10 ng/gr di BW su STF espressi come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta monitorando gli animali durante la prima, seconda, quarta e sesta ora post-iniezione; Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Sheffe's test; * $p<0.05$; *** $p<0.001$.

4.4 Effetti di ORX-A sul pattern di espressione di ORXR

L'analisi del pattern di espressione di ORXR, attraverso la tecnica dell'ibridazione *in situ*, ha permesso di verificare come le variazioni comportamentali osservate in seguito al trattamento con ORX-A fossero associate a modificazioni molecolari sito-specifiche nel pattern di espressione di tale recettore. Dall'analisi dei dati è emerso che il trattamento prolungato con ORX-A in *Thalassoma pavo* ha indotto alterazioni molecolari, principalmente a livello ipotalamico e mesencefalico. In particolare, a livello ipotalamico, ORX-A ha indotto *up-regulations* moderate in NPO ed NPGm, ed elevate in SCN, mentre un'elevata ($p < 0.01$) *down-regulation* caratterizzava NLTm. Per quanto riguarda l'area mesencefalica, ORX-A ha indotto una generale *up-regulation* di ORXR, con una moderata ed elevata *up-regulation* che caratterizzava rispettivamente SGC e Tlo. Una *up-regulation* molto elevata è stata osservata anche in CV (Fig.).

Per quanto riguarda il trattamento acuto in *Carassius auratus*, ORX-A ha indotto una generale *up-regulation* del trascritto per ORXR. Le principali alterazioni molecolari sono state osservate a livello dell'area telencefalica che presentava *up-regulations* molto elevate in particolare a livello dei nuclei Dc, Dd, Dl, Dm, Vd e Vl. Valori eterogenei sono stati osservati nell'area diencefalica con *up-regulations* moderate, elevate e molto elevate, rispettivamente, in Tpp, NLR e NDLI, mentre una moderata *down-regulation* caratterizzava LHA. Moderate *up-regulations* caratterizzavano inoltre l'area mesencefalica, come evidenziato in OTec e TLA, e cerebellare (CV) (Fig.4.14).

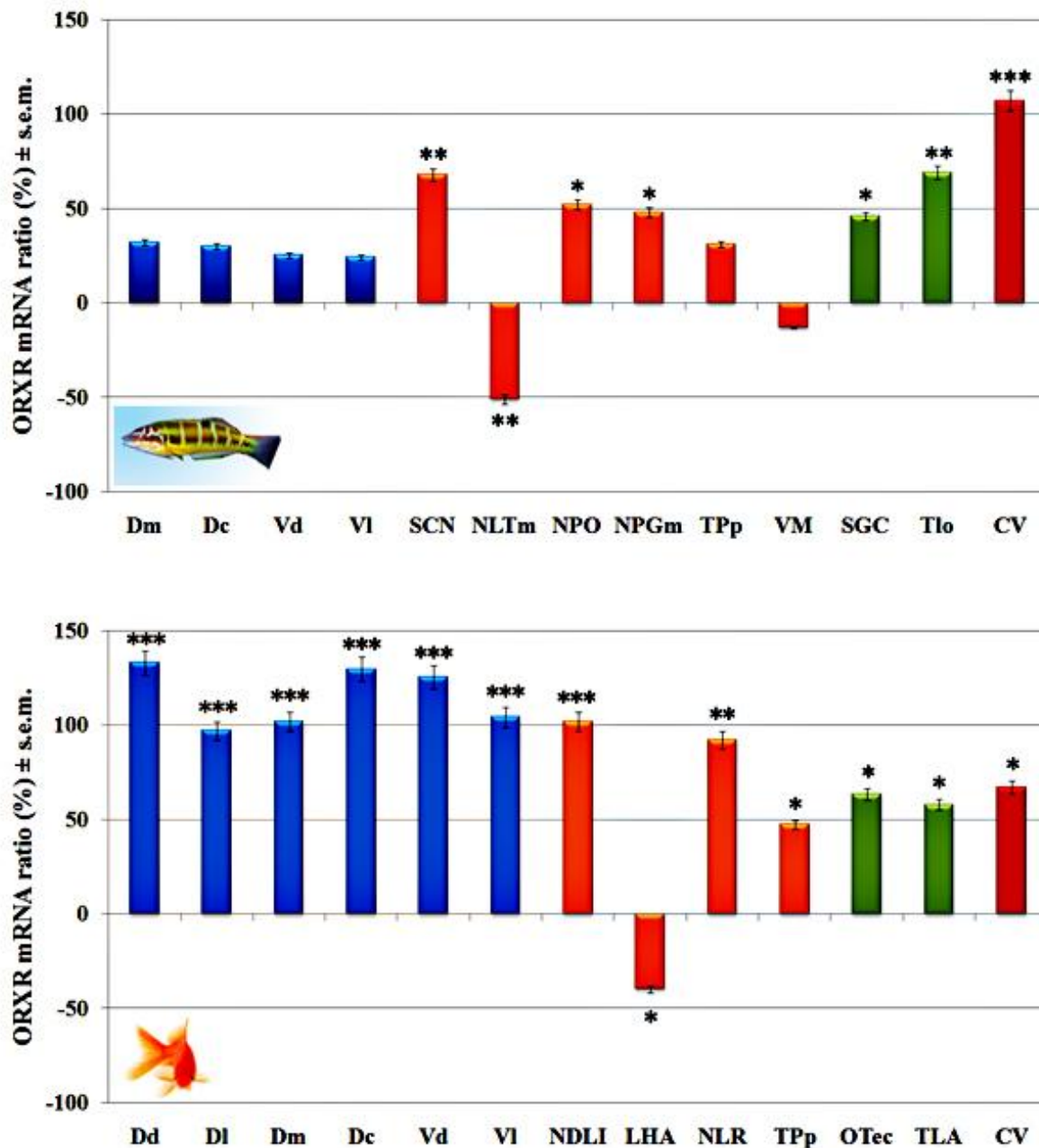


Fig.4.14 Modificazioni del pattern di espressione di ORXR in seguito a trattamento con ORX-A, prolungato (96 h) in *Thalassoma pavo* (sopra) ed acuto (24 h) in *Carassius auratus* (sotto). I risultati sono riportati come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Abbreviazioni: CV= valvola del cervelletto; Dc, Dd, Dm DI= nuclei centrale, dorsale, mediale e laterale del telencefalo dorsale; E= nucleo entopeduncolare; LHA= area ipotalamica laterale; NAT= nucleo anteriore tuberale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore ipotalamico; NPO= nucleo preottico; NPGm= nucleo pregglomeruloso mediale; NLTm= parte mediale del nucleo tuberale laterale; NLR= nucleo del recesso laterale; OTec= tetto ottico; SCN= nucleo sovra chiasmatico; SGC= strato grigio centrale; TLA= tori laterali; Tlo= tori longitudinali; TPp= nucleo periventricolare del tubercolo posteriore; Vd e VI= nuclei dorsale e laterale del telencefalo ventrale; VM= talamo mediale.

Gli effetti dell'ORX-A nei nostri modelli sperimentali, oltre che a livello comportamentale e molecolare, sono stati valutati a livello strutturale mediante l'applicazione della colorazione istologica ACS. Tale metodica permette di visualizzare la presenza di eventi neurodegenerativi, dovuti sia a fenomeni necrotici che apoptotici, attraverso un'intensa reazione argirofilica, mentre l'analisi al TEM ha consentito di evidenziare gli eventi neurodegenerativi anche a livello ultrastrutturale. Nel caso di *Carassius auratus*, non è stata evidenziata alcuna reazione argirofilica in nessuna delle aree encefaliche considerate; tale dato è stato confermato anche dall'analisi ultrastrutturale, suggerendo così che una singola esposizione ad ORX-A non produce alcun evento neurodegenerativo in *Carassius auratus* (Fig.). Al contrario in *Thalassoma pavo*, in seguito al trattamento prolungato (96 h) con dosi relativamente alte di ORX-A, è stato possibile osservare un'evidente reazione argirofilica altamente sito-specifica e concentrata prevalentemente a livello di HTH e dell'area mesencefalica. L'analisi ultrastrutturale al TEM ci ha permesso di verificare, nelle stesse aree encefaliche caratterizzate da un'abbondante reazione argirofilica, la presenza di segni caratteristici di danno cellulare, quali la presenza di cromatina condensata in prossimità della membrana nucleare, ed il rigonfiamento dei mitocondri con la perdita delle tipiche creste mitocondriali (Fig. 4.15)

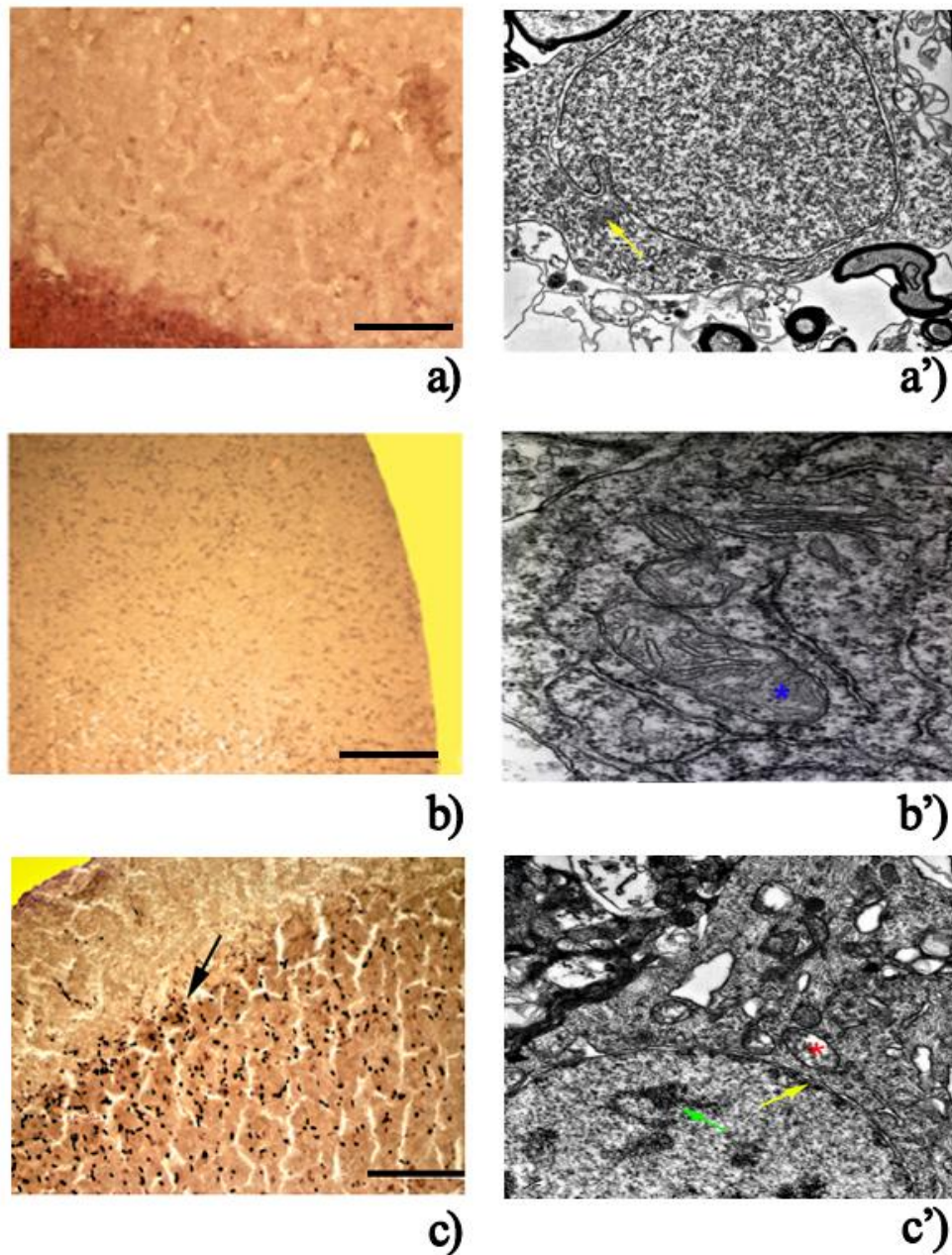


Fig. 4.15 Sezioni encefaliche rappresentative di OTeC osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS (a,b,c) e processate per l'analisi ultrastutturale al TEM (a',b',c') in esemplari di controllo (*Thalassoma pavo*, a,a') e trattati (*Carassius auratus*, b,b'; *Thalassoma pavo* c,c'). In a' la freccia gialla indica la presenza della tipica struttura mitocondriale in esemplari controllo di *Thalassoma pavo*; tale struttura non viene alterata dal trattamento con ORX-A in *Carassius auratus* come evidenziato dal particolare del mitocondrio mostrato in b' (asterisco blu). In seguito al trattamento con ORX-A in *Thalassoma pavo* sono state osservate al TEM evidenti anomalie ultrastrutturali come evidenziato dal particolare in c' in cui si osserva il condensamento della cromatina (freccia verde), anche in prossimità della membrana nucleare (freccia gialla), e il rigonfiamento mitocondriale con perdita delle creste mitocondriali (asterisco rosso). Scale bar: a,b,c= 60 μ m; Magnification TEM: a',c'= 12000X; b'=30000X.

4.5 Effetti del fotoperiodo sulle attività dell'ORX-dipendenti in *Thalassoma pavo*

Sulla base di precedenti studi in cui è stato dimostrato come le diverse condizioni di fotoperiodo siano in grado di influenzare l'azione ORXergica nei roditori (Espana et al., 2002) e in base anche al fatto che *Thalassoma pavo* si è rivelato il modello sperimentale più resistente alle dosi relativamente alte di ORX-A, somministrate per periodi relativamente lunghi, in questa parte del mio lavoro di dottorato sono stati valutati gli effetti di due condizioni estreme di fotoperiodo (luce costante o Light Phase, LP; oscurità costante o Dark Phase, DP), sulle attività comportamentali e neuronali indotte dall'ORX-A, solo nel teleosteo marino. A tale scopo, quest'ultimo è stato trattato quotidianamente i.p. con ORX-A 100 ng/gr di BW per un periodo di 96 ore, e contemporaneamente mantenuto in condizioni di LP o di DP, per l'intero periodo di trattamento. Dall'analisi comportamentale, è emerso che, in condizioni di LP, l'ORX-A era in grado di indurre un incremento molto elevato ($p < 0.001$) del tempo trascorso dagli animali in STF che si associava con una riduzione molto elevata del tempo speso dagli animali in FS e R. Al contrario, negli animali mantenuti in condizioni di DP, l'ORX-A induceva una riduzione molto elevata di STF e un moderato aumento del tempo trascorso in R (Fig 4.16).

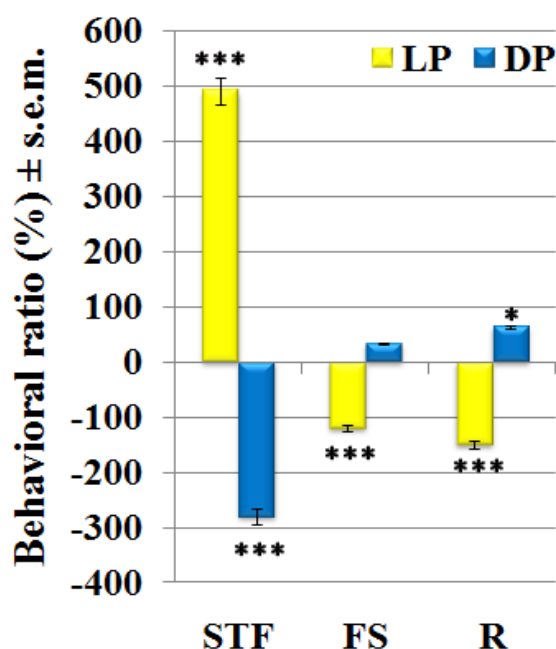


Fig. 4.16 Gli effetti delle differenti condizioni di fotoperiodo sulle attività comportamentali ORX-A-indotte in *Thalassoma pavo*, valutati dopo 4 giorni di trattamento i.p. con ORX-A 100 ng/gr di BW in animali mantenuti in LP o DP, sono mostrati come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). L'analisi comportamentale è stata condotta mediante 4 osservazioni giornaliere di 60 min, e le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ - Dunnett's test: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

L'analisi molecolare del trascritto di ORXR ha mostrato che le alterazioni comportamentali indotte da ORX-A nelle diverse condizioni di fotoperiodo sono associate a modificazioni sito-specifiche nel pattern di espressione di ORXR. In particolare in condizioni di LP, ORX-A induceva *up-regulations* elevate e molto elevate a livello mesencefalico (SGC) ed ipotalamico (NPO), mentre sempre a livello ipotalamico una moderata *down-regulation* è stata osservata in SCN. In condizioni di DP, il trattamento con ORX-A ha evidenziato una moderata *up-regulation* a livello telencefalico (Dm), mentre elevate *down-regulations* sono state osservate in SCN e a livello talamico in VM; una *down-regulation* molto elevata caratterizzava inoltre l'area mesencefalica SGC (Fig. 4.17). In questa parte del lavoro, si è potuto dimostrare non solo che le alterazioni comportamentali erano strettamente legate a variazioni del trascritto di ORXR ma anche che l'azione combinata delle due condizioni estreme di fotoperiodo (LP o DP) e di ORX-A era responsabile di eventi neurodegenerativi. Tali aspetti sono stati valutati mediante l'applicazione del metodo istologico Fluro Jade B, che è un metodo altamente specifico per la rivelazione in campo a fluorescenza del danno neuronale sia di natura apoptotica che necrotica. In particolare, in condizione di LP, un danno neuronale di entità moderata, elevata e molto elevata è stato osservato rispettivamente nelle aree telencefalica, ipotalamica e mesencefalica. Nel caso degli animali mantenuti in condizione di DP, il trattamento con ORX-A induceva un'elevata neurodegenerazione in tutte le aree encefaliche considerate (Fig. 4.18)

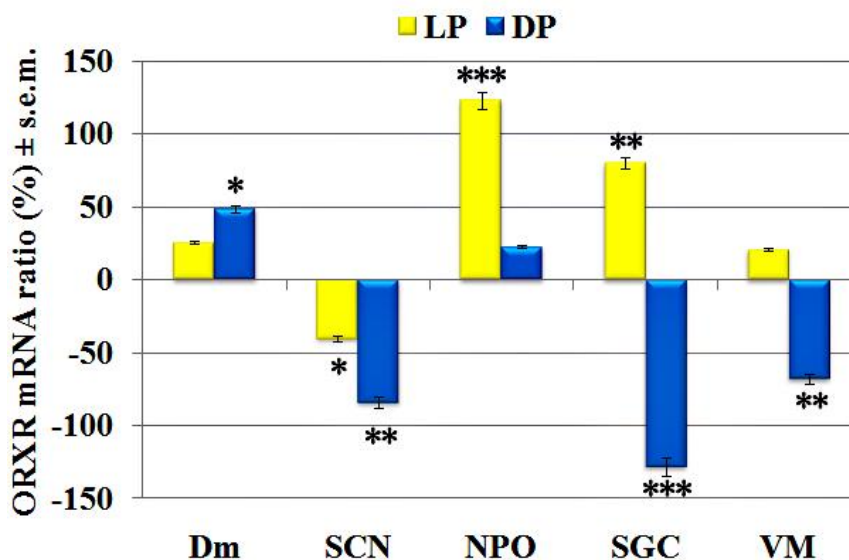


Fig.4.17 Le variazioni nel pattern di espressione di ORXR in seguito a trattamento con ORX-A in esemplari di *Thalassoma pavo*, mantenuti in LP e DP per 96 ore, sono mostrate come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ad animali mantenuti in condizione di fotoperiodo naturale (NP). Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Abbreviazioni: Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NPO= nucleo preottico; SGC= strato grigio centrale; VM= talamo mediale.

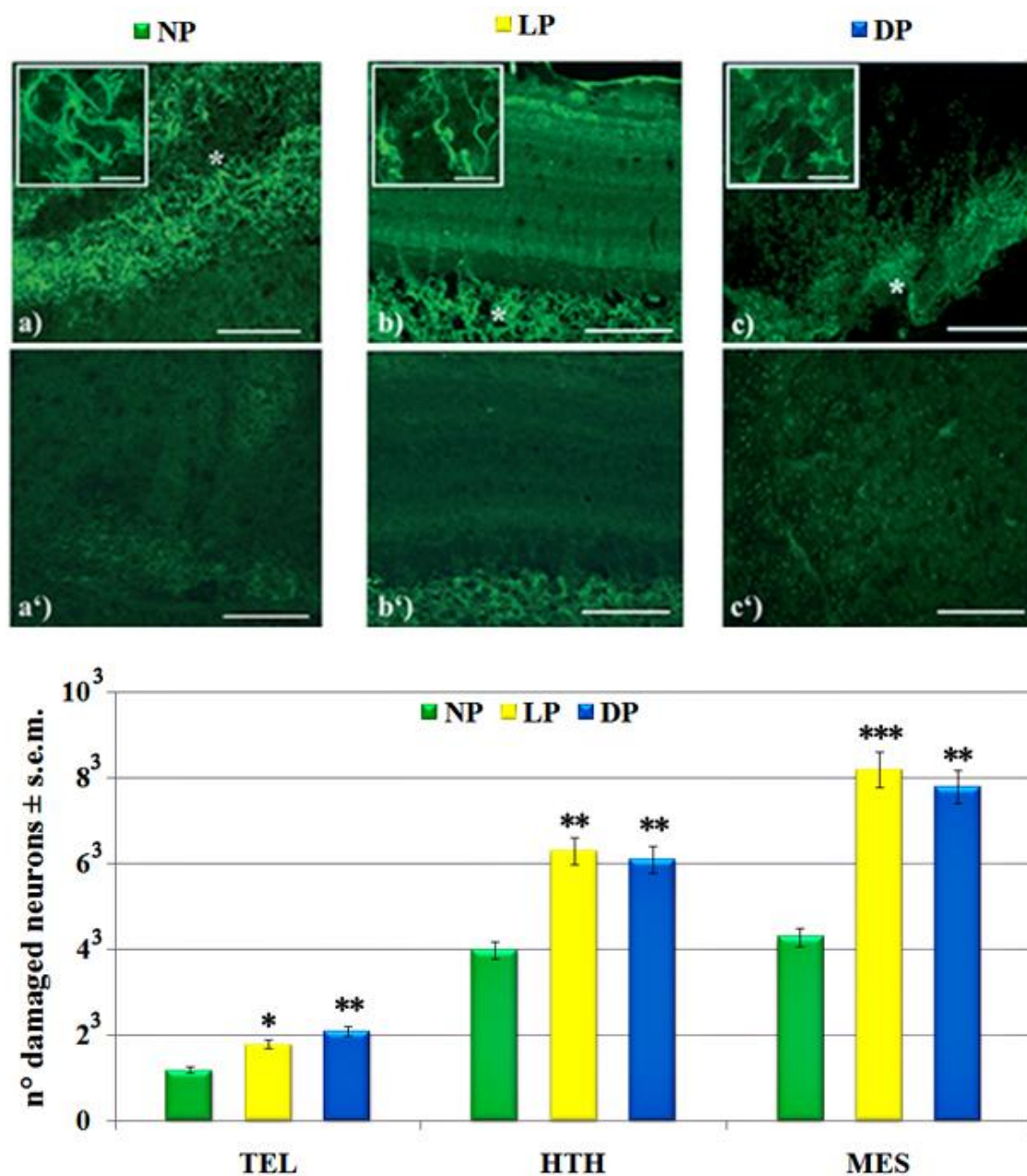


Fig. 4.18 Sopra: Le sezioni encefaliche rappresentative di esemplari di *Thalassoma pavo*, mantenuti per 96 ore in condizioni di NP, LP e DP e trattati con ORX-A 100 ng/gr di BW (a,b,c) e relativi controlli (a',b',c'), sono state osservate al microscopio a fluorescenza in seguito a colorazione con Fluoro Jade B. In a ed a' è rappresentata l'area ipotalamica NLTm, in b e b' un particolare di OTec, in c e c' il nucleo telencefalico Dm; nei riquadri è mostrato un particolare dei neuroni degenerati identificati nelle rispettive aree di a, b e c in corrispondenza dell'asterisco. Scale bar: a,b,c 1 cm=60 μ m; riquadri 1 cm=40 μ m.

Sotto: La stima quantitativa dei neuroni degenerati in TEL, HTH e MES è espressa come numero di neuroni degenerati \pm s.e.m. rispetto ai controlli. Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.6 Azione di GABA_AR sulle attività comportamentali

Avendo verificato come le condizioni ambientali siano in grado di avere profondi effetti sulle attività ORX-mediate, ci si è chiesto se altri fattori endogeni possano interagire con il sistema ORXergico. In particolare, sulla base dell'importanza funzionale del sistema GABAergico e del numero crescente di studi che hanno dimostrato come quest'ultimo sia implicato nei mammiferi nel controllo di attività comportamentali ORX-dipendenti, l'attenzione è stata successivamente rivolta al ruolo del cross-talking tra il sistema ORXergico e le subunità α e β di GABA_AR.

Subunità β di GABA_AR: Muscimol e Bicucullina

Per indagare gli effetti della subunità β di GABA_AR sulle attività ORX-mediate, le attività comportamentali dei nostri modelli sperimentali sono state analizzate in seguito a trattamento i.p. con diverse dosi di MUS, un potente agonista per il sito di legame per il GABA, e di BIC, antagonista altamente specifico per lo stesso sito. L'analisi comportamentale ha evidenziato che la stimolazione della trasmissione GABAergica attraverso la somministrazione di MUS produceva significative alterazioni comportamentali in entrambi i nostri modelli. Nel caso di *Thalassoma pavo*, già alla dose di 0,1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, il MUS determinava un moderato incremento sia di STF che di R, associata ad una diminuzione nel FS. A dosi più alte, il moderato incremento del tempo trascorso dagli animali nella fase di R, si accompagnava ad un'elevata riduzione nel FS (Fig.4.19 a). Inoltre, questi effetti risultavano associati ad una riduzione della velocità media di nuoto che risultava di entità elevata per la dose di 0,5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW fino a diventare molto elevata alla dose di 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW (Fig.4.19 a'). Effetti paragonabili a quelli osservati in *Thalassoma pavo*, sono stati osservati anche in *Carassius auratus*. Infatti, anche in questo teleosteo il trattamento i.p. con MUS alla dose di 0,1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW induceva un moderato incremento sia in STF che in R (Fig.4.19 b). Alla dose di 0,5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, accanto ad un moderato incremento in STF, è stata osservata un'elevata riduzione nel FS, riduzione che era di simile entità anche alla dose di 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW. In parallelo a ciò, si è potuto osservare una riduzione elevata e molto elevata della velocità media di nuoto registrata rispettivamente alla dose di 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW (Fig.4.19 b'). Tuttavia, a differenza di *Thalassoma pavo*, in cui le dosi più alte inducevano solo un moderato incremento di R, nel caso di *Carassius auratus* tale incremento era di entità molto elevata (Fig.4.19 b).

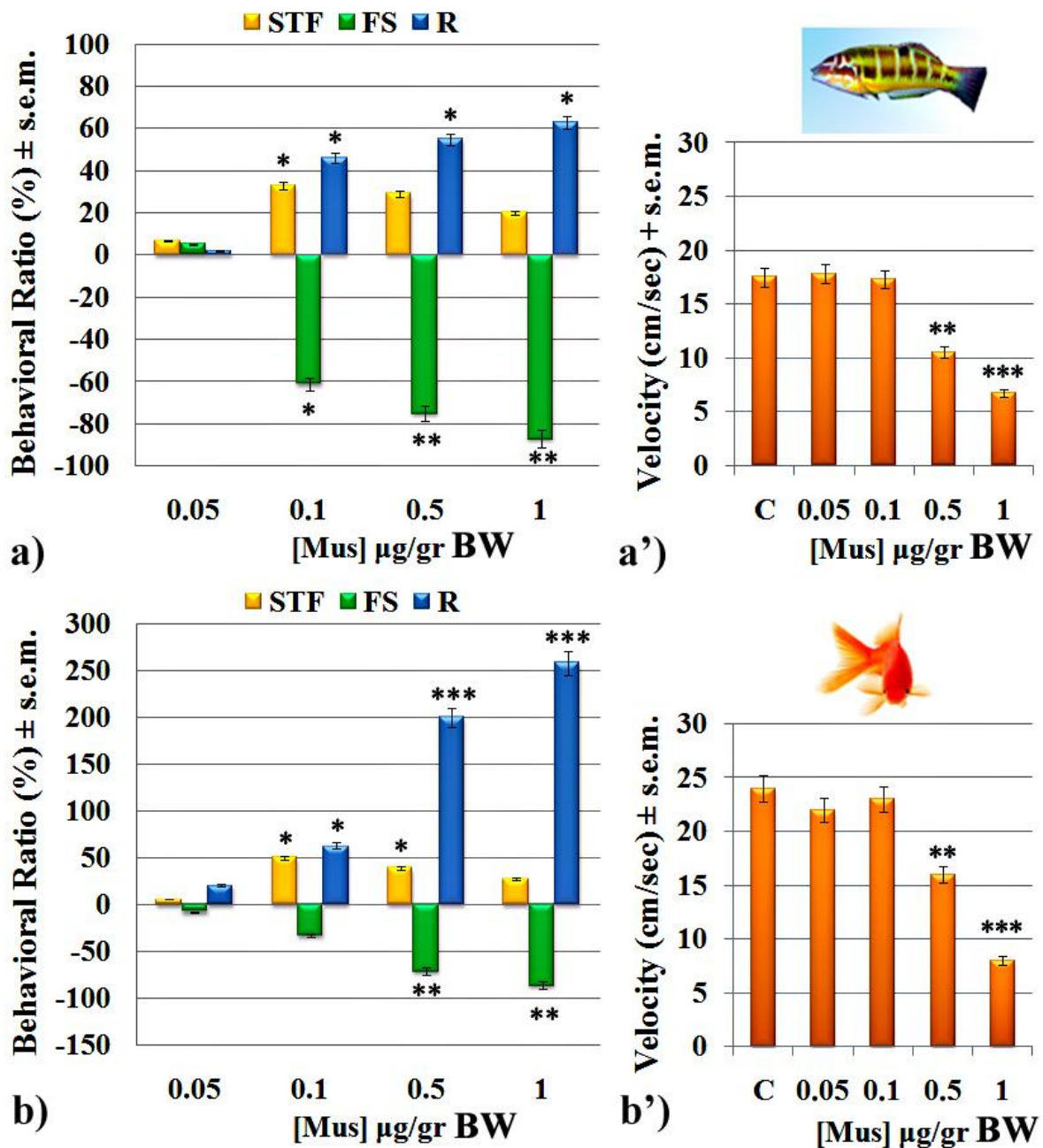


Fig. 4.19 Gli effetti delle differenti dosi di MUS testate sulle attività comportamentali di *Thalassoma pavo* (a) e *Carassius auratus* (b), sono mostrati come ratio (%) ± s.e.m rispetto ai controlli. La velocità media di nuoto in *Thalassoma pavo* (a') e *Carassius auratus* (b') registrata in seguito al trattamento i.p. con le diverse dosi di MUS è espressa come cm/sec ± s.e.m. L'analisi comportamentale è stata condotta monitorando gli animali durante la prima ora post-trattamento, e le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

Il successivo blocco di GABA_AR, attraverso al somministrazione i.p. dell'antagonista BIC, ha prodotto significative alterazioni comportamentali sia in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*. In particolare, alla dose di 1 µg/gr di BW, BIC induceva un moderato decremento nel tempo speso dagli animali in STF; un tale decremento è stato osservato anche per la dose di 2 µg/gr di BW e diventava di entità elevata alla dose di 5 µg/gr di BW. Le dosi di 2 e 5 µg/gr di BW erano caratterizzate da un moderato decremento di R, associato ad un moderato ed elevato incremento del FS, rispettivamente in *Carassius auratus* e *Thalassoma pavo*. (Fig. 4.20 a,b) Tuttavia, ad un'analisi più approfondita, l'incremento nell'attività locomotoria che caratterizzava le dosi più alte di BIC non era dovuto ad un reale incremento in FS ma ad uno specifico pattern comportamentale, caratterizzato da improvvisi scatti di nuoto convulsivo, con perdita del tipico asse di orientamento del corpo, alternati a periodi di inattività con iperventilazione. Tale pattern comportamentale, definito come nuoto convulsivo (Convulsive Swimming; CS), alla dose di 2 µg/gr di BW costituiva solo il 4% del totale dell'attività locomotoria di *Thalassoma pavo*, mentre alla dose di 5 µg/gr di BW era responsabile del 62% di tutta l'attività locomotoria. Nel caso di *Carassius auratus*, la BIC già alla dose di 2 µg/gr di BW induceva un pattern di CS pari al 55% del totale dell'attività locomotoria di tale teleosteo, che raggiungeva addirittura l'82% del tempo alla dose di 5 µg/gr di BW (Fig. 4.20 a',b'). Inoltre, come conseguenza degli episodi di CS, durante i quali la velocità del nuoto risultava aumentata in maniera molto elevata (oltre 160% in *Thalassoma pavo* ed oltre 180% nel caso di *Carassius auratus*), gli animali coprivano una maggiore distanza, che in *Thalassoma pavo* era elevata (+67%) e molto elevata (+110%), rispettivamente per le dosi di 2 e 5 µg/gr di BW. Nel caso di *Carassius auratus*, l'incremento della distanza percorsa era molto elevato per entrambe le dosi di 2 µg/gr di BW (+120%) e 5 µg/gr di BW (+670%).

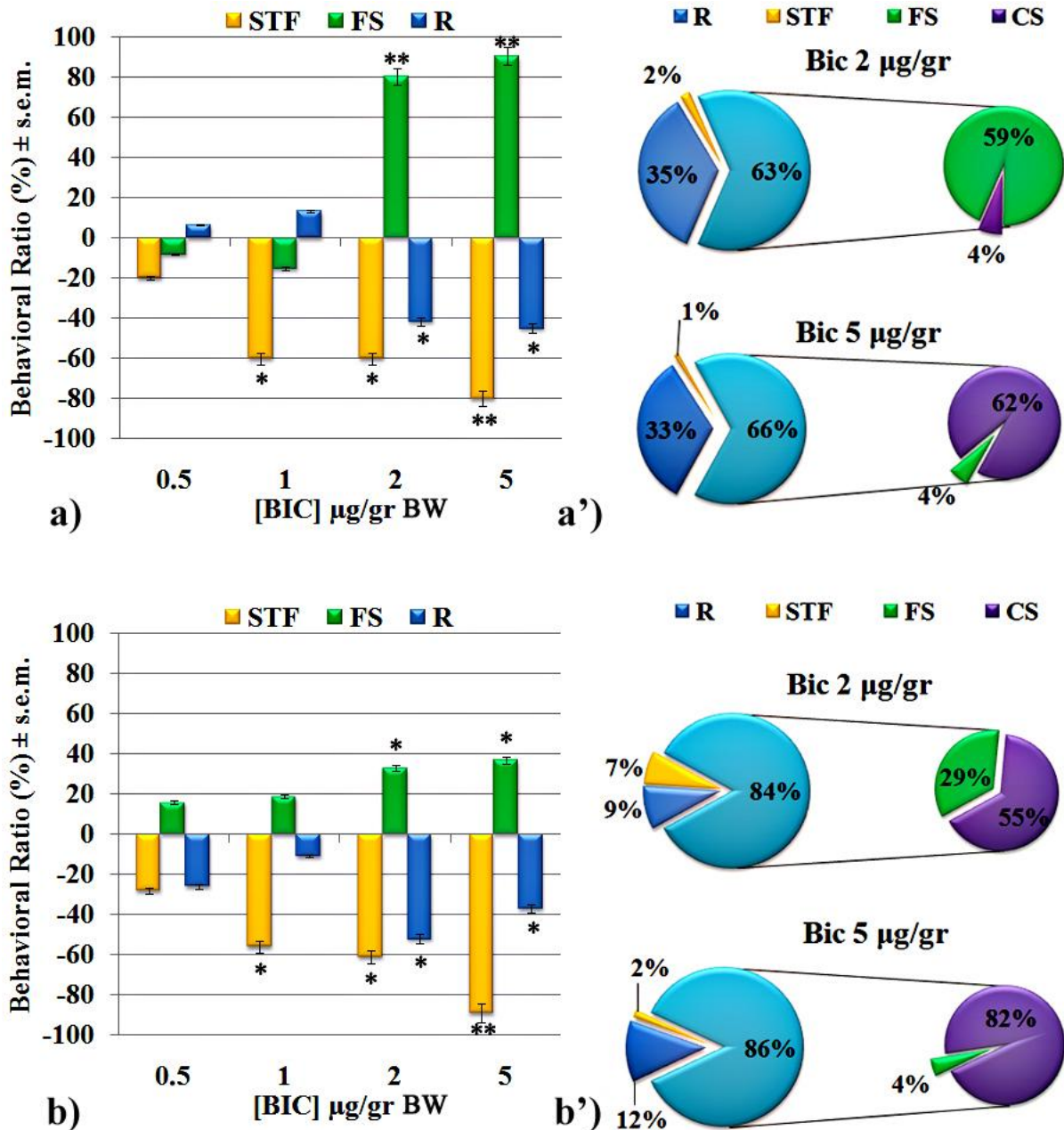


Fig. 4.20 Gli effetti comportamentali delle differenti dosi di BIC somministrate in *Thalassoma pavo* (a) e *Carassius auratus* (b), sono mostrati come ratio (%) ± s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). Attività comportamentali in *Thalassoma pavo* (a') e *Carassius auratus* (b'), mostrate come % di tempo spesa in ciascuna categoria, registrate in seguito a trattamento i.p. con BIC alle dosi di 2 e 5 µg/gr di BW. L'analisi comportamentale è stata condotta monitorando gli animali durante la prima ora post-trattamento, e le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

L'analisi molecolare sui livelli di trascritto di ORXR ha permesso di verificare che le alterazioni comportamentali indotte dall'attivazione/blocco di GABA_AR erano associate a modificazioni nel pattern di espressione di ORXR. Nel caso di *Thalassoma pavo*, il blocco di GABA_A indotto dalla BIC determinava una generale *down-regulation* del recettore ORXergico in tutte le aree encefaliche considerate. In particolare *down-regulations* moderate sono state osservate a livello telencefalico in Dm e, a livello mesencefalico, in OTec, mentre a livello diencefalico (NLTm ed NPGm) e nell'area mesencefalica dei Tlo si osservava una *down-regulation* di entità elevata. A livello di CV si è riscontrato invece una diminuzione molto elevata nel pattern di espressione dell'mRNA per ORXR. L'unica eccezione a questo trend generale è rappresentata da SCN in cui è stata osservata un'elevata *up-regulation*. Sempre nel teleosteo marino, il trattamento con MUS era in grado di indurre moderate *down-regulations* sia a livello diencefalico (NLTm e NPGm) che mesencefalico (Tlo). Una moderata *up-regulation* è stata riportata nell'area telencefalica Dm. Per quanto concerne *Carassius auratus*, l'azione del MUS risultava in una moderata *up-regulation* di ORXR a livello telencefalico come osservato in Dm e Vd, mentre il mesencefalo (TLA) esprimeva una elevata *up-regulation*. Tale trattamento era anche responsabile di un'elevata *down-regulation* in NLR. Anche nel teleosteo d'acqua dolce, il trattamento con BIC ha avuto effetti opposti a quelli del MUS non solo a livello comportamentale ma anche sul pattern di espressione di ORXR. Infatti, una moderata *down-regulation* caratterizzava le aree telencefaliche Dm, DI e Vd, mentre a livello diencefalico era presente una generale *up-regulation*, con valori di entità moderata ed elevata, rispettivamente, in NLR ed LHA. Infine, la regione mesencefalica presentava una moderata *up-regulation* in OTec e un'elevata *down-regulation* in TLA (Fig. 4.21).

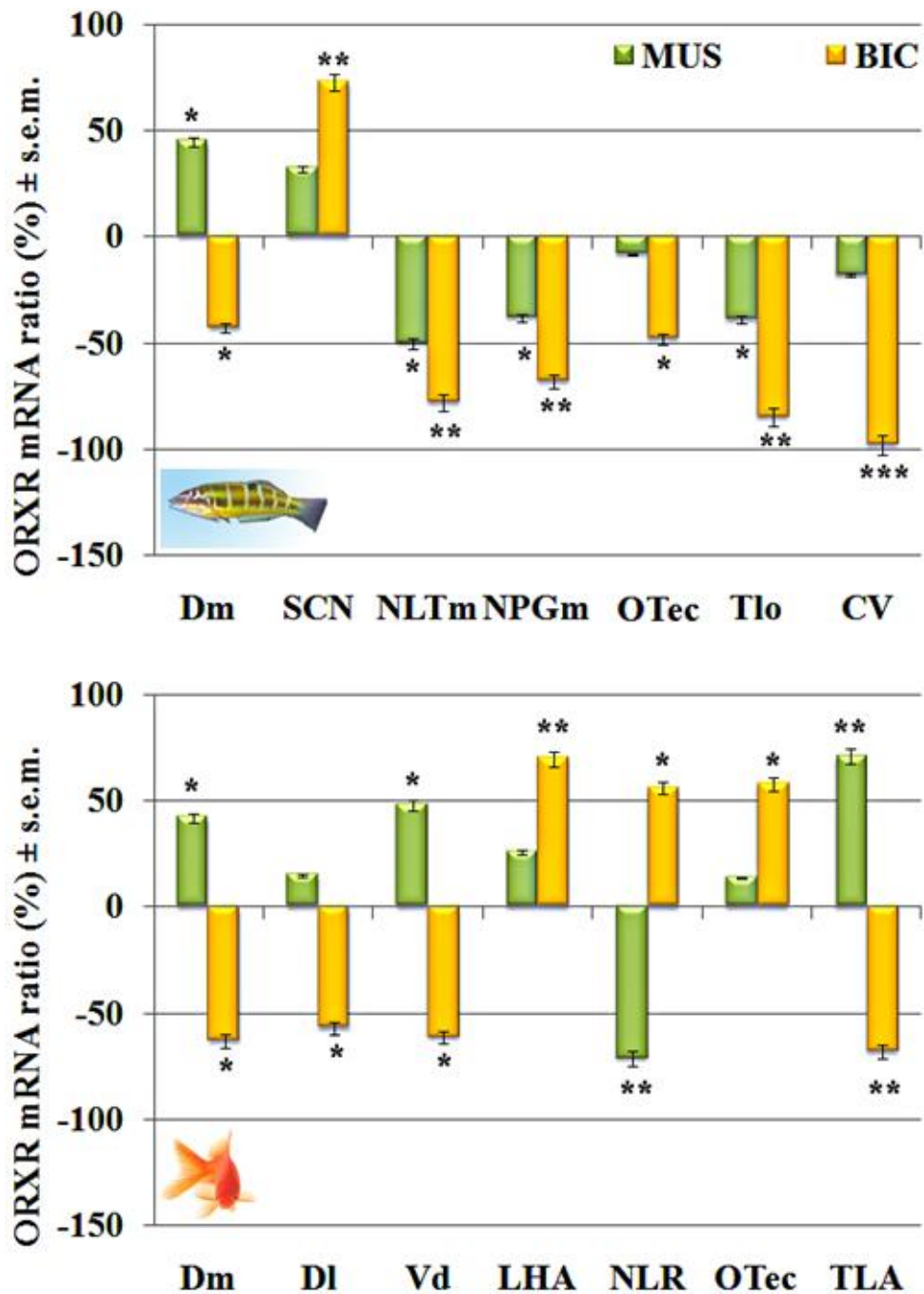


Fig.4.21 Il pattern di espressione di ORXR in seguito a trattamento con MUS 0.1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW e BIC 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW in *Thalassoma pavo* (sopra) e in *Carassius auratus* (sotto) è riportato come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Abbreviazioni: CV= valvola del cervelletto; Dm e DI= nuclei mediale e laterale del telencefalo dorsale; LHA= area ipotalamica laterale; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; NLTm= parte mediale del nucleo tuberale laterale; NLR= nucleo del recesso laterale; OTec= tetto ottico; SCN= nucleo sovra chiasmatico; TLA= tori laterali; Tlo= tori longitudinali; Vd= nucleo dorsale del telencefalo ventrale.

Anche in questa parte del mio lavoro di dottorato, l'attenzione è stata rivolta all'analisi neurodegenerativa in *Thalassoma pavo* (l'unico modello sperimentale che aveva riportato danni neuronali negli studi da me condotti in precedenza). In questo caso, l'ACS ha evidenziato la presenza di una colorazione argirofilica molto lieve, localizzata prevalentemente a livello diencefalico, negli animali trattati con MUS. Al contrario, in seguito al trattamento con BIC è stata osservata una notevole reazione argirofilica in particolare in alcune regioni mesencefaliche quali OTec. L'analisi ultrastrutturale ha confermato la presenza di danno neuronale nelle stesse aree che sono risultate positive all'ACS; infatti, nel caso del trattamento con MUS sono stati osservati pochi e circoscritti segni di morte cellulare, solo in un numero limitato di neuroni. Nel caso del trattamento con BIC, invece, il danno cellulare risultava notevolmente più esteso, coinvolgendo un numero maggiore di cellule neuronali che, in molti casi, risultavano completamente degenerate con la perdita degli organuli cellulari e la presenza di un'evidente frammentazione delle membrane nucleare e cellulare. È inoltre interessante notare una notevole riduzione del danno neuronale quando MUS e BIC sono stati somministrati contemporaneamente; tali effetti erano evidenziati sia dalla moderata reazione argirofilica, concentrata prevalentemente a livello diencefalico (NPGm) e di CV, che dal TEM (Fig. 4.22).

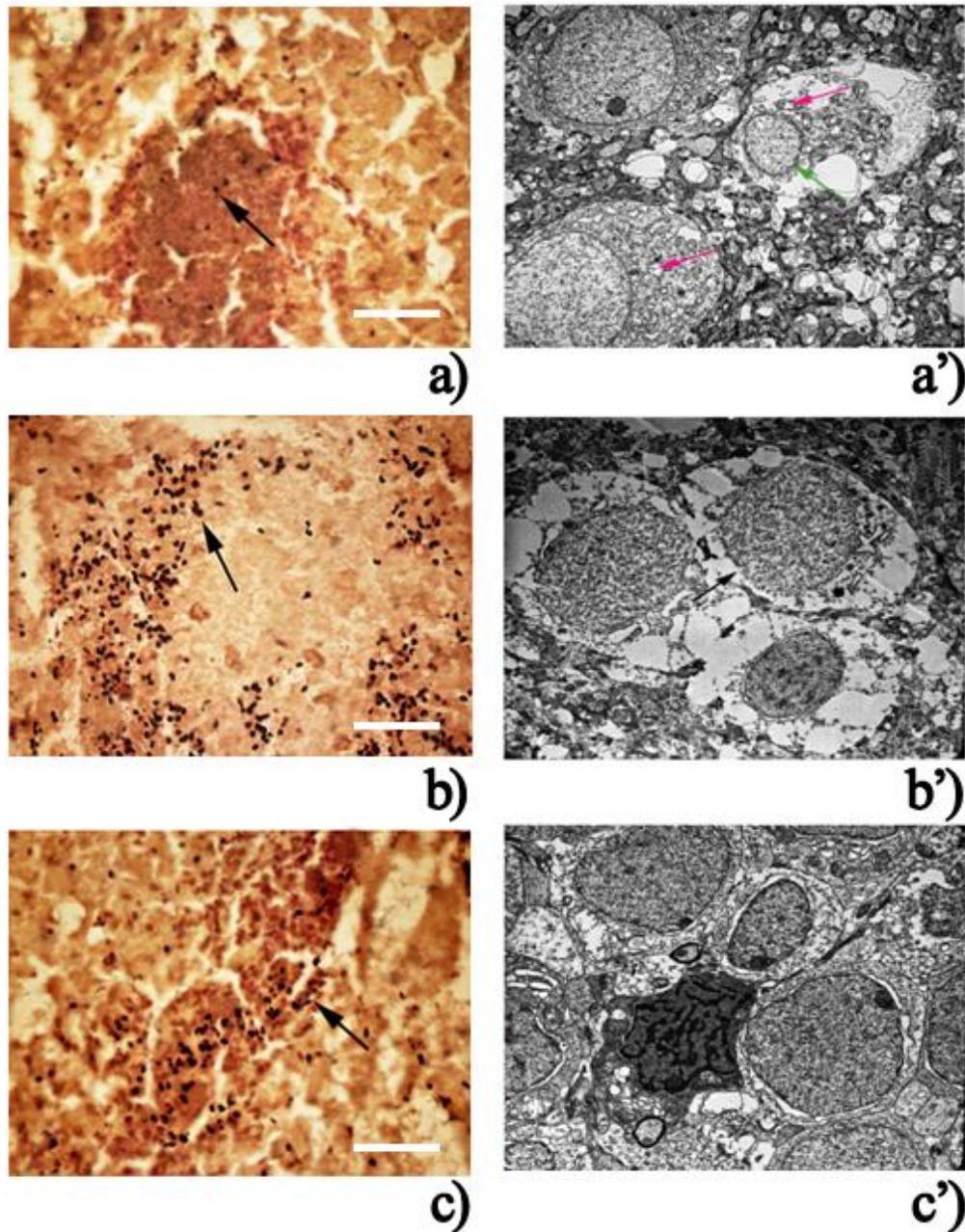


Fig. 4.22 Sezioni encefaliche rappresentative osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS (a,b,c) e aree corrispondenti processate per l'analisi ultrastrutturale al TEM (a',b',c') di esemplari di *Thalassoma pavo* trattati con MUS 0.1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW (a,a'), BIC 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW (b,b'), e MUS+BIC (0.1/1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW; c.c'). In (a, c) sono evidenziati a livello di NPGm particolari della reazione argirofilica (freccie nere), in (a') il rigonfiamento mitocondriale (freccia viola) e la condensazione cromatinica in prossimità della membrana nucleare (freccia verde), in (b) un particolare di Tlo in cui è evidente la reazione argirofilica (freccia nera) e in (b') la disgregazione delle membrane nucleari e cellulari (freccia nera) a livello della medesima area. Scale bar: a,c 1cm= 60 μm ; b 1cm=40 μm ; Magnification TEM: a'= 4400X; b'=3000X; c'=7000X.

Subunità α di GABA_AR: Zolpidem e Diazepam

I risultati sulla stimolazione/blocco di GABA_AR, ottenuta mediante la somministrazione di MUS/BIC, hanno evidenziato che nei nostri modelli sperimentali, tale neurorecettore gioca un ruolo cruciale nella modulazione del comportamento alimentare nei teleostei. Alla luce di tali dati e allo scopo di una maggiore comprensione del ruolo di GABA_AR nella modulazione delle attività comportamentali ORX-indotte, è stata indagata l'azione della subunità α di GABA_AR con particolare attenzione al comportamento alimentare. A tal proposito, sono stati valutati gli effetti di un agonista benzodizepinico, DZP, e non-benzodiazepinico, ZOL, sul comportamento alimentare di *Carassius auratus*. L'analisi comportamentale ha evidenziato un incremento in STF elevato alla dose di 0.5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW e molto elevato alle dosi di 1, 2 e 5 $\mu\text{g}/\text{gr}$, di BW mentre alle dosi di 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW non è stata evidenziata alcuna differenza significativa rispetto ai controlli. Quando sono stati esaminati gli effetti del DZP, è emerso che tale agonista per il sito BZD, già alla dose di 0.1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW era in grado di indurre un moderato incremento in STF, incremento che diventava elevato alla dose di 0.5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW e molto elevato per le dosi testate comprese tra 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW; inoltre, un elevato incremento in STF è stato osservato anche alla dose di 20 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW (Fig. 4.23). La notevole stimolazione di STF, prodotta sia dallo ZOL che dal DZP, era associata con una conseguenziale riduzione del tempo speso dagli animali nelle attività di FS e R. Infatti, l'incremento in STF registrato per lo ZOL alla dose 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, dose che ha prodotto i massimi effetti su STF, era associato con un moderato ed elevato decremento, rispettivamente, nel FS ed in R; nel caso del DZP, alla dose di 5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, dose che ha indotto i massimi effetti su STF, l'incremento in tale attività era associato ad un elevato decremento sia in FS che in R (Fig. 4.23). È inoltre interessante notare che l'azione dello ZOL e del DZP sulle attività comportamentali di *Carassius auratus* era completamente bloccata quando somministrati in concomitanza con 4 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW di FLU, antagonista competitivo per il sito BZD, confermando che proprio tale sito era quello responsabile della stimolazione di STF indotta da ZOL e DZP (Fig. 4.23).

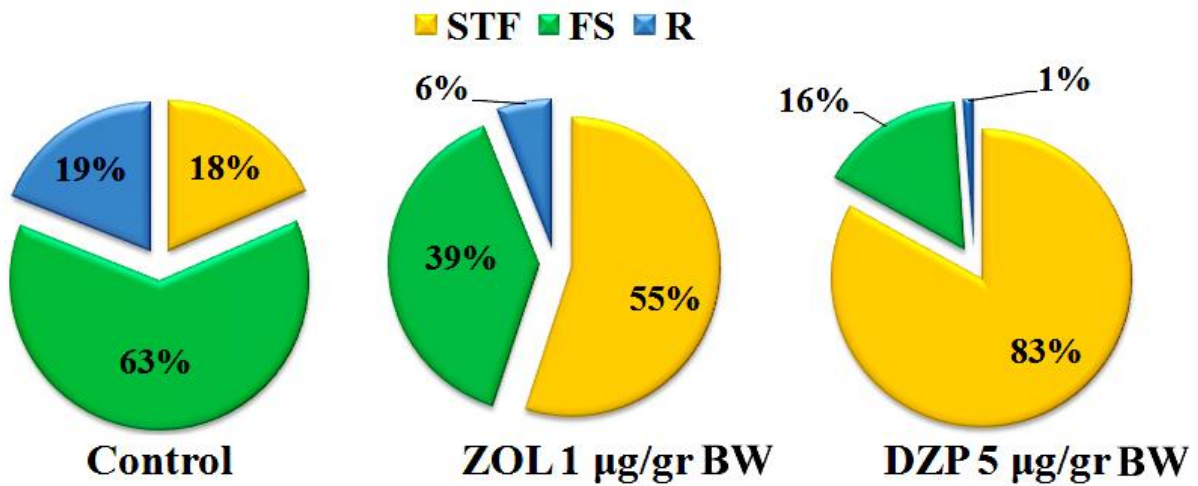
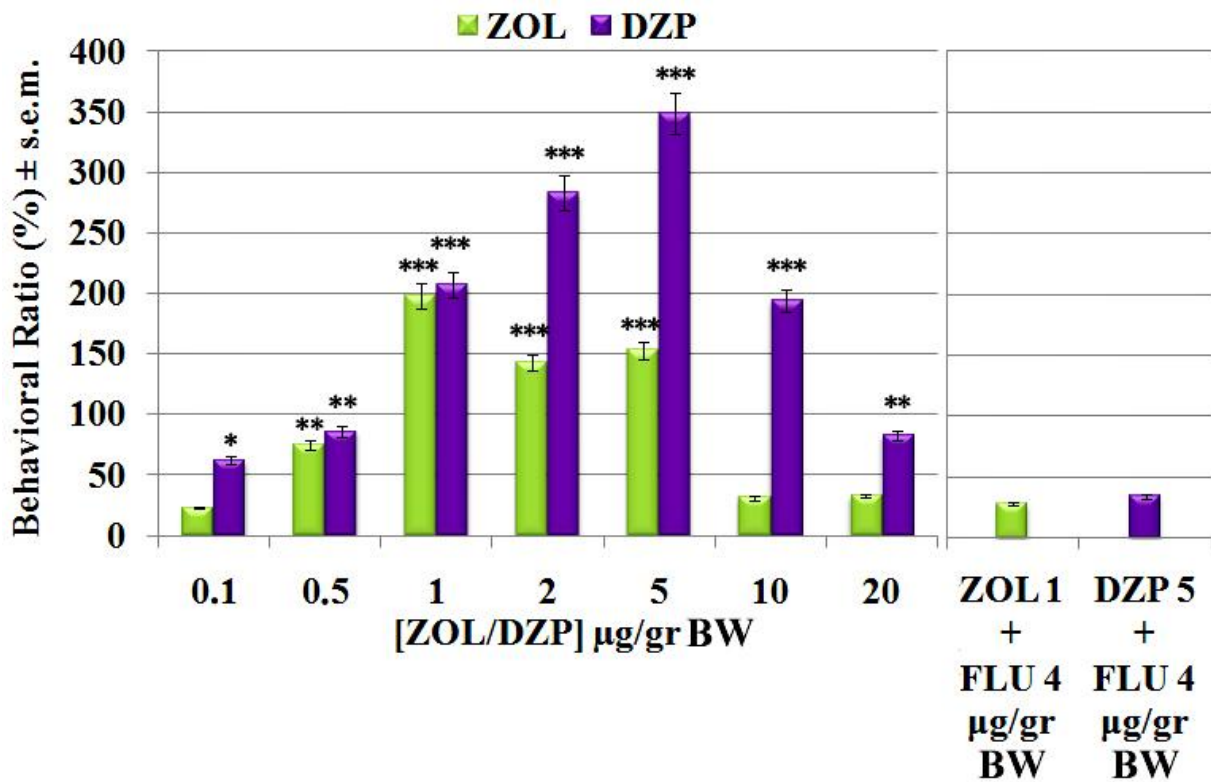


Fig. 4.23 *Sopra*: Gli effetti sullo STF delle differenti dosi di ZOL e DZP in *Carassius auratus* sono espressi come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). *Sotto*: Tempo (%) speso dagli animali di controllo (NaCl 0,9%) e dagli animali trattati i.p. con ZOL 1 μ g/gr di BW e DZP 5 μ g/gr di BW nelle diverse categorie comportamentali. L'analisi comportamentale è stata condotta monitorando gli animali durante la prima ora post-trattamento, e le immagini, acquisite mediante videocamera, sono state analizzate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

Analogamente a quanto già verificato nel caso delle alterazioni molecolari indotte dalla modulazione della subunità β di GABA_AR, anche in questo caso si è potuto constatare che le modificazioni comportamentali ottenute in seguito all'attivazione della subunità α di GABA_AR, mediante trattamento con ZOL e DZP, erano associate ad importanti modifiche sito-specifiche del pattern di espressione di ORXR. In particolare a livello telencefalico, sia lo ZOL che il DZP inducevano effetti eterogenei come evidenziato dalle moderate *up-regulations* del Dm, associate con le moderate *down-regulations* del Vl. A livello ipotalamico, è stato osservato che entrambi gli agonisti della subunità α di GABA_AR inducevano una *up-regulation* elevata e molto elevata nel SCN, in seguito al rispettivo trattamento con DZP e con ZOL. Inoltre, mentre lo ZOL determinava una moderata *up-regulation* a livello di LHA, nella stessa area il trattamento con DZP causava una elevata *down-regulation*. Effetti divergenti sono stati osservati anche a livello del tubercolo posteriore, ed in particolare in Tpp, dove mentre lo ZOL induceva una moderata *down-regulation* di ORXR, il trattamento con DZP era responsabile in tale area di un'elevata *up-regulation* nel trascritto per ORXR. Nel talamo è stato possibile osservare una generale *down-regulation* di ORXR, che risultava moderata in DT in seguito al trattamento con lo ZOL, mentre nel caso del DZP una elevata *down-regulation* caratterizzava sia DT che VT. Nella regione mesencefalica del OTec sia lo ZOL che il DZP inducevano una *up-regulation* molto elevata mentre in TLA è stato possibile riscontrare una *up-regulation* della stessa entità in seguito a trattamento con ZOL; nella stessa area, il DZP causava solo una moderata *up-regulation* del trascritto di ORXR. Sempre a livello mesencefalico, una moderata *down-regulation* è stata osservata nella regione tegmentale di DTL in seguito al trattamento con DZP. Inoltre, sia lo ZOL che il DZP inducevano una moderata *up-regulation* dell'espressione di ORXR a livello cerebellare come osservato in CV (Fig. 4.24).

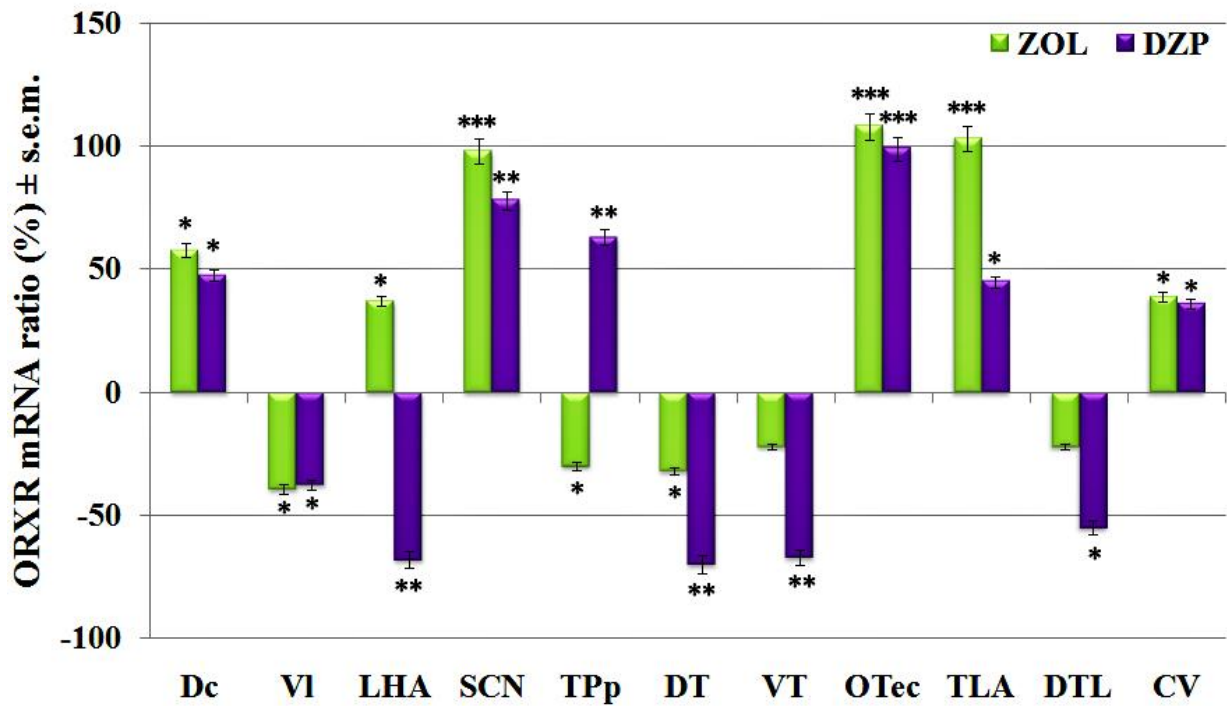


Fig.4.24 Il pattern di espressione di ORXR in seguito a trattamento i.p. con ZOL 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW e DZP 5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW in *Carassius* è riportato come ratio (%) \pm s.e.m. rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Abbreviazioni: CV= valvola del cervelletto; Dc= nucleo centrale del telencefalo dorsale; DT=talamo dorsale; LHA= area ipotalamica laterale; OTec= tetto ottico; SCN= nucleo sovra chiasmatico; TLA= tori laterali; TPp= nucleo periventricolare del tubercolo posteriore; VI= nucleo dorsale e laterale del telencefalo ventrale; VT= talamo ventrale.

4.7 Correlazione tra STF e quantità di cibo consumata

A questo punto ci si è chiesti se la stimolazione di STF indotta da ORX-A e dagli agonisti e antagonisti di GABA_AR fosse correlata con un reale aumento del cibo ingerito dagli animali. Ho perciò proceduto a misurare la quantità di cibo consumato da *Carassius auratus* quando questo era sottoposto a ORX-A, MUS, BIC, ZOL e DZP e da queste analisi ho potuto constatare che nel caso dell'ORX-A e delle droghe specifiche per la subunità β di GABA_AR, il STF non era associato ad un incremento del food intake. Al contrario, gli agonisti della subunità α di GABA_AR erano in grado di indurre uno stato di iperfagia, come dimostrato dall'incremento elevato e molto elevato del food intake negli animali trattati, rispettivamente, con ZOL e DZP (Fig.4.25).

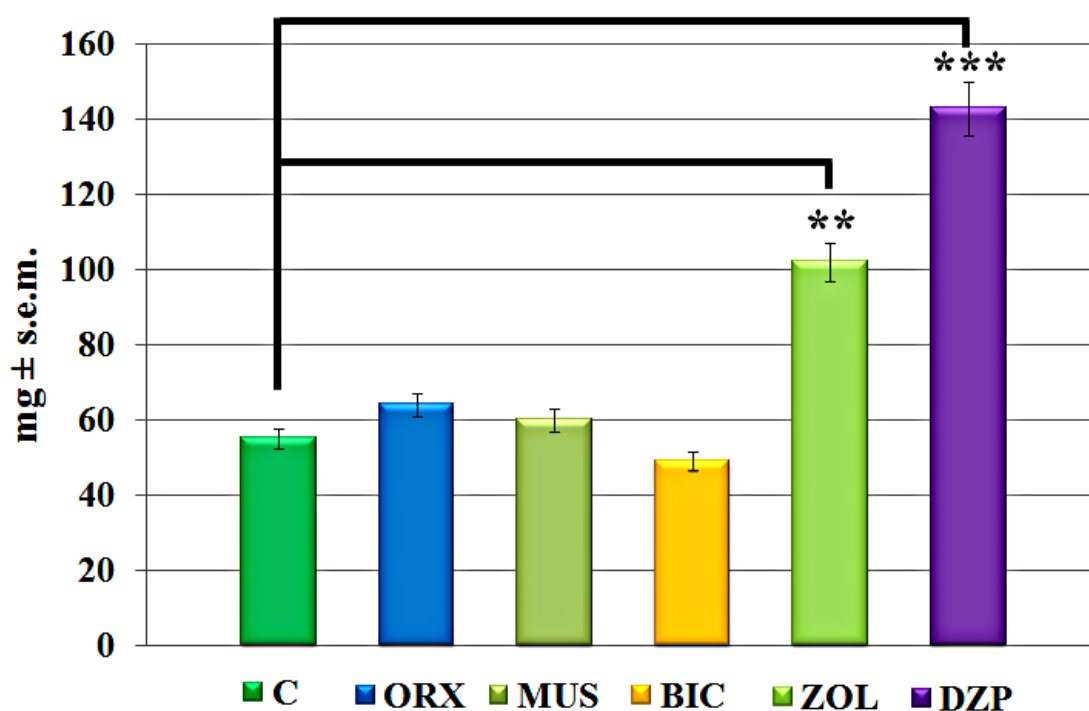


Fig. 4.25 La quantità di cibo consumata dagli animali controllo (C) e trattati i.p. con ORX 10 ng/gr di BW, MUS 0.1 μ g/g di BW r, BIC 1 μ g/gr di BW, ZOL 1 μ g/gr di BW e DZP 5 μ g/gr di BW, è espressa come milligrammi (mg) di cibo ingerito per animale \pm s.e.m. durante la prima ora post-trattamento. Analisi statistica ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

4.8 Analisi delle funzioni complesse

4.8.1 Capacità di apprendimento: T-maze test

I dati appena riportati mi hanno indotto a chiedermi quale fosse il motivo per cui i pesci erano spinti verso il cibo senza effettivamente consumarlo. Mi sono perciò chiesto se fosse possibile che anche nei pesci il comportamento alimentare sia collegato a processi più complessi, quali quelli dell'apprendimento e della ricompensa. Per questo motivo, ho innanzitutto proceduto a testare la capacità di apprendimento di *Carassius auratus* mediante la metodica del T-maze test. Durante questo test sono state testate anche le diverse associazioni tra uno stimolo visivo con una fonte di cibo, al fine di determinare l'associazione stimolo-risposta ottimale per indurre un condizionamento efficace nel nostro modello sperimentale, e gli effetti dell'ORX-A su tale associazione. L'analisi dei dati, in cui è stato valutato il tempo impiegato dagli animali per raggiungere il braccio dell'apparato associato con la fonte di cibo, parametro definito come latenza, ha evidenziato che gli animali mostravano un moderato decremento nella latenza già in seguito alla terza sessione di condizionamento specialmente quando gli stimoli discriminati tra le diverse braccia del maze erano costituiti da input luminosi di colore diverso (Blu/Rosso). Dopo quattro sessioni di condizionamento un moderato decremento è stato osservato anche per gli animali condizionati a discriminare tra il braccio destro e sinistro del maze (Dx/Sx) e per gli animali in cui lo stimolo discriminante era costituito da un braccio del maze illuminato da luce bianca e un braccio non illuminato (Light/Dark). In seguito alla quinta sessione di condizionamento è stata osservata un'elevata riduzione nella latenza in tutti i gruppi sperimentali condizionati, indipendentemente dallo stimolo discriminante utilizzato. Tale riduzione si manteneva stabile nel tempo, come verificato in seguito all'analisi delle *performances* dopo la sesta e settima sessione di condizionamento (Fig.4.26).

Sulla base di tale screening, sono stati valutati anche gli effetti dell'ORX-A sulle capacità di apprendimento di *Carassius auratus* tramite le *performances* effettuate al T-maze test. Da tale analisi è emerso che in seguito al trattamento con ORX-A gli animali presentavano un significativo miglioramento delle *performances*, come dimostrato dalla moderata riduzione della latenza quando la discriminazione tra le braccia del maze era esclusivamente spaziale (braccio Dx/Sx) o tra il braccio illuminato/non illuminato (Light/Dark). È interessante notare che la riduzione nella latenza indotta dall'ORX-A diventava elevata quando lo stimolo discriminante era costituito dagli *inputs* luminosi di diverso colore (Blu/Rosso), (Fig.4.27).

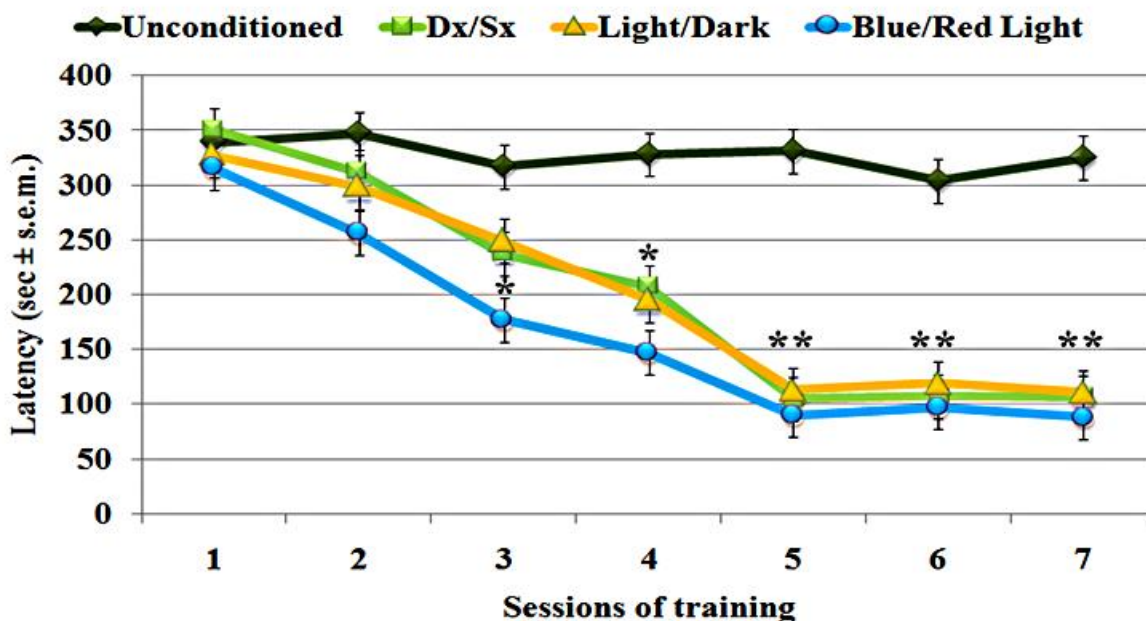


Fig.4.26 La quantità di tempo impiegata dagli animali per raggiungere il braccio del maze associato con la fonte di cibo (latenza) è espresso in secondi (sec) \pm s.e.m. nelle diverse sessioni di condizionamento e nei diversi gruppi sperimentali condizionati a discriminare tra braccio destro e sinistro del maze (Dx e Sx, linea verde), tra braccio illuminato e non illuminato (Light/Dark, linea arancio) e tra braccio illuminato con luce blu o rossa (Blue/Red Light, linea azzurra) e in animali non condizionati (Unconditioned, linea verde scuro). Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

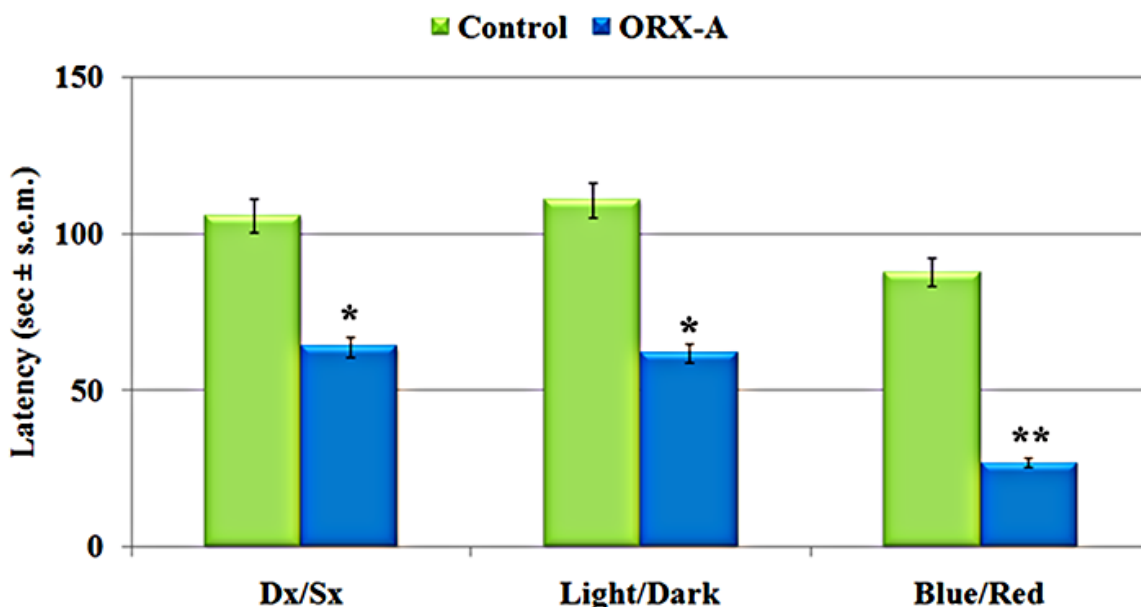


Fig.4.27 La latenza, misurata per i diversi gruppi sperimentali dopo la settima sessione di condizionamento, in animali controllo (NaCl 0,9%) e trattati con ORX-A 10 ng/gr di BW è espressa in secondi (sec) \pm s.e.m. Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Newman-Keul's test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

4.8.2 Processi di ricompensa: Conditioned Place Preference

Stabilite le abilità di apprendimento in *Carassius auratus* e la capacità dell'ORX-A di influenzare tale attività, in questo lavoro sono stati anche analizzati gli effetti di tale neuropeptide e di GABA_AR sui processi di ricompensa, attraverso l'utilizzo del paradigma CPP. Sulla base dei risultati ottenuti al T-maze, sono stati scelti proprio gli stimoli luminosi colorati (Blu e Rosso) come stimoli associati alla presenza/assenza di una ricompensa alimentare. I dati ottenuti al CPP, analogamente a quanto osservato al T-maze, hanno evidenziato che in seguito a 5 sessioni di condizionamento gli animali mostravano una inversione molto elevata del PP iniziale rispetto agli animali non condizionati, con un Δ PP medio del 133 % (Fig. 4.28). Tale inversione si manteneva stabile anche in seguito ad ulteriori sessioni di condizionamento. Per questo motivo l'ottava sessione di condizionamento è stata scelta per analizzare gli effetti di ORX-A e di GABA_AR sul Δ PP.

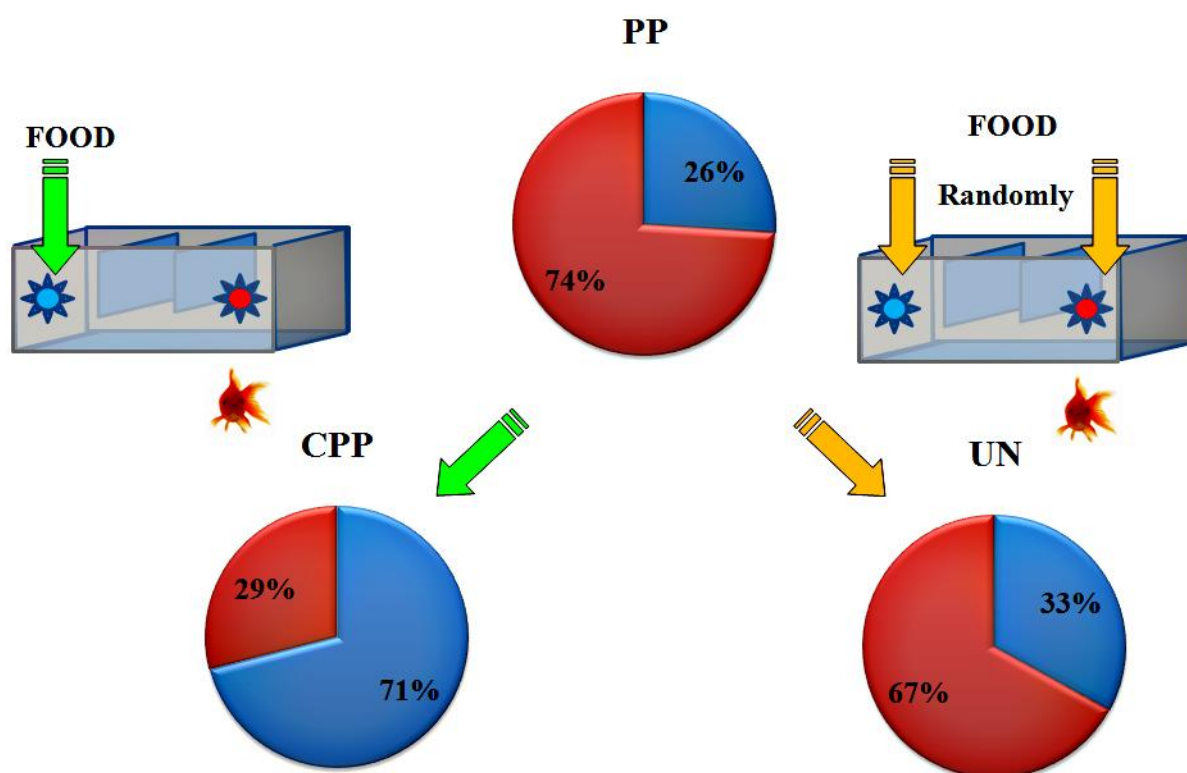


Fig.4.28 Rappresentazione schematica degli effetti del condizionamento sul Δ PP in animali con PP iniziale per il lato dell'apparato associato al colore rosso in seguito ad 8 sessioni di condizionamento.

In questa parte l'analisi al CPP ha permesso di evidenziare che l'ORX-A induceva un significativo miglioramento nelle *performances* degli animali inducendo un elevato incremento del Δ PP. Un incremento, se pur di moderata intensità, è stato osservato anche negli animali trattati con DZP. Al contrario, BIC causava un moderato decremento dei valori del Δ PP (Fig. 4.29, 4.30).

Sulla base degli effetti osservati e al fine di verificare la presenza di un'eventuale azione sinergica o antagonistica tra i sistemi ORXergico e GABA_ARergico sui meccanismi responsabili dei processi di ricompensa, sono stati testati gli effetti dell'azione di GABA_AR sul Δ PP-ORX-indotto. È stato così possibile verificare che, quando l'ORX-A veniva somministrata in concomitanza a BIC, tale blocco era responsabile di un decremento molto elevato nel Δ PP-ORX-indotto. Inoltre, il trattamento simultaneo con ORX-A + ZOL e DZP, ha evidenziato, rispettivamente, la presenza di un decremento moderato ed elevato nel Δ PP-ORX-indotto (Fig. 4.31)

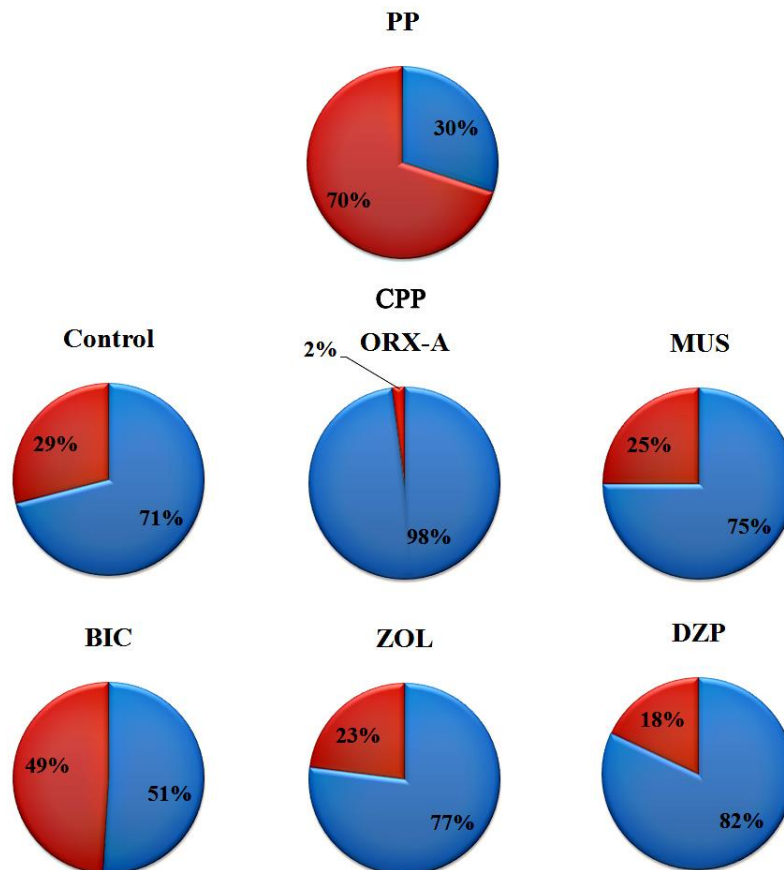


Fig.4.29 Rappresentazione schematica della percentuale di tempo trascorsa nel compartimento associato alla ricompensa alimentare (in azzurro) valutata dopo 8 sessioni di condizionamento nei controlli (NaCl 0,9%) ed in seguito al trattamento i.p. con ORX-A 10 ng/gr di BW, MUS 0.1 μ g/gr di BW, BIC 1 μ g/gr di BW, ZOL 1 μ g/gr di BW e DZP 5 μ g/gr di BW.

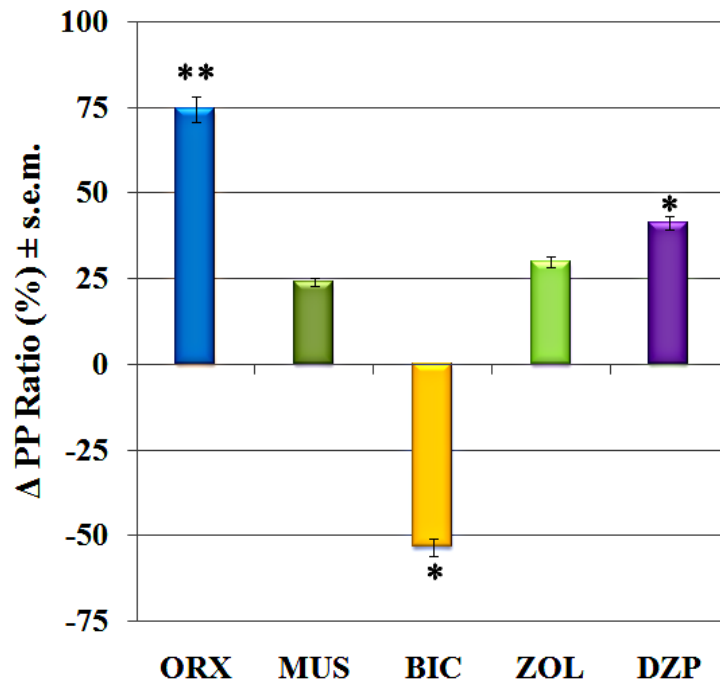


Fig.4.30 Il ΔPP , misurato dopo l'ottava sessione di condizionamento, per i diversi gruppi sperimentali trattati con ORX-A 10 ng/gr di BW, MUS 0.1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, BIC 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW, ZOL 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW e DZP 5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW è espresso come ratio (%) \pm s.e.m rispetto ai controlli (NaCl 0,9%). Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

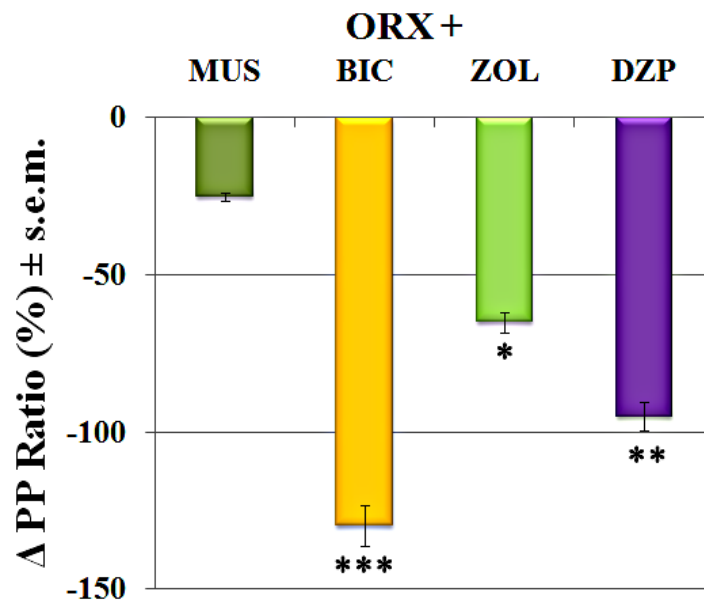


Fig.4.31 Il ΔPP , misurato dopo l'ottava sessione di condizionamento, per i diversi gruppi sperimentali trattati simultaneamente con ORX-A 10 ng/gr di BW più MUS 0.1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW o BIC 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW o ZOL 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW o DZP 5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ di BW è espresso come ratio (%) \pm s.e.m rispetto agli animali trattati con la sola ORX-A 10 ng/gr di BW. Analisi statistica: ANOVA con $\alpha=0.01$ – Dunnett's test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro costituisce il primo tentativo di valutare i meccanismi di cross-talking tra il sistema ORXergico e GABAergico nel controllo di alcune attività comportamentali e neuronali di due teleostei, *Thalassoma pavo*, un pesce marino e *Carassius auratus*, un pesce d'acqua dolce. Al momento, il sistema ORXergico è stato ampiamente studiato nei mammiferi nei quali rappresenta un sistema di neurotrasmissione importante per il successo di innumerevoli processi comportamentali vitali, quali il *feeding*, il ciclo sonno-veglia, l'attività locomotoria, la secrezione neuroendocrina, i processi di ricompensa e dipendenza oltre alle capacità mnemoniche (Selbach *et al.*, 2004; Harris e Aston-Jones, 2006; Sakurai, 2007). Solo di recente, tale sistema è stato oggetto di studio anche nei vertebrati non mammiferi nei quali agisce nella modulazione delle medesime attività dei mammiferi, dimostrando così un alto livello di conservazione non solo a livello strutturale ma anche a livello funzionale (Volkoff, 2006; Nakamachi *et al.*, 2006; Yokogawa *et al.*, 2007).

È noto che nei mammiferi le ORXs ipotalamiche agiscono mediante il legame a due sottotipi recettoriali ORX1R e ORX2R, ampiamente distribuiti a livello del SNC (Sakurai *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 2007). Contrariamente a ciò, in questo studio è stato possibile verificare la presenza di un solo ORXR in *Thalassoma pavo* (Facciolo *et al.*, 2009), come in *Carassius auratus* (dato non ancora pubblicato), con un'elevata omologia di sequenza nei confronti di ORX1R di *Rattus norvegicus*, nel primo caso, e una maggiore omologia con ORX2R di *Rattus norvegicus* nel secondo. Su tali basi, nel presente lavoro sperimentale, si è voluto verificare l'esistenza di un secondo sottotipo ORXR, ma l'utilizzo di diverse coppie di primers degenerati, costruite su regioni altamente conservate di entrambi gli ORXR dei mammiferi, non ha dato alcun risultato portandoci ad escludere la possibilità dell'esistenza di un secondo sottotipo recettoriale sia in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*. Tale ipotesi trova conferma nel fatto che anche in altri vertebrati non mammiferi e, in particolare, in *Gallus gallus* (Ohkubo *et al.*, 2003) e *Danio rerio* (Prober *et al.*, 2006), attualmente è stato identificato un solo ortologo per ORXR.

È da notare che il recettore identificato in *Danio rerio* ha presentato un maggior grado di omologia con ORX2R dei mammiferi (Prober *et al.*, 2006), in maniera simile a quanto riscontrato in questo lavoro anche per *goldfish*. La maggiore omologia dell'ortologo di ORXR in *Thalassoma pavo* con il recettore di tipo 1 dei mammiferi non sorprende comunque più di tanto se si considera che il suo pattern di espressione (Facciolo *et al.*, 2009) rispecchia quello di ORX1R, proprio nelle aree telencefaliche, diencefaliche e mesencefaliche (D'Almeida *et al.*, 2005) principalmente coinvolte nel comportamento alimentare e nell'attività locomotoria dei mammiferi (Nakamura *et al.*, 2000; Sutcliffe e De Lecea, 2002). In ogni caso la differenza nei livelli di omologia, riscontrate tra *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*, potrebbe essere dovuta a fattori tecnici in quanto, essendo

sequenze parziali, queste potrebbero rispecchiare regioni diverse di tale recettore. E' invece importante sottolineare che l'analisi della struttura secondaria delle sequenze di ORXR ha evidenziato che agli elevati livelli di omologia con i ORXRs di *Rattus norvegicus* corrispondeva la presenza di domini strutturalmente conservati che potrebbero rappresentare regioni critiche per la funzione di ORXR (Kukkonen *et al.*, 2002). I dati ottenuti ci permettono, quindi, di confermare che tale sistema filogeneticamente antico abbia un grado di conservazione molto elevato, mantenendo caratteristiche molecolari condivise (Alvarez e Sutcliffe, 2002). Anche i risultati dell'analisi molecolare sulle sequenze parziali della PPORX di *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus* hanno evidenziato elevati livelli di similarità e identità con le sequenze dei peptidi di altri teleostei (Kaslin *et al.*, 2004; Xu e Volkoff, 2007) e dei mammiferi (Sakurai *et al.*, 1998). Infatti, dall'analisi della sequenza della PPORX, identificata in entrambi i nostri modelli sperimentali, è emersa la presenza dei domini conservati che caratterizzano l'ORX-A di altri teleostei (Panula, 2009), quali la presenza di una sequenza spaziatrice interna alla sequenza dell'ORX-A, di un solo ponte disolfuro tra i residui di Cys 5 e la Cys 12 e dell'epitopo aa "SCKLY".

Sulla base delle sequenze nucleotidiche identificate, sono state disegnate specifiche sonde per ibridazione *in situ* che hanno consentito di verificare il pattern di espressione della PPORX e di ORXR in *Thalassoma pavo*, come in *Carassius auratus*. In entrambi, l'mRNA per la PPORX risultava espresso esclusivamente a livello ipotalamico, con elevati livelli di espressione nell'area ipotalamica laterale e livelli moderati nel nucleo del recesso laterale, confermando quanto osservato sia in *Danio Rerio* (Kaslin *et al.*, 2004) che in altri vertebrati mammiferi (De Lecea e Soutcliffe, 1999) e non mammiferi (Shibahara *et al.*, 1999; Singletary *et al.*, 2006). L'analisi del pattern di espressione di ORXR ha rivelato, invece, che esso risulta espresso in maniera eterogenea lungo tutto l'encefalo. La distribuzione da noi osservata si sovrappone alle aree in cui, in altri studi, è stata individuata la presenza di fibre ORXergiche sia in *Carassius auratus* (Nakamachi *et al.*, 2006) che in *Danio rerio* (Prober *et al.*, 2006), in accordo anche a quanto verificato nei mammiferi nei quali gli ORXRs si distribuiscono negli stessi siti dove poi si dirigono le proiezioni dei neuroni ORXergici (Kukkonen *et al.*, 2002).

Per quanto concerne gli effetti dell'ORX-A sulle attività comportamentali dei nostri modelli sperimentali, si è potuto evidenziare come tale neuropeptide sia in grado di influenzare principali attività, come il comportamento esplorativo ed alimentare. In particolare, un incremento molto elevato di STF è stato osservato in *Thalassoma pavo*, in seguito al trattamento con ORX-A 100 ng/gr di BW, e in *Carassius auratus*, in seguito a trattamento con ORX-A 10 ng/gr di BW. Tale effetto conferma il ruolo dell'ORX-A come uno dei principali fattori orexinogenici anche nei teleostei, come del resto già evidenziato da altri studi sempre in *Carassius auratus* (Volkoff *et al.*,

1999; Nakamachi et al., 2006). Il dato è anche in accordo con l'influenza reciproca tra il sistema ORXergico ed altri importanti sistemi ad azione orexinogenica/anorexigenica documentata in tale teleosteo (Huesa et al., 2005; Miura et al., 2007; Hoskins et al., 2008; Kojima et al., 2009). Si è potuto osservare come l'incremento di STF si associava ad una significativa riduzione del tempo di inattività degli animali, riduzione elevata nel caso di *Carassius auratus* e molto elevata in *Thalassoma pavo*; in quest'ultimo teleosteo si osservava anche un incremento molto elevato nel FS. Questi effetti sembrano ricalcare gli effetti insonnia-simili indotti dall'over-espressione del trascritto della PPORX in *Danio rerio* (Prober et al., 2006), suggerendo che il sistema ORXergico gioca un ruolo chiave nella modulazione dei comportamenti stato-dipendenti, quali il comportamento alimentare ed esplorativo, attraverso la sua azione sul ciclo sonno-veglia non solo nei mammiferi (De Lecea, 2009) ma anche nei teleostei (Nakamachi et al., 2006; Yokogawa et al., 2007).

Come detto in precedenza, le modificazioni comportamentali indotte dall'ORX-A erano correlate ad una variazione sito-specifica nei livelli di trascritto di tale recettore. Per entrambi i teleostei, è stata osservata, infatti, una generale *up-regulation* di ORXR a livello mesencefalico e diencefalico, aree critiche sia per il controllo delle attività stato-dipendenti che del bilancio energetico, nei mammiferi (Szymusiak e McGynty, 2008) come nei teleostei (Matsuda et al., 2009). È inoltre importante ricordare che, nel caso di *Carassius auratus*, gli effetti comportamentali osservati in seguito al trattamento con una singola dose di ORX-A 10 ng/gr erano sorprendentemente associati anche ad una *up-regulation* molto elevata di ORXR a livello telencefalico, area che nei teleostei gioca un ruolo cruciale nella modulazione dei processi di apprendimento (Portavella e Vargas, 2005; Rodriguez et al., 2002).

L'analisi morfologica sugli eventuali effetti neurodegenerativi, non ha rilevato la presenza di alcun danno neuronale in seguito a trattamento acuto in *Carassius auratus*. Al contrario, in *Thalassoma pavo*, è stata osservata un'intensa colorazione argirofilica localizzata principalmente a livello ipotalamico e mesencefalico, in associazione ad evidenti segni ultrastrutturali di danno cellulare. Tali dati suggeriscono che l'esposizione a dosi relativamente alte di tale neuropeptide, per periodi prolungati, è in grado di produrre un danno neuronale simile agli effetti pro-apoptotici caspasi-dipendenti, indotti da dosi paragonabili di ORX-A, somministrata per tempi prolungati (Voisin et al., 2006). In quest'ottica è rientrata la valutazione delle condizioni fotoperiodiche che, agendo sulla regolazione del ciclo sonno-veglia, costituiscono uno dei principali modulatori delle attività stato-dipendenti nei mammiferi (Gillette e Tischkau, 1999) nei quali influenzano anche l'azione ORXergica (España et al., 2002). Sulla base di tali conoscenze, sono stati valutati gli effetti delle condizioni di fotoperiodo estremo (LP o DP) sulle attività comportamentali e neuronali ORX-A-

indotte di *Thalassoma pavo*. Lo studio comportamentale degli animali mantenuti in LP ha evidenziato la presenza di un drammatico incremento del tempo trascorso in STF che si associava con una conseguente riduzione molto elevata del tempo speso in FS e R. Al contrario, negli animali mantenuti in condizioni di DP, il trattamento con ORX-A ha prodotto una riduzione molto elevata di STF associata ad un moderato aumento del tempo di R.

L'applicazione del metodo istologico Fluoro Jade B, una metodica che si è rivelata altamente specifica per la rivelazione in campo a fluorescenza del danno neuronale di natura apoptotica e necrotica, sia nei mammiferi (Schmued e Hopkins, 2000) che nei teleostei (Giusi et al., 2008), ha permesso di evidenziare un intenso segnale fluorescente, in particolare a livello delle aree ipotalamiche e mesencefaliche di animali trattati con ORX-A e mantenuti in condizioni di LP o DP. L'effetto neurotossico indotto dall'ORX-A è, anche in questo caso, comparabile con l'attivazione dei processi apoptotici caspasi-dipendenti causati dalla somministrazione di dosi relativamente alte e ripetute di tale neuropeptide (Voisin et al., 2006). Inoltre, gli effetti delle condizioni di fotoperiodo su tali processi di morte cellulare sono in linea con le alterazioni nei processi di apprendimento (Ma et al., 2007) e con l'induzione di fenomeni apoptotici in roditori esposti per lunghi periodi a condizioni di costante luce (Goldbart et al., 2003) o oscurità (Gonzalez e Aston-Jones, 2008).

Le profonde alterazioni comportamentali e strutturali ORX-dipendenti, osservate durante le diverse condizioni di fotoperiodo, si sono rivelate correlate a modificazioni sito-specifiche del pattern di espressione di ORXR. In particolare, l'*up-regulation* di ORXR nell'ipotalamo (NPO e NSC) di animali mantenuti in LP suggerisce che le condizioni di LP possono avere un'azione stimolante sulle fibre ORXergiche. Tale dato si accorderebbe con l'incremento di STF in *Thalassoma pavo*, analogamente a quanto osservato nei roditori mantenuti in condizione di costante luce (Zhang et al., 2004). La riduzione dei livelli di ORXR a livello ipotalamico e di OTec in pesci mantenuti in DP sottolinea il possibile ruolo svolto da tali aree nella promozione degli stati sonno-simili, come osservato anche in animali notturni quali i roditori (Martinez et al., 2002). Inoltre, i risultati molecolari dell'OTec indicano l'area mesencefalica come uno dei principali target dell'azione ORXergica nella modulazione dell'attività locomotoria e del comportamento esplorativo, non solo in *Carassius auratus* (miei risultati e Volkoff et al., 2003; Huesa et al., 2005) ma anche in *Thalassoma pavo*.

Complessivamente, i dati di questa parte del mio lavoro di dottorato suggeriscono una dicotomia strutturale/funzionale del sistema ORXergico dei teleostei. In particolare, la dose relativamente elevata di ORX-A, in associazione a LP, sembrerebbe agire sui siti ORXR a bassa affinità (dosi fisiologiche) nell'ipotalamo e nel mesencefalo, come già evidenziato per gli effetti dell'ORX-A nei

mammiferi (Sakurai et al., 1998). Al contrario il mantenimento di bassi livelli di ORXR, osservati a livello telencefalico (Dm), suggerisce che i meccanismi d'azione ORXergici durante il DP siano mediati da tipi recettoriali ad alta affinità, in accordo con l'attività di ORX2R nei mammiferi (De Lecea et al., 1998). Considerando, inoltre, la differente affinità per i peptidi ORXergici osservata in *Danio rerio* (Kaslin et al., 2004) e la capacità di SB334867, un antagonista selettivo per ORX1R, di bloccare il comportamento alimentare ORX-indotto in *Carassius auratus* (Miura et al., 2007), è possibile ipotizzare nei teleostei la presenza di uno “switch” nell'espressione di ORXR tra due centri encefalici: il primo localizzato a livello di ipotalamo-mesencefalo (“light”) e il secondo a livello telencefalico (“dark”). Il primo di tali centri, medierebbe le attività correlate allo stato di veglia, durante il giorno, attraverso l'azione delle ORXs appunto sui siti ORXR a bassa affinità, mentre il secondo centro indurrebbe la promozione, durante la notte, delle attività sonno-simili attraverso l'azione dei siti ORXR ad alta affinità.

È noto che il sistema ORXergico, oltre che essere profondamente influenzato da fattori ambientali, è anche modulato dal cross-talking con altri sistemi di neurotrasmissione. L'importanza funzionale del sistema GABAergico e, in particolare, di GABA_AR, nel controllo delle attività comportamentali ORX-dipendenti è evidenziata da un numero crescente di studi (Alam et al., 2005; Kokare et al., 2006; Kotz et al., 2006; Thorpe et al., 2006). Su tali basi è stata investigata l'azione di GABA_AR in *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*, attraverso il trattamento con MUS e BIC, rispettivamente agonista ed antagonista altamente specifici per il sito della subunità β di GABA_AR (Olsen e Sieghart, 2009). L'influenza del MUS e della BIC sull'attività locomotoria ha evidenziato come il successo delle attività motorie e sensoriali di tale teleosteo sia mediato dall'azione di GABA_AR non solo nei mammiferi (Kotz et al., 2006) ma anche nei miei modelli sperimentali. Il coinvolgimento di tale recettore sull'attività locomotoria non ci sorprende più di tanto poiché è stato ampiamente documentato che esso riveste un ruolo primario nella regolazione delle funzioni omeostatiche vitali, quali il ciclo sonno-veglia nei mammiferi (Reinoso Suarez, 2007) e nei teleostei (Clements e Schereck, 2001; Yokogawa et al., 2007).

Gli effetti del MUS sull'attività locomotoria di *Thalassoma pavo* e *Carassius auratus*, nei quali non è stata evidenziata in parallelo alcun incremento nella velocità di nuoto e nella distanza percorsa, si accordano con quanto riportato nei roditori nei quali tale agonista non induceva alcuna variazione nel pattern di immobilità tonica (Donatti e Leite-Panissi, 2009). Al contrario, il blocco della trasmissione di GABA_AR, indotto da alte dosi di BIC, ha evidenziato la presenza di un pattern motorio di tipo convulsivo come nel caso dell'iperattività motoria indotta da alte dosi di BIC nei roditori (Kwak et al., 2005). In particolare, il blocco della trasmissione di GABA_AR ha indotto nei nostri modelli sperimentali episodi intermittenti di nuoto frenetico, con movimenti circolari ed

improvvisi cambi nella direzione di nuoto, seguiti da perdita del controllo posturale, durante i quali gli animali mostravano periodi di movimenti oscillanti su un lato del corpo, alternati ad episodi di immobilità completa, similmente a quanto osservato negli anuri esposti ad un blocco dell'azione di GABA_AR (Hewapathirane *et al.*, 2008). Tali effetti comportamentali sembrerebbero indicare che l'azione inibitrice su FS sia attivata già alle 24 ore grazie ad un'azione GABA_ARergica precoce mentre il comportamento esplorativo è maggiormente attivato in una fase più tardiva (96 ore). Inoltre, il fatto che l'azione dell'agonista selettivo di GABA_AR si espliciti per lo più a livello di STF sottolinea un alto livello di conservazione della funzione alimentare da parte del GABA, come evidenziato dalla modulazione a livello centrale del MUS su attività fisiologiche, quali quelle gustative nella carpa (Pirone *et al.*, 2007). Per quanto riguarda l'iperattività indotta dalla BIC, questa suggerisce l'assenza di qualsiasi induzione al comportamento alimentare da parte di tale antagonista, come del resto dimostrato anche in altri vertebrati (Zendehdel *et al.*, 2009).

A questo punto è utile ricordare che, nei mammiferi, l'azione del sistema GABAergico sul comportamento alimentare è favorita dal cross-talking con altri sistemi di neurotrasmissione come il sistema GLUergico (Meister, 2007) ed istaminergico (Morteza *et al.*, 2008). I risultati del mio studio sottolineano che nei teleostei l'azione alimentare di GABA_AR sia, almeno in parte, mediata dal sistema ORXergico. Questo dato appare evidente quando si osservano le variazioni nel pattern di espressione di ORXR indotte dal trattamento con MUS e BIC, in diverse aree encefaliche note per la loro azione sulle funzioni gustative e motorie dei teleostei (Volkoff *et al.*, 2003; Huesa *et al.*, 2005). Infatti, sia in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*, la BIC induceva significative *down-regulations* di ORXR; tali effetti erano antagonizzati dal MUS, principalmente a livello di aree encefaliche quali SCN, NPGm, Dm e OTec supportando i dati comportamentali dell'azione inibitoria del MUS su FS ma non su STF. In questo modo, gli effetti antagonistici di MUS e BIC sul pattern di espressione di ORXR si accordano con la stimolazione dell'assunzione di cibo indotta dall'ORX-A (Kokare *et al.*, 2006). Infatti, l'attività GABAergica in aree encefaliche quali SCN favorisce la ricerca di cibo in accordo all'azione di ORXR in aree encefaliche omologhe dei mammiferi (Vanitallie, 2006). Inoltre, i fenomeni di inattività riportati in presenza di elevate dosi di MUS sembrerebbero strettamente legati sia alla *up-regulation* di ORXR, a livello dei centri di regolazione dei ritmi circadiani, quali appunto SCN che alla *down-regulation* osservata in NLTm, area omologa del proencefalo basale e dell'area preottica mediale dei mammiferi (Henny e Jones, 2006). Tale modulazione della risposta ORXergica GABA_AR-mediata, proprio nelle aree suddette, è in accordo con i fenomeni di cross-talking responsabili della regolazione del ciclo sonno-veglia nei mammiferi (Henny e Jones, 2006) e in altri telostei (Yokogawa *et al.*, 2007). Sulla base di questi risultati, si sta tentando di suggerire che l'incremento dell'attività GABA_AR, capace di

stimolare il comportamento alimentare ORX-indotto, possa agire modulando le riserve di ATP a livello cellulare, come dimostrato in seguito ad un innalzamento del tono GABAergico in *Carassius carassius* (Ellefsen *et al.*, 2009). Inoltre, gli effetti del MUS sembrano richiamare le alterazioni dell'equilibrio creatina/fosfocreatina, osservate in seguito ad un incremento dell'attività GABAergica e che sono in grado di influenzare i processi di omeostasi energetica (Tong *et al.*, 2008) e, di riflesso, il comportamento alimentare.

E', a mio avviso, un dato interessante quello che riguarda il trattamento combinato di MUS+BIC il quale determinava la prevenzione delle attività BIC-dipendenti, come dimostrato sia dalle migliori *performances* nel nuoto di *Thalassoma pavo* che dall'azione inibitrice di MUS sul pattern di espressione ORXRergico, indotto da BIC. Questo effetto di MUS sembra, inoltre, essere presente anche nel caso di eventi neurodegenerativi in quanto il trattamento combinato di MUS+BIC proteggeva le diverse aree encefaliche dai danni BIC-dipendenti, sia a livello cellulare che ultracellulare. Infatti la modesta reazione argirofilica, così come le lievi alterazioni ultrastrutturali, osservate in seguito al trattamento con MUS e al trattamento combinato, confermerebbero il ruolo protettivo di tale agonista di GABA_AR, in accordo a quanto verificato in condizioni di ischemia (Zhang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008) e di danno da stress ossidativo (Kumar e Goyal, 2007). In questo contesto, le lievi alterazioni comportamentali e neuronali in presenza di MUS, non solo suggeriscono un'azione neuroprotettiva di GABA_AR durante le *performances* motorie dei teleostei, ma anche il coinvolgimento dei neuroni che esprimono ORXR in modo da assicurare la loro sopravvivenza contro i danni eccitotossici (Katsuki e Akaike, 2005) e, di conseguenza, attivare lo stimolo alimentare.

A questo punto, mi sono chiesto se il *cross-talking* tra il sistema ORXRergico e GABA_AR nella modulazione del comportamento alimentare ed esplorativo si basasse esclusivamente sull'azione delle subunità β di GABA_AR o se, invece, questa interazione richiedesse l'intervento di altre subunità. Alla luce di tali interrogativi, è stata indagata l'azione della subunità α di GABA_AR mediante la somministrazione di ZOL, un'imidazopiridina con azione di agonista selettivo per la subunità α_1 di GABA_AR (Olsen and Sieghart, 2009), e di DZP, una classica BZD che lega le altre subunità α , ad una concentrazione simile a quella utilizzata nell'uomo a scopi terapeutici (Murphy *et al.*, 2008). Per tale parte, la mia attenzione è stata diretta esclusivamente a *Carassius auratus*, proprio perché è un ottimo modello sperimentale per studiare gli effetti neuronali che regolano il comportamento alimentare e l'omeostasi energetica (Huesa *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007; Hoskins *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2009). Dallo studio comportamentale, si è osservato che ZOL era responsabile di un elevato incremento in STF che diventava di intensità ancora superiore in seguito alla somministrazione di DZP. Quando però ho verificato se

l'incremento di STF fosse associato ad un reale incremento del *food intake*, ho potuto constatare che la stimolazione di STF, indotta da MUS e da ORX-A, non si associava ad alcuna variazione della quantità di cibo ingerita dagli animali. Solo in seguito al trattamento con ZOL e DZP, si poteva osservare rispettivamente un incremento elevato e molto elevato del *food intake*. Il trattamento con FLU, antagonista competitivo del sito BZD di GABA_AR, sopprimeva sia l'incremento di STF sia l'iperfagia confermando che la stimolazione del comportamento alimentare è effettivamente legata ad un'azione specifica della subunità α di GABA_AR.

L'iperfagia ZOL/DZP-indotta in *Carassius auratus* è in accordo con quanto già osservato nei mammiferi in cui l'attivazione del sito BZD induce la stimolazione del comportamento alimentare e dell'assunzione di cibo (Cooper, 2005). Nei mammiferi è stato, inoltre, osservato che le BZD sono in grado di influenzare la percezione dell'appetibilità del cibo e dei fluidi, incrementandone l'effetto edonico (Berridge e Peciña, 1995). Sempre nei mammiferi, tale azione si esplica a livello di strutture encefaliche fitogeneticamente antiche e, in particolare, a livello del tronco dell'encefalo, che rappresenta il principale substrato neuronale attraverso il quale la trasmissione di GABA_AR agisce all'interno della gerarchia neuronale responsabile della percezione gustativa, inducendo così un potenziamento degli effetti edonici indotti dal consumo di cibo (Peciña e Berridge, 1996; Cooper 2005). In questo lavoro, si sta tentando di dimostrare che, similmente a quanto osservato nei mammiferi, anche in *Carassius auratus* l'azione iperfagica di ZOL e DZP possa esplicitarsi attraverso un'induzione dell'effetto edonico agendo, eventualmente, a livello del tronco encefalico dal momento che esso svolge un'azione cruciale nella modulazione del comportamento alimentare proprio in questo teleosteo (Matsuda, 2009).

Prima di poter asserire ciò, ho però proceduto a verificare il ruolo di ORX-A, MUS, BIC, ZOL e DZP sui processi motivazionali di *Carassius auratus* e se tali meccanismi fossero simili a quanto già riscontrato nei mammiferi (Harris and Aston-Jones, 2006). Con tale scopo, ho approntato un apparato per il T-maze test, modello ampiamente utilizzato per valutare i processi cognitivi e di apprendimento, sia nei mammiferi (Gerlai, 2001) che nei teleostei (Ninkovic e Bally-Cuif, 2005), e per il conditioned place preference (CPP), un paradigma in grado di valutare gli effetti dei differenti trattamenti farmacologici sui processi di ricompensa indotti dal cibo o dalle droghe di abuso (Tzschentke, 1998; Tzschentke, 2007). Durante il T-maze test *Carassius auratus* era addestrato in un apparato a 4 braccia in modo da poter discriminare tra differenti stimoli (spaziali o visivi) in associazione ad una ricompensa (cibo). In seguito a sole 3 sessioni di addestramento, i pesci di controllo iniziavano a ridurre moderatamente il tempo di latenza quando la ricompensa era associata al compartimento illuminato con la luce blu/rossa. Il tempo di latenza veniva ulteriormente ridotto quando gli animali erano trattati con ORX-A. Questi risultati ci permettono di evidenziare, per la

prima volta, non solo che l'ORX è uno dei principali sistemi responsabili del comportamento alimentare in *Carassius auratus*, probabilmente tramite l'attivazione di altri sistemi come quelli della ghrelina e NPY (Miura et al., 2007; Kojima et al., 2009), ma anche che essa possa partecipare al controllo di attività *goal-oriented*, in maniera simile a quanto precedentemente riportato nei mammiferi (Tsujino e Sakurai, 2009). In questo caso, il miglioramento delle *performances* durante il T-maze test suggerisce che il sistema ORXergico possa essere coinvolto nel potenziamento dei processi mnemonici del pesce, specialmente quando essi sono mediati da stimoli visivi. Questo coinvolgimento non ci sorprende più di tanto poiché nei mammiferi è stato già dimostrato che l'ORX-A è in grado di migliorare i processi mnemonici ipocampo-dipendenti (Jaeger et al., 2002). In questo contesto, è interessante notare che il netto miglioramento della *performance* comportamentale era associato in questo studio ad una notevole *up-regulation* del trascritto di ORXR in alcune aree telencefaliche, come Dm and Dl, aree considerate omologhe dell'amigdala e dell'ipocampo (Butler, 2000) e che perciò potrebbero essere coinvolte nei processi di apprendimento e di ricompensa in maniera simile ai mammiferi (Hollander et al., 2008; Benoit et al., 2008).

Anche l'analisi al CPP ha permesso di evidenziare che l'ORX-A induceva un significativo miglioramento nelle *performances* degli animali inducendo un elevato incremento del Δ PP. Tale dato suggerisce che l'ORX-A possa influenzare positivamente i circuiti della ricompensa operanti in *Carassius auratus*, in maniera analoga a quanto recentemente osservato nei mammiferi nei quali tale neuropeptide gioca un ruolo cruciale nei processi di ricompensa indotti non solo dal cibo, ma anche da droghe di abuso (Boutrel et al., 2005), dalla nicotina (Hollander et al., 2008) e dall'alcool (Lawrence, 2009). Nei mammiferi l'ORX-A agisce sui meccanismi della ricompensa principalmente modulando la plasticità sinaptica a livello della regione mesencefalica VTA (Borgland et al., 2009) e, di riflesso, modulando il tono dopaminergico a livello della corteccia prefrontale e del nucleo accumbens (Aston-Jones et al., 2008). È interessante notare che, nel nostro modello sperimentale, gli effetti comportamentali indotti dall'ORX-A si correlano con una significativa *up-regulation* di ORXR a livello di TPp, area omologa al VTA dei mammiferi (Poposku et al., 2008), suggerendo che, anche nel nostro modello, l'ORX-A potrebbe modulare il tono GABAergico proprio in questa regione considerata come il sistema dopaminergico ascendente dei teleostei (Rink e Wullimann, 2002). Quando siamo andati a verificare gli effetti della BIC sul Δ PP-ORX-indotto, è stato possibile evidenziare che la trasmissione GABA_ARergica risulta indispensabile per l'azione ORXergica sui meccanismi di ricompensa di *Carassius auratus*. A tal proposito, nei mammiferi era stato già osservato che gli effetti dell'ORX-A sui processi di ricompensa, almeno a livello di VTA, si associano ad un incremento del tasso di scarica dei neuroni

GABAergici di questa stessa area (Korotkova *et al.*, 2003). Ciò conferma quello da noi riscontrato e cioè che il cross-talking tra il sistema ORXergico e GABA_AR abbia un ruolo cruciale nella modulazione dei processi di ricompensa (Korotkova *et al.*, 2003). È da notare, inoltre, come il trattamento con BIC in tale teleosteo sia associato ad una significativa *down-regulation* di ORXR sempre a livello delle aree telencefaliche, quali Dm e Dl, di cui abbiamo già evidenziato il ruolo cruciale nella modulazione dei processi di apprendimento e motivazionali nel nostro modello sperimentale. Tale intima associazione tra i processi di apprendimento e ricompensa richiama quanto osservato nei mammiferi, nei quali il sistema ORXergico non è attivato in conseguenza alla sola ricompensa, ma esclusivamente qualora questa sia associata ad un contesto ambientale contingente (Harris *et al.*, 2007).

Il DZP, ma non lo ZOL, analogamente all'ORX-A, induceva un significativo incremento del ΔPP. Tuttavia, somministrati in concomitanza con l'ORX-A, sia lo ZOL che il DZP causavano una significativa riduzione nel ΔPP-ORX-indotto, suggerendo un'azione antagonistica tra l'ORX-A e il sito BDZ nella modulazione dei processi di ricompensa in *Carassius auratus*. Tale effetto sembra in linea con i differenti meccanismi di azione tra l'ORX-A e il sito BZD in molteplici funzioni neuronali e comportamentali, quali l'apprendimento e la modulazione del ciclo sonno-veglia (Lu e Greco, 2006; Winrow *et al.*, 2010). Inoltre, è da notare che nei mammiferi l'iperfagia indotta dall'attivazione del sito BZD è stata collegata ad un incremento dell'effetto edonico del cibo, attraverso la loro azione a livello del sistema degli oppioidi endogeni portando, di riflesso, a ritardare la conclusione del pasto (Richardson *et al.*, 2005). Al contrario, l'ORX-A tenderebbe a modulare l'aspetto motivazionale della ricerca di cibo attraverso una stimolazione dei circuiti neuronali alla base dei processi di ricompensa (Tsujino e Sakurai, 2009) e, quindi, attraverso un'azione precedente il pasto stesso. Infatti, è interessante osservare come, nel nostro modello sperimentale, l'azione iperfagica indotta sia dallo ZOL che dal DZP, si associ ad importanti modificazioni del pattern di espressione di ORXR, principalmente a livello diencefalico e mesencefalico, aree cruciali nella modulazione dell'attività locomotoria e del comportamento alimentare. L'ORX-A, come già evidenziato precedentemente, era invece responsabile di significative *up-regulations* principalmente a livello dell'area telencefalica. Tali dati ci portano così a suggerire l'esistenza di una dicotomia strutturale e funzionale nella stimolazione del comportamento alimentare osservato in *Carassius auratus* in cui, mentre l'ORX-A agisce a livello dei processi di apprendimento e motivazionali, principalmente a livello dei siti telencefalici, l'azione del sito BZD agisce attraverso la modulazione di ORXR, principalmente a livello dei siti diencefalici e mesencefalici.

E' ovvio, siamo ancora all'inizio e dunque sono necessari ulteriori studi che potrebbero fornire utili nozioni per meglio capire il complesso meccanismo attraverso il quale il sistema ORXergico possa essere considerato un importante "switch" tra l'ipotalamo e le altre regioni cerebrali, come per esempio nel caso di VTA che nei mammiferi si "attiva" durante la promozione degli stimoli alimentari legati a ricompensa (Aston-Jones et al., 2009). In tal senso, potrebbe essere importante studiare i meccanismi di cross-talking con un altro importante sistema di neurotrasmissione (quello glutammatergico) che com'è noto agisce nei processi di plasticità sinaptica. Infatti, gli studi già avviati presso il laboratorio di Neuroanatomia Comparata iniziano a indicare un ruolo chiave proprio del sistema Glutammatergico nella modulazione dei processi di apprendimento e ricompensa di *Carassius auratus*.

BIBLIOGRAFIA

Abrahamson EE, Leak RK and Moore RY. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12, 435-440, (2001b).

Alam MN, Szymusiak R, Gong H, King J and McGinty D. Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J Physiol* 521, 679–690, (1999)

Alam N, Kumar S, Bashir T, Suntsova N, Methippara MM, Szymusiak R and McGinty D. GABA-mediated control of hypocretin –but not melanin-concentrating hormone-immunoreactive neurones during sleep in rats. *J Physiol* 563.2, 569-582, (2005).

Altman J, Bayer SA. (1997). Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure, and functions. *New York: CRC Press.*

Alvarez CE and Sutcliffe JG. Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neuroscience Letters* 324, 169-172, (2002).

Antunes VR, Brailoiu GC, Kwok EH, Scruggs P and Dun NJ. Orexins/hypocretins excite rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1801–R1807, (2001).

Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res.*, (2009)

Atack JR, Smith AJ, Emms F, McKernan RM. Regional differences in the inhibition of mouse in vivo [3H]Ro 15-1788 binding reflect selectivity for alpha 1 versus alpha 2 and alpha 3 subunit-containing GABAA receptors. *Neuropsychopharmacology*, 20 (3):255-62, (1999).

Backberg M, Hervieu G, Wilson S and Meister B. Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 15, 315–328, (2002).

Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR. Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol.* 503(5), 668-84, (2007).

Baldo BA, Gual-Bonilla L, Sijapati K, Daniel RA, Londry CF and Kelley AE. Activation of a subpopulation of orexin /hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABA_A receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but non by exposure to a novel environment. *Eur J Neurosci* 19, 376-386, (2004).

Baron MS, Wichmann T, Ma D and DeLong MR. Effects of transient focal inactivation of the basal ganglia in parkinsonian primates. *J Neurosci* 22, 592–599, (2002).

Basso AM and Kelley AE Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference, *Behav Neurosci.* 113, 324– 336, (1999).

Bayer L, Colard C, Nguyen NU, Risold PY, Fellmann D and Griffond B. Alteration of the expression of the hypocretin (orexin) gene by 2-deoxyglucose in the rat lateral hypothalamic area. *Neuroreport* 11, 531–533, (2000).

Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mleux B, Machard D, Jones B and Muhlethaler M. Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 14, 1571–1575, (2001).

Beck B and Ricky S. Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, 258, 119-122, (1999).

Beck M, Brickley K, Wilkinson HL, Sharma S, Smith M, Chazot PL, Pollard S and Stephenson FA. Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABAA receptor-associated protein, GRIF-1. *J Biol Chem* 277, 30079-30090, (2002).

- Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG and Moss SJ.** GABA_A receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* 4, 908-916, (2001).
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R and Khazipov R.** GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol Rev* 87, 1215-1284, (2007).
- Benoit SC, Tracy AL, Davis JF, Choi D, Clegg DJ.** Novel functions of orexigenic hypothalamic peptides: from genes to behavior. *Nutrition*. Sep;24(9):843-7, (2008).
- Berridge KC, Pecina S.** Benzodiazepines, appetite, and taste palatability. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(1):121-31 (1995).
- Besnard F, Havenet P, Itier V, Granger P, Partiseti M, Deportere H, Graham D and Langer SZ.** GABA_A receptor subtypes and the mechanism of action of zolpidem. Zolpidem: an update of its pharmacological properties and therapeutic place in the management of insomnia: Freeman, Puech, Roth eds: Elsevier, Paris, (1996).
- Biggio F, Gorini G, Caria S, Murru L, Sanna E and Follesa P.** Flumazenil selectively prevents the increase in alpha(4)-subunit gene expression and an associated change in GABA(A) receptor function induced by ethanol withdrawal. *J Neurochem* 102, 657-666, (2007).
- Bingman, V.P., Ritters, L.V., Strasser, R. & Gagliardo, A.** (1998). Neuroethology of avian navigation. In **Balda, R., Pepper-Berg, I. & Kamil, A. (eds)**, *Animal Cognition in Nature*. Academic Press, New York, pp. 201–226.
- Blanco M, Garcia-Caballero T, Fraga M, Gallego R, Cuevas J, Forteza J, Beiras A and Dieguez C.** Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept* 104, 161–165, (2002).
- Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Dieguez C and Beiras A.** Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1616–1619, (2001).
- Bollan K, Robertson LA, Tang H and Connolly CN.** *Biochem Soc Trans* 31, 875–879, (2003).
- Bongianni F, Mutolo D, Tardone F and Pantaleo T.** GABAergic and glycinergic inhibitory mechanisms in the lamprey respiratory control. *Brain Res* 1090, 134-145 (2006).
- Borgland SL, Chang SJ, Bowers MS, Thompson JL, Vittoz N, Floresco SB, Chou J, Chen BT, Bonci A.** Orexin A/hypocretin-1 selectively promotes motivation for positive reinforcers. *J Neurosci.* 29(36):11215-25, (2009).
- Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF and De Lecea L.** Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 19168-19173, (2005).
- Braford, M.R.** (1995). Comparative aspects of forebrain organization in the rayfined fishes: touchstones or not? *Brain Behav. Evol.*, 46, 259–274.
- Briski KP and Sylvester PW.** Hypothalamic orexin-A-immunopositive neurons express Fos in response to central glucopenia. *Neuroreport* 12, 531–534, (2001a).
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG and Hokfelt T.** Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402, 460–474, (1998).
- Bueno CH, Zangrossi Jr H, Viana MB.** The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res* 38 (11), 1697-1701, (2005).

- Burdakov D and Alexopoulos H.** Metabolic state signalling through central hypocretin/orexin neurons. *J. Cell. Mol. Med.* 9(4), 795-803, (2005).
- Burdakov D, Gerasimenko O and Verkhatsky A.** Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons *in situ*. *J Neurosci* 25, 2429–2433, (2005).
- Burdakov D, Jensen L, Alexopoulos H, Williams R, Fearon I, O'Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L and Verkhatsky A.** Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50, 711–722, (2006).
- Burdakov D, Liss B and Ashcroft FM.** Orexin excites GABAergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium calcium exchanger. *J Neurosci* 23, 4951-4957, (2003).
- Burgess, N., Jeffery, K.J. & O'Keefe, J.** (1999). *The Hippocampal and Parietal Foundations of Spatial Cognition.* Oxford University Press, London.
- Butler AB.** Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradox resolved. *Neurosci. Lett.*, 293, 95–98(2000).
- Burlet S, Tyler CJ and Leonard CS.** Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 22 2862–2872, (2002).
- Buzsaki G.** Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *J Sleep Res* 7 (Suppl 1), 17–23 (1998).
- Cahill GM.** Circadian melatonin rhythms in cultured zebrafish pineals are not affected by catecholamine receptor agonists. *Gen Comp Endocrinol* 105, 270-275, (1997).
- Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JR, Wilson S and Williams G.** Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 50, 105–112, (2001).
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G.** Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes.* 1999 Nov;48(11):2132-7.
- Canonaco M., Tavoraro R., Facciolo R.M.** (1997). Dimorphic distribution of the two main GABAA binding sites in cortical and limbic areas of a rodent living in natural environmental conditions. *J. Comp. Neurol.*, **380**:423-434.
- Challet E, Pevet P, Malan A.** Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res* 84,275–84, (1997).
- Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ and Chang JK.** Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 260, 161–164, (1999).
- Chen J and Randeve HS.** Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 18, 2790-2804, (2004).
- Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB and Scammell TE.** Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci* 21, RC168, (2001).
- Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G.** Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* 41, 35–43, (2004).
- Ciriello J, Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP and de Oliveria CVR.** Identification of neurons containing orexin-B (hypocretin-2) immunoreactivity in limbic structures. *Brain Research* 967, 123-131, (2003).

- Clegg DJ, Air EL, Woods SC and Seeley RJ.** Eating elicited by orexin-A, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 143, 2995–3000, (2002).
- Clements S and Schreck CB.** The GABA_A agonist muscimol enhances locomotor activity, but does not alter the behavioural effects of CRH in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol and Biochem* 24, 41–48, (2001).
- Cluderay JE, Harrison DC and Hervieu GJ.** Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept* 104, 131–144, (2002).
- Cooper SJ.** Palatability-dependent appetite and benzodiazepines: new directions from the pharmacology of GABA(A) receptor subtypes. *Appetite*. 44(2):133-50, (2005).
- Cone RD.** The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 10, 211-216, (1999).
- Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA and Williams G.** Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20, 1455–1470, (1999).
- D'Almeida V, Hipólido DC, Raymond R, Barlow KB, Parkes JH, Pedrazzoli M, Tufik S, Nobrega JN.** Opposite effects of sleep rebound on orexin OX1 and OX2 receptor expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 136(1-2):148-57, (2005).
- Daniele A, Albanese A, Gianotti G, Gregori B, Bartolomeo P.** Zolpidem in Parkinson's disease. *Lancet* 349, 1222–1223 (1997).
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S and Nakazato M.** Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288, 87–90, (2000a).
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, and Nakazato M.** Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 1–6, (2000b).
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Kakurai T, Yanagisawa M and Nakazato M.** Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 748–753, (1999).
- De Lecea L and Soutcliffe JG.** The hypocretin/orexin: novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. *Cell Mol Life Sci* 56, 473-480, (1999).
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, and Sutcliffe JG.** The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 322–327, (1998).
- De Lecea L.** A decade of hypocretins: past, present and future of the neurobiology of arousal. *Acta Physiol.* (2009).
- DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR and Moenter SM.** Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 16, 2872–2891, (2002).
- Doldan MJ, Prego B, Holmqvist BI and De Miguel E.** Distribution of GABA-immunolabeling in the early zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Eur J Morphol* 37, 126–129, (1999).
- Donatti, A.F., Leite-Panissi, C.R.,** GABAergic antagonist blocks the reduction of tonic immobility behavior induced by activation of 5-HT(2) receptors in the basolateral nucleus of the amygdala in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* (2009).
- Duarte TT, Corrêa SAL, Santana UJ, Pereira ASF and Hoffmann A.** Agonistic-like responses from the torus semicircularis dorsalis elicited by GABA_A blockade in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Braz J Med Biol Res*, 39, 945-955, (2006).

- Dube MG, Horvath TL, Kalra PS and Kalra SP.** Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides* 21, 1557–1560, (2000).
- Duxon MS, Stretton J, Starr K, Jones DN, Holland V, Riley G, Jerman J, Brough S, Smart D, Johns A, Chan W, Porter RA and Upton N.** Evidence that orexin-A-evoked grooming in the rat is mediated by orexin-1 (OX1) receptors, with downstream 5-HT_{2C} receptor involvement. *Psychopharmacology (Berl)* 153, 203–209, (2001).
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Chatei MA and Bloom SR.** The effect of the prexin on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentration hormone and galanin. *J Endocrinol.* 160, R7-12, (1999).
- Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE and Muhlethaler M.** Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 108, 177–181, (2001).
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H.** The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron.* 23;209–226 (1999).
- Ellefsen S, Stenslokken KO, Fagernes CE, Kristensen TA, Nilsson GE.** Expression of genes involved in GABAergic neurotransmission in anoxic crucian carp brain (*Carassius carassius*). *Physiol. Genomics* 36, 61-68, (2009).
- Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE and Haas HL.** Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci* 21, 9273–9279, (2001).
- Eriksson KS, Sergeeva OA, Selbach O and Haas HL.** Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 19, 1278-1284, (2004).
- Espana RA, Baldo BA, Kelley AE, and Berridge CW.** Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience* 106, 699–715, (2001).
- España RA, Plahn S, Berridge CW.** Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/Orexin. *Brain Res.* 12;943(2):224-36 (2002).
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM and Luscher B.** Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571, (1998).
- Facciolo RM, Crudo M, Giusi G, Alò R, Canonaco M.** Light- and dark-dependent orexinergic neuronal signals promote neurodegenerative phenomena accounting for distinct behavioral responses in *Thalassoma pavo*. *Journal Neuroscience Research*, 87(3): 748-757, 2009.
- Farrell WJ, Delville Y and Wilczynski W.** Immunocytochemical localization of orexin in the brain of the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *Soc Neur Abstr* 33, 328.4, (2003).
- Farver DK and Khan MH.** Zolpidem for antipsychotic-induced Parkinsonism. *Ann. Pharmacother.* 35, 435– 437 (2001).
- Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E and Biggio G.** Neurosteroids, GABA_A receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology* 186, 267-280, (2006).
- Fraser EJ, Bosma PT, Trudeau VL and Docherty K.** The Effect of Water Temperature on the GABAergic and Reproductive Systems in Female and Male Goldfish (*Carassius auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 125, 163–175, (2002).
- Frey S, Bergado-Rosado J, Seidenbecher T, Pape HC and Frey JU.** Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. *J Neurosci* 21, 3697–3703 (2001).
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E and Nishino S.** Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 12, 993–997, (2001).

- Galas L, Vaudry H, Braun B, Van den Pol AN, De Lecea L, Sutcliffe JG and Chartrel N.** Immunohistochemical localization and biochemical characterization of hypocretin/orexin-related peptides in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *J Comp Neurol* 429, 242-252, (2001).
- Gallagher, M. & Chiba, A.** The amygdala and emotion. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6;221–227 (1996).
- Gao XB and Van den Pol AN.** Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol* 533, 237–252, (2001).
- Gerashchenko D, Salin-Pascual R and Shiromani PJ.** Effects of hypocretin-saporin injections into the medial septum on sleep and hippocampal theta. *Brain Res* 913, 106–115 (2001).
- Gerlai R.** Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res.* 125(1-2):269-77, (2001).
- Giannaccini G, Betti L, Correani M, Dini M, Giusti L, Lucacchini A.** Binding of the benzodiazepine ligand [3H]-Ro 15-1788 to brain membrane of the saltwater fish *Mullus surmuletus*. *Neurochem Int.*, 31 (6): 781-7, (1997).
- Gillette MU, Tischkau SA.** Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog Horm Res.* 54:33-58, (1999).
- Giusi G, Alò R, Crudo M, Facciolo RM, Canonaco M.** Specific cerebral heat shock proteins and histamine receptor cross-talking mechanisms promote distinct lead-dependent neurotoxic responses in teleosts. *Toxicol Appl Pharmacol.* 227(2):248-56, (2008).
- Goldman-Rakic PS.** Cellular basis of working memory. *Neuron* 14, 477–485, (1995).
- Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo SZ, Payne RS, Cheng Z, Brittian KR, Gozal D.** Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 122:585–590, (2003).
- Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R.** Activation of c-fos in GABAergic neurons in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol*, 556, 935-46, (2004).
- Gonzalez MM, Aston-Jones G.** Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(12):4898-903 (2008).
- Graves LA, Hellman K, Veasey S, Blendy JA, Pack AI and Abel T.** Genetic evidence for a role of CREB in sustained cortical arousal. *J Neurophysiol* 90, 1152–1159, (2003).
- Greenspan RJ, Tononi G, Cirelli C and Shaw PJ.** Sleep and the fruit fly. *Trends Neurosci* 3, 142-145, (2001).
- Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C and Fellmann D.** Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262, 77–80, (1999).
- Grudt TJ, van den Pol AN, Perl ER.** Hypocretin-2 (orexin-B) modulation of superficial dorsal horn activity in rat. *J Physiol.* 2002 Jan 15;538(Pt 2):517-25.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Muntun RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA and Upton N.** Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,10911–10916, (1999).
- Håkansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M and Meister B.** Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 11,653–663, (1999).

- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M and Sakurai T.** Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30,345–354, (2001).
- Harris GC and Aston-Jones G.** Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *TRENDS Neurosci* 29, 572-577, (2006).
- Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, Aston-Jones G.** Lateral hypothalamic Orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behav Brain Res.* 183(1):43-51; (2007).
- Harrison TA, Chen CT, Dun NJ, and Chang JK.** Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neurosci Lett* 273, 17–20, (1999).
- Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA and Arch JR.** A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96, 45–51, (2000).
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR.** Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides.* 1999;20(9):1099-105.
- Hendricks JC, Sehgal A and Pack AI.** The need for a simple animal model to understand sleep. *Prog. Neurobiol.* 61, 339–351, (2000).
- Henny P and Jones BE.** Innervation of Orexin/Hypocretin Neurons by GABAergic, Glutamatergic or Cholinergic Basal Forebrain Terminals Evidenced by Immunostaining for Presynaptic Vesicular Transporter and Postsynaptic Scaffolding Proteins. *J Comp Neurol* 499, 645-661, (2006).
- Herrero P., Pè Rez P., Abades N.N., Hardy O. and Torres B.** (1999). Tectotectal connectivity in goldfish. *The Journal of Comparative Neurology* 411: 455-471.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC and Leslie RA.** Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103, 777–797, (2001).
- Hewapathirane DS, Dunfield D, Yen W, Haas K.** In vivo imaging of seizure activity in a novel developmental seizure model. *Exp. Neurol.* 211, 480-488 (2008).
- Higashijima SJ, Mandel G and Fetcho JR.** Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 480, 1–18, (2004).
- Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, Kenny PJ.** Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;105(49):19480-5, (2008).
- Holmqvist T, Åkerman KEO, and Kukkonen JP.** High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett* 305, 177–180, (2001).
- Horvath TL and Gao XB.** Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. *Cell Metab.* 1, 279-86, (2005).
- Horvath TL, Diano S and van den Pol AN.** Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19,1072–1087, (1999b).
- Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS and van Den Pol AN.** Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415, 145–159, (1999a).
- Hoskins LJ, Xu M, Volkoff H.** Interactions between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and orexin in the regulation of feeding and reproduction in goldfish (*Carassius auratus*). *Horm Behav.* 54(3):379-85, (2008).

- Huesa G, Van den Pol AN and Finger TE.** Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *J Comp Neurol* 488, 476-491, (2005).
- Ichinose M, Asai M, Sawada M, Sasaki K, and Oomura Y.** Induction of outward current by orexin-B in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 440, 51-54, (1998).
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N and Nakazato M.** Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res* 821, 526-529, (1999).
- Ikenaga T, Yoshida M., Uematsu K.** (2005). Morphology and immunohistochemistry of efferent neurons of the goldfish corpus cerebelli. *The Journal of Comparative Neurology* **487**: 300-311.
- Ivanov A and Aston-Jones G.** Hypocretin/orexin depolarizes and decreases potassium conductance in locus coeruleus neurons. *Neuroreport* 11, 1755-1758, (2000).
- Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I and Telegdy G.** Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol* 12, 1174-1178, (2000).
- Jeffery, K.J., Anderson, M.I., Hayman, R. & Chakraborty, S.** (2004). A proposed architecture for the neural representation of spatial context. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **28**, 201-218.
- Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T and Ahring PK.** The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *J Biol Chem* 277, 41438-41447, (2002).
- Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A and Dominiak P.** Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142, 3324-3331, (2001).
- Jones BE and Muhlethaler M.** Modulation of cortical activity and sleepwake state by hypocretin/orexin. In: *de Lecea L, Sutcliffe JG, editors. The hypocretins: integrators of physiological systems. New York: Springer* 289-301, (2005).
- Jones BE.** Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145, 157-169, (2004).
- Kandel ER.** The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038 (2001).
- Kaslin J and Panula P.** Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic system in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440, 342-377 (2001).
- Kaslin J, Nystedt JM, Ostergard M, Peitsaro N and Panula P.** The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic system. *J Neurosci* 24, 2678-2689, (2004).
- Katsuki H, Akaike A.** Quinolinic acid toxicity on orexin neurons blocked by gamma aminobutyric acid type A receptor stimulation. *Neuroreport* 16, 1157-1161, (2005).
- Kavanau JL.** REM and NREM sleep as natural accompaniments of the evolution of warm-bloodedness. *Neurosci Behav Rev* 26, 889-906, (2002).
- Kavanau JL.** Vertebrates that never sleep: implications for sleep's basic functions. *Brain Res Bull* 46, 269-279, (1998).
- Kelley AE.** Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behaviour and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav Rev.* 27, 756-776, (2004).
- Kim Y, Nam R, Yoo YM and Lee C.** Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 355, 29-32, (2004).

- Kirchgessner AL and Liu M.** Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24, 941–951, (1999).
- Kittler JT and Moss SJ.** Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13, 341–347, (2003).
- Kokare DM, Patole AM, Carta A, Chopde CT and Subhedar NK.** GABAA receptors mediate orexin-A induced stimulation of food intake. *Neuropharmacol* 50, 16–24, (2006).
- Kojima K, Kamijo M, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K.** Neuronal relationship between orexin-A- and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides*. 43(2):63–71 (2009).
- Korotkova TM, Eriksson KS, Haas HL and Brown RE.** Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regul Pept* 104,83–89, (2002).
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE.** Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*. 1;23(1):7–11, (2003).
- Korpi ER, Gründer G and Lüddens H.** Drug interactions at GABAA receptors. *Progr Neurobiol* 67, 113–159, (2002).
- Kotz CM, Wang C, Teske JA, Thorpe AJ, Novak CM, K. Kiwaki K and J. A. Levine JA** Orexin A mediation of time spent moving in rats neural mechanisms. *Neurosci* 142, 29–36, (2006).
- Krasowsky MD, Rick CE, Harrison NL, Firestone LL and Homanics GE.** A deficit of functional GABA_A receptors in neurons of beta 3 subunit knockout mice. *Neurosc Lett* 240, 81–84, (1998).
- Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, and Åkerman KEO.** Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1567–C1591, (2002).
- Kummer M, Neidert SJ, Jöhren O and Dominiak P.** Orexin (hypocretin) gene expression in rat ependymal cells. *Neuroreport* 12, 2117–2120, (2001).
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K and Sakurai T.** Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842, 256–261, (1999).
- Kurose T, Ueta Y, Yamamoto Y, Serino R, Ozaki Y, Saito J, Nagata S and Yamashita H.** Effects of restricted feeding on the activity of hypothalamic Orexin (OX)-A containing neurons and OX2 receptor mRNA level in the paraventricular nucleus of rats. *Regul Pept* 104, 145–151, (2002).
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I and Yamashita H.** Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11, 1977–1980, (2000).
- Kwak S-E, Kim J-E, Kim D-S, Jung J-Y, Won MH, Kwon O-S, Choi S-Y, Kang T-C.** Effects of GABAergic transmissions on the immunoreactivities of calcium binding proteins in the gerbil hippocampus *J. Comp. Neurol.* 485, 153–164 (2005).
- Lambe EK and Aghajanian GK.** Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slice. *Neuron* 40, 139–150, (2003).
- Lang M, Bufe B, De Pol S, Reiser O, Meyerhof W and Beck-Sickinger AG.** Structural properties of orexins for activation of their receptors. *J Pep Sci* 12, 258–266, (2006).
- Lang M, Soll RM, Durrenberger F, Dautzenberg FM and Beck-Sickinger AG.** Structure activity studies of orexin A and orexin B at the human orexin 1 and orexin 2 receptors led to orexin 2 receptor selective and orexin 1 receptor preferring ligands. *J Med Chem* 47, 1153–1160, (2004).
- Lawrence AJ.** Regulation of alcohol-seeking by orexin (hypocretin) neurons. *Brain Res.* (2009).

- LeDoux, J.E.** Emotions: clues from the brain. *Ann. Rev. Psychol.* 46:209–235, (1995).
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE.** Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep–waking cycle, *J. Neurosci.* 25 (28) 6716–6720, (2005).
- Lei Chen, C. Savio Chan and Wing-Ho Yung.** Electrophysiological and behavioral effects of zolpidem in rat globus pallidus. *Experimental Neurology* 186, 212–220, (2004).
- Levin BE, Dunn-Meynell AA and Routh VH.** Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276, R1223–R1231, (1999).
- Levy R, Lang AE, Dostrovsky JO, P. Pahapill P, Romas J, Saint-Cyr J, Hutchison WD and Lozano AM.** Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain*, 124, 2105–2118, (2001).
- Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN.** Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron* 36, 1169–1181, (2002).
- Li-li Zhang, Lei Chen, Yan Xue, Wing-ho Yung.** Modulation of synaptic GABAA receptor function by zolpidem in substantia nigra pars reticulata. *Acta Pharmacol* 29, (2): 161–168, (2008).
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, De Jong PJ, Nishino S and Mignot E.** The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365–376, (1999).
- Liu RJ, Van den Pol AN, Aghajanian GK.** Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J. Neurosci* 22 (21), 9453–9464. (2002).
- Liu XH, Morris R, Spiller D, White M and Williams G.** Orexin a preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro. *Diabetes* 50, 2431–2437, (2001).
- Liu ZW and Gao XB.** Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J. Neurophysiol* 97, 837–848, (2007).
- Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R and Dieguez C.** Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 41–45, (2000).
- López, JC, Bingman, VP, Rodríguez F, Gómez Y, Salas C.** Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. *Behav. Neurosci.*, 114, 687–699, (2000a).
- López, JC, Broglio C, Rodríguez F, Thinus-Blanc C, Salas C.** Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. *Behav. Brain Res.*, 109, 91–98, (2000b).
- López JC, Gómez Y, Rodríguez F, Broglio C, Vargas JP, Salas C.** Spatial learning in turtles. *Anim. Cogn.*, 4, 49–59, (2001).
- Lorez M, Benke D, Luscher B, Mohler H and Benson JA.** Single-channel properties of neuronal GABAA receptors from mice lacking the 2 subunit. *J Physiol* 1, 11–31, (2000).
- Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP and Åkerman KEO.** The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 275, 30806–30812, (2000).
- Ma J, Leung LS.** Limbic system participates in mediating the effects of general anesthetics. *Neuropsychopharmacol* 1–16, (2005).
- Ma WLD, Fay RR.** Neural representations of the axis of acoustic particle motion in nucleus centralis of the torus semicircularis of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Physiol. A.* 188:301–313(2002).

- Ma WP, Cao J, Tian M, Cui MH, Han HL, Yang YX, Xu L.** Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats. *Neurosci Res.* 59(2):224-30, (2007).
- Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L and Nussdorfer GG.** Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med* 7, 401–404, (2001).
- Malenka RC and Nicoll RA.** Long-term potentiation: a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874 (1999).
- Mananos EL, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B and Kah O.** Involvement of gamma aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinol* 69, 269–280, (1999).
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M and Elmquist JK .** Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435, 6–25, (2001).
- Martin G, Fabre V, Siggins GR and de Lecea L.** Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. *Regul Pept* 104, 111–117, (2002).
- Martin IL and Dunn SMJ.** GABA Receptors. *Tocris Cookson, Ltd*, (2002).
- Martinez GS, Smale L, Nunez AA.** Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res* 955:1–7, (2002).
- Martyniuk CJ, Chang JP and Trudeau VL.** The Effects of GABA Agonists on Glutamic Acid Decarboxylase, GABA-Transaminase, Activin, Salmon Gonadotrophin-Releasing Hormone and Tyrosine Hydroxylase mRNA in the Goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroend Brain J Neuroendocrinol* 19, 390–396, (2007).
- Martyniuk CJ, Crawford AB, Hogan NS and Trudeau VL.** GABAergic Modulation of the Expression of Genes Involved in GABA Synaptic Transmission and Stress in the Hypothalamus and Telencephalon of the Female Goldfish (*Carassius auratus*) *Journal of Neuroendocrinol* 17, 269–275, (2005).
- Matsuda K, Kojima K, Shimakura S, Takahashi A.** Regulation of food intake by melanin-concentrating hormone in goldfish. *Peptides.* 30(11):2060-5 (2009).
- Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M and Goto K.** Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept* 104, 119–123, (2002).
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F and Nussdorfer GG.** Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 778–782, (2001a).
- McCormick CA, Hernandez DV** Connections of octaval and lateral line nuclei of the medulla in the goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in goldfish and catfish. *Brain. Behav. Evol.* 47;113–137, (1996).
- Meek J., Nieuwenhuys R.** (1998). Holosteans and teleosts. In: Nieuwenhuys R., Ten Donkelaar H.J., Nicholson C., editors. *The central nervous system of vertebrates*, vol. 2. Berlin: Springer. p 759–937.
- Meister B.** Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92, 263-271, (2007).
- Mieda M, Williams SC, Sinton CM, Richardson JA, Sakurai Tand Yanagisawa M.** Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J Neurosci.* 24, 10493–501, (2004).
- Miklos IH and Kovacs KJ.** GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neurosci* 113, 581–592 (2002).

- Mintz EM, Phillips NH and Berger RJ.** Daytime melatonin infusions induce sleep in pigeons without altering subsequent amounts of nocturnal sleep. *Neurosci Lett* 258, 61–64, (1998).
- Mintz EM, van den Pol AN, Casano AA, and Albers HE.** Distribution of hypocretin-(orexin) immunoreactivity in the central nervous system of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Chem Neuroanat* 21,225–238, (2001).
- Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J and Nogimori T.** Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 31, 606–609, (1999).
- Miura T, Maruyama K, Shimakura S, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S, Matsuda K.** Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides*. 28(6):1207-13. (2007).
- Mizielinska S, Greenwood S and Connolly CN.** The role of GABA_A receptor biogenesis, structure and function in epilepsy. *Biochem Soc Trans* 34, 863–867, (2006).
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T and Matsukura S.** Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci Lett* 273, 45–48, (1999a).
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Yanagisawa M, and Matsukura S.** Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 495–499, (1999b).
- Morteza Z, Vahhab B, Hossein J.** Effects of central histamine receptors blockade on GABA(A) agonist-induced food intake in broiler cockerels. *Pak J Biol Sci*. 11, 416-21, (2008).
- Moss SJ and Smart TG.** Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 240-250, (2001).
- Muroya S, Uramura K, Sakurai T, Takigawa M and Yada T.** Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca²⁺ in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett*. 309,165–8, (2001).
- Murphy SE, Downham C, Cowen PJ, Harmer CJ.** Direct effects of diazepam on emotional processing in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 199(4):503-13. (2008).
- Nakamachi T, Matsuda, K, Maruyama K, Miura, T, Uchiyama, M, Funahashi, H, Sakurai, T. and Schioda S.** Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the Goldfish. *J of Neuroendocrinology* 18, 290-297, (2006).
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M and Sakurai T.** Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 873, 181–187, (2000).
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, and Goto K.** Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 243–260, (1999).
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, and Suzuki T.** Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J. Neurosci* 26, 398–405, (2006).
- Narnaware YK, Peyon PP, Lin X and Peter RE.** Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *Am. J. Physiol: Regul Integr Comp Physiol* 279, R1025-1024, (2000).
- Naslund E, Ehrstrom M, Ma J, Hellstrom PM and Kirchgessner AL.** Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G470–G479, (2002).
- Nieuwenhuys, R., ten Donkelaar, H.J. & Nicholson, C.** The Central Nervous System of Vertebrates. *Springer, Berlin*, (1998).
- Ninkovic J, Bally-Cuif L.** The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. 39(3):262-74, (2006).

- Northcutt RG.** (2006). Connections of the Lateral and Medial Divisions of the Goldfish Telencephalic Pallium. *J. Comp. Neurol.* **494**:903–943.
- Northcutt RG.** The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain Behav. Evol.* **46**:275–318, (1995).
- Ohkubo T, Boswell T and Lumineau S.** Molecular cloning of chicken prepro-orexin cDNA and preferential expression in the chicken hypothalamus. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 476–480 (2002).
- Ohkubo T, Tsukada A and Shamoto K.** cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J Mol Endocrinol* **31**, 499–508, (2003).
- Okumura T, Takeuchi S, Motomura W, Yamada H, Egashira Si S, Asahi S, Kanatani A, Ihara M and Kohgo Y.** Requirement of intact disulfide bonds in bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 976–981, (2001).
- Olsen RW, Sieghar WT.** GABA(A) receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141–148 (2009).
- Panda S, Hogenesch JB and Kay SA.** Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–325, (2002).
- Panula P.** Hypocretin/orexin in fish physiology with emphasis on zebrafish. *Acta Physiol.* (2009).
- Paoletti R, Nicosia S, Clementi F and Fumagalli G.** *Farmacologia generale e molecolare.* Terza edizione, UTET, (2004).
- Paus T, Koski L, Caramanos Z and Westbury C.** Regional differences in the effects of task difficulty and motor output on blood flow response in the human anterior cingulate cortex. *Neuroreport* **9**, R37–R47, (1998).
- Peciña S, Berridge KC.** Brainstem mediates diazepam enhancement of palatability and feeding: microinjections into fourth ventricle versus lateral ventricle. *Brain Res.* **15**:727(1-2):22–30, (1996).
- Peter RE, Gill VE.** A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* **159**:69–102, (1975).
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers G, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S and Mignot E.** A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* **6**, 991–997, (2000).
- Peyron C, Petit J, Rampon C, Jouvett M and Luppi P.** Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neurosci* **82**, 443–468, (1998b).
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG and Kilduff TS.** Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* **18**, 9996–10015, (1998a).
- Phillips-Singh D, Li Q, Takeuchi S and Ohkubo T.** Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell Tissue Res* **313**, 217–225, (2003).
- Pirone A, Giannaccini G, Betti L, Lucacchini A, Mascia G, Fabbrini L, Italiani P, Uccelli A, Lenzi C, Fabiani O.** [3H] muscimol receptors sites in the carp (*Cyprinus carpio* L.) brain: binding assay and autoradiographic distribution. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **148**(2):324–31, (2007).
- Polzonetti-Magni A, Carnevali O, Yamamoto K, Kikuyama S.** Growth hormone and prolactin in amphibian reproduction. *Zoolog Sci.* **1995** Dec;**12**(6):683–94.

- Popesku JT, Martyniuk CJ, Mennigen J, Xiong H, Zhang D, Xia X, Cossins AR, Trudeau VL.** The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 293(1-2):43-56, (2008).
- Portavella M, Torres B, Salas C.** Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J. Neurosci.*, 24;2335–2342, (2004a).
- Portavella M, Torres B, Salas C, Papini MR.** Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neurosci. Lett.*, 362;75–78, (2004b).
- Portavella M and Vargas, JP.** Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *European Journal of Neuroscience.* 21;2800–2806, (2005).
- Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung R-J and Schier AF.** Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in Zebrafish. *J Neurosci* 26, 13400-13410, (2006).
- Rattenborg NC, Mandt BH, Obermeyer WH, Winsauer PJ and Huber R.** Migratory sleeplessness in the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *PLoS Biol* 2, e212, (2004).
- Rattenborg NC, Obermeyer WH, Vacha E and Benca RM.** Acute effects of light and darkness on sleep in the pigeon (*Columba livia*). *Physiol Behav* 84, 635–640, (2005).
- Reinoso Suarez F.** Modulation by the GABA of the ventro-oral-pontine reticular REM sleep-inducing neurons. *An. R. Acad. Nac. Med. (Madr.)*. 124, 397-411, (2007).
- Richardson DK, Reynolds SM, Cooper SJ, Berridge KC.** Endogenous opioids are necessary for benzodiazepine palatability enhancement: naltrexone blocks diazepam-induced increase of sucrose-'liking'. *Pharmacol Biochem Behav.* 81(3):657-63, (2005).
- Rink E, Wullimann MF.** Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394:152–170. (1998).
- Rink E, Wullimann MF.** Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull.* 57(3-4):385-7, (2002).
- Ripley B, Fujiki N, Okura M, Mignot E and Nishino S.** Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. *Neurobiol Dis* 8, 525–534, (2001).
- Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A and Blundell JE.** SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 13, 1444–1452, (2001).
- Rodríguez R, López, JC, Vargas JP, Gómez Y, Broglio C, Salas C.** Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *J. Neurosci.* 22;2894–2903, (2002).
- Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C.** Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull.* 1;57(3-4):499-503 (2002).
- Rogers CJ, Twyman RE, MacDonald RL.** Benzodiazepine and β -carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* 475, 69– 82, (1994).
- Root AD, Sanford JD, Kavanaugh SI and Sower SA.** In vitro and in vivo effects of GABA, muscimol, and bicuculline on lamprey GnRH concentration in the brain of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Comp Biochem Physiol* 138, 493– 501, (2004).

- Rupp B., Northcutt R.G.** (1998). The diencephalon and pretectum of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): a cytoarchitectonic study. *Brain Behav. Evol.* **51**:239–262.
- Russell SH, Kim MS, Small CJ, Abbott CR, Morgan DG, Taheri S, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA and Bloom SR.** Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* **12**, 1213–1218, (2000).
- Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA and Bloom SR.** The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* **13**,561–566, (2001).
- Ruzicka E, Roth J, Jech, R., Busek P.** Subhypnotic doses of zolpidem oppose dopaminergic-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **15**, 734–735, (2000).
- Sakamoto F, Yamada S and Ueta Y.** Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept* **118**, 183–191, (2004).
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, and Yanagisawa M.** Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573–585, (1998).
- Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, and Goto K.** Structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem* **274**, 17771–17776, (1999).
- Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M.** Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* **46**, 297–308, (2005).
- Sakurai T.** Orexins and orexin receptors: implication in feeding behaviour. *Regulatory Pept* **85**, 25-30, (1999).
- Sakurai T.** Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Medicine Reviews* **9**, 231–241, (2005).
- Sakurai T.** The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* **8**, 171-181, (2007).
- Samson WK, Taylor MM, Anderson JW, and Ferguson AV.** Orexin inhibition of CRH-stimulated ACTH secretion: possible role of potassium channel activation (Abstract). *Proc Ann Mtg Endocr Soc* (no. OR57-5), (2002)
- Saper CB, Chou TC and Scammell TE.** The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* **24**, 726–731, (2001).
- Schneider PG and Rodríguez de Lores Arnaiz G.** Convulsant bicuculline modifies CNS muscarinic receptor affinity. *BMC Neuroscience*, **7**:32, 1-8, (2006).
- Schwartz MW, Woods SC and Porte D Jr.** Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671, (2000).
- Schmued LC, Hopkins KJ.** Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* **874**:123–130, (2000).
- Selbach O, Doreulee N, Bohla C, Eriksson KS, Sergeeva OA, Poelchen W, Brown RE and Haas HL** Orexins/hypocretins cause sharp wave- and θ -related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, GABAergic, noradrenergic and cholinergic signaling. *Neuroscience* **127**, 519–528, (2004).

- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H and Stewart J.** The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacol* 168, 3–20,(2003).
- Sherry, D.F. & Duff, S.J.** (1996). Behavioral and neural bases of orientation in food storing birds. *J. Exp. Biol.*, **199**, 165–172.
- Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, Ihara M, and Goto K.** Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides* 20, 1169–1176, (1999).
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M and Kannan H.** Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277, R1780–R1785, (1999).
- Silverstein JT, Breninger J, Baskin DG and Plisetskaya EM.** Neuropeptide Y-like expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen Comp Endocrinol* 110, 157-165, (1998).
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M and Barnard EA.** Analysis of the set of GABAA receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 279, 41422-41435, (2004).
- Singletary KG, Delville Y, Farrell WJ and Wilczynski W.** Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the nervous system of the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Brain Res* 1041, 231-236 (2005).
- Singletary KG, Deviche P, Strand C and Delville Y.** Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J Chem Neuroanat* 32, 81-89, (2006).
- Skolnik P, Hu RJ, Cook CM, Hurt SD, Trometer JD, Liu R, Huang Q and Cook J.** [³H] RY80: a high-affinity, selective ligand for γ -aminobutyric acid_A receptors containing *alpha*-5 subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 283 (2), 488-493, (1997).
- Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Neville WA, Jewitt F and Porter RA.** The hypocretins are weak agonists at recombinant human orexin-1 and orexin-2 receptors. *Br J Pharmacol* 129,1289–1291, (2000).
- Soffin EM, Evans ML, Gill CH, Harries MH, Benham CD and Davies CH.** SB-334867-A antagonises orexin mediated excitation in the locus coeruleus. *Neuropharmacology* 42, 127– 133, (2002).
- Song C, Chen X, Xia J, Yu Z and Hu Z.** Modulatory effects of hypocretin-1/orexin-A with glutamate and γ -aminobutyric acid on freshly isolated pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 399, 101–105, (2006).
- Spiegel K, Tasali E, Penev P and Van Cauter E.** Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med.* 141, 846-50, (2004).
- Stratford TR and Kelley AE.** Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior, *J Neurosci.* 19 ,11040– 11048, (1999).
- Stratford TR and Kelley AE.** GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior, *J Neurosci.* 17, 4434– 4440, (1997).
- Sweet DC, Levine AS and Kotz CM.** Functional opioid *pathways* are necessary for hypocretin-1 (orexin-A)-induced feeding, *Peptides* 25, 307– 314, (2004).
- Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, and Kotz CM.** Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821,535–538, (1999).
- Szabadi E.** Drugs for sleep disorders: mechanisms and therapeutic prospects. *Br J Clin Pharmacol* 61, 761–766, (2006).

- Szymusiak R, McGinty D.** Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 1129:275-86 (2008).
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T and Mignot E.** Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med.* 1, e62, (2004).
- Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, Rossi M and Ghatei Mand Bloom S.** Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett* 279, 109–112, (2000).
- Takai T, Takaya T, Nakano M, Akutsu H, Nakagawa T, Aimoto S, Nagai K and Ikegami T.** Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor *J Peptide Sci* 12, 443–454, (2006).
- Takakusaki K, Takahashi K, Saitoh K, Harada H, Okumura T, Kayama Y, and Koyama Y.** Orexinergic projections to the midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy. *J Physiol* 568, 1003–1020, (2005).
- Taylor MM and Samson WK.** The other side of the orexins: endocrine and metabolic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E13–E17 (2003).
- Thakkar MM, Ramesh V, Strecker RE, McCarley RW.** Microdialysis perfusion of orexin-A in the basal forebrain increases wakefulness in freely behaving rats. *Arch Ital Biol* 139, 313–328 (2001).
- Thomas M, Sing H, Belenky G, Holcomb H, Mayberg H, Dannals R, Wagner H, Thorne D, Popp K, Rowland L, Welsh A, Balwinski S and Redmond D.** Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *J Sleep Res* 9, 335–352, (2000).
- Thorpe AJ, Doanee DF, Sweetd DC, Beverlye JL and Kotz CM.** Orexin A in the rostromedial hypothalamic area induces feeding by modulating GABAergic transmission. *Brain Res* 1125, 60–66, (2006).
- Thorpe AJ, Mullett MA, Wang C and Kotz CM.** Peptides that regulate food intake: regional metabolic, and circadian specificity of lateral hypothalamic orexin A feeding stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R1409-R1417, (2003).
- Tietz EI, Zeng XJ, Chen S, Lilly SM, Rosenberg HC, Kometiani P.** Antagonist-induced reversal of functional and structural measures of hippocampal benzodiazepine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (3): 932-42, (1999).
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH and Guan XM.** Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438, 71–75, (1998).
- Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB.** Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat. Neurosci.* 11, 998-1000, (2008).
- Trudeau VL, Spanswick D, Fraser EJ, Lariviere K, Crump D, Chiu S, MacMillan M and Schulz RW.** The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. *Biochem Cell Biol* 78, 241–259, (2000).
- Tsujino N, Yamanaka A, Ichiki K, Muraki Y, Kilduff TS, Yagami K, Takahashi S, Goto K, and Sakurai T.** Cholecystokinin activates orexin/ hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. *J. Neurosci.* 25, 7459–7469, (2005).
- Tsujino N, Sakurai T.** Orexin/Hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 61(2):162-76, (2009).
- Tzschentke TM.** Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol.* 56(6):613-72, (1998).

- Tzschentke TM.** Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 12(3-4):227-462, (2007).
- Van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS and Belousov AB.** Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18, 7962–7971, (1998).
- Vanitallie TB.** Sleep and energy balance: Interactive homeostatic systems. *Metabolism* 55, S30-S35, (2006).
- Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Fuccio F and De Luca B.** Extracellular GABA in the medial hypothalamus is increased following hypocretin-1 administration. *Acta Physiol Scand* 182, 89-94 (2004).
- Voisin T, Firar AE, Avondo V, Laburthe M.** Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 147:4977–4984, (2006).
- Volkoff H and Peter RE.** Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Pept* 101, 59–72, (2001).
- Volkoff H, Bjorklund JM and Peter RE.** Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res* 846, 204-209, (1999).
- Volkoff H.** The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp Biochem Physiol*, 144 325–331, (2006).
- Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ.** Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol Pharmacol*, 50 (3): 670-8, (1996).
- Waleh NS, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J and Kilduff TS.** Modulation of the promoter region of preprohypocretin by alpha-interferon. *Gene* 262, 123–128, (2001).
- Whiting PJ .** The GABAA receptor gene family: new opportunities for drug development. *Curr Opin Drug Disc Dev* 6, 648–657, (2003).
- Whitmore, D., Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P.** Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87-91, (2000).
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ and Liu XH** The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 74,683–701, (2001).
- Williams G, Harrold JA, Cutler DJ.** The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc.* 2000 Aug;59(3):385-96.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM and Yanagisawa M.** To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 24, 429-458, (2001).
- Winrow CJ, Tanis KQ, Reiss DR, Rigby AM, Uslaner JM, Uebele VN, Doran SM, Fox SV, Garson SL, Gotter AL, Levine DM, Roecker AJ, Coleman PJ, Koblan KS, Renger JJ.** Orexin receptor antagonism prevents transcriptional and behavioral plasticity resulting from stimulant exposure. *Neuropharmacology.* 58(1):185-94, (2010).
- Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL and De Lecea L.** Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 24, 11439–11448, (2004).
- Wouterlood FG, Van Denderen JC, Van Haeften T and Witter MP.** Calretinin in the entorhinal cortex of the rat: distribution, morphology, ultrastructure of neurons, and co-localization with gamma-aminobutyric acid and parvalbumin. *J Comp Neurol* 425, 177–192, (2000).

- Wu M, Shanabrough M, Leranath C, Alreja M.** Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci* 20, 3900–3908, (2000).
- Wu M, Zaborszky L, Hajszan T, van den Pol AN and Alreja M.** Hypocretin/Orexin Innervation and Excitation of Identified Septohippocampal Cholinergic Neurons. *J Neurosci* 24(14), 3527–3536 (2004)
- Wu M, Zhang Z, Leranath C, Xu C, Van den Pol AN and Alreja M.** Hypocretin Increases Impulse Flow in the Septohippocampal GABAergic Pathway: Implications for Arousal via a Mechanism of Hippocampal Disinhibition. *J Neurosci* 22, 7754–7765, (2002).
- Wu M, Zhang Z, Leranath C, Xu C, van den Pol AN, Alreja M.** Hypocretin increases impulse flow in the septohippocampal GABAergic pathway: implications for arousal via a mechanism of hippocampal disinhibition. *J Neurosci* 22, 7754–7765, (2002b).
- Wullimann, M. F., Rupp, B., Reichert, H.** (1996). Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. *Medical*. 144 pp.
- Xi M, Morales FR and Chase MH.** Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res* 901, 259–264, (2001).
- Xu L, Anwyl R, Rowan MJ.** Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 394:891–894 (1998).
- Xu M and Volkoff H.** Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. *Mol Cell Endocrinol* 271, 28–37, (2007).
- Yamamoto N. and Ito H.** (2005). Fiber connections of the anterior preglomerular nuclei in Cyprinids with notes on telencephalic connections of the preglomerular complex. *The Journal of Comparative Neurology* 491: 212-233.
- Yamamoto T, Suzuki H, Uemura H, Yamamoto K and Kikuyama S.** Localization of orexin-A-like immunoreactivity in prolactin cells in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, 135, 186-192, (2004).
- Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S and Yamashita H.** Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res* 65, 14–22, (1999).
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M and Sakurai T.** Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38, 701-713, (2003).
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, and Goto K.** Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849, 248–252, (1999).
- Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S and Sakurai T.** Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1237–1245, (2002).
- Yamasaki H, LaBar KS and McCarthy G.** Dissociable prefrontal brain systems for attention and emotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11447–11451, (2002).
- Yokogawa T, Marin W, Faraco J, Pèzeron G, Appelbaum L, Zhang J, Rosa F, Mourrain P and Mignot E.** Characterization of Sleep in Zebrafish and Insomnia in Hypocretin Receptor Mutants. *PLOS Biol* 5, 2379-2397, (2007).
- Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A and Scammell TE.** Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494, 845-861, (2006).

- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, and Nishino S.** Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 14, 1075–1081, (2001).
- Zendehdel M, Baghbanzadeh A, Babapour V, Cheraghi J.** The effects of bicuculline and muscimol on glutamate-induced feeding behavior in broiler cockerels. *Comp. Biochem. Physiol. A Neuroethol. Sense. Neural Behav. Physiol* (2009).
- Zhang S, Zeitzer JM, Yoshida Y, Wisor JP, Nishino S, Edgar DM, Mignot E.** Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep* 27:619–627, (2004).
- Zhang Y and Kawasaki M.** Interruption of pacemaker signals is mediated by GABAergic inhibition of the pacemaker nucleus in the African electric fish *Gymnarchus niloticus*. *J Comp Physiol A*, 193, 665–675, (2007).
- Zhdanova IV, Wanga SY, Leclaira OU and Danilovab NP.** Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish, *Brain Research* 903, 263–268, (2001).
- Zhou C, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, von Lossow R, Mares U, Jarry H, Rune GM.** Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp. Neurol.* 203, 72-81, (2007).
- Zhou, C., Li, C., Yu, H.M., Zhang, F., Han, D., Zhang, G.Y.,** Neuroprotection of c-Aminobutyric Acid Receptor Agonists Via Enhancing Neuronal Nitric Oxide Synthase (Ser847) Phosphorylation Through Increased Neuronal Nitric Oxide Synthase and PSD95 Interaction and Inhibited Protein Phosphatase Activity in Cerebral Ischemia. *J. Neurosci. Res.* 86, 2973-2983, (2008).