



---

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CALABRIA**

Facoltà di Farmacia e Scienze  
della Nutrizione e della Salute

**Dottorato di Ricerca in**  
**“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”**  
**XXI ciclo**

Settore Scientifico Disciplinare: Farmacologia (BIO/14)

**TESI DI DOTTORATO**

**Modulazione della glutammina sintasi ed apoptosi astrogliale  
indotta da gp120: ruolo dello stress ossidativo  
e del fattore di trascrizione NFκB**

Coordinatore  
Chiar.mo Prof.  
**Giacinto Bagetta**

Relatore  
Chiar.mo Prof.  
**Vincenzo Mollace**

Dottoranda  
**Dott.ssa Valeria Visalli**

---

Anno Accademico 2008-2009

*Al Prof. Vincenzo Mollace*

## INDICE

1. Introduzione.....	pag. 5
2. Aspetti molecolari dell' infezione da HIV-1.....	pag. 6
3. Neurodegenerazione e demenza associate all'infezione da HIV.....	pag. 10
3.1 Demenza associata all'HIV-1.....	pag. 10
3.2 Neuropatogenesi dell'HAD.....	pag. 10
3.3 Penetrazione dell'HIV-1 nel cervello.....	pag. 11
3.4 Migrazione delle cellule infettate attraverso il tessuto cerebrale.....	pag. 12
3.5 Interazione tra le cellule mononucleate infettate da HIV-1, neuroni ed astrociti.....	pag. 14
4. Stress ossidativo e neuroAIDS.....	pag. 18
4.1 Meccanismi di relazione tra HIV e stress ossidativo in cellule del SNC.....	pag. 21
4.1.1 Generazione di radicali liberi in seguito all'infezione da HIV.....	pag. 21
4.1.2 Alterazioni della barriera ematoencefalica.....	pag. 24
4.2 Ruolo degli antiossidanti endogeni.....	pag. 25
4.2.1 Superossido dismutasi.....	pag. 25
4.2.2 Glutazione.....	pag. 27
4.2.3 Catalasi.....	pag. 30
4.3 Ruolo degli antiossidanti esogeni.....	pag. 30
5. Meccanismi di apoptosi indotti da gp120.....	pag. 31
6. Ruolo di NFκB e gp120 nella regolazione e trasmissione dei segnali pro-infiammatori.....	pag. 42
6.1 Meccanismi molecolari di induzione del complesso trascrizionale NFκB.....	pag. 44
7. Glutamina e glutamina sintasi.....	pag. 47
7.1 Localizzazione e modulazione della glutamina sintasi nel SNC.....	pag. 51
8. Gli antidepressivi atipici: la tianeptina.....	pag. 57
8.1 Teorie sui possibili meccanismi d'azione della tianeptina.....	pag. 57
8.2 Effetti sulla neuroplasticità e neurogenesi.....	pag. 59
8.3 Effetti sulla trasmissione glutammatergica.....	pag. 62

<b>8.4 Effetti sui processi infiammatori.....</b>	<b>pag. 67</b>
<b>9. Scopi della tesi.....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>10. Materiali e metodi.....</b>	<b>pag. 80</b>
<b>11. Risultati.....</b>	<b>pag. 93</b>
<b>12. Discussione.....</b>	<b>pag. 110</b>
<b>13. Conclusioni.....</b>	<b>pag. 124</b>
<b>14. Bibliografia.....</b>	<b>pag. 125</b>
<b>Produzione scientifica.....</b>	<b>pag. 155</b>

## 1. Introduzione

Nell'ambito delle patologie correlate alla Sindrome da Immuno Deficienza Acquisita (AIDS) è noto come, solo in Europa, circa il 5-7 % dei malati ogni anno sviluppi una disfunzione neurologica che viene indicata, nello stadio più avanzato, come Complesso AIDS-Demenza (ADC) (Tardieu, 1999).

Ne deriva, pertanto, che le alterazioni a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) rappresentano uno dei problemi più gravi associati all'infezione da HIV-1.

I pazienti presentano disfunzioni cognitive, disturbi comportamentali e problemi motori che vengono indicati, nello stadio più tardivo, come Demenza associata all'HIV (HAD) (Ghafouri et al., 2006; Ances and Ellis, 2007). Infatti, le alterazioni neurodegenerative sono comuni nei pazienti che soffrono di AIDS, sebbene i neuroni non vengano infettati in seguito alla penetrazione dell'HIV nei tessuti cerebrali.

Nonostante l'impiego della *highly active antiretroviral therapy* (HAART) abbia cambiato lo scenario della demenza associata all'HIV, migliorando i processi cognitivi in alcuni pazienti, sempre nuovi casi di demenza continuano a svilupparsi (Nath and Sacktor, 2006).

Comunque, la disfunzione neurologica in pazienti affetti da AIDS rimane ancora un problema irrisolto.

Così, una migliore comprensione dei processi che scatenano e modulano la neurodegenerazione nel tessuto cerebrale dei pazienti con AIDS potrebbe

fornire un approccio terapeutico di successo alla neuropatogenesi dell'infezione da HIV.

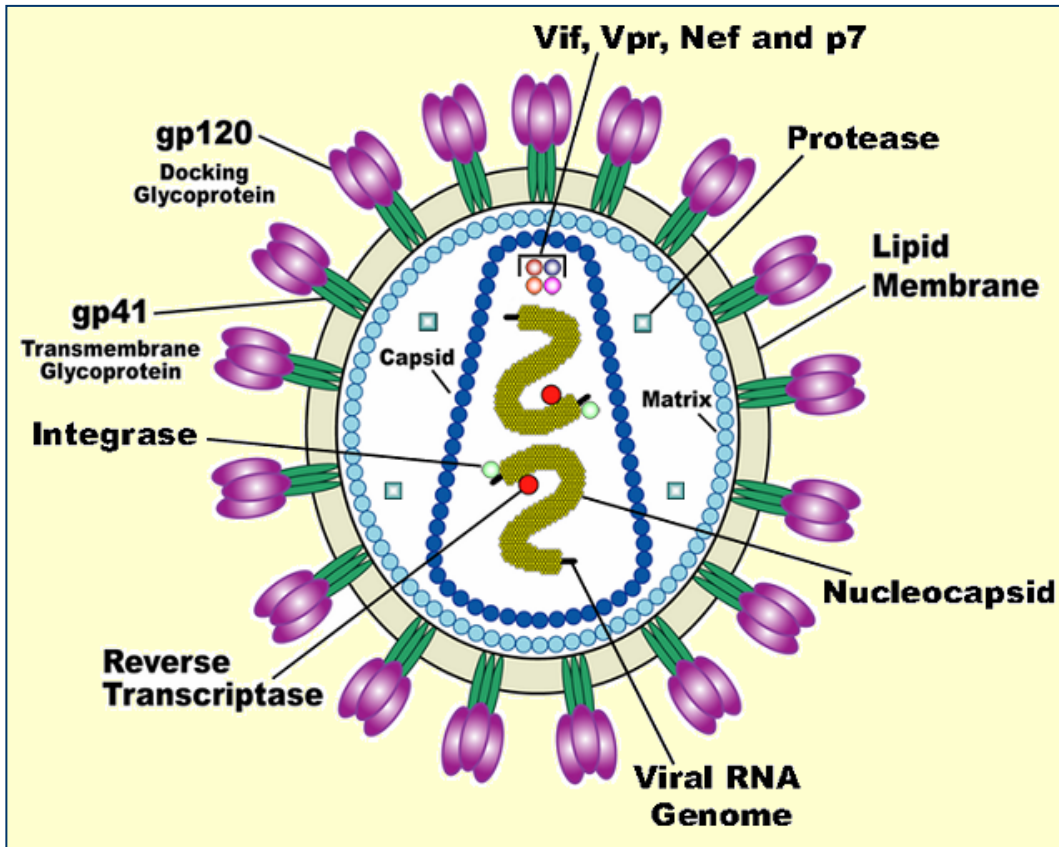
## **2. Aspetti molecolari dell'infezione da HIV-1**

L'HIV è un virus che appartiene al genere delle lentiviridae e alla famiglia dei retrovirus (Barre-Sinoussi, 1996). Esistono due principali tipi di HIV: l'HIV di tipo 1 (HIV-1), che è la forma predominante nel mondo, e il secondo tipo di HIV (HIV-2), che è più diffuso nella parte ovest dell'Africa. L'HIV-1 e l'HIV-2 presentano il 40-50 % di omologia delle sequenze nucleotidiche (Guyader et al., 1987).

Il virione dell'HIV-1 è una particella sferica di circa 100 nm di diametro e contiene un nucleo di forma conica circondato da un rivestimento di lipidi (Fig. 1). Il rivestimento di lipidi deriva dalla cellula ospite e contiene due glicoproteine: gp120 e gp41.

Il nucleo del virus contiene la proteina della matrice p17 (MA), la proteina del capsido p24 (CA), la proteina del nucleocapsido p7 (NC), due copie di RNA genomico a singolo filamento di circa dieci kilobasi, e le tre proteine virali: la trascrittasi inversa p66/p51 (RT), l'integrasi p31 (IN) e la proteasi p15 (PR) (Stevenson and O'Brien, 1998).

Il genoma dell'HIV-1 (Fig. 2) è costituito da dieci frammenti codificanti per proteine ben identificate (Li et al., 1992; Stevenson and O'Brien, 1998; Wang et al., 2000): il gene *gag* codifica per le proteine strutturali del nucleo



**Figura 1.** Rappresentazione strutturale del virus dell'HIV nella forma matura.

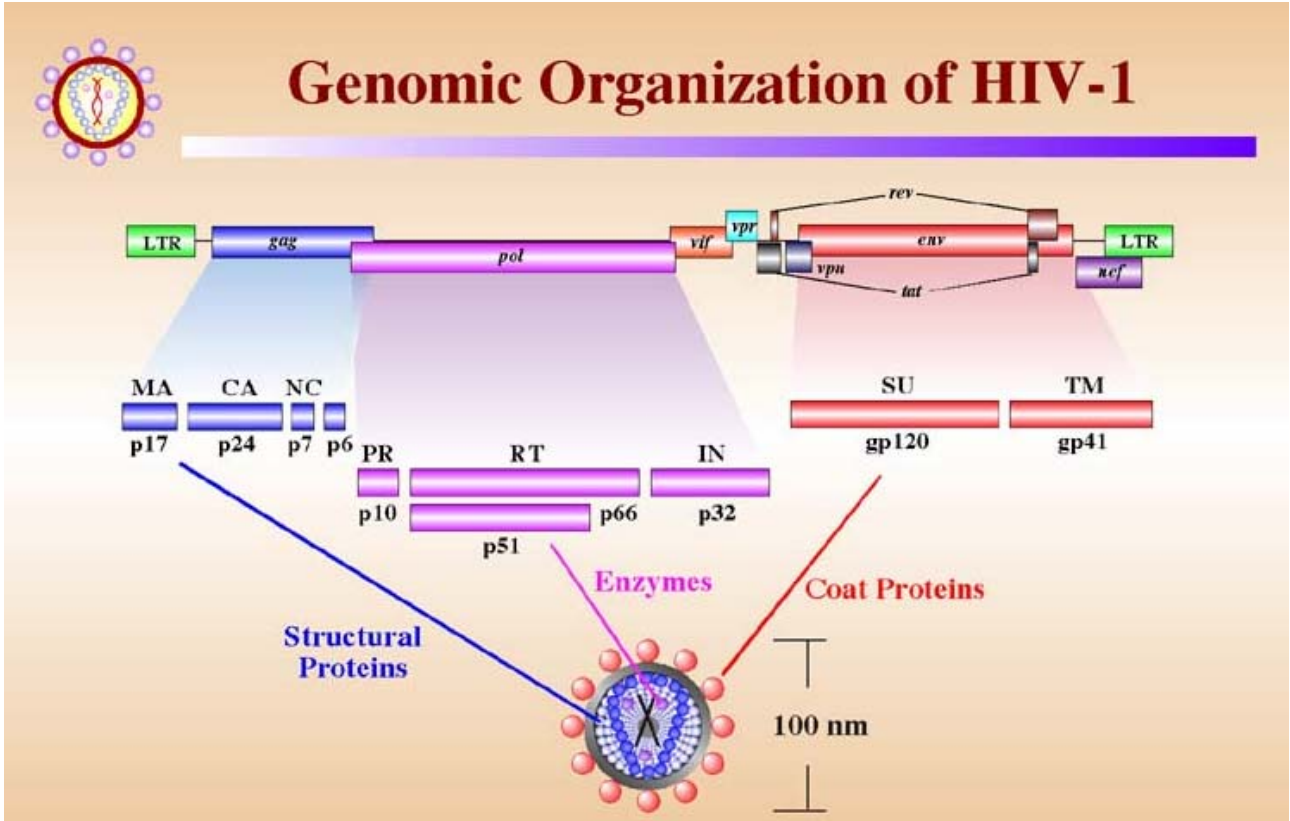


Figura 2. Organizzazione genomica dell'HIV-1.



virale (MA, CA, NC e p6), il gene *pol* codifica per gli enzimi richiesti per la sintesi degli acidi nucleici virali (RT - trascrittasi inversa), l'integrazione degli acidi nucleici virali nel DNA della cellula ospite (IN - integrasi) e la maturazione del virione (PR). Il gene *env* codifica per le glicoproteine strutturali dell'involucro esterno coinvolte nel legame e nella fusione alla cellula bersaglio (la proteina superficiale gp120 (SU) e la proteina transmembranaria gp41 (TM), rispettivamente). *Tat* e *rev* sono geni regolatori che codificano per due proteine che possono modulare l'espressione genica virale (Kingsman and Kingsman, 1996). *Tat* è una proteina transattivante, che si lega a specifiche regioni (TAR, o Transactivation Response Region) e attiva la trascrizione dell'mRNA. *Rev* si lega agli RRE (*Rev Response Element*) e determina l'uscita dal nucleo del pre-mRNA contenente gli introni, dal quale, tramite un processo di splicing, si forma l'mRNA maturo. In aggiunta, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* sono geni virali accessori che codificano per le proteine che regolano la sintesi e l'assemblaggio di nuove particelle infettive del virus (Bour and Strebel, 2000; Steffens and Hope, 2001). Il fattore infettivo dei virioni (*vif*), che è essenziale per la maturazione del virione, determina l'infettività ed è coinvolto nella funzione della proteasi p15. La proteina regolatrice del virus (*vpr*) fa parte del complesso di reintegrazione, ovvero è necessaria per l'importazione nel nucleo ed è un attivatore della trascrizione. La proteina virale sconosciuta (*vpu*) è coinvolta nel rilascio dei virioni e nella degradazione dei CD4. *Nef* regola negativamente l'espressione dei CD4 sulla

superficie cellulare, accresce l'infettività delle particelle di HIV-1 ed è essenziale per una corretta replicazione virale (Luo et al., 1997).

### **3. Neurodegenerazione e demenza associate all'infezione da HIV**

#### ***3.1 Demenza associata all'HIV-1***

Sebbene vari patogeni opportunisti possano causare complicazioni neurologiche nei pazienti con l'AIDS, lo stesso HIV-1 ha caratteristiche di neuro-invasività e neuro-virulenza e ad uno stadio avanzato dell'infezione può causare una demenza subcorticale chiamata *demenza associata all'HIV-1* (HAD), caratterizzata da alterazioni cognitive e motorie (Price, 1996).

I sintomi motori includono tremore, debolezza delle gambe, andatura instabile, movimenti e linguaggio rallentati e culminano in apatia crescente, quadriplegia, incontinenza, ed infine in una forte demenza globale e mutismo (Navia et al., 1986).

All'inizio del 1990 il 20-30% dei pazienti con AIDS ha sviluppato HAD (McArthur et al., 1993).

#### ***3.2 Neuropatogenesi dell'HAD***

La neuropatologia associata con le forme più severe di HAD, chiamata encefalite da HIV-1 (HIVE), è caratterizzata da sfoltimento dendritico (Masliah et al., 1997), semplificazione dei contatti sinaptici (Fox et al., 1997; Verall et al., 1999), pallore mielinico, astrocitosi (proliferazione di astrociti attivati), infiltrazione di cellule mononucleate nel parenchima del cervello,

nodi microgliali, formazione di cellule multinucleate giganti (MGC) (Glass et al., 1995; Giulian et al., 1996) e può anche includere una selettiva perdita neuronale (Masliah et al., 1992). Le MGC risultano dalla fusione tra i macrofagi infettati da HIV e la microglia mentre i nodi microgliali sono gruppi di microglia/macrofagi; comunque le MGC risultano presenti solo nel 50% dei pazienti con HAD (Wiley and Achim, 1994).

Altri studi riportano una buona correlazione tra il carico virale intratecale, come determinato da più metodi quantitativi, e i disturbi clinici (Wiley and Achim, 1994; McArthur et al., 1997).

Sebbene le proteine dell'HIV-1 siano state evidenziate in neuroni, astrociti, oligodendrociti e cellule microvascolari endoteliali del cervello (BMEC) (Wiley et al., 1986; Bagasra et al., 1996), l'HIV-1 si replica solo nelle cellule mononucleate/microgliali infiltrate nel cervello adulto (Vazeux et al., 1987; Kure et al., 1990; Kolson et al., 1998).

### ***3.3 Penetrazione dell'HIV-1 nel cervello***

L'HIV-1 penetra nel cervello attraverso cellule mononucleate (monociti) infettate (Nottet and Jendelman, 1995). Queste cellule possono aumentare la permeabilità della barriera ematoencefalica attraverso una complessa interazione con le BMEC, le quali sono importanti componenti della barriera.

I monociti infetti da HIV-1 inducono l'espressione di E-selectina (Hofman et al., 1993) e di molecole di adesione (ICAM-1) sulle BMEC (Lafrenie et al., 1996); producono inoltre bassi livelli di ossido nitrico (NO),

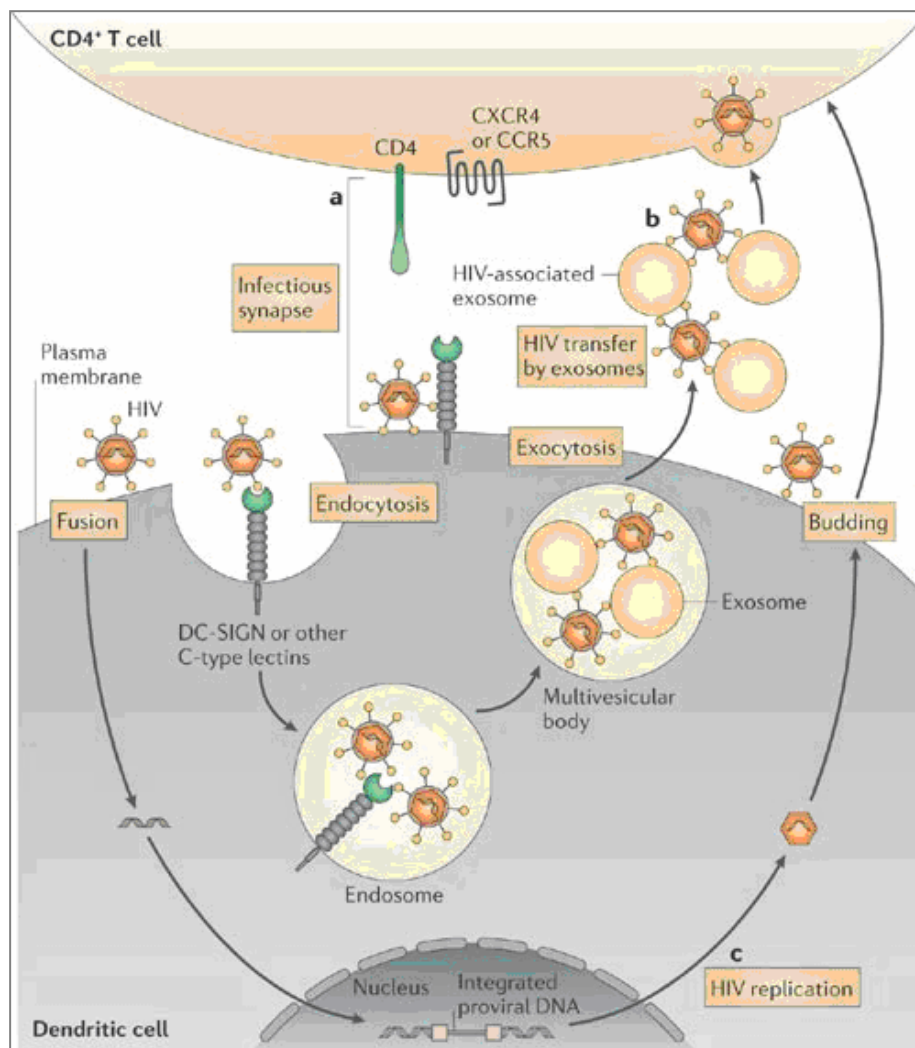
un potente vasodilatatore (Bukrinsky et al., 1995) ed anche un alto livello di metalloproteasi della matrice (MMP-9) che attraverso la degradazione delle proteine della matrice extracellulare, adiacenti al monostrato endoteliale, inducono un aumento della permeabilità della barriera ematoencefalica (Dhawan et al., 1992) e potrebbero quindi essere responsabili della precoce penetrazione virale in corso di infezione acuta da HIV-1 tramite il passaggio ed il legame delle cellule mononucleate infettate da HIV-1 nell'endotelio del cervello. Tale passaggio potrebbe anche coinvolgere le cellule dendritiche, poiché è stato documentato che l'HIV è in grado di legarsi ai DC-SIGN (dendritic cell-specific C type ICAM-3 grabbing non-integrin) (Fig. 3).

Inoltre, accanto a questi sottili cambiamenti, si osserva anche un evidente danneggiamento dell'endotelio che può essere alla base dell'eccessiva infiltrazione di cellule mononucleate nel cervello ed anche contribuire agli stadi più severi dell'HAD (Boven et al., 1999).

### ***3.4 Migrazione delle cellule infettate attraverso il tessuto cerebrale***

Le cellule mononucleate infettate da HIV-1 sono state evidenziate maggiormente nelle regioni sottocorticali dell'SNC, come la materia bianca cerebrale, la materia grigia profonda (gangli della base e talamo), e il mesencefalo ventrale (Brew et al., 1995; Wiley et al., 1998).

Sebbene gli esatti meccanismi che sottendono questa distribuzione rimangano non chiari, è stato suggerito che l'espressione nel cervello di



**Figura 3.** Il passaggio dell'HIV attraverso la barriera ematoencefalica coinvolge anche le cellule dendritiche, poiché l'HIV è in grado di legarsi a varie molecole di adesione, tra cui i DC-SIGN (*dendritic cell-specific C type ICAM-3 grabbing non-integrin*).

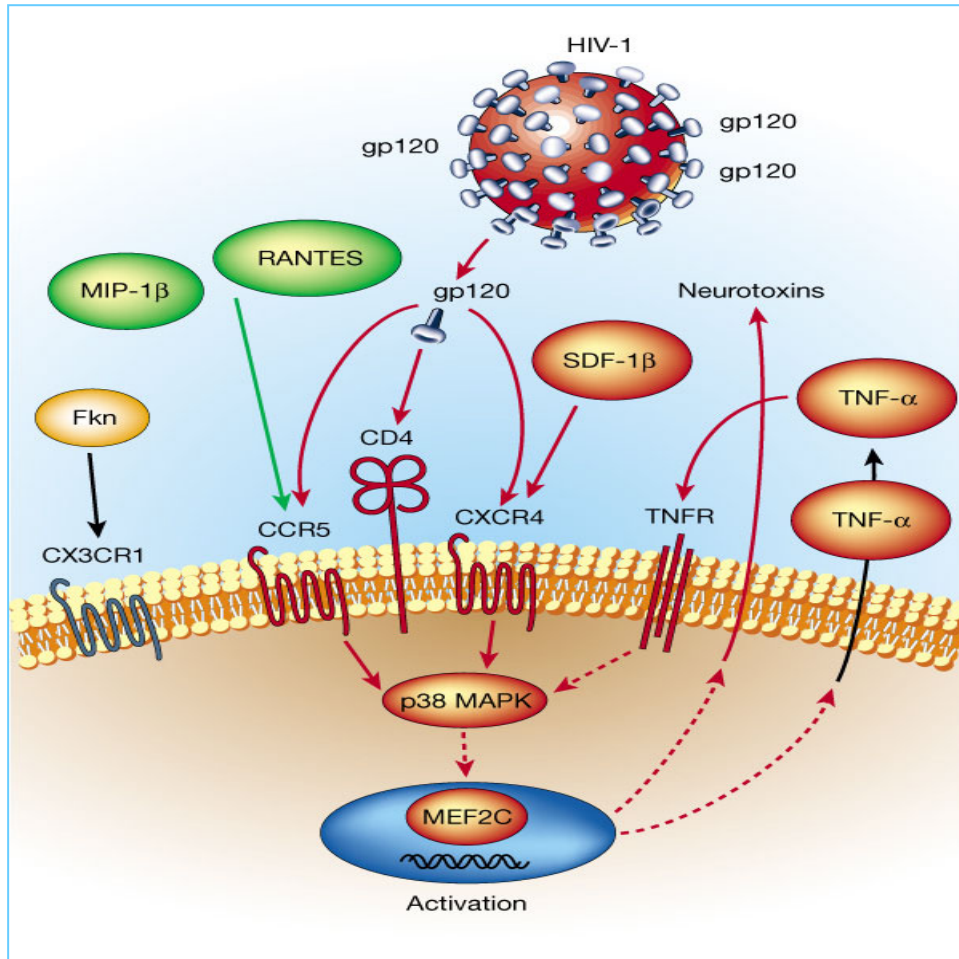
molecole di adesione e delle chemochine attraggono le cellule mononucleate infettate da HIV-1 proprio in queste aree del cervello (Nottet et al., 1997).

Per esempio, l'espressione delle chemochine MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  è risultata elevata nel tessuto cerebrale di pazienti con HAD (Schmidtmayerova et al., 1996; Sanders et al., 1998).

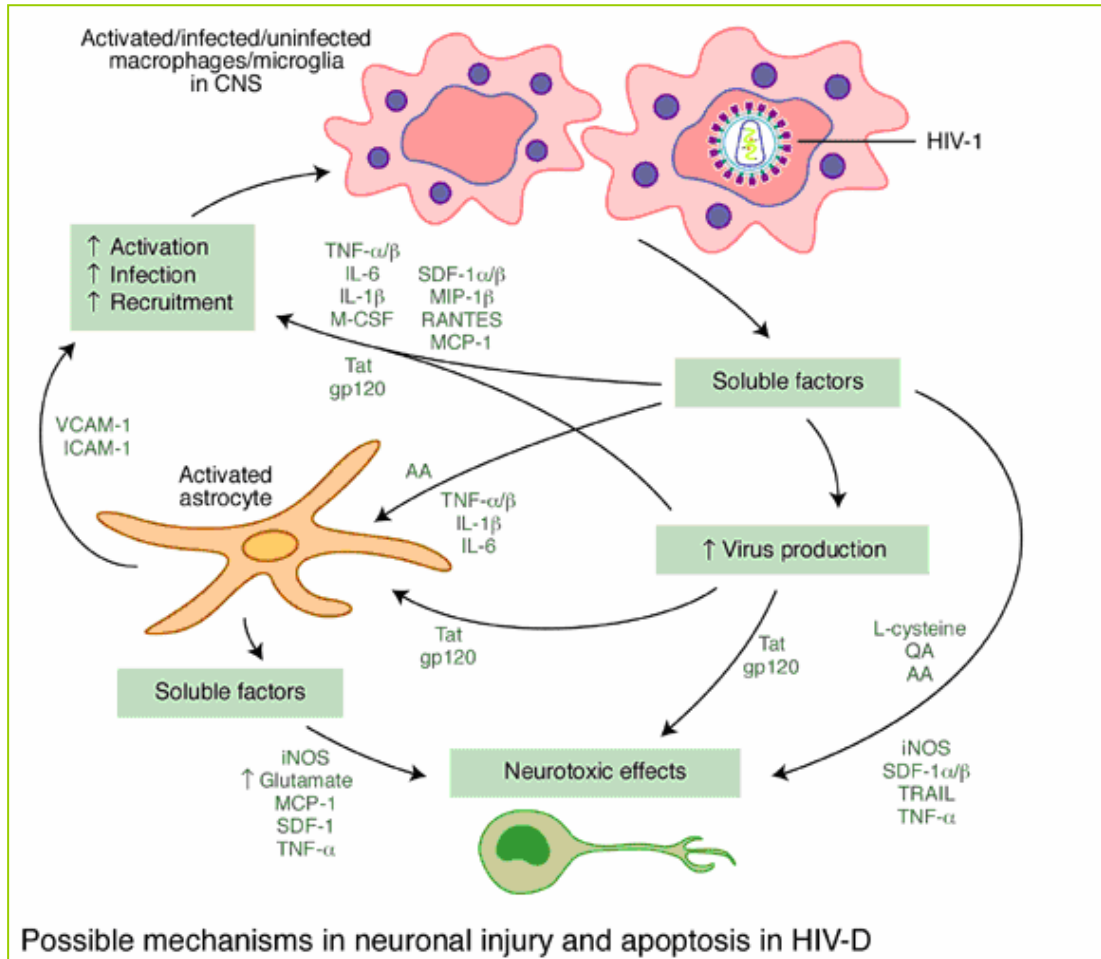
Le chemochine attraggono sia cellule mononucleate infettate che cellule non infettate da HIV-1 nel parenchima cerebrale e ciò ha come conseguenza un'espansione del carico virale nel SNC.

### ***3.5 Interazione tra le cellule mononucleate infettate da HIV-1, neuroni ed astrociti***

Una volta all'interno della parenchima del cervello, le cellule mononucleate infettate da HIV-1 rilasciano proteine dell'involucro come gp120, citochine e chemochine, che a loro volta attivano cellule mononucleate non infette. Entrambe rilasciano sostanze potenzialmente neurotossiche (Fig. 4), che inducono danno ai neuroni, danneggiamento dendritico e sinaptico, e apoptosi. Queste neurotossine inducono la produzione di specie reattive dell'ossigeno, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), il fattore attivante le piastrine (PAF), l'acido arachidonico (AA), gli eicosanoidi quali leucotrieni e prostaglandine, l'NO, il glutammato, l'L-cisteina (Fig. 5) (Brew et al., 1995; Lipton, 1996; Zheng and Gendelman, 1997; Kolson et al., 1998).



**Figura 4.** Pathways alla base della produzione di neurotossine e molecole pro-infiammatorie indotte dalla gp120.



**Figura 5.** Citochine e neurotossine coinvolte nel danno neuronale e nell'apoptosi indotti dall'HIV.



Il PAF, l'NO e l'AA incrementano il livello intracellulare neuronale di  $\text{Ca}^{2+}$ , e questo conduce ad un aumento del rilascio di neurotrasmettitori e dunque un aumento della neurotrasmissione (Lindsberg et al., 1991). Il  $\text{TNF-}\alpha$  può incrementare le correnti al  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti (Soliven and Albert, 1992), causare danneggiamento della mielina e lisi degli oligodendrociti (Selmaj et al., 1990) e indurre una sovrapproduzione del NO nelle cellule monocitiche infettate da HIV-1 (Nathan, 1992).

La produzione di NO indotta dalle citochine può potenziare la neurotossicità mediata dai recettori N-metil-D-aspartato (NMDA-R) (Dawson et al., 1991). L'NO può reagire con  $\text{l'O}_2^-$  per produrre i radicali liberi altamente neurotossici, probabilmente sotto forma di perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) o di uno dei suoi prodotti di degradazione (Bonfoco et al., 1995).

Anche le proteine dell'HIV possono essere neurotossiche. La gp120 può legarsi ai siti di glicina sul recettore NMDA (Pattarini et al., 1998) e, in questo modo, aumentare la risposta neuronale al glutammato o, comunque, a molecole glutammato-simili (Lipton et al., 1991; Pittaluga et al., 1996).

*Tat* può stimolare i recettori NMDA e/o non NMDA e, in questo modo, incrementare i livelli intracellulari di  $\text{Ca}^{2+}$  e causare morte neuronale (Cheng et al., 1998; New et al., 1998).

In sintesi, il danneggiamento neuronale è mediato principalmente da una iperattività dei canali ionici i quali conducono ad un eccessivo influsso di  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo, a sua volta, scatena l'attivazione di vari enzimi potenzialmente nocivi, la produzione, quindi, di radicali liberi e il rilascio di glutammato.

Il glutammato successivamente lega, eccitandoli, i recettori NMDA sui neuroni vicini, provocando ulteriori danni (Kaul et al., 2001).

Gli astrociti sono essenziali per il mantenimento di una bilanciata omeostasi del microambiente dei neuroni (Norenberg, 1994). Infatti, gli astrociti possono regolare negativamente la produzione delle neurotossine da parte delle cellule mononucleate infettate da HIV-1 (Nottet et al., 1995).

Gli astrociti infettati da HIV-1 possono viceversa perdere la loro capacità di *scavenger* e causare un danneggiamento neuronale. Le cellule mononucleate infettate da HIV-1 e immuno-attivate possono, inoltre, produrre diverse molecole che alterano la capacità di *scavenger* degli astrociti.

#### **4. Stress ossidativo e neuroAIDS**

Negli ultimi anni gli studi *in vitro* ed *ex vivo* hanno tentato di caratterizzare i meccanismi alla base della relazione tra l'infezione da HIV e la neuroAIDS.

In particolare, prove insistenti indicano che l'HIV viene processato da macrofagi e microglia, producendo effetti deleteri sui tessuti cerebrali. (Meltzer et al., 1990; Lipton and Gendelman, 1995; Xiong et al., 2000).

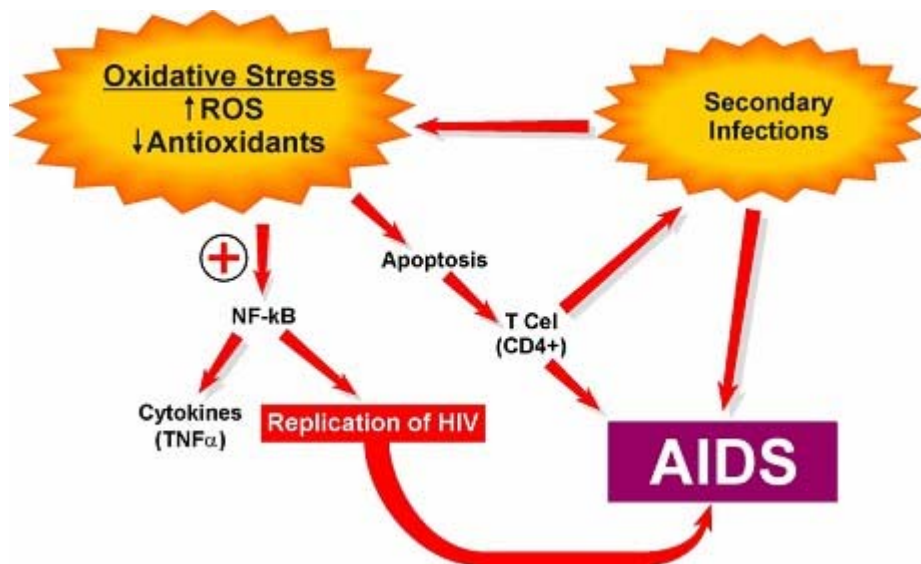
I dati disponibili suggeriscono che i meccanismi che iniziano il danno neuronale e non neuronale nel cervello dei malati di AIDS *in vivo* potrebbero coinvolgere più di un fattore neurotossico. In particolare, varie prove

evidenziano che i pazienti affetti da HIV sono sotto stress ossidativo cronico (Pace and Leaf, 1995).

Questo effetto è susseguente alla deplezione di antiossidanti endogeni e ad un'incrementata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Fig. 6). In aggiunta, questa risposta viene aumentata dall'infiammazione cronica che è associata all'attivazione di linfociti e fagociti, ed è accompagnata da effetti diretti o indiretti di patogeni opportunisti. (Pace and Leaf, 1995; Romero-Alvira and Roche, 1998; Elbim et al., 2001).

Sebbene l'utilizzo della terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART) riduca la frequenza dei disordini associati da HIV (Tardieu, 1999), questo trattamento potrebbe essere meno efficace nei tessuti del cervello e quindi nel trattamento dei disordini cerebrali associati all'HIV.

Quindi, si rende necessaria una migliore comprensione dei seguenti aspetti: 1) I meccanismi che scatenano la overproduzione di radicali liberi nella neuroAIDS; 2) Il meccanismo alla base della disregolazione, legata all'HIV, dei fattori che modulano il bilancio tra la sopravvivenza e la morte delle cellule del SNC; 3) Il ruolo di antiossidanti endogeni ed esogeni nei tessuti cerebrali durante l'infezione da HIV.



**Figura 6.** I pazienti affetti da HIV sono sotto stress ossidativo cronico e tale effetto è susseguente alla deplezione di antiossidanti endogeni e ad un'incrementata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

#### ***4.1 Meccanismi di relazione tra HIV e stress ossidativo in cellule del SNC***

Lo stress ossidativo è stato suggerito essere coinvolto in molti aspetti della patogenesi della patologia da HIV inclusa la replicazione virale (Davis, et al. 1999; Mollace et al., 2000), la risposta infiammatoria, la riduzione della proliferazione di cellule immunitarie, la perdita delle funzioni immunitarie, la perdita di peso cronica e l'incremento di sensibilità verso la tossicità dei farmaci (Pace and Leaf, 1995; Cross et al., 2000; Elbim et al. 2001).

Di queste, l'infezione da HIV di macrofagi e microglia e il seguente incremento di permeabilità della BEE, è stato suggerito giocare un ruolo chiave nella neuropatogenesi dell'infezione da HIV.

##### ***4.1.1 Generazione di radicali liberi in seguito all'infezione da HIV***

La replicazione attiva dell'HIV in macrofagi e microglia rappresenta un serbatoio per il virus ed un importante stadio per la neuropatogenesi dell'infezione da HIV; tale processo conduce alla produzione di prodotti infiammatori e ad un'eccessiva produzione di radicali liberi (Aquaro et al., 2000; Xiong et al., 2000; Elbim et al., 2001).

Una delle neurotossine che è suggerito essere coinvolta nel danno neuronale è il nitrossido (NO). L'NO è un radicale libero nitrogeno generato in più tessuti, incluso l'SNC, tramite bioconversione dell'L-arginina in citrullina dall'NO sintasi (Moncada et al., 1991; Lamas et al., 1998). Può essere rilasciata costitutivamente dai neuroni in risposta a numerosi stimoli

neurochimici, inclusa la neurotrasmissione eccitatoria e cambiamenti dell'influsso di  $Ca^{2+}$  (Moncada et al., 1991). Il rilascio di NO inoltre è stato dimostrato essere indotto *in vitro* dalle cellule gliali in seguito all'aggiunta di citochine infiammatorie (Mollace et al. 1993, 1998) e antigeni solubili, così come la glicoproteina del rivestimento dell'HIV gp120 (Dawson et al., 1993; Mollace et al., 1993; Mollace and Nisticò, 1995). In particolare, le citochine proinfiammatorie (inclusa l'IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$ ), che vengono rilasciate nei tessuti cerebrali infettati dall'HIV (Ensoli et al., 2000) sono in grado di indurre up-regulation dell'isoforma inducibile dell'NO sintasi (iNOS) (Boven et al., 1999). Inoltre, iNOS può essere indotta in colture primarie di ratti mixate con cellule cerebrali in risposta alla stimolazione con gp41 (Bonfoco et al., 1995).

In contrasto, recenti studi hanno dimostrato che sia la gp120 che la proteina tat possono indurre molecole (citochine e chemochine ad esempio) che possono modificare l'espressione dei recettori di superficie della BEE consentendo la loro entrata preferenziale nel cervello.

Questo potrebbe rappresentare un metodo alternativo per l'induzione del rilascio dell'NO nei tessuti cerebrali prima che il virus sia entrato nel SNC.

In aggiunta a questi dati, la somministrazione di gp120 nel cervello del ratto, che conduce a morte apoptotica i neuroni corticali, non ha determinato l'induzione della iNOS anche in presenza dell'attivazione dell'mRNA codificante per l'IL-1 $\beta$ , suggerendo che altri meccanismi (ad esempio la generazione di prostanoidi, il potenziamento della neurotrasmissione

eccitatoria) possano essere coinvolti in questo modello di neuroAIDS (Corasaniti et al., 1998; Bagetta et al., 1999 ).

Recenti evidenze dimostrano che sebbene gli effetti neurotossici diretti dell'NO siano modesti, vengano fortemente aumentati dalla reazione con l'anione superossido a formare perossinitrito. L'anione superossido è prodotto da linee cellulari mieloidi-monocitiche in seguito all'infezione da HIV (Kimura et al., 1993).

La produzione di anioni superossido ha come conseguenza un cambiamento nello stato antiossidante di queste cellule perché la superossido dismutasi (SOD), uno scavenger dell'anione superossido, viene generato a mantenere basse le concentrazioni di questo radicale libero. La reazione produce perossinitrito, che è un potente ossidante, responsabile della nitratura dei residui di tirosina delle proteine strutturali (Beckman and Koppenol, 1996).

Il neurofilamento, una proteina che provvede alla stabilità strutturale dei neuroni, è una delle proteine bersaglio del perossinitrito e la risultante nitratura conduce a distruzione dell'organizzazione dei neurofilamenti e quindi danno neuronale (Beckman and Koppenol, 1996).

Interessantemente, questa reazione è catalizzata dalla SOD, e ciò che potrebbe spiegare la paradossale neurotossicità osservata in topi transgenici overesprimenti l'attività extracellulare della SOD.

#### ***4.1.2 Alterazioni della barriera ematoencefalica***

L'iperproduzione di ROS non è solo capace di produrre effetti deleteri diretti nell'omeostasi dei tessuti del SNC ma può anche modificare la permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE), avendo quindi effetti sulla permeabilità di fattori solubili, rilasciati nella circolazione generale, nei tessuti del cervello.

In particolare, vari studi suggeriscono che disfunzioni di cellule endoteliali microvascolari del cervello possano partecipare alla neuropatogenesi dell'infezione da HIV-1. Per esempio, *in vitro* l'infezione da parte di HIV di macrofagi ha prodotto anioni superossido (Boven et al., 1999, 2000) e la NO sintasi endoteliale è stata indotta in una co-coltura di macrofagi e cellule endoteliali, suggerendo che la formazione di perossinitrito può avvenire quando queste cellule sono a stretto contatto tra loro.

Infatti, lo staining immunistoichimico per la nitrotirosina, marker della produzione di perossinitrito, ha dimostrato un'intensa immunoreattività specialmente nelle aree perivascolari del tessuto cerebrale di pazienti con demenza da AIDS.

La nitrotirosina è stata in particolare co-localizzata nelle cellule che morfologicamente somigliano a monociti e macrofagi e si trovano in prossimità dell'endotelio cerebrale (Mollace et al., 2001).



Inoltre, l'architettura di molti vasi sanguigni è stata danneggiata come dimostrato dallo staining immunistoichimico per la zonula occludens-1, una proteina delle giunzioni strette (Boven et al., 2000). Infatti, durante il contatto con macrofagi infettati da HIV-1, le cellule endoteliali potrebbero contribuire al loro stesso danneggiamento come risultato della produzione di NO.

Queste osservazioni potrebbero spiegare l'incrementata permeabilità della BEE artificiale per l'albumina radioattiva quando messa a contatto con i macrofagi infettati dall'HIV (Dhawan et al., 1995).

## ***4.2 Ruolo degli antiossidanti endogeni***

### ***4.2.1 Superossido dismutasi***

Perché macrofagi e microglia funzionino come serbatoio a lungo termine per l'HIV-1, queste cellule devono possedere un meccanismo per proteggersi dagli effetti tossici dell'anione superossido.

Infatti, elevati livelli di anione superossido nei macrofagi infettati da HIV, comparati con i macrofagi controllo, coincide con elevati livelli di un importante scavenger extracellulare dell'anione superossido, la CuZnSOD citosolica (Boven et al., 1999).

Poiché questi dati *in vitro* dimostrano che l'infezione da HIV dei macrofagi conduce sia ad un incremento di produzione dell'anione superossido e di espressione della SOD, cambiamenti *in vivo* dell'espressione

dell'mRNA per la SOD potrebbero anche essere indicativi di cambiamenti nella produzione di anioni superossido.

Inoltre, i livelli di iNOS e SOD sono stati trovati significativamente elevati in pazienti con demenza, se paragonati ai livelli dei pazienti con AIDS senza demenza (Boven et al., 1999).

Le analisi immunoistochimiche hanno dimostrato che la SOD era espressa nella microglia CD68-positiva, mentre iNOS era presente in eguali quantità negli astrociti GFAP-positivi che nella microglia. Approssimativamente il 70% dei macrofagi positivi agli antigeni p24 dell'HIV-1 hanno espresso anche la SOD suggerendo un diretto evento intracellulare indotto da HIV. L'infezione da HIV-1 dei macrofagi produce sia un aumento di anioni superossido che un aumento dei livelli dell'mRNA per la SOD se paragonati con i macrofagi non infettati (Boven et al., 1999).

Infine, la nitrotirosina è stata evidenziata più spesso e a più alti livelli nelle sezioni del cervello di pazienti con demenza paragonati a pazienti senza demenza (Mollace et al., 2001).

Questi risultati dimostrano che, come risultato della simultanea produzione di anioni superossido e NO, il prodotto risultante perossinitrito potrebbe contribuire alla neuropatogenesi dell'infezione da HIV-1 (Boven et al., 1999).

#### 4.2.2 *Glutathione*

Il tripeptide glutathione (GSH) è presente ad una concentrazione maggiore di 12 mM nelle cellule di mammifero. Funziona come un antiossidante e mantiene il potenziale redox nelle cellule mantenendo i gruppi sulfidrilici delle proteine nella forma ridotta. Alte concentrazioni cellulari di GSH proteggono contro una varietà di differenti ROS. Il GSH interagisce direttamente con i radicali in reazioni non enzimatiche agendo come donatore di elettroni nella riduzione dei perossidi catalizzata dalla glutathione perossidasi.

Le concentrazioni di GSH e altri composti sulfidrilici sono diminuite nel sangue, fegato e SNC di pazienti con infezione da HIV (Choi et al., 2000; Pietarinen-Runtti et al., 2000) e un basso livello di GSH è associato ad una sopravvivenza limitata in pazienti affetti da HIV (Herzenberg et al., 1997).

La diminuzione di concentrazione di GSH è coinvolta in vari disordini come l'infiammazione, l'apoptosi dei linfociti T CD4+ e di cellule neuronali e nel decremento della detossificazione di molecole antiretrovirali.

Comunque, sebbene il livello di GSH sia un fattore determinante nello sviluppo della neurotossicità mediata da radicali liberi, la deplezione di GSH non è un prerequisito per la loro tossicità, come recentemente dimostrato *in vitro* (Smith et al., 2001).

I meccanismi precisi alla base dello squilibrio nel contenuto e nel ricircolo di GSH durante l'infezione da HIV e il ruolo potenziale di GSH nella neuroAIDS non sono chiari.

E' stato suggerito che il GSH venga depleto in modo più rapido o a livelli più alti del GSH consumato, come risultato dello stress ossidativo. Comunque, un severo stress ossidativo non potrebbe diminuire completamente il GSH sistemico *in vivo*, e quindi sono stati ipotizzati anche altri meccanismi alla base delle alterazioni osservate.

In particolare, la biosintesi di GSH potrebbe essere compromessa da vari componenti dell'HIV, per esempio la proteina tat, attraverso la modulazione di enzimi chiave coinvolti nel ciclo del GSH.

In aggiunta, un'inflammatione cronica del SNC, insieme all'attivazione della microglia, che è osservata comunemente in individui infetti da HIV, potrebbe essere associata con anomalità del contenuto di GSH, dipendente dalla concentrazione del GSH, dalla richiesta di GSH e dalla generazione di ROS e NO.

Gli effetti deleteri si pensa siano mediati principalmente dal fattore di trascrizione nucleare  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Guha et al., 2000), l'espressione del quale rappresenta un evento chiave nella regolazione del bilancio tra sopravvivenza e morte nelle cellule del SNC. Tuttavia, esiste un forte dibattito circa il ruolo dello stress ossidativo nell'attivazione di NF $\kappa$ B dal momento che Bowie et al. hanno suggerito che lo stress ossidativo non sia più che un fattore facilitante (Bowie and O'Neill, 2000).

Lo stress ossidativo può indurre l'espressione e la replicazione dell'HIV-1 tramite l'attivazione NF $\kappa$ B (Schreck et al., 1991).

L'N-acetil-L-cisteina (NAC) è un antiossidante che previene l'attivazione di NFκB attraverso l'inibizione della degradazione di IκB (Schreck et al., 1991).

La NAC è stato scoperto inibire la replicazione dell'HIV-1 stimolata dalle citochine in sistemi cellulari infettati sia acutamente che cronicamente (Roederer et al., 1990). Inoltre, la NAC ha inibito l'effetto stimolatorio del TNF-α, del forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) o dello stress ossidativo sull'espressione e la replicazione dell'HIV-1 nelle cellule T (Mihm et al., 1991; Staal et al., 1993).

Un precedente esperimento clinico aveva altresì dimostrato come il paziente sottoposto ad una terapia antiretrovirale convenzionale supplementata con NAC avesse evidenziato un ematocrito stabile ed un veloce incremento nel conteggio di cellule CD4<sup>+</sup> (Spada et al., 2002).

Dal momento che la NAC esplica la propria attività antiretrovirale attraverso l'incremento del livello intracellulare di glutatione (GSH) e considerato che tat è responsabile della deplezione del GSH *in vivo* (Choi et al., 2000), la somministrazione di GSH come tale e dei suoi monoesteri incrementa anche il livello intracellulare di GSH e inibisce la replicazione dell'HIV-1 nelle cellule monocitiche infette (Ho and Douglas, 1992).

### ***4.2.3 Catalasi***

La produzione di anioni superossido da parte delle cellule infettate dal'HIV è contrastata dalla SOD, che produce  $H_2O_2$ .

In condizioni basali quest'ultima viene degradata dalla catalasi. Al momento, non esistono chiare evidenze che l'attività della catalasi sia modificata nei tessuti cerebrali dei pazienti con AIDS. E' stato recentemente riportato che la catalasi è diminuita in linfociti T CD8+ di individui positivi all'HIV, suggerendo che l'attività di scavenger della  $H_2O_2$  potrebbe essere ridotta durante l'infezione da HIV (Yano et al., 1998).

### ***4.3 Ruolo degli antiossidanti esogeni***

L'uso di più selettivi scavenger dei radicali liberi potrebbe aiutare nella comprensione del ruolo dei ROS nella patofisiologia della neuroAIDS e, nel prossimo futuro, potrebbe anche aiutare a creare un migliore approccio per il trattamento dei disordini cerebrali che accompagnano l'infezione da HIV. Sebbene delle poliamine-SOD modificate abbiano dimostrato di essere protettive contro la neurodegenerazione dei neuroni ippocampali (Wengenack et al., 1997), in generale l'uso di molecole peptidiche come SOD o catalasi non ha prodotto significativi benefici quando usate nel trattamento di disordini neurodegenerativi. Questa mancata azione è probabilmente causata dalla difficoltà di queste molecole ad avere accesso nei tessuti del cervello in quantità tali da determinare un'effettiva attività

scavenger contro l'iperproduzione di radicali liberi e alla loro limitata emivita *in vivo*. Recentemente, una nuova classe di complessi macrociclici non peptidici dell'Mn(II) che posseggono l'attività enzimatica della SOD è stata è stata sintetizzata ed ha la stessa attività della SOD nativa ma può attraversare significativamente la BEE (Salvemini et al., 1999)

In particolare, l'M40401, un complesso SOD-mimetico appartenente a questa classe ha dimostrato una significativa protezione contro la morte cellulare apoptotica che avviene negli astrociti che sono stati incubati con sopranatanti di macrofagi umani infettati da HIV (Mollace et al., 2000).

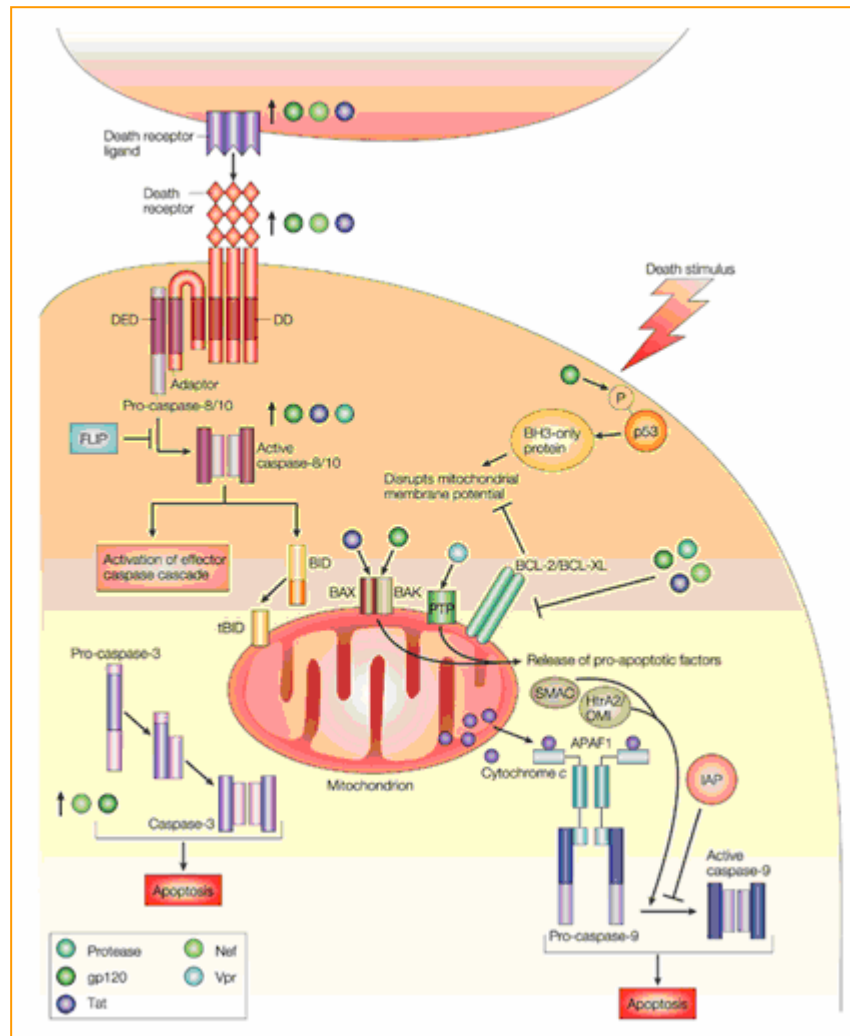
Questo effetto è stato accompagnato da una riduzione della concentrazione di malonildialdeide nelle cellule astrogliali (Mollace et al., 2001) e da una riduzione dello staining della nitrotirosina in queste cellule dimostrando che l'effetto di M40401 avviene attraverso una riduzione della formazione di ROS. Poiché queste molecole hanno dimostrato una significativa attività nei processi neuro degenerativi *in vivo*, potrebbero anche essere usate come approccio terapeutico nella neuroAIDS nel prossimo futuro.

## **5. Meccanismi di apoptosi indotti da gp120**

L'apoptosi costituisce la morte cellulare programmata, cioè un processo fisiologico che, unitamente alla proliferazione cellulare, provvede al controllo emostatico del numero di cellule in un determinato tessuto; in diverse circostanze può però venire innescata anche da fattori patologici.

Il primo elemento dell'apoptosi è l'innescò del programma (priming) di suicidio cellulare ad opera di stimoli che provengono più frequentemente dall'esterno della cellula ma che possono anche derivare da alterazioni del DNA (radiazioni ionizzanti, farmaci antineoplastici), da una alterata espressione genica durante il ciclo cellulare o da variazioni del calcio intracellulare. Nel meccanismo apoptotico, il passo successivo all'innescò del processo è l'attivazione di proteasi citoplasmatica, tra cui le proteasi neutre calcio dipendenti e le caspasi. Le prime sono enzimi inattivi alle normali concentrazioni di calcio intracellulare e si attivano quando le concentrazioni dello ione aumentano (Celotti, 2006). Le caspasi sono una famiglia di proteasi coinvolta nella trasduzione di stimoli apoptotici (Stennicke and Salvesen, 2000); vengono sintetizzate come proenzimi inattivi e vengono attivate da un clivaggio proteolitico. Molte caspasi possono attivarne un'altra in una cascata sequenziale. La caspasi-3 è un frequente effettore a valle della cascata (Stennicke and Salvesen, 2000) e risulta attivata in vari disordini neurologici (Namura et al., 1998; Hartmann et al., 2000; Su et al., 2000). Essa, infatti, viene attivata anche in seguito all'innescò della via apoptotica mediata dal recettore *Fas*, che è coinvolto nella morte delle cellule T in corso di infezione da HIV (Fig. 7). La caspasi-3 attiva è stata evidenziata mediante western blotting in colture fetali del SNC umano esposte a HIV/gp120 (Zheng et al., 1999), sebbene la specifica popolazione cellulare che ha subito l'attivazione della caspasi non sia stata identificata. Inoltre, studi postmortem sul cervello di pazienti pediatrici con HAD hanno evidenziato un incremento





**Figura 7.** Meccanismi alla base della morte apoptotica indotta dall'HIV a carico delle cellule T.

dell'immunoreattività neuronale per la procaspasi-3 (James et al., 1999). Più recentemente, è stato dimostrato che l'immunoreattività della caspasi-3 attiva è significativamente aumentata nei neuroni cerebrocorticali dei pazienti con HAD, come anche in colture neuronali di ratto esposte ad HIV/gp120 (Gwenn et al., 2002). I neuroni esposti ad HIV/gp120 subiscono l'attivazione della caspasi-8 e della caspasi-9 e l'inibizione di entrambe le vie di trasduzione previene l'apoptosi neuronale (Gwenn et al., 2002).

Topi transgenici che esprimono l'HIV/gp120 sviluppano diverse caratteristiche neuropatologiche associate all'HAD, inclusa la degenerazione dendritica (Toggas et al., 1994); l'inibizione delle caspasi *in vivo* previene tale tipologia di danno in topi transgenici (Gwenn et al., 2002).

Un altro meccanismo spesso coinvolto nell'induzione di apoptosi da parte del virus HIV, è la produzione di radicali liberi; infatti, incubando cellule astrogliali umane con soprannatanti di macrofagi infettati dall'HIV, si osserva un aumento dei livelli di malonildialdeide, un marker di perossidazione lipidica, nonché un indicatore di apoptosi (Mollace et al., 2002).

Esistono inoltre vari studi in cui si dimostra la simultanea attivazione, in corso di infezione da HIV, di specie radicaliche nelle cellule del SNC, come l'anione superossido ed il nitrossido (NO). Il nitrossido è in grado di combinarsi con l'anione superossido e generare il perossinitrito (Beckman et al., 1990), un radicale libero la cui produzione sembra essere strettamente

coinvolta nello sviluppo della neuropatogenesi associata ad infezione da HIV (Boven et al., 1999). A supporto di ciò, infatti, è stato provato che la decomposizione catalitica del perossinitrito previene la morte cellulare apoptotica in astrociti umani incubati con i soprannatanti di macrofagi infettati dall'HIV (Muscoli et al., 2002). Inoltre, l'incubazione di cellule gliali con gp120 o *Tat* conduce al rilascio di una grande quantità di radicali liberi che, a sua volta, causa effetti neurodegenerativi attraverso l'attivazione del network di citochine e la sensibilizzazione dei recettori NMDA (Mollace et al., 1995; 1998; Bruce-Keller et al., 2001). L'infezione virale può indurre morte programmata della cellula infettata ovvero apoptosi. Ciò succede in particolare nella fasi avanzate del ciclo vitale del virus, quando l'ampia diffusione virale, o l'abbattimento delle difese immunitarie possono aiutare il virus a colonizzare l'ospite.

In accordo con questa regola generale, la Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) associata ad infezione da parte del virus HIV, determina la distruzione per apoptosi sia delle cellule infettate (morte diretta) e di quelle non infettate che si trovano nelle vicinanze (effetto *bystander*) (Badley et al., 2000). E' stato dimostrato che HIV può indurre apoptosi mediante vari processi, anche quelli non ristretti ai meccanismi di apoptosi di una singola cellula e che possono essere valutati solo in sistemi in vivo usando materiale proveniente da soggetti (Gougeon, 2003) infettati da HIV/SIV. Inoltre, e' stato proposto che l'HIV altera le interazioni trofiche tra

differenti cellule del sistema immunitario, essendo esse dipendenti dal contatto o dalle citochine.

L'HIV virus codifica alcune proteine proapoptotiche, ovvero le proteine che possiedono la capacità di indurre apoptosi nella cellula ospite, come le glicoproteine dell'involucro virale ENV, VPR, TAT, NEF ed NFU (Fauci, 1996). HIV codifica anche per proteine antiapoptotiche, come ad esempio la glutatione perossidasi putativa (Cohen et al., 2004).

Casi clinici e dati epidemiologici in corso di validazione, suggeriscono che le mutazioni che causano la perdita di funzione proapoptotica di VPR (Brenner and Kroemer, 2003) sono più frequenti in virus isolati dai pazienti infetti in cui la malattia non progredisce che da pazienti che sviluppano AIDS. Al contrario le mutazioni che colpiscono il gene della glutatione-perossidasi sono più frequenti in virus dei pazienti con AIDS che in virus isolati da portatori sani, ribadendo nuovamente la nozione che una più alta apoptogenicità del virus HIV accelera la patogenesi dell'AIDS.

Tra diverse proteine codificate dal genoma dell'HIV, ENV risulta essere, almeno *in vitro*, la proteina con maggiore capacità di indurre apoptosi nelle cellule infette (Cicala et al., 2000).

La glicoproteina ENV nasce sotto forma di precursore chiamata gp160 che subisce maturazione proteolitica generando gp41, inserita nella membrana, e gp120, situata nella membrana o espressa sulla superficie cellulare. I recettori delle chemochine CXCR4 e CCR5, a cui si lega gp120, sono i principali trasmettitori dei segnali proapoptotici. Sebbene gp120 sia

stata rilevata nei fluidi corporei, è stato messo in dubbio se essa possa raggiungere concentrazioni così elevate da indurre morte cellulare *in vivo* (Klasse and Moore, 2004). Il complesso gp120\gp41 espresso sulla superficie delle cellule infettate da HIV può indurre apoptosi attraverso l'interazione con cellule non infettate esprimenti il recettore CD4 ed i co-recettori delle chemochine CXCR4 e CCR5. Questo tipo di morte cellulare è scatenata da tre distinti meccanismi: nel primo le due cellule interagenti, tra cui una esprime ENV e l'altra esprime CD4 in associazione con i co-recettori, possono non fondersi del tutto ma scambiare dei lipidi della membrana plasmatica dopo una sorta di processo di emifusione seguita da rapida morte (Blanco et al., 2003); nel secondo l'interazione fra le due cellule può indurre fusione cellulare seguita da fusione nucleare dando vita ad un sincizio (Ferri et al., 2000). I sincizi sono condannati a morire per apoptosi dopo una fase di latenza presumibilmente nel momento in cui si creano conflitti fra i nuclei figli o quando si attiva la replicazione cellulare (Zhivotovsky and Kroemer, 2004); nel terzo meccanismo si ipotizza che le cellule infettate dal virus, sul punto di andare in apoptosi, possano fondersi con cellule esprimenti CD4 ed in questo caso l'apoptosi è rapidamente trasmessa da una cellula all'altra in modo contagioso (Andreau, 2004).

La gp120 può indurre apoptosi non solo nei linfociti, ma anche nei neuroni, nei cardiomiociti, nelle cellule epiteliali renali e negli epatociti (Vlahakis, 2003).

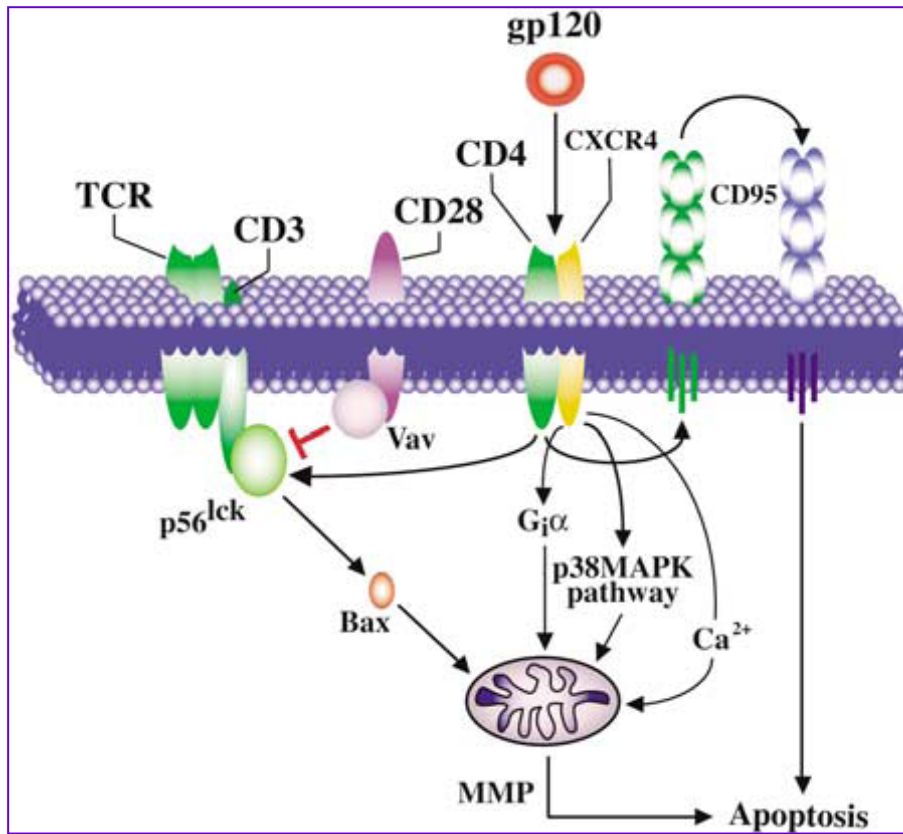
L'insieme degli effetti citotossici indotti da HIV portano alla linfo-deplezione e all'encefalite da HIV o neuroAIDS descritte nel paragrafo precedente, oltre che alle nefropatie ed epatopatie spesso riscontrate nei pazienti con AIDS.

I meccanismi di apoptosi (Fig. 8) indotti da HIV sono stati studiati in maggior dettaglio nei linfociti T.

Gp120, legandosi alla superficie dei linfociti T, induce l'interazione tra CD4 e CXCR4. Il cross-linking tra CD4 e/o CXCR4, mediato da gp120, può ipersensibilizzare i linfociti T all'induzione dell'apoptosi, in quanto lo stesso effetto si ottiene con gli anticorpi contro CD4 e/o CXCR4, in assenza della stimolazione di CD3, ovvero del recettore dell'antigene TCR (Finco et al., 1997). La convergenza di stimoli su CD4 può attivare tutte e due i principali meccanismi di apoptosi, quello dipendente dall'attivazione dei "recettori della morte" CD95/CD95L, o quello mitocondriale Bax-dipendente (Somma et al., 2000).

La stimolazione delle cellule Jurkat (linea dei linfociti T) con un anticorpo contro CD4 (Leu3a mAb) induce un rapido incremento dell'attività della Lck chinasi, l'aumento di Bax, e di conseguenza l'alterazione del potenziale transmembrana mitocondriale e apoptosi (Tuosto et al., 2002).

Quest'effetto può essere neutralizzato da Vav che coopera con CD28 a stimolare i segnali TCR. Questo può spiegare perché CD28 può inibire la morte cellulare indotta da gp120 (Tuosto et al., 1995).

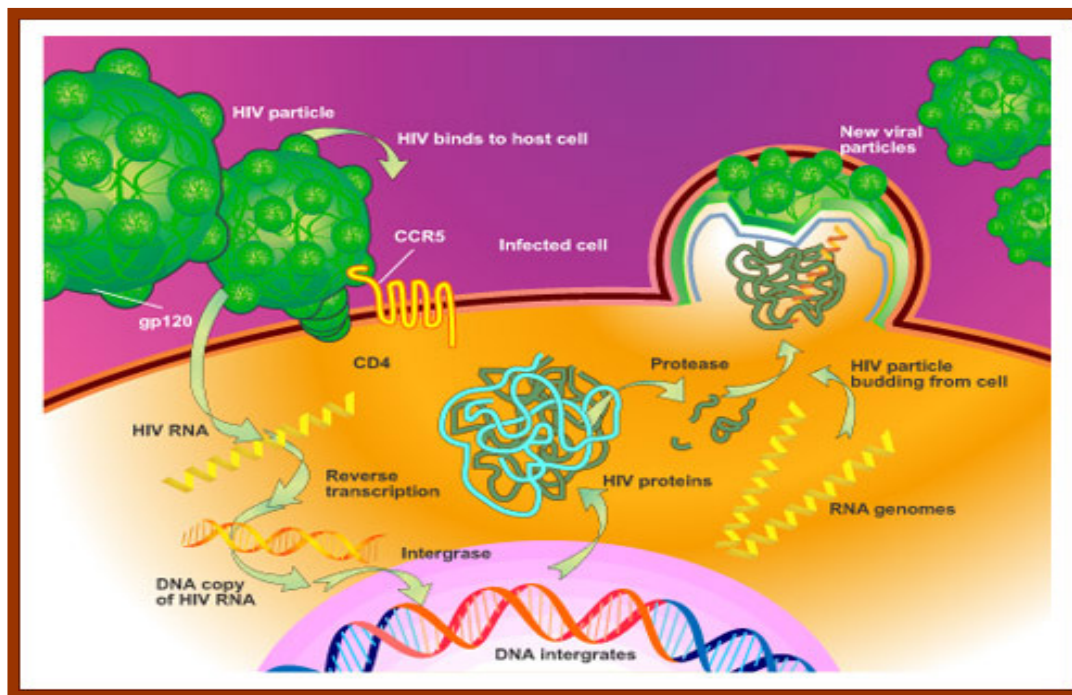


**Figura 8.** Meccanismi di morte cellulare indotti da gp120.

Alla tregua dell'anti-CD4, l'anticorpo monoclonale contro CXCR4 induce una rapida morte dei linfociti T, preceduta da dissipazione del potenziale transmembrana mitocondriale. In questo particolare modello la morte cellulare avviene in un modo indipendente dalla via delle caspasi. Nelle linee cellulari transfettate con una forma troncata di CD4 che lega gp120, ma che manca dell'abilità di trasdurre segnali, l'apoptosi legata alla dissipazione del potenziale transmembrana mitocondriale, si osserva ugualmente grazie all'attivazione di CXCR4 con gp120 (Roggero et al., 2001).

Il segnale scatenato da gp120 (Fig. 9) coinvolge i recettori delle chemochine in neuroni positivi per CXCR4 e, a valle di questi recettori, le proteine G sensibili alla tossina della pertosse (Tsu et al., 2002), la via della proteina chinasi p38, e un rapido incremento del calcio citosolico (Haughley and Mattson, 2002). Gp120 induce apoptosi in colture neuronali rendendole ipersensibili allo stress ossidativo e alle eccitotossine. Gp120 causa anche disfunzione neuronale e morte in topi in sistemi *in vivo*. Specifici inibitori della via del recettore Fas/TNF- $\alpha$  o della via mitocondriale mediata dalle caspasi, possono prevenire la morte neuronale indotta da gp120 (Garden et al., 2002). Un altro degli elementi chiave nei processi di apoptosi indotti da gp120 è l'oncosoppressore p53. Infatti, gp120 addizionata a colture miste di neuroni e cellule gliali murine, induce apoptosi solo se le cellule esprimono la proteina p53, ma non se le cellule derivano da topi p53<sup>-/-</sup>. La presenza di p53 è necessaria sia nei neuroni che negli astrociti.





**Figura 9.** Legame della gp120 ai recettori CCR5 e CXCR4 e successiva penetrazione dell'HIV nella cellula.

Inoltre, p53 sembra essere coinvolta nei processi di apoptosi osservati *in vivo*, in quanto e' possibile dimostrare un accumulo di p53 sia nei cervelli di pazienti con demenza associata ad HIV (Silva et al., 2003) che nel tessuto cerebrale di scimmie con encefalite da SIV (Jordan-Sciutto et al., 2000). Queste osservazioni suggeriscono che p53 possa svolgere un ruolo essenziale nell'apoptosi delle cellule del SNC *in vivo* indotta da HIV e dai suoi sottoprodotti come gp120.

## **6. Ruolo di NFκB e gp120 nella regolazione e trasmissione dei segnali pro-infiammatori**

Il complesso trascrizionale NFκB comprende una famiglia di proteine affini che includono potenti subunità transattivatrici (p65, c-Rel e RelB) e subunità leganti il DNA (p50 e p52). Gli omo ed eterodimeri, formati dall'associazione di vari membri della famiglia NFκB, sono importanti mediatori di segnali di trasduzione che regolano un ampio *range* di geni coinvolti nell'attivazione delle cellule T, nei processi infiammatori, nell'oncogenesi e nell'attivazione di geni antiapoptotici o proapoptotici (Mercurio and Manning, 1999). NFκB partecipa anche nella regolazione dell'espressione del gene del virus HIV-1 interagendo con due siti collocati nella regione U3 all'interno dell'estremità 5' del genoma virale.

Nei linfociti T non stimolati, l'NFκB citoplasmatico è legato attraverso una associazione reversibile con una proteina inibitoria, rappresentata dalle diverse isoforme IκB-α, β, γ, ε (Roulston et al., 1995). In risposta a vari

stimoli come quelli mitogeni, stress, citochine infiammatorie, prodotti di geni batterici e virali, NF $\kappa$ B è attivato e trasloca nel nucleo come risultato di una degradazione proteolitica delle proteine I $\kappa$ B (Chenet al., 1995).

Recenti osservazioni effettuate in differenti sistemi cellulari hanno messo in luce nuove possibilità per acquisire novità sui principali meccanismi molecolari di attivazione di NF $\kappa$ B. E' riportato in letteratura che, dopo successive stimolazioni di cellule a riposo, le diverse proteine inibitorie I $\kappa$ B subiscono fosforilazione sui residui S32 ed S36 da parte di IKK, o S19 ed S23 per I $\kappa$ B- $\beta$  (Weil et al., 1997).

E' stato dimostrato che l'interazione tra la glicoproteina gp120 e la molecola della superficie cellulare CD4 è sufficiente a stimolare l'attività di NF $\kappa$ B nel legare il DNA. L'attivazione di NF $\kappa$ B si osserva sia in linfociti T e linee cellulari linfoblastoidi CD4+, che nelle cellule HeLa P4p56, una linea cellulare umana non linfoide esprime CD4 e p56lck (Briant et al., 1996). Gp120, espresso sulla superficie cellulare, legando cellule esprimenti i recettori CD4, induce fosforilazione e degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e causa la translocazione degli eterodimeri p50-p65 di NF $\kappa$ B nel nucleo in cellule HeLa P4p56 CD4+. Non e' chiaro se NF $\kappa$ B partecipi nell'induzione della morte cellulare in risposta a gp120 o HIV anche in altri sistemi cellulari, come astrociti e neuroni, in quanto l'attivazione della pathway NF $\kappa$ B in queste cellule, anche se proposta, non e' stata ancora ben documentata.

## 6.1 Meccanismi molecolari di induzione del complesso trascrizionale

### NF $\kappa$ B

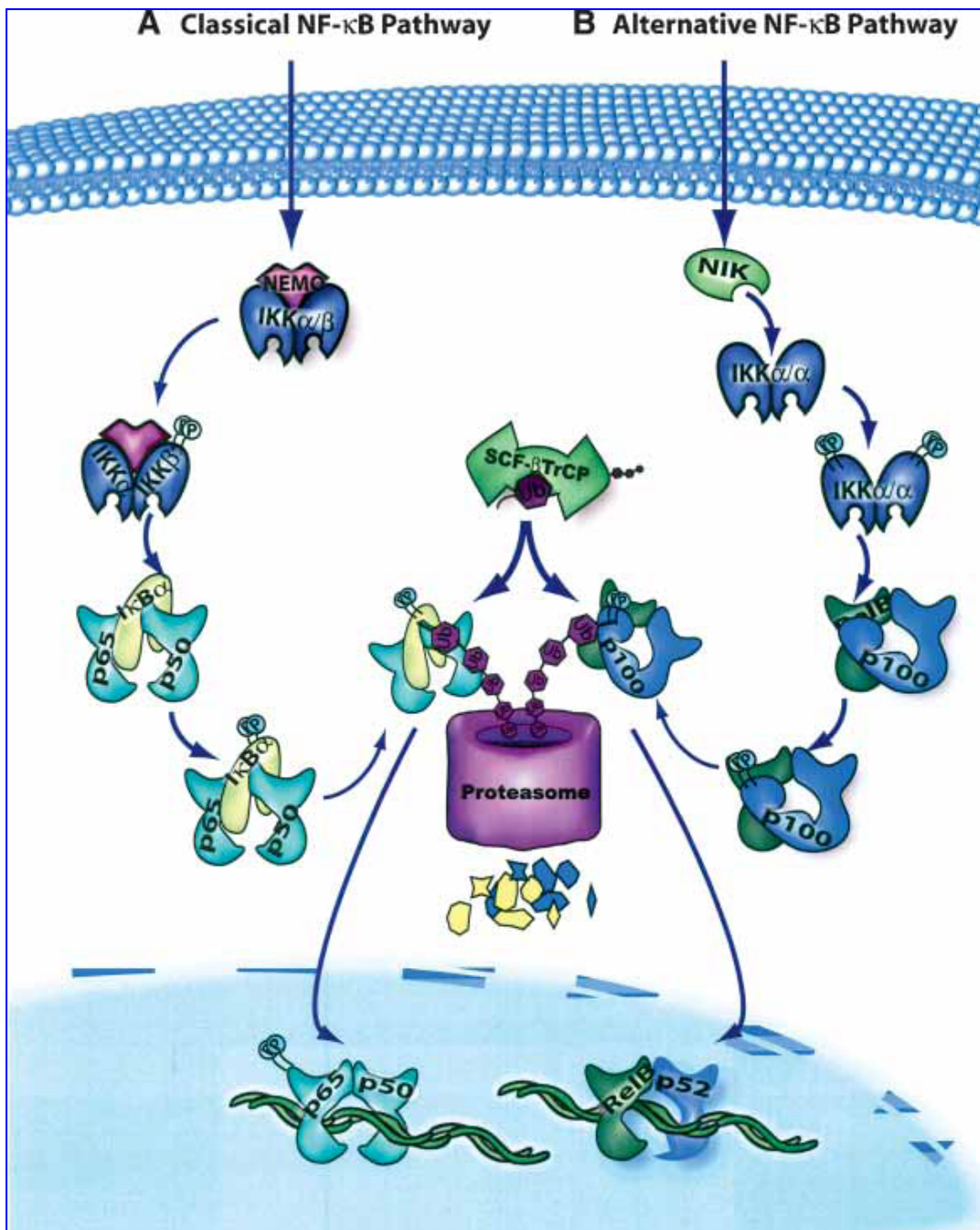
Nelle cellule in stato di quiescenza, prima di essere sottoposte a stimolazione, la maggior parte dei dimeri del complesso NF $\kappa$ B sono localizzati nel citoplasma legati a molecole inibitorie (I $\kappa$ Bs). La stimolazione delle cellule attiva il complesso I $\kappa$ B kinasi (IKK), a sua volta costituito da due subunità catalitiche (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ) ed una subunità regolatoria (IKK- $\gamma$ /NEMO) (Rothwarf and Karin, 1999). Tale chinasi, una volta attivata, fosforila NF $\kappa$ B legato a proteine I $\kappa$ B; ciò comporta la poliubiquitinazione e successivamente degradazione di I $\kappa$ B, creando un sito di legame per il complesso SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> ubiquitina ligasi (Karin and Ben-Neriah, 2000). I dimeri di NF $\kappa$ B liberati entrano nel nucleo dove coordinano l'attivazione trascrizionale di centinaia di geni, molti dei quali dipendono anche da altri fattori di trascrizione (Werner et al., 2005).

Benchè sia di fondamentale importanza, questa pathway, definita la classica via di trascrizione del complesso NF $\kappa$ B, è solo una delle due maggiori pathways conosciute. La seconda pathway, alternativa, consiste in una specifica attivazione dell'eterodimero p52:RelB e non coinvolge l'attivazione dei dimeri p50:RelA (Bonizzi and Karin, 2004). A differenza della pathway classica, che è dipendente sia dall'attività di IKK- $\gamma$  che di IKK- $\beta$ , la pathway alternativa si basa sull'omodimero IKK- $\alpha$ , del quale il substrato preferito è il precursore di p52, ovvero p100/NF $\kappa$ B2 (Senftleben et al., 2001). Questa proteina lega RelB attraverso il proprio dominio amino-

terminale trattenendosi insieme al suo partner nel citoplasma tramite l'estremità carbossi-terminale. L'attivazione dei dimeri IKK $\alpha$  causa la degradazione di quest'ultima e l'ingresso nel nucleo dei dimeri p52:RelB.

Sebbene questo pathway non sia direttamente coinvolto nell'immunità innata e nell'infiammazione, è comunque di fondamentale importanza per la generazione degli organi linfoidi secondari, e per la maturazione e la sopravvivenza delle cellule-B (Bonizzi and Karin, 2004). L'importanza verso il cancro è sottolineata dalle translocazioni cromosomiche associate con il linfoma delle cellule B che rimuove la regione codificante il dominio p100 dell'inibitore I $\kappa$ B. Inoltre, il pathway alternativo potrebbe essere coinvolto nella carcinogenesi mammaria (Demicco et al., 2005). Le mutazioni che riguardano altre subunità del complesso NF $\kappa$ B furono identificate in altri tipi di cancro, specialmente quelli di origine linfoide (Gilmore, 2003).

Un altro pathway che può causare l'attivazione del complesso NF $\kappa$ B è indipendente da IKK e si basa sull'attivazione della caseina kinasi 2 (CK2), che induce la degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$  attraverso la fosforilazione dei siti carbossi-terminali (Kato et al., 2003). Questo pathway presenta un ruolo minore sull'attivazione fisiologica del complesso NF $\kappa$ B, sebbene potrebbe contribuire alla carcinogenesi della pelle poiché essa viene fortemente attivata dalle radiazioni ultraviolette (Fig. 10).



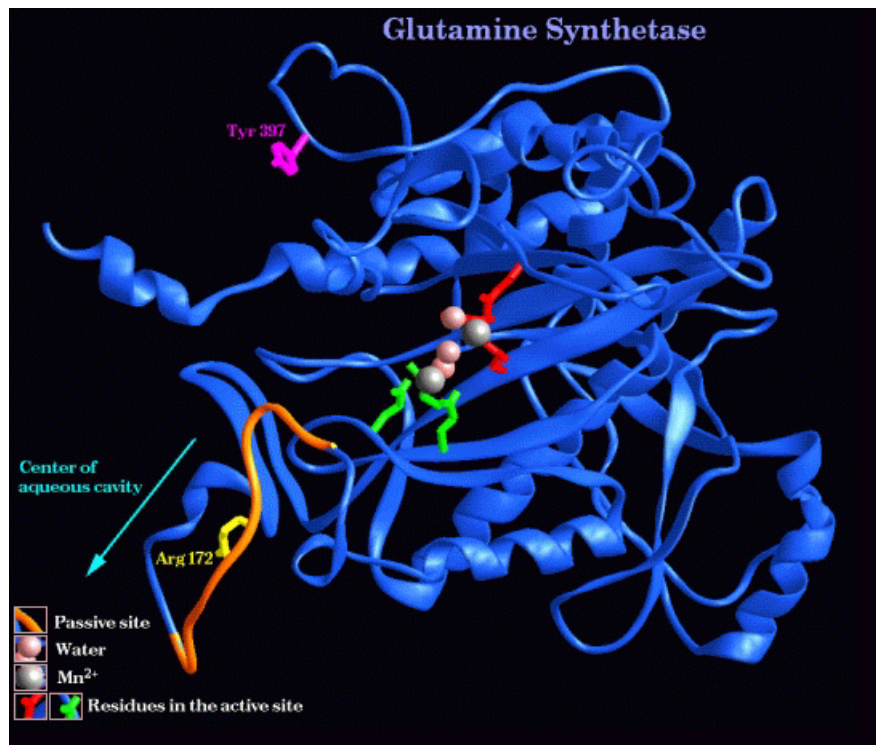
**Figura 10.** Via classica ed alternativa per l'attivazione di NF-κB.

## 7. Glutamina e glutamina sintasi

La Glutamina Sintasi (GS), isolata dal cervello umano, è una proteina di massa molecolare di 44.000 Da (Yamamoto et al., 1987), costituita da dodici subunità identiche contenenti ognuna un residuo di Tyr in posizione 397, in prossimità del suo sito attivo. Gli organismi procarioti ed eucarioti esprimono diverse forme di GS. La struttura meglio caratterizzata, mediante cristallografia a raggi X, è quella dell'enzima batterico, un dodecamero stabilizzato da legami a idrogeno e interazioni idrofobiche tra due anelli esamerici di subunità, con 12 siti attivi (Almassy et al., 1986; Valentine et al., 1968) (Fig. 11). Ciascun sito attivo può essere descritto come un doppio imbuto in cui ATP e Glu si legano alle estremità opposte. Nel punto di incontro dei due imbuto vi è la presenza di due siti di legame per cationi bivalenti ( $Mg^{2+}$  e/o  $Mn^{2+}$ ).

Tale enzima può essere modulato sia allostericamente che mediante modificazioni covalenti; ogni subunità possiede, infatti, oltre ad un sito attivo per la catalisi contenente uno ione  $Mn^{2+}$ , i siti di legame per otto molecole ad azione inibitrice, delle quali almeno sei sono i prodotti finali del metabolismo della Gln.

Ogni inibitore allosterico promuove un blocco parziale mentre il loro effetto combinato diventa additivo cosicché, gli otto inibitori insieme, bloccano completamente l'attività dell'enzima; tale meccanismo di controllo consente così di modulare, istante per istante, il rifornimento di Gln ai processi metabolici dell'organismo.



**Figura 11.** Modello tridimensionale della struttura secondaria della glutammina sintasi batterica (E.C.6.3.1.2.).

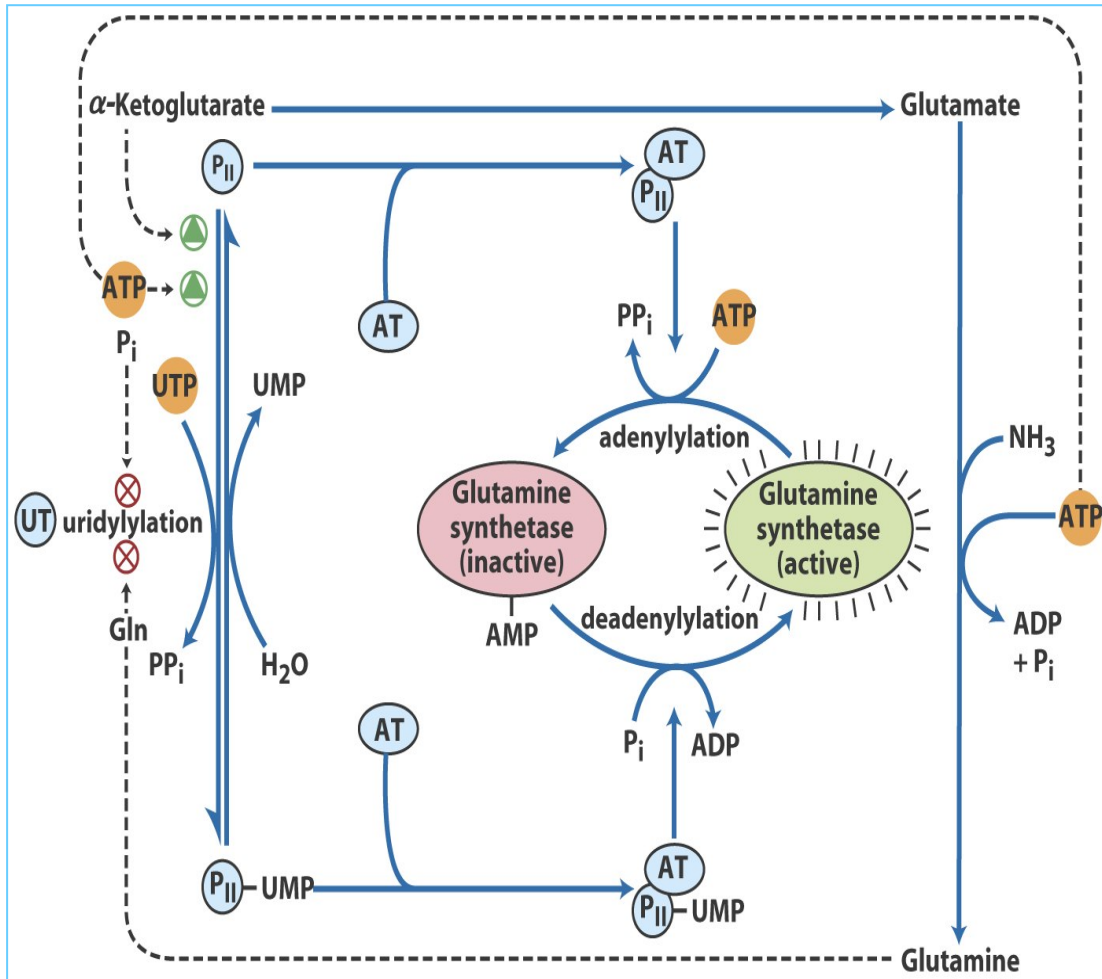


Sovrapposta all'inibizione allosterica vi è l'inibizione dovuta all'adenilazione (legame di AMP) della Tyr<sup>397</sup>, una modificazione covalente che determina un aumento della sensibilità nei confronti dell'inibizione allosterica e che, se interessa tutte e dodici le subunità dell'enzima, provoca una riduzione più accentuata dell'attività catalitica. L'inserzione e la rimozione del gruppo AMP è catalizzata dall'enzima adenilil-trasferasi (AT) che fa parte di una cascata enzimatica complessa sensibile alla Gln, all' $\alpha$ -chetoglutarato, all'ATP e al Pi. L'attività dell'adenilil-trasferasi è infatti modulata dal legame di una proteina regolatrice chiamata P<sub>II</sub> che, in forma uridililata (P<sub>II</sub>-UMP) stimola l'adenilazione della GS da parte di AT, mentre nella forma deuridililata ne riduce l'adenilazione.

Essendo inoltre l'uridililazione di P<sub>II</sub> stimolata dall' $\alpha$ -chetoglutarato e dall'ATP, ed inibita dalla Gln e dal Pi, si osserverà una diminuzione dell'attività della GS quando i livelli di Gln sono elevati; un aumento dell'attività enzimatica quando i livelli di Gln sono bassi e sono disponibili sia ATP che  $\alpha$ -chetoglutarato.

Questo complesso meccanismo di regolazione cui è soggetta la GS riflette il ruolo centrale dell'enzima e degli aminoacidi Glu e Gln nell'ambito del metabolismo cellulare dell'ammoniaca (Fig. 12).

Il glutammato e la glutammina sono infatti composti essenziali sia nei processi di biosintesi delle biomolecole azotate (aminoacidi, amine biogene, nucleotidi), sia nei processi di degradazione aminoacidergica. In particolare



**Figura 12.** Regolazione dell'attività della glutammina sintasi.

la via di degradazione di ogni aminoacido passa attraverso una tappa fondamentale in cui il gruppo amminico viene separato dallo scheletro carbonioso per essere legato, nel citosol degli epatociti, all' $\alpha$ -chetoglutarato, generando Glu. Quest'ultimo viene poi trasferito nei mitocondri, e solo qui il suo gruppo amminico viene di nuovo staccato formando  $\text{NH}_4^+$ .

In molti tessuti, compreso il cervello, l' $\text{NH}_3$  prodotta in eccesso viene invece legata enzimaticamente al Glu con formazione, ad opera della GS, di Gln che sostituisce il Glu nelle funzioni di trasportatore. La glutammina è infatti un composto neutro, non tossico, che può facilmente attraversare le membrane cellulari; essa viene infatti trasportata dai tessuti extraepatici al fegato dove, analogamente al Glu, rilascia l'azoto amidico all'interno dei mitocondri; qui è infatti presente l'enzima glutamminasi che converte la Gln in Glu ed  $\text{NH}_4^+$ .

La reazione catalizzata dalla GS risulta, dunque, particolarmente importante nell'ambito del metabolismo generale dell'organismo al fine di controllare costantemente i livelli di  $\text{NH}_3$  libera ma, come prima menzionato, a livello del SNC riveste anche un ruolo chiave nel controllo dell'eccitabilità cerebrale, essendo la Gln, al tempo stesso, precursore e metabolita del Glu.

### ***7.1 Localizzazione e modulazione della glutammina sintasi nel SNC***

L'utilizzo di tecniche immunostochimiche specifiche per la GS hanno permesso di dimostrare che l'enzima, nel SNC, è presente nelle cellule gliali del cervello di ratto mentre l'attività enzimatica risulta bassa, se non nulla, nei corpi neuronali (Tansey, 1991). Nell'ambito delle cellule gliali, gli

astrociti rimangono comunque la principale sede d'azione della GS, nonostante studi recenti abbiano dimostrato la presenza dell'enzima negli oligodendrociti perineuronali e perivascolari della sostanza grigia (evenienza che permetterebbe a tali cellule di esercitare una funzione trofica nei confronti del neurone glutammatergico).

La presenza di astrociti GS-positivi è stata riscontrata soprattutto nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale, nel neostriato e nella corteccia cerebellare, mentre gli astrociti presenti nella sostanza bianca, come il corpo calloso, risultano debolmente immunoreattivi per la GS (Miyake and Vitamura, 1992). Inoltre, l'attività dell'enzima nelle diverse aree cerebrali nel corso dello sviluppo, può essere direttamente collegata alla maturazione astrogliale; se infatti, prima della nascita, in tutte le regioni del cervello si misurano bassi livelli di attività della GS, parallelamente all'imaturità di tutte le cellule gliali presenti, dopo la nascita l'attività enzimatica aumenta in tutte le aree cerebrali contemporaneamente alla differenziazione delle cellule astrogliali al punto che la GS può essere utilizzata come un marker astrogliale (Caldani et al., 1982).

La sintesi del GLN catalizzata dall'enzima, avviene in due stadi, richiede come substrato specifico il Glu, ed è accompagnata dalla scomparsa di NH<sub>3</sub> libera e dalla liberazione di fosfato proveniente dall'ATP:



In tal senso la GS, oltre a partecipare attivamente al metabolismo degli amminoacidi eccitatori assume, anche a livello cerebrale, un ruolo critico nel

meccanismo di detossificazione dell' $\text{NH}_3$  cerebrale. In molte patologie umane quali l'encefalopatia epatica (Noremborg et al., 1992), il coma, l'epilessia, è stato infatti dimostrato uno stato di iperammonemia che sembra sia riconducibile ad un'alterazione della regolazione gliale del metabolismo dell'acido glutammico e dell' $\text{NH}_3$ . Nonostante sia stato anche dimostrato come l' $\text{NH}_3$  sia in grado di incrementare la trasformazione del Glu in Gln in colture primarie di astrociti, tale effetto non altera però in modo significativo la rimozione netta del Glu dallo spazio extracellulare, né risultano aumentate le altre vie di metabolizzazione del Glu, essendo la produzione di metaboliti [ $^{14}\text{C}$ ]-deaminati inalterata e quella di aspartato addirittura ridotta. È stato invece riportato come il contenuto di GLN libera in una coltura di astrociti cerebrali murini incubati in una soluzione contenente Glu e  $\text{NH}_3$ , aumenti di 3-4 volte quando il pH della soluzione è 7.4-7.8, indicando in questo modo che l'attività enzimatica della GS è ottimale a pH 7.2.

Anche gli ioni sono coinvolti nell'attività della GS dal momento che  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , sebbene a concentrazioni in condizioni diverse, sono essenziali per il normale funzionamento dell'enzima, mentre il  $\text{Ca}^{++}$  inibisce la sintesi Gln probabilmente attraverso un meccanismo di competizione poiché tale effetto è ridotto in presenza di elevate concentrazioni di  $\text{Mg}^{++}$ .

La soppressione dell'attività enzimatica si osserva anche in caso di incremento dei livelli di ADP, che agisce competitivamente all'ATP; ciò merita particolare attenzione dal momento che i comuni disordini metabolici cerebrali, quali l'ipossia, l'ipoglicemia (Noremborg, 1976) o l'ischemia

(Lowry et al., 1964), sono associati ad una forte riduzione dei livelli di ATP ed un concomitante accumulo di ADP (Yamamoto et al., 1987). Esperimenti condotti su culture astrogliali hanno infatti dimostrato che la deprivazione di glucosio, attraverso un decremento di ATP, fosfocreatina e Glu e ad un marcato incremento dei livelli di  $\text{NH}_3$  e ADP, provoca una riduzione di attività della GS. Essendo però la deplezione di ATP solo del 33% rispetto ai controlli, nelle colture prive di glucosio e siero, tale effetto non può essere attribuito soltanto alla mancanza di ATP ma deve essere ricondotto ad un aumento del *turnover* enzimatico.

La riduzione dell'attività catalitica della GS può infatti dipendere anche dalla sua degradazione proteolitica che, secondo Rodney L. Levine, comporta due passaggi: ad una prima modificazione ossidativa metallo-catalizzata, segue la degradazione ad opera di una proteasi specifica.

Evidenze sperimentali indicano come il  $\text{Fe}^{++}$  si leghi ad un sito cationico divalente dell'enzima, interagisca con l' $\text{H}_2\text{O}_2$  e produca una specie dell' $\text{O}_2$  attivato, non ancora identificato, responsabile dell'ossidazione di uno dei sedici residui di His contenuti in ciascuna subunità. Sebbene tale modificazione ossidativa abolisca l'attività enzimatica e renda la proteina sensibile alla successiva degradazione, l'alterazione non implica modificazioni strutturali (Levine et al., 1981). Infatti, la proteina mantiene la sua struttura dodecamerica e le subunità conservano i loro pesi molecolari nativi.

Nei processi neurodegenerativi di tipo eccitotossico, in cui l'iperstimolazione glutamatergica determina un incremento della produzione di radicali liberi, tra cui il perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), si assiste dunque alla modificazione ossidativa della GS con conseguente riduzione della sua attività. Infatti, l'esposizione dell'enzima al perossinitrito provoca la nitratura dei residui di Tyr e la conversione dell'enzima in una forma che è simile a quella adenilata, più suscettibile di degradazione proteolitica; d'altra parte la nitratura dell'enzima precedentemente adenilato comporta la perdita completa dell'attività catalitica.

È molto probabile che l'azione del perossinitrito si espliciti attraverso la formazione dell'intermedio altamente reattivo  $\text{OONOCO}_2^-$ , ottenuto per reazione con la  $\text{CO}_2$ , dal momento che la nitratura dei residui di Tyr a livello della GS è particolarmente stimolata dalla presenza di  $\text{CO}_2$ .

L'inattivazione ossidativa della GS, unita al blocco dei trasportatori gliali del Glu e al suo aumentato release neuronale (azioni queste mediate dagli stessi radicali), potrebbe contribuire ad amplificare ulteriormente l'azione neurotossica del Glu. Infatti, nel corso di ischemia cerebrale sperimentalmente indotta nel gerbillo, una condizione in cui si registra un'elevata produzione di radicali liberi di ossigeno (ROS), Oliver e coll. hanno dimostrato danno ossidativo alle proteine cerebrali con perdita di attività della GS.

Tale attività è stata anche valutata in rapporto alle concentrazioni cellulari di NO, uno dei principali responsabili del danno neuronale. A tal

fine, Minana e coll. hanno dimostrato che una concentrazione 200  $\mu$ M di Nitroarginina, inibitore della NOS, incrementa la sintesi di Gln negli astrociti, mentre 1mM di S-nitroso-N-acetilpenicillamina (SNAP), un agente generante NO, riduce il contenuto cerebrale di Gln. D'altra parte, nei ratti, l'infusione intrastriatale di 8-bromo-cGMP, considerato il secondo messaggero dell'NO, si è visto produrre un incremento del *release* striatale di Glu in modo dose dipendente, determinando contemporaneamente una lenta riduzione dei livelli di Gln (Ohta et al., 1996).

Da quanto in premessa, si evince come la GS astrogliale possa rivestire un ruolo di primo piano nella modulazione del sistema glutammatergico in condizioni basali od in corso di processi neuropatologici in cui vi sia un'abnorme attivazione di tale sistema.

Inoltre, la forte modulazione di tale enzima da parte di svariate specie radicaliche, e del nitrossido in particolare, fa sì che lo studio di tali processi e della loro suscettibilità al controllo farmacologico possa rivestire un ruolo di primo piano in diversi processi fisiopatologici.

Infine, la presenza di diverse isoforme enzimatiche che generano nitrossido e la loro coesistenza ed interrelazione nelle cellule gliali (Mollace et al., 1995), rappresenta un ulteriore elemento da approfondire per chiarire il ruolo del cross-talk nitrossido-GS negli astrociti.



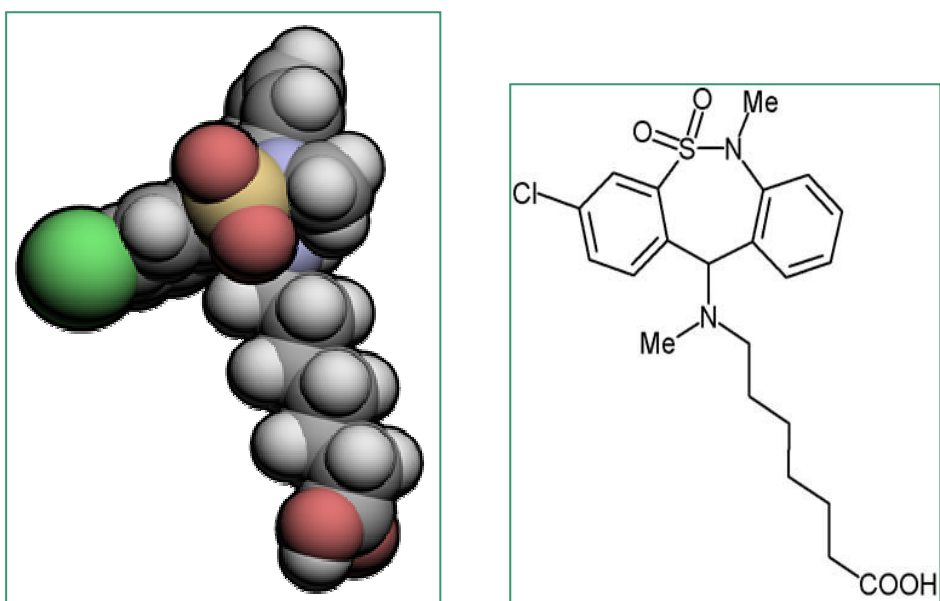
## **8. Gli antidepressivi atipici: la tianeptina**

### ***8.1 Teorie sui possibili meccanismi d'azione della tianeptina***

La tianeptina fu scoperta nei primi anni '80 al Servier Institute, in Francia, durante ricerche approfondite per sviluppare nuovi farmaci antidepressivi.

La sua struttura (Fig. 13) include un sostituito dibenzotiazepinico legato ad una lunga catena carboniosa (costituita da 7 atomi di carbonio), quest'ultima importante fattore di differenziazione dagli altrimenti simili farmaci Triciclici.

La tianeptina, inoltre, è definita come un “antidepressivo atipico”; infatti, a differenza dei triciclici e dei SSRI, che devono il loro effetto al blocco del re-uptake della serotonina, la tianeptina sembra essere capace di diminuirne l'attività, oltre che la quantità nelle sinapsi del sistema nervoso centrale. Quest'effetto, comunque, può essere considerato come effetto secondario dell'unico meccanismo d'azione proposto per la tianeptina: l'interferenza con gli effetti provocati dallo stress sulla trasmissione glutammatergica (Kole et al., 2004; Spedding et al., 2005; Reagan et al., 2007; Svenningsson et al., 2007). Le numerose evidenze secondo le quali la tianeptina ha un meccanismo opposto ai SSRI, ha spinto numerosi studiosi ad indagare, a questo punto, su una possibile e nuova ipotesi per le patologie su base depressiva, ovvero sulla possibilità che queste patologie abbiano come eziologia una modifica della neuroplasticità.



**Figura 13.** Struttura della tianeptina, inclusa vista in 3D.

Da un punto di vista clinico, la tianeptina è un antidepressivo efficace nella riduzione dei sintomi depressivi lievi fino a quelli più gravi, anche associati ad ansia. È inoltre ben tollerata, sebbene possa condurre a sedazione o a deperimento cognitivo.

## ***8.2 Effetti sulla neuroplasticità e neurogenesi***

Per neuroplasticità si intende la capacità del tessuto cerebrale di adattarsi funzionalmente e strutturalmente a diversi stimoli.

La disfunzione che può interessare tale capacità a livello dell'ippocampo, dell'amigdala e della corteccia, può essere considerata come un meccanismo coinvolto nelle disfunzioni cognitive, emotive, mnemoniche e dell'apprendimento alla base delle patologie depressive.

Infatti, l'ippocampo è una struttura del cervello molto importante ai fini dei processi d'apprendimento e memoria, e contiene un'elevata espressione di recettori per gli ormoni steroidei. Ciò implica un'elevata sensibilità agli effetti degli ormoni dello stress, i livelli dei quali sono molto elevati nei pazienti depressi, specialmente in quei soggetti che soffrono della forma più grave (McEwen et al., 2004). L'amigdala, invece, è una struttura molto importante per quanto riguarda i meccanismi di processazione della paura, ed è considerata un target molto specifico per l'ansia e lo stress (McEwen et al., 2004).

In modelli sperimentali animali è stato dimostrato che, se gli animali erano sottoposti a situazioni stressanti, l'ippocampo e l'amigdala

rappresentavano le due strutture maggiormente responsabili degli sbalzi d'umore tipici dello stress, dei danni alla memoria (ippocampo-dipendente), e di un aumento significativo della paura e dell'aggressività, queste ultime tipiche dell'attivazione dell'amigdala (McEwen et al., 2004).

Studi più approfonditi, sviluppati a livello cellulare, analizzarono tali disfunzioni in quanto secondarie a danni come l'accorciamento dei dendriti nell'ippocampo e la loro crescita nell'amigdala laterale, ovvero a danni da rimodellamento; inoltre, è stata notata anche la soppressione della neurogenesi a livello del giro dentato. A livello molecolare, invece, fu evidenziato il coinvolgimento di amminoacidi eccitatori (nonché dei loro trasportatori), in grado, attraverso la loro neurotossicità, di indurre tali danni (McEwen et al., 2004).

Un altro parametro importante per valutare i danni dello stress a livello delle strutture limbiche è il volume ippocampale, il quale sembra immutato in giovani pazienti con depressione lieve, mentre in pazienti con depressione refrattaria o cronica, subisce un'importante diminuzione, suggerendo così che la depressione possa essere correlata anche a variazioni strutturali (Uzbay, 2008).

Tali variazioni strutturali possono essere:

- Perdita cellulare
- Atrofia di importanti regioni (come l'ippocampo)
- Modifica delle attività sinaptiche dei mediatori neurochimici.

Da qui, l'ipotesi monoamminergica, adottata per fornire un'eziologia alle patologie depressive, è stata progressivamente affiancata dalla sempre più affermata ipotesi riguardante la neuroplasticità.

Infatti, il rimodellamento che interessa le aree soggette a tali modifiche, ovvero le regioni limbiche, in cui sono presenti strutture fondamentali per l'emotività, avviene proprio a causa della diminuita capacità da parte del tessuto cerebrale di adattarsi; oltre alle monoammine, come la noradrenalina e la serotonina, anche la quantità di altri importanti neurotrasmettitori come il glutammato, se modificata, è associata ad un danno funzionale "rimodellamento-dipendente" (Uzbay, 2008).

Più in generale, se le sindromi depressive possono essere associate al rimodellamento delle aree responsabili dell'emotività soggettiva, appare chiaro come il meccanismo del farmaco antidepressivo debba o possa coinvolgere anche meccanismi d'azione che prevengono l'insorgenza di tali danni. Infatti, il trattamento con un antidepressivo riduce questo rimodellamento oltre a ripristinare l'equilibrio delle monoammine. Durante la terapia cronica con un antidepressivo, si osserva un effetto neuroprotettivo che normalizza lo stato delle strutture neuronali e delle sinapsi. Inoltre, i cambiamenti morfofunzionali, possono interessare sia l'intero neurone che porzioni di esso, come i dendriti (Uzbay, 2008).

La tianeptina ha effetti benefici su molti steps riguardanti il rimodellamento neuronale. In molti studi su modelli sperimentali animali, i cambiamenti neuronali stress-indotti, specie nell'ippocampo, sono stati

trattati con la tianeptina. Magarinos e collaboratori hanno osservato un accorciamento della lunghezza dei dendriti nei neuroni piramidali della regione CA3 dell'ippocampo, in ratti sottoposti a stress per tre giorni. In seguito, fu somministrata fluoxetina e tianeptina al fine di evidenziare le eventuali differenze tra i due farmaci; infatti, al contrario della fluoxetina, il trattamento con tianeptina si dimostrò molto efficace nel ridurre l'accorciamento dendritico. In più, fu possibile notare un aumento del volume ippocampale, della neurogenesi e dei fattori neurotrofici (Magariños et al., 1999).

### ***8.3 Effetti sulla trasmissione glutammatergica***

Nella passata decade gli studi condotti hanno dimostrato il ruolo del glutammato e dei suoi recettori nella depressione.

Gli amminoacidi eccitatori, in generale, sopprimono la neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo ed hanno un ruolo chiave sulla retrazione e sul rimodellamento dendritico stress-indotto. La regolazione dei livelli extracellulari di glutammato può essere una causa del danno dendritico nell'area CA3 dell'ippocampo indotto dallo stress cronico.

Comunque, il glutammato è molto importante nell'ambito del meccanismo d'azione della tianeptina (Jezova, 2005).

La distribuzione del trasportatore del glutammato gliale (GLT-1) e delle sue isoforme, possono dare un'idea sull'attività dello stesso

neurotrasmettitore così come sul danno dei dendriti e sulla soppressione della neurogenesi.

Reagan nel 2004 studiò la distribuzione di GLT-1 e dell'isoforma GLT-1b nella glia dell'ippocampo di ratti sottoposti ad uno stress cronico per 21 giorni.

Lo stress veniva prodotto restringendo la possibilità di movimento ai topi per sei ore al giorno. Per lo stesso periodo di 21 giorni, veniva fatta una somministrazione i.p. di 10 mg/kg di tianeptina. Lo stress indotto condusse ad un aumento significativo dell'mRNA di GLT-1 e dell'espressione della proteina nell'area CA3 dell'ippocampo e nel giro dentato (malgrado questa possa anche essere considerata come una risposta compensatoria dovuta all'incremento dei livelli di glutammato extracellulare), dimostrando che queste due aree sono quelle maggiormente coinvolte nelle risposte allo stress cronico (Reagan et al., 2004).

La maggiore rivelazione di questo studio fu che, l'aumento dell'attività glutammatergica stress-indotta poteva essere soppressa dalla tianeptina, la quale, al contrario, non si è dimostrata efficace nel modificare i livelli di mRNA del GLT-1 o la sua espressione come proteina nello strato ippocampale del gruppo controllo, ovvero del gruppo non sottoposto a stress. Tutto ciò dimostra che i farmaci antidepressivi migliorano i cambiamenti neuroplastici indotti dal glutammato; ciò comporta che gli antidepressivi agiscano non solo influenzando i livelli di monoammine come la noradrenalina e la serotonina (livelli che rappresentano la base dell'ipotesi

monoamminergica della depressione), ma anche i neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato (Reagan et al., 2004).

In questo studio lo stress indotto non provocò alcuna variazione dei livelli di mRNA di GLT-1b in nessuna regione dell'ippocampo.

Questi studi dimostrarono che i cambiamenti indotti dai trasportatori del glutammato nelle formazioni ippocampali e gli effetti della tianeptina sono limitati alla GLT-1 e non interessano l'isoforma GLT-1b (Reagan et al., 2004). Inoltre, sempre nello stesso studio, è interessante notare come siano i glucocorticoidi, prodotti in situazioni di stress, ad avere un'azione facilitante a carico del glutammato; è bene sottolineare, comunque, che i glucocorticoidi sono necessari per indurre i cambiamenti da stress ma non sono sufficienti, se isolati, a provocare tali danni.

La modulazione della trasmissione glutammatergica data dalla tianeptina è confermata da studi elettrofisiologici che indagano su effetti dei cambiamenti stress-indotti nelle sinapsi glutammatergiche. Per esempio Kole nel 2002 dimostrò che la tianeptina normalizza le correnti NMDA in modelli animali sottoposti a stress cronico nella regione CA3, fondamentale sia come area di eccitazione/inibizione per la formazione della memoria, sia come area nella quale si possono evidenziare i danni da eccitotossicità (Kole et al., 2002).

Anche il nitrossido (NO) può essere coinvolto nell'azione antidepressiva, attraverso un meccanismo ben noto sulla trasmissione del

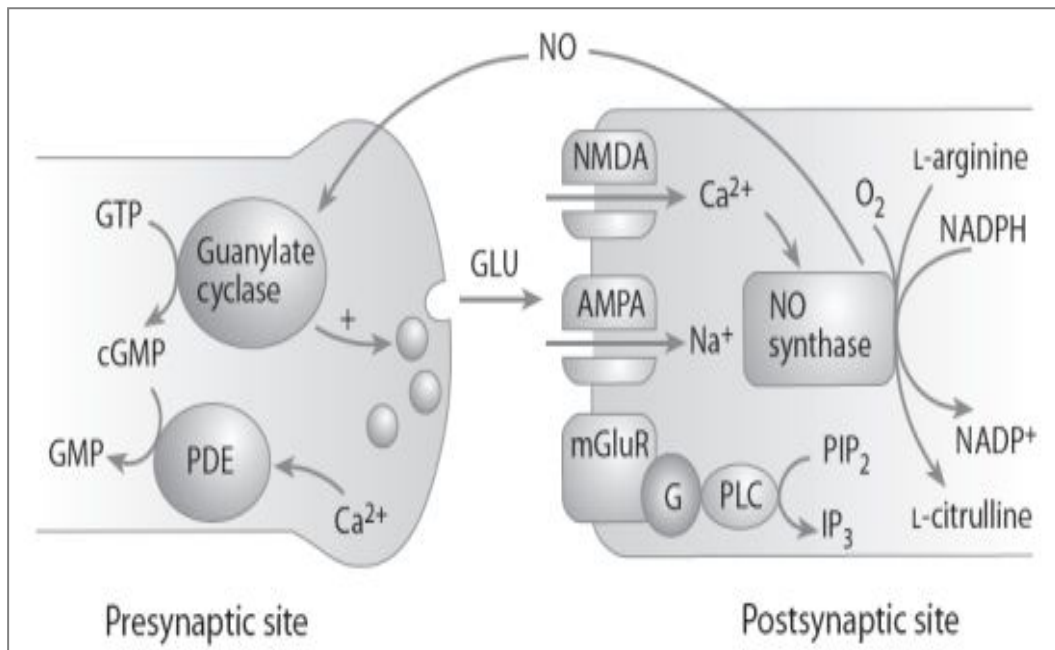


glutammato (Fig. 14). L'NO ha un'emivita breve (6-10 secondi) ed ha un'attività sia periferica che centrale nell'ambito del sistema nervoso. La sua sintesi, infatti, a partire da L-arginina, è catalizzata da una sintasi, NOS, che si trova in molte regioni, anche nell'ippocampo ed ha due isoforme (o tre se classificate come neuronale, endoteliale ed inducibile): una costitutiva ed una inducibile. L'NO può essere considerato come un "nuovo neurotrasmettitore", considerando l'esistenza di un pathway L-arginina-NO.

A livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC), l'NO interagisce con il sistema del glutammato ed il cGMP (Uzbay and Oglesby, 2001), contribuendo alle risposte eccitatorie come la sindrome d'astinenza da alcool.

La stimolazione dei recettori eccitatori, come quelli NMDA del glutammato, causa un'attivazione della NOS mediata dal sistema calcio-calmodulina, attivato a sua volta dall'ingresso di calcio nella cellula postsinaptica. L'attivazione della NOS, naturalmente, induce la produzione di NO che, rilasciato dal neurone postsinaptico, giunge a livello della cellula presinaptica e provoca un rilascio di glutammato attraverso la stimolazione della Guanilato Ciclasi (GC) (Tayfun and Oglesby, 2001).

L'aumento di L-citrullina nel cervello di ratto durante l'astinenza da alcool e l'aumento significativo di cGMP, specie nell'ippocampo, sia durante il consumo cronico che durante l'astinenza, suggeriscono il contributo dell'NO ai sintomi eccitatori da astinenza (Goren et al., 2001, Uzbay et al., 2004).



**Figura 14.** Relazione tra il “neurotrasmettitore retrogrado” NO e la trasmissione glutammatergica.

Wegener nel 2003, mostrò che la tianeptina e la fluoxetina inibiscono la NOS e l'attività dell'NO, soprattutto nell'ippocampo. Quest'inibizione può aumentare indirettamente il loro effetto inibitorio sull'attività del glutammato (Wegener et al., 2003). Essendo l'NO un radicale libero, e considerando che un eccesso di NO può condurre ad una degenerazione cellulare, la tianeptina e la fluoxetina possono determinare protezione dei neuroni. È noto, inoltre, che la tianeptina esercita il suo effetto neuroprotettivo anche attraverso il blocco dell'attività della lattato-deidrogenasi (della quale valori alterati si riscontrano nelle seguenti patologie: infarto miocardico, infarto polmonare, epatite virale acuta, epatite tossica, stato di shock, anemia severa, distrofia muscolare, esercizio muscolare intenso, diabete, insufficienza renale, cirrosi epatica, sindrome di Reye, leucemia e neoplasie), altrimenti attiva in condizioni di ipossia (Plaisant et al., 2003).

Ciò dimostra che i farmaci antidepressivi hanno effetti benefici sui disordini associati alla depressione e/o su disordini neuronali che causano la depressione, alterando direttamente o indirettamente il sistema glutammatergico. Inoltre, effetti positivi sui radicali liberi garantiscono un effetto neuroprotettivo.

#### ***8.4 Effetti sui processi infiammatori***

I farmaci antidepressivi si sono rivelati in grado, oltre agli effetti terapeutici classici, di normalizzare le alterazioni immunitarie osservate nei pazienti depressi, incluso l'aumento della produzione di citochine periferiche

pro-infiammatorie (Maes, 2001). Nei modelli animali, infatti, la depressione è accompagnata da una significativa alterazione dell'espressione delle citochine, normalizzate dal trattamento cronico con antidepressivi (Castanon et al., 2002). Per esempio, *in vitro*, l'incubazione di monociti umani con diversi tipi di farmaci antidepressivi (inibitori delle MAO, triciclici, SSRIs), produce una notevole inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie indotta dal lipopolisaccaride (LPS), un componente della parete dei batteri Gram-negativi (Connor et al., 2000).

Oltre al coinvolgimento delle citochine pro-infiammatorie, è stata rilevata la capacità di questi composti di aumentare i livelli di citochine anti-infiammatorie, come l'interleuchina-10 (Maes et al., 1999).

Gli effetti immunoregolatori possono essere conseguenza di vari meccanismi: per esempio, per i triciclici è stato ipotizzato che, grazie alla loro liposolubilità (Nahas et al., 1979), possano legarsi, attraverso appositi siti, alle membrane dei linfociti (Audus and Gordon, 1982). Inoltre, è ben nota l'esistenza di recettori 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/2C</sub> e dei trasportatori per la serotonina su linfociti, macrofagi, monociti; infatti, alcuni studi (Ignaro, 2000) hanno messo in luce come, attraverso l'azione di vasocostrizione, la serotonina contrasti l'azione vasodilatatrice e permeabilizzante di una sostanza detta EDRF (Endothelium derived relaxing factor), che corrisponde all'ossido di azoto.

Ben si comprende come, contrastando la vasodilatazione e la permeabilità dei vasi, che sono le prime tappe del processo infiammatorio, la serotonina svolga azione antinfiammatoria. A conferma di ciò, in alcuni studi è stato evidenziato come la diminuzione dei depositi di 5-HT e il blocco dei recettori sopracitati, possano causare un effetto immunoregolatorio negativo (Young and Matthews, 1995).

Di conseguenza, i farmaci antidepressivi che influiscono in qualche modo sulla trasmissione serotoninergica, secondo lo studio sopracitato, possono ridurre la risposta infiammatoria attraverso l'aumento indiscriminato dei livelli extracellulari di 5-HT.

Questi dati immunofarmacologici sono in linea con l'ipotesi che le citochine possano partecipare alla fisiopatologia della depressione, anche se non è ancora certo che gli effetti immunitari siano necessari per l'attività antidepressiva (Maes et al., 1995). Naturalmente, oltre alla variazione dei livelli di citochine, lo stress provoca una disfunzione dell'asse ipofisi-ipotalamo-surrene (HPA), forse causata da una inefficace inibizione dell'asse stesso da parte dei glucocorticoidi. In breve, in situazioni di stress acuto si attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene che libera adrenalina e cortisolo: lievi rialzi di tali ormoni hanno un potere induttore sulla funzionalità immunitaria, contribuendo alla mobilitazione dei leucociti periferici dai depositi.

Si tratta probabilmente di una risposta adattativa, al pari di altre evocate dallo stress, come l'incremento del tono cardiovascolare e polmonare, l'aumento della pressione arteriosa, l'attivazione del sistema muscolo-

scheletrico ed il miglioramento della capacità di concentrazione e dell'attenzione.

Diversamente, in situazione di stress cronico, questi ormoni attivano la risposta immunitaria in modo inadatto sia a combattere microrganismi e tumori, sia a preservare la tolleranza immunitaria nei confronti della propria identità biologica.

In questi casi, infatti, il livello plasmatico del cortisolo può aumentare sino a triplicare i valori corrispondenti al picco circadiano, esercitando un potente effetto immunosoppressivo che contribuisce a rendere l'individuo vulnerabile a malattie infettive spesso banali e transitorie, a volte molto più serie e compromettenti.

Quindi, sembra siano collegati i pathways la cui attivazione segue ad uno stress psicologico o emotivo, con quelli che determinano l'elicitazione della risposta dell'organismo a un qualsiasi agente patogeno esterno.

Uno studio sulla tianeptina ha permesso di fare chiarezza su questo argomento, oltre che su alcuni meccanismi propri del farmaco, saggiando i livelli di citochine pro- ed anti-infiammatorie in periferia (milza ed ipofisi) ed a livello centrale, dopo la somministrazione i.p. di LPS (Castanon et al., 2004).

Il risultato maggiormente importante di tale studio è stato la dimostrazione della capacità della tianeptina di attenuare l'espressione delle citochine indotte dall'LPS non solo in periferia ma anche a livello centrale.

In questo modo, si è avuta la possibilità di comparare l'attività immunomodulatoria delle varie classi di antidepressivi: per esempio, i triciclici, in topi stressati, riducono i livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ , mentre aumentano i livelli di citochine anti-infiammatorie come IL-10, al pari della somministrazione cronica di SSRI; fluoxetina ed imipramina invece, non alterano i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nella milza dopo 3 ore dalla somministrazione di LPS (Yirmiya et al., 2001). Ciò si pensa possa essere dovuto ad una diversa tempistica d'azione, ma soprattutto all'incapacità da parte di questi farmaci di influenzare l'espressione genica nella milza a differenza della tianeptina.

Infatti, un ulteriore dato è l'osservazione che il pretrattamento con la tianeptina modifica l'espressione delle citochine in un intervallo di tempo molto ristretto, specialmente a livello periferico, ovvero nella milza.

La tianeptina ha la peculiarità di attenuare l'effetto attivante di "stressors", come l'LPS, in questo caso, sull'asse HPA. Successivamente, fu ipotizzato che quest'effetto non poteva essere conseguenza solo ed esclusivamente dell'azione della tianeptina sulle citochine; infatti, essendo i glucocorticoidi composti che inibiscono la trascrizione degli mRNA che codificano per le citochine (Quan et al., 2000), una diminuzione della secrezione di questi ormoni può condurre ad un aumento dell'espressione delle citochine, anche se uno studio sull'imipramina (Dredge et al., 1999) ha dimostrato l'indipendenza dell'aumento dei livelli di TNF- $\alpha$  dall'attivazione dell'asse HPA.

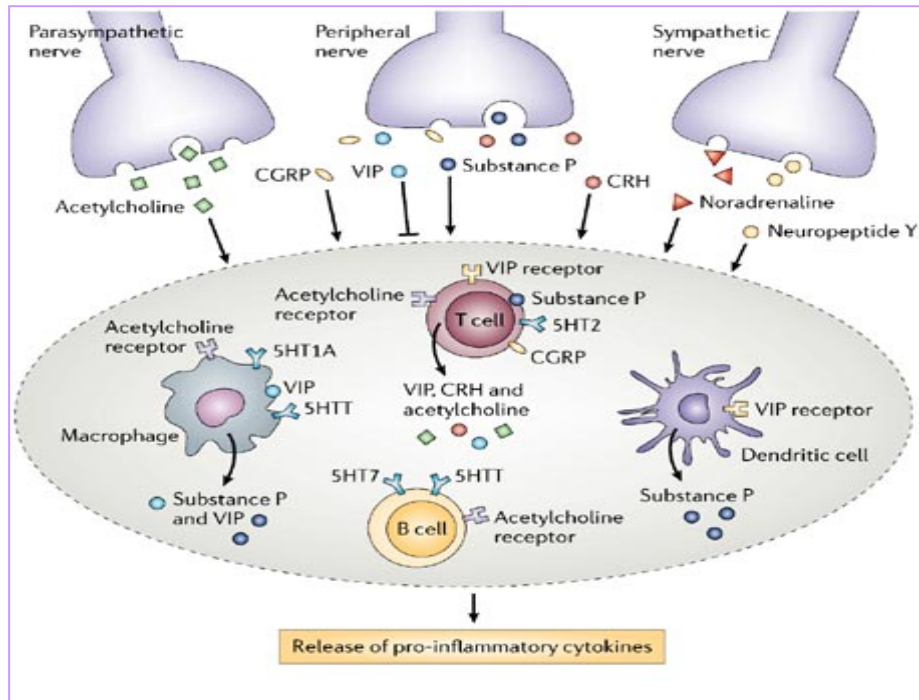
In alternativa, è stata avanzata l'ipotesi che la neurotrasmissione centrale della noradrenalina e della serotonina, target di molti antidepressivi, possano modulare la produzione di citochine (Linthorst and Reul, 1999) (Fig. 15).

È stato dimostrato, infatti, che l'attivazione della trasmissione noradrenergica, ottenuta dopo un trattamento con antidepressivi triciclici, può down-regolare le risposte infiammatorie attraverso un'attenuazione della sintesi di citochine pro-infiammatorie (specie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e un aumento delle citochine anti-infiammatorie, come IL-10 (Platzer et al., 2000). Poiché la tianeptina ha solo un leggero effetto sulla trasmissione noradrenergica, questo sistema probabilmente non gioca un ruolo importante nelle proprietà immunoregolatrici di questo composto.

Sebbene la serotonina possa inibire la produzione di TNF- $\alpha$  indotta da LPS da parte dei macrofagi (Arzt et al., 1991), sono state raccolte evidenze secondo cui gli effetti delle diverse classi di antidepressivi sulla neurotrasmissione di serotonina non sono cruciali per la modulazione della risposta infiammatoria contro l'LPS. Per esempio, gli effetti negativi immunoregolatori degli SSRIs o dei farmaci che rilasciano serotonina, come la metilendiossimetamfetamina (MDMA), non sono correlati con le loro azioni sul sistema serotoninergico (Connor et al., 2000).

Allo stesso modo, le proprietà antinfiammatorie della tianeptina sembrano essere indipendenti dalla serotonina. In primo luogo, l'alterazione del reuptake della serotonina che è stato osservato dopo somministrazione acuta di tianeptina, non è così evidente come dopo il trattamento cronico.





**Figura 15.** Influenza dei neurotrasmettitori sulla produzione di citochine.

Inoltre, le diverse classi di antidepressivi alterano la produzione di citochine indotta da LPS, malgrado la loro differente attività sulla trasmissione serotoninergica.

La stimolazione cellulare con LPS scatena l'attivazione di diversi pathways intracellulari, come l'IL-1 $\beta$ , che a turno attivano diversi fattori di trascrizione, inclusi NF $\kappa$ B ed il gene *c-Fos/c-Jun*, specie in colture cellulari di tessuti periferici (Katsuyama et al., 1998).

Questi fattori di trascrizione poi, coordinano l'induzione di geni che codificano per mediatori dell'infiammazione, specie le citochine; NF $\kappa$ B, per esempio, è un fattore trascrizionale coinvolto nelle risposte immuni ed infiammatorie (O'Neill and Kaltschmidt, 1997), che spesso codifica per geni coinvolti in stati patologici cerebrali, come l'abuso di alcool e le patologie neurodegenerative (Altura and Gebrewold, 1998).

L'effetto della tianeptina sull'espressione di mRNA che codificano per differenti citochine, indotte da LPS, può essere spiegato dalla capacità della tianeptina di agire su uno o più steps attivanti, che portano all'induzione finale della trascrizione dei geni che codificano per le citochine. In conformità con quest'interpretazione, la somministrazione cronica di tianeptina riduce l'immunoreattività di *Fos* indotta da LPS nell'ipotalamo. Inoltre, questa visione è in accordo con molti risultati che dimostrano che molti antidepressivi, che agiscono inizialmente a livello extracellulare, successivamente sortiscono i loro effetti alterando i pathways intracellulari, inclusi l'aumento dell'espressione dei fattori di trascrizione.

Lo studio di Castanon (Castanon et al., 2004), inoltre, dimostra che la tianeptina altera l'espressione di mRNA nell'ipotalamo con un tempo di risposta diverso rispetto alle altre classi, oltre a diminuire drasticamente l'ampiezza della risposta; questi dati possono essere interpretati per suggerire che la tianeptina può modulare l'espressione delle citochine indotta da LPS attraverso meccanismi diversi e non esclusivi, che necessitano ancora di studi accurati.

La tianeptina ha attenuato gli effetti comportamentali e neuroendocrini delle citochine, così come la loro espressione. Siccome i sintomi della malattia indotti dalla somministrazione i.p. di LPS sono mediati da una produzione periferica e centrale di citochine pro-infiammatorie, i risultati del suddetto studio può spiegare parzialmente l'effetto della tianeptina sui segni da LPS.

Visti gli effetti protettivi della tianeptina sulle alterazioni stress-indotte dei neuroni ippocampali e dell'attività neurotossica delle citochine pro-infiammatorie, è stato proposto che la neuroprotezione indotta dalla tianeptina, possa essere spiegata, almeno in parte, dalle sue proprietà immunomodulatorie sulle citochine pro-infiammatorie. Quest'ipotesi è particolarmente interessante nel contesto della nuova teoria che lega i disordini depressivi con le alterazioni della plasticità strutturale nel cervello adulto e propone che il recupero dalla depressione possa essere dovuto all'aumento della velocità di neurogenesi indotta dall'antidepressivo.

Ad ogni modo, queste ipotesi possono spiegare il ruolo delle citochine nella depressione e le proprietà terapeutiche della tianeptina.

In un altro studio più recente, sempre al fine di indagare più dettagliatamente l'attività della tianeptina, il farmaco è stato testato sia *in vitro* che *in vivo*, in presenza ed in assenza di pretrattamento con IL-1 $\beta$ , per valutare i suoi effetti sul danno provocato dall'ibotenato (Plaisant et al., 2003). L'ibotenato è un agonista selettivo dei recettori NMDA; il suo utilizzo in topi nati da 5 giorni, permette la riproduzione di un modello sperimentale neurodegenerativo, associato a paralisi cerebrale, alla base del quale ci sono processi di natura ipossi-ischemica. Infatti, quando l'ibotenato viene somministrato per via intracerebrale, è possibile osservare subito la morte neuronale in tutto lo strato corticale (Dommergues et al., 2000).

Le lesioni a livello della sostanza bianca, si esplicano attraverso lesioni cistiche periventricolari (Dommergues et al., 2000). Il danno provocato può essere misurato attraverso la rilevazione dei livelli di Lattato-Deidrogenasi (LDH), il rilascio del quale è indotto dal danno ipossico e inibito dagli antagonisti NMDA (MK-801) e dalla tianeptina.

Il pretrattamento con citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , è stato necessario per verificare l'eventuale coinvolgimento nel meccanismo neuroprotettivo della tianeptina (Castanon et al., 2000), visto il loro ruolo di "inibitori" della plasticità neuronale a livello dell'ippocampo (Danzter et al., 1998).

L'utilizzo delle citochine sopracitate ha permesso di esacerbare il danno provocato da ibotenato sia a livello corticale che a livello della sostanza bianca, attraverso un meccanismo dose-dipendente che coinvolge le microglia ed è inibito dagli antagonisti NMDA (Dommergues et al., 2000).

I dati ottenuti hanno dimostrato che la tianeptina ha un effetto “anti-ippico” simile a quello degli antagonisti NMDA. Infatti, in colture di cellule neuronali, le quali erano state indotte a morte programmata, la tianeptina è risultata attiva a concentrazione di 1  $\mu$ M (ma senza una definita relazione dose-risposta) allo stesso modo dell'antagonista NMDA usato (MK-801).

Tuttavia, in presenza di glutammato in concentrazioni elevate, la tianeptina è risultata incapace di proteggere il tessuto neuronale, a dimostrazione dell'insufficiente antagonismo nei confronti della via glutammatergica. Tutto ciò trova spiegazione nei dati ottenuti dalle colture cellulari incubate con IL-1 $\beta$ , nelle quali la tianeptina ha confermato i suoi effetti neuro protettivi, dimostrando che tali effetti siano da ricondurre piuttosto ad un'interazione con le citochine.

*In vivo*, invece, la somministrazione cronica e acuta di tianeptina e dei suoi enantiomeri, non ha modificato i danni prodotti dall'ibotenato, che sono risultati inibiti, invece, dopo la somministrazione degli antagonisti NMDA.

Malgrado ciò, sia la somministrazione acuta che quella cronica di tianeptina, effettuata seguendo un preciso piano terapeutico, nei modelli sperimentali per i quali era stato previsto il pretrattamento con IL-1 $\beta$ , ha

sortito effetti inibitori sulla prevista esacerbazione del danno neuronale prodotta da questa citochina.

Comunque, tale modello non permette di capire se gli effetti siano da ricercare a livello centrale o a livello periferico, così come se la barriera emato-encefalica sia stata interessata dal danno (Dommergues et al., 2000).

L'IL-1 $\beta$  è una citochina pro-infiammatoria coinvolta in molti stati fisiologici alterati e patologie, come l'apoptosi neuronale indotta da gp120 nella neocorteccia di ratto (Russo et al., 2007), o l'ischemia cerebrale, dove l'antagonista di IL-1 $\beta$  riduce il danno da stroke (Rothwell et al., 1997).

Altro importante target delle citochine sono i trasportatori della 5-HT (Ramamoorthy et al., 1995); l'IL-1 $\beta$  possiede la capacità di up-regolare l'espressione dei trasportatori della 5-HT, che sono codificati da un unico gene. Inoltre, sempre a riguardo all'IL-1 $\beta$ , i suoi recettori sono espressi anche sui neuroni serotoninergici, suggerendo, di conseguenza, un ruolo nella regolazione della loro attività. Inoltre, è stato documentato un aumento dei livelli di citochine durante le infezioni, di natura batterica o virale, del tessuto cerebrale (specie nei macrofagi/microglia); per esempio, durante l'infezione da HIV, in cui l'aumento di IL-1 $\beta$  porta all'aumento dell'espressione dei propri recettori (Tyor et al., 1992), è possibile supporre una correlazione molto stretta tra i livelli di IL-1 $\beta$  e l'espressione dei trasportatori della 5-HT nella patogenesi di complicazioni neuronali, come la demenza associata all'AIDS (Price et al., 1988).

## **9. Scopi della tesi**

La presente attività sperimentale ha avuto, pertanto, come principali scopi quelli di:

1) studiare gli aspetti neuropatologici dei processi di morte cellulare che si verificano nelle cellule astrogliali umane in coltura incubate con fattori solubili dell'HIV quali la gp120, ed in particolare il ruolo dello stress ossidativo;

2) verificare se i fenomeni neuropatologici a carico delle cellule astrogliali correlati con l'HIV siano caratterizzati dalla modulazione dell'espressione e dell'attività della glutammina sintasi, enzima che metabolizza il glutammato in glutammina nelle cellule astrogliali, svolgendo un ruolo neuroprotettivo;

3) determinare, in seguito ad incubazione con gp120, il ruolo svolto dai radicali liberi e dal nitrossido, in particolare, nella regolazione dell'espressione della glutammina sintasi astrogliale;

4) studiare, nell'ambito dei suddetti aspetti, gli effetti prodotti dalla tianeptina, un antidepressivo atipico con proprietà anti-infiammatorie;

5) indagare sugli effetti molecolari della gp120 e della tianeptina sulla via del fattore di trascrizione NFκB.

## **10. Materiali e metodi**

### ***Culture di cellule astrogliali umane***

Le cellule astrogliali umane utilizzate per i seguenti esperimenti appartengono al ceppo Lipari e U373.

Le cellule astrogliali del tipo Lipari sono state ottenute da un paziente malato di 51 anni che presentava un'estesa massa fronto-temporale destra (astrocitoma) (Zupi et al., 1988), e cresciute come precedentemente descritto (Mollace et al., 2002). L'espianto è stato triturato dapprima meccanicamente, poi enzimaticamente con tripsina e seminato in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, Inghilterra) contenenti Ham's nutrient mixture F10 e Dulbecco's modified Eagle's medium (1:1) (Euroclone, UK) supplementati con il 10% di siero fetale di vitello (FCS, Gibco, UK), 2 mM di L-glutammina, 1 mM di sodio piruvato e con 100 UI/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina.

Le cellule sono state quindi incubate a +37 °C in aria umidificata contenente il 5 % di CO<sub>2</sub>. Le cellule U373 sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA), e coltivate come già descritto per il ceppo Lipari.

### ***Gp120 di HIV-1***

Nei presenti esperimenti è stata usata la glicoproteina gp120 contenuta nell'envelope di HIV. In particolare, la gp120 è stata prodotta attraverso il sistema d'espressione del Baculovirus (purezza: > 90% by SDA-PAGE),



un'isoforma di gp120 ricombinante HIV-1 (IIIB) glicosilata e fedele alla grandezza naturale con un peso di circa 115 kDa. La gp120 è stata acquistata da RDI Division of Fitzgerald Industries Intl, Concord, MA, USA.

Per valutare se l'effetto della gp120 possa essere stato o meno attribuibile alla contaminazione dell'endotossina, alcuni esperimenti sono stati condotti aggiungendo Polimixina B (10 µg/ml; n=5, dati non mostrati), dimostrando che l'attività della gp120 è indipendente dall'endotossina.

### ***Valutazione della mortalità cellulare***

Le cellule astrogliali Lipari provenienti dalle fiasche sono state seminate in piastre da sei pozzetti alla densità di 250.000 per pozzetto, in terreno completo, ed incubate a +37° C.

Dopo 48 ore è stata raggiunta la confluenza e dunque gli astrociti sono stati trattati con diverse concentrazioni di gp120 (100 pM, 1 nM, 10 nM) per 24 h e pretrattati con N-acetilcisteina (NAC, 0.5-5 mM) (Sigma, Milano) 2 h prima dell'incubazione con gp120.

Sia la gp120 che la NAC sono state solubilizzate in terreno poco prima dell'uso. A questo punto il terreno con i trattamenti è stato aspirato e le cellule sono state tripsinizzate, centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti ed il pellet è stato risospeso in 500 µl di terreno senza siero nè rosso fenolo.

Dieci µl della sospensione sono stati miscelati a 30 µl di una soluzione di acqua bidistillata contenente trypan blue allo 0,1 %.

Il trypan blue è un colorante idrosolubile, in grado di penetrare ed accumularsi, solo nelle cellule morte, colorandole di blu. Le cellule della sospensione sono state contate al microscopio, in una camera di Neubauer, da un operatore non a conoscenza del trattamento.

La percentuale di mortalità è stata ottenuta calcolando il rapporto tra il n° di cellule morte e il n° totale di cellule contate per ciascun trattamento.

### ***Misurazione della produzione di malonildialdeide***

La malonildialdeide (MDA) viene utilizzata come marker biologico della perossidazione lipidica. In particolare, sia le cellule controllo sia quelle trattate, sono state congelate in azoto liquido e omogeneizzate in cloruro di potassio (1.15%).

In seguito, sono stati aggiunti all'omogenato cellulare 2 ml di cloroformio e si è proceduto alla centrifugazione del campione per 30 min. Quindi, sono stati prelevati gli strati organici, si è proceduto alla disidratazione con l'impiego del gas d'azoto e per ultimo, i campioni sono stati ricostituiti con 100 µl di salina. I livelli di MDA sono stati rilevati mediante la misurazione indiretta dell'acido tiobarbiturico (TBA) (Ohkawa et al., 1979). Brevemente, ai campioni ricostituiti è stata aggiunta la seguente soluzione: 20 µl di SDS (8.1%), 150 µl di acido acetico al 20% (pH 3.5), 150 µl di TBA 0.8% e 400 µl di acqua bidistillata. I campioni, così risospesi, sono stati riscaldati a + 95°C per 95 min e lasciati raffreddare. Si è proceduto,

quindi, all'estrazione del cromogeno, così ottenuto, aggiungendo 100 µl di acqua bidistillata, 500 µl di n-butanolo e piridina (15:1 v/v contenente 0.05% di idrossitoluene butilato) e centrifugando a 4000 rpm per 10 min per facilitare la separazione di fase. Lo strato organico è stato rimosso e la produzione di MDA è stata rilevata attraverso la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 532 nm. I risultati sono stati espressi come nmol di MDA/g di omogenato.

### ***Analisi al citofluorimetro***

Le cellule astrogliali Lipari trattate o meno con gp120 e con NAC sono state tripsinizzate e staccate dalle piastre. Aliquote da  $5 \times 10^5$  sono state centrifugate (300 g x 5 min.) i *pellets* sono stati lavati con PBS, posti su ghiaccio e risospesi con 0,5 ml di una soluzione ipotonica di fluorocromo contenente 50 µg/ml di ioduro di propidio, 0,1% di sodio citrato e 0,1% di Triton X-100. Dopo 30 min. al buio e a 4°C, le cellule ipoploidi colorate dallo ioduro di propidio sono state analizzate con un citofluorimetro FACScan, e la fluorescenza è stata misurata tra 565 e 605 nm. I dati sono stati acquisiti usando il programma Lysis II.

### ***Analisi della morte cellulare mediante TUNEL***

Al fine di valutare la presenza di cellule apoptotiche, caratterizzate da una marcata frammentazione del DNA, è stata utilizzata la metodica di

marcatura dei frammenti di DNA *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL). Brevemente, gli astrociti sono stati permeabilizzati mediante un'incubazione di 20 min a temperatura ambiente in Triton X-100 0.15%/citrato di sodio 0.15% (% w/v). Di seguito, sono stati lavati con PBS (pH 7.2) e la reazione è stata sviluppata utilizzando un kit di rilevazione della morte cellulare in situ con fluoresceina (Roche, Germania). Le immagini dei nuclei apoptotici sono state ottenute utilizzando un microscopio a fluorescenza.

Per gli esperimenti di TUNEL sugli astrociti U373, è stato utilizzato il kit Promega G3250, seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule astrogliali, dopo essere state opportunamente trattate, sono state tripsinizzate e staccate dalle piastre per essere processate. Le cellule ipoploidi colorate con lo ioduro di propidio sono state analizzate da un citofluorimetro FACScanto II (canali a 530 e 585 nm).

### ***Caratterizzazione immunocitochimica della glutammina sintasi e della nitrotirosina***

Le cellule astrogliali sono state seminate su vetrini copiogetto. Dopo 2-3 giorni di coltura a +37°C, le cellule, dopo essere state opportunamente trattate, sono state fissate in paraformaldeide (4%) in 0,120 M di sodio fosfato (pH 7.4) per 30 min. a 37°C. Le cellule sono state lavate in PBS (pH 7.4) e, di seguito, la perossidasi endogena è stata rimossa con 0,01% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

in metanolo al 60% per 15 min. e successivamente si è passati al lavaggio per tre volte e per 5 min. con PBS 0,1%+Triton X-100. La successiva permeabilizzazione è stata effettuata con Triton X-100 allo 0.5% per 5min.

In seguito le cellule sono state poste per 1 ora a temperatura ambiente nella blocking solution, soluzione contenente siero di cavallo al 5% (Vector), albumina bovina (BSA) al 1% e PBS+Triton; gli anticorpi monoclonali anti-glutammina sintasi o anti-nitrotirosina (diluiti in PBS/BSA 1:150, Transduction Laboratories) sono stati incubati a +4° C per tutta la notte.

Il giorno dopo sono stati rimossi gli anticorpi primari e si è proceduto a tre lavaggi di 5 min. ciascuno con PBS+Triton; successivamente si è passati all'incubazione con l'anticorpo secondario biotinilato (diluito 1:100, Vectastain ABC kit). Dopo un lavaggio in PBS, si è proceduto con la colorazione del precipitato mediante 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloride (DAB) ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0.3% (Menarini, Italia); tale soluzione, è stata tenuta per 3-7 min. fino ad ottenere la colorazione. Infine, dopo aver bloccato la reazione con H<sub>2</sub>O bidistillata, le cellule sono state lavate in PBS (5 x 5 min), disidratate attraverso passaggi seriatati in alcool a concentrazioni crescenti (50°, 70°, 80°, 95°, 100°) ed in seguito passate in Histolemon. Il vetrino coprioggetto è stato quindi montato sul portaoggetto con montante di DPX per essere osservato al microscopio ottico.

### ***Misurazione dei livelli di glutammina nei sopranatanti cellulari***

I livelli di glutammina sono stati determinati utilizzando un saggio colorimetrico, quantitativo, specifico per le cellule in coltura (Glutamine kit assay, Sigma) (Kemp and Shiloach, 1993). Il saggio si basa sulla deaminazione riduttiva della L-glutammina da parte di un enzima specifico. La reazione è selettiva per la L-glutammina e non si verificano reazioni con altri amminoacidi o con l'ammoniaca.

In breve, i sopranatanti delle cellule, gli standard di glutammina e il mezzo di coltura utilizzato, sono stati incubati per 1,30 h a +37°C con il tampone di reazione, il tampone di diluizione e l'enzima. In seguito, ogni campione è stato miscelato con il reagente contenente il cromoforo e incubato per ulteriori 5 min a temperatura ambiente.

L'assorbanza è stata misurata con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 550 nm. La concentrazione di glutammina è stata determinata mediante l'analisi della curva standard con la regressione lineare. I risultati sono stati espressi come  $\mu\text{M}$  di glutammina.

### ***Analisi dei livelli di nitriti***

I livelli di nitriti ( $\text{NO}^{2-}$ ) nelle cellule di astrocitoma sono stati determinati con l'ausilio della reazione di Griess. Tale metodica prevede la miscelazione in parti uguali del supernatante cellulare con il reattivo di

Griess (1% sulfanilammide/0.1% naftiletilendiamina di cloridrato/2.5% H<sup>3</sup> PO<sup>4</sup>).

L'assorbanza è stata misurata ad una lunghezza d'onda pari a 546 nm mentre la concentrazione dei nitriti è stata determinata utilizzando il sodio nitrito come standard. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza concentrazioni di nitrito pari a nmol NO<sup>2-</sup> ml<sup>-1</sup>

### *Saggio di attivazione della caspasi*

L'attivazione della caspasi-3 negli astrociti è stata verificata utilizzando il sistema "CaspACE FITC-VAD-FMK in situ marker", che è un analogo fluorescente, grazie al legame con fluoresceina isotiocianato, dell'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK; la procedura di colorazione per rilevare la presenza della caspasi attivata indicata dal produttore Promega è stata modificata per poter analizzare i campioni al citofluorimetro. I trattamenti con gp120 e tianeptina sono stati eseguiti nelle piastre da 6 pozzetti. La tianeptina è stata fornita dalla Servier (Francia) ed è stata solubilizzata in terreno di coltura poco prima dell'uso. Dopo 48 h dall'inizio del trattamento le cellule astrogliali sono state incubate per 20 minuti a 37°C nel mezzo di coltura contenente l'inibitore FITC-VAD-FMK alla concentrazione finale di 5 µM.

In seguito il mezzo è stato aspirato e sono stati effettuati due lavaggi con PBS per procedere alla tripsinizzazione. Le cellule sono state raccolte con il mezzo di coltura, in provette falcon da 15 ml e centrifugate a 1200 rpm per 5

min. Il pellet cellulare è stato lavato in PBS e infine le cellule sono state divise in due provette da citofluorimetria, di cui, ad una è stata aggiunta la soluzione di PBS contenente 1 µg/ml di ioduro di propidio, all'altra solo PBS. Le sospensioni degli astrociti sono state analizzate immediatamente al citofluorimetro FACSCanto II (canali 530 e 585 nm). L'analisi è stata effettuata con il software FlowJo. La percentuale delle cellule positive è stata determinata in base al controllo negativo non incubato con la sonda FITC-VAD-FMK; le cellule positive allo ioduro di propidio sono state escluse dall'analisi.

### ***Trasformazione batterica***

Per l'amplificazione dei plasmidi pNFκB-Luc e pRL-CMV sono stati utilizzati batteri competenti *E. coli* DH5-α con efficienza di trasformazione di 10<sup>7</sup>. La trasformazione è stata eseguita attraverso il metodo dello shock termico.

In breve, 50 ng del plasmide da amplificare sono stati aggiunti a 50 µl di batteri competenti ed incubati sul ghiaccio per 15 minuti. Successivamente il tubo con tale miscela è stato incubato a 42°C per 45 secondi e quindi trasferito su ghiaccio per circa 2 minuti; infine sono stati aggiunti 450 µl di LB (brodo di coltura batterica) e la sospensione è stata trasferita in un tubo per colture batteriche (BD2059) ed incubata per 30 minuti a 37°C in agitazione a 220 rpm. 100 µl della coltura batterica è stata piastrata su una piastra di agar contenente ampicillina (50 µg/ml) ed incubata per 16 ore a



37°C. Successivamente una colonia batterica è stata inoculata in 150 ml di brodo di coltura contenente ampicillina ed incubata, sotto agitazione, a 220 rpm, a 37°C per 14-16 ore. Infine, la coltura batterica è stata raccolta mediante centrifugazione per 15 minuti a 6000 x g a 4°C. Il risultante pellet batterico è stato processato per l'estrazione del DNA o conservato a -80°C .

### ***Estrazione di DNA plasmidico***

La maxipurificazione è stata effettuata per l'estrazione di DNA plasmidico che è stato successivamente utilizzato per la trasfezione delle cellule U373. Il procedimento è stato eseguito utilizzando l'EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), secondo le istruzioni del produttore. Questo metodo si basa sul principio della cromatografia a scambio ionico, dove DNA carico negativamente si lega a gruppi DEAE della resina.

In breve, il pellet batterico contenente i plasmidi di interesse è stato risospeso in 10 ml di Buffer P1 [50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 ug/ml RNasiA]. Sono stati aggiunti 10 ml di tampone P2 [Tampone di lisi alcalina: 200 mM NaOH, 1% SDS (p/v)] ed è stata miscelata la soluzione capovolgendo per 3-4 volte la provetta (non è stato utilizzato il vortex per evitare di frammentare il DNA cromosomiale, circa 400 Kb), ed incubata per 5 min. a TA. Sono stati aggiunti 10 ml di tampone P3 per neutralizzare la soluzione. Dopo aver filtrato il lisato in una falcon da 50 ml, sono stati aggiunti 2,5 ml di Buffer ER; successivamente è stata invertita la provetta per 10 volte ed incubata in ghiaccio per 30 minuti. Il contenuto è stato caricato e

fatto filtrare sulla colonna precedentemente equilibrata con 10 ml di Buffer QBT, che è stata successivamente lavata per due volte con 30 ml di Buffer QC. Il DNA è stato quindi eluito con 15 ml di Buffer QN, precipitato con 10.5 ml di isopropanolo e la soluzione ottenuta è stata centrifugata a 15.000 g per 30 minuti a 4°C. Previa eliminazione del surnatante, il pellet è stato lavato con un tampone libero da endotossine e con etanolo, centrifugato a 15.000 g per 10 minuti, lasciato asciugare all'aria per 10-20 minuti, e infine risospeso in 100 o 200 µl di acqua sterile.

### ***Trasfezione ceppo U373***

Per la trasfezione delle cellule U373, è stato utilizzato il metodo basato sulla lipofectamina 2000 (Invitrogen). Le cellule sono state piastrate il giorno prima della trasfezione alla densità di  $0.7 \times 10^5$  cellule per  $\text{cm}^2$ . Per i saggi di luciferasi le cellule sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti, e sono stati utilizzati i seguenti plasmidi reporter: pNFκB-Luc e pRL-CMV (Promega) alla concentrazione di 2.25 µg/24 well e 0.2 µg/24 well, rispettivamente.

In particolare, pRL-CMV è il plasmide codificante per il gene *Renilla*, sotto il controllo del promotore CMV, mentre pNFκB-Luc è il plasmide con il gene *firefly* di luciferasi sotto il controllo di 5 sequenze ripetute degli elementi *enhancer* di NFκB (TGGGGACTTTCCGC) (Stratagene). L'efficienza della trasfezione è stata normalizzata cotrasfettando le cellule con il vettore pRL-CMV. Il DNA plasmidico è stato diluito con 3 ml del tampone Optimem (Invitrogen). In un'altra provetta è stata diluita la

lipofectamina (5 µl in 3 ml di Optimem). Le due soluzioni sono state unite goccia a goccia agitando costantemente per consentire la formazione dei liposomi contenenti il DNA plasmidico. Questa miscela è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, dopo aver aspirato il mezzo dalle cellule la miscela è stata aggiunta alle cellule e lasciata agire per 2.5 ore nell'incubatore, al termine delle quali il mezzo di trasfezione è stato sostituito con il mezzo completo di coltura. Dopo venti ore hanno avuto inizio i trattamenti con gp120 e tianeptina per diversi tempi.

### ***Saggio della luciferasi***

Per effettuare tale saggio è stato utilizzato il kit “Dual-luciferase Reporter Assay System” (Promega).

Le cellule sono state lavate con PBS e raccolte in 200 µl di tampone di lisi seguito dall'incubazione per 15 min. a TA. Il saggio è stato eseguito con 10 µl del lisato cellulare a cui sono stati aggiunti 50 µl del reagente LAR II (Luciferase Assay Reagent II) portato a TA; previa risospensione della soluzione è stato inserito il campione nel luminometro DCR-1 (Digene Diagnostics) per effettuare la prima misurazione corrispondente al segnale luminoso indotto da NFκB. Successivamente, sono stati aggiunti 50 µl di reagente secondario “Stop and Go” (addizionato ad 1 µl del substrato di Renilla per provetta), per effettuare la seconda lettura (renilla luciferasi) necessaria per normalizzare i dati ottenuti nella prima lettura. I valori di background sono stati aggiustati rispetto ai lisati non trasfettati. Ciascun

lisato è stato misurato almeno 3 volte e ciascun trattamento è stato effettuato 6 volte.

### ***Western blotting***

L'espressione di GS, iNOS, nNOS e I $\kappa$ B $\alpha$  è stata valutata mediante analisi con western blotting. In particolare, sulle cellule astrogliali trattate e non trattate con gp120, NAC e tianeptina, sono stati effettuati tre lavaggi con PBS e successivamente sono state lisate per aggiunta del "lysis buffer" contenente 50 mM di Tris - Cl pH 6,8, 2% SDS ed un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma). I campioni sono stati raccolti e immediatamente bolliti a 100°C per 2 minuti. A tali composti sono stati aggiunti blu di bromofenolo allo 0,05%, glicerolo al 10% e  $\beta$ -mercaptoetanololo al 2%. I campioni sono stati nuovamente bolliti prima del caricamento su gel SDS-PAGE. Al 10%. Dopo l'elettroforesi, i polipeptidi sono stati trasferiti su filtri di nitrocellulosa (Biorad). Sono stati utilizzati, per rivelare i rispettivi antigeni, l'Ab monoclonale anti-Glutamina (1:3000, Transduction Laboratories), l'Ab monoclonale anti- $\beta$ -actina (1:5000, Sigma), l'Ab monoclonale anti-NOS inducibile (1:2000, Transduction Laboratories), l'Ab monoclonale anti-NOS neuronale (1:2000, Transduction Laboratories), e l'Ab monoclonale anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:2000, Santa Cruz). Dopo incubazione con l'anticorpo secondario (1:5000, anti-mouse marcato con perossidasi, e 1:5000 anti-rabbit marcato con perossidasi), le bande corrispondenti alle specifiche proteine sono state analizzate attraverso un sistema di rilevamento della

chemiluminescenza usando un reagente (ECL-Plus) fornito da Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK).

## **11. Risultati**

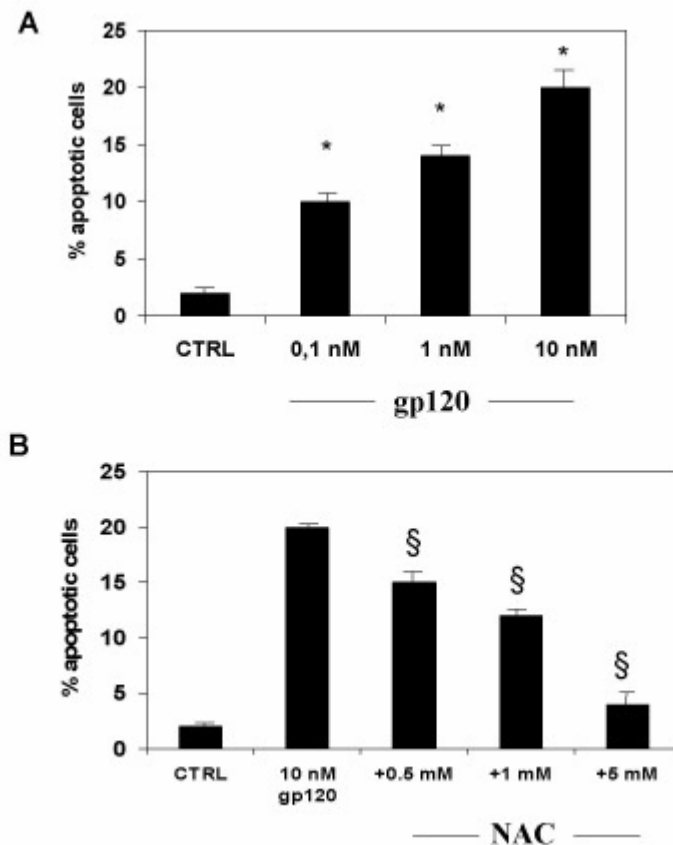
### ***Mortalità astrogliale da gp120 ed effetti della NAC***

Al fine di valutare quale potesse essere l'effetto della gp120 sulle cellule astrogliali umane in coltura, si è effettuata un'analisi della vitalità cellulare in seguito al trattamento con differenti concentrazioni di tale glicoproteina virale. A tale scopo è stato utilizzato il test di esclusione del trypan blue, un colorante idrosolubile, che non è in grado di penetrare attraverso la membrana plasmatica intatta delle cellule vive, mentre marca le cellule che, andando incontro a processi degenerativi, presentano alterazioni della membrana. I trattamenti, condotti per 24 ore con concentrazioni crescenti di gp120 (100 pM, 1 nM, 10 nM), hanno provocato un aumento progressivo della mortalità astrogliale rispetto alle cellule controllo, non trattate (Tab. 1). In particolare, la più bassa concentrazione utilizzata, cioè 100 pM, ha determinato come risultato una mortalità del 16%; quella intermedia, ovvero 1 nM, ha indotto una percentuale del 38%, ed infine la più alta concentrazione utilizzata (10 nM) ha prodotto una mortalità del 45% rispetto al livello basale. Tale risultato è tanto più significativo se si considera che l'astrocita è una cellula notevolmente resistente agli stress, sia di tipo ossidativo che di altra specie, in quanto fisiologicamente deputata a proteggere i neuroni da questo genere di insulti.

<b>TRATTAMENTO</b>	<b>% riduzione della vitalità cellulare</b>
CTRL	2 ± 1.3
Gp120 100 pM	16 ± 1.4*
Gp120 1 nM	38 ± 2*
Gp120 10 nM	45 ± 3.2*
Gp120 10 nM + NAC 0.1 mM	40 ± 2.4 §
Gp120 10 nM + NAC 1 mM	22 ± 2.1 §
Gp120 10 nM + NAC 5 mM	6 ± 2§

**Tabella 1. Percentuale di mortalità astrogliale indotta da concentrazioni crescenti di gp120 ed effetti della NAC.** Il trattamento di cellule astrogliali umane in coltura con gp120, utilizzata a concentrazioni crescenti (100 pM, 1 e 10 nM) ha ridotto la vitalità cellulare come espresso dalla percentuale di cellule positive al trypan blue contate in 10 esperimenti. La NAC (0.5, 1, 5 mM) ha antagonizzato tale effetto in maniera dose-dipendente. \* P < 0.05 astrociti trattati con gp120 vs controllo (CTRL). § P < 0.05 NAC vs astrociti trattati con gp120. L'analisi statistica è stata effettuata usando ANOVA ed il test di Student-Newman-Keuls.

La riduzione della vitalità delle cellule astrogliali in seguito ad incubazione con gp120 (100 pM, 1 nM, 10 nM) è stata accompagnata da morte cellulare per apoptosi. Infatti, la quantificazione dell'apoptosi effettuata attraverso il citofluorimetro ha evidenziato un aumento di cellule ipoploidi rispetto al controllo (fig. 16). Al fine di testare l'effetto dell'N-acetilcisteina (NAC), una molecola con potente effetto antiossidante, sulla mortalità astrogliale indotta da gp120, tale sostanza è stata utilizzata in pretrattamento di 2 h ed alle concentrazioni di 0.5, 1 e 5 mM. Dalle percentuali delle conte cellulari con trypan blue è emerso chiaramente come la NAC sia una sostanza caratterizzata da una bassa tossicità intrinseca (dati non mostrati) ed espliciti un'azione protettiva, dose-dipendente, sulla mortalità indotta da gp120. L'effetto più significativo è senza dubbio osservabile alla più alta dose di gp120 utilizzata, 10 nM, poiché il pretrattamento di 2 h con la NAC, anche questa alla concentrazione più elevata (5 mM) ha riportato la percentuale di mortalità astrogliale ad un valore praticamente comparabile al controllo (Tab. 1). A conferma dell'effetto protettivo della NAC, tale farmaco ha determinato una riduzione dose-dipendente delle cellule apoptotiche (analisi al citofluorimetro) (Fig. 16), suggerendo ulteriormente come la tossicità della gp120 sugli astrociti si espliciti fondamentalmente attraverso una iperproduzione di radicali liberi dell'ossigeno. Il fatto che nei processi di morte indotta dalla gp120 risulti essere coinvolta l'apoptosi è stato altresì documentato dalle numerose cellule TUNEL-positive (Fig. 17),



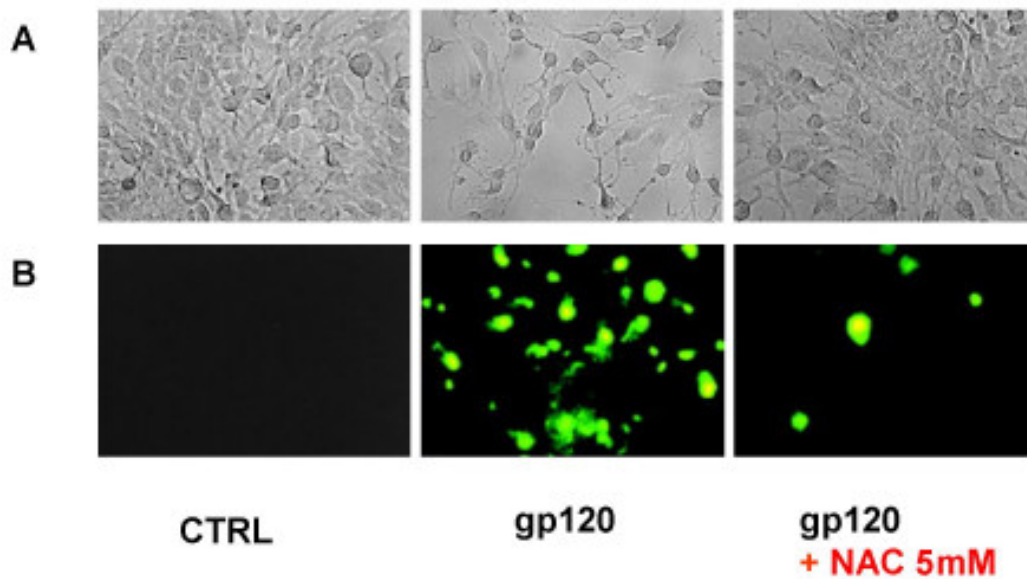
**Figura 16. L’N-acetilcisteina ha prevenuto la morte apoptotica delle cellule astrogliali umane indotta da gp120.** (A). L’incubazione delle cellule astrogliali umane con gp120 (0,1, 1, 10 nm) per 24 h ha determinato un aumento dose-dipendente della morte cellulare per apoptosi come evidenziato dall’analisi al citofluorimetro. (B) L’N-acetilcisteina (NAC, 0.5-5 mM) in pre-trattamento di due ore, ha revertito in maniera dose-dipendente l’effetto pro-apoptotico della più alta concentrazione di gp120 utilizzata (10 nM). I dati rappresentano la media di cinque esperimenti indipendenti.

\*  $P < 0.05$  astrociti trattati con gp120 vs controllo (CTRL).

§  $P < 0.05$  NAC vs astrociti trattati con gp120.

L’analisi statistica è stata effettuata usando ANOVA ed il test di Student-Newman-Keuls.



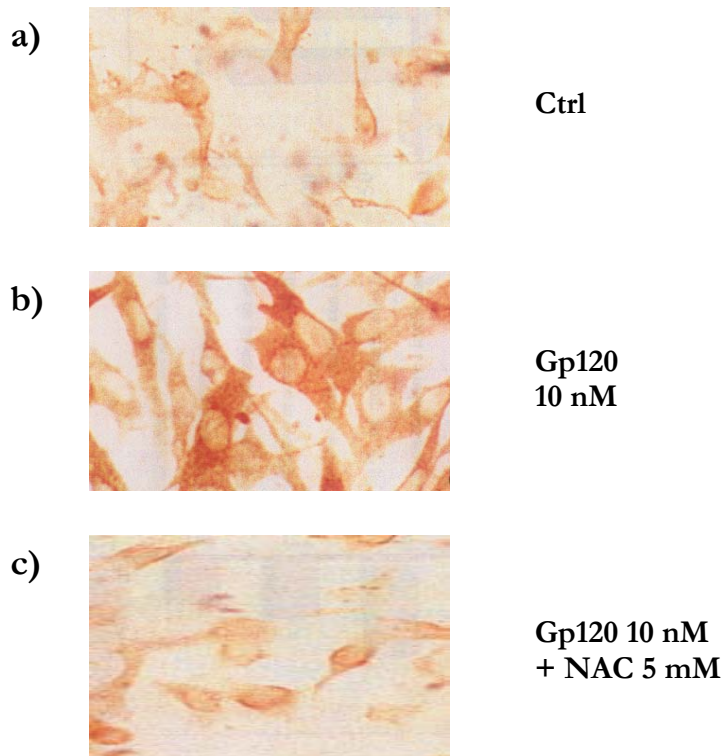


**Figura 17.** Il trattamento con gp120 ha indotto apoptosi astrogliale come evidenziato da numerose cellule TUNEL-positivo, e tale effetto è risultato prevenuto dalla NAC. L'incubazione delle cellule astrogliali con gp120 (10 nM) per 24 ore ha condotto ad una riduzione della popolazione cellulare (A: microfotografie in contrasto di fase) e frammentazione del DNA, come dimostrato dalla presenza di numerose cellule TUNEL-positivo (verde) (B: microfotografie in immunofluorescenza) paragonate a cellule controllo. La pre-incubazione di 2 ore con NAC (5 mM) ha antagonizzato la generazione di apoptosi negli astrociti indotta dalla gp120 (10 nM). Le foto sono rappresentative di cinque differenti esperimenti.

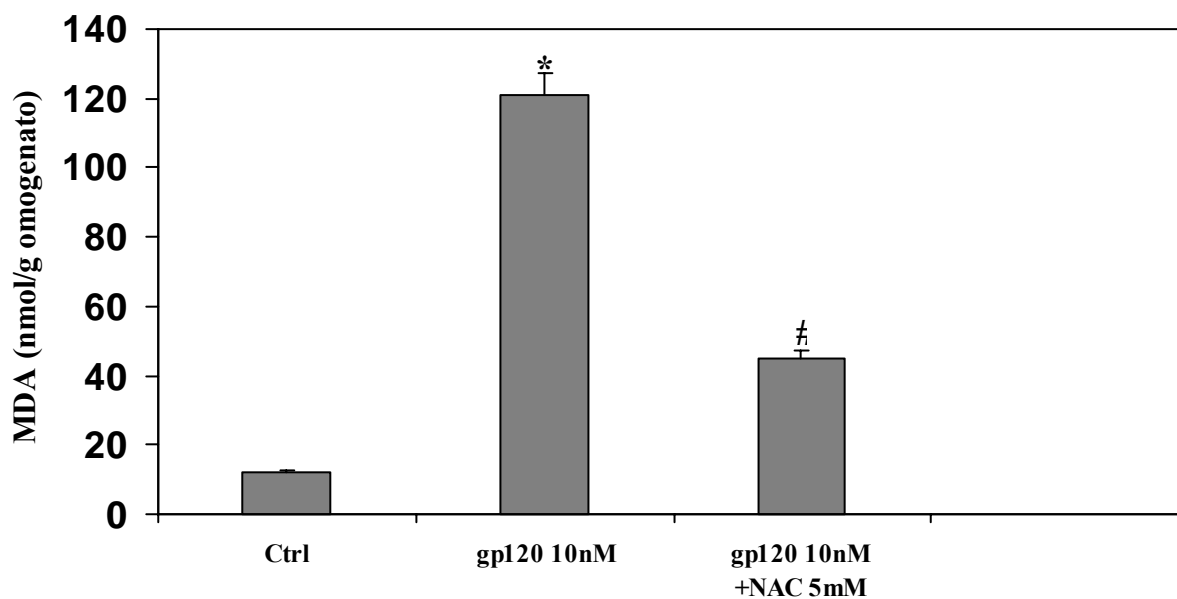
evidenziate in seguito al trattamento con la più alta concentrazione di gp120 utilizzata, cioè 10 nM. Non a caso, la stessa analisi mediante TUNEL ha evidenziato ulteriormente la protezione fornita dalla NAC nei confronti della morte apoptotica indotta sulle cellule astrogliali dalla gp120 (Fig. 17).

Il ruolo fondamentale svolto dallo stress ossidativo nei processi di morte cellulare indotti da gp120 è stato ulteriormente dimostrato dall'analisi immunocitochimica dello staining della nitrotirosina (Fig. 18) considerato un indice della produzione di perossinitrito, e dal saggio della malonildialdeide (MDA) (Fig. 19), che hanno evidenziato chiaramente come la gp120 sia un induttore di stress ossidativo: infatti, la gp120 (10 nM) ha aumentato notevolmente lo staining della nitrotirosina rispetto al controllo (Fig. 18a,b), effetto significativamente antagonizzato dalla NAC (5 mM) (Fig. 18c). Inoltre, i livelli di MDA, considerato un marker di perossidazione lipidica, sono risultati fortemente aumentati negli omogenati cellulari in seguito al trattamento con 10 nM di gp120, ed anche tale effetto è stato revertito dalla NAC (5 mM) (Fig. 19). La gp120 (10 nM) si è altresì dimostrata in grado di determinare una diminuzione dei livelli di espressione della glutammina sintasi (GS) astrogliale rispetto al controllo, come evidenziato attraverso analisi immunocitochimica (Fig. 20a,b). Analogamente, la stessa analisi immunocitochimica ha evidenziato che tale effetto è stato significativamente ridotto dalla NAC (5 mM) (Fig. 20c).

L'espressione della GS è stata valutata anche attraverso analisi con western blotting (Fig. 21). Il trattamento con gp120 (100 pm, 1, 10 nM) per 24 ore ha



**Figura 18.** La gp120 ha determinato un aumento dello staining della nitrotirosina e tale effetto è stato ridotto dalla NAC. La gp120 (10 nM) ha determinato l'aumento dell'espressione immunocitochimica della nitrotirosina astrogliale (b) rispetto al controllo (a), mentre la pre-incubazione con NAC ha revertito tale effetto (c). Le microfotografie sono rappresentative di cinque diversi esperimenti.

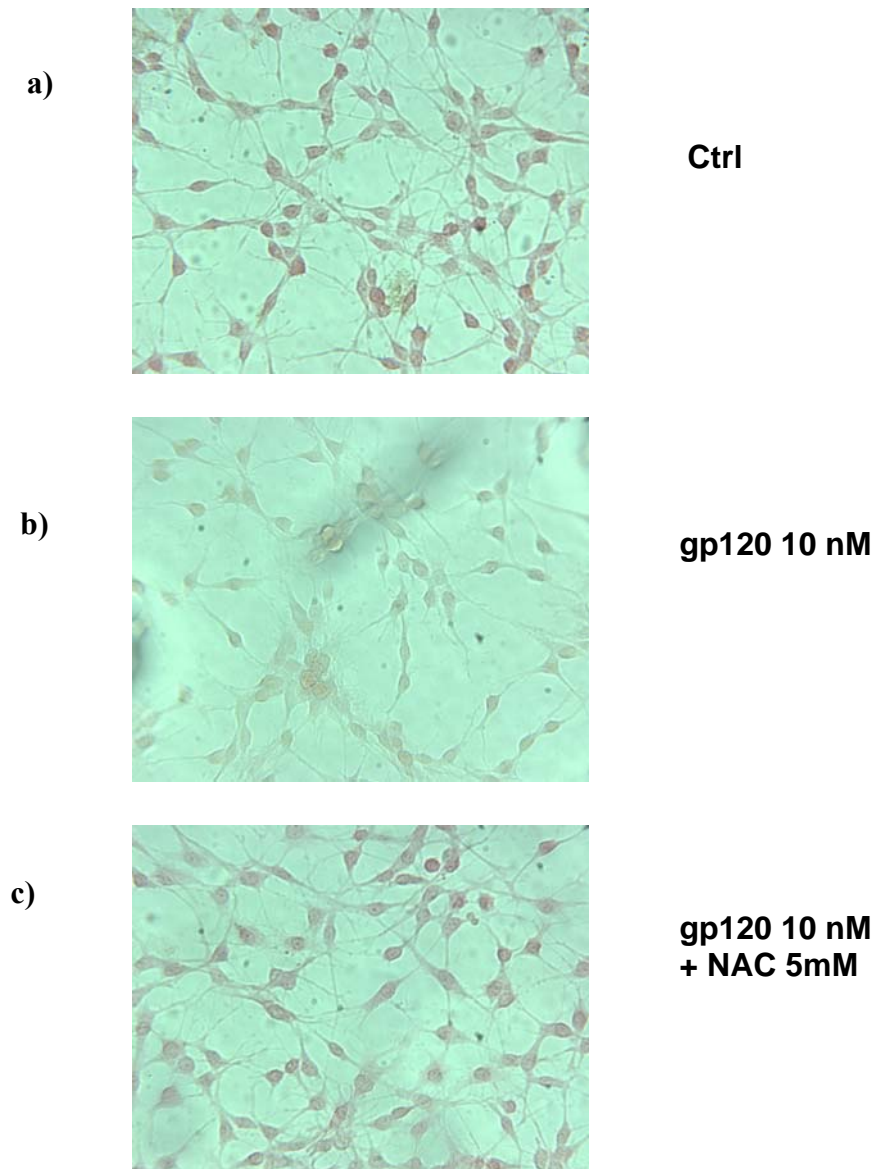


**Figura 19.** La gp120 ha determinato un aumento dei livelli di malonildialdeide (MDA) negli omogenati cellulari e tale effetto è stato ridotto dalla NAC. L'MDA risulta aumentata nelle cellule trattate con gp120 (10 nM) per 24 ore. Il pretrattamento di 2 ore con NAC (5 mM) ha antagonizzato tale iperproduzione. I dati rappresentano la media di cinque esperimenti indipendenti.

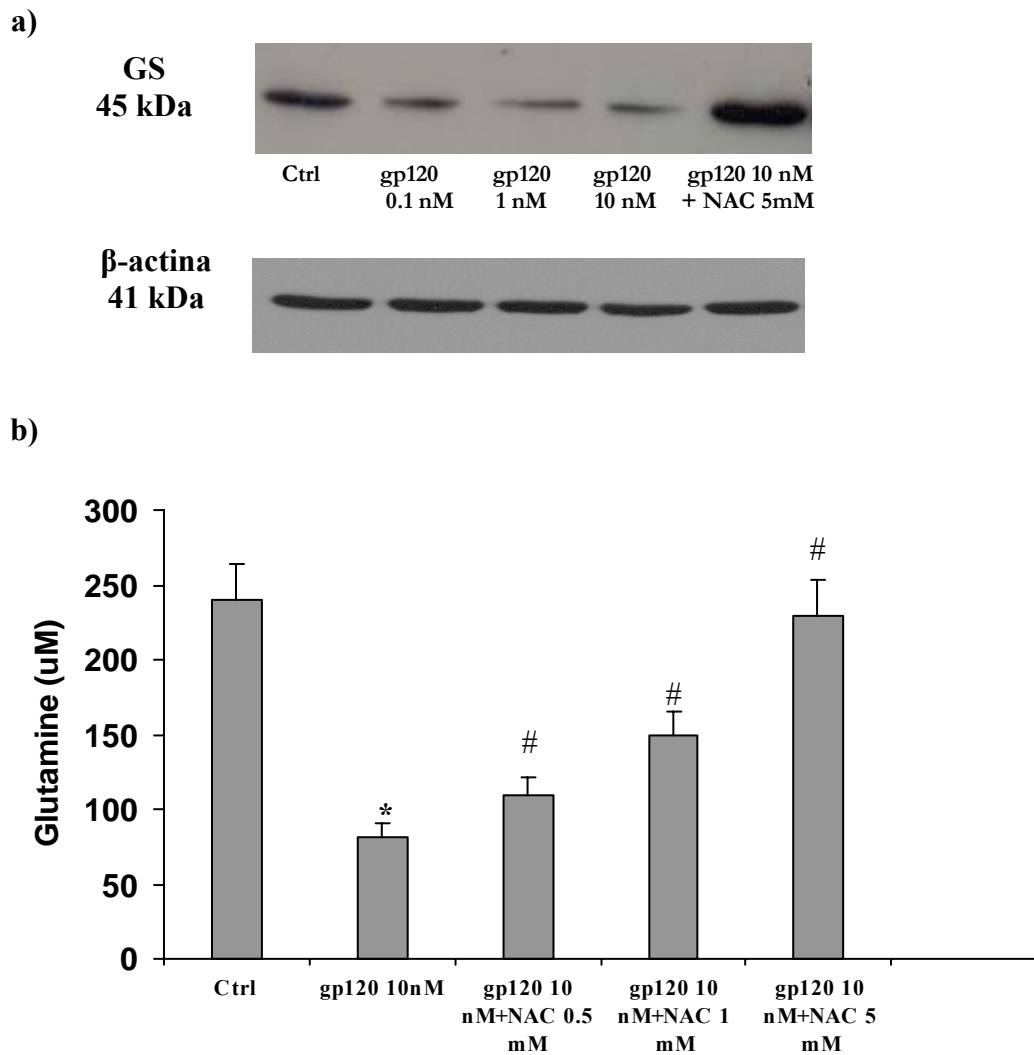
\*  $P < 0.05$  astrociti trattati con gp120 vs controllo (CTRL).

#  $P < 0.05$  NAC vs astrociti trattati con gp120.

L'analisi statistica è stata effettuata usando ANOVA ed il test di Student-Newman-Keuls.



**Figura 20.** La gp120 ha determinato una diminuzione dello staining della glutammina sintasi (GS) astrogliale e l'effetto è stato inibito dalla NAC. La gp120 (10 nM) ha determinato l'aumento dell'espressione immunocitochimica della GS astrogliale (b) rispetto al controllo (a), mentre la pre-incubazione con NAC ha revertito tale effetto (c). Le microfotografie sono rappresentative di cinque diversi esperimenti.



**Figura 21. (a) Effetto della gp120 e della NAC sull'espressione della GS astrogliale in cellule astrogliali umane in coltura.** L'incubazione delle cellule astrogliali con gp120 (0.1, 1 10 nM) per 24 ore ha ridotto in maniera dose-dipendente l'espressione della GS astrogliale come evidenziato dall'analisi al western blotting. Il pre-trattamento di due ore con NAC ha revertito quest'effetto. I blots sono rappresentativi di cinque esperimenti.

**(b) Il decremento della formazione di glutamina nei soprannatanti delle cellule astrogliali incubate con gp120 è stato revertito dalla NAC.** Il trattamento delle cellule astrogliali con gp120 (10 nM) per 24 ore ha prodotto una riduzione della formazione di glutamina in confronto alle cellule non trattate (controllo). La NAC (0.5, 1 e 5 mM) in pretrattamento di due ore, ha revertiti tale effetto in maniera dose-dipendente. I dati rappresentano la media di cinque differenti esperimenti. \*  $P < 0.05$  comparato al controllo; #  $P < 0.05$  nei trattati vs cellule trattate con gp120. L'analisi statistica è stata effettuata usando il test ANOVA seguito dallo Student-Newman-Keuls test.

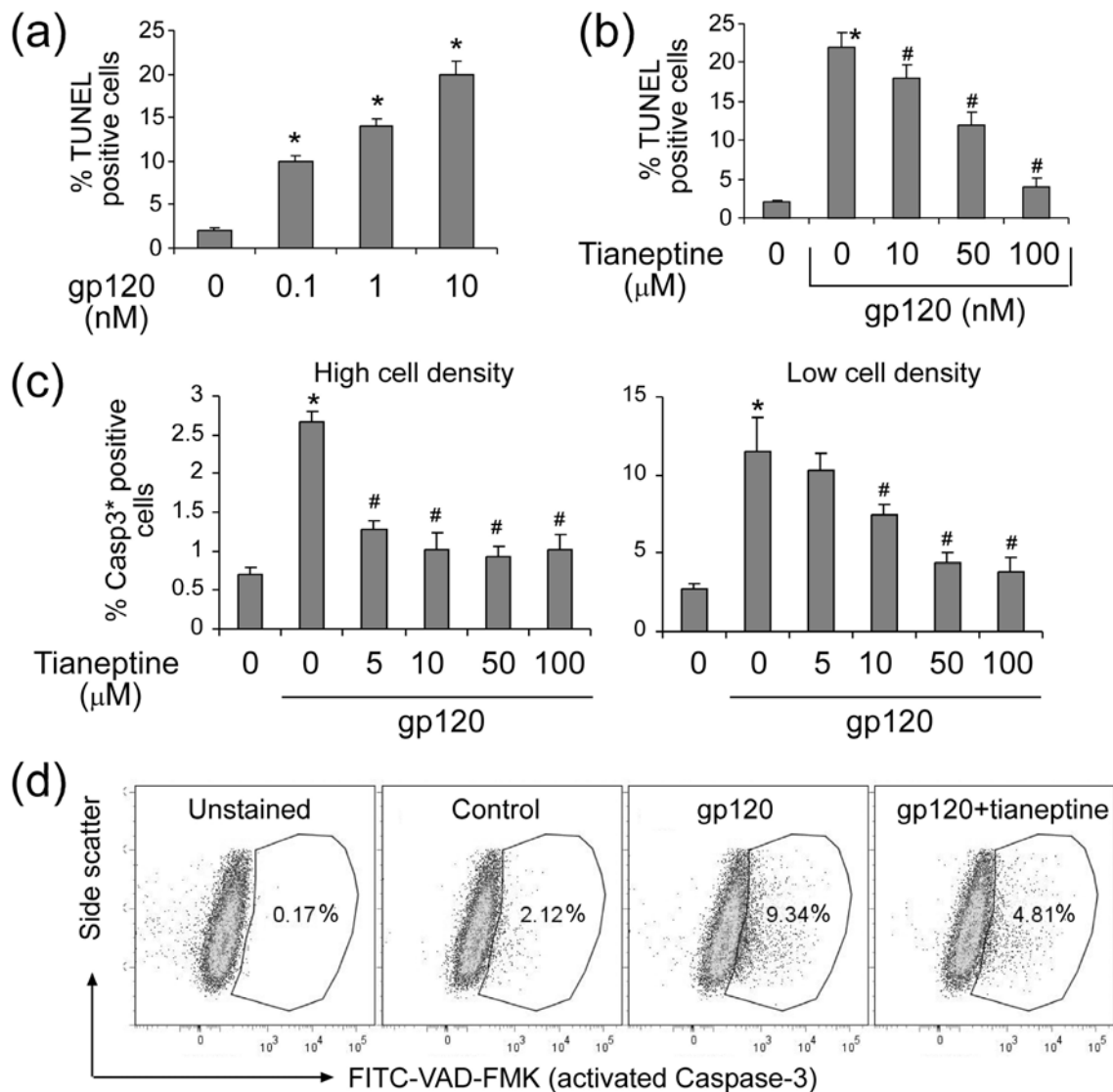
determinato una riduzione dose-dipendente di tale espressione, effetto revertito dalla NAC (5 mM) (Fig. 21a). La gp120 alla più alta concentrazione utilizzata (10 nM) ha determinato altresì una significativa riduzione dell'attività di tale enzima (Fig. 21b), effetto contrastato dalla NAC (0.5-5 mM) in maniera dose-dipendente (Fig. 21b).

### ***Effetti della tianeptina sui processi di morte cellulare indotti dalla gp120***

Per valutare il potenziale effetto protettivo della tianeptina nei confronti della neurodegenerazione indotta dal virus dell'HIV, sono stati utilizzati astrociti umani appartenenti al ceppo U373.

Il trattamento con gp120 (0.1, 1, 10 nM) per 48 ore ha indotto in queste cellule una riduzione della vitalità dose-dipendente. In particolare, la morte cellulare indotta da gp120 è da ricondurre principalmente a meccanismi di apoptosi, come dimostrato dal saggio TUNEL (Fig. 22a) analizzato mediante il citofluorimetro. La tianeptina (100  $\mu$ M), in pretrattamento di un'ora, ha preservato gli astrociti dalla morte cellulare apoptotica indotta dalla gp120 in modo dose-dipendente (Fig. 22b).

La gp120 ha indotto apoptosi coinvolgendo l'attivazione della caspasi-3 in altri tipi cellulari. Per questo motivo abbiamo valutato l'ipotesi se la caspasi-3 potesse essere attivata in risposta a gp120. Dopo il trattamento con gp120 in presenza o assenza di tianeptina, le cellule sono state marcate con FMK-VAD-FITC, una versione fluorescente dell'inibitore irreversibile della caspasi-3. La gp120 ha comportato una significativa attivazione della



**Figura 22. La tianeptina previene la morte apoptotica delle cellule astrogliali indotta dalla gp120.** **a)** L'incubazione di cellule astrogliali con gp120 (0.1, 1 e 10 nM) per 48 ore ha indotto morte cellulare apoptotica in confronto ai controlli non trattati, come dimostrato dal saggio TUNEL analizzato mediante il citofluorimetro. I dati rappresentano la media ed il relativo errore standard medio di 3 esperimenti indipendenti.\*  $P < 0.05$  negli astroцитi trattati con gp120 rispetto alle cellule controllo (non trattate); #  $P < 0.05$  in cellule trattate con gp120 e tianeptina rispetto alle cellule trattate con gp120. **b)** La tianeptina (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), in pretrattamenti di un'ora, ha prevenuto l'effetto della gp120. L'analisi statistica è stata effettuata come in (a) **c)** L'incubazione di cellule astrogliali con gp120 (10 nM) per 48 ore ha determinato l'attivazione della caspasi-3 come dimostrato dall'incremento del legame al coniugato FITC-VAD-FMK, un composto che riconosce specificatamente la forma tagliata della caspasi-3. Il concomitante trattamento con tianeptina (50 nM), in pre-trattamento di un'ora, ha antagonizzato il clivaggio della caspasi-3 indotto dalla gp120 come dimostrato nell'analisi al FACS. Le cellule astrogliali sono state seminate nella quantità di  $2,0 \times 10^5/\text{cm}^2$  (pannello di sinistra) e  $0,5 \times 10^5/\text{cm}^2$  (pannello di destra) con gp120 (10 nM). L'analisi statistica è stata effettuata come in (a). Il saggio specifico indica un tasso di apoptosi inferiore ed una protezione da apoptosi quasi completa alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$  di tianeptina a densità cellulare elevata. **d)** Dot plots rappresentativi della fluorescenza con FITC relativi alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  di tianeptina in (c).

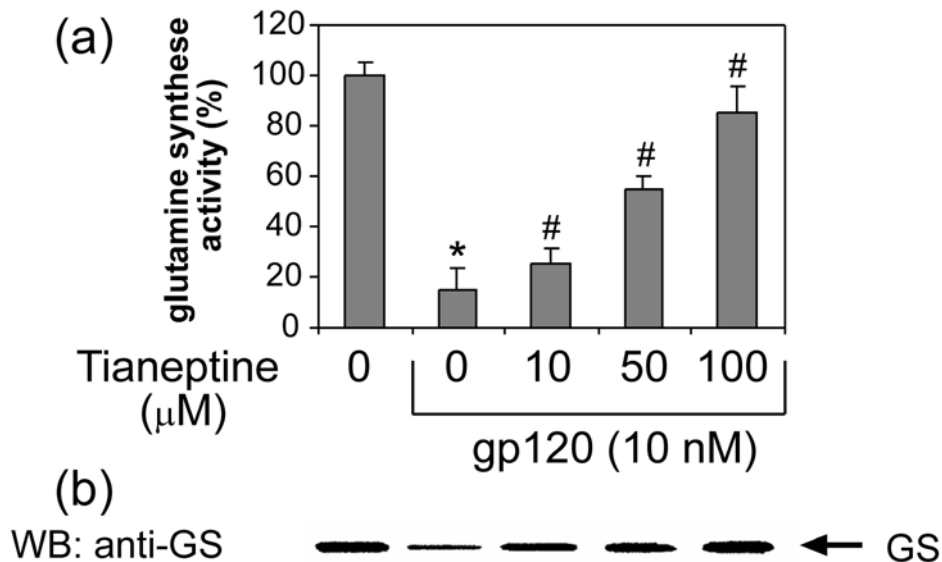


caspasi-3 rispetto alle cellule controllo (Fig. 22c), ma l'esatta percentuale di cellule apoptotiche è risultata inversamente proporzionale alla densità cellulare presente all'inizio del trattamento (22d).

La tianeptina ha sensibilmente ridotto l'attivazione della caspasi-3 già alla concentrazione di 5  $\mu\text{M}$  se applicata per 48 ore su un campione ad alta densità cellulare, ma ha provocato un effetto massimo protettivo a dosi più alte su cellule piastrate a bassa confluenza.

Al fine di comprendere il meccanismo alla base dell'effetto protettivo della tianeptina, è stata determinata l'attività della glutammina sintasi (GS) con un saggio specifico, e l'espressione di tale proteina, mediante western blotting, immediatamente dopo aver incubato le cellule con differenti concentrazioni di tianeptina (10-100  $\mu\text{M}$ ). La gp120 (10 nM) ha ridotto l'espressione e l'attività della GS del 75% rispetto al gruppo controllo (gruppo di cellule che non hanno ricevuto il trattamento), mentre il pre-trattamento con tianeptina (100  $\mu\text{M}$ ) ha ristabilito entrambi i parametri della GS in modo dose-dipendente (Fig. 23a,b).

Ciò suggerisce che l'effetto protettivo della tianeptina sia mediato dalla stimolazione del catabolismo del glutammato. Il trattamento con gp120, inoltre, ha condotto ad una riduzione rapida e transitoria dei livelli di NO, confermata dalla precoce down-regulation dell'isoforma costitutiva della NOS (2 h) e dalla successiva up-regulation della NOS inducibile (24 h)(Fig. 24b).



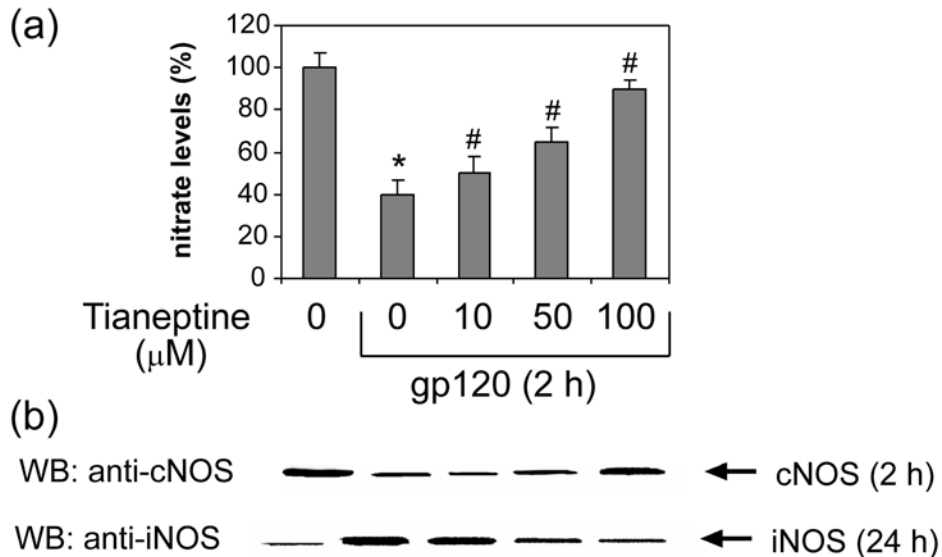
**Figura 23. La tianeptina aumenta i livelli e l'attività della glutammina sintasi in cellule astrogliali umane.**

**a) il decremento della formazione di glutammina nei soprannatanti delle cellule astrogliali incubate con gp120 è stato revertito dalla tianeptina.**

Il trattamento con gp120 (10 nM) per 24 ore ha determinato una diminuzione della formazione di glutammina rispetto ai controlli non trattati. Tale effetto è stato revertito dalla tianeptina in maniera dose-dipendente. La tianeptina (10, 50, 100,  $\mu\text{M}$ ), in pretrattamento di due ore, ha revertito questo effetto. I dati rappresentano la media ed il relativo errore standard medio di cinque esperimenti indipendenti. \*  $P < 0.05$  quando comparato al controllo; #  $P < 0.05$  nei trattati vs trattamenti con gp120. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test ANOVA seguito dallo Student-Newman-Keuls test.

**b) effetto della gp120 sui livelli di espressione della glutammina sintasi nelle cellule astrogliali.**

L'incubazione delle cellule astrogliali con gp120 (10 nM) per 24 ore ha ridotto l'espressione della GS come dimostrato dall'analisi con western blotting. Il pretrattamento di due ore con tianeptina (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) ha revertito questo effetto. I blots sono rappresentativi di 5 esperimenti.



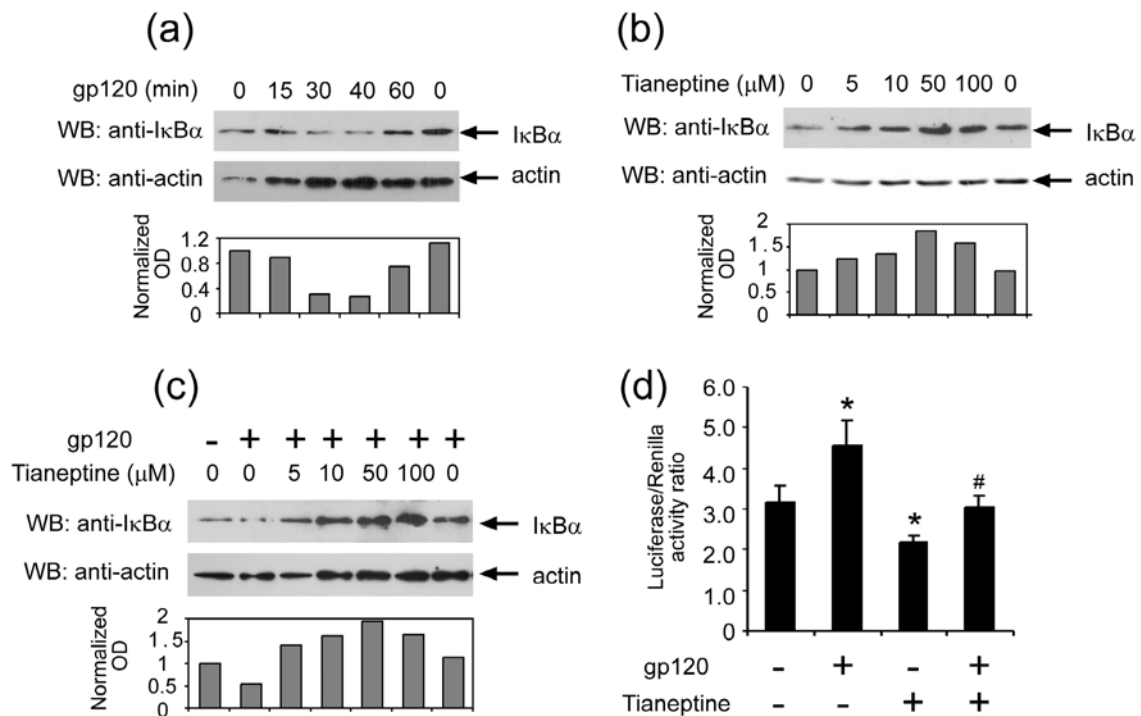
**Figura 24. Effetto della tianeptina sul nitrossido e sulle isoforme della nitrossido sintasi.**

**a) La transitoria diminuzione dei livelli di nitrito nelle cellule astrogliali incubate con gp120 è stata revertita dalla tianeptina.** Il trattamento delle cellule astrogliali con gp120 (10 nM) per 2 ore ha prodotto un iniziale decremento dei livelli dei nitrito in confronto al controllo non trattato. La tianeptina (10, 50, 100 μM), in pretrattamento di 2 ore, ha revertito quest'effetto in maniera dose-dipendente. I dati rappresentano la media ed il relativo errore standard medio di cinque esperimenti indipendenti. \*  $P < 0.05$  se comparati al controllo CTRL; #  $P < 0.05$  nei trattati vs trattamenti con gp120. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test ANOVA seguito dallo Student-Newman-Keuls test.

**b) Effetto di gp120 sull'espressione della cNOS ed iNOS in colture astrogliali umane.** L'incubazione di cellule astrogliali con gp120 (0.1, 1, 10 nM) per 24 ore ha ridotto in maniera dose-dipendente l'espressione della cNOS ed ha incrementato l'espressione della iNOS come dimostrato dall'analisi mediante Western blotting. Il pretrattamento di 2 ore con tianeptina (10, 50, 100 μM) ha revertito in maniera dose-dipendente questo effetto. I blots sono rappresentativi di 5 esperimenti. Le colonne rappresentano la media ed il relativo errore standard medio.

Infine, sono stati determinati i livelli di nitrito dopo il trattamento con gp120, per misurare la diminuzione transitoria di NO in presenza ed in assenza di tianeptina. 100  $\mu$ M di tianeptina risultano essere efficaci nell'inibizione della riduzione di nitrito provocata dal trattamento con gp120 (100  $\mu$ M, 2 h) (Fig. 24a).

La principale via di trasduzione del segnale responsabile dell'induzione di iNOS è la classica pathway del complesso trascrizionale NF $\kappa$ B. È stata verificata l'attivazione di NF $\kappa$ B monitorando i cambiamenti dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  e misurando l'attività di induzione di NF $\kappa$ B utilizzando il saggio della luciferasi. È stato valutato l'effetto di gp120 sulla degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$ . Come mostrato nella figura (25a), si è verificato un abbassamento dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  dopo 30, 40 e 60 minuti dall'aggiunta di gp120. Il pretrattamento di 1 h con tianeptina ha contrastato in modo dose-dipendente la diminuzione dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  indotta da gp120 (Fig. 25c) e ha ridotto significativamente, alla concentrazione 50  $\mu$ M, l'attività di NF $\kappa$ B misurata dopo 5 ore dalla stimolazione con gp120 (Fig. 25d). In modo interessante, la tianeptina a dosi che vanno da 5 a 100  $\mu$ M, ha incrementato i livelli basali di I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 25b). In accordo con tali dati, è stata osservata una riduzione dell'attività di luciferasi di NF $\kappa$ B in cellule pretrattate con tianeptina rispetto alle cellule controllo (Fig. 25d).



**Figura 25. La tianeptina interferisce con la via di trasduzione NFκB stabilizzando IκBα nelle cellule astrogliali.**

**a) Analisi time-course dei livelli della proteina IκBα in risposta a stimolazione con gp120.** Le cellule astrogliali (150.000/well) sono state stimolate con gp120 (10 nM) e sono state lisate con RIPA buffer ai tempi indicati in figura. I lisati sono stati analizzati e 5 μg del lisato proteico totale sono stati caricati su un gel (10% SDS-PAGE) e successivamente analizzati mediante western-blotting. Il *blot* è rappresentativo di 3 esperimenti. Le colonne rappresentano la densità ottica media normalizzata del segnale di IκBα diviso l'OD medio del segnale dell'actina.

**b) La tianeptina stabilizza IκBα in assenza della stimolazione di gp120.**

Le cellule (seminate come sopra) sono state trattate per 1 ora e 40 minuti con differenti concentrazioni di tianeptina e successivamente analizzate mediante western-blotting.

**c) La tianeptina inibisce la degradazione di IκBα indotta da gp120.**

Le cellule astrogliali sono state seminate come in figura (a) e sono state stimolate con gp120 per 35 minuti. La tianeptina a differenti dosi è stata aggiunta un'ora prima dell'aggiunta di gp120. Le cellule sono state analizzate mediante Western-blotting come in figura (a).

**d) L'attività trascrizionale di NFκB è stata soppressa dalla tianeptina.**

Le cellule astrogliali sono state seminate ad alta densità e transfettate il giorno dopo con i plasmidi pNFκB-Luc e pRL. Venti ore dopo la transfezione, le cellule sono state stimolate con gp120 (10 nM) e/o tianeptina (50 μM) per 5 ore, mentre altre non hanno subito trattamento. Ogni trattamento è stato eseguito per 6 volte. L'attività di luciferasi e l'attività di controllo di renilla sono il risultato di 6 punti sperimentali. I dati rappresentano la media ed il relativo errore standard medio di un esperimento rappresentativo che è stato eseguito tre volte. \* P < 0.05 se comparato al controllo; # P < 0.05 nei trattati vs trattamenti con gp120. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test ANOVA seguito dallo Student-Newman-Keuls test.

Questi dati indicano che la la tianeptina protegge gli astrociti dall'apoptosi indotta da gp120 interferendo nelle fasi iniziali della stessa, come ad esempio la degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$  seguita dall'attivazione del complesso trascrizionale NF $\kappa$ B e dalla transitoria downregulation di NO.

## **12. Discussione**

L'alterazione delle funzioni cognitive che accompagna l'infezione da HIV è una delle più frequenti complicanze nei pazienti con AIDS (Price et al., 1988; Tardieu, 1999).

Lo stress ossidativo, combinato con l'attivazione dei processi infiammatori, gioca un ruolo chiave nella neuropatogenesi dell'infezione da HIV. Questa è il risultato di un aumento nella formazione di molte specie di radicali liberi come l'anione superossido, il nitrossido e il perossinitrito che si associa ad una deregolazione degli antiossidanti endogeni nei tessuti cerebrali dei pazienti affetti da immunodeficienza acquisita (Pace and Leaf, 1995; Romero-Alvira and Roche, 1998; Elbim et al., 2001).

L'effetto della iperproduzione di ROS può, a sua volta, avere effetti cruciali sui meccanismi che regolano il bilancio tra la vita e la morte delle cellule del S.N.C. e condurre ad una significativa deregolazione della permeabilità della BEE, amplificando l'effetto deleterio dell'infezione da HIV nei tessuti cerebrali (Mollace et al., 2001).

I nostri dati sperimentali documentano come l'infezione da HIV sia correlata con la produzione di fattori solubili (presumibilmente citochine pro-

apoptotiche/pro-ossidanti) che, a contatto con le cellule astrogliali umane in coltura, determinano la comparsa di morte cellulare per apoptosi.

Tale evento è documentato dalla presenza di una quota media stimabile, dopo 24 ore di incubazione delle cellule astrogliali con la gp120, di alterazione della vitalità cellulare rilevata attraverso il test del trypan blue, e confermato dai dati ottenuti con la tecnica del TUNEL. Che la morte cellulare osservata sia da ricondurre ad una condizione di stress ossidativo è dimostrato dall'incremento considerevole della produzione di malonildialdeide (prodotto dei processi di perossidazione lipidica).

Numerose evidenze sperimentali documentano come lo stress ossidativo contribuisca a diversi aspetti della patogenesi dell'infezione da HIV, quali la replicazione virale (Davis, et al. 1999; Mollace et al., 2001), la risposta infiammatoria, la ridotta proliferazione delle cellule immuno-effettrici e la perdita della funzione immunitaria, nonché l'aumentata sensibilità alla tossicità da farmaci (Pace and Leaf, 1995; Schwarz, 1996; Ferrando et al., 1998; Cross and Ku, 2000; Elbim et al. 2001).

In particolare, sembra che lo stress ossidativo sia direttamente responsabile delle alterazioni che avvengono nel tessuto cerebrale dei malati di AIDS, che non possono essere spiegate solo sulla base dell'infezione diretta da parte del virus. Risulta evidente, pertanto, che le interazioni del virus con i macrofagi/microglia e con le cellule astrogliali, ed il conseguente rilascio sia di componenti virali che di citochine pro-infiammatorie/pro-apoptotiche, rappresentino gli eventi "chiave" che, attraverso la produzione

abnorme di radicali liberi, conducono a danno cerebrale. Infatti, è stato documentato come in diversi tipi cellulari l'infezione da HIV determini una significativa alterazione dello stato ossidativo, particolarmente evidente nei macrofagi e nella microglia, dove si verifica un'aumentata produzione di malonildialdeide, ed una ridotta sintesi di glutazione endogeno (Palamara et al., 1996; Mollace et al., 2002).

Considerando, inoltre, che il blocco della replicazione virale in tali cellule (ottenuto impiegando farmaci antivirali) riduce le alterazioni metaboliche ed elimina gli effetti pro-apoptotici, risulta ulteriormente confermato che il rilascio di fattori solubili da parte dei macrofagi sia la principale causa dei processi apoptotici osservati quando i soprannatanti degli stessi macrofagi infettati sono incubati con gli astrociti e i neuroni; il meccanismo attraverso cui tali fattori agiscono è la distruzione del bilancio tra la formazione dei radicali liberi e l'attivazione degli antiossidanti endogeni (Aquaro et al., 2000). E' stato, infatti, dimostrato come l'interazione tra la microglia infettata dal virus e gli astrociti sia in condizione di incrementare significativamente la produzione di NO. In particolare, mentre l'infezione da HIV nei macrofagi induce l'espressione della iNOS e la conseguente produzione di bassi livelli di NO, gli astrociti invece rappresentano una più consistente sorgente di NO; ciò suggerisce che il danno neuronale, correlato con l'AIDS, veda la produzione di specie reattive nelle cellule gliali come un meccanismo fisiopatologico di rilevanza fondamentale.



L'induzione dell'espressione della iNOS negli astrociti avviene, dunque, attraverso il rilascio di fattori solubili da parte dei macrofagi cerebrali. Infatti, è stato dimostrato che non solo l'IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$ , prodotti durante il processo di attivazione cerebrale, sono in grado d'indurre l'espressione della iNOS astrogliale, ma anche le proteine dell'HIV, gp120 (Mollace et al., 1993) nonché Tat sono in grado di stimolare la sintesi dell'mRNA per questo enzima (Rostasy et al., 1999).

L'NO prodotto negli astrociti è in grado di interagire successivamente con il gruppo eme della COX-2 (Mollace et al., 1994) inducendo la sintesi di PGE<sub>2</sub> e la produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Tale sequenza di eventi, unita al fatto che anche l'IL-1 $\beta$  è in grado di attivare la COX-2 nella corteccia di ratto (Bagetta et al., 1998) e che i macrofagi producono elevate quantità di anione superossido, giustifica le elevate concentrazioni di nitrotirosina nelle sezioni cerebrali dei pazienti con ADC e nelle cellule astrogliali da noi impiegate, confermando ulteriormente che il perossinitrito è il principale responsabile della morte delle cellule cerebrali in corso di infezione da HIV (Boven, 1999; Muscoli et al., 2002).

E' stato ampiamente documentato come, nei soggetti infettati da HIV, accanto ad un'incrementata produzione di radicali liberi si verifichi una riduzione dei sistemi antiossidanti endogeni. Infatti, usando una linea cellulare HeLa, stabilmente transfettata con il gene tat virale, è stato provato che l'espressione della proteina regolatoria tat sopprime l'espressione

cellulare della MnSOD, mentre quella dell'enzima Cu/ZnSOD rimane essenzialmente immutata (Flores et al., 1993).

Tale decremento di attività della MnSOD in queste cellule è accompagnato da un elevato stress ossidativo, dimostrato da un aumento dei gruppi carbonilici delle proteine e da una riduzione del contenuto cellulare di gruppi sulfidrilici. Tuttavia, i principali bersagli molecolari dello stress ossidativo sono le proteine cellulari, a livello delle quali si osserva un aumento dei gruppi carbonilici e un rapido incremento della degradazione delle proteine appena sintetizzate ad opera dei sistemi proteolitici ATP e ubiquitina-dipendenti (Flores et al., 1993). Tali eventi portano alla riduzione della quantità totale di proteine cellulari e alla comparsa di cellule molto piccole che vanno incontro a mitosi letale (Flores et al., 1993).

Esistono prove del fatto che lo stress ossidativo modula diverse risposte cellulari attraverso l'attivazione di alcune famiglie di geni che coinvolgono trasduttori intracellulari, come p21-Ras e la PKA, nonché di fattori di trascrizione del tipo NFκB/Rel che rivestono un ruolo importante nella regolazione dell'apoptosi; infatti, l'infezione da HIV e lo stress ossidativo, da questa indotto, possono modulare l'apoptosi cerebrale proprio attraverso l'attivazione di NFκB/Rel (Van Antwerp et al., 1998; Bowie and O'Neill, 2000).

Queste osservazioni inducono a credere che le risposte cellulari allo stress ossidativo siano correlate all'attivazione di specifiche famiglie di geni

e di eventi trascrizionali, e ciò può essere importante per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nei confronti della morte cellulare apoptotica.

Nelle cellule del cervello e dei tessuti periferici infettate dall'HIV, lo stress ossidativo sembra influire sulla replicazione virale per mezzo di meccanismi che coinvolgono il sistema delle citochine. Infatti, TNF- $\alpha$  stimola la replicazione virale attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B ed è noto che tale attivazione coinvolge la formazione di ROS (Lamberti et al., 1999).

I risultati da noi ottenuti dimostrano come l'incubazione con la NAC ha prodotto un importante effetto protettivo nei confronti della morte cellulare indotta dalla gp120, documentando per tale classe di molecole interessanti prospettive nel trattamento del neuroAIDS. L'effetto antiossidante è documentato dal fatto che la produzione di malonildialdeide viene significativamente inibita nelle cellule astrogliali e si correla adeguatamente con l'inibizione dell'apoptosi prodotta da tale composto.

Il ripristino dei livelli degli antiossidanti nelle cellule infettate porta alla riduzione della replicazione virale e, probabilmente, anche del danno cellulare indotto da HIV (Premanathan et al., 1997; Muscoli et al., 2002). In particolare, con i nostri esperimenti, è stato possibile dimostrare come l'impiego di farmaci antiossidanti sia in grado di prevenire gli effetti neurodegenerativi, mediati dalla formazione dei fattori solubili del virus dell'HIV, che si verificano a carico della glia.

In tal senso, le evidenze sperimentali da noi ottenute documentano come la massiva produzione di radicali liberi come il NO, che si osserva in seguito ad attivazione dell'isoforma inducibile della NOS in presenza di particelle virali, giochi un ruolo chiave nella regolazione di enzimi neuroprotettivi quali la glutammina sintasi. E' noto come un eccesso di glutammato nello spazio sinaptico, oltre a determinare una serie di eventi per così dire "acuti" e legati all'azione  $Ca^{2+}$  ionofora dell'attivazione di recettori di tipo NMDA, si associ ad azioni di modulazione anche di isoforme enzimatiche inducibili od al rilascio di mediatori dell'infiammazione, quali metaboliti dell'acido arachidonico od infine a liberazione di specie radicaliche di tipo infiammatorio.

In tali condizioni, la presenza di un'attivazione gliale con la conseguente attivazione reattiva della GS, conduce ad un'azione di riduzione dei livelli di glutammato libero che, in definitiva, fanno configurare l'incremento della GS come un evento di sicuro significato neuroprotettivo.

La modulazione dei livelli di GS astrogliale si presenta come un evento chiave anche nella comprensione dei meccanismi alla base della morte cellulare che si verifica in seguito ad applicazione di uno stimolo, come la gp120, che induce sugli astrociti stress di tipo ossidativo ed infiammatorio.

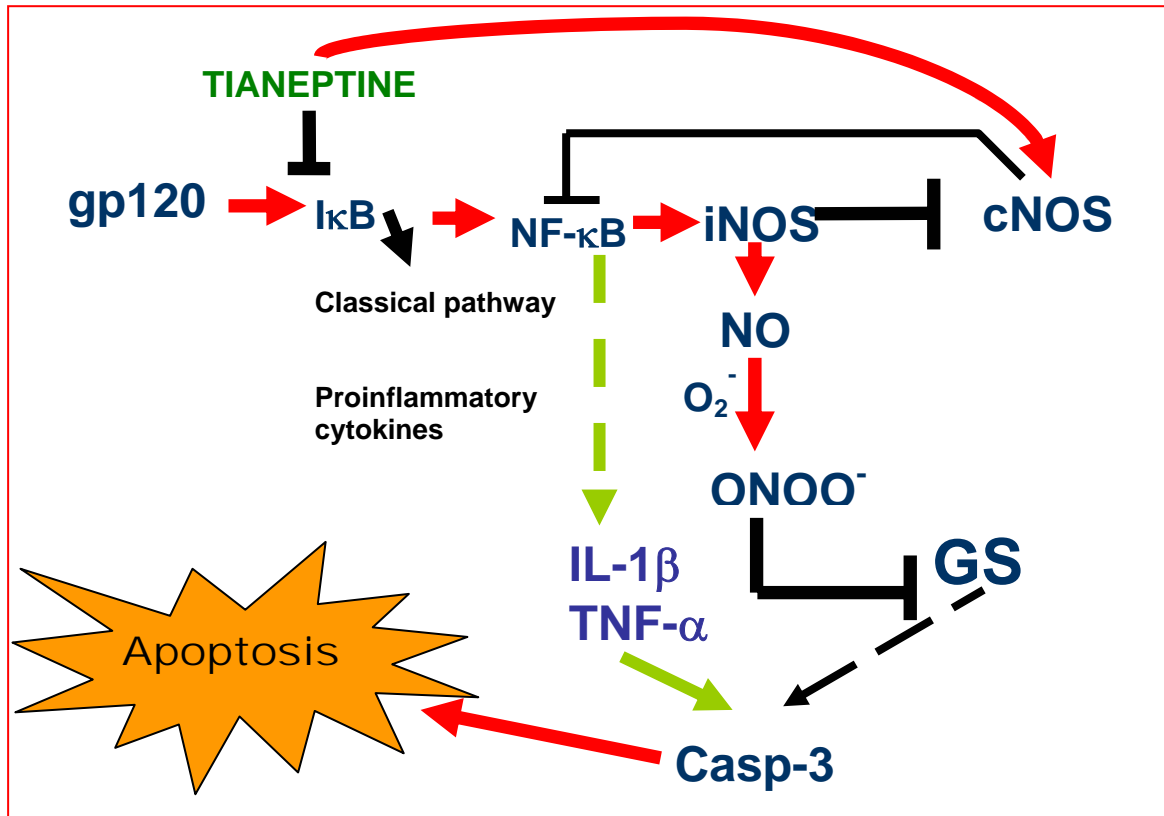
Il ruolo cruciale dello stress ossidativo nei processi di morte astrogliale causata da fattori solubili dell'HIV è confermato dalla protezione conferita dalla NAC, un potente antiossidante.

La NAC è un composto unico in quanto agisce da agente riducente nelle reazioni redox sia per una proprietà intrinseca, che attraverso la stimolazione della sintesi del principale riducente endogeno, il GSH, che potrebbe risultare compromesso in corso di infezione da HIV (Moldeus and Cotgreave, 1994).

È inoltre provato come la NAC sia dotata di azione protettiva contro l'apoptosi indotta da stress ossidativo, deprivazione di fattori di crescita e farmaci citotossici (Hockenbery et al., 1993; Ferrari et al., 1995; Yan et al., 1995; Yan and Greene, 1998).

Nei presenti studi la NAC si è dimostrata in grado di prevenire la morte astrogliale indotta dalla gp120, sia per necrosi che per apoptosi. In particolare, è altresì noto come la NAC sia in grado di inibire l'attivazione del fattore di trascrizione NFκB bloccando IKK (Oka et al., 2000), e l'attivazione di NFκB è necessaria per l'induzione dell'iNOS (Colasanti and Persichini, 2000).

Infatti, i nostri dati documentano come la tianeptina, un nuovo farmaco antidepressivo con proprietà antinfiammatorie, sia in grado di attenuare gli effetti apoptotici causati dalla proteina dell'HIV gp120 in colture di astrociti umani. Questo effetto è accompagnato dalla modulazione dell'attività e dell'espressione della glutammina sintasi (GS) in astrociti danneggiati da gp120 (Fig. 26). Cellule astrogliali previamente incubate con gp120 e sottoposte a trattamento con tianeptina mostrano nuovamente espressione ed attività della glutammina sintasi. Tale farmaco dimostra di possedere un



**Figura 26. Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari della tianeptina nella protezione dall'apoptosi indotta dalla gp120.**

L'effetto iniziale della tianeptina coinvolge il blocco della degradazione di IκBα indotta da gp120. Ciò previene l'induzione della iNOS e la diminuzione dei livelli della cNOS, la stabilizzazione dei livelli fisiologici di NO, e, conseguentemente, l'aumento dell'attività della GS che è fondamentale per la protezione cellulare.

ulteriore effetto regolatorio sull'equilibrio tra il rilascio costitutivo ed il rilascio inducibile di NO negli astrociti umani. Questo effetto è probabilmente mediato dall'inibizione del fattore trascrizionale NFκB. Infatti, la tianeptina previene l'iniziale down-regulation di IκBα indotta da gp120, necessaria per l'attivazione del pathway classico di NFκB ed iNOS. Questo ci suggerisce che la tianeptina interferisca con il meccanismo che porta alla degradazione di IκBα in risposta a gp120.

Le nostre conclusioni spiegano come la tianeptina protegga le cellule astrogliali dall'apoptosi e suggeriscono che l'inibizione di NFκB possa stare alla base della sua attività anti-infiammatoria descritta precedentemente da altri autori (Plaisant et al. 2003; Castanon et al. 2004).

La glutammina sintasi è un enzima fondamentale per la protezione astrogliale e neuronale in quanto capace di catabolizzare l'eccessiva quantità di glutammato rilasciata dal danno cellulare. L'incremento dell'attività della GS avviene dopo danno encefalico ed è protettivo rispetto alla disfunzione astrocitica causata da gp120 (Muscoli et al., 2005) così come contro gli effetti deleteri dell'eccesso di glutammato nel fluido extracellulare (Oliver et al., 1990; Tuor et al., 1995, 1996; Bertorelli et al., 1998). Dunque, l'aumento dell'attività della GS (diminuita dopo l'incubazione degli astrociti con gp120) indotta dalla tianeptina, può, anche in base a queste evidenze, essere considerato un fattore importante nella protezione degli astrociti dalle disfunzioni indotte dall'HIV.

Tale modulazione sembra guidata, almeno in parte, dal rilascio di NO da parte dell'isoforma costitutiva della NO sintasi (NOS). Infatti, le concentrazioni di tianeptina capaci di proteggere gli astrociti dagli effetti della gp120 sono in grado di aumentare l'attività sia della GS che della cNOS e si dimostrano capaci di inibire la sovra-espressione della iNOS conseguente all'esposizione degli astrociti alla gp120. Quest'effetto è associato ad un'iniziale riduzione dei livelli di nitrito registrata nei soprannatanti cellulari, a conferma della capacità della tianeptina di ridurre l'eccessiva produzione di NO generata dalla proteina virale, un effetto che avviene in contemporaneità con l'aumento di cNOS e con l'inibizione dell'attività di iNOS. Tutto ciò è in accordo con i dati ottenuti da noi e da altri gruppi di ricercatori che dimostrano che il rilascio costitutivo di NO (e di conseguenza della GS) è uno step cruciale nella risposta adattativa degli astrociti agli stimoli infiammatori (Muscoli et al., 2005).

Esiste un'evidenza secondo cui NO rilasciato in condizioni basali dalla cNOS determini l'inattivazione dell'isoforma inducibile attraverso l'inibizione del pathway di NF $\kappa$ B, il quale a sua volta regola i meccanismi trascrizionali di iNOS (Colasanti and Suzuki, 2000). In particolare, è noto che NF $\kappa$ B rappresenta uno dei più importanti pathway coinvolto nella mediazione dell'espressione di iNOS, seguito da mediatori extracellulari, incluse le endotossine e le citochine infiammatorie (Bonaiuto et al., 1997; Chao et al., 1997; Massa and Wu, 1998; Hartlage-Rubsamen et al., 1999).



Quando vengono rilasciate basse concentrazioni di NO sia endogeno che esogeno, NFκB si pone in uno stato inattivo (Togashi et al., 1997). Molti fattori possono contribuire all'inibizione NO-dipendente di NFκB, incluso l'effetto diretto del NO a livello del legame di NFκB con il suo promotore, senza l'interessamento dell'attivazione e della translocazione di NFκB (Matthews et al., 1996; Dela Torre et al., 1997). Inoltre, NO inibisce il legame di NFκB al DNA attraverso una S-nitrosilazione del residuo di cisteina in posizione 62 della subunità p50 (Dela Torre et al., 1998).

Ulteriori dati hanno recentemente dimostrato che NO interagisce con NFκB attraverso la stabilizzazione dell'inibitore IκB. In particolare, è stato dimostrato che NO e i donatori di NO stabilizzano IκB attraverso la prevenzione della sua degradazione da parte di NFκB e l'aumento dell'espressione dell'mRNA di IκBα, senza interferire con l'espressione dell'mRNA della subunità p65 o p50 di NFκB (Peng et al., 1995). Inoltre un iniziale decremento del NO è necessario per l'attivazione di NFκB e successivamente per l'induzione di iNOS. Dunque, quando la tianeptina è incubata con astrociti trattati con gp120, cNOS si riattiva e l'espressione di iNOS diminuisce, suggerendo così che la tianeptina possa comunicare al sistema di produzione dell'NO di lavorare in uno stato di efficienza "non infiammato". Dato che la tianeptina si è dimostrata capace di aumentare in maniera dose dipendente l'inibitore di NFκB, IκBα, è probabile che l'effetto di questo composto sulla regolazione della NOS sia dovuto anche ad interferenze con la via di segnalazione dell'NO mediata da NFκB. Questo

meccanismo interferisce in modo significativo con l'espressione e l'attività della GS nelle cellule astrogliali trattate con gp120. Infatti, è stato dimostrato che il rilascio basale di NO aumenta l'attività della GS negli astrociti (Minana et al., 1997). Inoltre, abbiamo precedentemente dimostrato che il rilascio costitutivo di NO correlato con l'attività dei recettori NMDA, è associato con l'aumentata espressione della GS negli astrociti (Muscoli et al., 2005), indicando che esiste una chiara relazione tra il rilascio basale di NO e l'espressione della GS. D'altra parte l'attivazione della iNOS indotta da LPS più IFN- $\gamma$ , ha dimostrato di ridurre l'aumento della GS correlato al NMDA (Muscoli et al., 2005). Questo suggerisce che la sovrapproduzione di NO danneggia la GS negli astrociti successivamente alla loro esposizione a gp120, probabilmente attraverso la generazione di perossinitrito. A ulteriore conferma di ciò, è stato dimostrato che il perossinitrito, potente radicale libero prodotto dall'unione dell'anione superossido con il nitrossido, sia in grado di nitrosilare dei residui tirosinici della GS determinando gravi alterazioni a carico della stessa proteina (Muscoli et al., 2007).

Il ripristino della cNOS verso livelli basali indotto dalla tianeptina rappresenta un meccanismo cruciale nella sua azione antiapoptotica (Fig. 22), così come anche la prevenzione dell'induzione di vie di trasduzione infiammatorie come NF $\kappa$ B.

I nostri dati dimostrano che la tianeptina stabilizza I $\kappa$ B- $\alpha$  anche in assenza di gp120, suggerendo che le cellule astrogliali in coltura mostrano elevati livelli di NF $\kappa$ B basali che sono ulteriormente incrementati da gp120.

Non sappiamo se il blocco della degradazione di I $\kappa$ B- $\alpha$  tianeptina-dipendente, sia un risultato della iniziale modulazione positiva della cNOS o se sia una conseguenza di altri effetti molecolari della tianeptina, non ancora conosciuti.

Inoltre, il fatto che tianeptina inibisce NF $\kappa$ B potrebbe spiegare gli effetti antinfiammatori della tianeptina già riportati in letteratura. Infatti, è stato dimostrato che la tianeptina attenua gli effetti pro-infiammatori della IL-1 $\beta$  nel CNS (Plaisant et al., 2003) e l'espressione del TNF- $\alpha$  indotta nella milza dall'LPS ed i livelli plasmatici di TNF- $\alpha$  (Castanon et al., 2004). Inoltre, il trattamento cronico con tianeptina ha alterato l'equilibrio tra citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ed antinfiammatorie (IL-10) nell'ipotalamo successivamente all'iniezione di LPS. Poichè l'espressione delle citochine e l'infiammazione sono regolate da NF $\kappa$ B, è probabile da quanto osservato che l'azione inibitoria della tianeptina su NF $\kappa$ B possa rappresentare un meccanismo comune per l'attività antinfiammatoria ed antiapoptotica di questo farmaco.

Ad ogni modo, in conclusione, alla luce di questi studi, l'utilizzo di farmaci antinfiammatori ed antiossidanti, potrebbe permettere ulteriori progressi nella comprensione dei processi che sono alla base della neuropatogenesi dell'infezione da HIV e ciò potrebbe rappresentare la base per nuove ed efficaci strategie nel trattamento della ADC.

### 13. Conclusioni

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano che:

1. esiste una significativa vulnerabilità della popolazione astrogliale umana a seguito dell'incubazione con gp120, e tale effetto è accompagnato da apoptosi e da un aumento dei livelli di stress ossidativo;

2. gli effetti pro-ossidanti risultano essere contrastati dall'antiossidante NAC;

3. la gp120 induce alterazioni dell'attività e dell'espressione della glutammina sintasi, della nitrossido sintasi neuronale e di quella inducibile;

4. la gp120 induce l'attivazione del complesso trascrizionale NF $\kappa$ B attraverso l'induzione della degradazione del suo inibitore I $\kappa$ B $\alpha$  con l'effetto massimo osservabile a 30-40 minuti dall'esposizione;

5. l'effetto su NF $\kappa$ B è revertito dalla tianeptina, che al contrario stabilizza il legame dell'inibitore I $\kappa$ B $\alpha$  a NF $\kappa$ B;

6. analogamente, tutti gli altri effetti della gp120 sulle cellule astrogliali sono stati contrastati dalla tianeptina, suggerendo così un nuovo e potenzialmente utile approccio per il trattamento dei pazienti con HAD.

## 14. Bibliografia

**Alfonso J., Frick L.R., Silberman D.M., Palumbo M.L., Genaro A.M., Frasch A.C.** (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* **59**(3):244-51.

**Altura B.M., Gebrewold A.** (1998). Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates alcohol-induced leukocyte-endothelial cell interaction and cerebral vascular damage in rats: possible role of activation of transcription factor NF-kappaB in alcohol brain pathology. *Alcohol* **16**(1):25-8.

**Ances B.M., Ellis R.J.** (2007). Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Semin Neurol* **27**(1):86-92.

**Andreau K, Perfettini J-L, Castedo M, Metivier D, Scott V, Pierron G., Kroemer G.** (2004). Contagious apoptosis facilitated by the HIV-1 envelope. Fusion-induced cell-to-cell transmission of a lethal signal. *J. Cell. Sci.* **117**: 5643–5653.

**Aquaro S., Panti S., Caroleo M.C., Balestra E., Cenci A., Forbici F., Ippolito G., Mastino A., Testi R., Mollace V., Calio R. and Perno C.F.** (2000). Primary macrophages infected by human immunodeficiency virus trigger CD95-mediated apoptosis of uninfected astrocytes. *J.Leukoc.Biol.* **68**:429-435.

**Arzt E., Costas M., Finkielman S., Nahmod V.E.** (1991). Serotonin inhibition of tumor necrosis factor-alpha synthesis by human monocytes. *Life Sci.* **48**(26):2557-62.

**Audus K.L., Gordon M.A.** (1982). Characteristics of tricyclic antidepressant binding sites associated with murine lymphocytes from spleen. *J Immunopharmacol* **4** (1-2):1-12.

**Badley A.D., Pilon A.A., Landay A. Lynch D.H.** (2000). Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* **96**:2951–2964.

**Bagasra O., Lavi E., Bobroski L., Khalili K., Pestaner J.P., Tawadros R., Pomerantz R.J.** (1996). Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Aids* **10**(6): 573-85.

**Bagetta G., Corasaniti M.T., Berliocchi L., Nisticò R., Giammarioli A.M., Malorni W., Aloe E., Finazzi-Agrò A.** (1999). Involvement of interleukin-1 $\beta$  in the mechanism of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) recombinant protein gp120-induced apoptosis in the neocortex of rat. *Neuroscience* **89**:1051-1066.

**Bagetta G., Corasaniti M.T., Malorni W., Rainaldi G., Berliocchi L., Finazzi-Agro A., Nistico G.** (1996). The HIV-1 gp120 causes ultrastructural changes typical of apoptosis in the rat cerebral cortex. *Neuroreport* **7**(11): 1722-4.

**Bagetta G., Corasaniti M.T., Paletti A.M., Berliocchi L., Giammarioli A.M., Malori W., Finazzi-Agro A.** (1998). HIV-1 gp120-induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2(COX-2). *Biochem Biophys Res Commun.* **244**(3):819-24.

**Banks W.A., Kastin A.J., Akerstrom V.** (1997). HIV-1 protein gp120 crosses the blood-brain barrier: role of adsorptive endocytosis. *Life Sci* **61**(9):PL119-25.

**Barroga C.F., Ellis R., Nelson J., Heaton R.K., Atkinson J.H., McCutchan J.A., Grant I., Spector S.A.** (1997). HIV-1 neurocognitive disorders and chemokine receptors. *Aids* **11**(13):1651-2.

**Basson M.D., Panzini L., Palmer R.H.** (2001). Effect of nabumetone and aspirin on colonic mucosal bleeding time. *Aliment Pharmacol Ther* **15**(4):539-42.

**Beckman J.S., Koppenol W.H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**:C1424-C1437.

**Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4):1620-4.

**Bertorelli R., Adami M., Di Santo E., Ghezzi P.** (1998). MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain. *Neurosci Lett* **246**(1):41-4.

**Blanco J., Barretina J., Ferri K.F., Jacotot E., Gutierrez A., Cabrera C., Kroemer G., Clotet B. Este J.A.** (2003). Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. *Virology* **305**:318-329.

**Bonaiuto C., McDonald P.P., Rossi F., Cassatella M.A.** (1997). Activation of nuclear factor-kappa B by beta-amyloid peptides and interferon-gamma in murine microglia. *J Neuroimmunol* **77**(1):51-6.

**Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A.** (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16):7162-6.

**Bonizzi G., Karin M.** (2004). The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-288

**Bour S., Strebel K.** (2000). HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system. *Adv Pharmacol* **48**: 75-120.

**Bourinbaiar A.S., Lee-Huang S.** (1995). Potentiation of anti-HIV activity of anti-inflammatory drugs, dexamethasone and indomethacin, by MAP30, the antiviral agent from bitter melon. *Biochem Biophys Res Commun* **208**(2):779-85.

**Boven L.A., Gomes L., Hery C., Gray F., Verhoef J., Portegies P., Tardieu M., Nottet H.S.** (1999). Increased peroxynitrite activity in AIDS dementia complex: implications for the neurophatogenesis of HIV-1 infection. *J. Immunol.* **162**:4319-4327.

**Boven L.A., Middel J., Breij E.C., Schotte D., Verhoef J., Soderland C., Nottet H.S.** (2000). Interactions between HIV-infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines. *J Neurovirol* **6**(5):382-9.

**Bowie A., O'Neill L.A.** (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappa B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Bioche. Pharm.* **59**:13-23.

**Brenner C. Kroemer G.** (2003). The mitochondriotoxic domain of Vpr determines HIV-1 virulence. *J. Clin. Invest.* **111**(10):1547-54.

**Brew B.J., Rosenblum M., Cronin K., Price R.W.** (1995). AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: clinical-virological correlations. *Ann Neurol* **38**(4): 563-70.

**Briant L., Coudronniere N., Robert-Hebmann, V., Benkirane M., Devaux, C.** (1996). *J. Immunol.* **156**:3994-4004.

**Bruce-Keller A.J., Barger S.W., Moss N.I., Pham J.T., Keller J.N., Nath A.** (2001). Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 beta-estradiol. *J Neurochem* **78**(6):1315-24.

**Bruno V., Copani A., Besong G., Scoto G., Nicoletti F.** (2000). Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture. *Eur J Pharmacol* **399**(2-3):117-21.

**Bukrinsky M.I., Nottet H.S., Schmidtmayerova H., Dubrovsky L., Flanagan C.R., Mullins M.E., Lipton S.A., Gendelman H.E.** (1995). Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med* **181**(2):735-45.

**Caldani M., Rolland B., Fages C., Tardy M.** (1982). Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia.* **38**(10):1199-202.



**Castanon N., Bluthé R. M. and Dantzer R.** (2001). Chronic treatment with the atypical antidepressant tianeptine attenuates sickness behavior induced by peripheral but not central lipopolysaccharide and interleukin-1 $\beta$  in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **154**:50-60.

**Castanon N., Leonard B.E., Neveu P.J., Yirmiya R.** (2002). Effects of antidepressants on cytokine production and actions. *Brain Behav Immun* **16**(5): 569-74.

**Castanon N., Medina C., Mormede C., Dantzer R.** (2004). Chronic administration of tianeptine balances lipopolysaccharide-induced expression of cytokines in the spleen and hypothalamus of rats. *Psychoneuroendocrinology* **29**(6):778-90.

**Celotti F.** (2006). Patologia generale e fisiopatologia. *EdiSES, Napoli*, ultima edizione 2006.

**Chao C.C., Lokensgard J.R., Sheng W.S., Hu S., Peterson P.K.** (1997). IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport* **8**(14):3163-6.

**Chen Z., Hagler J., Palombella V.J., Melandri F., Scherer D., Ballard D. and Maniatis T.** (1995). *Genes Dev.* **9**:1586-1597.

**Cheng J., Nath A., Knudsen B., Hochman S., Geiger J.D., Ma M., Magnuson D.S.** (1998). Neuronal excitatory properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Neuroscience* **82**(1):97-106.

**Choi J., Liu R.M., Kundu R.K., Sangiorgi F., Wu W., Maxson R. and Forman H.J.** (2000). Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**: 3693-3698.

**Cicala C., Arthos J., Rubbert A., Selig S., Wildt K., Cohen O.J. Fauci A.S.** (2000). HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1178-1183.

**Cohen I., Boya P., Zhao L., Metivier D., Andreau K., Perfettini J.-L., Weaver J.G., Badley A., Taylor E.W. Kroemer G.** (2004). Anti-apoptotic activity of the glutathione peroxidase homologue encoded by HIV-1. *Apoptosis* **9**:181–192.

**Colasanti M., Persichini T.** (2000). Nitric oxide: an inhibitor of NF- kappaB/Rel system in glial cells. *Brain Res Bull.* **52**(3):155-61. Review.

**Colasanti M., Suzuki H.** (2000). The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci.* **21**:249-252.

**Connor T.J., Kelly J.P., McGee M., Leonard B.E.** (2000). Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; Ecstasy) suppresses IL-1beta and TNF-alpha secretion following an in vivo lipopolysaccharide challenge. *Life Sci* **67**(13):1601-12.

**Corasaniti M.T., Maccarrone M., Nistico R., Malorni W., Rotiroti D., Bagetta G.** (2001). Exploitation of the HIV-1 coat glycoprotein, gp120, in neurodegenerative studies in vivo. *J Neurochem* **79**(1):1-8.

**Corasaniti M.T., Melino G., Navarra M., Garaci E., Finazzi-Agro A., Nistico G.** (1995). Death of cultured human neuroblastoma cells induced by HIV-1 gp120 is prevented by NMDA receptor antagonists and inhibitors of nitric oxide and cyclooxygenase. *Neurodegeneration* **4**(3):315-21.

**Corasaniti M.T., Navarra M., Catani M.V., Melino G., Nistico G., Finazzi-Agro A.** (1996). NMDA and HIV-1 coat protein, GP120, produce necrotic but not apoptotic cell death in human CHP100 neuroblastoma cultures via a mechanism involving calpain. *Biochem Biophys Res Commun* **229**(1):299-304.

**Corasaniti M.T., Navarra M., Nistico S., Rotiroti D., Maccarrone M., Melino G., Finazzi-Agro A.** (1998). Requirement for membrane lipid peroxidation in HIV-1 gp120-induced neuroblastoma cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3):686-9.

**Corasaniti M.T., Strongoli M.C., Piccirilli S., Nistico R., Costa A., Bilotta A., Turano P., Finazzi-Agro A., Bagetta G.** (2000). Apoptosis induced by gp120 in the neocortex of rat involves enhanced expression of cyclooxygenase type 2 and is prevented by NMDA receptor antagonists and by the 21-aminosteroid U-74389G. *Biochem Biophys Res Commun* **274**(3): 664-9.

**Cross A.H., Ku G.** (2000). Astrocytes and central nervous system endothelial cells do not express B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) immunoreactivity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **107**:21-28.

**Czeh B., Lucassen P.J.** (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **257**(5):250-60.

**Czeh B., Michaelis T., Watanabe T., Frahm J., de Biurrun G., van Kampen M., Bartolomucci A., Fuchs E.** (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22):12796-801.

**Czeh B., Welt T., Fischer A.K., Erhardt A., Schmitt W., Muller M.B., Toschi N., Fuchs E., Keck M.E.** (2002). Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* **52**(11):1057-65.

**Dantzer R., Bluthé R.M., Layé S., Bret-Dibat J.L., Parnet P., Kelley K.W.** (1998). Cytokines and sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci.* **840**:586-90.

**Davis D.A., Yusa K., Gillim L.A., Newcomb F.M., Mitsuya H. And Yarchoan R.** (1999). Conserved cysteines of immunodeficiency virus type 1 protease are involved in regulation of polyprotein processing and viral maturation of immature virions. *J. Virol.* **73**:156-164.

**Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Brecht D.S., Snyder S.H.** (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14):6368-71.

**Dawson V.L., Dawson T.M., Uhl G.R., Snyder S.H.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8):3256-9.

**DelaTorre A., Schroeder R.A., Bartlett S.T., Kuo P.C.** (1998). Differential effects of nitric oxide-mediated S-nitrosylation on p50 and c-jun DNA binding. *Surgery* **124**(2):137-41.

**DelaTorre A., Schroeder R.A., Kuo P.C.** (1997). Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **238**(3):703-6.

**Demicco, E.G., Kavanagh K.T., Romieu-Mourez R., Wang X., Shin S.R., Landesman-Bollag E., Seldin D.C., Sonenshein G.E.** (2005). RelB/p52 NF- $\kappa$ B complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor I $\kappa$ B- $\alpha$  expression and promote carcinogenesis of the mammary gland. *Mol. Cell. Biol.* **25**:10136-10147.

**Dhawan S., Toro L.A., Jones B.E., Meltzer M.S.** (1992). Interactions between HIV-infected monocytes and the extracellular matrix: HIV-infected monocytes secrete neutral metalloproteases that degrade basement membrane protein matrices. *J Leukoc Biol* **52**(2):244-8.

**Dommergues M.A., Patkai J., Renaud J.C., Evrard P., Gressens P.** (2000). Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol. Jan* **47**(1):54-63.

**Dredge K., Connor T.J., Kelly J.P., Leonard B.E.** (1999). Differential effect of a single high dose of the tricyclic antidepressant imipramine on interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion following an in vivo lipopolysaccharide challenge in rats. *Int J Immunopharmacol.* **21**(10):663-73.

**Elbim C., Pillet S., Prevost M.H., Preira A., Girard P.m., Rogine N., Hakim J., Israel N. and Gougerot- Pocidalo M.A.** (2001). The role of phagocytes in HIV-related oxidative stress. *J. Clin. Virol.* **20**:99-109.

**Ensoli F., Fiorelli V., De Cristofaro M., Muratori D.S., Novi A., Isgrò A. Aiuti F.** (2000). Role of immune-derived diffusible mediators in AIDS-associated neurological disorders. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **48**:259-266.

**Fauci A.S.** (1996) Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature.* **384**:529-534.

**Ferrari G., Yan C.Y., Greene L.A.** (1995). N- acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.* **15**:2857-2866.

**Ferri K.F., Jacotot E., Geuskens M., Kroemer G.** (2000). Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by HIV-1-ENV/CD4 interaction. *Cell Death Differ.* **7**: 1137–1139.

**Finco O, Nuti S, De Magistris M, Mangiavacchi L, Aiuti A, Forte P, Fantoni A, van der Putten H., Abrignani S.** (1997). Induction of CD4+ T cell depletion in mice doubly transgenic for HIV gp120 and human CD4. *Eur. J. Immunol.* **27**:1319-1324.

**Flores S.C., Marecki J.C., Harper K.P., Bose S.K., Nelson S.K., McCord J.M.** (1993). Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(16):7632-6.

**Fox L., Alford M., Achim C., Mallory M., Masliah E.** (1997). Neurodegeneration of somatostatin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(4): 360-8.

**Garden G.A., Budd S.L., Tsai E., Hanson L., Kaul M., D'Emilia D.M., Friedlander R.M., Yuan J., Masliah E., Lipton S.A.** (2002). Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *J Neurosci* **22**(10): 4015-24.

**Gendelman H.E., Orenstein J.M., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter D.C., Meltzer M.S.** (1989). The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *Aids* **3**(8): 475-95.

**Genis P., Jett M., Bernton E.W., Boyle T., Gelbard H.A., Dzenko K., Keane R.W., Resnick L., Mizrachi Y., Volsky D.J.** (1992). Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-astroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease. *J Exp Med* **176**(6):1703-18.

**Ghafouri M., Amini S., Khalili K., Sawaya B.E.** (2006). HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* **3**: 28.

**Gilmore, T. D.** (2003). The Rel1/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat. Res.* **115**: 241–265.

**Giulian D., Yu J., Li X., Tom D., Li J., Wendt E., Lin S.N., Schwarcz R., Noonan C.** (1996). Study of receptor-mediated neurotoxins released by HIV-1-infected mononuclear phagocytes found in human brain. *J Neurosci* **16**(10):3139-53.

**Glass J.D., Fedor H., Wesselingh S.L., McArthur J.C.** (1995). Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* **38**(5):755-62.

**Goren M.Z., Aricioglu-Kartal F., Yurdun T., Uzbay I.T.** (2001). Investigation of extracellular L-citrulline concentration in the striatum during alcohol withdrawal in rats. *Neurochem Res* **26**(12):1327-33.

**Goudsmit J., de Wolf F., Paul D.A., Epstein L.G., Lange J.M., Krone W.J., Speelman H., Wolters E.C., Van der Noordaa J., Oleske J.M.** (1986). Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet* **2**(8500):177-80.

**Gougeon M.** (2003). Cell death and immunity: apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* **3**: 392-404.

**Guha M., Bai W., Nadler J.L., Natarajan R.,** (2000). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* **275**:17728-17739.

**Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L., Alizon M.** (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**(6114):662-9.

**Hartlage-Rubsamen M., Lemke R., Schliebs R.** (1999). Interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection. *J Neurosci Res* **57**(3):388-98.

**Hartmann A., Hunot S., Michel P.P., Muriel M.P., Vyas S., Faucheux B.A., Mouatt-Prigent A., Turmel H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G.I., Agid Y., Hirsch E.C.** (2000). Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6):2875-80.

**Hashimoto K., Shimizu E., Iyo M.** (2004). Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **45**(2):104-14.

**Haughey N.J., Mattson M.P.** (2002). Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 Proteins Tat and gp120. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **31** (Suppl 2):S55–S6.

**Herzenberg L.A., de Rosa S.C., Dubs J. G., Roederer M., Anderson M.T., Ela S.W., Deresinski S.C., Herzenberg L.A.** (1997). Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:1967-1972.

**Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.** (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**:241-251.

**Ho W.Z., Douglas S.D.** (1992). Glutathione and N-acetylcysteine suppression of human immunodeficiency virus replication in human monocyte/macrophages in vitro. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1249-1253.

**Hofman F.M., Wright A.D., Dohadwala M.M., Wong-Staal F., Walker S.M.** (1993). Exogenous tat protein activates human endothelial cells. *Blood* **82**(9):2774-80.

**Ignarro L.J.** (2000). The unique role of nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. *Ital Heart J* **1 Suppl 3**:S28-9.

**Jacotot E., Ravagnan L., Loeffler M., Ferri K.F., Vieira H.L., Zamzami N., Costantini P., Druillennec S., Hoebeke J., Briand J.P., Irinopoulou T., Daugas E., Susin S.A., Cointe D., Xie Z.H., Reed J.C., Roques B.P., Kroemer G.** (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* **191**: 33–46.

**James H.J., Sharer L.R., Zhang Q., Wang H.G., Epstein L.G., Reed J.C., Gelbard H.A.** (1999). Expression of caspase-3 in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **25**(5): 380-6.

**Jezova D.** (2005). Control of ACTH secretion by excitatory amino acids: functional significance and clinical implications. *Endocrine* **28**(3): 287-94.

**Johnson R.T., Glass J.D., McArthur J.C., Chesebro B.W.** (1996). Quantitation of human immunodeficiency virus in brains of demented and nondemented patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* **39**(3): 392-5.

**Jordan-Sciutto K.L., Wang G., Murphy-Corb M. Wiley C.A.** (2000). Induction of cell-cycle regulators in simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am. J. Pathol.* **157**: 497–507

**Karin M., Ben-Neriah Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621–663.



**Kato T. Jr., Delhase M., Hoffmann A., Karin M.** (2003). CK2 Is a c-terminal I $\kappa$ B kinase responsible for NF- $\kappa$ B activation during the UV response. *Mol. Cell* **12**: 829–839.

**Katsuyama M., Ikegami R., Karahashi H., Amano F., Sugimoto Y., Ichikawa A.** (1998). Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 727-31.

**Kaul M., Lipton S.A.** (1999). Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8212-6.

**Kimura T., Kameoka M., Ikuta K.** (1993). Amplification of superoxide anion generation in phagocytic cells by HIV-1 infection. *FEBS Lett.* **326**, 232-236.

**Kingsman S.M., Kingsman A.J.** (1996). The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* **240**(3):491-507.

**Klasse P.J., Moore J.P.** (2004). Is there enough gp120 in the body fluids of HIV-1-infected individuals to have biologically significant effects? *Virology* **323**(1):1–8.

**Kole M.H., Czeh B., Fuchs E.** (2004). Homeostatic maintenance in excitability of tree shrew hippocampal CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Hippocampus* **14**(6): 742-51.

**Kolson D.L., Lavi E., Gonzalez-Scarano F.** (1998). The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system. *Adv Virus Res* **50**:1-47.

**Kosenko E., Liansola M., Montoliu C., Monfort P., Rodrigo R., Hernandez-Viadel M., Erceg S., Sanchez-Perez A.M., Felipe V.** (2003). Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain:modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int.* **43**(4-5):493-9.

**Kure K., Lyman W.D., Weidenheim K.M., Dickson D.W.** (1990). Cellular localization of an HIV-1 antigen in subacute AIDS encephalitis using an improved double-labeling immunohistochemical method. *Am J Pathol* **136**(5): 1085-92.

**Lafrenie R.M., Wahl L.M., Epstein J.S., Hewlett I.K., Yamada K.M., Dhawan S.** (1996). HIV-1-Tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessel endothelial cells. A mechanism of HIV pathogenesis. *J Immunol* **156**(4): 1638-45.

**Lamas S., Perez-sala D., Moncada S.** (1998). Nitric oxide: from discovery to the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 436-438.

**Lamberti A., Romano M.F., Agosti V., Garbi C., Bond H.M., Bonelli P., Turco M.C., Venuta S.** (1999). Regulation of cell survival in CD95-induced T cell apoptosis: role of NF-kappa B/Rel transcription factors. *Apoptosis.* **4**(3):179-86.

**Levine R.L., Oliver C.N., Fulks R.M., Standtman E.R.** (1981). Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(4): 2120-4.

**Li Y., Hui H., Burgess C.J., Price R.W., Sharp P.M., Hahn B.H., Shaw G.M.** (1992). Complete nucleotide sequence, genome organization, and biological properties of human immunodeficiency virus type 1 in vivo: evidence for limited defectiveness and complementation. *J Virol* **66**(11): 6587-600.

**Lindsberg P.J., Hallenbeck J.M., Feuerstein G.** (1991). Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* **30**(2): 117-29.

**Linthorst A.C., Reul J.M.** (1999). Inflammation and brain function under basal conditions and during long-term elevation of brain corticotropin-releasing hormone levels. *Adv Exp Med Biol.* **461**:129-52.

**Lipton S.A.** (1992). Memantine prevents HIV coat protein-induced neuronal injury in vitro. *Neurology* **42**(7): 1403-5.

**Lipton S.A.** (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* **16**(12): 527-32.

**Lipton S.A.** (1996). Similarity of neuronal cell injury and death in AIDS dementia and focal cerebral ischemia: potential treatment with NMDA open-channel blockers and nitric oxide-related species. *Brain Pathol* **6**(4): 507-17.

**Lipton S.A., Gendelman H.E.** (1995). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **332**(14): 934-40.

**Lipton S.A., Sucher N.J., Kaiser P.K., Dreyer E.B.** (1991). Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron* **7**(1): 111-8.

**Lowry O.H., Passonneau J.V. Hasselberger F.X., Schulz D.W.** (1964). Effects of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem.* **239**:18-30.

**Lum J.J., Cohen O.J., Nie Z., Weaver J.G., Gomez T.S., Yao X.J., Lynch D., Pilon A.A., Hawley N., Kim J.E., Chen Z., Montpetit M., Sanchez-Dardon J., Cohen E., and Badley A.D.** (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* **111**:1547–1554.

**Macilwain C.** (1993). Aspirin on trial as HIV treatment. *Nature* **364**(6436): 369.

**Maes M.** (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **19**(1):11-38.

**Maes M.** (2001). The immunoregulatory effects of antidepressants. *Hum Psychopharmacol* **16**(1):95-103.

**Maes M., Song C., Lin A.H., Bonaccorso S., Kenis G., De Jongh R., Bosmans E., Scharpe S.** (1999). Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology* **20**(4):370-9.

**Magarinos A.M., Deslandes A., McEwen B.S.** (1999). Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* **371**(2-3): 113-22.

**Malhotra J., Gupta Y.K.** (1997). Effect of adenosine receptor modulation on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Br J Pharmacol* **120**(2): 282-8.

**Masliah E., Heaton R.K., Marcotte T.D., Ellis R.J., Wiley C.A., Mallory M., Achim C.L., McCutchan J.A., Nelson J.A., Atkinson J.H., Grant I.** (1997). Dendritic injury is a pathological substrate for human immunodeficiency virus-related cognitive disorders. HNRC Group. The HIV Neurobehavioral Research Center. *Ann Neurol* **42**(6): 963-72.

**Massa P.T., Wu C.** (1998). Increased inducible activation of NF-kappaB and responsive genes in astrocytes deficient in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Interferon Cytokine Res* **18**(7): 499-507.

**Matthews J.R., Botting C.H., Panico M., Morris H.R., Hay R.T.** (1996). Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2236-42.

**McArthur J.C., Hoover D.R., Bacellar H., Miller E.N., Cohen B.A., Becker J.T., Graham N.M., McArthur J.H., Selnes O.A., Jacobson L.P., et al.** (1993). Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology* **43**(11): 2245-52.

**McEwen B.S., Chattarji S.** (2004). Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur Neuropsychopharmacol* **14 Suppl 5**: S497-502.

**Mercurio, F., Manning, A.M.** (1999). NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:226-232.

**Meucci O., Fatatis A., Simen A.A., Bushell T.J., Gray P.W., Miller R.J.** (1998). Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24):14500-5.

**Meucci O., Fatatis A., Simen A.A., Miller R.J.** (2000). Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8075-80.

**Mihm S., Ennen J., Pessara U., Kurth R., Droge W.** (1991). Inhibition of HIV-1 replication and NF-kappa B activity by cysteine and cysteine derivatives. *AIDS* (**5**): 497-503.

**Minana M.D., Kosenko E., Marcaida G., Hermenegildo C., Montoliu C., Grisolia S., Felipo V.** (1997). Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide. *Cell Mol Neurobiol* **17**(4):433-45.

**Miyake T., Kitamura T.** (1992). Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells. *Brain Res.* **586**(1):53-60.

**Moldeus P., Cotgreave I.A.** (1994). N-acetylcysteine. *Methods enzymol.* **234**:482-492.

**Mollace V., Colasanti M., Muscoli C., Lauro G.M., Iannone M., Rotiroti D., Nistico G.** (1998). The effect of nitric oxide on cytokine-induced release of PGE2 by human cultured astroglial cells. *Br J Pharmacol* **124**(4): 742-6.

**Mollace V., Colasanti M., Persichini T., Bagetta G., Lauro G.M., Nisticò G.** (1993). HIV gp120 glycoprotein stimulates the inducible isoform of no synthase in human cultured astrocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **194**(1):439-45.

**Mollace V., Colasanti M., Rodino P., Lauro G.M., Nisticò G.** (1994). HIV coating gp 120 glycoprotein-dependent prostaglandin E2 release by human cultured astrocytoma cells is regulated by nitric oxide formation. *Biochem Biophys Res Commun.* **203**(1):87-92.

**Mollace V., Nottet H., Clayette P., Turco M.C., Muscoli C., Salvemini D., Perno C.F.** (2001). Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *TRENDS in Neurosciences* **24**(7):411-6.

**Mollace V., Nistico G.** (1995). Release of nitric oxide from astroglial cells: a key mechanism in neuroimmune disorders. *Adv Neuroimmunol* **5**(4): 421-30.

**Mollace V., Salvemini D., Riley D.P., Muscoli C., Iannone M., Granato T., Masuelli L., Modesti A., Rotiroti D., Nistico R., Bertoli A., Perno C.F., Aquaro S.** (2002). The contribution of oxidative stress in apoptosis of human-cultured astroglial cells induced by supernatants of HIV-1-infected macrophages. *J Leukoc Biol* **71**(1): 65-72.

**Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.** (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142.

**Muscoli C., Salvemini D., Paolino D., Iannone M., Palma E., Cufari A., Rotiroti D., Perno C.F., Aquaro S., Mollace V.** (2002). Peroxynitrite decomposition catalyst prevents apoptotic cell death in a human astrocytoma cell line incubated with supernatants of HIV-infected macrophages. *BMC Neurosci* **3**:13.

**Muscoli C., Visalli V., Colica C., Nistico R., Palma E., Costa N., Rotiroti D., Nistico G., Mollace V.** (2005). The effect of inflammatory stimuli on NMDA-related activation of glutamine synthase in human cultured astroglial cells. *Neurosci Lett* **373**(3): 184-8.

**Nahas G.G., Desoize B., Leger C.** (1979). Effects of psychotropic drugs on DNA synthesis in cultured lymphocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* **160**(3):344-8.

**Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Yuan J., Moskowitz M.A.** (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* **18**(10): 3659-68.

**Nath A., Sacktor N.** (2006). Influence of highly active antiretroviral therapy on persistence of HIV in the central nervous system. *Curr Opin Neurol* **19**(4): 358-61.

**Navia B.A., Dafni U., Simpson D., Tucker T., Singer E., McArthur J.C., Yiannoutsos C., Zaborski L., Lipton S.A.** (1998). A phase I/II trial of nimodipine for HIV-related neurologic complications. *Neurology* **51**(1): 221-8.

**Navia B.A., Jordan B.D., Price R.W.** (1986). The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol* **19**(6):517-24.

**New D.R., Maggirwar S.B., Epstein L.G., Dewhurst S., Gelbard H.A.** (1998). HIV-1 Tat induces neuronal death via tumor necrosis factor-alpha and activation of non-N-methyl-D-aspartate receptors by a NFkappaB-independent mechanism. *J Biol Chem* **273**(28):17852-8.

**Norenberg M.D.** (1976). Histochemical studies in experimental portal-systemic encephalopathy. *Arch Neurol.* **33**(4):265-9.

**Norenberg M.D., Neary J.T., Bender A.S., Dombro R.S.** (1992). Hepatic encephalopathy: a disorder in glial-neuronal communication. *Prog Brain Res.* **94**:261-9.

**Nottet H.S., Bar D.R., van Hassel H., Verhoef J., Boven L.A.** (1997). Cellular aspects of HIV-1 infection of macrophages leading to neuronal dysfunction in in vitro models for HIV-1 encephalitis. *J Leukoc Biol* **62**(1):107-16.

**Nottet H.S., Gendelman H.E.** (1995). Unraveling the neuroimmune mechanisms for the HIV-1-associated cognitive/motor complex. *Immunol Today* **16**(9): 441-8.

**Nottet H.S., Persidsky Y., Sasseville V.G., Nukuna A.N., Bock P., Zhai Q.H., Sharer L.R., McComb R.D., Swindells S., Soderland C., Gendelman H.E.** (1996). Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. *J Immunol* **156**(3):1284-95.

**Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**(2):351-8.

**Ohta K., Araki N., Shibata M., Hamada J., Komatsumoto S., Shimazu K., Fukuuchi Y.** (1996). Correlation of in vivo nitric oxide and cGMP with glutamate/glutamine metabolism in the rat striatum. *Neurosci Res.* **25**(4):379-84.

**Oka S., Kamata H., Kamata K., Yagisawa H., Hirata H.** (2000). N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- $\kappa$ B activation through inhibition of I $\kappa$ B kinases. *FEBS Letters.* **472**:196-202.

**Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J., Carney J.M., Floyd R.A.** (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(13):5144-7.

**O'Neill L.A., Kaltschmidt C.** (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **20**(6): 252-8.

**Pace G.W., Leaf C.D.** (1995). The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:523-528.

**Patel C.A., Mukhtar M., Pomerantz R.J.** (2000). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis in human neuronal cells. *J Virol* **74**(20): 9717-26.

**Pattarini R., Pittaluga A., Raiteri M.** (1998). The human immunodeficiency virus-1 envelope protein gp120 binds through its V3 sequence to the glycine site of N-methyl-D-aspartate receptors mediating noradrenaline release in the hippocampus. *Neuroscience* **87**(1): 147-57.

**Peng H.B., Libby P., Liao J.K.** (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* **270**(23):14214-9.

**Petito C.K., Roberts B.** (1995). Evidence of apoptotic cell death in HIV encephalitis. *Am J Pathol* **146**(5):1121-30.



**Petito C.K., Roberts B., Cantando J.D., Rabinstein A., Duncan R.** (2001). Hippocampal injury and alterations in neuronal chemokine co-receptor expression in patients with AIDS. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(4):377-85.

**Picado C.** (2002). Aspirin-intolerant asthma: role of cyclo-oxygenase enzymes. *Allergy* **57 Suppl 72**:58-60.

**Pietarinen-Runtti P., Lakari E., Raivio K.O., Kinnula V.L.** (2000). Expression of antioxidant enzymes in human cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **278**:118-125.

**Pittaluga A., Pattarini R., Severi P., Raiteri M.** (1996). Human brain N-methyl-D-aspartate receptors regulating noradrenaline release are positively modulated by HIV-1 coat protein gp120. *Aids* **10**(5): 463-8.

**Plaisant F., Dommergues M.A., Spedding M., Cecchelli R., Brillault J., Kato G., Munoz C., Gressens P.** (2003). Neuroprotective properties of tianeptine: interactions with cytokines. *Neuropharmacology* **44**(6): 801-9.

**Platzer C., Döcke W., Volk H., Prösch S.** (2000). Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol.* **105**(1):31-8.

**Premanathan M., Nakashima H., Igarashi R., Mizushima Y., Yamada K.** (1997). Lecithinized superoxide dismutase: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Mar 1;**13**(4):283-90.

**Price R.W.** (1996). Neurological complications of HIV infection. *Lancet* **348**(9025):445-52.

**Price R.W., Brew B., Sidtis J., Rosenblum M., Scheck A.C., Cleary P.** (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* **239**:586-592.

**Quan N., He L., Lai W., Shen T., Herkenham M.** (2000). Induction of IkappaBalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. *J Neurosci* **20**(17):6473-7.

**Ramamoorthy S., Ramamoorthy J.D., Prasad P.D., Bhat G.K., Mahesh V.B., Leibach F.H., Ganapathy V.** (1995). Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. *Biochem Biophys Res Commun.* **216**(2):560-7.

**Reagan L.P., Hendry R.M., Reznikov L.R., Piroli G.G., Wood G.E., McEwen B.S., Grillo C.A.** (2007). Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* **565**(1-3):68-75.

**Reagan L.P., Rosell D.R., Wood G.E., Spedding M., Muñoz C., Rothstein J., McEwen B.S.** (2004). Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(7):2179-84.

**Rocher C., Spedding M., Munoz C., Jay T.M.** (2004). Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex* **14**(2): 224-9.

**Roederer M., Staal F.J., Raju P.A., Ela S.W., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A.** (1990). Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 4884-4888.

**Roggero R., Robert-Hebmann V., Harrington S., Roland J., Verne L., Jaleco S., Devaux C., Biard-Piechaczyk M.** (2001). Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J. Virol.* **75**: 7637–7650.

**Romero-Alvira D., Roche E.** (1998). The keys of oxidative stress in acquired immune deficiency syndrome apoptosis. *Med Hypotheses.* **51**(2):169-73.

**Rostworowski M., Balasingam V., Chabot S., Owens T., Yong V.W.** (1997). Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci* **17**(10): 3664-74.

**Rothwarf D. M., Karin M.** (1999). The NF- $\kappa$ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE* 1999 (5):RE1.

**Rothwell N., Allan S., Toulmond S.** (1997). The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest.* **100**(11):2648-52.

**Roulston A., Lin R., Beauparlant P., Wainberg M.A., Hiscott J.** (1995). *Microbiol. Rev.* **59**: 481-505.

**Russo R., Siviglia E., Gliozzi M., Amantea D., Paoletti A., Berliocchi L., Bagetta G., Corasaniti M.T.** (2007). Evidence implicating matrix metalloproteinases in the mechanism underlying accumulation of IL-1 $\beta$  and neuronal apoptosis in the neocortex of HIV/gp120-exposed rats. *Int Rev Neurobiol.* **82**:407-21.

**Sacktor N.** (2002). The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol* **8 Suppl 2**: 115-21.

**Sacktor N., Schifitto G., McDermott M.P., Marder K., McArthur J.C., Kieburtz K.** (2000). Transdermal selegiline in HIV-associated cognitive impairment: pilot, placebo-controlled study. *Neurology* **54**(1): 233-5.

**Salvemini D., Wang Z.Q., Zweier J.L., Samouilov A., Macarthur H., misko T.P., Currie M.G., Cuzzocrea S., Sikorski J.A., Riley D.P.** (1999). A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* **286** :304-306.

**Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R.** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**(5634): 805-9.

**Schifitto G., Sacktor N., Marder K., McDermott M.P., McArthur J.C., Kieburtz K., Small S., Epstein L.G.** (1999). Randomized trial of the platelet-activating factor antagonist lexipafant in HIV-associated cognitive impairment. Neurological AIDS Research Consortium. *Neurology* **53**(2): 391-6.

**Schmidtmayerova H., Nottet H.S., Nuovo G., Raabe T., Flanagan C.R., Dubrovsky L., Gendelman H.E., Cerami A., Bukrinsky M., Sherry B.** (1996). Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 700-4.

**Schreck R., Riber P., Baeuerle P.A.** (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**: 2247-2258.

**Selmaj K.W., Farooq M., Norton W.T., Raine C.S., Brosnan C.F.** (1990). Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* **144**(1):129-35.

**Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F.R., Krahn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S.C., Karin M.** (2001). Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF-Kb signaling pathway. *Science* **293**:1495–1499.

**Shi B., De Girolami U., He J., Wang S., Lorenzo A., Busciglio J., Gabuzda D.** (1996). Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *J Clin Invest* **98**(9):1979-90.

**Silva C., Zhang K., Tsutsui S., Holden J.K., Gill M.J., Power C.** (2003). Growth hormone prevents human immunodeficiency virus-induced neuronal p53 expression. *Ann. Neurol.* **54**: 605–614.

**Smith S.L., Sadler C.J., Dodd C.C., Edwards G., Ward S.A., Park B.K., McLean W.G.** (2001). The role of glutathione in the neurotoxicity of artemisinin derivatives in vitro (2). *Biochem. Pharmacol.* **61** (4): 409-416.

**Soliven B., Albert J.** (1992). Tumor necrosis factor modulates Ca<sup>2+</sup> currents in cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* **12**(7): 2665-71.

**Somma F., Tuosto L., Montani M.S., Di Somma M.M., Cundari E. Piccolella E.** (2000). Engagement of CD4 before TCR triggering regulates both Bax- and Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **164**: 5078–5087.

**Spada C., Treitinger A., Reis M., Masokawa I.Y., Verdi J.C., Luiz M.C., Silveira M.V., Michelon C.M., Avila-Junior S., Gil D.O., Ostrowski S.** (2002). The effect of N-acetylcysteine supplementation upon viral load, CD4, CD8, total lymphocytes count and hematocrit in individuals undergoing antiretroviral treatment. *Clin. Chem. Lab Med.* **40**: 452-455.

**Spedding M., Lestage P.** (2005). Synaptic plasticity and neuropathology: new approaches in drug discovery. *Med Sci (Paris)* **21**(1):104-9.

**Staal F.J., Roederer M., Raju P.A., Anderson M.T., Ela S.W., Herzenberg L.A., Herzenberg LA.** (1993). Antioxidant inhibit stimulation of HIV transcription. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (9):299-306.

**Steffens C.M., Hope T.J.** (2001). Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *Aids* **15 Suppl 5**: S21-6.

**Stennicke H.R., Salvesen G.S.** (2000). Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 299-306.

**Svenningsson P., Bateup H., Qi H., Takamiya K., Huganir R.L., Spedding M., Roth B.L., McEwen B.S., Greengard P.** (2007). Involvement of AMPA receptor phosphorylation in antidepressant actions with special reference to tianeptine. *Eur J Neurosci* **26**(12): 3509-17.

**Tansey F.A., Farroq M., Cammer W.** (1991). Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem.* **56**(1):266-72.

**Tardieu M.** (1999). HIV-1-related central nervous system disease. *Curr. Opin. Neurol.* **12**: 377-381.

**Tayfun Uzbay I., Oglesby M.W.** (2001). Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav Rev* **25**(1): 43-52.

**Togashi H., Sasaki M., Frohman E., Taira E., Ratan R.R., Dawson T.M., Dawson V.L.** (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2676-80.

**Toggas S.M., Masliah E., Rockenstein E.M., Rall G.F., Abraham C.R., Mucke L.** (1994). Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature* **367**(6459): 188-93.

**Trillo-Pazos G., McFarlane-Abdulla E., Campbell I.C., Pilkington G.J., Everall I.P.** (2000). Recombinant nef HIV-III B protein is toxic to human neurons in culture. *Brain Res* **864**(2): 315-26.

**Tuor U.I., Chumas P.D., Del Bigio M.R.** (1995). Prevention of hypoxic-ischemic damage with dexamethasone is dependent on age and not influenced by fasting. *Exp Neurol* **132**(1): 116-22.

**Tuor U.I., Del Bigio M.R.** (1996). Protection against hypoxic-ischemic damage with corticosterone and dexamethasone: inhibition of effect by a glucocorticoid antagonist RU38486. *Brain Res* **743**(1-2): 258-62.

**Tuor U. I., Del Bigio M. R., Chumas P.D.** (1996). Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **8**:159-193.

**Tuosto L., Piazza C., Moretti S., Modesti A., Greenlaw R., Lombardi G., Piccolella E.** (1995). Ligation of either CD2 or CD28 rescues CD4+ T cells from HIV-gp120-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2917–2922.

**Tuosto L., Marinari A and Piccolella E** (2002). CD4-Lck through TCR and in the absence of Vav exchange factor induces Bax increase and mitochondrial damage. *J. Immunol.* **168**: 6106–6112.

**Twu C., Liu N.Q., Popik W., Bukrinsky M., Sayre J., Roberts J., Rania S., Bramhandam V., Roos K.P., MacLellan WRFiala M.,** (2002). Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptor-controlled pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:14386–14391.

**Uzbay I.T., Celik T., Aydin A., Kayir H., Tokgoz S., Bilgi C.** (2004). Effects of chronic ethanol administration and ethanol withdrawal on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) levels in the rat brain. *Drug Alcohol Depend* **74**(1):55-9.

**Uzbay T.I.** (2008). Tianeptine: potential influences on neuroplasticity and novel pharmacological effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**(4): 915-24.

**Uzbay T.I., Kayir H., Ceyhan M.** (2007). Effects of tianeptine on onset time of pentylenetetrazole-induced seizures in mice: possible role of adenosine A1 receptors. *Neuropsychopharmacology* **32**(2):412-6.

**Van Antwerp D.J., Martin S.J., Verma I.M., Green D.R.** (1998). Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* **8**(3):107-11.

**Vazeux R., Brousse N., Jarry A., Henin D., Marche C., Vedrenne C., Mikol J., Wolff M., Michon C., Rozenbaum W.** (1987). AIDS subacute encephalitis. Identification of HIV-infected cells. *Am J Pathol* **126**(3): 403-10.

**Vlahakis S.R., Villasis-Keever A., Gomez T.S., Bren G.D. Paya C.V.** (2003). Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human hepatocytes via CXCR4. *J. Infect. Dis.* **188**:1455–1460.

**Wang W.K., Chen M.Y., Chuang C.Y., Jeang K.T., Huang L.M.** (2000). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect* **33**(3):131-40.

**Warner T.D., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell J.A., Vane J.R.** (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7563-8.

**Wegener G., Volke V., Harvey B.H., Rosenberg R.** (2003). Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res* **959**(1):128-34.

**Weil R., Laurent-Winter C., Israel A.** (1997). Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* **272**:9942-9949.

**Wengenack T.M., Curran G.L., Poduslo J.F.** (1997). Postischemic, systemic administration of polyamine-modified superoxide dismutase reduces hippocampal CA1 neurodegeneration in rat global cerebral ischemia. *Brain Res.* **754**(1-2):46-54.

**Werner S.L., Barken D., Hoffmann A.** (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* **309**: 1857–1861.

**Wesselingh S.L., Power C., Glass J.D., Tyor W.R., McArthur J.C., Farber J.M., Griffin J.W., Griffin D.E.** (1993). Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann Neurol* **33**(6): 576-82.

**Whelton A.** (1999). Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *Am J Med* **106**(5B): 13S-24S.



**Wiley C.A., Achim C.** (1994). Human immunodeficiency virus encephalitis is the pathological correlate of dementia in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* **36**(4): 673-6.

**Wiley C.A., Schrier R.D., Nelson J.A., Lampert P.W., Oldstone M.B.** (1986). Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18):7089-93.

**Wiley C.A., Soontornniyomkij V., Radhakrishnan L., Masliah E., Mellors J., Hermann S.A., Dailey P., Achim C.L.** (1998). Distribution of brain HIV load in AIDS. *Brain Pathol* **8**(2):277-84.

**Xiong H., Zeng Y.C., Lewis T., Zheng J., Persidsky Y., Gendelman H.E.** (2000). HIV-1-infected mononuclear phagocyte secretory products affect neuronal physiology leading to cellular demise: relevance for HIV-1 associated dementia. *J. neurovirol.* **6**: S14-23.

**Yamamoto H., Konno H., Yamamoto T., Ito K., Mizugaki M., Iwasaki Y.** (1987). Glutamine synthetase of the human brain: purification and characterization. *J Neurochem* **49**(2):603-9.

**Yan C.Y, Ferrari G., Greene L.A.** (1995). N-acetylcysteine- promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J. Biol. Chem.* **270**:26827-26832.

**Yan C., Greene L.A.** (1998). Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the ras pathway. *J. Neurosci* **18**:4042-4049.

**Yano S., Yano N., Rodriguez N., Baek J.H., Que X., Yamamura Y., Kim S.J.** (1998). Suppression of intracellular hydrogen peroxide generation and catalase levels in CD8+ T-lymphocytes from HIV+ individuals. *Free Radic. Biol. Med.* **24**(2):349-359.

**Yeung M.C., Pulliam L., Lau A.S.** (1995). The HIV envelope protein gp120 is toxic to human brain-cell cultures through the induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Aids* **9**(2):137-43.

**Yin M.J., Yamamoto Y., Gaynor R.B.** (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**(6706):77-80.

**Yirmiya R., Pollak Y., Barak O., Avitsur R., Ovadia H., Bette M., Weihe E., Weidenfeld J.** (2001). Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology* **24**(5):531-44.

**Young M.R., Matthews J.P.** (1995). Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function. *Immunology* **84**(1):148-52.

**Zheng J., Gendelman H.E.** (1997). The HIV-1 associated dementia complex: a metabolic encephalopathy fueled by viral replication in mononuclear phagocytes. *Curr Opin Neurol* **10**(4):319-25.

**Zheng J., Thylin M.R., Ghorpade A., Xiong H., Persidsky Y., Cotter R., Niemann D., Che M., Zeng Y.C., Gelbard H.A., Shepard R.B., Swartz J.M., Gendelman H.E.** (1999). Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmunol* **98**(2):185-200.

**Zhivotovsky B., Kroemer G.** (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**:752-7.

**Zupi G., Candiloro A., Laudonio N., Carapella C., Benassi M., Riccio A., Bellocchi M., Greco C.** (1988). Establishment, characterization and chemosensitivity of two human glioma derived cell lines. *J Neurooncol.* **6**(2):169-77.

## Produzione scientifica

### COMUNICAZIONI A CONGRESSI

- 1 **Valeria Visalli**, Carolina Muscoli, Iolanda Sacco, Francesca Sculco, Fabiola Scarpino, Ernesto Palma, Nicola Costa, Domenicantonio Rotiroti and Vincenzo Mollace. N-acethylcysteine prevents HIV-related apoptotic cell death of human cultured astrocytes: role of glutamine synthase. IX Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine: Neuroinflammation in neuronal cell death and repair. Porto Pirog Hotel. Parghelia (VV). Calabria. Italy. 13-16/09/06.
- 2 **Valeria Visalli**, Carolina Muscoli, Iolanda Sacco, Antonella Sgura, Caterina Tanzarella, Domenicantonio Rotiroti, Stefano Acquaro and Vincenzo Mollace. Role of oxidative stress on gp120-induced inhibition of glutamine synthase in astroglial cells. Federazione Italiana Scienze della Vita. 28 settembre-1 ottobre 2006. Riva del Garda (TN), Italia.
- 3 Iolanda Sacco, Ernesto Palma, Francesca Sculco, Carmela Colica, **Valeria Visalli**, Saverio Muscoli, Salvatore Ragusa, Luigi Mondello, Francesco Romeo, Domenicantonio Rotiroti and Vincenzo Mollace. The protective effect of bergamot oil non volatile fraction on LOX-1 expression in balloon injury-related neointima formation. 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Cagliari 6-9 Giugno 2007.
- 4 Francesca Sculco, Carolina Muscoli, Ernesto Palma, Iolanda Sacco, **Valeria Visalli**, Nicola Costa, Domenicantonio Rotiroti, Francesco Romeo and Vincenzo Mollace. Apoptotic cell death in doxorubicin-induced cardiomyopathy: role of peroxynitrite and LOX-1 receptor modulation. 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Cagliari 6-9 Giugno 2007.
- 5 Francesca Sculco, Saverio Muscoli, Iolanda Sacco, **Valeria Visalli**, Carolina Muscoli, Laura Pontecorvo, Iside Scarfò, Domenico Sergi, Francesco Romeo and Vincenzo Mollace. Apoptotic cell death in doxorubicin-induced cardiomyopathy: role of peroxynitrite and LOX-1 receptor modulation. 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cardiologia. Roma, 16/10/07.

- 6   Domenica Ventrice, Carolina Muscoli, Iolanda Sacco, **Valeria Visalli**, Emanuele Vizza, Michelangelo Iannone, Antonio Scalzo, Elzbieta Janda and Vincenzo Mollace. HPLC determination of oxidative stress's markers to describe the protective effect of olive oil on morphine tolerance. XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine. Porto Pirogus Hotel. Parghelia (VV). Calabria. Italy. 20-22/05/09.
  
- 7   Elzbieta Janda, **Valeria Visalli**, Iolanda Sacco, Carolina Muscoli, Carmela Colica, Serafina Aprigliano, Alessia Maretta, Nuria Vadalà, Francesca Sculco, Ernesto Palma, Domenica Ventrice, Domenicantonio Rotiroti, Michael Spedding and Vincenzo Mollace. The effect of tianeptine on gp120-induced apoptosis in astroglial cells: role in repression of NFkB signaling and nitric oxide synthase(s) modulation. XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine. Porto Pirogus Hotel. Parghelia (VV). Calabria. Italy. 20-22/05/09.

## PUBBLICAZIONI

- 1   Carolina Muscoli, **Valeria Visalli**, Carmen Colica, Robert Nisticò, Ernesto Palma, Nicola Costa, Domenicantonio Rotiroti, Giuseppe Nisticò and Vincenzo Mollace, (2005). The effect of inflammatory stimuli on NMDA-related activation of glutamine synthase in human cultured astroglial cells. *Neurosci Lett.* 373(3):184-188.
  
- 2   **Valeria Visalli**, Carolina Muscoli, Iolanda Sacco, Francesca Sculco, Ernesto Palma, Nicola Costa, Carmela Colica, Domenicantonio Rotiroti and Vincenzo Mollace, (2007). N-acetylcysteine prevents HIV gp 120-related damage of human cultured astrocytes: correlation with glutamine synthase dysfunction. *BMC Neuroscience* 8:106.
  
- 3   Vincenzo Mollace, Salvatore Ragusa, Iolanda Sacco, Carolina Muscoli, Francesca Sculco, **Valeria Visalli**, Ernesto Palma, Luigi Mondello, Paola Dugo, Domenicantonio Rotiroti and Francesco Romeo, (2008). The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxyLDL receptor-1 expression in balloon injury-related neointima formation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 13(2):120-9.

## **Ringraziamenti**

*Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Giacinto Bagetta per avermi concesso l'opportunità di vivere un'esperienza che mi ha formato, maturato ed arricchito, nonché per la comprensione e la disponibilità sempre dimostratemi;*

*desidero ringraziare il Prof. Ernesto Palma per il costante supporto scientifico e morale;*

*desidero ringraziare la Dott.ssa Elzbieta Janda per il contributo nella stesura della presente tesi ed i preziosi insegnamenti;*

*un ringraziamento particolare a Dina, con cui condivido giornalmente ansie e gioie, collega di tante vicissitudini ed amica sempre presente con il suo sincero affetto;*

*infine, un “grazie” speciale alla persona cui è dedicata la presente tesi:*

*a Lui devo gran parte di ciò che conosco, di ciò che ho e di ciò che sono.*