



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

Scuola di Dottorato

“Life Sciences”

Indirizzo

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

CICLO

XXVI

**Interazione tra Catestatina e fibre Orexinergiche/NMDAergiche
in condizioni simil-ischemiche nel criceto ibernante**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/06

Direttore: Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Firma

Supervisore: Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Firma

Dottorando: Dott.ssa Maria Mele

Firma

INDICE

<u>RIASSUNTO</u>	2
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>INTRODUZIONE</u>	6

CAPITOLO I

1. Approcci scientifici per lo studio dell'ischemia	10
1.1 L'ischemia cerebrale	10
1.1.1 Insorgenza dell'ischemia	12
1.1.2 Fattori di rischio per lo sviluppo dell'ischemia	14
1.1.3 Meccanismi molecolari del processo ischemico.....	17
1.2 Modelli <i>in vivo</i> che consentono di simulare condizioni simil-ischemiche.....	21
1.2.1 Modelli d'ischemia globale	21
1.2.2 Modelli d'ischemia focale	22
1.2.3 Animali ibernanti	23
1.2.4 Ibernazione.....	24
1.2.4.1 Torpore e risveglio: aspetti molecolari e attività cardiovascolare..	26
1.3 Modelli <i>in vitro</i> che consentono di simulare condizioni simil-ischemiche.....	27

CAPITOLO II

2. Sistemi recettoriali implicati nella patogenesi ischemica.....	30
2.1 Principali neuromediatrici coinvolti nel controllo cardiovascolare	30
2.2 Il sistema recettoriale NMDA.....	32
2.2.1 NMDARs e ischemia cerebrale	35
2.3 Il sistema orexinergico	36
2.3.1 Neuropeptidi orexinergici.....	38
2.3.2 Recettori per le orexine	40

2.3.3	Meccanismo d'azione dei recettori orexinergici	43
2.3.4	Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori nel SNC.....	45
2.3.5	Effetti delle orexine sull'ischemia cerebrale.....	46
2.3.6	Orexine: controllo dell'appetito, della sete e delle dipendenze.....	48
2.3.7	Orexine e pressione arteriosa	49
2.3.8	Orexine e ciclo sonno-veglia.....	50
2.3.9	Orexine e asse ipotalamo-ipofisaria	51
2.4	Le cromogranine.....	52
2.4.1	Cromogranina A: struttura del gene e della proteina.....	53
2.4.2	Funzioni della cromogranina A e dei peptidi derivati	54
2.4.3	La catestatina	56
2.4.4	Controllo cardiovascolare esercitato dalla catestatina	57
2.5	Aree cerebrali implicate nel controllo della pressione arteriosa.....	59
2.6	Aree cerebrali implicate nel controllo dell'ibernazione.....	62
2.7	Aree cerebrali implicate nel controllo del feeding.....	64
2.8	Ipotalamo: anatomia e funzioni	67
2.8.1	Nucleo periventricolare ipotalamico.....	70
2.9	Ippocampo: anatomia e funzioni.....	72
2.10	HIP e HTH: suscettibilità e danni ischemici	74
2.10.1	Importanza di preservare questi centri nervosi	75

CAPITOLO III

3.	Materiali e metodi.....	77
----	-------------------------	----

I^a PARTE

3.1.1	Modello sperimentale	77
3.1.2	Tecnica stereotassica e trattamenti farmacologici.....	81
3.1.3	Comportamento dei criceti durante l'ibernazione	83

3.1.4 Ibridazione <i>in situ</i> non radioattiva (ISH) del recettore ORX2.....	84
3.1.5 Analisi neurodegenerativa mediante <i>Amino Cupric Stain</i> (ACS)	88
3.1.4 Analisi statistica	89

II^a PARTE

3.2.1 Colture cellulari HIP e HTH	90
3.2.2 Dissezione HIP e HTH	90
3.2.3 Protocollo d'isolamento e messa in coltura delle cellule	91
3.2.3.1 Simulazione dell'ischemia <i>in vitro</i>	92
3.2.3.2 Trattamenti <i>in vitro</i>	93
3.2.3.3 Allestimento di co-culture HIP-HTH	93
3.2.4 Caratteristiche delle membrane.....	94
3.2.5 ISH in coltura.....	95
3.2.6 Analisi morfologica delle colture cellulari: osservazioni al confocale	98
3.2.7 Analisi morfologica delle colture cellulari: osservazioni al SEM.....	99
3.2.8 Analisi statistica	100

RISULTATI

I^a PARTE

4.1.1 Analisi comportamentale durante l'INGR e il RISV	102
4.1.2 Variazioni dell'espressione del ORX2R durante il ciclo d'ibernazione	104
4.1.3 Analisi neurodegenerativa durante il ciclo d'ibernazione	109

II^a PARTE

4.2.1 Espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ippocampali OGD e NOGD trattati con CST	112
4.2.2 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ippocampali OGD e NOGD, cresciuti in presenza di neuroni ipotalamici	113

4.2.3 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ipotalamici OGD e NOGD	114
4.2.4 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ipotalamici OGD e NOGD, cresciuti in presenza di neuroni ippocampali	117
4.2.5 Valutazione del rapporto NR2A/NR1.....	117
4.2.6 Effetti della CST sulla morfologia cellulare	118
<u>DISCUSSIONE</u>	123
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	133
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	159

*Al mio amore Luca
e ai miei figli Mattia & Samuele*

RIASSUNTO

L'ischemia cerebrale rappresenta la principale causa di mortalità e morbidità a livello mondiale, provocando spesso deficit motori e riducendo la qualità della vita. Ciò è dovuto al fatto che la carenza di ossigeno e glucosio causa gravi danni al Sistema Nervoso Centrale. Sono diversi i sistemi neuronali implicati nella patogenesi ischemica, tra questi rivestono particolare importanza quello orexinergico (ORXRs), i recettori N-metil-D-aspartato (NMDAR) e la catestatina (CST). Alla luce di quanto detto, l'obiettivo di questo lavoro è valutare gli effetti, sui sistemi recettoriali suddetti, causati dagli insulti ischemici sia attraverso un approccio *in vivo*, sia attraverso una simulazione dell'ischemia *in vitro*. Nel primo caso, criceti ibernati (*Mesocricetus auratus*) sono stati infusi con CST, ORX-A o ORX-A+CST, a livello del nucleo periventricolare ipotalamico, scelto per la sua implicazione nel controllo cardiovascolare, del feeding e del ciclo sonno/veglia, dopodiché è stata correlata l'espressione del ORX2R e dei vari parametri del feeding. Dai risultati è emerso che la CST determina un effetto anoressigenico attraverso la down-regulation del ORX2R soprattutto nei nuclei implicati nel controllo del feeding, mentre l'ORX-A causa l'effetto opposto. Nella seconda parte la condizione ischemica è stata simulata attraverso la deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) in cellule ippocampali (HIP) e ipotalamiche (HTH), con successiva valutazione degli effetti trascrizionali indotti dalla CST. Sorprendentemente, i due tipi cellulari rispondono in modo diverso all'insulto ischemico quando posti insieme in coltura, rispetto alle cellule cresciute separatamente. Infatti, l'aggiunta della CST in HIP OGD causa una down-regulation della subunità NMDAergica NR2A e un up-regulation di NR1 e ORX1R, recettore quest'ultimo, che invece è ampiamente espresso in presenza di cellule HTH. In quest'ultima, invece, la CST provoca la down-regulation di tutti i fattori analizzati, ma tale trend viene completamente invertito in presenza di cellule HIP. In conclusione dai risultati ottenuti sembra che la CST sia in grado di determinare variazioni dell'espressione NMDAergica e ORXergica, e ciò potrebbe proporre nuovi scenari per il ruolo neuronale di tali recettori e della CST nella patogenesi ischemica.

ABSTRACT

Cerebral ischemia is a major cause of morbidity and mortality in the world, often causing motor deficits that greatly reduce the quality of life. This depends on the fact that the cerebral depletion of oxygen and glucose causes serious impairments of the Central Nervous System. Several factors are directly involved with the neuronal responses during ischemic episodes, among which the orexinergic system (ORXRs), the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) and catestatin (CST). In this work, it was our intention to evaluate the effects caused by the ischemic insults through both an *in vivo* approach and an *in vitro* simulation of ischemia. In the first case the periventricular hypothalamic nucleus of hibernating hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infused with CST and ORX-A alone or in combination. The selection of this nucleus was based on it being a key site for cardiovascular, feeding and sleep/wake cycle control and so it was my aim to evaluate the various feeding parameters together with ORX2R expression variations. Interestingly, CST exhibits an anorexigenic role via the down-regulation of ORX2R above all in the feeding nucleus, while ORX-A causes the opposite effects. In the second part, ischemic conditions were simulate by depriving hippocampal (HIP) and hypothalamic (HTH) cells of oxygen and glucose (OGD) and afterwards assessing the transcriptional effects of CST on them. Surprisely, the two cell types responded differently to ischemic insults when kept together in culture, with respect to cells cultured separately. Indeed, the addition of CST in HIP OGD cells appeared to account for a down-regulation of NR2A and an up-regulation of NR1 plus ORX1R, which in the case of this latter situation seemed to be greatly increased in the presence of HTH cells. In HTH cells, CST was responsible for a down-regulation of all factors, but when they were cultured in the presence of HIP cells this trend was inverted. Overall from these results it appeared that CST was able to modulate the expression of NMDAergic and ORXergic receptor systems, and these results tend to propose new scenarios for the neuronal role of such receptor systems together with CST in ischemic disorders.

INTRODUZIONE

È ormai noto che una riduzione parziale o totale del flusso ematico nel cervello, anche per breve tempo, è causa d'ischemia cerebrale. Infatti, i neuroni, essendo privi di riserve energetiche, dipendono totalmente dal flusso ematico cerebrale per il rifornimento di glucosio (Khatri & Man, 2013). La mancanza di tale fattore e di ossigeno nel tessuto cerebrale può essere causata da alterazioni cardio-vascolari, traumatiche o derivanti da altre patologie, e determina cambiamenti nel metabolismo cellulare che provocano fenomeni di eccitotossicità, stress ossidativo, danno mitocondriale e neurodegenerazione (Canonaco et al., 2005; Deb et al., 2010). Sono diversi i sistemi recettoriali implicati nella patogenesi ischemica e tra questi rivestono particolare importanza i recettori N-metil-D-aspartato (NMDARs), il sistema orexinergico (ORXergico) e la catestatina (CST). I NMDARs mediano la trasmissione eccitatoria del Sistema Nervoso Centrale e, oltre a svolgere un ruolo cruciale nella regolazione della pressione arteriosa, sono essenziali per la crescita neuronale. Il sottotipo recettoriale più diffuso, soprattutto nelle aree cerebrali critiche per il controllo emodinamico, è il tetramero NR1-NR2A (Furukawa et al., 2005; Vyklicky et al., 2014). L'eccessiva attivazione, tuttavia, induce eccitotossicità, provocando morte cellulare e contribuendo alla neurodegenerazione che si osserva nei disordini ischemici (Di Vito et al., 2014). Dai diversi lavori è emerso che il sistema ORXergico è implicato nel controllo di varie funzioni, tra cui quelle metaboliche, circadiane, della locomozione e dell'omeostasi cardiovascolare (Yamamoto et al., 2002; Marston et al., 2008; Sakurai et al., 2010; Li et al., 2014). Questo sistema neuronale consta di 2 neuropeptidi, l'orexina A e l'orexina B (ORX-A, -B), prodotte dal clivaggio proteolitico della prepro-orexina, che legano 2 recettori accoppiati a proteine G, il recettore 1 e il 2 (ORX1-2R; Sakurai et al., 1998). Infine, la CST è un piccolo peptide idrofobico che si forma dal taglio proteolitico della cromogranina A e riveste un ruolo fondamentale nel controllo nervoso dell'attività cardiovascolare (Mahata et al., 1997, 2010).

Allo scopo di valutare gli effetti trascrizionali della CST sui suddetti sistemi recettoriali durante l'insulto ischemico, tale studio è stato condotto sia su un modello *in vivo*,

qual è il roditore ibernante *Mesocricetus auratus*, che su uno *in vitro*. La scelta del criceto ibernante quale modello sperimentale è legata alla capacità di tale animale di entrare facoltativamente in un vero e proprio ciclo d'ibernazione, che presenta caratteristiche simil-ischemiche in cui si alternano fasi ipo- e ipertensive, senza riportare alterazioni morfo-funzionali (Drew et al., 2007). Pertanto, l'ibernazione si traduce in uno specifico stato fisiologico che mettendo "a riposo" i processi biologici vitali consente di proteggere il cervello dagli insulti ischemici (Mele et al., 2014). È importante sottolineare che l'utilizzo di entrambi gli approcci ci consente di valutare, nel primo caso, gli effetti del peptide neuroattivo CST in presenza dei vari fattori trofici che normalmente operano durante l'intero ciclo dell'ibernazione, mentre l'allestimento di un sistema *in vitro* ci permette di studiare solo gli elementi specifici che intervengono nei pathways ORXergico e NMDAergico.

In base a quanto finora detto, nella prima parte di questo lavoro, dopo l'incannulazione del nucleo periventricolare ipotalamico, scelto per la sua implicazione nel feeding, nel risveglio e nel controllo cardiovascolare, gli animali sono stati portati negli stati di ingresso (INGR), torpore (TORP) o risveglio (RISV), dopodiché si è proceduto all'infusione con ORX-A, o CST o ORX-A+CST. Nelle fasi d'INGR e RISV sono stati valutati l'assunzione di cibo e di acqua, il movimento nella gabbia e le variazioni di peso corporeo; quest'ultimo parametro è stato preso in considerazione anche per lo stato di TORP. Successivamente è stata quantificata, mediante ibridazione *in situ*, l'espressione del mRNA codificante per l'ORX2R al fine di verificare se l'encefalo avesse attuato fenomeni plastici di adattamento in seguito ai trattamenti effettuati. La scelta di valutare l'espressione dell'ORX2R, piuttosto che dell'ORX1R, scaturisce dal fatto che il primo è coinvolto, più dell'altro, nel controllo del ciclo sonno-veglia, del dispendio energetico e dell'attività locomotoria (Mele et al., 2014). Si è proceduto, infine, tramite Amino Cupric Silver Stain, alla valutazione dell'entità di neurodegenerazione durante le diverse fasi del ciclo d'ibernazione.

Per quanto concerne lo studio *in vitro*, essendo la severità della patologia ischemica non uniformemente distribuita nelle varie aree cerebrali, si è scelto di utilizzare l'ippocampo (HIP), in quanto una delle sedi maggiormente suscettibili al danno ischemico (Benfenati, 2007), e l'ipotalamo (HTH) che invece appare più resistente (Makarchenko, 1968). Esso, infatti, oltre a secernere sostanze con effetti neuroprotettivi come ORXs, grelina, neuropeptide Y, galanina e BDNF (Beck & Pourie, 2013; Mele et al., 2014) recupera velocemente il potenziale di membrana dopo un insulto ischemico grazie alla presenza di un'isoforma più resistente della pompa Na^+/K^+ ATPasi (Brisson & Andrew, 2012). Per questa parte, la simulazione dell'evento ischemico è stata fatta privando le cellule di ossigeno e glucosio (Zhang et al., 2007) e la possibilità di poter studiare *in vitro* le sole aree HIP e HTH consente di ottenere risultati privi d'interferenze derivanti da altri sistemi corporei (es. secrezione ormonale periferica). In particolare, l'allestimento di sistemi di coltura combinati (co-cultura) HIP-HTH, permette di valutare l'eventuale azione sinergica dei due tipi cellulari. L'analisi morfologica cellulare, infine, permette di definire il ruolo dei sistemi recettoriali analizzati sullo sviluppo neuronale in condizioni ischemiche.

Sulla base di tali premesse, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di stabilire se il peptide ipotensivo CST, più specifiche subunità NMDAergiche (NR1 e NR2A) e i recettori ORXergici esercitano un ruolo protettivo durante la patologia ischemica. La comprensione dei meccanismi molecolari implicati in tale processo, potrebbe fornire nuovi target molecolari utili per applicazioni terapeutiche nell'ambito dei disordini neurodegenerativi derivanti da alterazioni dell'omeostasi vascolare a livello cerebrale.

CAPITOLO I

Approcci scientifici per lo studio dell'Ischemia Cerebrale

Ad oggi, l'ischemia cerebrale risulta essere una patologia estremamente frequente che colpisce uomini e donne, e che può essere causata da alterazioni cardiovascolari, obesità o derivare da altre patologie (Sowers, 2003; Pujadas et al., 2008). L'importanza di comprendere i meccanismi alla base di tale processo, risiede nel fatto che la maggior parte dei pazienti colpiti manifesta effetti irreversibili, che nel peggiore dei casi rendono il soggetto disabile, riducendo molto la qualità della vita (Knutson et al., 2007). Essendo quindi tale patologia considerata una piaga sociale, la ricerca su questo fronte è molto attiva con l'intento di determinare quali siano i fattori neuronali che potrebbero consentire una limitazione dei danni, o meglio ancora una rigenerazione del tessuto cerebrale danneggiato. Per far ciò i ricercatori si servono di modelli sperimentali in grado di sopravvivere a forti variazioni del flusso ematico cerebrale (BBF), che invece nell'uomo causano la patologia ischemica con i danni suddetti. Un modello molto utilizzato è il criceto siriano (*Mesocricetus auratus*), roditore ibernante facoltativo in cui si alternano fasi ipo- e ipertensive, senza riportare danni fisiologici e/o strutturali. Tale roditore può quindi consentire di determinare, sia attraverso studi *in vivo* che *in vitro*, quali sono i fattori che giocano un ruolo nella patogenesi ischemica. La comprensione di quali siano i geni coinvolti in tale processo potrebbe, quindi, fornire importanti indicazioni sui meccanismi protettivi attuati dagli animali che, come *Mesocricetus auratus*, sono tolleranti a condizioni simil-ischemiche (Drew et al., 2007).

I.1 L'ischemia cerebrale

Con il termine ischemia s'intende una riduzione parziale o totale del flusso ematico in un organo; i danni riportati dal tessuto colpito dipenderanno dal grado, dalla durata e dalla vulnerabilità di quest'ultimo, ne consegue quindi che la sintomatologia può essere estremamente variabile a seconda della sede interessata (Hossmann, 1998). Tra le varie forme d'ischemia quella cerebrale risulta essere, nella maggior parte dei casi, la più debilitante in

quanto il danneggiamento anche di una sola area cerebrale può avere importanti ripercussioni su molteplici funzioni vitali. La riduzione localizzata del BBF determina la deplezione di ossigeno e glucosio con conseguente danno cerebrale che diventa irreversibile se il flusso di sangue non viene immediatamente ripristinato (Nagasawa & Kogure, 1989; Hossmann, 1998; Koller & Toth, 2012). Ciò è dovuto al fatto che le cellule cerebrali, che utilizzano come fonte energetica essenzialmente glucosio e ossigeno, non sono in grado di accumulare riserve energetiche, per cui sono estremamente sensibili al calo di tali nutrienti che si verifica durante l'ischemia (Khatri & Man, 2013). In condizioni normali, il sistema circolatorio cerebrale è dotato di un meccanismo fisiologico di autoregolazione che, mediante costrizione o dilatazione delle arteriole di resistenza, permette il mantenimento di un BBF costante anche a dispetto di grandi variazioni della pressione arteriosa sistemica (BP), svolgendo così un ruolo fondamentale nella protezione del tessuto nervoso da possibili danni ipossici (Peterson et al., 2011). I limiti di autoregolazione del BBF sono compresi tra i 60 e i 150 mmHg, valori oltre i quali la variazione del flusso diviene direttamente proporzionale alla BP (Lassen, 1959). I meccanismi fisiologici alla base dell'autoregolazione sono di natura neurogena, miogena e metabolica. In particolar modo fattori rilasciati a livello endoteliale, come l'ossido nitrico (NO), sembrano giocare un ruolo fondamentale nelle alterazioni del processo di "autoregolazione dinamica", come appunto si verifica in presenza di un evento ischemico cerebrale acuto (Peterson et al., 2011).

La deplezione di ossigeno e di glucosio nel tessuto cerebrale è seguita da cambiamenti nel metabolismo cellulare, dovuti ad alterazioni dei processi che producono energia e ciò scatena una serie di eventi correlati che comportano neurodegenerazione e che culminano in danno o morte cellulare. All'interno dell'area ischemica è possibile identificare una zona centrale di necrosi detta "core", che per prima va incontro ad anossia, e una zona periferica di estensione variabile detta "penombra ischemica", costituita da neuroni marginalmente perfusi che possono essere recuperati qualora il flusso sanguigno venga ripristinato in breve tempo

(Deb et al., 2010). È stato dimostrato, infatti, che a seguito di un evento ischemico, il core è perfuso a 10-12 ml/100g/min o meno, la zona ischemica circostante (circondata dalla penombra) è criticamente ipoperfusa a meno di 18-20 ml/100g/min, per cui, a rischio di morire entro poche ore, mentre la penombra è perfusa a circa 60 ml/100g/min, quindi, con una minore probabilità di morire (Heuschmann et al., 2003). In definitiva, nonostante il cervello sia in grado di riparare parte dei danni cerebrali indotti da riduzione o interruzione dell'apporto ematico e di ripristinare l'organizzazione morfo-funzionale (Kreisel et al., 2007), l'ischemia cerebrale rappresenta la terza causa di morte nel mondo e la prima causa di morbidità e invalidità sia in Europa che in altre nazioni industrializzate. Dati ISTAT, mostrano che l'incidenza dell'ischemia è pari a 0,27% per anno negli uomini e a 0,12% per anno nelle donne; la letalità è del 32% negli uomini e del 35% nelle donne e aumenta molto con l'avanzare dell'età (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17).

I.1.1 Insorgenza dell'ischemia

Sulla base delle caratteristiche clinico-patologiche l'ischemia viene classificata in tre sottotipi: aterotrombotica, cardioembolica e ischemia dovuta a cause varie, tra cui la malattia cerebrale venosa, malattie del sangue e del sistema di coagulazione, vasculiti, infezioni, dissezione aortica, traumi ed encefalopatia ipertensiva (Pujadas et al., 2008). L'occlusione aterotrombotica delle grandi arterie (carotide, cerebrale media, basilare) è la causa più comune d'ischemia cerebrale, spesso dovuta a obesità, ed è causata dalla deposizione di lipidi sulle pareti vasali, con conseguente formazione di placche aventi superfici irregolari che favoriscono l'aggregazione piastrinica. La placca aterosclerotica così formata oltre a restringere il lume del vaso, può ulcerarsi attivando il sistema della coagulazione e portando alla formazione di un tappo o trombo (Deb et al., 2010).

L'embolia di origine cardiaca causa circa il 25% di tutti gli infarti cerebrali, tuttavia, l'incidenza d'ischemia cardioembolica aumenta con l'età (Murtagh & Smalling, 2006). Per

embolia s'intende l'ostruzione di un'arteria o di una vena causata da un corpo estraneo presente nel flusso ematico, che viene denominato embolo e che può essere un coagulo di sangue, una bolla d'aria o di altri gas, o altre formazioni di dimensioni tali da ostruire il vaso sanguigno. L'infarto cardioembolico è il sottotipo più grave d'ischemia cerebrale, con un alto tasso di mortalità in ospedale (6-27%) e un numero considerevole di pazienti con disfunzioni neurologiche al momento della dimissione ospedaliera (Di Tullio & Homma, 2002; Arboix et al., 2008; Arboix & Aliò, 2011). L'embolo cerebrale di origine cardiaca è dovuto a tre possibili meccanismi: emostasi e formazione di trombi nelle cavità cardiache sinistre dilatate (o con altre alterazioni strutturali), rilascio di materiale trombotico da una superficie anomala (calcificazione) o passaggio anomalo dalla circolazione venosa a quella arteriosa (embolia paradossa; Ferro, 2003). Gli emboli cardiaci possono essere di diverse dimensioni, ma quelli derivanti dalle cavità cardiache sono spesso più grandi e, quindi, destinati a causare grave ictus, disabilità e morte. A causa delle grandi dimensioni, gli emboli cardiaci, nella maggior parte dei casi, fluiscono fino ai vasi intracranici e raggiungono l'arteria cerebrale media (MCA), dove formano ostruzioni singole o multiple. Pertanto, infarti cerebrali cardioembolici predominano nei territori di distribuzione della carotide e del MCA (Ustrell & Pellisé, 2010). Nell'infarto di tipo embolico, l'embolo può derivare non solo da frammenti trombotici cardiaci, ma anche da lesioni aterosclerotiche, da cellule neoplastiche presenti nel sistema circolatorio o da frammenti adiposi entrati nel flusso sanguigno a seguito di una frattura ossea, oppure avere natura gassosa come nella sindrome da decompressione (Moossy, 1993).

L'infarto emorragico, caratterizzato dalla rottura di un vaso sanguigno e conseguente travaso di sangue nel parenchima cerebrale, nel 95% dei casi è dovuto a cardioembolismo (Arboix & Aliò, 2012). Si possono verificare due tipi di emorragia: *intracerebrale*, che riguarda piccole arterie o arteriole ed è comunemente causata da ipertensione, traumi, malattie emorragiche, angiopatia amiloide, uso illecito di stupefacenti e malformazioni vascolari; *subaracnoidea*, caratterizzata da versamento ematico a livello subaracnoideo in seguito alla

rottura di aneurismi o sanguinamento da malformazioni vascolari vicino alla superficie piaie. Quest'ultima costituisce il 10-15% di tutti gli ictus (Fig. I.1; Escudero Augusto et al., 2008).

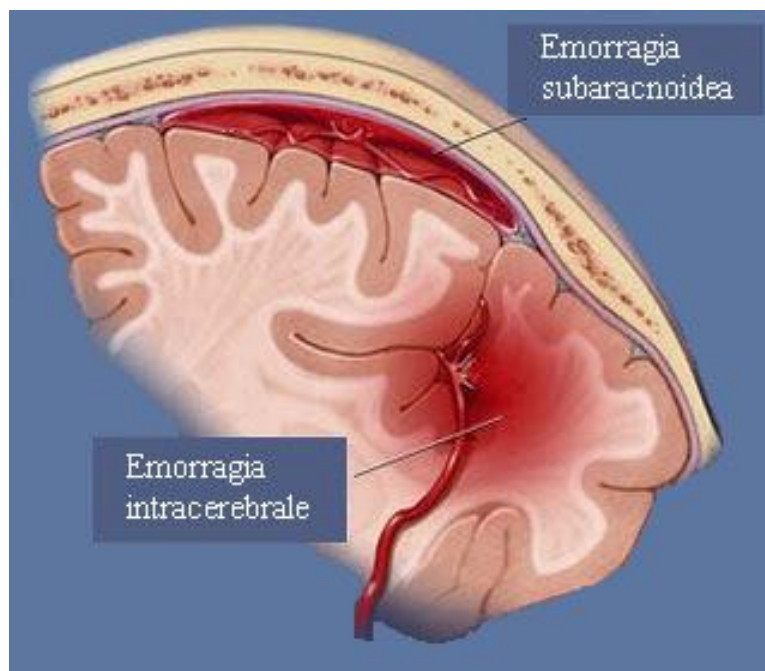


Fig. I.1 Emorragia intracerebrale e subaracnoidea.

I.1.2 Fattori di rischio per lo sviluppo dell'ischemia

Tra i principali fattori di rischio ischemico figurano sicuramente l'ipertensione e l'ipotensione progressiva, condizioni entrambe responsabili di oscillazioni del grado di ossigenazione cerebrale (Lucas et al., 2010). Già nel 1959, Lassen aveva dimostrato che il BBF, nell'uomo, è indipendente da variazioni della pressione arteriosa media (MAP) all'interno di un intervallo compreso tra circa 60 e 150 mmHg (Lassen, 1959). Entro questi valori, il BBF è mantenuto costante attraverso variazioni di resistenza cerebrovascolare; una volta raggiunti i limiti di autoregolazione, la resistenza cerebrovascolare non può correggere ulteriori variazioni di pressione con possibili conseguenze ischemiche (Lucas et al, 2010).

Altro fattore di rischio per lo sviluppo dell'ischemia cerebrale è l'obesità, infatti, è stato riscontrato che nei soggetti obesi il rischio trombofilico è circa 2 volte maggiore rispetto ai soggetti non obesi (Sowers, 2003). In particolare, un aumentato rischio di sviluppare ictus cerebrale è stato associato a elevate concentrazioni plasmatiche dell'ormone leptina, implicato

nella regolazione del peso corporeo e del bilancio energetico (Friedman & Halaas, 1998; Soderberg et al., 1999). Inoltre, da studi recenti è emerso che lo stesso potrebbe giocare un ruolo importante anche nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa attraverso la stimolazione del sistema nervoso simpatico (Beltowski, 2006). Infine, sembra che la leptina possa essere coinvolta nei meccanismi di regolazione dell'aggregazione piastrinica e di induzione della trombosi arteriosa (Konstantinides et al., 2001; Bodary et al., 2005).

È stato dimostrato che anche il sesso gioca un ruolo importante nello sviluppo dell'ischemia e in particolare l'incidenza è più alta negli uomini rispetto alle donne, nella maggior parte delle nazioni, indipendentemente dal paese di origine (Sudlow & Warlow, 1997). Tuttavia in età avanzata, le donne, rispetto agli uomini della stessa età, presentano un tasso di mortalità più elevato (Bousser, 1999). I meccanismi alla base di queste differenze rimangono poco chiari, ma l'esposizione agli ormoni gonadici, in particolare gli estrogeni, è stato ipotizzato svolga un ruolo protettivo (McCullough et al., 2005). Infatti, in uno studio sperimentale si è osservato che in seguito ad induzione d'ischemia su cavie animali, le femmine riportavano meno danni rispetto ai maschi, risultato che veniva capovolto se le femmine erano sottoposte ad ovariectomia (McCullough et al., 2003). Esito, quest'ultimo, in linea con quanto precedentemente osservato su ratti spontaneamente ipertesi di età avanzata in cui la somministrazione di estrogeni dopo ovariectomia ripristinava l'effetto protettivo (Yamori, 1976). Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal loro legame a uno specifico recettore ("estrogen receptor" ER) e la neuroprotezione da parte del 17 β -estradiolo (E2) nel cervello sembra essere mediata principalmente dalla via nucleare ER-mediata inducendo effetti genomici che coinvolgono l'interazione di E2 con ER e la regolazione della trascrizione di vari geni neuroprotettivi. È stato, infatti, dimostrato che E2 aumenta l'espressione dei geni anti-apoptotici Bcl-2 e survivina in seguito a induzione d'ischemia *in vivo* (Dubal et al., 1999; Zhang et al., 2008); aumenta, inoltre, l'espressione del fattore neuroprotettivo, fondamentale per la plasticità sinaptica, l'apprendimento e la memoria, brain

derived neurotrophic factor (BDNF; Bekinschtein et al., 2008).

Studi effettuati su modelli sperimentali di diabete mellito hanno dimostrato che questa condizione patologica influenza negativamente l'evoluzione e la prognosi della cardiopatia ischemica in quanto può alterare le risposte endoteliali delle arteriole cerebrali contribuendo, così, all'estensione del danno vascolare (Mayhan et al, 1991; Tesfamariam et al, 1991; Raddino et al., 2008). Queste disfunzioni endoteliali, registrate anche negli uomini diabetici (Saenz de Tejada et al., 1989), alterano il fenomeno, già citato, dell'autoregolazione del BBF (Peterson et al., 2011); infatti la condizione iperglicemica ostacola la vasodilatazione NO-mediata attraverso l'inibizione della produzione della NO-sintetasi endoteliale. Il diabete, inoltre, favorisce la produzione di sostanze vasocostrittrici come l'endotelina-1 (ET-1), l'angiotensina II e le prostaglandine (Raddino et al., 2008).

Anche alcuni fattori genetici possono contribuire all'insorgenza dell'ischemia. Si è visto che un certo numero di patologie monogeniche, quali malattie mitocondriali, del tessuto connettivo e dei canali ionici possono essere implicate nell'insorgenza d'ictus in pazienti che non presentano i soliti fattori di rischio. Inoltre, ci può essere una certa predisposizione genetica condivisa da diversi membri della famiglia, legata alla presenza di fattori di rischio come ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete e fumo (Jamorozik et al., 1994). Ci sono prove di una forte relazione positiva tra l'insorgenza d'ictus e l'abuso di alcol, mentre un consumo moderato sembrerebbe essere associato a una riduzione di tale rischio (Camargo, 1989). Il consumo eccessivo di alcol può aumentare la BP, l'aggregazione piastrinica ed eritrocitaria, l'osmolarità plasmatica e l'ematokrito con conseguenti variazioni del BBF; può, inoltre, indurre aritmie (fibrillazione atriale, extrasistoli ventricolari, tachicardia) aumentando il rilascio surrenale di catecolammine (CAs; Estruch, 1995).

È stato accertato che un altro fattore di rischio ischemico è l'apnea ostruttiva del sonno (Barone & Kriege, 2013). Questa sindrome è una malattia comune, caratterizzata dal collasso parziale o completo delle vie aeree superiori durante il sonno, secondaria a fattori funzionali

e/o anatomici (Guilleminault et al., 1976). In associazione con questi eventi respiratori si verifica un' aumentata attivazione del sistema nervoso simpatico, con conseguente aumento della BP e della frequenza cardiaca (HR) che, in combinazione con modificazioni emodinamiche, predispongono allo sviluppo di malattie cardiovascolari e ictus (Hudgel, 1992; Somers et al., 1995; Patil et al., 2007). Anche uno stile di vita sedentario può condurre a ictus, in quanto un esercizio fisico regolare produce effetti benefici su colesterolo e trigliceridi ematici, favorisce il calo del peso corporeo e della BP (Anderssen & Hjermann, 2000; Assanelli et al., 2004). Nonostante l'ischemia possa verificarsi a qualsiasi età, negli anziani c'è un rischio maggiore (soprattutto dagli 85 anni in su), dovuto all'invecchiamento vascolare che causa un progressivo irrigidimento delle arterie, perdita di conformità e conseguente aumento della BP (O'rouke, 2007).

I.1.3 Meccanismi molecolari del processo ischemico

Durante il processo d'ischemia/riperfusion cerebrale si verifica un danno primario o immediato e uno secondario che si sviluppa successivamente (Fig. I.2). Il principale effetto di una carenza o totale assenza di riperfusione in un tessuto è l'alterazione della respirazione cellulare, con conseguente rallentamento della produzione di ATP intracellulare e danno mitocondriale (Moro et al., 2005). In questi casi, la produzione energetica viene in parte affidata alla glicolisi anaerobica (Karaszewski et al., 2009), responsabile di una modesta produzione di ATP, insufficiente a mantenere le funzioni neuronali di base quali, ad esempio, il corretto funzionamento della pompa Na^+/K^+ e del Ca^{2+} . Inoltre, la glicolisi anaerobica porta all'incremento dei livelli di fosfato inorganico, lattato e idrogenioni con conseguente acidosi intra ed extra-cellulare. L'alterato funzionamento della pompa Na^+/K^+ ATP-dipendente determina l'incapacità, da parte del neurone, di mantenere il gradiente chimico transmembrana e si verifica, di conseguenza, un accumulo extracellulare di K^+ , nonché un afflusso intracellulare di Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} che porta al rigonfiamento osmotico della cellula

(edema citotossico; Moro et al., 2005; Deb et al., 2010). Per limitare questo fenomeno, il Na^+ intracellulare viene scambiato con il Ca^{2+} extracellulare attraverso gli scambiatori $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Il risultato è un netto incremento del Ca^{2+} citosolico, cui segue la depolarizzazione della membrana plasmatica che, a sua volta, determina l'attivazione dei canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Siesjö & Bengtsson, 1989). Lo sbilanciamento del gradiente ionico si traduce in un rilascio incontrollato di glutammato (Glu) a livello dei terminali presinaptici, dove si verifica una attivazione eccessiva dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -ammino-3-5-methylisoxasole-4-idrossi acido propionico (AMPA), causando il fenomeno noto come eccitotossicità del Glu, che determina un ulteriore accumulo di Ca^{2+} intracellulare e attivazione non controllata di enzimi Ca^{2+} -dipendenti quali proteasi, lipasi e nucleasi. Tali enzimi e loro prodotti metabolici danneggiano le membrane cellulari, il materiale genetico e le proteine strutturali, conducendo il neurone a morte cellulare (Nakanishi et al., 2009);

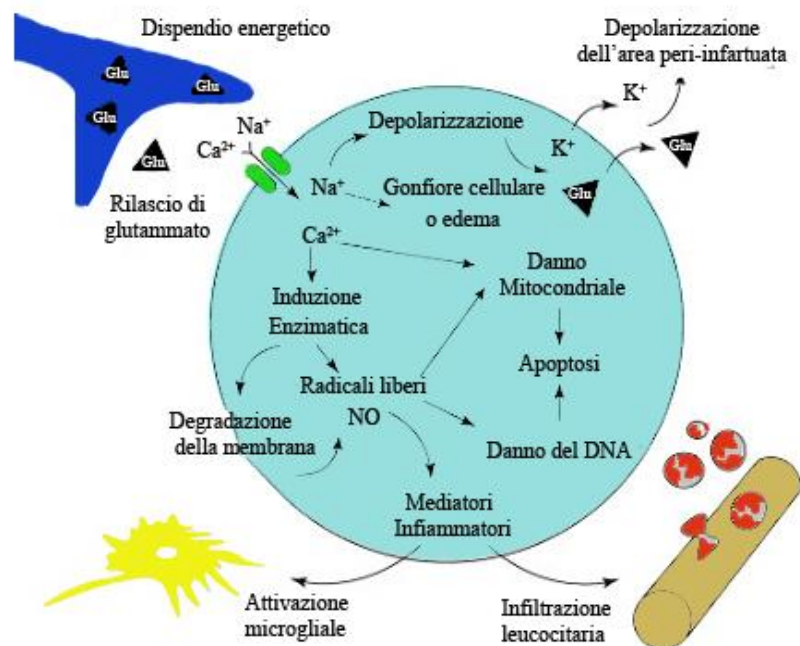


Fig. I.2 Schematizzazione dei meccanismi patologici dell'ischemia cerebrale. L'attivazione di specifici recettori per il Glu causa aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} , Na^+ e Cl^- , mentre il K^+ viene rilasciato nello spazio extracellulare. Il Ca^{2+} attiva numerosi enzimi (proteasi, lipasi, ecc.) e i radicali liberi generati danneggiano la membrana, i mitocondri e il DNA, innescando l'apoptosi e inducendo anche la formazione dei mediatori della risposta infiammatoria (Modificato da Dirnagl et al., 1999).

l'attivazione delle proteasi, infatti, comporta la degradazione di proteine citoscheletriche (actina) e della matrice extracellulare (laminina); l'attivazione della fosfolipasi A2, della ciclossigenasi e dell'ossido nitrico sintetasi neuronale (nNOS) porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del NO che provocano danni a DNA, lipidi e proteine (Dirnagl et al, 1999; Moro et al, 2005).

Particolarmente responsabili dello stress ossidativo sono l'anione superossido (O_2^-) e il NO, che reagendo tra di loro danno luogo alla formazione di un potente ossidante qual è il perossinitrito ($ONOO^-$; Beckman et al., 1990). Oltre agli effetti dannosi sull'integrità cellulare, i ROS possono bloccare anche la respirazione mitocondriale, inibendo i complessi enzimatici coinvolti nella catena di trasporto degli elettroni (Yamamoto et al., 2002). Inoltre, lo stress ossidativo facilita la formazione del poro di transizione mitocondriale, che incrementa la fuoriuscita dalle membrane mitocondriali interna ed esterna di proteine correlate all'apoptosi, tra cui il citocromo C (Kim et al., 2002). Conseguentemente al danno primario, l'organismo attiva risposte infiammatorie e immunologiche che inducono l'esacerbazione del danno neuronale. Infatti, astrociti, microglia e cellule endoteliali rilasciano in grande quantità mediatori pro-infiammatori, come l'interleuchina-1 β (IL-1 β) e il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), che consentono il reclutamento, l'attivazione e l'adesione dei leucociti all'endotelio del microcircolo cerebrale. I leucociti attivati ostruiscono il canale vascolare e si ha tras migrazione di monociti e macrofagi nelle aree infartuate. Nella risposta infiammatoria vengono, inoltre, attivati importanti fattori di trascrizione, comprendenti il nuclear factor k chain transcription in B cells (NF-kB), il fattore indotto dall'ipossia-1 (HIF-1), il fattore di regolazione dell'interferone 1 (IRF-1) e la proteina trasduttrice del segnale e attivatore della trascrizione STAT3 (Dirnagl et al., 1999).

L'ipossia che accompagna il processo ischemico provoca perdita d'integrità strutturale cerebrale e dei vasi sanguigni anche attraverso il rilascio di metalloproteasi della matrice. La perdita d'integrità strutturale vascolare si traduce nella distruzione della barriera

ematoencefalica (BBB), con conseguente edema cerebrale e progressione secondaria di lesioni cerebrali (Adibhatla & Hatcher, 2008). In definitiva, l'ischemia comporta la perdita di cellule cerebrali e la zona ischemica presenta differenze significative nella modalità di morte cellulare. La maggior parte delle cellule del core ischemico va incontro a necrosi, dovuta alla riduzione di energia cellulare e a rigonfiamento e rottura degli organelli subcellulari, la penombra ischemica, invece, va incontro ad apoptosi sia caspasi-dipendente, che caspasi-indipendente (Ferrer et al., 2003; Ferrer, 2006). Eppure, nelle prime fasi d'ischemia, i neuroni del "core necrotico" mostrano alcune caratteristiche tipiche dell'apoptosi, quali condensazioni citoplasmatiche e nucleari più attivazione della cascata delle caspasi (Benchoua et al., 2001). Nonostante l'attivazione nucleare della via apoptotica, i cambiamenti morfologici dell'apoptosi non si osservano nelle fasi finali dell'ischemia, e ciò potrebbe essere dovuto alla compromissione della produzione di energia che indirizza la cellula verso la necrosi (Nicotera et al., 1998). Nella penombra, invece, l'attivazione delle caspasi può avvenire in modo completo per l'esistenza di un flusso di sangue residuo e, infatti, aumenta l'espressione genica di Bcl-2 e della proteina p53, seguita da rilascio di molecole proapoptotiche (citocromo c, caspasi, ecc; Bederson et al., 1986). La cascata delle caspasi può essere attivata sia dalla via estrinseca recettore-dipendente, che da quella recettore-indipendente o intrinseca mitocondriale (Longa et al., 1989). L'ischemia, inoltre, provoca l'attivazione di altre vie di morte cellulare, quali la via delle chinasi N-terminali c-Jun (JNKs), della proteina p38 e delle chinasi 5 ciclina dipendente (CDK-5; Beal, 1992; Eng et al., 2003; Moro et al., 2005; Zhang & Bhavnani, 2006). La ri-perfusione post-ischemica riveste un ruolo paradossale, in quanto, se da un lato riduce l'estensione della penombra apportando ossigeno e nutrienti, dall'altro può aggravare il danno nel core ischemico (Schaller & Graf, 2004). I meccanismi che sottendono questo fenomeno sono molteplici: azione di radicali liberi, processi infiammatori, aumento della sintesi di prostaglandine, rilascio eccessivo di aminoacidi eccitatori e danni di barriera (Traystman et al., 1991; Okada et al., 1994; Albayrak et al., 1997).

I.2 Modelli *in vivo* che consentono di simulare condizioni simil-ischemiche

Un buon modello animale per lo studio dell'ischemia deve essere in grado di riprodurre l'eziologia, le conseguenze anatomico-funzionali e metaboliche della patologia umana. Essendo l'ischemia un processo assai variabile nelle sue manifestazioni, cause e nei siti anatomici in cui avviene (Ginsberg & Busto, 1989), non esiste un modello animale ideale d'ictus ischemico, ma ne sono stati sviluppati diversi, ognuno dei quali ha i propri punti di forza e di debolezza (Durukan & Tatlisumak, 2007). In generale, nei modelli ischemici si riduce l'apporto di ossigeno e di glucosio al Sistema Nervoso Centrale (SNC). Sebbene la conoscenza scientifica iniziale provenga da studi su specie superiori, motivazioni di tipo etico, ecologico ed economico ne hanno ridotto notevolmente l'utilizzo a favore di animali di piccola taglia. Fra questi, il ratto è l'animale più comunemente usato per varie ragioni: somiglianza anatomica e fisiologica con gli esseri umani, facilità di monitoraggio fisiologico, ed elevata riproducibilità (Macrae, 1992; Brinker et al., 1999; Durukan & Tatlisumak, 2007).

Esistono, in generale, due categorie di modelli animali: quelli in cui l'ischemia è indotta artificialmente e quelli in cui si verifica spontaneamente. Nell'ambito di tali categorie si distinguono modelli ischemici globali e focali. Nei modelli ischemici globali la riduzione o cessazione del flusso ematico riguarda l'intero cervello o quasi; condizione che nell'uomo si verifica a seguito di un arresto cardiaco. Nei modelli ischemici focali, che mimano la forma clinicamente più comune, si ha una diminuzione del flusso sanguigno in una specifica regione cerebrale. Poiché l'occlusione embolica dell'arteria cerebrale media (MCAO) clinicamente è una forma comune d'ischemia nell'uomo, la maggior parte dei modelli d'ischemia focale simula questo evento (Karpiak et al., 1989).

I.2.1 Modelli d'ischemia globale

I modelli d'ischemia globale sono caratterizzati da interruzione completa del flusso sanguigno. In tali modelli la riperfusione post-ischemica, soprattutto nelle prime fasi di

rianimazione, avviene a una BP ridotta, e inoltre la composizione del sangue è alterata a causa delle profonde modificazioni sistemiche (Pulsinelli & Buchan 1988; Hossmann 1998; Iijima et al., 1993; Katz et al., 1995). In questo contesto il danno ischemico è definito anche come “fenomeno di maturazione” o “morte neuronale ritardata” in quanto si sviluppa lentamente dopo un periodo di latenza e interessa principalmente alcune popolazioni neuronali, tra cui le cellule piramidali dell'ippocampo (HIP), i neuroni corticali degli strati III, V e VI, i neuroni dello striato e le cellule cerebellari del Purkinjia (Brierley, 1979; Pulsinelli et al., 1982).

Questi modelli sono prodotti mediante l'occlusione delle arterie che regolano il BBF, quali l'arteria carotide comune (CCA) e le arterie vertebrali, oppure mediante l'aumento della pressione intracranica oltre il valore della BP. Anche la riperfusione collaterale viene interrotta attraverso l'occlusione delle arterie mammarie interne e le arterie pterigopalatine, mediante drenaggio retrogrado dei vasi occlusi, o anche abbassando la BP a livelli ipotensivi. Nel gerbillo, l'ischemia globale può essere prodotta mediante l'occlusione delle CCA senza l'occlusione delle arterie vertebrali perché in questo roditore il circolo di Willis è incompleto e non vi è connessione tra l'arteria basilare e l'arteria carotide interna (Hossmann, 1998).

I.2.2 Modelli d'ischemia focale

Nel ratto, l'occlusione transiente o permanente della MCAO sia distale che prossimale è largamente utilizzata per gli studi di neuroprotezione farmacologica e per la caratterizzazione dei meccanismi implicati nel danno ischemico. La MCAO, impiegata come modello d'ischemia cerebrale *in vivo*, può essere indotta tramite varie tecniche, come ad esempio la cauterizzazione o l'elettrocoagulazione della MCA (Tamura et al., 1981; Tyson et al., 1984). Tuttavia, come variante del suddetto modello, la MCA può essere occlusa contestualmente alla CCA ipsilaterale (Chen et al., 1986). Molto utilizzata nei topi e nei ratti è anche l'occlusione intraluminale, che consiste nell'inserire un filo da sutura in silicone attraverso la carotide fino al punto di occludere il flusso nella MCA (Koizumi, 1986; Longa et al., 1989).

Anche la creazione di trombi è una tecnica molto sfruttata per generare modelli d'ischemia cerebrale; si può trattare di trombi formati dal sangue dell'animale stesso (autologo) e poi iniettati attraverso la carotide esterna per poi raggiungere vasi intracranici (Kaneko et al., 1985), oppure trombi ricchi in fibrina resistenti all'autolisi (Busch et al., 1997). Al pari di questo sistema sono utilizzati vari tipi di materiale artificiale per mimare il trombo: silicone viscoso (Lauer et al., 2002), collagene (Purdy et al., 1989), polivinilsilossano (Yang et al., 2002) e microsfele (35-50 μm) in carbonio o in polietilene (Roos et al., 2003).

Nel tentativo di produrre lesioni ischemiche minime, Watson e collaboratori hanno sviluppato il modello di fototrombosi corticale in cui viene somministrato all'animale, per via venosa, il rosso bengala (colorante fotosensibile) che induce l'aggregazione delle piastrine quando irradiato a una specifica lunghezza d'onda (Wester et al., 1995). Un altro modello che stimola la formazione di trombi prevede l'uso di sali dell'acido arachidonico, ma non è ben documentato il danno ischemico dal punto di vista istopatologico (Furlow & Bass, 1975). Nei modelli di occlusione è annoverato anche l'ET-1, un piccolo peptide endoteliale delle cellule muscolari lisce e dei neuroni, con una forte azione vasocostrittrice (Yoshimoto et al., 1990). L'ET-1 può essere somministrata direttamente nella MCA (Macrae, 1992), oppure, può essere applicata sulla corteccia (COR), riducendo la perfusione locale (Fuxe et al., 1997).

I.2.3 Animali ibernanti

Nonostante l'ischemia cerebrale si caratterizzi per processi di neurodegenerazione, gli animali ibernanti sono in grado di tollerare fenomeni di questo tipo, senza riportare alterazioni neurofisiologiche, e questo li rende ottimi modelli sperimentali per lo studio di molecole ad attività potenzialmente neuroprotettiva. L'abilità di entrare in uno stato d'ibernazione è uno dei più affascinanti esempi di metamorfosi fenotipica nei vertebrati, che consiste di profondi cambiamenti nella fisiologia, morfologia e comportamento in risposta a condizioni ambientale sfavorevoli. Tale fenomeno può avere la durata di diversi giorni o settimane ed è

caratterizzato da intervalli di profondo decremento del tasso di attività metabolica e temperatura corporea (Tb). La riduzione regolata e reversibile del bisogno di ossigeno e nutrienti nelle cellule e nei tessuti, sono alcuni dei principali aspetti neuroprotettivi che il SNC attua nel corso dell'ibernazione (Carey et al., 2003; Drew et al., 2007). L'ibernazione è stata documentata in differenti gruppi di mammiferi tra cui Monotremi, Primati, Marsupiali, Insettivori e Carnivori (Storey, 2010). In particolare, il criceto siriano (*Mesocricetus auratus*), ibernante facoltativo, ha dimostrato di essere un utile modello per lo studio del processo ischemico, tra cui la delineazione dei meccanismi di protezione dei tessuti e degli organi alle basse temperature e soprattutto la protezione contro le lesioni degli organi dovute alla riperfusione post-ischemica. Altri mammiferi ibernanti come lo scoiattolo di terra (*Spermophilus lateralis*), lo scoiattolo americano (*Tamias asiaticus*) e i ricci (*Erinaceus europaeus*) sono frequentemente studiati per gli stessi motivi, tuttavia per la ricerca è molto importante studiare animali che, come i criceti, ibernano facilmente in tutte le stagioni dell'anno, piuttosto che gli ibernanti stagionali (Arai et al., 2005).

I.2.4 Ibernazione

Si definisce "ibernazione" lo stato di letargo o torpidità in cui si vengono a trovare diversi invertebrati e vertebrati durante la stagione fredda (Thomas et al., 1985). Nel caso di uccelli e mammiferi la definizione di questo termine è più complessa. Di fatti, l'ibernazione secondo Menaker (1962) è considerata uno stato fisiologico caratterizzato da una riduzione della Tb di tali vertebrati, che mantengono comunque la capacità di aumentarla spontaneamente a un livello omeotermico, senza assorbire il calore dall'ambiente esterno. Questo stato è diverso dall'ipotermia dei mammiferi non ibernanti (Menaker et al., 1962) che, se esposti a basse temperature, attivano il processo di termogenesi da brivido fino a che non recuperano (Andjus et al., 1956), oppure se la condizione avversa persiste per tempi lunghi, questi esauriscono la loro capacità termogenica e muoiono (Aloia et al., 1981). La capacità di riscaldamento

spontaneo dipende dalla temperatura ambientale, dalla stagione e dallo stato endocrino dell'animale (Andjus et al., 1959). In queste specie, il riscaldamento spontaneo è possibile solo se l'animale non è raffreddato a una temperatura alla quale le funzioni cardio-respiratorie sono arrestate (El Hilali et al., 1966). A differenza delle specie non ibernanti, gli ibernatori non entrano in arresto cardio-respiratorio durante l'ibernazione e il riscaldamento spontaneo inizia quando i meccanismi endogeni di risveglio (RISV) sono attivi (Andjus et al., 1969).

L'ibernazione in condizioni naturali è caratterizzata da due principali ritmi fisiologici circannuali: l'oscillazione della massa corporea e lo switch ritmico tra omeotermia ed eterotermia. Durante l'ibernazione tutti i mammiferi possono essere caratterizzati da una riduzione globale del tasso metabolico, della Tb e del flusso ematico in risposta al freddo e al buio. Nel caso più semplice, l'ibernazione può essere suddivisa in tre periodi con fisiologie essenzialmente distinte: una fase d'ingresso (INGR) o raffreddamento in cui l'attività metabolica e la Tb si riducono; una fase di torpore (TORP) o mantenimento, quando la Tb e l'attività metabolica rimangono a valori minimi e tendono a essere limitati dall'instaurarsi di un gradiente tra Tb e temperatura ambientale e una fase di RISV o riscaldamento in cui la Tb e l'attività metabolica aumentano a livelli eutermici (36-37°C). I mammiferi che entrano in TORP possono subire enormi cambiamenti in molte variabili neurofisiologiche; la maggior parte delle aree del SNC diventano metabolicamente quiescenti ed elettricamente silenti.

È ampiamente riconosciuto che l'ibernazione è sotto stretto controllo neuronale da parte del HTH, dell'area preottica HTH e del HIP (Heller & Colliver, 1974; Sallmen et al., 2003). Le specie ibernanti hanno evoluto meccanismi cerebrali adattivi che coinvolgono la trasformazione di stimoli sensoriali da parte delle strutture sottocorticali in segnali effettori che permettono agli animali di resistere in condizioni ambientali avverse (Heller, 1979; Carey et al., 2003). Durante l'INGR e il TORP, il SNC deve continuamente, e in maniera affidabile, elaborare segnali sensoriali dall'ambiente interno e inviare appropriate risposte ai vari organi effettori (Carey et al., 2003). L'ibernazione, in quanto tale, non è un adattamento speciale

caratteristico di alcuni mammiferi, piuttosto si tratta di un sistema universale che permette ad alcuni animali di generare l'energia necessaria a sostenere l'omeotermia e la sopravvivenza in un periodo privo di risorse. Nonostante le basse temperature corporee (5°C), nella fase di mantenimento dell'ibernazione, alcune specie in letargo hanno la capacità di regolare la frequenza respiratoria (RR), la HR (Lyman, 1951) e la Tb attraverso cambiamenti metabolici. RR e HR sono probabilmente modulati modificando l'equilibrio tra l'attività simpatica e parasimpatica, mentre le variazioni nella Tb avvengono per meccanismi ancora non completamente caratterizzati (Harris & Milsom, 1995).

I.2.4.1 Torpore e risveglio: aspetti molecolari e attività cardiovascolare

Il TORP rappresenta un aspetto superficiale del sonno, in questa fase del suo ciclo vitale l'animale si ritira in un nido, assume una postura simile al sonno, ha un comportamento quiescente e presenta soglie di eccitazione elevate. Durante il TORP l'entità della diminuzione della Tb varia da specie a specie; in alcuni ibernanti tale temperatura raggiunge i 0°C equilibrandosi con quella ambientale, per altri animali invece viene mantenuta a $5,5-7^{\circ}\text{C}$. Studi preclinici e clinici hanno dimostrato come una profonda ipotermia, durante il TORP, protegga il cervello contro il danno ischemico (Krieger & Yenari, 2004; Yenari & Hemmen, 2010). Sono diversi i meccanismi coinvolti nella neuroprotezione indotta dall'ipotermia, primo fra tutti la riduzione lineare del BBF quando la temperatura interna scende da 37°C a 18°C . Da un punto di vista dei processi cellulari, infatti, l'ipotermia previene l'ischemia cerebrale riducendo l'eccitotossicità, un importante meccanismo di morte neuronale, attraverso l'attenuazione del rilascio extracellulare di Glu nella regione ischemica (Baker et al., 1995). L'ipotermia sopprime l'ischemia cerebrale indotta da stress ossidativo (Karibe et al., 1994; Katz et al., 2004) prevenendo alcuni tipi di danno cellulare, quale ad esempio la frammentazione del DNA (Nakamura et al., 1999; Phanithi et al., 2000; Ji et al., 2007). Questo stato termico diminuisce, inoltre, l'espressione post-ischemica di Fas (proteina

transmembrana di tipo II della famiglia del fattore di necrosi tumorale) e caspasi-3 (Phanithi et al., 2000), riduce il rilascio del citocromo-c mitocondriale, aumenta l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Zhang et al., 2001) e riduce l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF-kB) inducente l'espressione dei geni infiammatori coinvolti nel danno ischemico (Han et al., 2003; Yenari & Han, 2006; Webster et al., 2009).

I criceti siriani (*Mesocricetus auratus*) si svegliano dal letargo a intervalli regolari di circa 90-100 ore o in risposta a stimoli meccanici e vibrazionali. Il RISV comporta una trasformazione dinamica della biochimica del corpo tramite la successione coordinata di stati fisiologici che portano poi, in un periodo di 2-3 h, a una Tb di 30°C. Il RISV dal letargo può essere paragonato a un periodo di accelerazione in cui l'attività simpatica sembra dominare (Harris & Milsom, 1995). Il BBF durante la fase di TORP è circa il 10% dei livelli di riposo eutermici (Frerichs et al., 1994). L'HR si riduce da 350-400 a 6-25 bpm, la BP media scende da 139 a 28 mmHg e l'elettroencefalogramma (EEG) diventa isoelettrico. L'elettrocardiogramma (ECG) rimane normale durante l'ibernazione, fatta eccezione per la bradicardia e il rallentamento della conduttanza. La riduzione della Tb e del HR durante l'entrata in TORP è poi seguita dalla fase ipertensiva del RISV, in cui la MAP registra picchi del 403±21% rispetto ai valori eutermici (Osborne & Hashimoto, 2003, 2006).

I.3 Modelli *in vitro* che consentono di simulare condizioni simil-ischemiche

Le cellule mantenute in coltura possono derivare direttamente dalla dissociazione di un tessuto (colture cellulari primarie) o possono provenire da colture precedenti (colture secondarie o terziarie). Le cellule derivate dalla dissociazione di tessuti hanno una limitata capacità replicativa e tendono a diventare senescenti. Vi sono, tuttavia, linee cellulari "immortalizzate" per mutazioni spontanee o indotte che sono in grado di replicarsi indefinitamente in coltura. È possibile mantenere in coltura anche cellule di tipo diverso, in questo caso si parla di co-colture. Le condizioni di coltura sono ottenute mantenendo le

cellule in piastre da coltura, in presenza di specifici mezzi di crescita liquidi che contengono disciolte le quantità appropriate delle sostanze necessarie allo sviluppo cellulare (aa, vitamine, sali, glucosio), in incubatori che sono in grado di mantenere controllata la temperatura, il pH, la pressione parziale dell'anidride carbonica e l'umidità. La morfologia delle cellule in coltura riflette quella del tessuto *in vivo*, infatti, cellule che *in vivo* fanno parte di tessuti solidi, come le cellule di origine nervosa, epiteliale o mesenchimale, crescono in monostrato, adese al substrato del contenitore; le cellule che normalmente vivono in un mezzo fluido, come le cellule di origine emopoietica, crescono in sospensione. Un'altra importante caratteristica delle colture *in vitro* è quella di operare in condizioni di assoluta sterilità, a tale fine occorre lavorare sotto cappe a flusso laminare e utilizzare materiale monouso sterile. Recentemente, modelli *in vitro* hanno trovato crescente applicazione nella ricerca ischemica. In tali modelli, detti OGD (Oxygen and Glucose Deprivation), colture primarie di neuroni (Goldberg & Choi, 1993) o colture organotipiche (Vornow, 1994), sono incubate in una camera anaerobica in terreno privo di glucosio, al fine di simulare l'interruzione della fornitura di ossigeno e nutrienti al parenchima cerebrale (Hossman, 1998). Sarà così possibile effettuare valutazioni relative al danno ischemico nel tipo cellulare oggetto di studio.

CAPITOLO II

Sistemi recettoriali implicati nella patogenesi ischemica

Da molti anni l'ipotermia è considerata una metodica di protezione per l'organismo che si esplica soprattutto nei confronti del cervello, al quale in condizioni normali bastano deficit di ossigeno e glucosio anche di pochi minuti per sviluppare condizioni patologiche debilitanti. La fisiologia dell'ibernazione comprende vari aspetti neuroprotettivi fra i quali quello principale è il decremento della Tb che determina diminuzione del danno neuronale indotto dall'ischemia che accompagna la riduzione del BBF (Whalen et al., 2000). A tal proposito l'abbassamento della Tb che si registra negli ibernanti durante la fase di TORP rappresenta un ottimo modello per lo studio di diverse patologie quali ischemia, obesità e malattie neurodegenerative (Arendt, 2004). Sono diversi i sistemi neurorecettoriali implicati nella patogenesi dell'ischemia, e tra questi i principali risultano essere i recettori NMDA, il sistema orexinergico (ORXergico) e le cromogranine (Cgs). Tali sistemi recettoriali giocano, in alcuni casi, ruoli contrapposti. Infatti, mentre il sistema ORXergico funge da fattore ipertensivo, gli altri due esercitano la funzione opposta (Mahata et al., 1997; Zanutto et al., 2010; Luong & Carrive, 2012). Dal punto di vista della protezione neuronale però, non esistono studi in grado di fornirci indicazioni circa i probabili meccanismi di cross-talking che potrebbero interessare tali sistemi. Alla luce di quanto detto risulta molto interessante andare a studiare le variazioni trascrizionali dei suddetti sistemi recettoriali in cellule neuronali esposte a ischemia, sia *in vivo* che *in vitro*, ottenendo indicazioni riguardo l'eventuale attività neuroprotettiva esercitata da parte dei fattori cellulari analizzati.

II.1 Principali neuromediatori coinvolti nel controllo cardiovascolare

Essendo l'ischemia cerebrale una condizione patologica caratterizzata da una riduzione localizzata del BBF (Nagasawa & Kogure, 1989), risulta di fondamentale importanza la comprensione del ruolo svolto da specifici neurotrasmettitori nelle variazioni della BP. Sono diversi i neuromediatori implicati in tali meccanismi di controllo, fra questi rivestono

particolare importanza i sistemi neurorecettoriali NMDA, ORXergico e le Cgs (Mahata et al., 1997; Zanutto et al., 2010; Luong & Carrive, 2012). Il primo media la neurotrasmissione eccitatoria del SNC e svolge un ruolo cruciale nella regolazione della BP (Glazewski et al., 1995), come dimostra uno studio in cui la stimolazione del nucleo del tratto solitario (NTS) indotta dal NMDA altera la sensibilità dei barocettori presenti a questo livello, determinando un effetto bradicardico, mentre l'inibizione induce stati di ipertensione (Zanutto et al., 2010; Giusi et al., 2012). Tale sistema recettoriale svolge un ruolo critico anche nella crescita neuronale, ma la sua stimolazione eccessiva durante l'ischemia cerebrale causa eccitotossicità, provocando danni soprattutto a livello ippocampale (HIP; Kalueff, 2007).

Il sistema ORXergico è implicato nel controllo di diverse funzioni, tra cui quelle endocrine, metaboliche, circadiane, del ciclo sonno-veglia, della percezione del dolore, della locomozione e dell'omeostasi cardiovascolare (Hagan et al., 1999; Yamamoto et al., 2002; Kayaba et al., 2003; Marston et al., 2008; Sakurai et al., 2010; Tsuneki & Sasaoka, 2013; Li et al., 2014), come dimostrato dall'incremento della BP provocato dall'iniezione intracerebroventricolare (icv) di ORX-A (Luong & Carrive, 2012). Questo insieme di funzioni è coerente con la localizzazione dei neuroni ORXergici soprattutto nell'ipotalamo (HTH) laterale (LH), sede centrale d'integrazione di numerosi input sensoriali ed emotivi, nonché area ricca di proiezioni eccitatorie diffuse in tutto il cervello (Sakurai et al., 1998).

Le Cgs costituiscono una famiglia di glicoproteine acide, localizzate nelle vescicole secretorie di cellule neuroendocrine, che nella maggior parte dei casi fungono da precursori di peptidi biologicamente attivi coinvolti nella modulazione di varie attività, fra cui la regolazione della BP (Helle, 2010; Mahata et al., 2010; Sánchez-Margalet et al., 2010). In particolare, la Catestatina (CST) è un piccolo peptide idrofobico che si forma dal taglio proteolitico della cromogranina A (CgA) e riveste un ruolo fondamentale nel controllo dell'attività cardiovascolare (Mahata et al., 1997, 2010). Tale neuromodulatore agendo sui recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), inibisce il rilascio delle CAs che modulano la

funzione cardiovascolare, regolando così la BP e prevenendo l'ipertensione (Mahata et al., 1997; Yonekura et al., 2008).

II.2 Il sistema recettoriale NMDA

Il Glu è il principale neurotrasmettitore ad azione eccitatoria presente a livello del SNC. Una volta sintetizzato, il Glu viene accumulato in vescicole e successivamente rilasciato nello spazio sinaptico dove interagisce con specifici recettori post-sinaptici. Tali recettori possono essere associati direttamente a un canale ionico (ionotropi o iGluRs), oppure accoppiati a proteine G (metabotropi o mGluRs; Vyklícky et al., 2014). I recettori NMDA (NMDARs), appartengono alla famiglia degli iGluRs, prendono il nome dall'agonista che li attiva, e differiscono dagli altri iGluRs in quanto, in condizioni di riposo della membrana post-sinaptica, sia l'agonista NMDA che il Glu non sono in grado di attivare da soli il canale. Infatti, il NMDAR è fisiologicamente inibito dagli ioni Mg^{2+} che risiedono nel poro del canale; solamente quando la membrana post-sinaptica viene depolarizzata, verosimilmente attraverso l'interazione del Glu con gli altri iGluRs non-NMDARs vicini, il blocco da Mg^{2+} viene rimosso e il canale può condurre correnti ioniche. L'attivazione dei NMDARs richiede, quindi, la simultanea attività pre-sinaptica (rilascio di Glu) e post-sinaptica (depolarizzazione indipendente della membrana post-sinaptica). Pertanto, i NMDARs sono canali attivati da ligando e contemporaneamente voltaggio-dipendenti e, per tale proprietà, sono stati definiti come sensori dell'attività sincrona delle cellule pre e post-sinaptiche ("*coincidence detector*"; Zito, 2009). Altro fattore limitante l'attivazione dei NMDARs è il legame della Gly a un sito allosterico, il quale potenzia l'interazione Glu-recettore che, altrimenti, non sarebbe in grado di generare correnti ioniche. La Gly funge quindi da co-trasmettitore con un ruolo regolatorio per i NMDARs (Dunn et al., 1999).

Questi recettori sono caratterizzati da una cinetica di attivazione lenta (10-50 ms), se comparata a quella dei recettori non-NMDA (0,2-0,4 ms), e da un lungo tempo di attivazione

in presenza dell'agonista. L'attivazione determina l'apertura del canale NMDA (Fig. II.1) che è altamente permeabile al Ca^{2+} , oltre che ai cationi monovalenti come Na^+ e K^+ .

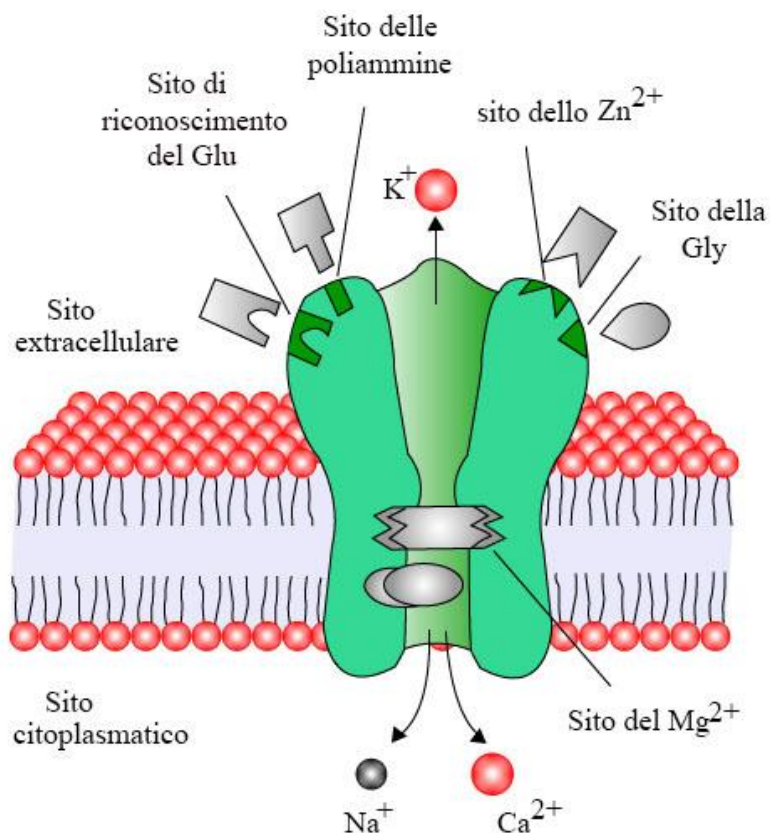


Fig. II.1 Rappresentazione schematica del complesso recettoriale NMDA.

Dal punto di vista molecolare questi recettori derivano dall'assemblaggio di differenti subunità: NR1, NR2 e NR3 (Vycklicky et al., 2014). La subunità NR1 regolatoria è espressa ubiquitariamente nell'encefalo e presenta il sito di legame per la Gly. È codificata da un solo gene che va incontro a splicing alternativo attraverso il quale possono essere ottenute 8 diverse varianti: (000-001-010-011-100-101-110-111; Weiss et al., 1998). La subunità NR2, coinvolta nel legame con il Glu, è presente in 4 diverse forme indicate con A-D, codificate da geni diversi e selettivamente espresse in alcune aree cerebrali; conferisce specifiche proprietà cinetiche e farmacologiche al recettore, inclusa la sensibilità allo zinco, all'idrogeno e alle poliammine. La subunità NR3 esiste in 2 forme, A e B, codificate da geni diversi. Queste, probabilmente fungono da modulatori del flusso ionico riducendo la sensibilità al Mg^{2+} e la

permeabilità al Ca^{2+} (Yuan et al., 2008). Tutte le subunità hanno un livello significativo di omologia e dal punto di vista strutturale sono costituite (Fig. II.2A) da un dominio N-t extra-

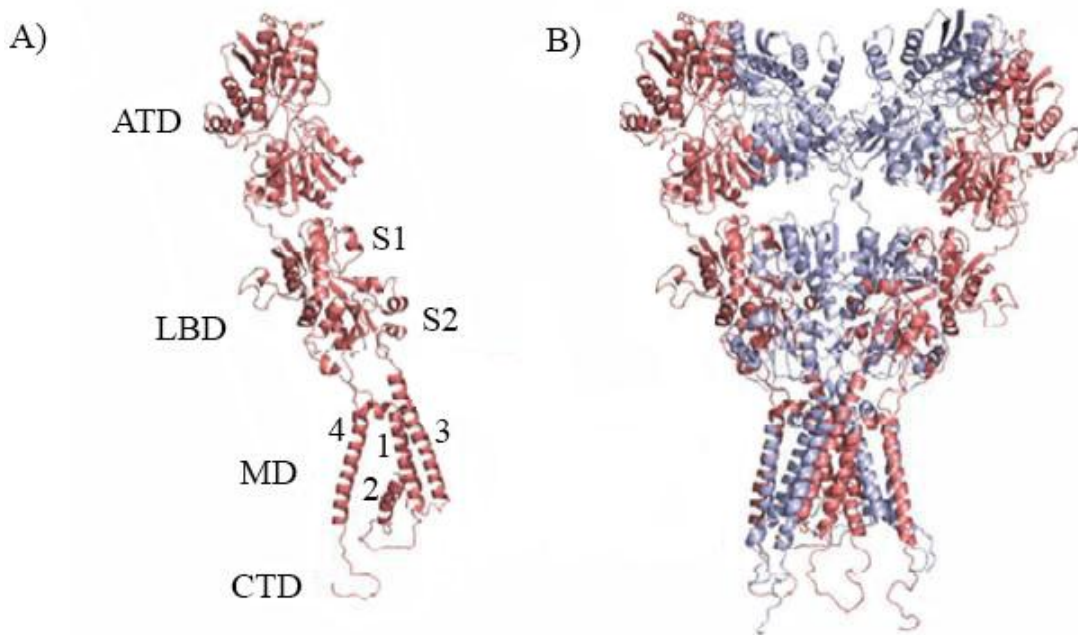


Fig. II.2 A: Organizzazione dei domini di una singola subunità recettoriale NR. 2 domini extracellulari, (ATD): dominio N-t e LBD: dominio di legame del ligando composto dai due lobi (superiore e inferiore S1 e S2); MD: dominio transmembrana formato da quattro eliche; CTD: dominio C-t intracellulare. B: Modello di omologia dell'eterotetramero GluN1 (in rosso) /GluN2 (in blu; Modificato da Vyklicky et al., 2014).

cellulare (ATD) collegato a un dominio di legame del ligando extracellulare (LBD) bi-lobato (S1-S2), che a sua volta è collegato a un dominio transmembrana (MD) composto da 4 eliche (M1, M3, M4, M2) formanti parte del canale ionico. Le eliche comunicano a turno con un dominio C-t (CTD) intracellulare. I recettori funzionali sono eterotetrameri costituiti da 2 subunità NR1 obbligatorie, combinate con 2 subunità NR2 e/o NR3, anche se GluN1/GluN2 è fisiologicamente più importante di GluN1/GluN3 (Fig. II.2B). L'attivazione del primo richiede 2 molecole di Gly e 2 di Glu, mentre il secondo richiede solo Gly. Anche altre molecole agoniste possono attivare i NMDARs come ad esempio la D-serina, L-serina, D-alanina e L-alanina (Vycklicky et al., 2014).

I NMDARs svolgono un ruolo importante nel promuovere il potenziamento a lungo termine (LTP), determinando un aumento progressivo dell'efficacia sinaptica soprattutto a

livello HIP, favorendo apprendimento e memoria. Studi hanno dimostrato che sia il blocco farmacologico del NMDAR, che la sua assenza in topi mutanti, impedivano l'induzione del LTP e determinavano un indebolimento di molte forme di apprendimento (Zito, 2009). D'altra parte un'eccessiva attivazione di questi recettori può causare morte neuronale per eccitotossicità, come riscontrato in una serie di disturbi neurodegenerativi tra cui l'ischemia cerebrale, l'ipossia, malattie autoimmuni ed encefalomyelite in cui si rilevano elevate concentrazioni (mM) di Glu (Benveniste, 2009; Shijie et al., 2009). Si ritiene che a essere responsabile degli effetti neurotossici dei NMDARs sia l'eccessivo influsso di Ca^{2+} da loro mediato. Infatti, mentre in concentrazioni fisiologiche il Glu stimola un influsso di Ca^{2+} tale da attivare l'elemento di legame che risponde all'adenosina monofosfato ciclico o cAMP (CREB), potenziando la produzione di BDNF che promuove la crescita cellulare, l'influsso eccessivo di Ca^{2+} causa la disattivazione di CREB e di conseguenza l'inibizione dell'espressione del BDNF con effetti deleteri sulla crescita cellulare (Zito, 2009).

II.2.1 NMDARs e ischemia cerebrale

L'eccessiva attivazione dei NMDARs inducendo eccitotossicità, provoca morte cellulare e contribuisce alla degenerazione neuronale che si osserva nell'ischemia (Di Vito et al., 2014). È stato visto, infatti, che in colture neuronali sottoposte a ischemia, l'eccitotossicità favorisce l'attivazione di proteasi Ca^{2+} dipendenti, come la calpaina, che comporta la proteolisi della regione C-t delle subunità NR2A e NR2B. In questo modo, il complesso formato dalla subunità NR1 e dai frammenti N-t di NR2 diventa stabile nei neuroni overattivati e tutto ciò potrebbe rappresentare un meccanismo a feedback negativo attraverso cui può avvenire la down-regulation della funzione dei NMDARs (Gascón et al., 2005). L'elevato ingresso di Ca^{2+} che si verifica nel neurone post-sinaptico in seguito all'eccessiva attivazione dei NMDARs, oltre che della down-regulation di NR2, è responsabile anche del blocco trascrizionale della subunità NR1 (Fig. II.3). Infatti, è stato visto che in colture neuronali

corticali, concentrazioni eccitotossiche di NMDA provocano una rapida e irreversibile inibizione della trascrizione della subunità NR1, con conseguente riduzione dell'attività del recettore, in quanto la sua funzionalità è strettamente dipendente dall'esposizione dell'eterotetramero NR1/NR2 sulla membrana plasmatica. Forti diminuzioni dell'mRNA per NR1 sono evidenziabili anche in ratti in cui è stata indotta l'ischemia (Gascón et al., 2005).

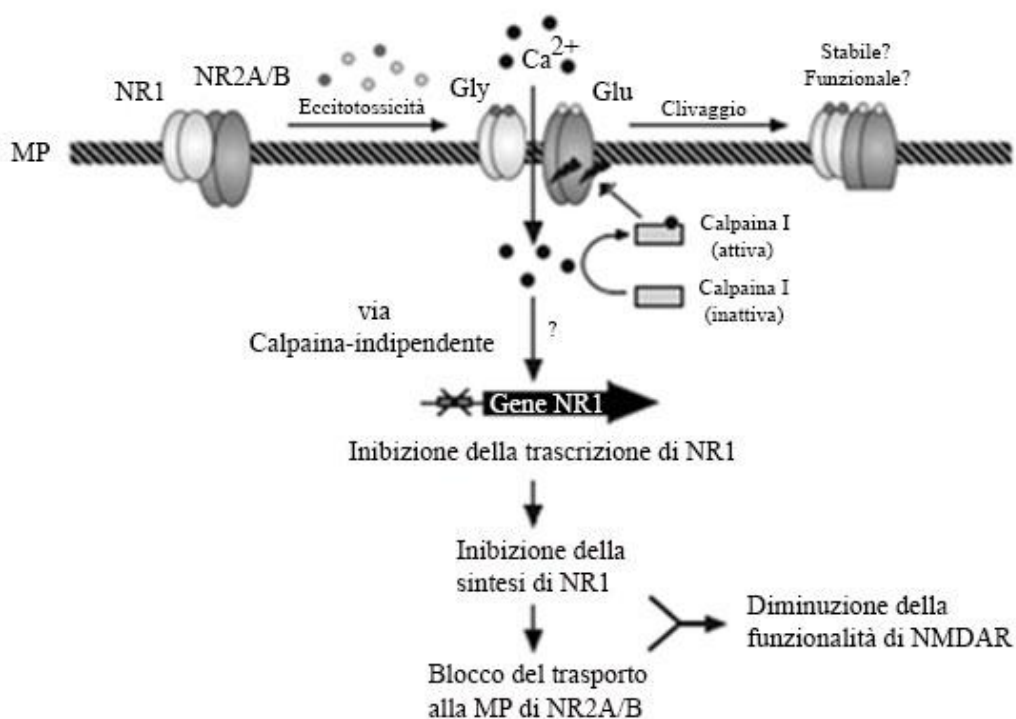


Fig. II.3 Modello di regolazione del NMDAR in condizioni di eccitotossicità e ischemia (Modificato da Gascón et al., 2005).

II.3 Il sistema orexinergico

Le ORXs, inizialmente identificate con il nome di ipocretine (Hcrt), sono implicate nella regolazione di numerosi processi fisiologici, quali: ciclo sonno-veglia, alimentazione, controllo del sistema cardiovascolare, percezione del dolore, locomozione, così come in numerose manifestazioni patologiche: stress, fenomeni di dipendenza e disordini psichiatrici come panico, ansia e depressione. Questo insieme di funzioni è coerente con la localizzazione dei neuroni ORXergici nel LH, uno dei principali siti cerebrali d'integrazione d'input sensoriali ed emotivi, e per le loro proiezioni eccitatorie diffuse in tutto il cervello. Va ricordato, inoltre, che il termine ORXs, dal greco “ορεκτέος” significa “induce l'appetito”,

si deve al gruppo di ricerca di Sakurai che scoprì questi peptidi nel 1998 nel corso di uno studio volto a individuare i ligandi, fino ad allora sconosciuti, di due recettori transmembrana accoppiati a proteine G (GPCR) e precisamente ORX1R e ORX2R (Sakurai et al., 1998). Il gruppo di ricerca di de Lecea (1998), ha isolato lo stesso trascritto precursore HTH-specifico, definendo che tale trascritto codificava potenzialmente per due neuropeptidi, che sulla base della loro localizzazione ipotalamica e della sequenza amminoacidica, simile alla secretina intestinale, sono stati identificati ipocretine 1 e 2 (hcrt-1 e hcrt-2; de Lecea et al., 1998). Il termine hcrt e ORX vengono d'ora in poi utilizzati come sinonimi.

L'orexina A (ORX-A) e l'orexina B (ORX-B) sono neuropeptidi prodotti da un precursore polipeptidico comune, la prepro-orexina (PPORX), attraverso un processo proteolitico catalizzato da una pro-ormone convertasi. La PPORX nei mammiferi (uomo, maiale, cane, ratto e topo) è costituita da 130-131 amminoacidi (aa) e il suo mRNA è espresso abbondantemente e specificatamente nel LH ed in aree cerebrali adiacenti a quest'ultimo e costituenti, nel loro complesso, il "centro dell'appetito" (de Lecea et al., 1998). Il gene umano della PPORX, localizzato sul cromosoma 17q21 (Shirasaka et al., 1999), è costituito da due esoni e un introne distribuiti su 1432 paia di basi (pb) di cui la porzione essenziale per la trascrizione è rappresentata dalle 450 pb più prossimali del gene (Kukkonen et al., 2002). Le prime 143 pb dell'esone 1 contengono la regione 5' non codificante (5'UTR), più una piccola parte della regione codificante che include i primi sette residui aa della sequenza segnale secretoria. L'esone 2 contiene la restante parte dell'open reading frame (ORF) e la regione 3' non codificante (3'UTR). L'introne è lungo 818 bp.

La presenza della PPORX è stata riscontrata oltre che nel HTH, nel nucleo subtalamico, nelle cellule ependimali (Kukkonen et al., 2002) e in parti diverse del SNC, anche nel cuore, polmone, rene, apparato digerente, ghiandole surrenali, placenta e muscolatura scheletrica (Sakurai et al., 1998; Nakabayashi et al., 2003). Mediante la tecnica della RT-PCR questo prepro-ormone è stato individuato anche nell'epididimo (Karteris et al., 2004), nelle gonadi

maschili del ratto (Barreiro et al., 2005) e nelle gonadi di pollo in entrambi i sessi. L'mRNA della PPORX è presente nel cervello dell'embrione di ratto a basse concentrazioni a partire dal 18° giorno di sviluppo ed aumenta drasticamente dalla terza settimana post natale (de Lecea et al., 1998). Esso raggiunge livelli elevati in particolari fasi della vita quali la gestazione e la lattazione (Wang et al., 2003; Kanenishi et al., 2004). A causa della sua localizzazione sul cromosoma 17, il gene dell'uomo è funzionalmente coinvolto nello sviluppo di un gruppo di malattie neurovegetative definite "chromosome 17-linked dementiae", ossia demenze correlate al cromosoma 17, comprendenti il complesso di disinibizione, il Parkinson e l'amiotrofia (Sakurai et al., 1998). E' stato, inoltre, dimostrato che l'assenza dei geni che codificano per la PPORX provoca nell'uomo manifestazioni sintomatologiche simili alla narcolessia (Peyron et al., 2000), diversa sotto il profilo patogenetico dall'analoga sindrome canina che è causata da una mutazione dei geni responsabili della produzione dell'ORX2R.

II.3.1 Neuropeptidi orexinergici

Il clivaggio di una molecola di PPORX porta alla formazione di una molecola di ORX-A e una di ORX-B anche se, tuttavia, l'espressione di quest'ultima è superiore rispetto a quella dell'ORX-A in sette aree del SNC. Le ORXs costituiscono una nuova famiglia di peptidi senza somiglianze strutturali significative rispetto alle famiglie conosciute di peptidi regolatori. L'ORX-A è un peptide di 33 aa contenente due ponti disolfuro (Fig. II.4), ha un peso molecolare di 3562 Da ed una struttura secondaria costituita da tre α -eliche delle quali la I è formata dai residui aa compresi tra Leu16 e Ala23, l'elica II è costituita dai residui aa compresi tra l'Asn25 e la Thr32, mentre l'elica III, situata a livello della porzione amminoterminale (NH₂-terminale) è una corta α -elica formata dai residui aa compresi tra la Gly6 e la Gly9. Nove residui aa, quali Leu16, Leu19, Leu20, Hys26, Gly29, Ile30 Leu31, Thr32 e Leu33, costituiscono la superficie idrofobica a livello della porzione

carbossiterminale (COOH-terminale) e sono ben conservati anche nell'ORX-B a differenza della porzione NH₂-terminale che differisce fra i due neuropeptidi (Voisin et al., 2003).

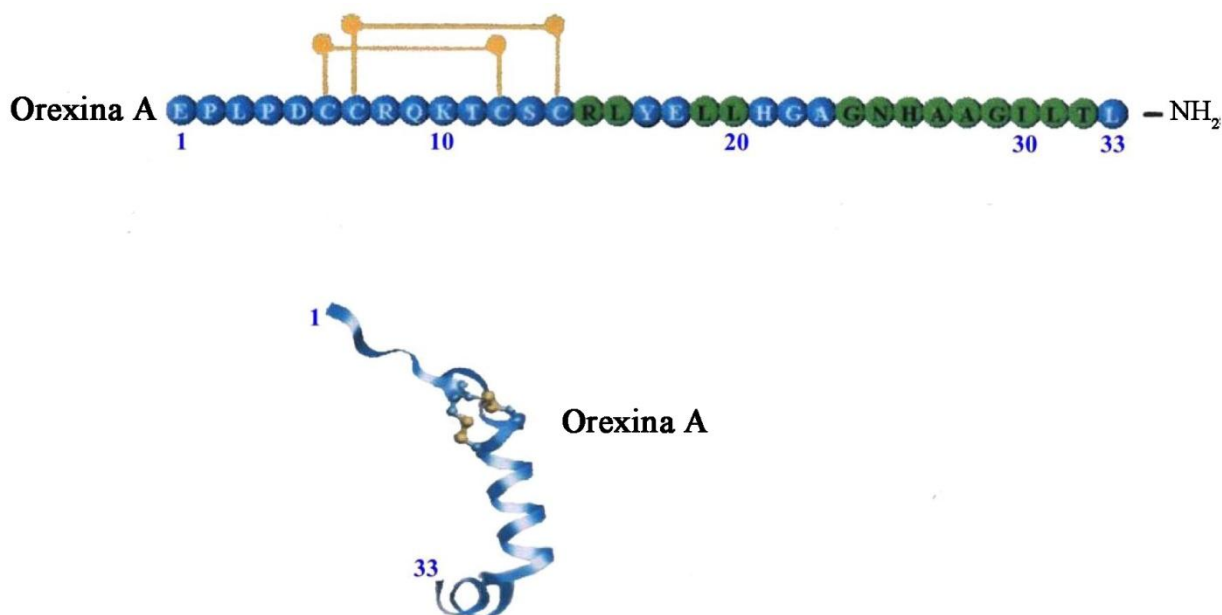


Fig. II.4 ORX-A: struttura primaria e terziaria (Modificato da Voisin et al., 2003).

L'ORX-B dei mammiferi è un peptide costituito da 28 aa (2937 Da), dotato di un terminale carbossiammidico (Sakurai et al., 1998) e la sua struttura consiste di due α -eliche connesse da un corto segmento "random coil" (Fig. II.5; Núñez et al., 2009). Confrontando la sequenza amminoacidica dell'ORX-A e dell'ORX-B umane si evidenzia una composizione identica per il 46%, tale porzione è quella responsabile del legame con l'ORX2R, mentre la rimanente porzione peptidica è responsabile del legame con l'ORX1R. Questo è il motivo per cui l'ORX-A ha un'affinità due/tre volte superiore rispetto all'ORX-B per l'ORX1R, ma mostra affinità di legame simile per l'ORX2R (Sakurai et al., 1998). Tale ipotesi è stata maggiormente avvalorata da uno studio *in vitro*, condotto su cellule ovariche di criceto cinese, che dimostra una riduzione di potenza nel legame dell'ORX-A con l'ORX1R in seguito al cambiamento della sequenza nella regione peptidica non comune, mentre la capacità di legare l'ORX2R rimane invariata (Ammoun et al., 2003). L'ORX-A nell'uomo, nel maiale, nel cane, nel ratto, e nel topo sono identiche, mentre l'ORX-B umana differisce di un aa rispetto a

quella dei suini e del cane e di due aa rispetto a quella del ratto e del topo (Kukkonen et al., 2002). Le sequenze di ORX-A e ORX-B di mammifero risultano altamente conservate anche rispetto ad altre specie, quali pesci, *Xenopus laevis* e pollo (Fig. II.6; Shibahara et al., 1999; Sakurai, 2005). È stata, inoltre, evidenziata l'importanza degli aa compresi tra le posizioni 6 e

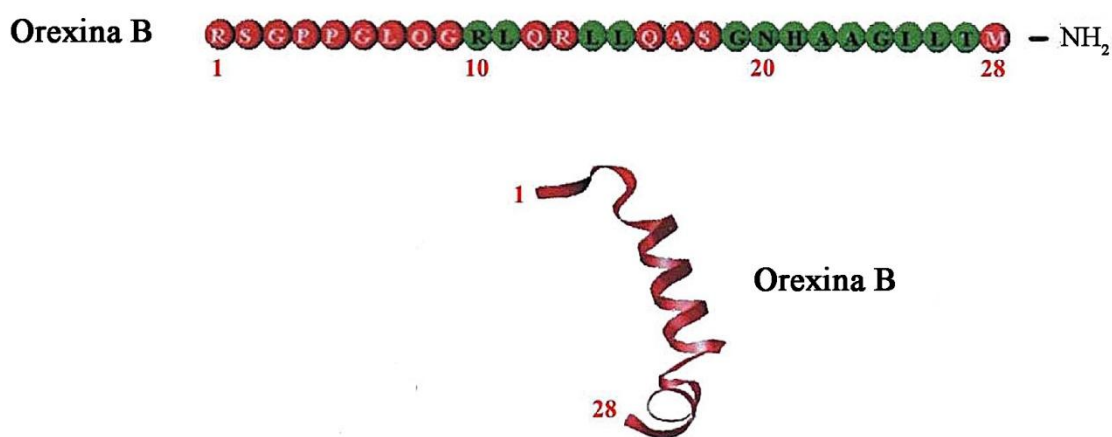


Fig. II.5 ORX-B: struttura primaria e terziaria (Modificato da Voisin et al., 2003).

14 di entrambe le ORXs per l'attivazione dei recettori, mentre non è necessario che i ponti disolfuro dell'ORX-A siano conservati e non è influente neanche la struttura terziaria (Lang et al., 2005). Per entrambe le molecole, gli aa COOH-terminali sono più importanti degli NH₂-terminali (Darker et al., 2001).

II.3.2 Recettori per le orexine

I recettori per le ORXs fanno parte della sottoclasse A delle proteine citoplasmatiche accoppiate a proteine G (Kukkonen et al., 2002) e sono detti ORX1R e ORX2R. L'ORX1R dell'uomo, accoppiato alla sottoclasse di proteine recettoriali Gq (proteine G eterotrimeriche che attivano la fosfolipasi C- PLC; Zhu et al., 2003) è costituito da 425 aa, presenta una struttura caratterizzata da sette segmenti elicoidali transmembrana (Fig. II.7), il suo gene è

localizzato sul cromosoma 1p33 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001) e la parte codificante è costituita da sei esoni (Peyron et al., 2000).

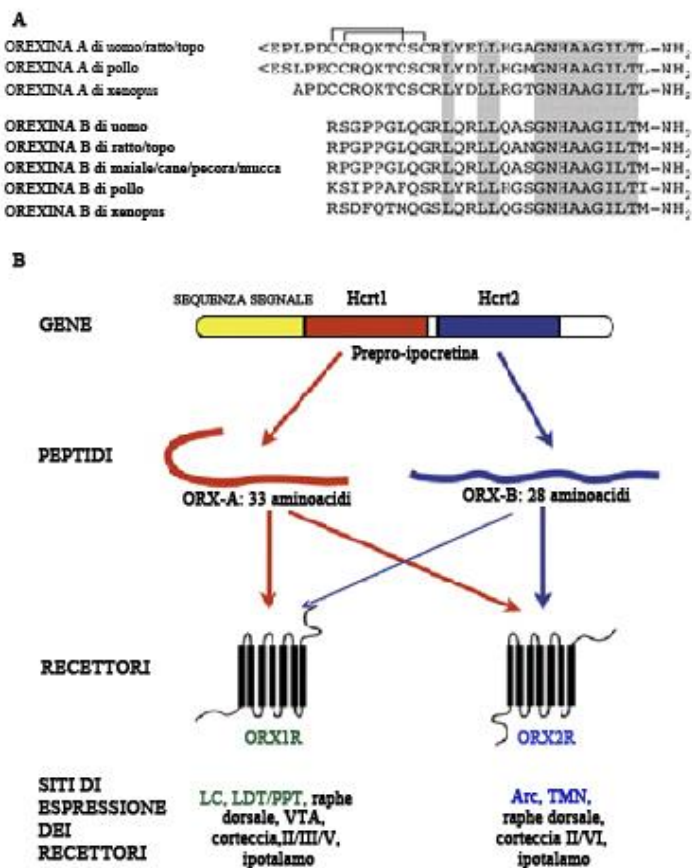


Fig. II.6 Attività del sistema ORXergico. A: sequenze aa dell'ORX-A e B. L'evidenziatura indica gli aa identici. B: le azioni delle ORXs sono mediate attraverso due recettori accoppiati alla proteina G (OX1R e OX2R). L'OX1R è accoppiato esclusivamente alle Gq, mentre l'OX2R è accoppiato alle Gi e/o Gq (Modificato da Carter et al., 2009).

L'ORX2R dell'uomo, accoppiato alle sottoclassi di proteine recettoriali Gq e/o Gi (proteine G eterotrimeriche che inibiscono l'adenilato ciclasi-AC; Zhu et al., 2003) è composto da 444 aa. Questo recettore presenta anch'esso sette eliche transmembrana (Fig. II.8), il gene relativo è localizzato sul cromosoma 6p11-q11 (de Lecea et al., 1998) e si compone di sette esoni (Peyron et al., 2000; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001). Entrambi i recettori, aventi un peso molecolare di 50 KDa (Sakurai et al., 1998), presentano comuni siti di glicosilazione e di fosforilazione per la proteina chinasi A e C (PKA, PKC) nei loops extra ed intracellulari.

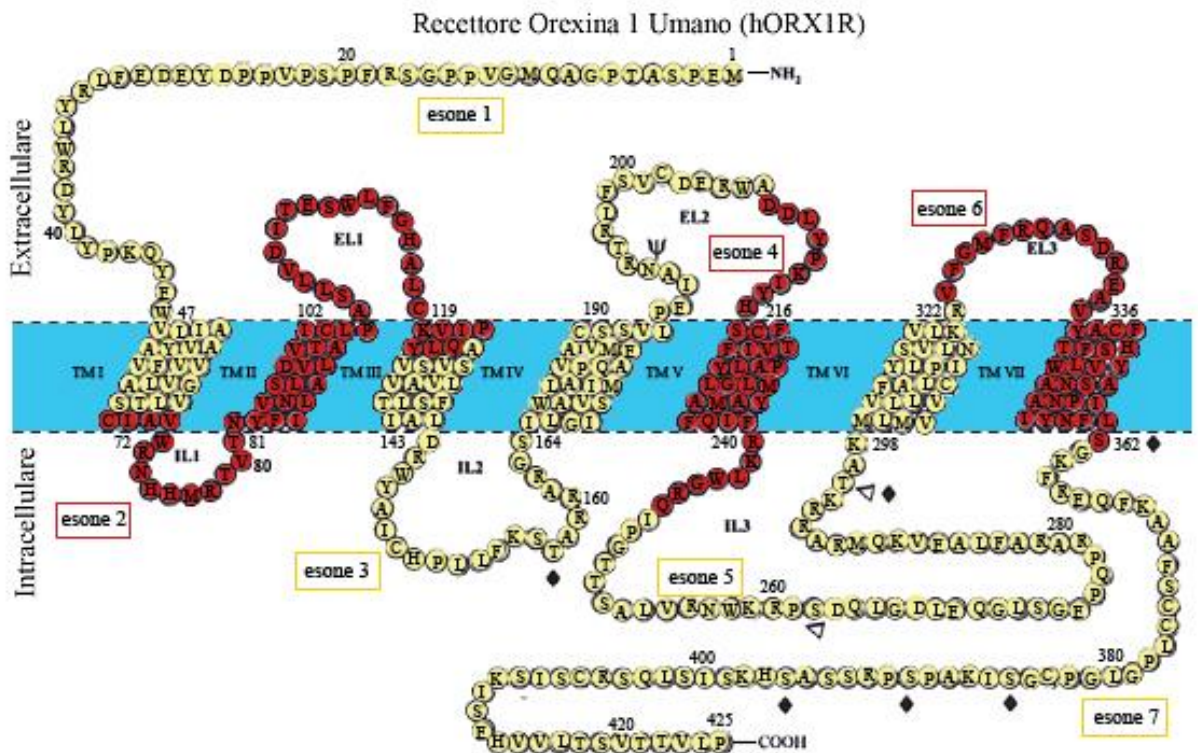


Fig. II.7 Struttura secondaria dell'ORX1R umano (Modificato da Zhu et al., 2003).

La coda COOH-terminale dei peptidi ha localizzazione intracitoplasmatica (Spinazzi et al., 2006). I due recettori mostrano omologia nella sequenza aa pari al 64% (Voisin et al., 2003) e sono altamente conservati in diverse specie di mammiferi quali l'uomo, il ratto, il topo, il cane, il suino e l'ovino (Sakurai et al., 1998; Kukkonen et al., 2002; Zhang et al., 2005). L'ORX1R, che è strutturalmente simile al recettore per il neuropeptide Y (NPY), presenta, inoltre, il 25% di similarità con il recettore per l'ormone rilasciante la tireotropina, il 23% con quello per la colecistochinina di tipo A e il 20% di similarità con il recettore per la neurochinina. Per quanto riguarda l'omologia interspecifica tra uomo e ratto è stato riscontrato il 94% di omologia per l'ORX1R e il 95% per l'ORX2R indicando un'elevata conservazione dei geni codificanti per tali recettori tra le varie specie (Marcus et al., 2001).

Nel topo sono state individuate due varianti dell'ORX2R: l'mORX2 α R, di 443 aa, e l'mORX2 β R, di 460 aa, per i quali sono stati ipotizzati due meccanismi d'azione differenti. Infatti, in caso di privazione di cibo si osserva un aumento dell'espressione genica a livello

HTH soltanto dell'mORX2βR e non della variante mORX2αR o dell'ORX1R (Chen & Randeva, 2004). Gli ORXR_s, oltre essere studiati nei mammiferi, sono stati studiati anche negli uccelli nei quali è stata identificata un'unica proteina recettoriale definita "chicken orexin receptor" (cORXR) che mostra l'80% di omologia nella sequenza aa con l'ORX2R dei mammiferi. Essa è costituita da 501 aa, codificati da 1869 pb (Okhubo et al., 2003).

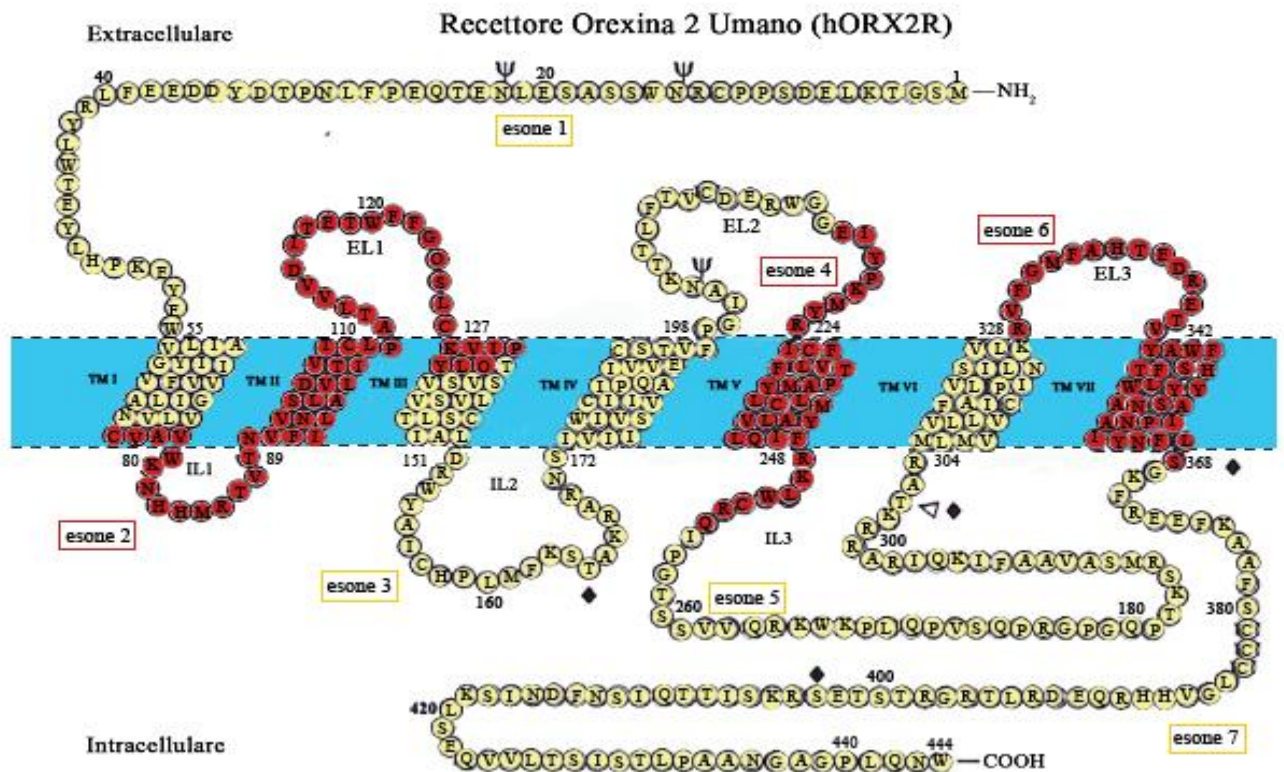


Fig. II.8 Struttura secondaria dell'ORX2R umano (Modificato da Zhu et al., 2003).

II.3.3 Meccanismo d'azione dei recettori orexinergici

Il legame delle ORXs con gli specifici recettori innesca diversi meccanismi cellulari. Tra questi va menzionato l'aumento del Ca^{2+} intracellulare, dovuto all'attivazione della PLC che catalizza la scissione del fosfatidilinositolo bifosfato (PIP_2) in inositolo trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG). Il DAG attiva la PKC, l' IP_3 determina un aumento del rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari; questo aumento porta ad un'ulteriore attivazione della PKC (Fig. II.9). La PKC e l'aumento del Ca^{2+} causano l'apertura dei canali per il Ca^{2+} voltaggio-

dipendenti, stimolando l'influsso di quest'ultimo e depolarizzazione della membrana plasmatica.

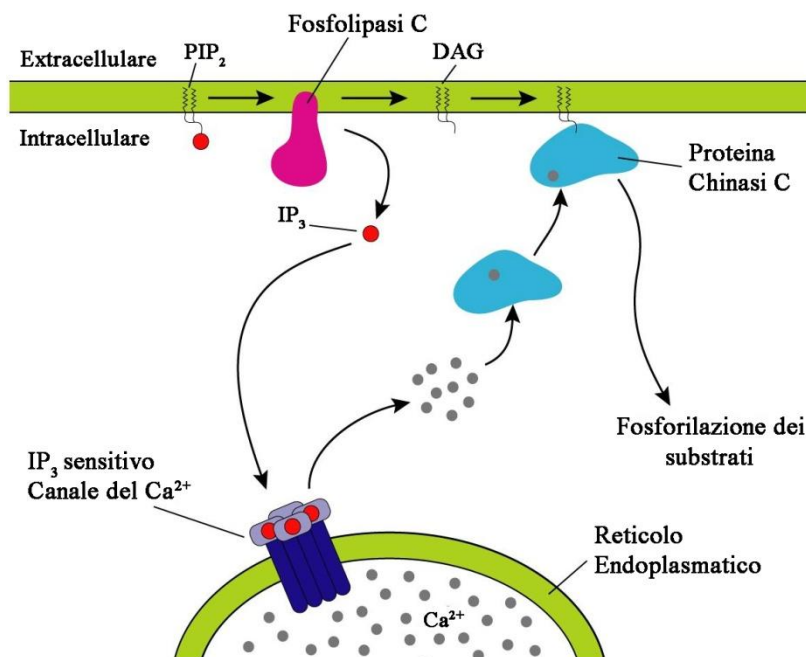


Fig. II.9 Meccanismo d'azione delle ORXs.

Gli effetti di ORX1R e ORX2R sono dovuti all'attivazione di proteine G eccitatorie (Gq/11), o nel caso dell'ORX2R, delle proteine inibitrici Gi/Go che possono causare l'efflusso di potassio (K⁺) nei neuroni con conseguente iperpolarizzazione della membrana cellulare. Altro effetto delle ORXs riguarda l'aumento dell'adenosin monofosfato ciclico (cAMP) nella corteccia surrenale dell'uomo e del ratto (Malendowicz et al., 1999; Mazzocchi et al., 2001); effetto non osservato in colture primarie di neuroni HTH di ratto, probabilmente perché in tali cellule sono presenti diverse isoforme di AC (Kukkonen et al., 2002). Va anche ricordato che il legame delle ORXs con i propri recettori influenza la plasticità sinaptica in quanto attiva le proteine chinasi coinvolte nella crescita, differenziazione e morte cellulare (MAPK). Studi recenti hanno dimostrato che la prolungata attivazione dell'ORX1R porta a morte cellulare e che la stimolazione con ORX-A causa morte cellulare ritardata indipendente dall'aumento del Ca²⁺ intracellulare. In tal caso sembra, infatti, che le MAPK, quali ERK (chinasi regolate da

segnali extracellulari che ha un ruolo protettivo) e p38 (proteina chinasi mitogeno attivata che induce morte cellulare) sono fortemente attivate dall'ORX-A (Ammoun et al., 2006).

II.3.4 Localizzazione delle orexine e dei relativi recettori nel SNC

ORX-A, ORX-B e PPORX presentano un quadro di espressione, in termini di localizzazione, alquanto simile. La maggior parte dei dati si riferisce al ratto, anche se altre specie di vertebrati presentano pattern simili. I neuroni ORXergici si trovano soprattutto nel LH, e in particolare a livello dell'eminenza mediana (ME), con estensioni al nucleo perifornicale (PeF) e all'area ipotalamica posteriore (PH; Spinazzi et al., 2006).

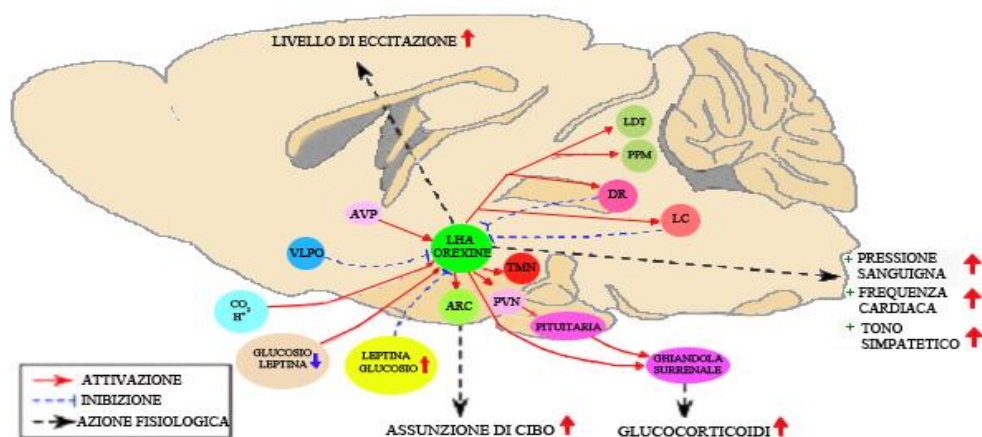


Fig. II.10 Interazioni dei neuroni ORXergici con le altre regioni del cervello e con i tessuti periferici. I neuroni ORXergici sono situati esclusivamente nel LH, ma proiettano in tutto il cervello. Le linee blu tratteggiate indicano le proiezioni inibitorie, le frecce rosse quelle eccitatorie, mentre le frecce nere tratteggiate mostrano le azioni fisiologiche di tale sistema recettoriale.

Neuroni ORXergici sono stati individuati anche a livello del HTH dorsale (DH), dorsomediale (DMH) e nel nucleo subincerto (SubI; Nixon & Smale, 2007). Da questi nuclei si dipartono fibre che proiettano in tutto il cervello (COR, bulbi olfattivi, talamo-TH- e tronco encefalico) e in altri nuclei HTH, inclusi il nucleo arcuato (Arc), il nucleo sopraottico (SO) e il nucleo paraventricolare (PVN; Spinazzi et al., 2006; Fig. II.10). Tali neuroni sono variabili nelle dimensioni (diametro del soma = 15-40µm) e nella forma (sferica, fusiforme, multipolare), non formano un nucleo distinto ma sono mescolati con i neuroni secernenti

melanina; sono presenti in numero di 1100-3400 in tutto il cervello di ratto (Kukkonen et al., 2002). E' interessante notare che alti livelli di immunoreattività per i recettori ORXergici sono stati evidenziati, mediante tecniche d'ibridazione *in situ*, a livello di area preottica, ME, Arc, LH e nucleo ventromediale ipotalamico (VMH) della stessa specie animale (Zhang et al., 2005); in particolare l'ORX1R è localizzato nel locus coeruleus (LC), nel rafe mediano e nell'Arc, mentre l'ORX2R è stato rilevato nel PVN (Russell et al., 2001b), nei neuroni istaminergici del nucleo tubero-mammillare (TMN), nel tegmento ponto-mesencefalico laterale (IPMT; Chen et al., 2013), nel prosencefalo, nel TH, nel cervelletto (Cb) e nella COR (Russell et al., 2001a; Yu et al., 2010).

La presenza dei due peptidi e relativi recettori è stata vista in aree fondamentali per il controllo del comportamento sessuale, quale l'asse HTH-ipofisi-gonadica. Studi recenti hanno dimostrato che l'espressione dell'ORX1R HTH si correla con le fasi del ciclo estrale delle femmine di ratto; l'mRNA aumenta durante il tardo proestro e nei primi giorni di lattazione. Durante la gravidanza, si ha un aumento di espressione nel PVN e durante la lattazione nel SO (Wang et al., 2003). Le ORXs sono coinvolte anche nella regolazione della funzione visiva in quanto sia loro, che l'ORX1R sono presenti nella retina umana (cellule gangliari, processi cellulari interni/esterni, strato plessiforme e fotorecettori; Savaskan et al., 2004).

II.3.5 Effetti delle orexine sull'ischemia cerebrale

Il sistema ORXergico, come ormai noto e accettato dal mondo scientifico, svolge un ruolo primario nella regolazione di diversi processi neurofisiologici quali l'alimentazione, il ciclo sonno-veglia e l'omeostasi energetica (Sakurai et al., 2007). Alterazioni dei meccanismi cellulari mediati dalle ORXs possono determinare l'insorgenza di patologie quali narcolessia (Peyron et al., 2000), emicrania e ischemia cerebrale, in quanto tali neuropeptidi sono presenti anche a livello del tronco encefalico che è una delle sedi principalmente implicata nel mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare (Irving et al., 2002; Yonekura et al., 2008).

Zhang et al. (2005) hanno dimostrato che l'ORX-A non solo è coinvolta nella regolazione cardiovascolare, ma anche nel sistema di controllo dell'attività respiratoria. Difatti, la sua somministrazione in ratti adulti aumenta la BP e la HR, riveste inoltre un ruolo neuroprotettivo contro l'ischemia cerebrale. La somministrazione icv di ORX-A in ratti MCAO determina, inoltre, una riduzione della superficie totale dell'area infartuata, a livello della quale il numero di neuroni esprimenti ORX-A è significativamente più alto rispetto al lato non ischemico. Il più alto numero di neuroni sul lato ischemico è dovuto all'attività di serotonina e grelina (Kojima et al., 1999), mentre il numero inferiore di neuroni ORXergici sul lato non ischemico è dovuto all'influenza di agenti inibitori come il GABA e la leptina (Yamanaka et al., 2003). Nella patogenesi ischemica oltre agli eventi che riguardano la sede di lesione e le sue immediate vicinanze, si sviluppa anche una forma speciale di shock, detta "*diaschisi*", che origina dalla lesione locale, ma produce effetti a distanza attraverso i nervi di collegamento.

La diaschisi è un'inibizione di aree distanti dalla sede della lesione, nelle quali si verifica una diminuzione del metabolismo dei neuroni e del flusso sanguigno. Si può affermare che tale inibizione sia una strategia biologica di difesa, causata dalla disfunzione/lesione di una regione cerebrale anatomicamente separata ma funzionalmente connessa. L'inibizione avviene in quanto alcune aree del cervello (Cb, TH, midollo, ecc.) non ricevono più informazioni dalle zone divenute silenziose a causa della lesione, ma anche per difendere le stesse strutture lesionate da un sovraccarico informativo difficilmente sopportabile. Studi dimostrano che la lesione dell'emisfero destro si traduce in danneggiamento indiretto dell'emisfero sinistro attraverso le fibre commissurali (Feeney & Baron, 1986). Questo fenomeno può essere responsabile delle variazioni del numero di neuroni ORXergici nel lato non-ischemico rispetto a quello ischemico; inoltre, l'esame delle sezioni cerebrali ischemiche non ha mostrato alcun danno neuronale diretto nel LH pertanto, è improbabile che i neuroni esprimenti l'ORX-A siano stati danneggiati direttamente da ischemia cerebrale. È stato,

invece, ipotizzato che venga compromessa in modo indiretto la funzionalità di questi neuroni e quindi tale neuromediatore potrebbe essere coinvolto nel meccanismo ischemico. In definitiva, i risultati indicano che l'ORX-A ha un effetto neuroprotettivo, limitato però alla parte periferica della regione ischemica (cioè l'area penombra; Astrup et al., 1981). Anche nella fase acuta d'ischemia cerebrale l'ORX-A potrebbe portare un aumento del BBF. Un altro ruolo importante dell'ORX-A nei confronti del danno neuronale, è quello di attivare il fattore HIF-1 α che è una componente chiave nella risposta all'ipossia. Infatti, la somministrazione esogena dell'ORX-A può attenuare un danno causato da riperfusione ischemica attraverso la stimolazione dell'espressione di tale fattore. Studi clinici hanno anche mostrato che i pattern del sonno sono alterati nei pazienti ischemici, i quali possono essere soggetti a insonnia, anche se generalmente le ischemie sono associate all'ipersonnia (Bassetti et al., 2001).

II.3.6 Orexine: controllo dell'appetito, della sete e delle dipendenze

Tra le tante funzioni svolte, le ORXs hanno anche la capacità di aumentare l'assunzione degli alimenti in varie specie animali tra cui i ratti (Sakurai et al., 1998) e gli ovini (Zhang et al., 2005); effetto che si riduce notevolmente nei ratti anziani a causa della diminuzione dei relativi recettori (Takano et al., 2004), mentre è ancora difficile spiegare perché non stimolano l'assunzione di cibo negli uccelli (Ohkubo et al., 2003). Attualmente sono noti più di cinquanta fattori cerebrali che influenzano l'assunzione degli alimenti interagendo con il sistema ORXergico, tra di essi si ricordano il NPY, la leptina, l'ormone melanocorticotropo, il peptide regolatore del gene Agouti, la galanina, la proopiomelanocortina (POMC) e la dinorfina (Taheri & Bloom, 2001; Kmiec, 2006). L'effetto paradossale riguardante l'assunzione degli alimenti si riscontra nei topi che sovraesprimono la PPORX, infatti, nonostante tali animali presentino un'accresciuta assunzione di cibo perdono progressivamente peso corporeo a causa del loro metabolismo che risulta essere decisamente superiore rispetto alla norma (Lubkin & Sticker, 1998). In seguito alla somministrazione icv di ORX-A nel nucleo dorsale

del vago si osserva una stimolazione della motilità dello stomaco (Hwang et al., 2001), della secrezione gastrica (Okumura et al., 2001) e un aumento della contrattilità del duodeno, del digiuno e dell'ileo (Sato et al., 2001). La somministrazione sottocutanea di ORX-A o di ORX-B stimola la secrezione endocrina del pancreas determinando rilascio d'insulina in modo dose-dipendente (Nowak et al., 2000), mentre la somministrazione icv di ORX-A aumenta la secrezione esocrina della ghiandola, probabilmente mediante stimolazione vagale (Miyasaka et al., 2002). Le ORXs sono inoltre implicate nel meccanismo che regola l'assunzione dell'acqua (Kunii et al., 1999) e rivestono un ruolo importante nella dipendenza dalle droghe e nell'assuefazione all'alcool (Georgescu et al., 2003), infatti trattando ratti assuefatti all'alcool con un antagonista dell'ORX1R si riesce ad abolire la loro necessità di bere (Lawrence et al., 2006).

II.3.7 Orexine e pressione arteriosa

È da sottolineare che quando l'ORX-A viene iniettata nei ventricoli cerebrali di ratti o topi svegli, questo neuropeptide determina un incremento dell'attività locomotoria associato ad aumento della Tb, della HR, della MAP (Shirasaka et al., 1999; Matsuzaki et al., 2002; Samson et al., 2007) e del flusso sanguigno nella pelle della coda, effetti cardiovascolari che sono stati osservati anche sotto anestesia (Chen et al., 2000; Hirota et al., 2003; Huang et al., 2010). Tali attività potrebbero derivare da un'azione concertata delle ORXs a più livelli del neurasse (Peyron et al., 1998). In questo caso, particolare interesse rivestono le proiezioni ORXergiche del midollo rostrale ventrolaterale (RVLM; Berthoud et al., 2005; Zheng et al., 2005; Puskás et al., 2010) in quanto regione contenente importanti centri di controllo cardiovascolare (Jansen et al., 1995; Kerman, 2008). A livello del RVLM, l'ORX-A induce una depolarizzazione neuronale dei vasopressori (Huang et al., 2010) evocando così aumenti della BP e della HR in ratti svegli o anestetizzati (Chen et al., 2000; Machado et al., 2002).

II.3.8 Orexine e ciclo sonno-veglia

E' interessante osservare che fra le diverse azioni neurofisiologiche regolate da questa classe di neuropeptidi (ORXs) vi è la capacità di controllare il ciclo sonno-veglia; attività evidenziata dalla loro cospicua espressione nel HTH e nel TH mediale di ratto durante le fasi diurne (Taheri et al., 2001). La Tb è influenzata da molti fattori fisiologici, tra cui lo stato comportamentale, l'attività locomotoria ed i ritmi biologici. Per quanto concerne l'ultima attività fisiologica e soprattutto lo stato di veglia sembra essere associato alla generazione ed alla ritenzione del calore corporeo tramite vasocostrizione cutanea, a differenza del sonno che si caratterizza da perdita di calore, dovuta a ridotta produzione dello stesso e a vasodilatazione cutanea (Mochizuki et al., 2006). Poiché i neuroni ORXergici sono attivi durante la veglia, è stato ipotizzato che la carenza di ORXs che si verifica in condizioni patologiche ridurrebbe la Tb, in particolare durante la veglia.

I ORX1Rs e ORX2Rs giocano ruoli diversi nella regolazione della veglia; topi ORX2R-KO mostrano chiare caratteristiche della narcolessia, mentre topi-KO per l'ORX1R non hanno anomalie comportamentali evidenti, fatta eccezione per la frammentazione del ciclo sonno-veglia (Zhang et al., 2013). È stato visto che mutazioni del gene per l'ORX2R provocano narcolessia nei cani (Lin et al., 1999), mentre la patologia umana sembra essere legata prevalentemente a un'anomala produzione di PPORX e di ORX-A. In topi narcolettici, privi di neuroni ORXergici, l'espressione transgenica della PPORX, così come la somministrazione di ORX-A, previene attacchi cataplettici (perdita improvvisa del tono muscolare) e altre anomalie del sonno REM (Mieda & Yanagisawa, 2004). Per cui, alterazioni nella produzione delle ORXs si correlano sia a narcolessia, che a cataplessia evidenziando un ruolo diretto del sistema ORXergico nel controllo motorio (Zhang et al., 2013). La somministrazione endovenosa di ORX-A, che attraversa liberamente la BBB, determina diminuzione della cataplessia e normalizzazione del ciclo sonno/veglia nei cani con ORX2R mutato, in modo dose-dipendente (John et al., 2000).

II.3.9 Orexine e asse ipolamo-ipofisaria

Le ORXs influenzano il funzionamento dell'asse HTH-ipofisi-surrene agendo a tutti e tre questi livelli, infatti, la somministrazione icv di ORX-A aumenta nei ratti il livello plasmatico di cortisone, corticosterone e dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH; Russell et al., 2001a; Date et al., 1999). In studi condotti su colture cellulari adrenocorticali umane e di ratto si osserva che l'aumento dei livelli degli ormoni steroidei avviene attraverso l'attivazione della cascata dell'AC e dell'IP₃ (Randeva et al., 2001), mentre in colture di cellule adrenomidollari di suino l'ORX-A stimola il rilascio di CAs, quali epinefrina e norepinefrina (Voisin et al., 2003). Da queste e altre osservazioni viene evidenziato che tale neuropeptide influenza il rilascio di ormoni ipotalamici e ipofisari nel ratto. Non si riscontra espressione di ORXs nella ghiandola pituitaria umana (Arihara et al., 2000), mentre è stato dimostrato essere prodotta nella ghiandola di altre specie di mammiferi. Per quanto riguarda i recettori ORX1R e ORX2R, tecniche di laboratorio hanno rilevato l'espressione di entrambi nella ghiandola pituitaria di ratto (Date et al., 2000; Jöhren et al., 2001, 2003), di pecora (Zhang et al., 2005), e di uomo (Blanco et al., 2001); è stato inoltre osservato che il recettore ORX1R è co-espresso con l'ormone della crescita (GH), mentre il recettore ORX2R con ACTH. Nell'ipofisi di ratto, l'espressione dell'ORX1R prevale su quella dell'ORX2R ed è superiore nei maschi rispetto alle femmine (Jöhren et al., 2001). I nuclei HTH coinvolti nella secrezione dell'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) e dell'arginina-vasopressina (AVP), contengono sia recettori sia neuroni positivi ORXergici, questo conferma il ruolo di tale sistema nel controllo del rilascio di AVP, CRH e ACTH nel ratto.

Le ORXs potrebbero mediare anche risposte allo stress. È interessante notare come questi peptidi aumentano particolari modelli stereotipati di comportamento, quali ad esempio la cura personale, il lavaggio della faccia e scavare, quest'ultima, attività che può essere collegata all'attivazione della risposta allo stress (Kukkonen et al., 2002). La somministrazione icv di ORX-A inibisce il rilascio di prolattina (Russell et al., 2000) e

diminuisce la secrezione basale del GH, senza alterare però la quantità di ormone di rilascio del GH (López et al., 2004). La somministrazione dell'ORX-A per via endovenosa provoca, invece, aumento dei livelli dell'ormone di rilascio della tireotropina e diminuzione dei livelli plasmatici dell'ormone stimolante la tiroide (Kukkonen et al., 2002; Martynska et al., 2006).

L'ORX-A stimola, inoltre, la produzione dell'ormone di rilascio dell'ormone luteinizzante in espianti HTH di ratti sia femmine che maschi e la secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (Small et al., 2003), ma tale effetto non si registra in colture cellulari HTH (Yang et al., 2005). Il sistema ORXergico è, quindi, considerato un fattore principale nell'indurre alcuni comportamenti legati all'attività riproduttiva.

II.4 Le Cromogranine

Le Cgs rappresentano la principale componente proteica acida della matrice delle vescicole secretorie di cellule neuroendocrine; implicate in numerosi processi fisiologici come l'organizzazione vescicolare, la produzione di peptidi biologicamente attivi e l'accumulo di specie solubili all'interno delle vescicole secretorie (Borges et al., 2010). La famiglia delle Cgs, anche dette granine (Mahata et al., 2010) comprende diversi peptidi quali la CgA, la cromogranina B o secretogranina I (CgB, SgI), la cromogranina C o secretogranina II (CgC, SgII), la secretogranina III (SgIII o 1B1075), la secretogranina IV (SgIV o HISL-19), la secretogranina V (SgV o 7B2), la secretogranina VI (SgVI o NESP55), la secretogranina VII (SgVII o VGF) e la secretogranina VIII (SgVIII o proSAAS).

La CgA è la prima granina a essere stata isolata, essa controlla non solo la biogenesi e la secrezione di granuli, ma esercita anche un effetto inibitorio endogeno su neuroni colinergici (Gayen et al., 2010). A livello cerebrale, la produzione e il rilascio di CgA in condizioni sane e patologiche, nonché durante i diversi stadi di sviluppo neuronale, sembrano essere regolate da fattori neurotrofici, quali il fattore di crescita delle cellule nervose (NGF) e le MAPK. Nei mammiferi, la CgA è localizzata soprattutto negli strati corticali III e V, nelle

cellule del Purkinje e nelle fibre rampicanti del Cb, nelle fibre muscoidi del giro dentato (DG) e nelle cellule piramidali del HIP, nel nucleo del tratto solitario (NTS) e nel rafe dorsale (DR). Gli alti livelli di mRNA per la CgA ritrovati nei neuroni del midollo spinale e del ponte sono probabilmente correlati alle funzioni di regolazione della BP e delle attività emodinamiche che questi siti cerebrali svolgono. Allo stesso modo, l'alta densità di trascritti per la CgA nelle diverse zone HTH quali l'MPA, LH, PVN e SO suggerisce la partecipazione di queste stazioni HTH nel controllo delle attività cardiaca e vascolare (Giusi et al., 2012).

II.4.1 Cromogranina A: struttura del gene e della proteina

Il gene umano della CgA (ChgA) è composto da 8 esoni, si estende su 15 Kb ed è stato mappato sul cromosoma 14q32. L'esone 1 codifica la regione 5'UTR e parte del peptide segnale, gli esoni II-V codificano il dominio NH₂-terminale, gli esoni VI-VII codificano per domini variabili e infine l'esone VIII codifica il dominio COOH-terminale e la regione 3'UTR. La CgA è una glicoproteina acida e idrofila, costituita da 457 aa più un peptide segnale di 18 aa per un peso molecolare di 48 KDa (Mouland et al., 1994), è espressa in modo ubiquitario nelle cellule secretorie del tessuto endocrino, neuroendocrino e nervoso (Taupenot et al., 2003). Tale polipeptide presenta regioni NH₂- e COOH-terminali altamente conservate e può formare dimeri e tetrameri in base alle condizioni cellulari di pH e concentrazioni di Ca²⁺. Presenta un unico ponte disolfuro tra la Cys1 e la Cys38 a livello della regione NH₂-terminale adibita allo smistamento del peptide stesso, mentre la regione COOH-terminale subisce delle modificazioni conformazionali responsabili a loro volta di variazioni nelle proprietà di legame di tale regione (Seung & Ferretti, 1993).

Confrontando le sequenze proteiche della CgA umana e bovina si osserva un elevato grado di conservazione nei domini NH₂- e COOH-terminale, la porzione centrale mostra invece variazioni di sequenza di circa il 30%, mentre l'omologia fra questi e il peptide murino è dell'83%. L'identificazione di proteine omologhe identificate in uccelli, rettili, pesci e anche

protozoi indica che la CgA è una proteina universale dai domini funzionali altamente conservati (Helle et al., 1990). In condizioni fisiologiche le concentrazioni della CgA nell'uomo e in altri mammiferi sono molto basse, ma questi livelli aumentano in pazienti affetti da tumori neuroendocrini, malattie neurologiche (schizofrenia ed epilessia) e neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer e sclerosi laterale amiotrofica; Aardal et al., 1996).

II.4.2 Funzioni della cromogranina A e dei peptidi derivati

La CgA si trova nelle cellule del sistema neuroendocrino diffuso ed è co-secreta con altri mediatori chimici. Dal punto di vista funzionale è coinvolta in molte attività biologiche sia intracellulari, che extracellulari: a livello intracellulare presenta una notevole capacità di aggregazione in presenza di concentrazioni millimolari di Ca^{2+} e quindi regola la formazione dei granuli secretori, mentre sul versante extracellulare funge da precursore di diversi peptidi biologicamente attivi. Negli anni 80, dopo lo sviluppo della tecnologia del cDNA e il concetto di pro-ormone introdotto da Eiden (Eiden et al., 1987), la CgA è stata identificata come precursore di molti frammenti generati dal clivaggio proteolitico tessuto-specifico operato da diverse proteasi e pro-ormone convertasi (PC1/3 e PC2) su coppie multiple di siti dibasici che si trovano lungo la sequenza della CgA (Fig. II.11; Helle et al., 2007).

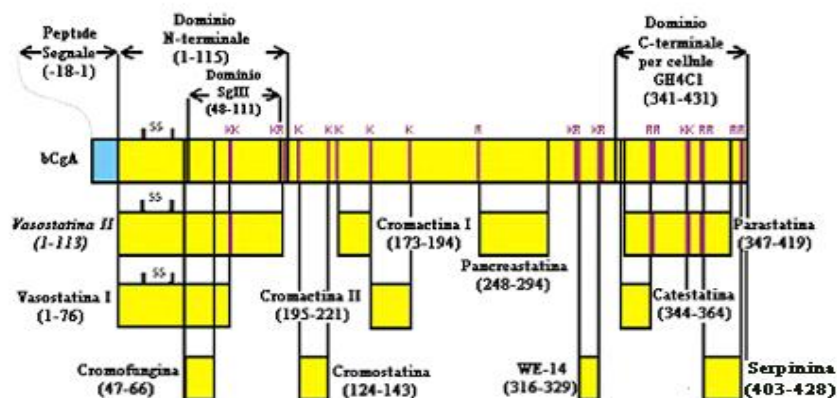


Fig. II.11 Rappresentazione schematica della struttura della CgA. La CgA bovina (bCgA) mostra un dominio funzionale e singoli residui basici come siti di clivaggio. Il dominio N-terminale (1-115) e il dominio della SgIII (48-111) sono stati caratterizzati nella CgA di ratto, ma la localizzazione di queste regioni è identica a quella della bCgA (Modificato da Koshimizu et al., 2010).

Il processo endo-proteolitico genera diversi peptidi biologicamente attivi, quali:

- betagranina (CgA₁₋₁₂₈; Schmid et al., 2007)
- catestatina (CST: umana CgA₃₅₂₋₃₇₂, bovina CgA₃₄₄₋₃₆₄; Mahata et al., 1997)
- cromacina e procromacina (Strub et al., 1996)
- cromactina I-II (CgA₁₇₃₋₁₉₄, CgA₁₉₅₋₂₂₁; Koshimizu et al., 2010)
- cromofungina (CgA₄₇₋₆₆; Lugardon et al., 2002)
- cromostatina (CgA₁₂₄₋₁₄₃; Garcia et al., 1994)
- EL-35 (CgA₃₉₂₋₄₃₉; Conlon, 2010)
- GE-25 (CgA₃₆₆₋₃₉₁; Conlon, 2010)
- pancrestatina (CgA₂₄₀₋₂₈₈; Koshimizu et al., 2010)
- parastatina (pCgA₃₄₇₋₄₁₉; Fasciotto et al., 2000)
- serpinina (CgA₄₀₃₋₄₂₈; Koshimizu et al., 2010)
- vasostatina I-II (VSTI-II: CgA₁₋₇₆, CgA₁₋₁₁₃; Aardal et al., 1993)
- WE-14 (CgA₃₁₆₋₃₂₉; Curry et al., 2002).

Tutti questi derivati glicoproteici sono in grado di regolare diverse attività fisiologiche; la CST gioca un ruolo importante nella funzione cardiaca e nella regolazione della BP, infatti mutazioni nel dominio corrispondente alla CST sul gene CgA sono associate con ipertensione nell'uomo. La pancrestatina esercita un effetto inibitorio sulla secrezione dell'insulina glucosio-stimolata, sulla glicogenolisi negli epatociti e sulla lipogenesi. La parastatina è un peptide che inibisce la secrezione del paratormone e della CgA in cellule paratiroidi. Le VSTI-II sono regolatori omeostatici del sistema cardiovascolare, infatti esse controbilanciano le risposte indotte da stress circolatorio ed attraverso una riduzione del tono muscolare vasale mantengono costante il flusso di sangue in un determinato distretto, la serpinina promuove la sopravvivenza delle cellule, la contrattilità e il rilassamento miocardico. Dal punto di vista fisiologico, la CST e la pancrestatina hanno effetti contrapposti nel metabolismo del glucosio e nella lipogenesi (Helle et al., 2007). CST e VST a livello cardiaco nei mammiferi esercitano

effetti inotropo e lusitropo negativi e per tale motivo sono considerate mediatori di un complesso sistema a feedback in grado di modulare l'attività cardiaca. Le VST possono innescare effetti cardio-protettivi simili a quelli del preconditionamento ischemico (protezione attivata prima dell'ischemia), mentre la CST è un potente agente cardioprotettivo che agisce nelle prime fasi post-ischemiche (protezione attivata al momento della riperfusione). Sia la VST, che la CST sono in grado di attivare più percorsi cardio-protettivi, ma in particolare inducono l'attivazione della via NO-dipendente che può svolgere un ruolo fondamentale nella cardioprotezione contro la riperfusione ischemica (Penna et al., 2012). La CST insieme alla pancrestatina svolge diverse attività, come la regolazione del bilancio del glucosio, della spesa energetica e dei processi che controllano il comportamento emotivo (Helle et al., 2007; Bartolomucci et al., 2011).

II.4.3 La catestatina

La CST, peptide idrofobico e cationico di 21 aa, è ottenuta dalla regione COOH-terminale della CgA in seguito al clivaggio proteolitico effettuato dagli enzimi plasmina (serina-proteasi) e catepsina L (cisteina-proteasi; Helle et al., 2007). Nell'uomo la CST presenta una struttura secondaria ripiegata e flessibile, con un loop elettropositivo ricco di Arg che stabilizza la forma idrofobica, ritenuta essenziale per l'azione inibitoria sul rilascio delle CAs. La sequenza della CST è altamente conservata in diverse specie di mammiferi e non, infatti la proteina umana mostra omologia con quella di ratto del ~86% e con le sequenze ritrovate negli uccelli (38%), nella rana (33%) e in zebrafish (19%; Bartolomucci et al., 2011). La prima molecola di CST a essere identificata e studiata è quella bovina che consente di definire tale peptide come potente antagonista non competitivo del nAChR e β agonista adrenergico. Le CAs sintetizzate nel citoplasma di cellule cromaffini vengono accumulate all'interno dei granuli a nucleo denso, attraverso trasportatori monoamminici vescicolari, dove interagiscono con la CgA che le compatta (Westermann et al., 1988; Videen et al., 1992); in seguito al

legame dell'acetilcolina (Ach) sui nAChRs, le CAs vengono co-secrete con la CgA. Una volta rilasciate nel plasma, tali molecole aumentano la BP mediante attivazione delle cellule bersaglio cardiovascolari, pertanto un aumento di tale parametro causato dalle CAs è strettamente accoppiata alla formazione di granuli a nucleo denso, a sua volta regolati dalla CgA. Il rilascio delle CAs è poi bloccato dalla CST, anch'essa secreta dai granuli cromaffini, che agisce come antagonista degli nAChRs riducendo in tal modo la BP (Fig. II.12; Taupenot et al., 2003; Mahata et al., 1997).

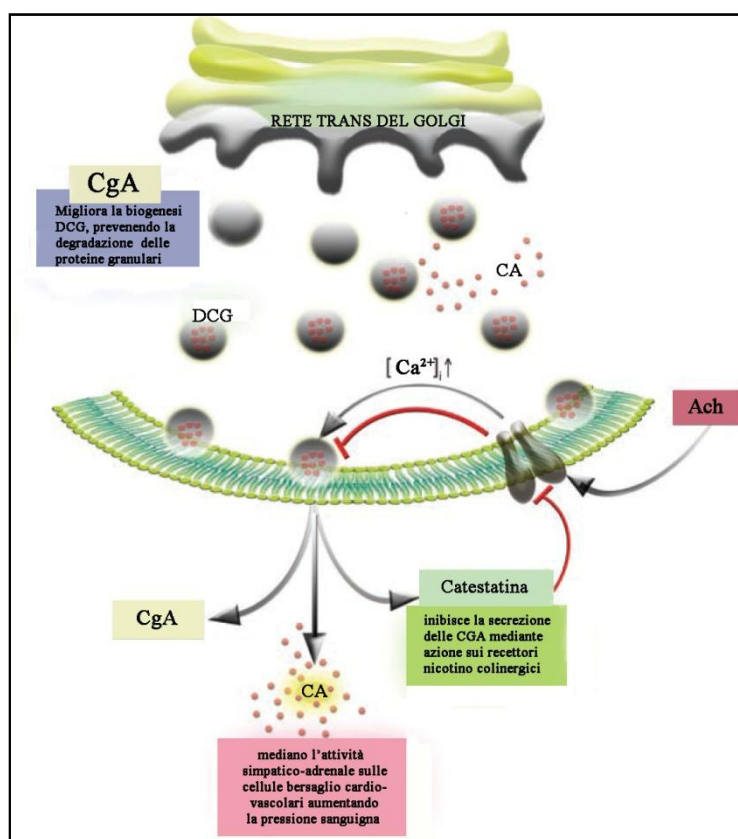


Fig. II.12 Le catecolammine (CA), sintetizzate nel citosol, vengono trasportate nei granuli secretori tramite trasportatori vescicolari monoaminici. Dopo stimolazione degli nAChRs da parte dell'Ach, le CA sono co-rilasciate con la CgA e la CST dai granuli. La secrezione delle CA provoca aumento della BP. Tale attività simpatico-adrenale viene antagonizzata dall'azione della CST sui recettori colinergici (Modificato da Kim & Loh, 2005).

II.4.4 Controllo cardiovascolare esercitato dalla catestatina

Il meccanismo fisiopatologico che correla CST e ipertensione si basa sull'iniziale osservazione che la concentrazione plasmatica di CST risulta diminuita in pazienti ipertesi e

in quelli normotesi con predisposizione genetica all'ipertensione, rispetto a pazienti controllo (normotesi). L'elevata concentrazione plasmatica di CAs, lo sviluppo dell'ipertensione in topi CgA-KO e il loro successivo recupero in seguito a iniezione della CST o mediante espressione transgenica di ChgA, dimostrano chiaramente il ruolo di questo peptide nell'inibire l'aumento della BP. In particolare, la CST ha effetti cardiovascolari diretti e indiretti: esperimenti condotti su cuore di ratto Langerdoff perfuso dimostrano che tale peptide esercita effetti inotropo (forza di contrazione) e lusitropo (velocità di rilasciamento) negativi attraverso le vie di segnalazione β_2 -ARs-Gi/o e NO-cGMP (Mahata et al., 2010).

È noto che l'attività cardiovascolare è controllata dal sistema nervoso autonomo (SNA) mediante la regolazione del tono vascolare. In particolare, mentre il sistema simpatico produce un aumento del HR, quello parasimpatico ne provoca una diminuzione. In ratti normotesi, microiniezioni di CST nel RVLM e nel midollo caudale ventrolaterale (CVLM) hanno effetti sulla MAP. Precisamente, la somministrazione di CST nel RVLM è simpatoeccitatoria con conseguente aumento della MAP; somministrazioni di CST nel CVLM attenuano la sensibilità dei barocettori simpatici con diminuzione della MAP. Ciò suggerisce che la CST svolge un ruolo importante nel controllo di tale parametro, molto probabilmente agendo a livello centrale sulla barosensibilità (Gaede & Pilowsky, 2010, 2012). Inoltre, si ritiene che la CST contribuisca alla regolazione del tono vascolare in quanto nell'uomo una variazione genetica della CST, in particolare G364S, provoca alterazioni nella funzione dei barocettori simpatici e parasimpatici. Nello specifico, gli eterozigoti G/S presentano un aumentato indice cardiaco parasimpatico (di circa 2,4 volte) e un diminuito indice cardiaco simpatico (di circa il 26%) rispetto agli omozigoti G/G. Questa variante della CST sembra ridurre il rischio d'ipertensione, specialmente negli uomini (Mahata et al., 2010). È stato inoltre visto che la CST esercita un'azione cardioprotettiva nelle prime fasi post-ischemiche, (riperfusion) inducendo l'attivazione della via NO-dipendente (Penna et al., 2012).

II.5 Aree cerebrali implicate nel controllo della pressione arteriosa

Il cervello, e in particolare alcune aree quali tronco encefalico, ponte, HTH e amigdala (AMY), svolgono un importante ruolo omeostatico nella regolazione della funzione cardiovascolare. L'RVLM è un'area di cruciale importanza per la regolazione della BP (Ross et al., 1984; Kubo et al., 1986), infatti i neuroni qui contenuti proiettano sulle cellule delle colonne intermedio-laterali del midollo spinale da cui tra origine il flusso spinale simpatico (Amendt et al., 1979; Caverson et al., 1983; Brown et al., 1984). Innervazioni reciproche tra l'RVLM e gli altri nuclei cerebrali suggeriscono che tale nucleo non è solo una regione importante per il mantenimento del tono simpatico vasomotorio, ma è anche un centro di integrazione delle funzioni cardiovascolari e delle informazioni provenienti da nervi periferici (barocettori, chemiocettori e riflessi somatosimpatici) e da altri nuclei cerebrali. Ci sono due ipotesi principali riguardanti l'attività dei neuroni RVLM: una è che questi possono avere un'attività pacemaker (Guyenet, 1990), l'altra è l'ipotesi "rete", che suggerisce che questi neuroni sono guidati da altri neuroni del tronco cerebrale (Barman et al., 1987). L'ipotesi di pacemaker" proposta da Guyenet si basa su studi *in vitro* che affermano come l'attività basale del RVLM è determinata dall'auto-depolarizzazione intrinseca del neurone premotorio. L'ipotesi "rete" invece afferma che l'attività dei neuroni premotori, *in vivo*, dipende da input eccitatori provenienti da altri nuclei del tronco cerebrale mediante una rete oscillante. A confermare il coinvolgimento del RVLM nel controllo cardiovascolare vi è il fatto che esso ha una fonte endogena di ACh responsabile delle risposte pressorie (Ernsberger et al., 1988;) e il recettore coinvolto è principalmente il sottotipo muscarinico M2 (Arneric et al., 1990; Kubo, 1998). La stimolazione elettrica e chimica del nucleo parabrachiale laterale (LPBN) produce una risposta pressoria mediante l'attivazione dei neuroni RVLM simpatoeccitatori (Miura et al., 1991; Agarwal et al., 1993), così come la stimolazione elettrica del grigio centrale (CG; Kubo, 2000) aumenta la BP tramite l'attivazione degli stessi neuroni (Carrive et al., 1988; Verberne et al., 1992).

Il NTS è il sito primario di terminazione per più afferenze viscerali, comprese quelle coinvolte nei riflessi cardiorespiratori; esso processa nuclei e integra informazioni provenienti da afferenze sensoriali come i barocettori arteriosi e i chemocettori carotidei. I neuroni di proiezione del NTS inviano queste informazioni verso numerose regioni del cervello coinvolte nella regolazione autonoma e respiratoria (Andresen & Kunze, 1994; Spyer, 1994; Kline, 2008) e la loro attività determina l'effetto netto del NTS sulle risposte cardiorespiratorie. Una sottopopolazione di neuroni del NTS proiettati nel RVLM è attivato dall'ipossia acuta *in vivo*, come indicato dall'espressione di c-fos (marker di attivazione neuronale). È stato osservato anche che l'iniezione di vasopressina in tale regione produce aumenti della BP e del HR: ciò suggerisce che quest'ultima nella regione del NTS esercita un'azione centrale sulla circolazione. I neuroni del NTS proiettano anche sul CVLM (Bailey et al., 2006; Li & Yang, 2007) e nel PVN; il primo è un nucleo cruciale del tronco encefalico che mantiene il tono simpatico e integra le risposte del SNP e del SNC. Il segnale in uscita dal CVLM è un pathway inibitorio GABAergico che agisce per limitare l'attività dei neuroni eccitatori del RVLM, per cui l'attivazione dei neuroni del CVLM è cruciale per il funzionamento del normale riflesso simpatico barorecettoriale. Questo nucleo ha effetti opposti sulla BP e sui livelli di attività nervosa a quelli osservati nel RVLM.

L'attività tonica dei neuroni premotori simpatici del RVLM è guidata anche da neuroni situati in una terza regione della zona midollare ventrolaterale denominata midollo compresso caudale (CPA). Il CPA è una regione compressa situata nella parte esterna del CVLM che sembra essere responsabile del mantenimento della BP e del tono simpatico vasomotorio durante l'anestesia profonda, infatti, studi condotti da Gordon e McCann (1988) hanno descritto che in ratti uretano-anestetizzati la microiniezione di Glu nel CPA causa un aumento della BP mediante regolazione del RVLM, così come la caduta della BP durante l'inattivazione del CPA è in parte mediata da una diminuzione dell'attività del RVLM. Anche l'HTH svolge un ruolo importante nella regolazione della BP (Kubo et al., 2000), infatti i

neuroni del PVN proiettano verso numerose aree coinvolte nella regolazione cardiovascolare tra cui l'RVLM (Swanson et al., 1983). La stimolazione elettrica e chimica del PVN provoca risposte pressorie e aumenta l'espressione della proteina c-fos nel RVLM di ratto (Krukoff et al., 1994), suggerendo che la stimolazione del PVN guida l'attivazione dei neuroni nel RVLM. Pertanto, è possibile che la risposta pressoria indotta dalla stimolazione del PVN sia mediata dall'attivazione di meccanismi colinergici nel RVLM. In generale comunque, le aree del HTH coinvolte nella regolazione della BP sono posizionate su entrambi i lati dell'intera lunghezza del terzo ventricolo (III ventricolo). Sia l'organo subfornicale (SFO) che l'organo vascolare della lamina terminale (OVLT) contengono neuroni con granuli secretori, vacuoli e capillari fenestrati. La presenza di tali capillari permette di monitorare i livelli di sangue e di sostanze peptidiche che non possono attraversare la BBB in altre parti del SNC. Alcuni neuroni della porzione parvocellulare del PVN proiettano direttamente sul mesencefalo, altri invece hanno proiezioni che entrano in contatto diretto con l'RVLM, l'NTS (Swanson et al., 1980; Coote et al., 1998) e con i neuroni spinali simpatici pregangliari (Luiten et al., 1985, Shafton et al., 1998). Un'altra regione coinvolta nel controllo della BP è la regione anteroventrale del III ventricolo (AV3V); il termine "Regione AV3V" si riferisce al tessuto Pe che forma le pareti della porzione più anteriore e ventrale del III ventricolo. Questa regione comprende diverse strutture neurali, compresi l'OVLT, le parti ventrale e mediale del nucleo mediano preottico (MnPO, MPO) e il nucleo Pe preottico (PPO). Il MnPO sembra agire come stazione di ricezione di input umorali provenienti dal SFO e dall'OVLT, e di input neurali provenienti da barocettori arteriosi e barocettori di bassa pressione. Anche l'HTH caudale (CH) è coinvolto nella regolazione della funzione cardiovascolare e respiratoria, infatti la stimolazione elettrica di quest'area nei gatti, nei cani e nei ratti provoca aumento della BP, del HR e dell'attività nervosa simpatica (Eldridge, 1985; Barron & Heesch, 1990). Diversi studi hanno, inoltre, dimostrato che la stimolazione chimica o la disinibizione del CH induce risposte cardiorespiratorie, suggerendo che siano i neuroni qui presenti, e non le fibre di

passaggio del HTH, responsabili di tali risposte. Inoltre, gli output del CH in seguito a stress cronici come l'esercizio fisico ci permettono di comprendere la capacità del HTH di adattarsi e cambiare la propria funzionalità autonoma; a tal proposito il CH partecipa alla regolazione dell'omeostasi cardiorespiratoria che accompagna l'esercizio fisico nei ratti attraverso due meccanismi principali: il "comando centrale" e i "riflessi muscolari" (Kaufman & Forster, 1996; Waldrop et al., 1996). Il primo meccanismo consiste nell'attivazione parallela dei pathway del centro locomotore centrale e di quello cardiorespiratorio, che si traducono in aumenti simultanei e proporzionali delle azioni che essi regolano. I "riflessi muscolari", attivati dagli eventi meccanici e metabolici di contrazione muscolare, agiscono invece come un meccanismo di feedback neurale per aumentare la funzione cardiovascolare durante l'esercizio. L'attivazione indipendente del comando centrale o dei riflessi muscolari è sufficiente per indurre aumenti dell'azione cardiorespiratoria in molti modelli animali.

È interessante notare che anche alcune aree corticali (COR infralimbica (IL), COR dorsale peduncolare (DP), COR prelimbica (PL) e COR cingolata anteriore (ACC)) sono in grado di influenzare una vasta gamma di funzioni fisiologiche regolate dal SNA. La stimolazione elettrica o chimica dell'IL nei ratti e negli altri mammiferi evoca cambiamenti transitori della BP, del HR, della motilità e secrezione gastrica e dei livelli plasmatici di corticosterone; l'influenza che l'IL esercita sul SNA può essere importante anche per la regolazione cardiovascolare e nelle risposte comportamentali alla paura condizionata. Infatti è stato riscontrato che la stimolazione, suscitata da emzioni, dell'IL determina variazioni della BP e lo fa attraverso l'azione del LH e del grigio periacqueduttale.

II.6 Aree cerebrali implicate nel controllo dell'ibernazione

Ci sono varie aree cerebrali implicate nel controllo dell'ibernazione che mostrano differenze nei meccanismi molecolari alla base delle modifiche fisiologiche e funzionali che si manifestano durante tale processo adattativo. Fra le prime aree a essere attivate all'inizio di

tale processo vi sono i nuclei che regolano la Tb e il livello di attività corticale. Il nucleo reticolare talamico è coinvolto nel processo di risveglio dal sonno e la sua attivazione può essere responsabile della depressione dei meccanismi che filtrano informazioni alla COR mantenendola “addormentata”; l’attivazione del SNC all’inizio del RISV si caratterizza per il blocco del nucleo reticolare talamico e quindi della COR, che viene poi attivata subito dopo il RISV dell’animale (Bratincsák et al., 2007). Per cui, la COR è la prima area del cervello a perdere l’attività non appena l’animale entra in TORP e l’ultima a riprendere le proprie attività al momento del RISV, essa subisce inoltre ampi cambiamenti sinaptici strutturali durante il TORP che potrebbero contribuire alla cessazione delle sue attività.

La plasticità sinaptica ritrovata nella COR non si osserva nel HTH, che rimane invece sempre attivo. Tale centro diencefalico è coinvolto in molti processi potenzialmente importanti per l’ibernazione, tra cui assunzione di cibo/sensazione di sazietà, ritmi circadiani, sonno, Tb e regolazione ormonale, svolgendo un ruolo importante per l’INGR in ibernazione e orchestrando/mantenendo gli stati di TORP e RISV (Schwartz et al., 2013). L’area preottica del HTH è il centro della termoregolazione che mostra la più forte attivazione nella fase d’INGR e più tardi nel RISV, in particolare la porzione ventromediale dell’area preottica mediale (MPA), che comprende i neuroni che vengono attivati per aumentare la Tb ed è nota attivarsi se l’animale è esposto ad un ambiente caldo, ha mostrato un forte segnale durante il RISV. Durante l’ibernazione il SO è in grado di mantenere l’ibernazione per il tempo necessario ed indurre successivamente il RISV (Kilduff et al., 1990; O’Hara et al., 1999). Studi recenti hanno indicato l’HTH preottico come un’altra sede encefalica implicata nella regolazione del ciclo sonno-veglia attraverso proiezioni in regioni cerebrali che promuovono il sonno e attraverso le connessioni reciproche con il prosencefalo basale (Mohns et al., 2006).

Nell’ibernazione un ruolo importante è rivestito anche da altri nuclei HTH come l’Arc, il DMH nonché il PVN, noti soprattutto per il loro coinvolgimento nell’assunzione del cibo; durante la fase del TORP si possono verificare brevi e spontanei intervalli di RISV, durante i

quali queste aree vengono attivate determinando la necessità, per l'animale, di nutrirsi. Il PVN, inoltre, orchestra numerosi meccanismi di regolazione neuroendocrina ed è noto per rispondere a sollecitazioni come il dolore, l'immobilizzazione, l'ipoglicemia e temperature ambientali estreme (Bratincsàk et al., 2007).

I neuroni ORXergici, localizzati nel PeF, nel DH e nel LH giocano un ruolo chiave nei processi dell'attenzione e dell'eccitazione (Peyron et al., 1998), dati recenti indicano, infatti, che le adenosine esercitano un effetto sonno-favorito nel LH attraverso l'inibizione di tali recettori (Liu & Gao, 2007). Altri neurotrasmettitori possono avere ruoli specifici nell'ibernazione: i neuroni serotoninergici del rafe potrebbero essere coinvolti nell'indurre e nel regolare la fase d'INGR nel ciclo dell'ibernazione (Canguilhem et al., 1986; Haak et al., 1991), l'istamina iniettata nel HIP prolunga il periodo d'ibernazione (Sallmen et al., 2003) e infine il sistema glutammatergico dell'AMY è in grado di controllare le risposte termoregolatorie considerate vitali nei diversi stati dell'ibernazione (Alò et al., 2011). Dopo il RISV, tutti i parametri fisiologici che hanno subito un decremento nel corso dell'ibernazione ritornano a valori eutermici permettendo agli animali ormai completamente svegli di riprendere le loro attività quotidiane come indicato dalla forte attivazione dei neuroni del HTH coinvolti nei vari processi metabolici. Quindi, l'identificazione delle aree cerebrali coinvolte nell'ibernazione guiderà futuri studi volti a chiarire i meccanismi finali di regolazione di questo importante processo (Bratincsàk et al., 2007).

II.7 Aree cerebrali implicate nel controllo del feeding

La regolazione dell'appetito è il risultato di un fine bilancio neuronale derivante dall'azione di diversi neurotrasmettitori in specifiche aree cerebrali, che agiscono senza la necessità di un impegno cosciente da parte dell'animale. I meccanismi che l'organismo utilizza per regolare l'assunzione del cibo sono vari, e si ammette l'esistenza di un sistema di regolazione altamente sofisticato, localizzato prevalentemente nel HTH, che esercita una funzione

integrativa, in quanto riceve segnali neuronali, ormonali e metabolici che permettono di avere informazioni sullo stato del corpo (Smeets et al., 2012). Tale sistema, tende a mantenere un peso corporeo prefissato, allo stesso modo di come altri centri regolano altre funzioni vitali, come la Tb e la respirazione. Secondo un modello descritto da Teitelbaum e Stellar (1954), tuttora ritenuto valido, nel HTH vi sono due centri distinti che regolano la fame e la sazietà, il “Feeding Center” e il “Saziety Center”. Il “Feeding center” è costituito dal LH e la sua eliminazione determina l’instaurarsi di una condizione anoressica. Il “Saziety center” è costituito dal VMN e dal PVN, e la sua eliminazione determina obesità (Pedroso et al., 2012). Questi centri HTH devono essere intesi come “reti nervose” che, in collegamento con altre strutture (COR, sistema limbico, SNA), ricevono segnali esterni (ambientali) ed interni, e rispondono sulla base della loro recettività verso tali stimoli. Esisterebbe in altre parole una fluttuazione della recettività neuronale verso queste sensazioni, legata allo stato della massa adiposa e quindi del peso corporeo, a fattori metabolici quali i livelli ematici di glucosio (l’ipoglicemia stimola l’assunzione di cibo), di lipidi (i corpi chetonici e i prodotti catabolici degli acidi grassi deprimono l’assunzione), di aa (triptofano), di vitamina B e zinco, di fattori ormonali di origine gastrica, intestinale (colecistochinina) e pancreatica (glucagone, insulina, amilina), di fattori neurogenetici legati alla distensione gastrointestinale e infine termostatici relativi alla Tb (Arora & Anubhuti, 2006). La zona del SNC coinvolta nell’omeostasi energetica è dunque l’HTH, nell’ambito del quale l’Arc rappresenta il centro di elaborazione primaria dell’informazione. Qui arrivano, attraversando la BBB tramite carrier specifici, i diversi segnali, i quali vengono integrati tra loro originando una risposta che sarà poi inviata ai neuroni secondari. L’Arc è indicato anche come nucleo infundibolare nel cervello umano, modificando le concentrazioni di insulina e di glucosio e l’attività di diverse popolazioni neuronali all’interno di queste aree. È costituito da due diversi set di neuroni: il NPY e la POMC attraverso i quali esiste una relazione di inibizione reciproca, per cui quando uno è attivo l’altro è inibito e viceversa, infatti i neuroni NPY nell’Arc sono attivati da digiuno e

ipoglicemia, al contrario i neuroni POMC vengono attivati in seguito a sazietà, promuovendo il catabolismo e il dispendio energetico (Saderi et al., 2012).

Per quanto riguarda invece il centro che controlla l'appetito, ossia LH, è costituito da due gruppi di neuroni: quelli ORXergici e quelli produttori l'ormone concentrante la melanina (MCH), entrambi ad azione oressigenica. Tali neuroni sono espressi in modo uniforme all'interno del LH e instaurano sinapsi con diverse zone del cervello in cui si trovano i rispettivi recettori. L'azione su questi target determina salivazione, motilità gastrica e secrezione d'insulina e glucagone (ormoni pancreatici), che spingono alla ricerca di cibo (Colombo et al., 2003). I neuroni ORXergici e MCH inoltre ricevono diversi input dal NTS e dall'Arc. Anche il SO è coinvolto nell'assunzione di cibo, infatti, esso contiene un orologio interno attraverso il quale i ritmi circadiani per la maggior parte dei processi fisiologici e comportamentali vengono regolati (Nakamura, 2012).

Sebbene diverse aree del HTH rivestono un ruolo cruciale nel controllo del comportamento alimentare, esse non sono le uniche strutture del SN coinvolte in questo complesso meccanismo, esiste infatti un importante controllo extraHTH mediato dal HIP e dal nucleo dorsale del rafe. Un'altra area chiave che collega il controllo alimentare con l'umore e le emozioni è l'AMY, la quale è coinvolta principalmente con i processi emotivi e mnemonici, ma gioca un ruolo anche nell'attenzione e nell'apprendimento. L'AMY è strettamente interconnessa con l'HTH, il mesencefalo/striato, e con i percorsi limbici e corticali coinvolti nel controllo alimentare, cruciali per l'annullamento della sazietà e la promozione dell'assunzione di cibo. I nuclei centrale (Ce) e basolaterale (BLA) dell'AMY sono centri implicati nel controllo della fame, infatti recenti studi hanno evidenziato come la somministrazione dell'ORX-A e B in questi centri, nel *Mesocricetus auratus*, porta un aumento di quantità del cibo ingerito rispetto ai controlli (Avolio et al., 2012). Il tutto è confermato da studi che mostrano come stimoli avversivi da stimolazione elettrica, all'interno di questi nuclei potrebbero inibire o annullare l'assunzione di cibo (Petrovich et al., 2009).

II.8 Ipotalamo: anatomia e funzioni

L'HTH è la porzione del diencefalo localizzata sotto il TH e corrispondente al pavimento e alla parte inferiore delle pareti del III ventricolo, è la sede di regolazione delle principali funzioni vegetative e di vari processi istintivi (De Wardener, 2001). Strutturalmente è caratterizzato dalla presenza di cellule neurosecretorie specializzate, riunite in vari nuclei e fasci raccolti in territori diversi per topografia, morfologia e funzione, che controllano funzioni diverse, e suddiviso in tre gruppi: gruppo anteriore, comprendente i nuclei SO e PVN; gruppo medio o del tuber cinereum, di cui la porzione centrale è la ME; gruppo posteriore, comprendente il nucleo ipotalamico posteriore, detto anche sostanza reticolare del HTH. L'HTH è attraversato da una fitta rete di vasi sanguigni ed è collegato da fasci di fibre nervose alla COR, al TH, al corpo striato, ai centri autonomi del tronco encefalico e del midollo spinale. L'area anteriore ha un'azione prevalentemente parasimpatica e impegnata nel mantenimento dell'omeostasi interna; quella posteriore, ad azione simpatica, fornisce output autonomi ed endocrini in seguito ad attività fisiche e mentali consentendo all'organismo di adattarsi a cambiamenti interni ed esterni. Le due metà HTH vengono attraversate sagittalmente dalla colonna anteriore del fornice (fascio HIP-mammillare) che separa i territori nucleari periventricolare e mediale da quello laterale (Toni et al., 1992; Fig. II.13). Per le sue attività di controllo sul sistema neurovegetativo l'HTH è stato definito “cervello viscerale” e tra le funzioni che esso regola rientrano il metabolismo, l'HR, la BP, la dilatazione delle pupille, la sudorazione, la peristalsi intestinale, la Tb e il sonno (Felig et al., 1995). L'HTH regola le attività del SN e di quello endocrino attraverso tre diversi meccanismi: 1) modulazione della secrezione delle altre ghiandole endocrine attraverso il rilascio di fattori che inducono o inibiscono la secrezione ormonale; 2) controllo diretto sulla midollare del surrene tramite centri autonomi dedicati; 3) regolazione della secrezione ipofisaria. Le cellule secernenti del HTH riversano i loro prodotti in una rete di capillari che si riuniscono in un insieme di vene, le quali, a loro volta, si dividono nuovamente in capillari

nell'ipofisi anteriore (l'intero complesso vascolare viene definito sistema portale ipofisario), in questo modo gli ormoni HTH possono influenzare l'ipofisi anche a concentrazioni molto basse (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998). A livello della neuroipofisi, la connessione è ancora più diretta, infatti qui giungono assoni provenienti dal HTH che rilasciano l'ormone antidiuretico (ADH) e l'ossitocina. La vicinanza dell'ipofisi al HTH è fondamentale per le sue funzioni, è stato infatti verificato sperimentalmente che lo spostamento della ghiandola in un'altra sede fa diminuire o annulla completamente la secrezione ormonale.

L'HTH riceve afferenze da tutto il SN reagendo quindi a tutti i tipi di stimoli ambientali, altre afferenze provengono dal sistema limbico e segnalano lo stato emozionale dell'individuo; inoltre esso è influenzato dalle variazioni della concentrazione nel sangue di sostanze quali gli elettroliti, l'acqua e gli ormoni. Le reazioni agli stimoli ambientali possono essere distinte in tre tipi: 1) reazioni rapide attraverso il SNC o la neuroipofisi; 2) risposte ritardate dipendenti dall'adenoipofisi; 3) risposte di imprinting, ossia modificazioni permanenti del comportamento indotte da stimoli percepiti in un determinato stadio dello sviluppo. In particolare, l'HTH risponde a tutte le situazioni di stress con modalità simili, mediante quella che viene definita "sindrome generale di adattamento", caratterizzata da tre fasi: allarme, resistenza ed esaurimento (Chistiakova & Savost'ianov, 2011). La prima fase, di risposta immediata, è contraddistinta dalla secrezione di adrenalina con aumento dell'attenzione, aumento del flusso sanguigno ai muscoli scheletrici e alla cute e diminuzione del flusso stesso verso i reni e gli organi digestivi, riduzione della produzione di urina (effetto dovuto anche al rilascio di ADH dalla neuroipofisi), incremento della BP, della frequenza respiratoria e HR e mobilitazione delle riserve energetiche. Se lo stress persiste si ha una fase di resistenza, caratterizzata dalla mobilitazione delle riserve lipidiche e proteiche, indotta dalla secrezione dei fattori HTH di rilascio degli ormoni GH e ACTH, e dall'aumento dei valori ematici di glucosio. La fase di resistenza può durare per giorni, settimane o mesi, ma alla fine si ha una fase di esaurimento con l'incapacità dell'organismo di mantenere più a

lungo l'omeostasi, in tale situazione se non s'interviene rapidamente, si può giungere alla morte dell'individuo. I fattori liberatori (liberine) rilasciati dal HTH che agiscono sull'ipofisi sono: i fattori di rilascio del GH, dell'ACTH, della tireotropina (TSH), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH), dell'ormone luteinizzante (LH), della prolattina (PRL) e dell'ormone stimolante i melanociti (MSH). I fattori inibitori sono quelli del GH (somatostatina), della PRL e del MSH.

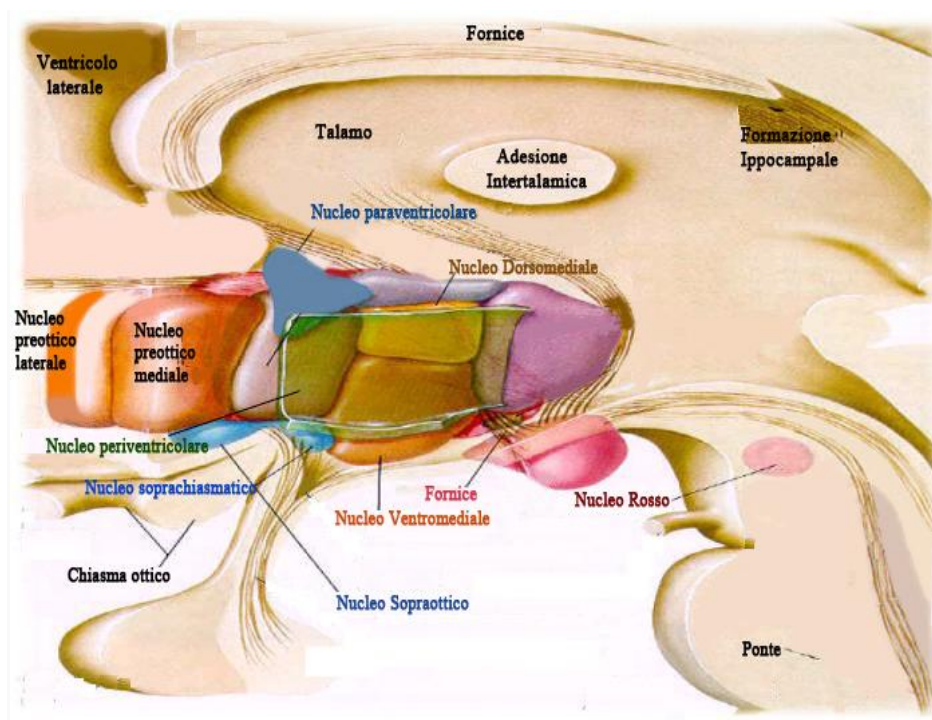


Fig. II.13 Organizzazione del HTH e nuclei in esso contenuti.

Una delle più importanti caratteristiche del HTH è l'assenza, in diverse aree, della BBB consentendo così il controllo neuroendocrino della ghiandola ipofisi. La secrezione dei fattori di rilascio HTH è regolata da un meccanismo di feedback legato alle concentrazioni degli ormoni provenienti dalle varie ghiandole endocrine, ma può essere anche indotta da agenti ambientali, come le variazioni della durata del giorno o della temperatura.

Un altro aspetto interessante riguardante l'HTH è il suo sistema di controllo sulla secrezione del GH da parte dell'ipofisi: il fattore che stimola la secrezione di tale ormone (GHRH, ormone rilasciante il GH) è prodotto dalla stessa area HTH che induce il senso di

fame in seguito a ipoglicemia. Si pensa, quindi, che gli stessi segnali che modificano i comportamenti di assunzione del cibo modifichino anche la produzione di GH. Anche i segnali HTH di stress possono alterare la secrezione dello stesso e, in effetti, si è osservato che le CAs e la serotonina, secrete da neuroni diversi del HTH, influenzano la secrezione di GH (Pinchera et al., 1991). Alcuni dei neuroni del HTH si connettono con i centri vegetativi per il controllo della vasocostrizione, della vasodilatazione e della sudorazione e con i centri somatici del brivido. Questi neuroni rappresentano i centri regolatori della Tb e hanno un ruolo cruciale nel meccanismo che serve per mantenerla nei limiti della norma. In particolare, se la temperatura esterna diminuisce, la l'HTH posteriore reagisce inducendo vasocostrizione, o anche movimenti dei muscoli (brividi) più ossidazione delle riserve energetiche, al contrario, se la temperatura aumenta, l'HTH induce sudorazione e vasodilatazione.

L'HTH influenza anche il sistema immunitario come si verifica in seguito a delle lesioni della sua parte anteriore causando una riduzione dell'ipersensibilità immediata e ritardata, mentre lesioni della parte posteriore inibiscono la produzione di anticorpi e di plasmacellule (Rivest, 2010). Lo stesso, attraverso l'ipofisi, determina ciclicità delle funzioni genitali femminili, che nei maschi è già annullata negli ultimi stadi della vita embrionale grazie alla presenza di testosterone nel sangue. Quindi, ancora prima della nascita, l'HTH è differenziato in modo diverso nei due sessi. L'ossitocina, che come si è detto è uno degli ormoni prodotti dal HTH, nelle donne stimola le cellule contrattili mioepiteliali che circondano le cellule secernenti delle ghiandole mammarie, consentendo rispettivamente l'espulsione del feto al momento del parto e la secrezione del latte (Everett & Baker, 1945; Denda et al., 2012).

II.8.1 Nucleo periventricolare ipotalamico

Il nucleo periventricolare HTH (Pe), una sottile lamina grigia che costituisce la parte più bassa del pavimento del III ventricolo. Il territorio Pe è ricco di nuclei ed è fornito di un sistema di

fibre sottoependimali che lo raccordano rostralmente al TH e caudalmente alla formazione reticolare del mesencefalo (Fig. II.13). La sua funzione è connessa a quella del sistema limbico, si trova, infatti, nel cerchio che circonda il III ventricolo e che è in parte di origine telencefalica (con la circonvoluzione del cingolo). È, inoltre, il centro di controllo viscerale del cervello e si associa alla regolazione del carattere istintivo dell'individuo e delle emozioni.

Dai neuroni parvocellulari dei nuclei Arc e Pe viene rilasciato, in modo ritmico, l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRh), conosciuto in passato come ormone di rilascio del LH (LHRH). A questo livello si ha, inoltre, rilascio di fattori liberanti e inibenti la secrezione di altri ormoni adenoipofisari quali FSH, TSH, GH, PRL e ACTH. Una leggera stimolazione del Pe può indurre atteggiamenti tipici della paura e della risposta a una punizione, a tal proposito studi recenti hanno definito tale regione come nucleo primario in cui il rilascio di gonadotropine è influenzato da stimoli ormonali e sensoriali, questi ultimi provenienti da proiezioni dalla divisione postero-dorsale del nucleo mediale dell'AMY e dai nuclei della stria terminale (BSTp; Herbison, 1998; De Vries & Simerly, 2002).

Tra le aree che influenzano il Pe, attraverso numerose proiezioni, c'è la regione AV3V che è fortemente coinvolta sia nel mantenimento dell'equilibrio idro-elettrolitico che nella regolazione cardiovascolare, e quindi giocando un ruolo critico nell'aumento della BP dipendente dal rilascio della vasopressina indotto dall'angiotensina II. Fibre efferenti dell'AV3V proiettano a nuclei prosencefalici della zona Pe e mediale che esercitano varie funzioni sul controllo endocrino e del SNA; le proiezioni predominanti sembrano innervare gruppi di cellule della zona Pe che sono modulatori primari delle funzioni neuroendocrine. Studi condotti con agonisti colinergici muscarinici, come la pilocarpina, hanno dimostrato che i relativi recettori influenzano l'attività delle aree collegate alla regione Pe causando vasodilatazione e riduzione della BP (Feigl, 1975; Inoue et al., 1984), mentre i meccanismi colinergici muscarinici centrali causano aumento della BP per aumento dell'attività simpatica e della secrezione di vasopressina (Kubo et al., 2000; Padley et al., 2007).

Il coinvolgimento del Pe anche nel controllo del feeding è confermato dalla presenza, a tale livello, di neuroni esprimenti la POMC, il NPY, la neurotensina e la grelina che mediano le risposte anoressigeniche indotte dall'exendina-4 che agendo sui recettori glucagone-like peptide-1, ha la capacità di inibire lo svuotamento gastrico, ridurre l'assunzione di cibo e indurre sazietà (Ahima et al., 2001; Sandoval et al., 2008). Per quanto concerne invece la sua implicazione con la regolazione del ciclo sonno/veglia è stata documentata la presenza al suo interno di proiezioni del nucleo soprachiasmatico, che è il sito principale dell'orologio circadiano (Deurveilher & Semba, 2003). Questi studi dimostrano che il Pe e l'area circostante (AV3V), attraverso proiezioni con gli altri nuclei HTH e alcune aree extra-HTH, sono coinvolti in molti meccanismi fisiologici che controllano l'assunzione di cibo, di acqua, la riproduzione, e soprattutto la funzione cardiovascolare.

II.9 Ippocampo: anatomia e funzioni

L'HIP è situato nella zona mediana del lobo temporale, fa parte del sistema limbico ed è implicato nei processi di apprendimento e memoria. L'apprendimento è il processo attraverso cui nuove informazioni sono acquisite dal SN, mentre la memoria è il meccanismo di immagazzinamento e/o di richiamo di tali informazioni. L'HIP, particolarmente sviluppato nei mammiferi, presenta la caratteristica struttura ricurva ("a cavalluccio marino", da cui il nome; Fig. II.14) ed è costituito da un insieme di formazioni, il giro dendato (DG), il Corno d'Ammon (CA) e il subiculum (Amaral & Lavenex, 2006). Il DG si compone di uno strato polimorfico più superficiale contenente gli assoni delle cellule dei granuli, uno strato granuloso contenente i corpi cellulari delle stesse e uno strato molecolare più interno contenente i dendriti (Amaral & Lavenex, 2006). Il CA è una voluminosa struttura, lunga circa 5 cm, che sporge nella cavità del cono temporale del ventricolo laterale. Esso si presenta espanso anteriormente e si assottiglia gradualmente nel procedere posteriormente. Il lato mediale è costeggiato dalla fimbria, un nastro di sostanza bianca che si prosegue dalle colonne

posteriori del fornice. Contiene tre regioni, la regione CA1 formata da cellule piramidali piccole, la regione CA2 e la regione CA3 formata da cellule piramidali grandi. Le regioni CA presentano diversi strati: l'alveus che è lo strato più profondo contenente gli assoni dei neuroni piramidali, cui seguono l'oriens, lo strato piramidale contenente i corpi cellulari dei neuroni piramidali, lo strato lucido che è quello più sottile presente solo nella regione CA3, lo

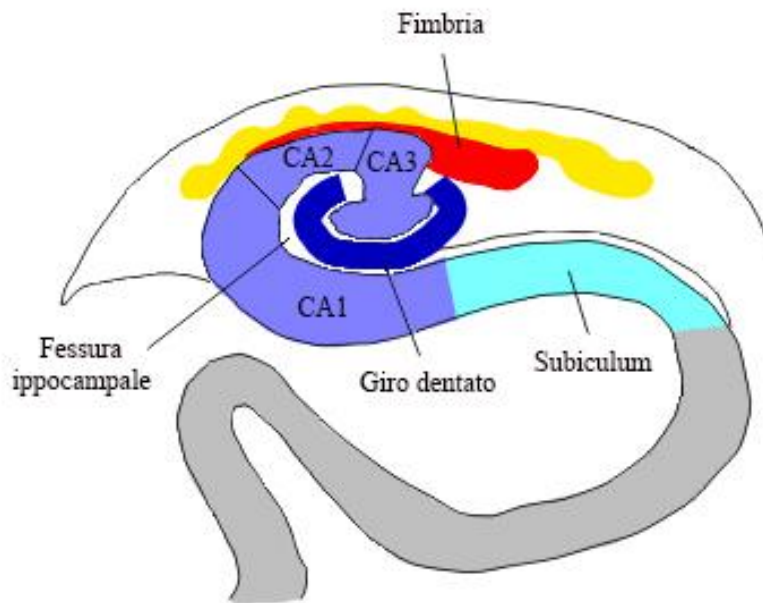


Fig. II.14 Organizzazione del HIP.

strato radiato contenente un insieme di fibre chiamate collaterali di Schaffer e lo strato lacunoso-molecolare che è quello più superficiale anch'esso contenente collaterali di Schaffer. Infine il solco ippocampale o fessura è una regione priva di cellule che separa la regione CA1 dal DG (Amaral & Lavenex, 2006). Il subiculum collega CA1 alla COR paraippocampale o entorinale rappresentando la principale uscita del circuito multisinaptico ippocampale (Cooper et al., 2005). In questo circuito, le informazioni provenienti dalle aree sensoriali e associative convergono nella COR entorinale e da qui ai neuroni del HIP. In sequenza arrivano prima alle cellule del DG, quindi alle cellule CA3 tramite le fibre muscoidi e infine alle cellule CA1 tramite le collaterali di Schaffer. Dopo l'elaborazione, l'informazione viene ritrasmessa all'area entorinale e da qui alla neocorteccia (Kenney & Gould, 2008). L'attività eccitatoria, a

questo livello, è mediata dai NMDARs, infatti, nel HIP le subunità NR2A e NR2B sono predominanti (Liu et al., 2004), e giocano un ruolo importante nella generazione della plasticità sinaptica, fondamentale per i processi di apprendimento e memoria (Zito, 2009). Ratti con alterazione del NMDAR e danni al tessuto HIP mostrano difficoltà ad apprendere e memorizzare (Faraji et al., 2008). Numerose evidenze suggeriscono come le diverse regioni del HIP possano svolgere distinte funzioni mnemoniche, quali la memoria episodica, l'apprendimento spaziale, quello contestualizzato e la memoria di lavoro. In particolare, lesioni del DG determinano deficit nella codifica della memoria spaziale (Lee & Kesner, 2002), l'area CA3 sembra essere coinvolta nelle associazioni tra particolari oggetti/odori e un determinato contesto, o ancora nell'associare un determinato contesto a un certo evento traumatico (Daumas et al., 2005); l'area CA1 riveste un ruolo importante nel formare associazioni temporali, nel consolidamento e nel recupero della memoria nonché nei processi di memorizzazione a lungo termine, come suggeriscono le sue numerose connessioni con le regioni corticali (Remondes & Schuman, 2004).

II.10 HIP e HTH: suscettibilità a danni ischemici

Simulazioni ischemiche effettuate in laboratorio su ratti, dimostrano che l'espressione di proteine pro-apoptotiche, come Casp-3 e Bax, conseguente l'evento ischemico, appare più alta nel HIP rispetto alle altre aree cerebrali. Ciò suggerisce che la severità ischemica non è uniformemente distribuita nelle varie aree cerebrali, ma vi sono siti particolarmente suscettibili a danni ischemici, e tra questi figura l'HIP (Li et al., 2009; Liu et al., 2013). A conferma di ciò, è stato dimostrato che il trattamento OGD di colture HIP di ratto provoca una rapida depolarizzazione di membrana dei neuroni piramidali (Zhang et al., 2008). La variabilità, inoltre, si osserva non solo tra le varie regioni cerebrali, ma anche all'interno di una data regione cerebrale, infatti, a livello HIP l'ordine di vulnerabilità è il seguente: CA1> CA3> DG (Schmidt-Kastner & Freund, 1991).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che invece i neuroni HTH sono più resistenti al danno ischemico (Brisson et al., 2013). Essi recuperano il potenziale di membrana dopo essere stati sottoposti a OGD probabilmente per la presenza di un'isoforma più resistente della pompa Na^+/K^+ ATPasi (Brisson & Andrew, 2012). Inoltre, l'HTH è la sede di produzione ORXergica e l'ORX-A, in particolare, riveste un ruolo neuroprotettivo contro l'ischemia cerebrale (Mele et al., 2014). L'HTH è anche sito di secrezione della grelina, per la quale sono stati riconosciuti effetti neuroprotettivi (Pawlik et al., 2011), fra l'altro quest'ultima determina un incremento del numero di neuroni esprimenti ORX-A, esercitando così un duplice effetto neuroprotettivo (Kojima et al, 1999).

II.10.1 Importanza di preservare questi centri nervosi

Tra le funzioni cerebrali complesse, una delle più affascinanti è senza dubbio la capacità di immagazzinare le informazioni scaturite dall'esperienza e di recuperare gran parte di esse in qualsiasi momento. Apprendimento e memoria rappresentano quindi, fenomeni chiave che sottostanno a tutte quelle capacità cognitive che caratterizzano gli esseri umani. Diversi studi hanno dimostrato che la precisa organizzazione strutturale e funzionale rende l'HIP particolarmente adatto allo svolgimento di tali attività, e sue lesioni compromettono questi processi con conseguente deterioramento cognitivo (Xie et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Anche le lesioni HTH si riflettono in conseguenze molto serie, considerando che tale area rappresenta il centro d'integrazione autonoma vero e proprio (Makarchenko, 1968), ossia la regione cerebrale che fornisce risposte neuroendocrine integrando segnali provenienti dall'ambiente, da altre aree cerebrali e dagli organi periferici. L'HTH influenza numerosi aspetti della vita quotidiana come l'introito alimentare e di liquidi, il dispendio energetico, il peso corporeo, la BP, la Tb, ecc., motivo per cui lesioni a suo carico possono causare una disfunzione multiorgano o MODS per il fallimento dell'asse HTH-ipofisi, disfunzioni ormonali e anomalie nella regolazione della Tb (Krahulik et al., 2010; Chen et al., 2013).

CAPITOLO III

MATERIALI E METODI

Tale lavoro di tesi è stato suddiviso in due parti distinte: studi *in vivo* (**I^a PARTE**) e studi *in vitro* (**II^a PARTE**). Nel primo caso è stata sfruttata la capacità del criceto siriano di entrare in ibernazione, consentendoci di valutare il ruolo farmacologico dell'ORX-A e della CST in un modello simil-ischemico. Nel secondo caso invece sono stati condotti studi *in vitro* previo isolamento di distinte popolazioni neuronali, poste poi in coltura in un apposito incubatore in grado di simulare una condizione ischemica. Il vantaggio di effettuare entrambi i tipi di studio sta nel fatto che nel primo caso si ottengono risultati dipendenti dalla sinergia fra il SNC e gli altri organi, nel secondo invece le risposte registrate sono indipendenti da fattori esterni alle cellule nervose sotto esame.

I^a PARTE

III.1.1 Modello sperimentale

Per questo lavoro di tesi è stato utilizzato il criceto Siriano dorato (*Mesocricetus auratus*) appartenente all'ordine dei Roditori (Tab. III.1), e ampiamente utilizzato negli studi sperimentali al pari di topo e ratto grazie ad alcune sue peculiarità: scarsa suscettibilità alle malattie spontanee, rapido sviluppo con ciclo vitale breve e capacità di entrare in ibernazione quando esposto a determinate condizioni. Il ciclo d'ibernazione rappresenta, inoltre, una condizione stato-specifica particolare per tali animali, in quanto alcune sue fasi, e in particolare la transizione torpore/risveglio, presentano delle caratteristiche simil-ischemiche che costituiscono un ottimo modello per gli studi neurodegenerativi (Canonaco et al., 2005).

REGNO	Animalia
PHYLUM	Cordata
SUBPHYLUM	Vertebrata

CLASSE	Mammalia
SOTTOCLASSE	Teri
SUPERCLASSE	Muroidei
ORDINE	Roditori
FAMIGLIA	Cricetidi
GENERE	<i>Mesocricetus</i>
SPECIE	<i>Mesocricetus auratus</i>

Tabella III.1 Classificazione sistematica di *Mesocricetus auratus*.

Tale roditore è diffuso in tutto il mondo come animale da compagnia e di ricerca ma origina da regioni desertiche dell'Asia minore. Le popolazioni selvatiche sono limitate a una piccola area del Medio Oriente, mentre la maggior parte della specie è distribuita in Siria; alcuni criceti dorati sono stati ritrovati anche in aree della Turchia orientale. Presenta media dimensione e in genere la femmina è leggermente più grande del maschio, pesa infatti dai 150 ai 190 gr contro i 120-170 gr del maschio. Il criceto dorato ha pelliccia folta e rossiccia, più chiara inferiormente, la testa è di colore dorato, mentre i fianchi sono grigio-gialli (Fig. III.1). La coda è corta e pelosa e il corpo presenta una forma tozza e robusta, con una grossa testa in cui nasconde delle tasche guanciali che servono per immagazzinare e proteggere la prole. Il cranio possiede archi zigomatici molto evidenti, il muso è ottuso, le orecchie grandi, occhi vivacissimi e scuri, di forma arrotondata, e labbra con un gran numero di vibrisse. Le zampe sono brevi, quelle anteriori tetradattili, quelle posteriori pentadattili e munite di forti unghie. Sui fianchi, all'altezza dell'ultima costola, i criceti dorati hanno delle ghiandole scure che usano per marcare il territorio. Tra i sensi presentano udito e olfatto, un senso del tatto molto

fine esercitato dalle vibrisse della regione della labbra ed anche un senso della vista molto evoluto, il criceto dorato è infatti, in grado di percepire i colori.



Fig. III.1 Esempio di *Mesocricetus auratus*.

Il carattere che contraddistingue quest'ordine di Mammiferi è la dentatura: mancano del tutto i canini e i premolari mentre gli incisivi, molto pronunciati e a crescita continua, sono foggiate a scalpello taglientissimo che gli animali utilizzano non solo per tritare il cibo, ma anche come arma di difesa. D'indole scontrosa ma non paurosa, irascibili, vivono in genere per proprio conto; crepuscolari e notturni ma capaci di svolgere piena attività anche di giorno, agili nei movimenti, buoni corridori. Il criceto dorato ha una vita media di 2 anni: in natura vive fino a 4 anni, ma in cattività massimo fino a 2-3. A causa della loro breve vita, crescono rapidamente e diventano sessualmente maturi a partire dall'età di 30 giorni. L'accoppiamento ha luogo al termine di vivaci duelli. I criceti si riproducono solo in dati periodi dell'anno, basando i loro periodi di attività sessuale sulla durata gestazionale della specie, in modo che la nascita avvenga durante la primavera o l'estate quando le risorse di cibo sono molte e le richieste energetiche per i processi omeostatici quali la termoregolazione sono basse, aumentando in tal modo il numero di calorie disponibili per supportare l'allattamento. La gestazione dura 16 giorni ed è la più breve tra i Mammiferi, fatta eccezione per i Marsupiali. Il periodo riproduttivo ha inizio all'età di appena due mesi e mezzo e la femmina può partorire da 6 a 12 piccoli per 7-8 volte l'anno. Il tempo medio per il parto è da 1,5 a 2,5 ore. I

piccoli (Fig. III.2) di colore rosa alla nascita sono ciechi, ma hanno già i denti, non hanno il pelo, e hanno un peso di soli 2 gr che aumenta progressivamente fino a raggiungere il peso dell'adulto dopo circa 2 mesi. A 2 giorni esibiscono uno strato di peluria, a 5 il pelo è totalmente formato, a 10 giorni i piccoli aprono gli occhi e incominciano a muoversi per la gabbia, a circa 15 giorni iniziano a mangiare anche cibo solido ma hanno ancora bisogno di essere allattati. Dopo tre settimane circa la cucciolata può definirsi svezzata (Huck & Lisk, 1985). I criceti sono onnivori: in natura si nutrono di alimenti di tutti i tipi, sia vegetali che animali (piante, semi, tuberi, insetti, frutta), anche se sono principalmente granivori, hanno cioè una preferenza verso i semi. Questi roditori comunicano principalmente con l'odore di marcatura, ma anche utilizzando una varietà di segnali uditivi, infatti, producono suoni scricchiolanti in diverse situazioni, in associazione con movimenti del corpo improvvisi. I criceti giovani sono in grado di produrre squittii ultrasonici che probabilmente sono importanti per le cure materne (Johnston, 1984).



Fig. III.2 Piccoli di *Mesocricetus auratus*.

Il criceto siriano, ibernante facoltativo, ha dimostrato di essere un utile modello per lo studio dei meccanismi di protezione dei tessuti e degli organi contro le lesioni dovute alla ri-perfusione post-ischemica. Quando i criceti vengono trasferiti da una stanza di allevamento eutermica con fotoperiodo “long-day” (L:D, 12h:12h) a un ambiente freddo e con fotoperiodo

breve (L:D, 20h:4h), cominciano a entrare in uno stato di torpore (TORP). È stato osservato che i criceti, allo stesso modo degli ibernanti stagionali come gli scoiattoli di terra artici, subiscono adattamenti neurali che consentono loro di entrare in TORP e di risvegliarsi anche quando le condizioni ambientali sono ancora avverse senza riportare alcun danno ischemico (Lewis et al., 2012). A tale riguardo, quello che si cerca di scoprire è se i criceti sono in grado di attivare processi neuroprotettivi che forniscono tolleranza all'ipossia.

III.1.2 Tecnica stereotassica e trattamenti farmacologici

In età adulta i criceti sono sottoposti a un intervento a livello cerebrale utilizzando uno strumento stereotassico che consente la somministrazione di piccole quantità di sostanze in determinate aree encefaliche mediante l'inserimento di una microcannula determinando effetti che risultano ovviamente limitati rispetto ad una somministrazione sistemica. In quest'ultimo caso, infatti, la sostanza iniettata attraverso la circolazione ematica, può raggiungere diverse sedi e svolgere azioni non desiderate o avere un effetto amplificato. La possibilità di raggiungere l'area d'interesse si basa sull'individuazione di punti di riferimento craniali, quali il bregma e il lambda, in base ai quali ottenere le giuste coordinate spaziali. Il bregma rappresenta la giunzione tra la sutura sagittale e coronale del cranio, mentre il lambda è la giunzione tra la sutura sagittale e lambdoidea (situata tra le ossa temporali e l'osso occipitale). Le coordinate possono essere desunte da disegni di sezioni cerebrali che nell'insieme costituiscono l'atlante stereotassico, caratteristico per ogni specie. Si possono così localizzare le strutture cerebrali attraverso le coordinate AP (antero-posteriore), ML (medio-laterale) e DV (dorso-ventrale). In questo lavoro grazie all'ausilio dello strumento stereotassico per piccoli animali, mediante l'inserimento unilaterale di microcannule sono state iniettate a livello del Pe le seguenti sostanze:

- 1 µl di ORX-A (20 nM), sciolta in una soluzione fisiologica di NaCl 0,9%;
- 1 µl di CST (50 µM), sciolta in una soluzione fisiologica di NaCl 0,9%;

- 1 μ l di co-trattamento: ORX-A + CST (40 nM e 100 μ M).

Gli animali controllo (CTRL) sono stati trattati con 1 μ l di soluzione fisiologica di NaCl 0,9%. L'intervento viene eseguito con strumentazione sterile e in condizioni asettiche per prevenire l'insorgere di setticemie. L'animale, prima dell'intervento, è stato anestetizzato iniettando una soluzione di uretano (1,3 gr/Kg – 2,5 gr/12,5 ml di NaCl 0,9%), dopodiché è stato posizionato sotto lo strumento stereotassico, facendo in modo che la testa fosse completamente immobilizzata per evitare movimenti inaspettati ed indesiderati durante l'intervento chirurgico. L'immobilizzazione viene effettuata utilizzando due barre mobili d'acciaio inserite, una per volta, nelle orecchie del criceto mentre il muso è stato saldamente bloccato in un morsetto (Fig. III.3). Successivamente si è proceduto con un'incisione longitudinale di circa 1 cm, che ha permesso di visualizzare il lambda, utilizzato come punto di riferimento per individuare le coordinate AP, ML e DV dell'area d'interesse. Le coordinate del Pe del criceto, scelte utilizzando l'atlante di Morin & Wood 2001, sono le seguenti: AP +4,1 mm, ML +0,4 mm e DV -8,3 mm.



Fig. III.3 Strumento stereotassico adatto al trattamento di piccoli roditori.

La teca cranica è stata forata in corrispondenza della coordinata raggiunta, è stata poi inserita la cannula nel foro corrispondente ed è stata stabilizzata attraverso pasta dentale liquida. La somministrazione del farmaco, effettuata mediante siringa Hamilton 30 minuti prima delle analisi comportamentali, per gli animali in fase di INGR è stata eseguita ogni 24h per tutto il periodo di osservazione, per il TORP le varie sostanze sono state iniettate, ogni 24h, per 72h dopo che l'animale è entrato in tale condizione, per il RISV l'iniezione è stata effettuata nei 90 min successivi dopo che l'animale è stato riportato a temperatura ambiente (Ta; Osborne & Hashimoto, 2004). Alla fine del periodo di osservazione, gli animali sono stati sacrificati mediante l'uso della ghigliottina, gli encefali prelevati nel minor tempo possibile sono stati congelati a -40 °C fino al momento del sezionamento al criostato in sezioni trasversali di 12 e 30 µm. In questo lavoro di tesi la cura degli animali e ogni procedura sperimentale sono state condotte in accordo con la “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” della direttiva della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC), riducendo al minimo la sofferenza degli animali e il numero di esemplari sacrificati.

III.1.3 Comportamento dei criceti durante l'ibernazione

Per lo studio della fase d'INGR, gli animali incannulati vengono separati singolarmente per gabbia e mantenuti alla temperatura di 4°C e a un ciclo di 4h luce/20h buio; il comportamento viene monitorato ogni giorno per 3 volte, per 7 giorni (Frerichs et al., 1994), durante le ore di luce. Gli animali in TORP e RISV vengono posti nelle stesse condizioni dei precedenti, con in più l'aggiunta di cotone e altro materiale utile alla costruzione del nido (Fig. III.4) nella gabbia. Fra questi ultimi, i criceti del RISV verranno posti a Ta dopo aver verificato la presenza dello stato di TORP, in modo tale da favorire l'attivazione dei vari processi metabolici. Dal momento del RISV si procederà con il monitoraggio del comportamento a 3h, 9h e 12h. Durante le sessioni di osservazioni della durata di 15 min ciascuna, sono stati valutati una serie di parametri tra cui: consumo di acqua, consumo di cibo, movimento nella

gabbia e nel nido (alzarsi, annusare e altro). In particolare per quanto concerne l'analisi quantitativa di cibo e acqua consumati, il primo giorno di osservazione ciascun animale è stato provvisto di 500 ml di acqua e 100 gr di pellet iniziali, per cui il consumo durante le fasi di INGR e RISV nei diversi trattamenti, in relazione ai loro CTRL, è stato stimato sottraendo i quantitativi rimasti dai valori iniziali.



Fig. III.4 Costruzione del nido

Al fine di procedere con le analisi morfo-strutturali e molecolari in distinte aree encefaliche del criceto dorato durante l'intero ciclo ibernante, gli animali sono stati sacrificati durante le diverse condizioni sperimentali: INGR (n=20), TORP (n= 20) e RISV (n=20). L'avvenuto ingresso nello stato di TORP è stato confermato dall'abbassamento della temperatura corporea dell'animale (5-7°C), dalla riduzione dei battiti cardiaci (3-5 al min) e dalla classica postura a gomito. Gli animali indotti al RISV sono stati sacrificati entro 12h (Osborne & Hashimoto, 2008), quando l'animale aveva già recuperato le funzioni motorie.

III.1.4 Ibridazione *in situ* non radioattiva (ISH) del recettore ORX2

L'ISH è una tecnica nella quale un filamento di acido nucleico con sequenza nota, *probe*, a singola o a doppia elica di DNA, a singola elica di RNA o un oligonucleotide ibridizza,

attraverso la formazione di legami idrogeno fra paia di basi complementari, con l'acido nucleico endogeno presente nelle sezioni di tessuto. Tale tecnica permette, dunque, di rivelare sequenze specifiche di acidi nucleici (DNA e/o RNA) in cellule e tessuti morfologicamente conservati mediante l'impiego di sonde geniche marcate con traccianti di diversa natura. Queste tecniche associano la possibilità di localizzazione, a livello microscopico e ultramicroscopico, di porzioni genomiche di origine cellulare o esogena conservando pressoché inalterata la morfologia cellulare. L'ISH richiede l'impiego di sonde geniche marcate radioattivamente oppure molecole rilevabili mediante reazioni citochimiche di affinità (es: reazioni aptene-anticorpo). A tale riguardo sono disponibili numerose molecole aptenizzate, in grado di reagire con specifici anticorpi e tra le più utilizzate citiamo la biotina (una vitamina) e la digossigenina (un aptene derivato da un alcaloide vegetale e legato mediante un braccio spaziatore di 11 atomi di carbonio alla posizione C-5 del nucleotide deossi-uridina-trifosfato). Queste molecole *reporter* sono evidenziabili nell'ibrido sonda-bersaglio mediante anticorpi specifici coniugati con enzimi. Gli enzimi maggiormente utilizzati sono la fosfatasi alcalina e la perossidasi che, in presenza di un opportuno substrato colorimetrico, producono un precipitato colorato che si deposita stabilmente nel sito di localizzazione dell'enzima. In una prima fase, le sezioni (12 µm) raccolte su vetrini polilisinati sono fissate con paraformaldeide, che consente la conservazione dell'RNA endogeno, non altera la morfologia del tessuto e garantisce una sufficiente penetrazione del probe. Per realizzare la fase di ibridazione vera e propria la sonda oligonucleotidica specifica per l'mRNA endogeno di interesse viene marcata mediante l'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), che catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati all'estremità 3'-OH libera del filamento. In questo lavoro, per la reazione di marcatura è stata utilizzata la digossigenina (DIG), un aptene derivato da un alcaloide vegetale e legato mediante un braccio spaziatore di 11 atomi di carbonio alla posizione C-5 del nucleotide deossi-uridina-trifosfato. Sezioni encefaliche di *Mesocricetus auratus* sono state utilizzate per valutare l'espressione

dell'mRNA per i diversi geni targets utilizzati in questo studio, considerando le condizioni sperimentali di INGR, TORP e RISV rispetto ai CTRL. Per tale scopo, oligonucleotidi sintetizzati con sequenza complementare e antiparallela rispetto all'mRNA dell'ORX2R (5'GAGCCCGTTTGGCTGTGCTCTTGAACATCAAAGGGTGAC3') considerate in questo studio sono stati marcati con DIG aggiungendo a 1 µl di oligonucleotide (100pmol), 4 µl di buffer TdT (potassio cacodilato 1M, Tris-HCL 125 Mm pH 6.6), 4 µl di CoCl₂, 2 µl di DIG, 1 µl di TdT e acqua distillata, fino ad un volume di 20 µl. Successivamente, tali sonde sono incubate per 30 min a 37°C e per bloccare la reazione, sono stati aggiunti 2 µl di EDTA 0.2 M pH 8.0. La presenza del probe è rilevabile nell'ibrido sonda-bersaglio in seguito a reazione con uno specifico anticorpo (1:100) coniugato alla fosfatasi alcalina, enzima che in presenza di un opportuno substrato colorimetrico costituito da una miscela di Nitroblu Tetrazolo cloruro (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato 4 toluidina (BCIP) forma un precipitato colorato che si deposita stabilmente nel sito di localizzazione dell'enzima.

Il protocollo consta di una serie di steps condotti in condizioni RNAsi-free:

- **Preparazione del tessuto:** le sezioni encefaliche (12 µm) ottenute al criostato sono state montate su vetrini polilisinati per assicurare una loro migliore adesione;
- **Reazione di marcatura della sonda:** ad 1 µl di probe (100 pmol) sono stati aggiunti 4 µl di buffer TdT (potassio cacodilato 1 M, Tris-HCl 125 mM pH 6.6), 4 µl di CoCl₂, 2 µl di DIG, 1 µl di TdT e H₂O *nucleasi-free*, fino ad un volume finale di 20 µl. Successivamente, il probe è stato incubato per 30 min a 37°C e per bloccare la reazione di marcatura sono stati aggiunti 2 µl di EDTA 0.2 M a pH 8.0;
- **Pre-ibridazione:** le sezioni sono lavate in SSC2X per 30 min e fissate in paraformaldeide 4% per 10 min, allo scopo di preservare l'integrità del tessuto. In seguito, essi sono sottoposti a tre lavaggi in PBS 1X (NaCl 1.3 M, NaH₂PO₄ 70 mM e NaH₂PO₄ H₂O 30 mM) e quindi immersi in una soluzione di acetilazione con trietanolammina 0.1 M (pH 8) ed anidride acetica 0.25% per 10 min. Segue una fase di

disidratazione con passaggi di 30 s in EtOH a diverse concentrazioni (30%, 60%, 70%, 80%, 95% e 100%). Infine, i vetrini sono ricoperti con 300 µl di buffer di preibridazione (formammide deionizzata, SSC5X, destrano solfato) per 2 h a 50°C in camera umida;

- **Ibridazione:** a ciascun buffer di pre-ibridazione viene aggiunto il probe ibridato (2,5 µl di oligo/50 µl di buffer) e DDT 50 mM in un rapporto 1:50; 100 µl di tale buffer vengono pipettati su ogni sezione e i tessuti sono incubati in camera umida overnight a 50°C;
- **Post-ibridazione:** il giorno successivo i vetrini sono lavati in SSC2X per 1 h a 50°C in continua agitazione ed in seguito immersi in NTE1X (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0 e NaCl 2.5 M) per 5 min a 37°C. Segue la fase di bloccaggio, che consiste nell'immersione dei vetrini per 50 min in una soluzione di blocking reagent (0.5%) preparato in Tris-HCl 100 mM pH 7.5 e NaCl 50mM;
- **Rilevazione immunologica:** dopo due lavaggi in buffer 1 per 2 min a Ta, i vetrini sono stati ricoperti per 45 min con 200 µl di buffer 1 in cui sono diluiti BSA 1% + Triton X100 0,3%. Successivamente, le sezioni sono state incubate per 2 h con l'anticorpo anti-DIG coniugato alla fosfatasi alcalina (1:100) diluito nello stesso buffer 1 e quindi sottoposti a tre lavaggi di 15 min in buffer 1 ed un lavaggio di 2 min in buffer 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM). Le sezioni sono state così incubate per 72 h al buio con una soluzione contenente un substrato specifico per la fosfatasi alcalina, vale a dire il colorante BCIP\NBT diluito in buffer 3 (1:1.3). Al termine di tale periodo di incubazione, la reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in una soluzione di buffer 4 (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, EDTA 1 mM) per 15 min e le sezioni sono state disidratate in EtOH. A questo punto, è stato possibile osservare la reazione immunologica al microscopio ottico Dialux EB 20 (Leitz) con obiettivo a contrasto di fase 16X. Al fine di determinare l'esistenza di variazioni

statisticamente rilevanti nell'espressione dell'mRNA per il ORX2R nei gruppi sperimentali considerati (INGR, TORP e RISV), i valori di OD ottenuti mediante analizzatore di immagine (Scion-Image 2.0) sono stati analizzati mediante ANOVA seguita da Newman-Keul's test.

III.1.5 Analisi neurodegenerativa mediante *Amino Cupric Silver Stain* (ACS)

L'ACS è una colorazione istologica che consente la valutazione del danno neurodegenerativo a uno stadio avanzato senza tuttavia distinguere tra processi apoptotici e necrotici. Tale tecnica sfrutta la capacità dei sali d'argento di reagire con i neuroni degenerati, depositandosi in essi e venendo ridotti ad argento metallico. Per tale procedura, gli encefali di *Mesocricetus auratus* congelati a -40°C per tutti i trattamenti sperimentali considerati in questo studio sono stati tagliati al criostato in sezioni di $30\ \mu\text{m}$, conservate a 4°C fino all'utilizzo.

Il protocollo sperimentale dell'ACS prevede i seguenti passaggi sperimentali:

- **Pre-impregnazione:** le sezioni sono immerse in una soluzione P di *Preimpregnazione* (nitrato d'argento, acqua distillata, dl-alanina, nitrato di rame 0.5%, nitrato di cadmio 0.5%, nitrato di lantanio 0.5%, rosso neutro 0.5%, piridina, trietanolammina, isopropanolo) a 50°C per 50 min e successivamente raffreddate a T_a per 2-3 h;
- **Impregnazione:** le sezioni sono risciacquate in acetone per 30 s ed immerse nella soluzione I di *Impregnazione* (nitrato d'argento, acqua distillata, EtOH 100%, acetone, idrossido di litio 0.4%, idrossido d'ammonio) per 45 min in costante agitazione;
- **Riduzione:** le sezioni sono trasferite in una soluzione R di *Riduzione* (formalina 10%, acido citrico monoidrato 1%, EtOH 100%, acqua distillata) a 32°C per 25 min, cui vengono aggiunti, a intervalli di 5 min e per 4 volte, 0.3 ml della soluzione I. I tessuti sono dunque trasferiti in acqua distillata e poi in acido acetico. Segue uno sciacquo in acqua per 1 h ed immersione overnight in acqua distillata;

- **Chiarificazione:** le sezioni sono ricoperte con la soluzione C1 di *Chiarificazione* (ferrocianuro di potassio 6%, clorato di potassio 4%, acido lattico) per 90 s a Ta. Dopo sciacquo in acqua distillata, esse sono ricoperte per 90 s in soluzione C2 di *Chiarificazione* (permanganato di potassio 0.06%, acido solforico 6%) e trasferite in acqua distillata (2 cambi) per 3 min a Ta;
- **Stabilizzazione:** le sezioni sono trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2%, agitate per 2 min e risciacquate in acqua distillata per 3 min; in seguito esse sono trasferite in Rapid Fixer (Kodak) per 4 min e, dopo sciacquo in acqua distillata, immerse per 20 min in rosso neutro 0.5%. Al termine della colorazione in rosso neutro, i tessuti sono disidratati (in alcol 50%, 70%, 95%, 100%) e sottoposti a differenziazione con una miscela di alcol-xylene (1:1), per completare con due immersioni in xylene puro e montaggio con DPX per l'osservazione al microscopio.

L'analisi quantitativa del contenuto di neuroni degenerati/area nelle diverse condizioni sperimentali è stata effettuata mediante la seguente formula (Giusi et al., 2008):

$$N_s = [\Sigma(N/V_{\text{section}})/n] \times V_{\text{ref}}$$

N_s = numero di cellule colorate per area; N = numero di cellule colorate per singola sezione;

V_{section} = volume della sezione; n = sezioni per area; V_{ref} = volume dell'area neuronale, utilizzando i parametri di V_{sect} e V_{ref} determinati in studi precedenti.

III.1.6 Analisi statistica

Tutte le osservazioni comportamentali effettuate durante le fasi di INGR e RISV sono state analizzate mediante il programma Etholog 2.2 (Ottoni, 2000) e i valori ottenuti per i diversi trattamenti ($\% \pm \text{s.e.m.}$) sono stati comparati rispetto ai CTRL mediante l'analisi ANOVA seguita da Newman Keul's test per valori di $p < 0.05$. I livelli di espressione del ORX2R (O.D. $\pm \text{s.e.m.}$) per criceti trattati con ORX-A, CST e ORX-A+CST, rispetto ai CTRL, sono stati calcolati mediante l'analisi ANOVA seguita da Newman Keul's test per valori di $p < 0.05$.

Anche le differenze ($\% \pm \text{s.e.m.}$) nell'analisi degenerativa sono state ottenute mediante l'analisi ANOVA seguita da Newman Keul's test per valori di $p < 0.05$.

II^a PARTE

III.2.1 Colture cellulari HIP e HTH

Una coltura di cellule *in vitro* consiste nell'isolamento delle cellule da un tessuto e nella loro crescita in presenza di tutti i fattori e i metaboliti necessari. Criceti siriani (Charles River, Germania) allo stadio di sviluppo post-natal days 1-3 (PND1-3), mantenuti in condizioni di fotoperiodo 12h:12h, sono stati sacrificati per effettuare il prelievo dell'encefalo e procedere alla dissezione del HIP e del HTH. Il mantenimento degli animali e tutte le procedure sperimentali sono stati condotti in accordo con le Linee-Guida per la Cura e l'Uso degli Animali da Laboratorio, secondo il Consiglio Direttivo della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Gli esperimenti sono stati effettuati cercando di ridurre al minimo il numero e la sofferenza delle cavie usate.

III.2.2 Dissezione HIP e HTH

Un'adeguata qualità del HIP e del HTH al momento del prelievo si rivela fondamentale per la resa cellulare al momento dell'allestimento delle colture. A tal fine, risulta estremamente importante concludere la fase del prelievo nel più breve tempo possibile. I piccoli di *Mesocricetus auratus* (PND1-3), vengono decapitati e successivamente l'encefalo è prelevato dalla scatola cranica, rimuovendo accuratamente le meningi che lo avvolgono. In seguito all'isolamento dell'encefalo, in base alla loro posizione anatomica riportata nell'atlante stereotassico di Morin & Wood (2001), si procede con la dissezione dei tessuti (HIP e HTH) mediante stereomicroscopio (10X), attraverso l'ausilio di materiale e strumenti per la dissezione, rigorosamente sterili (Fig. III.5). La dissezione viene eseguita effettuando due tagli coronali, uno in corrispondenza di Bregma e il secondo in posizione Bregma -3mm in

modo tale da ottenere una fettina, dello spessore di circa 3 mm, da cui poi isolare l'HIP (dorsalmente) e l'HTH (ventralmente). Una volta isolati, HIP e HTH vengono rapidamente immersi, separatamente, in **soluzione 1** (Neurobasal Medium A e BSA 0,02%) mantenuta in ghiaccio, che ne preserva l'integrità e la vitalità fino alla fase di dissociazione.

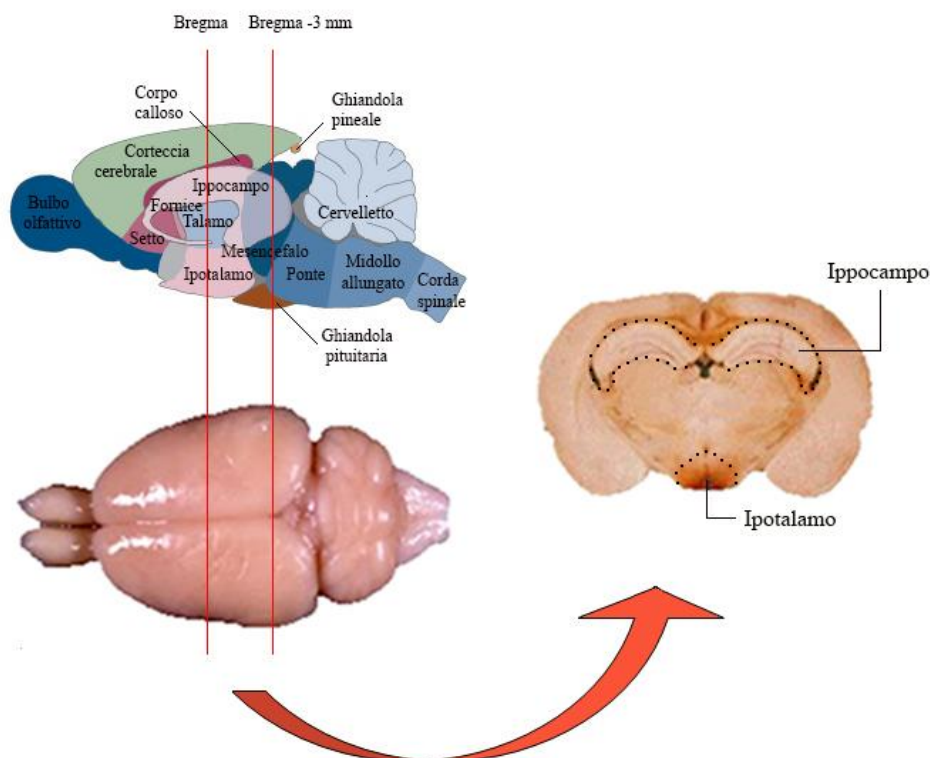


Fig. III.5 Schematizzazione della dissociazione di HIP e HTH dall'encefalo di *Mesocricetus auratus*.

III.2.3 Protocollo d'isolamento e messa in coltura delle cellule

È stato utilizzato il protocollo precedentemente ottimizzato presso il Laboratorio di Neuroanatomia Comparata, in grado di fornire una buona resa cellulare e un'apprezzabile vitalità. I campioni di HIP e di HTH, prelevati secondo la modalità sopra descritta e mantenuti in **soluzione 1**, vengono processati, separatamente, secondo le seguenti fasi sperimentali:

- 1) per la fase di digestione: dalla Falcon da 15 ml si rimuove la **soluzione 1** e si aggiunge la **soluzione 2** (Neurobasal Medium A + Papaina 0,1% + BSA 0,02%) per 20 min a 37°C;
- 2) al termine della digestione, quando i tessuti sono sedimentati, rimuovere gentilmente i

sopranatanti contenenti papaina e aggiungere la **soluzione 3** (mezzo di coltura: Neurobasal medium A + Supplemento B27 + Antibiotici + glutammina 0,5 mM + β -FGF 5 ng/ml) al sedimentato a Ta;

3) per la fase di triturazione: spipettare 40 volte con pipette di plastica monouso per dissociare gli aggregati, quindi lasciare riposare per 5 min. Rimuovere i sopranatanti e aggiungere la **soluzione 4** (Neurobasal medium + inibitore della tripsina 1% + BSA 1% + Antibiotici). Spipettare 10 volte con Pasteur di vetro e lasciare riposare per 10 min. Aspettare che gli aggregati sedimentino, prelevare con pipette Pasteur di vetro ad apertura piccola e trasferire i campioni in tubi da centrifuga da 15 ml;

4) centrifugazione: 1300 rpm per 10 min a Ta;

5) analisi della vitalità: le cellule pellettate sono risospese in mezzo di coltura (**soluzione 3**). A questo punto viene effettuata la conta cellulare secondo il metodo del Trypan Blue, per il quale il numero di cellule vive/ml = media cellule vive x 100.000;

6) piastramento: una volta effettuata la conta cellulare e determinato il numero di cellule, esse vengono piastrate con una densità di 200.000 cell/cm² in mezzo di coltura (**soluzione 3**). Ciascun pozzetto, contenente una specifica membrana adatta per la crescita di cellule neuronali, è stato in precedenza condizionato con mezzo di coltura. Per ridurre la proliferazione gliale si aggiunge AraC al 2° giorno di coltura e lo si rimuove al 4° giorno.

7) Mantenimento delle colture: il mezzo di coltura delle cellule primarie è cambiato 4 giorni dopo il terzo giorno. Per quanto riguarda il fattore di crescita β -FGF, la sua concentrazione di utilizzo è di 5ng/ml fino al 4° giorno e 10 ng/ml dopo il 4° giorno.

III.2.3.1 Simulazione dell'ischemia *in vitro*

Le cellule in coltura vengono fatte crescere all'interno di un incubatore (BINDER CO₂/O₂) in cui l'atmosfera può essere modificata a seconda delle esigenze. È possibile mantenere concentrazioni fisse di anidride carbonica (5%), a un'umidità del 90% e a una temperatura di

37°C per simulare una condizione fisiologica, che in questo studio definiamo non OGD (NOGD - No Oxygen and Glucose Deprivation); mentre per ricreare una condizione ischemica (OGD) l'O₂ presente all'interno dell'incubatore viene rimpiazzato con N₂ (5% CO₂ + 95% N₂), fermo restando i parametri di umidità (90%) e temperatura (37°C). In questo secondo caso alle cellule verrà fornito un mezzo di coltura privo di glucosio.

III.2.3.2 Trattamenti *in vitro*

Per i primi 7 giorni di crescita neuronale *in vitro* (DIV7 = stadio critico per lo sviluppo di assoni e dendriti; Giusi et al., 2009) tutte le colture sono state mantenute in condizioni fisiologiche (NOGD). Al 7° giorno alcune colture sono state esposte a OGD (90 min; Zhang et al., 2007), mentre per le altre è stata mantenuta la condizione NOGD. Al termine dei 90 minuti di simulazione ischemica il mezzo privo di glucosio è stato sostituito con quello contenente glucosio, dopodiché in alcune colture (OGD e NOGD) è stata aggiunta al mezzo di crescita CST 10 µM. Avendo quest'ultima un'emivita di 12h si è proceduto ad aggiungerla nuovamente 12h dopo la prima somministrazione. Tutte le colture sono state sacrificate a DIV8. Su alcune è stata poi condotta l'ibridazione *in situ*, su altre l'analisi morfologica.

III.2.3.3 Allestimento di co-culture HIP-HTH

In collaborazione con l'ITM-CNR (UNICAL), le cellule neuronali sono state fatte crescere su supporti a membrana al fluorocarbonio (FC) o teflon modificate: la membrana PTFE (politetrafluoroetilene; PALL Life Science) e la membrana PES (polietersulfone, PALL Life Science Supor-100 Membrane Filter 0,1 µm), entrambe permeabili all'O₂, all'anidride carbonica (CO₂) e al vapore acqueo, le cui proprietà risultano vantaggiose in quanto una diretta ossigenazione delle cellule consente loro di aderire strettamente alla superficie della membrana, condizione necessaria per una corretta maturazione neuronale (De Bartolo et al., 2007). Allo scopo di allestire sistemi di coltura combinati (co-cultura) HIP-HTH sono stati

utilizzati degli appositi inserti per colture cellulari (scaffdex, Fig. III.4:1,2,3) che, inseriti all'interno dei pozzetti di una piastra (Fig. III.6), consentono di mantenere contemporaneamente in coltura due tipi cellulari diversi, senza che si mescolino, mentre i fattori presenti nel mezzo di coltura, anche quelli rilasciati dalle stesse cellule, vengono a contatto con entrambi i tipi cellulari. In particolare, mentre la membrana PTFE è quella che viene depositata direttamente nel pozzetto, la PES viene montata all'interno dell'inserto.

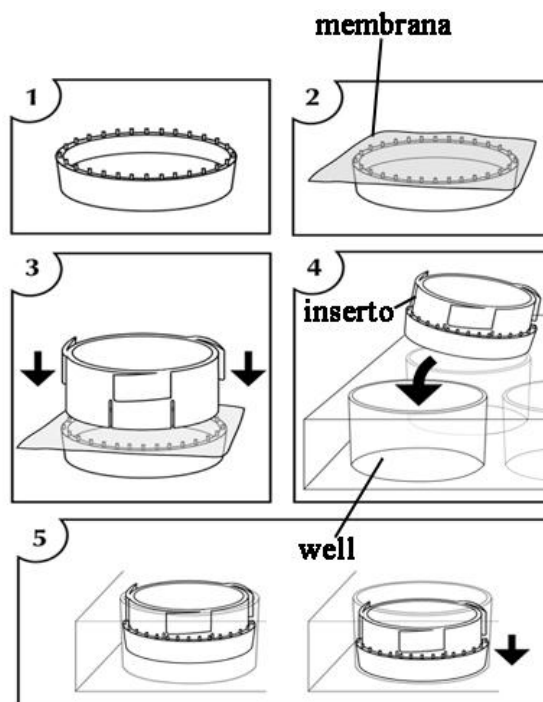


Fig. III.6 Allestimento della co-coltura. 1,2,3: montaggio della membrana all'interno dell'inserto; 4,5: inserimento dell'inserto dentro il pozzetto (well).

III.2.4 Caratteristiche delle membrane

Il PTFE è noto per la sua resistenza chimica, stabilità termica e idrofobicità, caratteristiche dovute alla struttura chimica (Fig. III.7). È un polimero semplice composto da C e F ($\text{CF}_2\text{—CF}_2$)_n. I legami C—C e C—F sono estremamente forti e gli atomi di F intorno al C formano una nube protettiva nei confronti di quest'ultimo rendendo il materiale inerte dal punto di vista chimico e apolare, ideale, quindi per molte applicazioni in ambito biologico. Infatti, vista la sua stabilità termica, la membrana PTFE può essere ripetutamente sterilizzata in autoclave,

permettendo di ottenere le condizioni di asetticità richieste per l'allestimento di colture cellulari neuronali (Wikol et al., 1998).

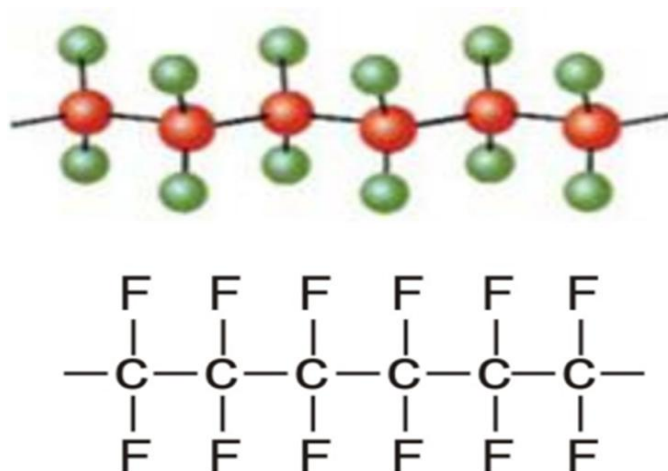


Fig. III.7 Struttura chimica di PTFE

PES è un polimero ad alte prestazioni, caratterizzato da una buona resistenza chimica e meccanica, tolleranza termica e da proprietà idrofobe, motivo per cui viene comunemente impiegato per la produzione di membrane. I gruppi aromatici, gli esteri e sulfoni che compongono questo polimero (Fig. III.8) sono responsabili dell'eccellente resistenza all'idrolisi e all'ossidazione termica (Qu et al., 2010).

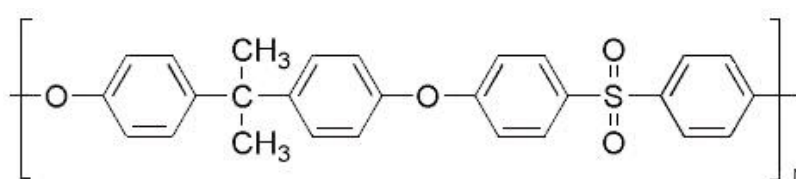


Fig. III.8 Struttura chimica di PES

III.2.5 ISH in coltura

Le colture cellulari HIP e HTH sono state testate per valutare l'espressione degli mRNA per i geni NR1, NR2A e ORX1R. Le sonde oligonucleotidiche antisense utilizzate per tale scopo sono le seguenti:

NR1: 5'AGCATTGCTGCGGGAGTCACATTCCTGATACCGAACCCATGTCT3'

NR2A: 5'TTGTAAGTGGCCTGAGTAGGTGGGCAGATTAGAAAGGCAACTT3'

ORX1R: 5'TAAAGCAGGCATAGACGGCTTCCCGGTCACTGGCTTGGCGGAACAT3'

Tali sonde sono state disegnate sulle sequenze nucleotidiche di *Mesocricetus auratus* presenti su GenBank:

Gene	NCBI Reference Sequence
NR1	XM_005083702.1
NR2A	XM_005084556.1
ORX1R	XM_005079508.1

Il procedimento sperimentale è riportato di seguito:

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

verificarsi un pieno sviluppo della colorazione: la visualizzazione di un colore “rosa-violetto” indica la corretta marcatura.

- **Fissazione.** Le cellule sono fissate in paraformaldeide 4% per 15 min (allo scopo di preservare l'integrità del tessuto) e successivamente sciacquate x3 volte in PBS 1X.
- **Permeabilizzazione.** Le cellule sono permeabilizzate in una soluzione di Triton X-100 0,2% in PBS 1X per 5 min e sciacquate 1 volta in PBS 1X.
- **Acetilazione.** Tale fase prevede l'aggiunta di una soluzione di acetilazione (0,1M di trietanolamina, 0,25% anidride acetica, pH 8,00) per 10 min e successivo sciacquo in PBS 1X.
- **Preibridazione.** Le cellule sono mantenute per 4-6 h a temperatura ambiente in un buffer contenente 50% di formammide, SSC 5X e Dextran solfato.
- **Ibridazione.** Al suddetto buffer di preibridazione viene aggiunto DTT al 2% e in più 100 ng di sonda marcata con DIG per well. La sonda va denaturata per 5 min a 80°C e successivamente posta sulle cellule per 16 h a 55 °C in camera umida.
- Al termine delle 16 h, le cellule sono sciacquate in SSC 5X e poi lasciate a Ta per 60 minuti in SSC 0.2X. Dopo l'immersione in buffer 1 (0,1M di TrisHCl pH 7.5; 0.15M di NaCl) per 5 min, le cellule sono immerse per 60 min in una soluzione di bloccaggio (0,5%) preparata in buffer 1 con aggiunta di BSA 2% e Triton X-100 allo 0,3%.
- **Rivelazione immunologica.** Le cellule sono incubate in camera umida per 3-4 h a Ta con anti-DIG (1:1000) diluito in buffer 1, cui seguono 2 lavaggi con buffer 1 per 10 min e un ultimo lavaggio di 5 min in buffer 2 (0,1M TrisHCl/0,1M NaCl/50mM di MgCl₂, pH 9,5).
- **Reazione di colorazione.** Le cellule sono coperte con un buffer di colorazione (23 µl di NBT (100 mg/ml), e 18 µl di BCPI (50 mg/ml) preparati in 5 ml di buffer 2) e mantenute al buio in camera umida overnight. La reazione di colorazione è stoppata con un buffer TE contenente 100 mM di TrisHCl pH 8,00 / EDTA 1 mM pH 8,00 per

5 min. Infine le cellule sono lavate in H₂O_s e coperte con montante coprioggetto per la visualizzazione al microscopio ottico.

III.2.6 Analisi morfologica delle colture cellulari: osservazioni al confocale

La morfologia dei neuroni è stata valutata mediante microscopio confocale. Si tratta di un microscopio ottico principalmente utilizzato per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o *in situ*, sfruttando l'immunofluorescenza. La preparazione dei campioni per l'immunofluorescenza è di seguito riportata:

CONCENTRAZIONE ANTICORPI PRIMARI	CONCENTRAZIONE ANTICORPI SECONDARI	CONCENTRAZIONE DAPI
GAP43 15µl/ml	TRITC 10 µl/ml	DAPI 20 µl/ml
β-TUBULINA 8,5µl/ml	FITC 10 µl/ml	
MAP2 10 µl/ml	TRITC 10 µl/ml	

Tab. III.2 Concentrazioni degli anticorpi primari e secondari utilizzati nella doppia immunofluorescenza.

si utilizzano anticorpi primari (Tab. III.2) diretti verso marcatori strutturali delle cellule neuronali: la GAP43 (Sigma, Italia) quale marcatore della crescita assonica, la MAP2 (Sigma, Italia) specifica per la componente dendritica, la β-tubulina (Sigma, Italia) marcatore di tutto il citoscheletro cellulare; il DAPI (Sigma, Italia) che si lega alla doppia elica di DNA ed è un marcatore del nucleo. Gli anticorpi secondari usati per la rivelazione sono stati la TRITC (Zymed Laboratories INC) e la FITC (Zymed Laboratories INC).

Il protocollo di doppia immunofluorescenza prevede i seguenti passaggi:

- **Fissazione:** dopo aver rimosso il mezzo di coltura, le cellule ippocampali sono fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X (pH 7.4) per 15 min a Ta e successivamente lavate in PBS 1X freddo per due volte;
- **Permeabilizzazione:** i campioni sono incubati per 10 min in una soluzione di PBS 1X contenente Triton X-100 (0,25%) a Ta e successivamente lavati per tre volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio. La concentrazione di Triton viene ridotta a 0,1% per antigeni di membrana quali Gap43;
- **Bloccaggio:** i campioni sono incubati con BSA 1% in PBS in cui è aggiunto Tween (PBST) per 30 min, al fine di bloccare il legame aspecifico degli anticorpi;
- **Incubazione simultanea:** le cellule sono ricoperte di una soluzione contenente una miscela dei due anticorpi primari in una soluzione di BSA 1% in PBST, overnight a 4°C. La miscela dei due anticorpi è allontanata per decantazione ed i campioni lavati tre volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio. I campioni sono successivamente incubati con la miscela dei due anticorpi secondari in una soluzione di BSA 1% in PBST 1X per 1h, a Ta. Una volta allontanata la miscela dei due anticorpi secondari, le cellule sono lavate tre volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio e successivamente incubate con DAPI per 20 min. Dopo aver effettuato gli ultimi lavaggi in PBS 1X, tre da 1 min, le cellule sono conservate al buio a 4°C. Per l'osservazione microscopica, i campioni sono ricoperti con un coprioggetto, interponendo un montante per fluorescenza e le osservazioni realizzate mediante microscopia confocale (60X).

III.2.7 Analisi morfologica delle colture cellulari: osservazioni al SEM

La morfologia dei neuroni a DIV8 è stata valutata mediante microscopio elettronico a scansione (SEM; ESEM FEG QUANTA 200, FEI Company, Oregon, USA). Per l'osservazione al SEM i campioni di neuroni cresciuti su membrane PTFE e PES sono stati

fissati in glutaraldeide al 2,5%, lavati in tampone fosfato (pH 7.4) e successivamente fissati in tetrossido di osmio all'1%. Infine, è stata eseguita una progressiva disidratazione in etanolo.

III.2.8 Analisi statistica

Per la valutazione dei dati trascrizionali è stata condotta l'analisi quantitativa dei valori di O.D. mediante l'analizzatore d'immagine Scion-Image 2.0 e successiva analisi statistica (one way ANOVA seguita da Neuman-Keul's test). Le letture sono state ripetute su 3 campioni diversi provenienti da due espianti separati e i dati riportati come valori medi di O.D. \pm s.e.m.

RISULTATI

I^a PARTE

IV.1.1 Analisi comportamentale durante l'INGR e il RISV

L'infusione Pe con ORX-A, CST o ORX-A+CST durante l'INGR e il RISV, da luogo a differenti performances comportamentali. In particolare, criceti infusi con ORX-A durante la fase d'INGR (Fig. IV.1) mostrano un aumento evidente ($F_{3,17}=5.13$; $p<0.01$) dei vari parametri correlati al feeding. Si registra, infatti, un aumento molto evidente ($p<0.001$) del feeding (+175%) e del food intake (+150%), affiancato da un aumento elevato dell'attività locomotoria (+89%) e del peso corporeo (+65%), e moderato ($p<0.05$) del consumo di acqua (+40%).

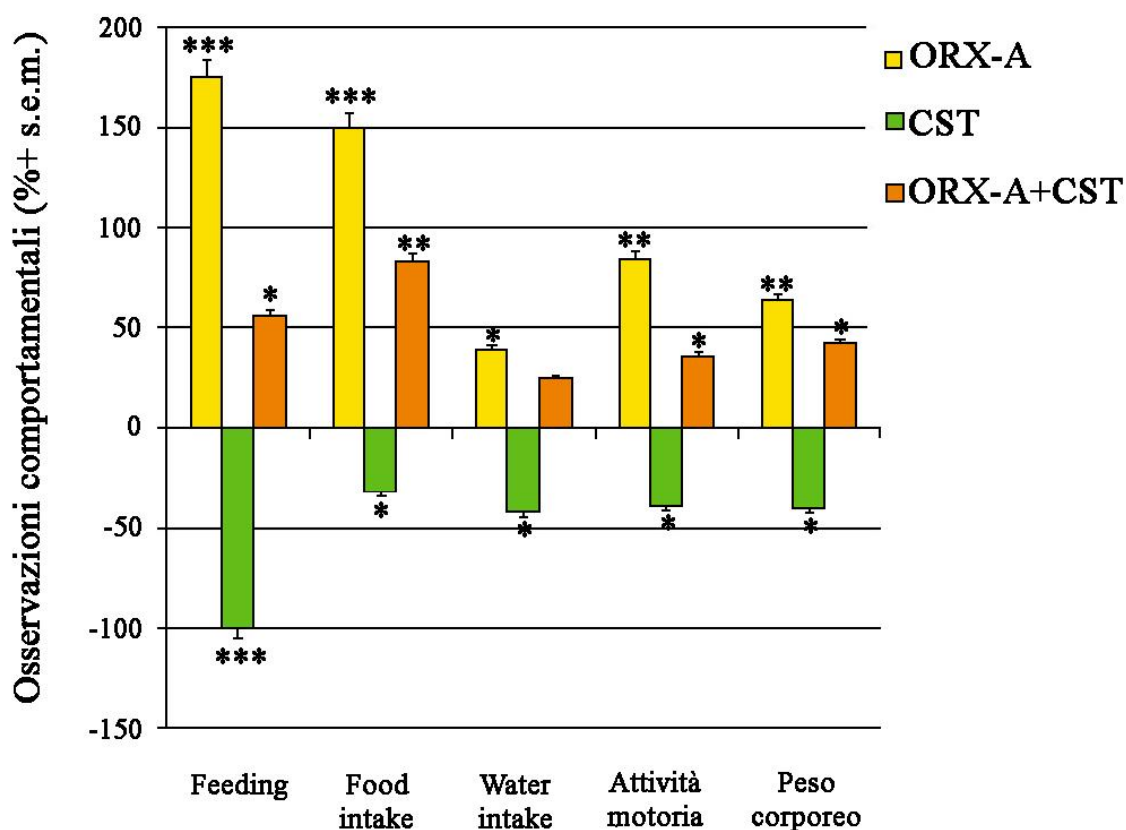


Fig. IV.1 Effetti comportamentali indotti dalle iniezioni Pe di ORX-A, CST e ORX-A+CST durante la fase d'INGR. I dati sono espressi come percentuale (\pm s.e.m), ottenuta confrontando le medie del comportamento di 5 animali per ogni gruppo ($n=20$). Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* per $p<0.05$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ rispetto al CTRL.

Al contrario, la CST provoca una riduzione significativa dei vari parametri analizzati ($F_{3,17}=4.98$; $p<0.01$), come evidenziato dal decremento molto evidente del feeding (-100%), insieme alla riduzione moderata del consumo di acqua (-43%), di cibo (-30%), del peso corporeo (-43%) e dell'attività motoria (-41%).

La contemporanea somministrazione dei due agenti (ORX-A+CST) determina l'aumento dei vari parametri: consumo di cibo (+90%), feeding (+54%), peso corporeo (+46%) e attività motoria (+30%).

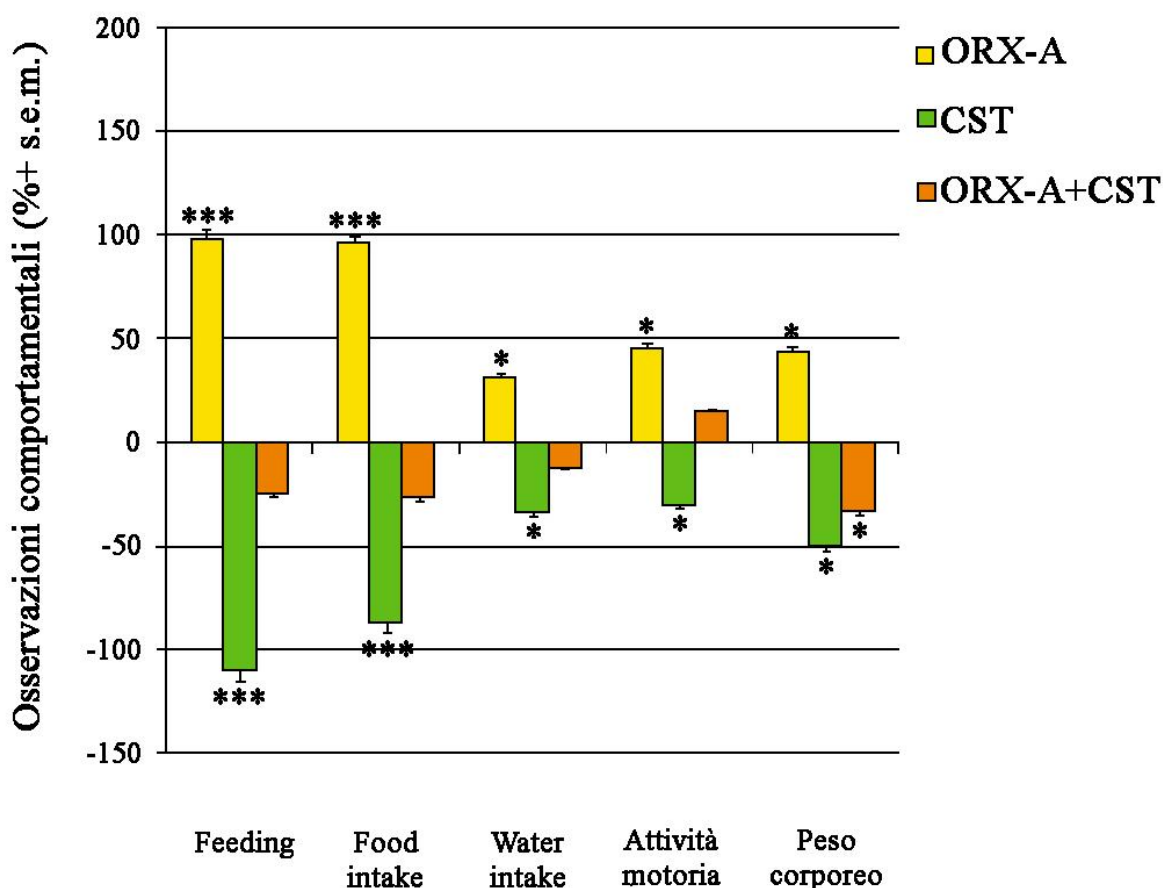


Fig. IV.2 Effetti comportamentali indotti dalle iniezioni Pe di ORX-A, CST e ORX-A+CST durante la fase di RISV. I dati sono espressi come percentuale (\pm s.e.m), ottenuta confrontando le medie del comportamento di 5 animali per ogni gruppo ($n=20$). Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* per $p<0.05$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ rispetto al CTRL.

Durante la fase di RISV (Fig. IV.2) l'ORX-A provoca un aumento molto elevato ($p<0.001$) del feeding (+98%) e del food intake (+96%) mentre il consumo di acqua (+30%),

l'attività motoria (+47%) e il peso corporeo (+46%) appaiono moderati ($F_{3,17}=3.21$; $p<0.05$). La somministrazione di CST durante tale fase determina invece una riduzione molto evidente del feeding (-110%) e del food intake (-89%), mentre il consumo di acqua (-38%), l'attività locomotoria (-37%) e il peso corporeo (-50%) subiscono solo un moderato decremento. Il co-trattamento determina una riduzione di tutti i parametri, anche se l'unico valore statisticamente significativo registrato è la riduzione moderata del peso corporeo (-31%).

IV.1.2 Variazioni dell'espressione del ORX2R durante il ciclo d'ibernazione

Le ORXs agiscono mediante due recettori accoppiati a proteine G detti ORX1R e ORX2R, dei quali il primo lega l'ORX-A con un'affinità dieci volte superiore rispetto all'ORX-B, mentre il secondo mostra un'eguale affinità per entrambi i neuropeptidi. Questi due recettori presentano un'elevata espressione in tutto il SNC, ma la localizzazione del ORX2R nel HTH, nel Cb e nel midollo riveste particolare importanza nel controllo cardiovascolare, nel "feeding behavior" e nell'attività locomotoria. Pertanto, al termine dello studio comportamentale si è proceduto con l'ISH utilizzando una sonda oligonucleotidica specifica per questo tipo recettoriale. Da un'iniziale analisi qualitativa è emersa una distribuzione encefalica eterogenea come dimostrato dagli autoradiogrammi dell'antisense (Fig. IV.3A). Il sense risulta invece essere uguale al back-ground (Fig. IV.3B).

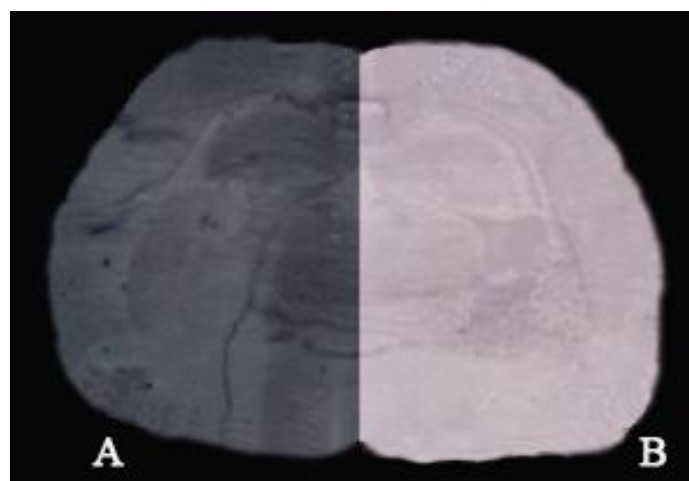


Fig. IV.3 Distribuzione del mRNA di ORX2R in una sezione rappresentativa di una regione encefalica mediale sottoposta a ISH con probe antisense (A) e sense (B).

La successiva analisi quantitativa è stata realizzata attraverso il programma Scion Image che ha permesso di misurare i livelli di O.D. di specifici nuclei e regioni encefaliche e nello stesso tempo stabilire eventuali differenze attraverso l'utilizzo di test statistici (ANOVA e *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test*). Nel CTRL eutermico non sottoposto al trattamento stereotassico e nel CTRL eutermico trattato esclusivamente con soluzione salina sono stati osservati livelli di espressione paragonabili (Fig. IV.4). Pertanto, le successive valutazioni sono state effettuate considerando come CTRL i criceti trattati esclusivamente con soluzione salina.

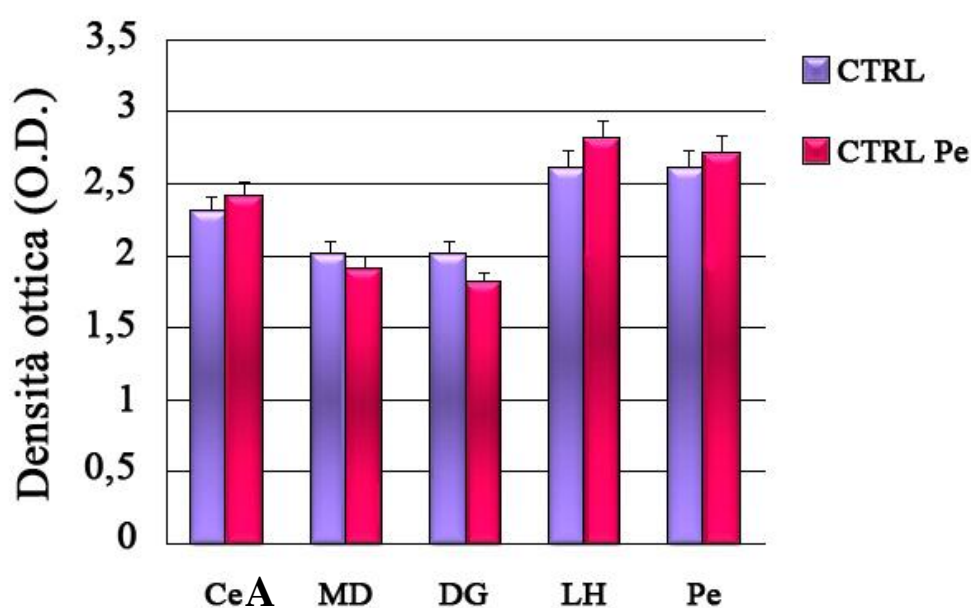


Fig. IV.4 Distribuzione (media \pm s.e.m.) dei livelli di O.D. per l'ORX2R che caratterizzano alcune aree cerebrali dell'encefalo dei criceti CTRL infusi nel Pe con soluzione salina rispetto ai CTRL non sottoposti a trattamento stereotassico. Abbreviazioni: CeA: nucleo centrale dell'AMY; MD: nucleo talamico dorso-mediale; DG: giro dentato; LH: ipotalamo laterale; Pe: nucleo periventricolare.

Al fine di stabilire se gli effetti comportamentali indotti dal cross-talking tra il sistema ORXergico e la CST possono essere correlati a variazioni nell'espressione del mRNA del ORX2R, sono stati valutati gli effetti trascrizionali indotti non solo dai trattamenti singoli, ma anche dal co-trattamento. A tal proposito è possibile vedere che per quanto riguarda l'espressione dell'ORX2R nei diversi nuclei delle aree HTH ed extra-HTH, durante la fase d'INGR, i trattamenti causano effetti diversi (Fig. IV.5).

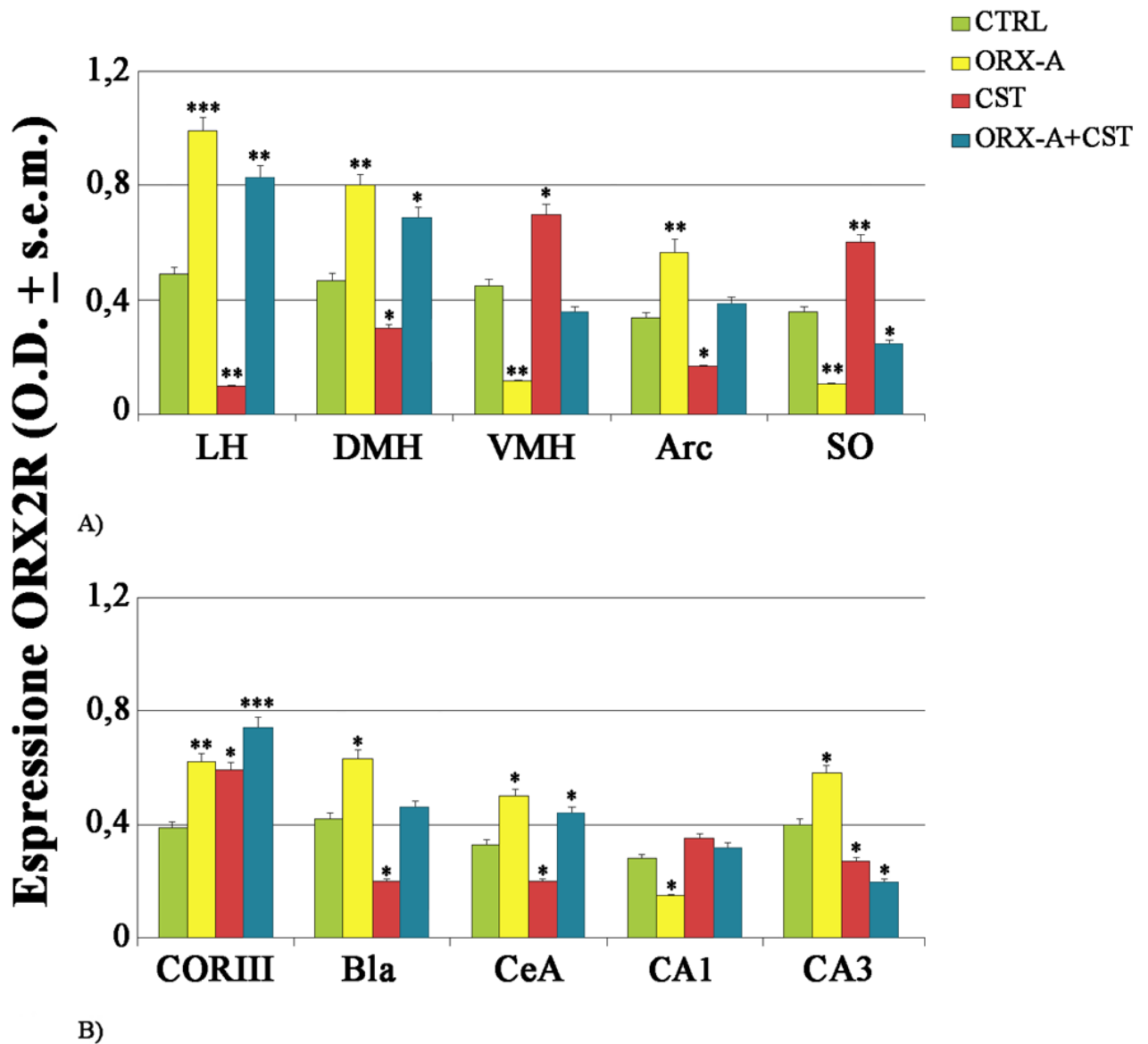


Fig. IV.5 Variazioni nella trascrizione del mRNA di ORX2R, a livello delle aree HTH (A) ed extra-HTH (B), in criceti in fase d'INGR trattati nel Pe con ORX-A, CST o ORX-A+CST. I dati sono riportati come O.D. ± s.e.m. Le analisi statistiche sono state eseguite con ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ rispetto al CTRL. Abbreviazioni: LH: ipotalamo laterale; DMH: nucleo ipotalamico dorsomediale; VMH: nucleo ipotalamico ventromediale; Arc: nucleo arcuato; SO: nucleo sopraottico; CORIII: strato corticale III; Bla: amigdala basolaterale; CeA: nucleo centrale dell'amigdala; CA1: cornu ammonis 1 dell'ippocampo; CA3: cornu ammonis 3 dell'ippocampo.

In particolare, in seguito alla somministrazione di ORX-A durante la fase d'INGR si registra un'elevata down-regulation a livello del SO (-71%), del VMH (-75%; Fig. IV.5A) e del cornu ammonis 1 (CA1; -46%; Fig. IV.5B), mentre si assiste ad un'elevata up-regulation ($F_{3,17}=5.18$; $p < 0.01$) in LH (+102%), Arc (+70%) e DMH (+69%). Valori moderati vengono registrati in cornu ammonis 3 (CA3, +45%), AMY basolaterale (Bla; +49%), AMY centrale (CeA; +54%) e strato III della corteccia (CORIII; +59%). Il trattamento con CST durante la

fase d'INGR determina un'evidente up-regulation del ORX2R in SO (+68%) e VMH (+57%), mentre valori negativi vengono registrati per LH (-82%), Arc (-49%), DMH (-38%), Bla (-52%), CORIII (+51%), CeA (-40%) e CA3 (-37%), rispetto al CTRL. È interessante notare che il co-trattamento continua a mantenere un trend up-regolativo molto evidente in CORIII (+89%), LH (+70%), DMH (+46%) e CeA (+30%), mentre provoca una moderata down-regulation solo nel SO (-30%) e in CA3 (-49%).

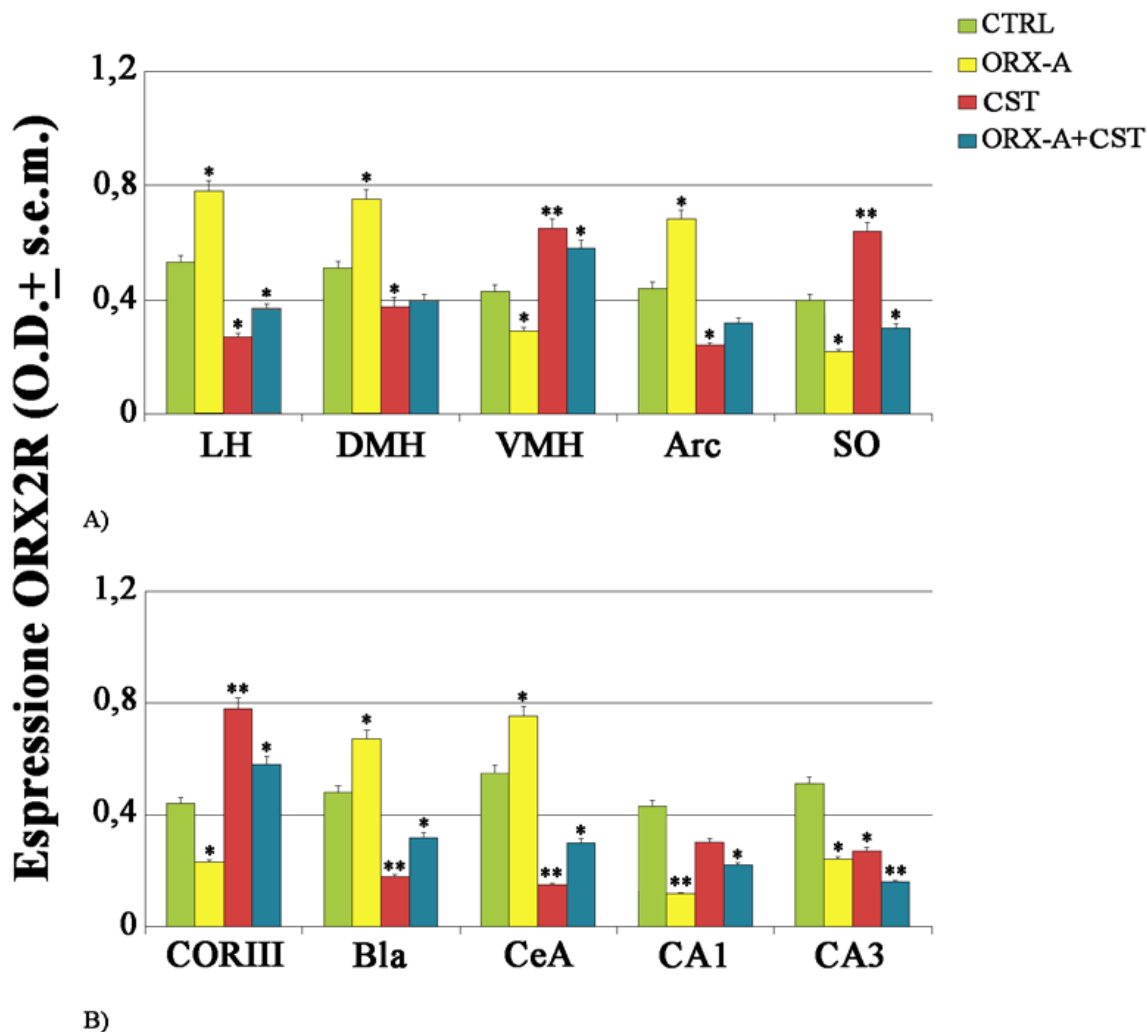


Fig. IV.6 Variazioni nella trascrizione del mRNA di ORX2R, a livello delle aree HTH (A) ed extra-HTH (B), in criceti in fase di TORP infusi nel Pe con ORX-A, CST o ORX-A+CST. I dati sono riportati come O.D. ± s.e.m. Le analisi statistiche sono state eseguite con ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ rispetto al CTRL. Per le abbreviazioni vedere Fig. IV.5.

Durante la fase ipotensiva del TORP negli animali infusi con CST viene rilevata una moderata ed elevata ($F_{3,17}=5.07$; $p < 0.01$) up-regulation del ORX2R nei nuclei SO (+57%),

VMH (+50%; Fig. IV.6A) e in CORIII (+75%; Fig. IV.6B). Risultano invece down-regolati CeA (-66%), Bla (-55%), LH (-49%), CA3 (-46%), Arc (-45%), CA1 e DMH (-30%). In seguito al trattamento con ORX-A risultano up-regolati i nuclei Arc (+56%), LH (+47%), DMH (+45%), CeA (+37%) e Bla (+43%), mentre si osservano valori negativi a livello di CA1 (-67%), CA3 (-54%), CORIII (-47%), SO (-45%) e VMH (-30%), rispetto al CTRL.

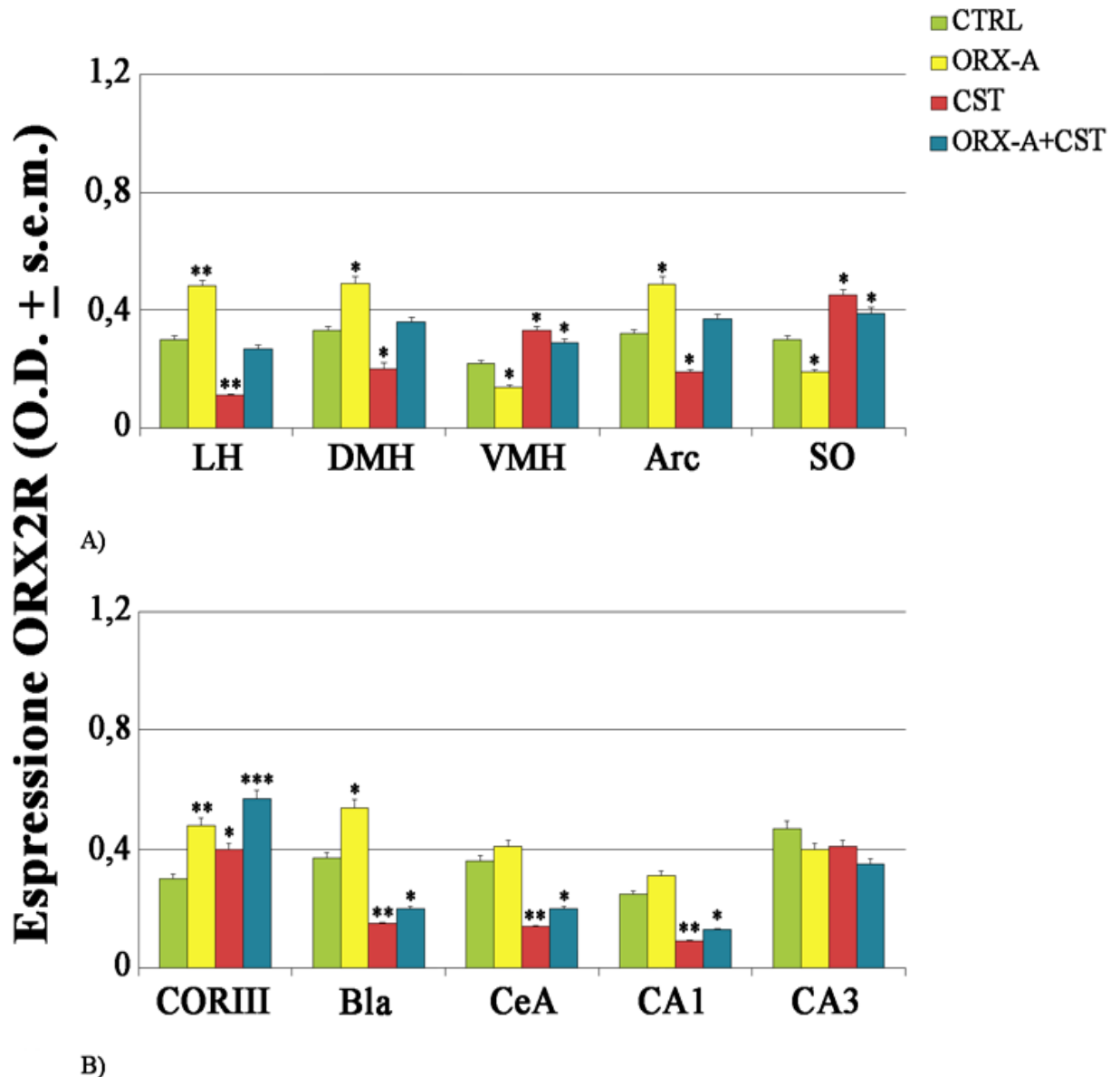


Fig. IV.7 Variazioni nella trascrizione del mRNA di ORX2R, a livello delle aree HTH (A) ed extra-HTH (B), in criceti in fase di RISV trattati nel Pe con ORX-A, CST o ORX-A+CST. I dati sono riportati come O.D. \pm s.e.m. Le analisi statistiche sono state eseguite con ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ rispetto al CTRL. Per le abbreviazioni vedere Fig. IV.5.

È interessante notare che la somministrazione combinata dei due peptidi induce una moderata up-regulation in SO (+32%), VMH (+33%) e CORIII (+33%), ma a prevalere è la down-regulation del ORX2R in CA3 (-68%), CA1 (-48%), CeA (-44%), LH (-32%) e Bla (-30%).

Nella fase ipertensiva del RISV il trattamento con ORX-A provoca, a parte una moderata down-regulation nel SO (-37%) e nel VMH (-36%), un up-regulation da moderata a elevata in tutti gli altri nuclei analizzati: LH, DMH e Arc (da +49% a +61%; Fig. IV.7A), CORIII (+64%) e Bla (+46%; Fig. IV.7B). Nei criceti infusi con CST si registra una moderata up-regulation in SO (+50%), VMH (+48%) e CORIII (+30%), mentre livelli ridotti caratterizzano tutti gli altri nuclei: Bla (-68%), CeA e LH (-65%), CA1 (-64%), Arc (-41%) e DMH (-40%). Nel caso del co-trattamento si assiste a un'elevata e moderata up-regulation del ORX2R in CORIII (+91%), VMH (+35%) e SO (+30%), mentre risultano down-regolati i nuclei Bla e CeA (-45%) più CA1 (-48%).

IV.1.3 Analisi neurodegenerativa durante il ciclo d'ibernazione

I diversi effetti comportamentali indotti da ORX-A e/o CST, oltre a essere correlati con i livelli trascrizionali del ORX2R, sembrano anche correlati con diverse risposte neurodegenerative durante le varie fasi dell'ibernazione (Fig. IV.8). Infatti, mediante l'analisi ACS è possibile evidenziare la presenza di campi neuronali degenerati sfruttando la reazione argirofilica per tutti gli animali trattati. In particolare, l'ORX-A determina una moderata riduzione ($F_{3,17}=3.22$; $p<0.05$) del segnale argirofilico (-40%) a livello di CORIII e HTH durante la fase d'INGR (Fig. IV.8A), mentre a livello HIP (+37%) ne causa un moderato incremento. La CST, invece, determina una lieve riduzione della degenerazione in CORIII (-43%) e HIP (-32%), rispetto a un moderato incremento in AMY (+48%) durante la fase d'INGR. Negli animali infusi con ORX-A+CST si osserva un trend neuroprotettivo caratterizzato da un'elevata riduzione della degenerazione in HTH (-74%) e CORIII (-63%).

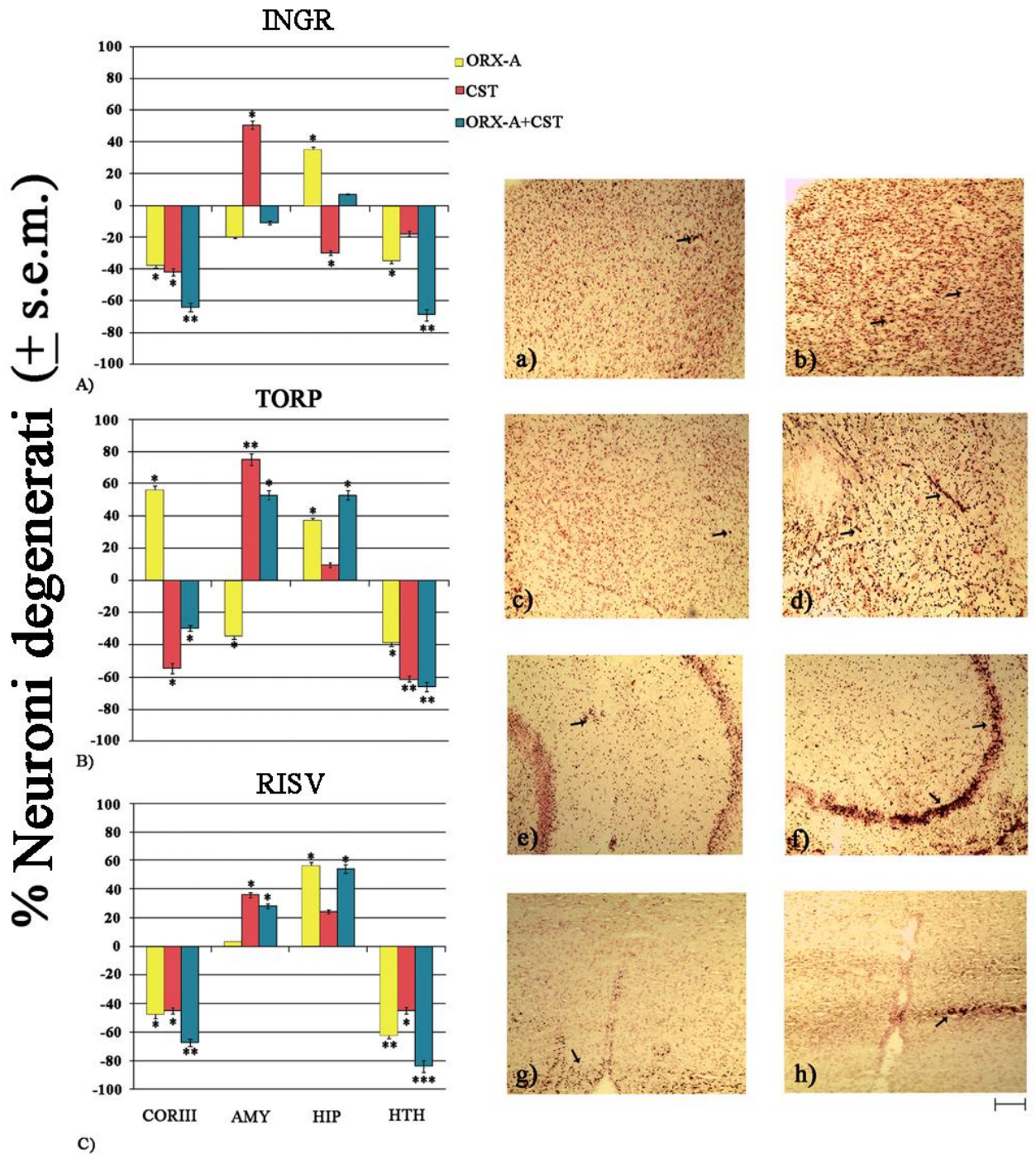


Fig. IV.8 A, B, C: Processi neurodegenerativi nelle diverse aree cerebrali di criceti trattati con ORX-A, CST o ORX-A+CST durante le fasi d'INGR, TORP e RISV. I dati sono riportati come valori % \pm s.e.m. rispetto ai relativi CTRL (n=15). a-h: foto rappresentative dell'analisi ACS in cui le frecce indicano i neuroni degenerati. In particolare vengono riportate le differenze per (b) CORIII degli animali trattati con ORX-A (n=5) durante la fase di TORP, (d) AMY di animali trattati con CST (n=5) durante la fase di TORP, (f) HIP degli animali infusi con ORX-A+CST (n=5) durante la fase di TORP e (h) HTH di criceti infusi con ORX-A+CST (n=5) durante il RISV, rispetto ai loro CTRL (a, c, e, g). Scale bar di (a-h)=100 μ m. Le analisi statistiche sono state eseguite con ANOVA e successivamente confrontate con *Newman Keul's Multiple Range post hoc Test* quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ rispetto al CTRL.

Per quanto riguarda la fase di TORP, l'ORX-A provoca un lieve effetto neurodegenerativo ($F_{3,17}=3.15$; $p<0.05$) a livello HIP (+38%) e di CORIII (+57%), mentre in AMY e HTH (-37%) si registra una lieve riduzione della degenerazione neuronale (Fig. IV.8B). Negli animali infusi con CST si evidenziano moderati effetti protettivi in CORIII (-56%) e HTH (-61%) mentre anche in questo stadio l'AMY (+75%) risulta essere molto degenerata. Lo stesso andamento viene ritrovato anche per il co-trattamento come evidenziato dalla moderata ed elevata neuroprotezione di CORIII (-31%) e HTH (-63%), rispettivamente. Al contrario le regioni limbiche AMY e HIP risultano moderatamente degenerate (+53%).

È interessante notare che, anche durante la fase ipertensiva del RISV (Fig. IV.8C), l'infusione Pe con ORX-A causa la moderata ($F_{3,17}=5.02$; $p<0.01$) degenerazione del HIP (+57%), mentre lo stesso trattamento risulta essere protettivo a livello del HTH (-62%) e di CORIII (-46%). Per quanto riguarda gli effetti indotti dalla somministrazione Pe di CST si registra un moderato incremento della degenerazione a livello dell'AMY (+37%), mentre lo stesso trattamento causa una moderata riduzione dei livelli di degenerazione in CORIII e HTH (-45%). Il trattamento combinato esercita un ruolo neuroprotettivo in HTH (-84%) e CORIII (-71%), mentre risulta essere neurodegenerativo in HIP (+55%) e AMY (+30%).

II^a PARTE

IV.2.1 Espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ippocampali OGD e NOGD trattati con CST

La valutazione degli effetti trascrizionali sui sistemi NMDAergico e ORXergico indotti dalla

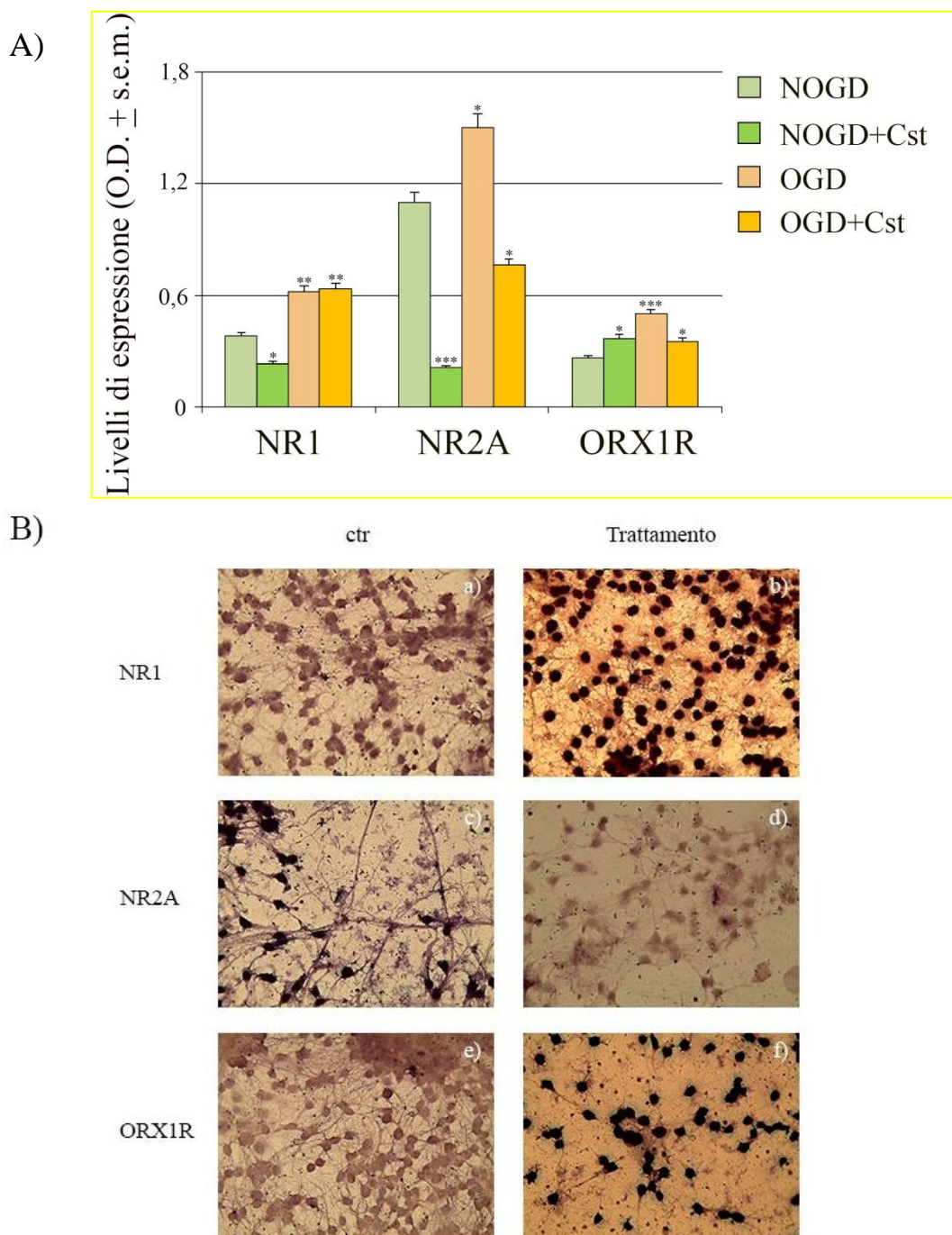


Fig. IV.9 A: Effetti della CST sull'espressione degli mRNA codificanti per NR1, NR2A e ORX1R nel soma di neuroni HIP in condizioni OGD e NOGD. Le letture sono state ripetute su almeno 3 campioni diversi provenienti da 2 espianti separati e i dati sono riportati come O.D. \pm s.e.m. B: Foto rappresentative di neuroni sottoposti a ISH per NR1 CTRL (a) e in condizioni OGD+CST (b), per NR2A in condizioni NOGD+CST (d) rispetto al CTRL (c) e ORX1R in condizioni OGD (f) rispetto al CTRL (e).

CST in condizioni fisiologiche e OGD, è stata condotta mediante ibridazione *in situ*. Un primo risultato importante, che conferma la validità del sistema di coltura applicato in questo studio, è l'assenza di segnale aspecifico esterno ai neuroni sulle membrane utilizzate (dati non mostrati). Inoltre, il segnale d'ibridazione aspecifico, ottenuto dalle colture trattate con la sonda sense, conferma la specificità delle sonde utilizzate. In particolare, i dati relativi alle condizioni NOGD+CST, OGD e OGD+CST sono stati confrontati con quelli NOGD (CTRL). Dall'osservazione del grafico relativo alle colture HIP, è possibile constatare che la subunità NR1 risulta essere up-regolata in modo elevato ($p < 0.01$) nei trattamenti OGD e OGD+CST (+63%, +66%; Fig. IV.9A), mentre se ne osserva una moderata ($p < 0.05$) riduzione in condizioni NOGD+CST (-40%). I dati relativi alla subunità NR2A mostrano un moderato incremento dei livelli di mRNA in condizioni OGD (+36%), mentre in condizioni NOGD+CST e OGD+CST si registra una down-regulation molto elevata (-81%) e moderata (-31%), rispettivamente. Per quanto riguarda l'ORX1R si rileva un'up-regulation molto elevata ($p < 0.001$) in condizioni OGD (+92%) e moderata sia in condizioni OGD+CST (+35%) che in condizioni NOGD+CST (+42%).

IV.2.2 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ippocampali OGD e NOGD, cresciuti in presenza di neuroni ipotalamici

Gli effetti trascrizionali sui sistemi NMDAergico e ORXergico indotti a livello HIP dalla CST, in condizioni fisiologiche e OGD, sono stati valutati anche in presenza di neuroni HTH. Dall'analisi dei livelli di mRNA dei trascritti analizzati emerge l'azione esercitata dalle cellule HTH su quelle HIP: per la subunità NR1 si registra un up-regulation molto elevata in condizioni OGD (+344%; Fig. IV.10A) ed elevata in condizioni OGD+CST (+58%), mentre il trattamento NOGD+CST causa una moderata down-regulation (-44%). La subunità NR2A subisce un incremento molto elevato in condizioni OGD (+123%), e al contrario, un'elevata diminuzione in condizioni NOGD+CST (-71%). L'ORX1R è fortemente ($p < 0.001$) e modera-

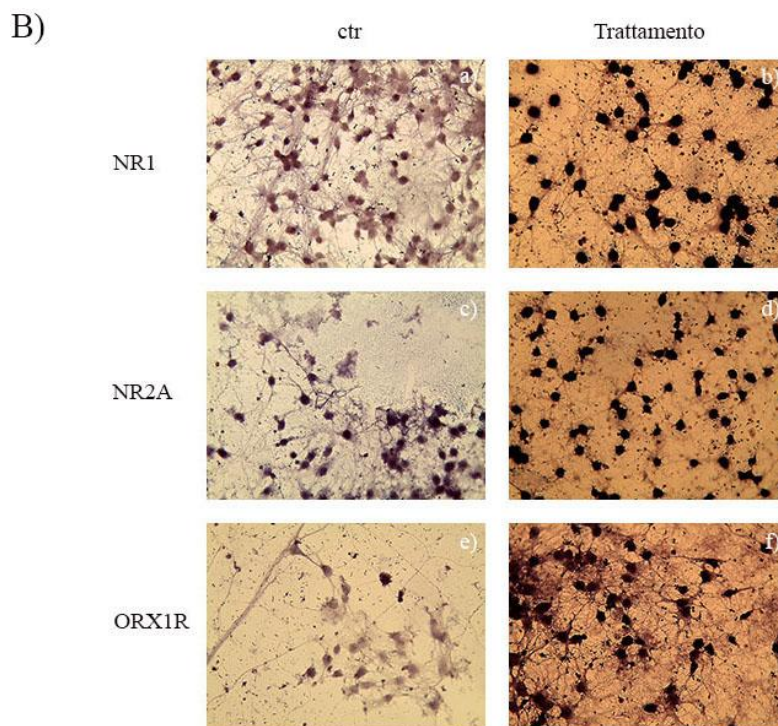
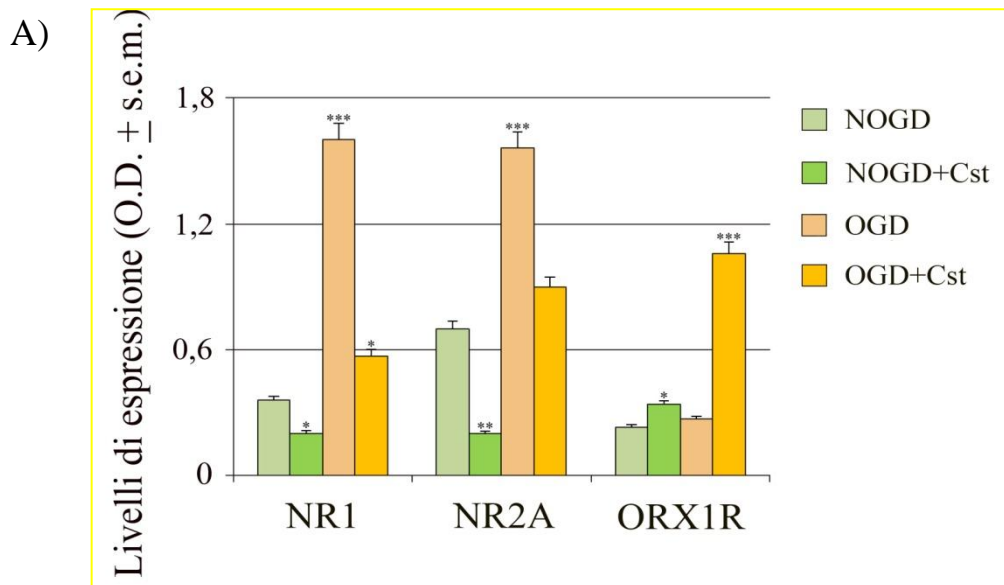


Fig. IV.10 A: Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in neuroni HIP, valutate nel soma in condizioni OGD e NOGD in presenza di neuroni HTH. Le letture all'analizzatore d'immagine sono state ripetute almeno su 3 campioni diversi provenienti da due espianti separati e i dati sono riportati come O.D. \pm s.e.m. B: Foto rappresentative di neuroni sottoposti a ISH per NR1 ed NR2A in condizioni OGD (b, d) e di ORX1R in condizioni OGD+CST (f) rispetto ai CTRL (a, c, e).

tamente up-regolato in condizioni OGD+CST (+361%) e NOGD (+48%), rispettivamente.

IV.2.3 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ipotalamici OGD e NOGD

A livello HTH, dall'analisi degli effetti trascrizionali indotti dalla CST sui sistemi recettoriali

NMDAergico e ORXergico in condizioni fisiologiche e OGD è stato osservato che, nel caso

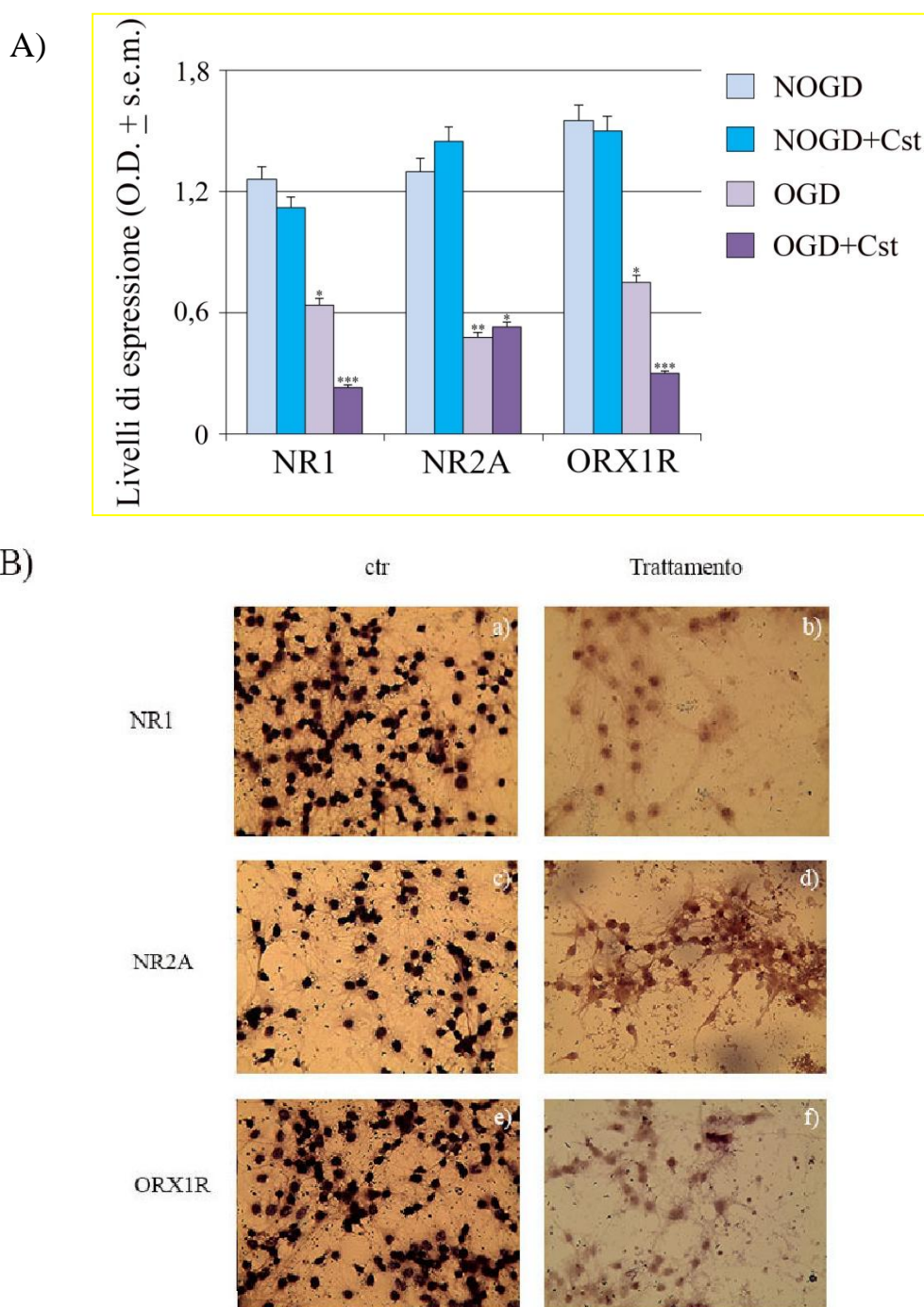


Fig. IV.11 A: Effetti della CST sul pattern di espressione degli mRNA per NR1, NR2A e ORX1R in neuroni HTH, valutati nel soma in condizioni OGD e NOGD. Le letture sono state ripetute almeno su 3 campioni diversi provenienti da due espianti separati e i dati sono riportati come O.D. \pm s.e.m. B: Foto rappresentative di neuroni sottoposti a ISH per NR1, NR2A e ORX1R rispettivamente in condizioni OGD+CST (b), OGD (d), OGD+CST (f), rispetto ai CTRL (a,c,e).

della subunità NR1 si ha una regolazione della trascrizione negativa, molto elevata in condizioni OGD+CST (-82%) e moderata in condizioni OGD (-49%; Fig. IV.11A).

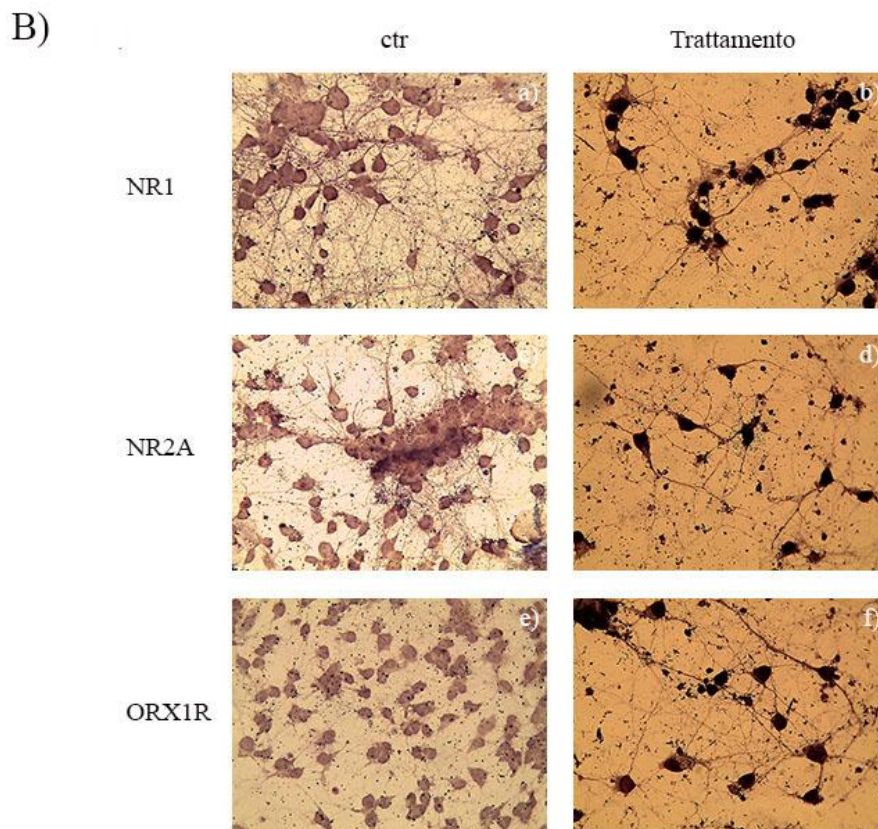
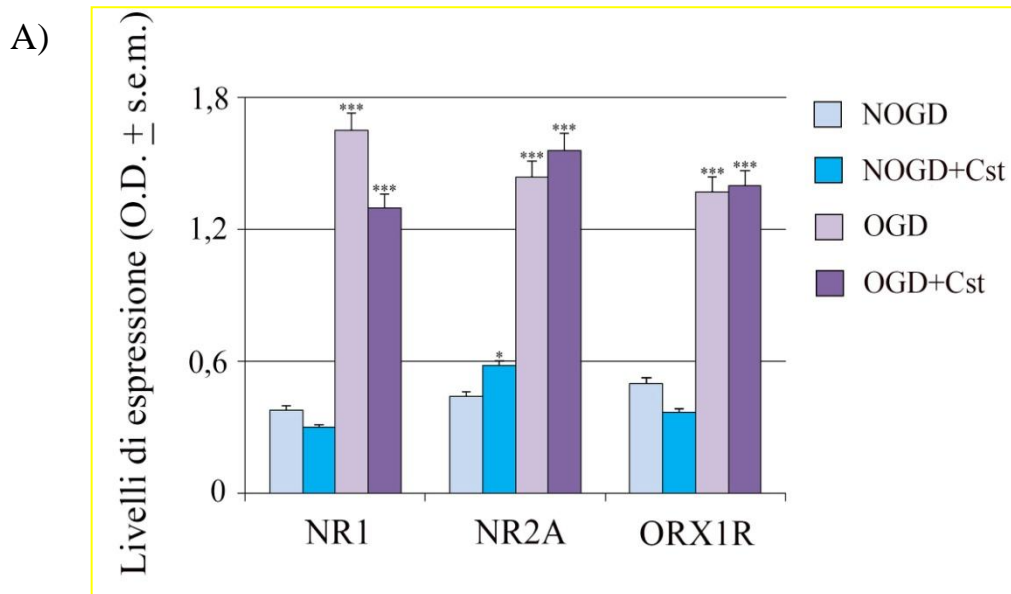


Fig. IV.12 A: Effetti della CST sulla trascrizione di NR1, NR2A ed ORX1R in neuroni HTH, valutati nel soma in condizioni OGD e NOGD in presenza di neuroni HIP. Le letture all'analizzatore d'immagine sono state ripetute almeno su 3 campioni diversi provenienti da due espianti separati e i dati sono riportati come O.D. \pm s.e.m. B: Foto rappresentative di neuroni sottoposti a ISH per NR1, NR2A e ORX1R in condizioni OGD (b,d,f) rispetto ai CTRL (a,c,e).

Anche la subunità NR2A subisce una down-regulation, elevata in condizioni OGD (-63%) e moderata in condizioni OGD+CST (-59%). Sulla stessa scia, l'ORX1R subisce una

regolazione della trascrizione negativa, molto elevata nel trattamento OGD+CST (-81%) e moderata in quello OGD (-52%).

IV.2.4 Effetti della CST sull'espressione di NR1, NR2A e ORX1R in colture di neuroni ipotalamici OGD e NOGD, cresciuti in presenza di neuroni ippocampali

In presenza di neuroni HIP sia i trascritti per le subunità NR1, NR2A che per l'ORX1R presenti nelle cellule HTH mostrano un up-regulation molto elevata sia in condizioni OGD (+334%, +227%, +174%; Fig. IV.12A) che in condizioni OGD+CST (+242%, +255%, +180%).

IV.2.5 Valutazione del rapporto NR2A/NR1

Allo scopo di rendere evidente quale sia la subunità NMDAergica prevalente, i valori delle percentuali per NR2A (normalizzati rispetto al CTRL) sono stati rapportati a quelli della subunità NR1 (anch'essi normalizzati rispetto al CTRL) per lo stesso trattamento. Dal grafico risultante (Fig. IV.13) è possibile constatare che a livello HIP si verifica una riduzione molto elevata ($p < 0.001$) del rapporto NR2A/NR1 nei trattamenti OGD+CST (-145%) e NOGD+CST (-100%), e moderata (-43%; $p < 0.05$) in condizioni OGD. In presenza di cellule HTH, quelle HIP continuano a manifestare un trend down-regolativo per NR2A, rispetto a NR1, anche se però si riduce di entità. In tal caso si registra una riduzione elevata ($p < 0.01$) in condizioni NOGD+CST (-61%) e OGD (-64%), e moderata nel trattamento OGD+CST (-50%).

A livello HTH si ha up-regulation di NR2A, rispetto a NR1, molto elevata (+209%) in condizioni NOGD+CST e moderata (+30%) in condizioni OGD+CST, mentre in condizioni OGD risulta moderatamente down-regolata (-30%). Anche in presenza di cellule HIP si registra un aumento del rapporto NR2A/NR1 molto elevato in condizioni NOGD+CST (+252%) e una riduzione moderata (-32%) nel trattamento OGD.

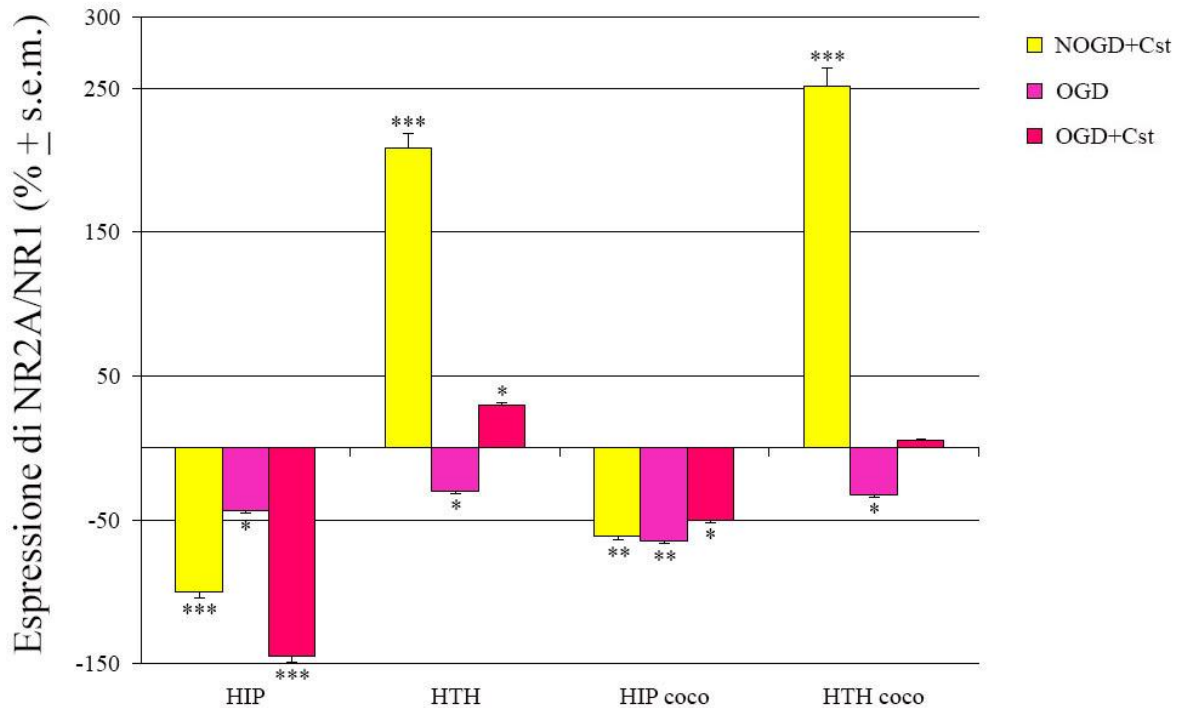


Fig. IV.13 Rapporto fra l'espressione delle subunità NR2A e NR1 in neuroni HIP, HTH, HIP mantenuti in co-cultura (HIP coco) e HTH coco in condizioni NOGD+CST, OGD e OGD+CST.

IV.2.6 Effetti della CST sulla morfologia cellulare

La determinazione delle caratteristiche morfostrutturali dei neuroni HIP di criceto in coltura allo stadio DIV8, cresciuti in condizioni NOGD, NOGD+CST, OGD e OGD+CST è stata realizzata mediante analisi al microscopio confocale e al SEM. I risultati dell'analisi al microscopio confocale rivelano un eterogeneo pattern di distribuzione di specifici antigeni neuronali impiegati come marcatori sia del differenziamento dell'intera cellula (β -tubulina) che degli elementi assonici (GAP43) e nucleari (DAPI). In condizioni NOGD i neuroni si presentano come una rete ben sviluppata con prolungamenti assonici ben definiti, come si evince dall'espressione della β -tubulina (Fig. IV.14a) e della GAP43 (Fig. IV.14b); anche il nucleo è ben strutturato e visibile in tutte e tre le foto (Fig. IV.14a,b,c). L'elaborazione combinata dei due segnali di fluorescenza (Fig. IV.14c) fornisce un quadro completo del grado di complessità della rete neuronale in tale condizione. In seguito all'aggiunta della CST la situazione appare leggermente modificata, infatti i prolungamenti assonici sono meno

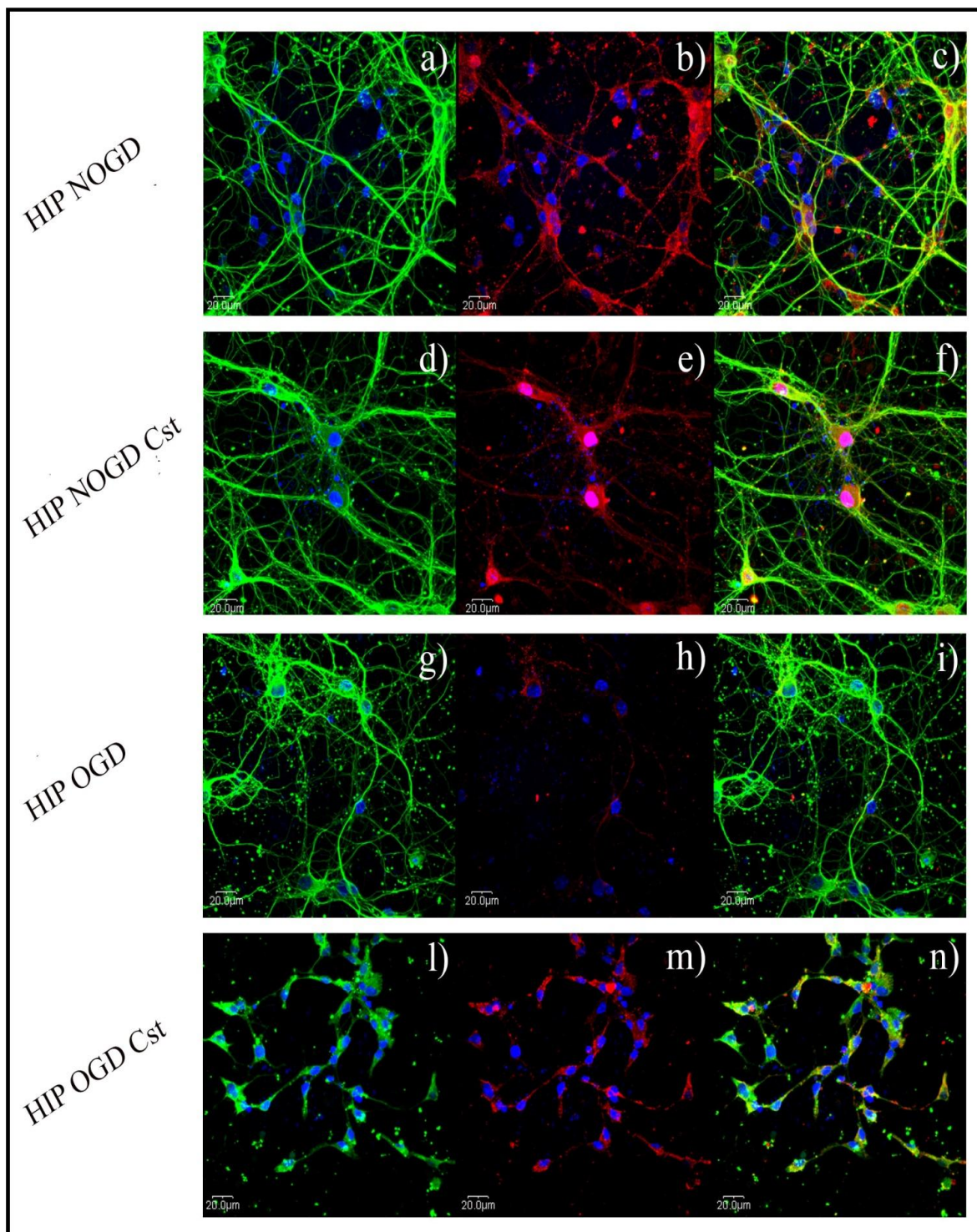


Fig. IV.14 Analisi morfologica effettuata mediante microscopia confocale di neuroni HIP allo stadio di sviluppo DIV8, cresciuti in condizioni NOGD, NOGD+CST, OGD e OGD+CST. Le cellule sono state sottoposte a immunofluorescenza con specifici marcatori strutturali quali (a,d,g,l) β -tubulina, in verde, specifico per il citoscheletro cellulare e (b,e,h,m) GAP43, in rosso, specifico per l'assone. Sono inoltre mostrati i risultati del merge (c,f,i,n) ottenuto mediante doppia immunofluorescenza. Il segnale blu è dato dal marcatore nucleare DAPI.

definiti, si evidenzia un'espressione leggermente ridotta della β -tubulina (Fig. IV.14d) e una considerevole minore espressione della GAP43 (Fig. IV.14e) e del segnale DAPI. Anche in

questo caso, l'elaborazione combinata dei due segnali di fluorescenza (merge; Fig. IV.14f) fornisce un segnale completo del grado di complessità della rete neuronale in condizioni NOGD+CST, che risulta un po' meno specializzato se confrontato con quello osservato in condizioni NOGD.

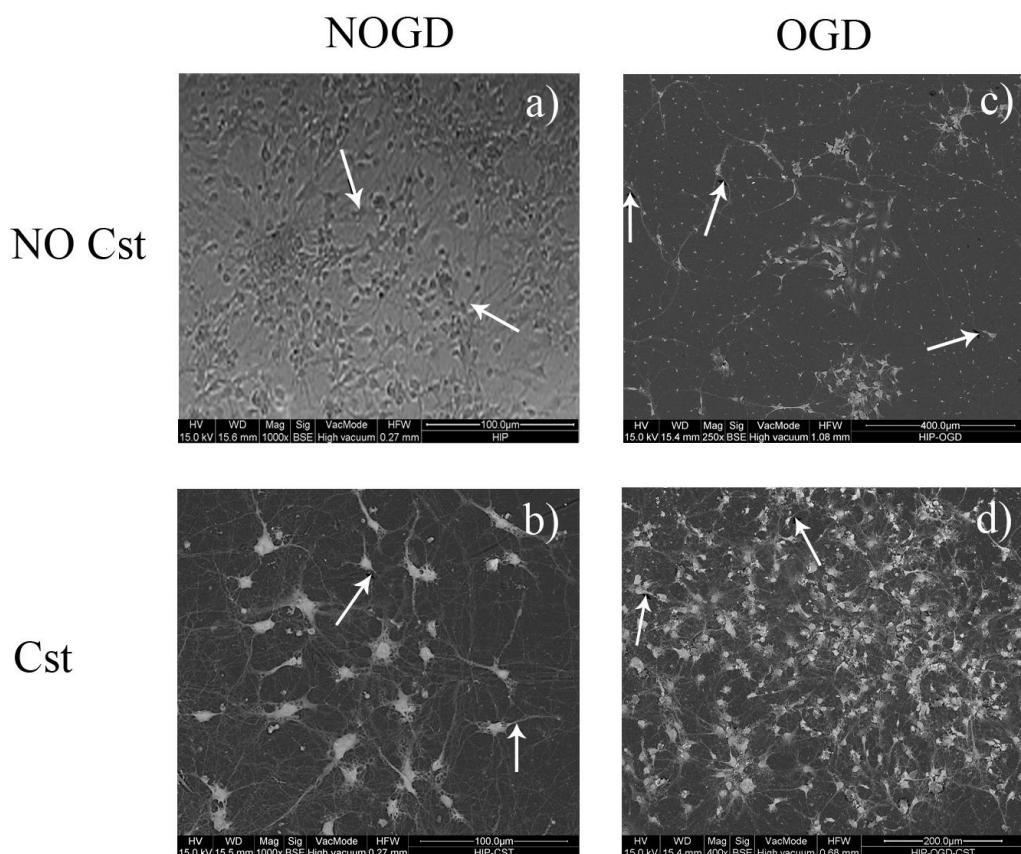


Fig. IV.15 Immagini SEM di neuroni HIP su membrana PTFE a DIV8, in condizioni NOGD (a), NOGD+CST (b), OGD (c) e OGD+CST (d). Le frecce in bianco indicano gli assoni.

Nel trattamento OGD la situazione peggiora drasticamente rispetto alla condizione fisiologica, difatti se il segnale relativo alla marcatura del citoscheletro è abbastanza evidente (Fig. IV.14g), quello relativo alla marcatura dei prolungamenti assonici è molto lieve (Fig. IV.14h). Il segnale completo del grado di complessità della rete neuronale in queste condizioni, inferiore rispetto alla condizione NOGD, è fornito dal merge in Fig. IV.14i. Infine, in condizioni OGD l'aggiunta della CST sembra alterare ancor più la situazione, dal momento che l'espressione della β -tubulina è molto ridotta (Fig. IV.14l) e le cellule appaiono quasi prive di prolungamenti cellulari (Fig. IV.14m). Dall'osservazione del merge (Fig.

IV.14n) appare molto chiaro il basso grado di complessità della rete neuronale in tale condizione (OGD+CST).

Le osservazioni al SEM confermano i risultati ottenuti dall'analisi confocale, infatti, in condizioni fisiologiche NOGD i neuroni HIP mostrano un soma triangolare e ben definito (Fig. IV.15a), e sono chiaramente visibili assoni e dendriti che formano un'intricata rete di connessioni tra le cellule. In seguito ad aggiunta di CST (NOGD+CST) il soma continua a mostrare la tipica morfologia ippocampale (Fig. IV.15b), ma diminuiscono i processi cellulari e la rete neuronale appare meno intricata. In condizioni OGD (Fig. IV.15c) diminuisce il numero di cellule, ma quelle presenti mantengono la morfologia tipica del HIP e diverse connessioni tra loro. Con l'aggiunta della CST la rete neuronale appare costituita da neuroni recanti alterazioni strutturali (forma triangolare non riconoscibile) e privi di una rete sinaptica ben distinta (Fig. IV.15d).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo lavoro evidenziano il ruolo regolatorio esercitato dall'ORX-A e dalla CST che, modificando feeding e motor behaviors, sono capaci di influenzare i vari stati del ciclo d'ibernazione (INGR, TORP e RISV). In particolare da tale studio è emerso un dato particolarmente interessante sul ruolo pro-obesità dell'ORX-A che, a causa della sua influenza sul feeding induce un aumento del peso corporeo durante le fasi di INGR e RISV (Sakurai et al., 1998; Avolio et al., 2012). E' proprio durante la fase d'INGR che la prevalenza dell'azione dell'ORX-A sulla CST, provoca l'incremento del dispendio energetico attraverso l'attivazione di altri fattori oressigenici, quali il NPY e il peptide Agouti-correlato, aumentando così lo stimolo della fame e incrementando l'indice di massa corporea (Liu & Gao, 2007; Ma et al., 2007). In aggiunta gli effetti omeostatici esercitati dall'ORX-A tendono a proporre i neuroni ORXergici come cellule "multi-tasking" che, esibendo un'elevata responsività non solo ai livelli periferici di glucosio, ma anche a quelli di grelina, rafforzano la loro partecipazione nei processi metabolici ed energetici, e molto probabilmente costituiscono un evento induttivo che favorisce la fase d'INGR degli animali ibernanti (Tsujino & Sakurai, 2013).

Al contrario, l'infusione del Pe con il peptide simpatoinibitorio CST da solo o in combinazione con l'ORX-A (ORX-A+CST) durante la fase di RISV determina un'azione anti-obesità dovuta, molto probabilmente, alla capacità della CST di agire sia sui recettori α_2 adrenergici, stimolando la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi, sia sulle fibre leptinergiche (Bandyopadhyay et al., 2012). Infatti, l'inibizione dei nAChRs indotta dalla CST (Mahata et al., 2003) sembra favorire, seppur in modo indiretto, il rilascio di leptina, interferendo così con le abitudini alimentari (Bandyopadhyay et al., 2012). Di conseguenza, è molto probabile che il Pe infuso con CST sia in grado di bloccare gli stimoli del feeding attraverso la down-regulation, leptina-dipendente, del NPY e del peptide Agouti-correlato (Meister, 2000; Palou et al., 2009). Il ruolo inibitorio esercitato dalla CST sul Pe, inoltre, sembrerebbe favorire sia durante l'INGR che nel RISV, una riduzione del consumo di acqua,

molto probabilmente attraverso la down-regulation del ORX2R in aree dopaminergiche quali l'AMY e l'area tegmentale ventrale (Avolio et al., 2012; Elgot et al., 2012). È interessante notare che anche l'attività motoria durante le suddette fasi dell'ibernazione aumenta in seguito all'infusione di ORX-A; viceversa la CST riduce tale parametro, mentre il co-trattamento ORX-A+CST ne causa un aumento solo durante la fase d'INGR. L'iperattività indotta dall'ORX-A potrebbe essere dovuta all'attivazione del sistema somatomotorio dopaminergico HTH con conseguente variazione dei comportamenti stereotipati, come ad esempio il grooming che, infatti, sono aboliti in seguito alla somministrazione di antagonisti dopaminergici (Nakamura et al., 2000; Torterolo et al., 2011). Allo stesso modo gli effetti ipoattivi indotti dalla CST propongono tale peptide CgA-derivato come il principale elemento simpatoinibitorio capace di attenuare non solo i parametri cardiovascolari, ma anche le condizioni di iperattività (Gaede & Pilowsky, 2012; Burgess et al., 2013).

Le variazioni trascrizionali del ORX2R a livello HTH e dei nuclei BIA e CeA sottolineano l'importanza di queste stazioni limbiche nella regolazione motoria, del feeding e del drinking durante le diverse fasi del ciclo d'ibernazione (Marcus et al., 2001; Alò et al., 2011). Al contrario, la down-regulation dello stesso a livello del SO, in seguito alla somministrazione di ORX-A, fornisce un'importante indicazione circa il ruolo inibitorio di tale nucleo, che rilasciando meno ossitocina favorisce uno stato di pro-obesità (Ocskó et al., 2012; Sabatier et al., 2013). In questo contesto non sorprende che gli effetti simpatoinibitori della CST sono correlati alla down-regulation del ORX2R in molte aree limbiche, eccetto che nel SO, dove invece si verifica up-regulation favorendo così un effetto anoressigenico ossitocina-dipendente (Sabatier et al., 2013). È interessante notare che, accanto alla riduzione del ORX2R a livello del centro della fame (LH), la sua riduzione nell'AMY e nelle aree HIP, in seguito all'infusione con CST, potrebbe rappresentare una delle cause molecolari per cui si registra una riduzione del consumo di acqua e del grado di vigilanza degli animali (Davis & Whalen, 2001).

La riduzione del segnale argirofilico (indice di neurodegenerazione) nelle aree con elevati livelli di ORX2R, specialmente a livello HTH, è in accordo con quanto visto in un recente lavoro (Avolio et al., 2013), nonché con l'aumentata sopravvivenza neuronale favorita da tale recettore a livello corticale. Il ruolo protettivo del ORX2R potrebbe essere dovuto all'up-regulation di HIF-1 che, favorendo l'attività glicolitica, determina un aumento della sopravvivenza neuronale in condizioni ipossiche, come evidenziato dalla riduzione della degenerazione neuronale durante la fase ipertensiva del RISV (Yuan et al., 2011; Mayr et al., 2011; Sokołowska et al., 2012). Tale attività neuroprotettiva potrebbe essere correlata alla riduzione delle attività CgA-dipendenti come la riduzione della frequenza respiratoria e dell'attività cardiovascolare (Takakura et al., 2011), e ciò potrebbe far comprendere nuovi meccanismi di cross-talking che, favorendo l'attivazione del simpatico, potrebbero guidare il criceto verso la fase del RISV (Avolio et al., 2013). In tale contesto, la neuroprotezione registrata a livello HTH, più che in altre aree cerebrali, potrebbe dipendere dall'attività trascrizionale dei nuclei LH, soprachiasmatico, preottico dorso- e ventro- mediale che risultano essere coinvolti nell'omeostasi cardiovascolare e del ciclo sonno/veglia attraverso il controllo di processi vitali, quali l'ingestione di cibo, i segnali di sazietà, i ritmi circadiani e il consumo energetico (Fontes et al., 2011; Fortaleza et al., 2012; Nakamura, 2012; Schwartz et al., 2013).

Dai risultati della seconda parte di questo lavoro sono emersi gli effetti trascrizionali differenziati esercitati da parte della CST *in vitro* sull'espressione NMDAergica e ORXergica in cellule HIP e HTH di criceto esposte a condizioni ischemiche. Non solo in questo, ma anche in una serie di altri studi, l'HIP ha dimostrato di essere una delle strutture cerebrali meglio indicata per i processi di rimodellamento neuronale e per la riattivazione sinaptica in seguito agli eventi ischemici (Sallmen et al., 2003). Allo stesso modo, anche la regione HTH ha dimostrato di svolgere un ruolo essenziale contro gli insulti ischemici (Brisson et al., 2013), motivo per cui necessita di ulteriori e approfondite indagini. Pertanto, i risultati

ottenuti forniscono nuove indicazioni sul ruolo modulatorio svolto dal peptide neuroattivo CST e da specifiche subunità NMDAergiche (NR1 e NR2A) e ORXergiche (ORX1R) durante il differenziamento dei neuroni HIP e HTH nella prima settimana di sviluppo postnatale di *Mesocricetus auratus*, ma soprattutto in risposta a condizioni ischemiche, tipiche del ciclo dell'ibernazione (Canonaco et al., 2005). Va inoltre sottolineato che, sebbene la vulnerabilità del HIP (Liu et al., 2013) e la resistenza del HTH (Brisson et al., 2013) in condizioni ischemiche siano state in parte studiate, in questo lavoro esse vengono valutate per la prima volta anche in co-cultura.

È noto che la neurotrasmissione eccitatoria mediata dai NMDARs è fondamentale nella fisiologia del SNC dei mammiferi (Furukawa et al., 2005), ma soprattutto nella patogenesi dell'ischemia cerebrale. L'eccessivo rilascio di Glu determina, infatti, iperattivazione dei NMDARs inducendo influsso di Ca^{2+} e stress ossidativo, con conseguenti danni al DNA e induzione dell'apoptosi (Yu et al., 2014). Studi eseguiti su colture cellulari hanno dimostrato che il Glu extracellulare aumenta notevolmente durante l'OGD fino a indurre morte neuronale (Choi et al., 1987). In questo contesto, è emerso anche che il blocco farmacologico dei NMDARs riduce le lesioni neuronali provocate da tale deprivazione, confermando il ruolo eccitotossico di questi recettori durante la patogenesi ischemica (Tang & Xing, 2013; Banco-Suarez & Hanley, 2014). La scelta di analizzare le subunità NR1 e NR2A nasce dal fatto che l'eterodimero da loro composto rappresenta l'unità funzionale dei NMDARs (Furukawa et al., 2005). Di queste, la prima (legante la Gly) è la subunità obbligatoria per il funzionamento del recettore (Dunn et al., 1999; Gascón et al., 2005) e diminuzioni della sua espressione si associano alla riduzione di attività dello stesso (Song et al., 2009). Sicché l'up-regulation di NR1 (responsabile dell'ingresso di Ca^{2+}) riscontrata a livello HIP in condizioni OGD è coerente con il ruolo eccitotossico riconosciuto all'overstimolazione dei NMDARs (Dos Anjos et al., 2009; Neuhaus et al., 2012), nonché con quanto osservato in astrociti OGD in cui si verifica un incremento trascrizionale di tale subunità

(Zhou et al., 2010). Di conseguenza il ruolo eccitotossico di NR1 a livello HIP in condizioni OGD+CST, sembra essere in linea con l'aumentata degenerazione neuronale riscontrata in *Mesocricetus auratus* trattato con CST durante la fase simil-ischemica (Mele et al., 2014). Si può quindi ritenere che la maggiore up-regulation della subunità NR1 in condizioni OGD+CST sia prevalentemente correlata a una minor probabilità di sopravvivenza di tali cellule in seguito all'aggiunta del fattore ipotensivo CST che riduce l'effetto protettivo relazionato al decremento di NR1 (Chen et al., 2013). La subunità NR2A, oltre a determinare le caratteristiche biofisiche del canale, è considerata fondamentale per la trasmissione sinaptica grazie all'interazione con PSD-95/SAP90 (Perez-Otano et al., 2001; Mele et al., 2014). Tale subunità è responsabile dei meccanismi neuroprotettivi e riduce la morte cellulare in condizioni di neurodegenerazione (De Montigny et al., 2013). Se ne deduce quindi che la CST, che ne provoca una down-regulation sia in condizione OGD, che NOGD, su cellule HIP non rivesta un ruolo protettivo.

Sebbene non sia ancora del tutto chiaro il ruolo svolto dalle ORXs nei meccanismi di morte neuronale, è noto che quest'ultime tendono ad aumentare la vitalità delle cellule nervose proteggendo i neuroni corticali dallo stress ossidativo in condizioni d'ipossia attraverso l'up-regulation di HIF-1 (Sikder & Kodadek, 2007; Mayr et al., 2011; Sokołowska et al., 2014). Quindi, se da un lato a livello HIP prevale l'espressione di NR1, piuttosto che della subunità protettiva NR2A, per quanto concerne l'ORX1R si osserva un up-regulation in tutte le condizioni analizzate, ma soprattutto in OGD. In pratica è come se in risposta a un insulto ischemico le cellule HIP cercano di proteggersi attraverso la via ORXergica e, infatti, l'up-regulation registrata in condizioni OGD è in accordo con quanto osservato su ratti con ischemia focale in cui si riporta un aumento dell'espressione genica e proteica dell'ORX1R (Irving et al., 2002; Nakamachi et al., 2005).

A livello HTH, l'elevato rapporto NR2A/NR1 rilevato in condizioni OGD+CST è coerente con l'osservazione che i neuroni HTH, contrariamente a quelli HIP, sono

relativamente resistenti all'ischemia, che in questa sede genera una lenta depolarizzazione con recupero del potenziale di membrana, probabilmente grazie ad un'isoforma della pompa Na^+/K^+ che funziona meglio durante tale condizione (Brisson et al., 2013). Questo dato è coerente con i risultati della prima parte di questo lavoro in cui in seguito alla somministrazione intracerebrale di CST si registra una riduzione della degenerazione neuronale a livello HTH (Mele et al., 2014), preservando questa importante sede di omeostasi cardiovascolare (Fontes et al., 2014). Diventa, dunque, rilevante l'effetto ipotensivo della CST che induce una down-regulation di NR1 in NOGD+CST e OGD+CST, relazione che si associa alla prevenzione dell'ipertensione (Marques-Lopes et al., 2014).

È interessante notare che nelle co-culture (sia HIP che HTH) il rapporto NR2A/NR1 è più o meno simile a quello delle colture singole, anche se la presenza di un secondo tipo cellulare modifica l'entità delle risposte. In particolare, le cellule HIP sembrano rispondere maggiormente agli effetti della CST sia in NOGD+CST, che OGD+CST in cui si ha un aumento nella produzione di NR2A rispetto alla coltura singola, riducendo la morte cellulare (De Montigny et al., 2013). Per quanto concerne gli ORX1Rs, anche in questo caso la presenza del HTH in condizioni OGD+CST ne fa aumentare l'espressione, rispetto alla coltura singola, facendo supporre che la CST a livello HIP non esplichi di per se effetti neuroprotettivi, mentre quando sono presenti le cellule HTH, che hanno dimostrato di essere sensibili a quest'ultima, anche le cellule HIP aumentano la sintesi dei ORX1Rs. Ciò potrebbe essere supportato dal fatto che le ORXs secrete dal HTH svolgono un ruolo importante nel migliorare la plasticità sinaptica HIP (Yang et al., 2013), così come numerosi altri secreti HTH fra cui l'istamina che fa aumentare la sopravvivenza neuronale delle cellule HIP in risposta a stimoli neurotossici (Kukko-Lukjanov et al., 2006) insieme a grelina, NPY, galanina e BDNF (Beck & Pourie, 2013). Contrariamente a quanto finora visto, la presenza delle cellule HIP, non provoca grandi variazioni sul rapporto NR2A/NR1 nelle cellule HTH. Se invece si considera l'espressione dei singoli fattori, questa co-esistenza sembra causare una

vera e propria inversione dei pattern di espressione cellulare sia per NR1, NR2A che per ORX1R. In quest'ultimo caso è come se la presenza delle cellule HIP, in condizioni OGD, rendesse le cellule HTH più responsive all'ORX-A. Anche in questo contesto, quindi, potrebbe esserci un'azione sinergica dei due tipi cellulari, così come dimostrato dal fatto che alterazioni della funzionalità HIP si ripercuotono sulle capacità omeostatiche del HTH (Stranahan et al., 2009).

Per quanto concerne la morfologia neuronale del HIP durante la prima settimana di sviluppo è stata riportata un'abbondante espressione di marcatori neuronali durante la formazione dei prolungamenti assonici e dendritici che potrebbero risultare importanti durante il differenziamento e per il mantenimento della complessa architettura neuronale in condizioni ischemiche e non. In particolare, l'espressione nel cono assonico è richiesta durante le prime fasi di formazione delle sinapsi, mentre l'attività trascrizionale dei dendriti diventa cruciale negli stadi più avanzati dello sviluppo (Poon et al., 2006). In questo lavoro, accanto alla distribuzione della β -tubulina che rimane pressoché costante in condizioni NOGD, NOGD+CST e OGD per poi ridursi nel trattamento OGD+CST, l'analisi della distribuzione del marker assonico, GAP43, ha evidenziato differenze notevoli. In particolare, esso risulta abbondantemente espresso nei prolungamenti assonici in condizioni NOGD, ma la sua presenza diviene moderata in seguito all'aggiunta della CST, confermando quanto visto negli studi trascrizionali. È stato, invece, dimostrato che l'espressione di GAP43 appare molto ridotta in condizioni OGD, diventando quasi assente nel trattamento OGD+CST. Di conseguenza gli effetti promossi dalla CST sia in condizioni NOGD che OGD, determinano una riduzione della componente assonica, il che è coerente con le numerose evidenze sperimentali secondo cui la distribuzione del mRNA per GAP43 è finemente regolata da Glu e GABA durante lo sviluppo neuronale (Console-Bram et al., 1998). In questo caso la down-regulation dell'espressione NMDAergica in seguito alla somministrazione di CST a livello HIP favorisce una riduzione dei livelli di espressione della proteina. Pertanto, il controllo del

bilancio tra i meccanismi eccitatori e inibitori è essenziale per il corretto mantenimento dell'architettura neuronale nonché per l'esplicarsi delle funzioni complesse. In particolare, visto che i NMDARs svolgono un ruolo importante nel mantenimento strutturale e funzionale delle sinapsi (Alvarez et al., 2007), l'eccessivo rilascio di Glu dovuto a ischemia potrebbe determinare il potenziamento delle risposte NMDAR-dipendenti, alterando il bilancio eccitazione/inibizione (Uchigashima et al., 2007) e compromettendo, di conseguenza, la corretta attivazione delle sinapsi silenti, il che provoca anomalie nel processo di differenziamento neuronale (Opitz et al., 2002).

CONCLUSIONI

In conclusione possiamo affermare che per la prima volta questo studio dimostra la correlazione esistente fra i sistemi recettoriali ORXergico, NMDAergico e la CST, non solo durante le varie fasi del ciclo dell'ibernazione, ma anche durante una condizione ischemica simulata *in vitro*. In particolare sembra che durante l'ibernazione la CST e il ORX2R giocano un ruolo chiave nel controllo delle diverse attività vitali e questo è ampiamente dimostrato dall'aumento del feeding (Sakurai et al., 1998; Avolio et al., 2012) e dell'attività motoria (Marcus et al., 2001) favoriti dall'ORX-A durante il RISV, molto probabilmente attraverso l'aumento del recettore neuroprotettivo ORX2R (Sokołowska et al., 2012). D'altro canto, la CST determina soprattutto una condizione anoressigenica (Bandyopadhyay et al., 2012) attraverso un aumento della degenerazione neuronale soprattutto a livello dell'AMY (Avolio et al., 2011) contemporaneamente con i ridotti livelli del ORX2R che influenzano negativamente gli eventi omeostatici correlati al RISV e al bilancio energetico (Kessler et al., 2011). È interessante notare che il co-trattamento con ORX-A+CST, similmente a quanto osservato per l'ORX-A, causa un effetto pro-obesità durante la fase d'INGR. È, infatti, durante tale fase, in cui la priorità è quella di accumulare energia, l'effetto oressigenico dell'ORX-A sembra essere favorito, mentre la prevalenza della componente simpatoinibitoria

durante il TORP, tende a costituire la forza "inducente" tale stato ipometabolico contemporaneamente con il mantenimento delle funzioni cardiorespiratorie (Drew et al., 2007; Gaede & Pilowsky, 2010). Vanno anche enfatizzate le funzioni esercitate dalla CST, infatti quest'ultima, oltre a causare variazioni dello stato nutrizionale dei criceti durante il ciclo dell'ibernazione, è in grado di modulare sia l'espressione del sistema recettoriale ORXergico (ORX1R), che di quello NMDAergico durante la condizione ischemica. In particolare, l'effetto neuroprotettivo della CST a livello HTH, dovuto all'elevata espressione di ORX1R e NR2A, è in forte contrapposizione con la scarsa capacità protettiva a livello del HIP (De Montigny et al., 2013).

Siamo ancora all'inizio ma lavori in questo campo potrebbero fornire, da un lato, ulteriori indicazioni relative ai meccanismi molecolari limbici implicati negli insulti ischemici OGD-dipendenti e dall'altro proporre nuovi ruoli neuroprotettivi dei segnali NMDAergici HTH. I risultati di questo studio, inoltre, aprono nuovi scenari sul ruolo esercitato dalla CST a livello nervoso e soprattutto dimostrano l'esistenza di meccanismi di cross-talking fra quest'ultima e i sistemi recettoriali NMDAergico e ORXergico e ciò potrebbe essere utile per lo sviluppo di nuove applicazioni terapeutiche nell'ambito dei disordini neurodegenerativi derivanti da alterazioni dell'omeostasi vascolare a livello cerebrale, in particolare durante lo stato di sonno.

BIBLIOGRAFIA

- Aardal S, Aardal NP, Larsen TH, Angeletti RH, Stridsberg M, Taupenot L, Aunis D, Helle KB (1996). Human pheochromocytoma: different patterns of catecholamines and chromogranins in the intact tumour, urine and serum in clinically unsuspected cases. *Scand J Clin Lab Invest*, **56**: 511-523.
- Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G (1993). Vasostatsins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol*, **5** (4): 405-12.
- Adibhatla RM, Hatcher JF (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders Subcell. *Biochem*, **49**: 241-268.
- Agarwal SK & Calaresu FR (1993). Supramedullary inputs to cardiovascular neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol*, **265**: 111-116.
- Ahima RS & Osei SY (2001). Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Mol Med*, **7**: 205-213.
- Albayrak S, Zhao Q, Siesjo BK, Smith ML (1997). Effect of transient focal ischemia on blood-brain barrier permeability in the rat: correlation to cell injury. *Acta Neuropatho*, **94**: 158-163.
- Alò R, Avolio E, Carelli A, Facciolo RM, Canonaco M (2011). Amygdalar glutamatergic neuronal systems play a key role on the hibernating state of hamsters. *BMC Neurosci*, **20**: 12-10.
- Aloia RC (1981). Hibernation. *Recherche*, **12**: 1376-1383.
- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2007). Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci.*, **27**: 7365-7376.
- Amaral D & Lavenex P (2006). Hippocampal Neuroanatomy. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*, Oxford University Press. ISBN 978-0-19-510027-3.
- Amendt K, Czachurski J, Dembowski K, Seller H (1979). Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column; a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst*, **1** (1): 103-7.
- Ammoun S, Holmqvist T, Shariatmadari R, Oonk HB, Detheux M, Parmentier M, Akerman KE, Kukkonen JP (2003). Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J Pharmacol Exp Ther*, **305** (2): 507-14.
- Ammoun S, Lindholm D, Wootz H, Akerman KE, Kukkonen JP (2006). G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and-independent cell death through p38 mitogen-/stress- activated protein-kinase. *J Biol Chem*, **281** (2): 834-42.
- Anderssen SA & Hjermmann I (2000). Physical activity-a crucial factor in the prevention of cardiovascular diseases. *Tidsskr Nor Laegeforen*, **120**: 3168-3172.
- Andjus RK & Petrovic V (1959). Test du rechauffement spontane en endocrinologie. *J. Physiol*, **51**: 387.
- Andjus RK (1969). Some mechanisms of mammalian tolerance to low body temperatures. *Symp Soc Exp Biol*, **23**: 351-94.
- Andresen MC & Kunze DL (1994). Nucleus tractus solitaries-gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol*, **56**: 93-116.

- Arai S, Hanaya T, Sakurai T, Ikeda M, Kurimoto M (2005). A novel phenomenon predicting the entry into a state of hibernation in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Vet Med Sci*, **67**: 215-217.
- Arboix A & Alió J (2011). Acute cardioembolic stroke: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **9**: 367-369.
- Arboix A & Alió J (2012). Acute cardioembolic cerebral infarction: answers to clinical questions. *Curr Cardiol Rev*, **8**: 54-67.
- Arboix A, Cendrós V, Besa M, García-Eroles L, Oliveres M, Targa C, Balcells M, Arriva E, Massons J (2008). Trends in risk factors, stroke subtypes and outcome. Nineteen-year data from the Sagrat Cor Hospital of Barcelona Stroke Registry. *Cerebrovasc Dis*, **26**: 509-516.
- Arendt T (2004). Neurodegeneration and plasticity. *Int J Dev Neurosci*, **22** (7): 507-14.
- Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Hayashi Y, Sasano H, Mouri T (2000). Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides*, **21** (4): 565-70.
- Americ SP, Giuliano R, Ernsberger P, Underwood MD, Reis DJ (1990). Synthesis, release and receptor binding of acetylcholine in the C1 area of the rostral ventrolateral medulla: Contributions in regulating arterial pressure. *Brain Res*, **511** (1): 98-112.
- Arora S & Anubhuti (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity-a review. *Neuropeptides*, **40** (6): 375-401.
- Assanelli D, Cottarelli C, Salvadori G, Rubino F, Fernando F, Biffi A (2004). Work, cardiopathy, and sports. *Med Lav*, **95**: 119-123.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981). Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke*, **12** (6): 723-5.
- Avolio E, Alò R, Carelli A, Canonaco M (2011). Amygdalar orexinergic-GABAergic interactions regulate anxiety behaviors of the Syrian golden hamster. *Behav Brain Res*, **218**: 288-295.
- Avolio E, Alò R, Mele M, Carelli A, Canonaco A, Bucarelli L, Canonaco M (2012). Amygdalar excitatory/inhibitory circuits interacting with orexinergic neurons influence differentially feeding behaviors in hamsters. *Behav Brain Res*, **234**: 91-99.
- Avolio E, Facciolo RM, Alò R, Mele M, Carelli A, Canonaco A, Mosciaro L, Talani G, Biggio G, Sanna E, Mahata KS, Canonaco M (2013). Expression variations of Chromogranin A and $\alpha_{1,2,4}$ GABA_AR in discrete limbic and brainstem areas rescue cardiovascular alterations. *Neurosci Res*, **77**: 8-15.
- Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC, Aicher SA (2006). Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. *J Neurosci*, **26** (46): 11893-902.
- Baker CJ, Fiore AJ, Frazzini VI, Choudhri TF, Zubay GP, Solomon RA (1995). Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the cores of permanent focal cerebral infarcts. *Neurosurgery*, **36**: 994-1002.

- Banco-Suarez E, Hanley JG (2014). Distinct subunit-specific α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor trafficking mechanisms in cultured cortical and hippocampal neurons in response to oxygen and glucose deprivation. *J Biol Chem*, **289**: 4644-4651.
- Bandyopadhyay GK, Vu CU, Gentile S, Lee H, Biswas N, Chi NW, O'Connor DT, Mahata SK (2012). Catestatin (chromogranin A(352-372)) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling. *J Biol Chem*, **287** (27): 23141-51.
- Barman SM & Gebber GL (1987). Lateral tegmental field neurons of cat medulla: a source of basal activity of ventrolateral medullospinal sympathoexcitatory neurons. *J Neurophysiol*, **57** (5): 1410-24.
- Barone DA & Kriege AC (2013). Stroke and obstructive sleep apnea: a review. *Curr Atheroscler Rep*, **15**: 334.
- Barreiro ML, Pineda R, Gaytan F, Archanco MA, Burrell MA, Castellano JM, Hakovirta H, Nurmio M, Pinilia L, Agiular E, Toppari J, Dieguez C, Tena-Sempere M (2005). Pattern of orexin expression and direct biological actions of orexin-A in rat testis. *Endocrinology*, **146**: 5164-5175.
- Barron KW & Heesch CM (1990). Cardiovascular effects of posterior hypothalamic stimulation in baroreflex-denervated rats. *Am J Physiol*, **259** (3 Pt 2): H720-7.
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR (2011). The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev*, **32**: 755-797.
- Bassetti CL & Aldrich MS (2001). Sleep electroencephalogram changes in acute hemispheric stroke. *Sleep Med*, **2** (3): 185-194.
- Beal MF (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J*, **6**: 3338-3344.
- Beck B & Pourié G (2013). Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr Rev*, **71**: 541-561.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*, **87**: 1620-1624.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, **17**: 472-476.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 2711-2716.
- Benfenati F (2007). Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed.*, **78**: 58-66.
- Beltowski J (2006). Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **189**: 47-60.

- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B (2001). Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci*, **21**: 7127-7134.
- Benveniste H (2009). Glutamate, microdialysis, and cerebral ischemia: lost in translation? *Anesthesiology*, **110**: 422-425.
- Berthoud HR, Patterson LM, Sutton GM, Morrison C, Zheng H (2005). Orexin inputs to caudal raphé neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. *Histochem Cell Biol*, **123** (2): 147-56.
- Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Señaris R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A (2001). Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*, **86** (7): 1616-9.
- Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT (2005). Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol*, **25**: 119-122.
- Borges R, Díaz-Vera J, Domínguez N, Arnau MR, Machado JD (2010). Chromogranins as regulators of exocytosis. *J Neurochem*, **114** (2): 335-43.
- Bousser MG (1999). Stroke in women: the 1997 Paul Dudley White International lecture. *Circulation*, **99**: 463-467.
- Bratincsàk A, McMullen D, Miyake S, Tóth ZE, Hallenbeck JM, Palkovits M (2007). Spatial and temporal activation of brain regions in hibernation: c-fos expression during the hibernation bout in thirteen-lined ground squirrel. *J Comp Neurol*, **505** (4): 443-58.
- Brierley JB (1979). Ischemic necrosis along brain arterial boundary zones: some aspects of its etiology. *Adv Neurol*, **26**: 155-162.
- Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkuken U, Hossmann KA (1999). Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport*, **10**: 3269-3272.
- Brisson CD & Andrew RD (2012). A neuronal population in hypothalamus that dramatically resists acute ischemic injury compared to neocortex. *J Neurophysiol*, **108**: 419-430.
- Brisson CD, Lukewich MK, Andrew RD (2013). A distinct boundary between the higher brain's susceptibility to ischemia and the lower brain's resistance. *PLoS One*, **8**: 79589.
- Brown DL & Guyenet PG (1984). Cardiovascular neurons of brainstem with projections to spinal cord. *Am J Physiol*, **247** (6 Pt 2): R1009-16.
- Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE (2013). Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice. *J Neurosci*, **33**: 9734-9742.
- Busch E, Kruger K, Hossmann KA (1997). Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res*, **778**: 16-24.
- Camargo CA (1989). Jr Moderate alcohol consumption and stroke. The epidemiologic evidence. *Stroke*, **20**: 1611-1626.
- Canguilhem B, Miro JL, Kempf E, Schmitt P (1986). Does serotonin play a role in entrance into hibernation? *Am J Physiol*, **251** (4 Pt 2): R755-61.

- Canonaco M, Madeo M, Alò R, Giusi G, Granata T, Carelli A, Canonaco A, Facciolo RM (2005). The histaminergic signaling system exerts a neuroprotective role against neurodegenerative-induced processes in the hamster. *J Pharmacol Exp Ther*, **315**: 188-195.
- Carey HV, Andrews MT, Martin SL (2003). Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev*, **83**: 1153-1181.
- Carrive P, Bandler R, Dampney RAL (1988). Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. *Brain Res*, **460** (2): 339-45.
- Carter ME, Schaich Borg J, de Lecea L (2009). The brain hypocretins and their receptors: mediators of allostatic arousal. *Curr Opin Pharmacol*, **9**: 39-45.
- Caverson MM, Ciriello J, Calaresu FR (1983). Cardiovascular afferent inputs to neurons in the ventrolateral medulla projecting directly to the central autonomic area of the thoracic cord in the cat. *Brain Res*, **274** (2): 354-8.
- Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ (2000). Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **278**: 692-7.
- Chen J & Randeve HS (2004). Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol*, **18**: 2790-2804.
- Chen L, McKenna JT, Bolortuya Y, Brown RE, McCarley RW (2013). Knockdown of orexin type 2 receptor in the lateral pontomesencephalic tegmentum of rats increases REM sleep. *Eur J Neurosci*, **37** (6): 957-63.
- Chen SH, Lin MT, Chang CP (2013). Ischemic and oxidative damage to the hypothalamus may be responsible for heat stroke. *Curr Neuropharmacol*, **11**: 129-140.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*, **17**: 738-743.
- Chistiakova NV & Savost'ianov KV (2011). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and genetic variants affecting its reactivity. *Genetika*, **47**: 1013-1025.
- Choi DW, Peters S, Viseskul V (1987). Dextrorphan and levorphanol selectively block N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity on cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **242**: 713-720.
- Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K (2003). Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas*, **27** (2): 161-6.
- Conlon JM (2010). Granin-derived peptides as diagnostic and prognostic markers for endocrine tumors. *Regul Pept*, **165** (1): 5-11.
- Console-Bram LM, Baird DH, Fitzpatrick-McElligott SG, McElligott JG (1998). Modulation of GAP-43 mRNA by GABA and Glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res*, **783**: 316-325.

- Cooper DC, Chung S, Spruston N (2005). "Output-Mode Transitions Are Controlled by Prolonged Inactivation of Sodium Channels in Pyramidal Neurons of Subiculum". *PLoS Biology*, **3**: 175.
- Coote JH, Yang Z, Pyner S, Deering J (1998). Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **25** (6): 461-3.
- Curry WJ, Barkatullah SC, Johansson AN, Quinn JG, Norlen P, Connolly CK, McCollum AP, McVicar CM (2002). WE-14, a chromogranin a-derived neuropeptide. *Ann N Y Acad Sci*, **971**: 311-6.
- Darker JG, Porter RA, Eggleston DS, Smart D, Brough SJ, Sabido-David C, Jerman JC (2001). Structure-activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett*, **11** (5): 737-40.
- Date Y, Mondal MA, Matsuhura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nazakato M (2000). Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Mol Brain Res*, **76**: 1-6.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sarurais T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Sci USA*, **96** (2): 748-53.
- Daumas S, Halley H, Francés B, Lassalle JM (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem*, **12**: 375-382.
- Davis M & Whalen PJ (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psych*, **6**, 13-34.
- De Bartolo L, Rende M, Giusi G, Morelli S, Piscioneri A, Canonaco M, Orioli E (2007). Membrane bio-hybrid systems: A valuable tool for the study of neuronal activities. Editori: Canonaco M, Facciolo RM *Evolutionary Molecular Strategies and Plasticity*. Kerala: Research Signpost Press, 379-396.
- de Lecea, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett II FS, Frankel WN, Van Den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (1): 322-7.
- De Montigny A, Elhiri I, Allyson J, Cyr M, Massicotte G (2013). NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3 β , and PKC activities. *Neural Plast*, **2013**: 261593.
- De Vries GJ & Simerly RB (2002). Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. *Hormones, brain, and behavior.*, p 137-191.
- De Wardener HE (2001). The hypothalamus and hypertension. *Physiol Rev*, **81**: 1599-1658.
- Deb P, Sharma S, Hassan K (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*, **5**: 197-218.
- Denda S, Takei K, Kumamoto J, Goto M, Tsutsumi M, Denda M (2012). Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and released upon stimulation with adenosine 5'-[γ thio]triphosphate in vitro. *Exp Dermatol*, **21** (7): 535-7.

- Deurveilher S & Semba K (2003). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. *Brain Res*, **987** (1): 100-6.
- Di Tullio MR & Homma S (2002). Mechanisms of cardioembolic stroke. *Curr Cardiol Rep*, **4**: 141-148.
- Di Vito A, Mele M, Piscioneri A, Morelli S, De Bartolo L, Barni T, Facciolo RM, Canonaco M (2014). Overstimulation of Glutamate Signals Leads to Hippocampal Transcriptional Plasticity in Hamsters. *Cell Mol Neurobiol*, **34**: 501-509.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, **22**: 391-397.
- Drew KL, Buck CL, Barnes BM, Christian SL, Rasley BT, Harris MB (2007). Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J Neurochem*, **102**: 1713-1726.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM (1999). Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*, **19**: 6385-6393.
- Dunn RJ, Bottai D, Maler L (1999). Molecular biology of the apteronotus NMDA receptor NR1 subunit. *J Exp Biol*, **202**: 1319-1326.
- Durukan A & Tatlisumak T (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, **87**: 179-197.
- Eiden LE (1987). Is Chromogranin A prohormone? *Nature*, **325**: 301.
- El Hilali M & Andjus RK (1966). Role of shivering thermogenesis during rewarming from induced hypothermia as evaluated by means of curarization and of indirect calorimetry. *Arch Biol Sci*, **18**: 133-142.
- Eldridge FL, Millhorn DE, Kiley JP, Waldrop TG (1985). Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. *Respir Physiol*, **59** (3): 313-37.
- Elgot A, El Hiba O, Gamrani H (2012). Alteration of dopaminergic innervation and voluntary movements after long period of thirst in a semi-desert rodent, *Meriones shawi*: behavioral and immunohistochemical studies. *C R Biol*, **335**, 463-471.
- Eng HL, Dalkara T, Moskowitz MA (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Neurosci*, **4**: 399-415.
- Ernsberger P, Arango V, Reis DJ (1988). A high density of muscarinic receptors in the rostral ventrolateral medulla of the rat is revealed by correction for autoradiographic efficiency. *Neurosci Lett*, **85** (2): 179-86.
- Escudero Augusto D, Marqués Alvarez L, Taboada Costa F (2008). Up-date in spontaneous cerebral hemorrhage. *Med Intensiva*, **32**: 282-295.
- Estruch R (1995). Efectos cardiovasculares del alcohol. *Med Clin (Barc.)*, **105**: 628-635.
- Everett NB & Baker BL (1945). The distribution of cell types in the anterior hypophysis during late pregnancy and lactation. *Endocrinology*, **37**: 83-8.

- Faraji J, Lehmann H, Metz GA, Sutherland RJ (2008). Rats with hippocampal lesion show impaired learning and memory in the ziggurat task: a new task to evaluate spatial behavior. *Behav Brain Res*, **189**: 17-31.
- Fasciotto BH, Denny JC, Greeley GH Jr, Cohn DV (2000). Processing of chromogranin A in the parathyroid: generation of parastatin-related peptides. *Peptides*, **21** (9): 1389-401.
- Feeney DM & Baron JC (1986). Diaschisis. *Stroke*, **17** (5): 817-30.
- Feigl EO (1975). Reflex parasympathetic coronary vasodilatation elicited from cardiac receptors in the dog. *Circ Res*, **37** (2): 175-82.
- Felig JD, Baxter LA, Frohman (1995). Endocrinology and metabolism. New York: McGraw-Hill.
- Ferrer I (2006). Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies. *Cerebrovasc Dis*, **2**: 9-20.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfó E, Justicia C, Planas AM (2003). Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **29**: 472-481.
- Ferro JM (2003). Brain embolism. Answers to practical questions. *J Neurol*, **250**: 139-147.
- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*, **184**: 64-74.
- Fortaleza EA, Scopinho AA, Corrêa FM (2012). Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus mediate cardiovascular responses evoked by the microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of the rat brain. *Neuroscience*, **219**: 157-65.
- Frerichs KU, Kennedy C, Sokoloff L, Hallenbeck JM (1994). Local cerebral blood flow during hibernation, a model of natural tolerance to 'cerebral ischemia'. *J Cereb Blood Flow Metab*, **14** (5): 193-205.
- Friedman JM, Halaas JL (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**: 763-770.
- Furlow TW Jr & Bass NH (1975). Stroke in rats produced by carotid injection of sodium arachidonate. *Science*, **187**: 658-660.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, **438**: 185-192.
- Fuxe K, Bjelke B, Andbjør B, Grahn H, Rimondini R, Agnati LF (1997). Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport*, **8**: 2623-2629.
- Gaede AH & Pilowsky PM (2010). Catestatin in rat RVLM is sympathoexcitatory, increases barosensitivity, and attenuates chemosensitivity and the somatosympathetic reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **299**: 1538-1545.
- Gaede AH & Pilowsky PM (2012). Catestatin, a chromogranin A-derived peptide, is sympathoinhibitory and attenuates sympathetic barosensitivity and the chemoreflex in rat CVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **302**: 365-372.

- Garcia GE, Gabbai FB, O'Connor DT, Dinh TQ, Kennedy B, Ziegler MG, Takiyyuddin MA (1994). Does chromostatin influenza catecholamine rilascio o la pressione sanguigna in vivo? *Peptidi*, **15** (1): 195-7.
- Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodríguez-Peña A, Díaz-Guerra M (2005). Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem*, **280**: 35018-35027.
- Gayen JR, Zhang K, Ramachandra Rao SP, Mahata M, Chen Y, Kim HS, Naviaux RK, Sharma K, Mahata SK, O'Connor DT (2010). Role of reactive oxygen species in hyperadrenergic hypertension: biochemical, physiological, and pharmacological evidence from targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene. *Circ Cardiovasc Genet*, **3** (5): 414-25.
- Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, Di Leone RJ (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci*, **23** (8): 3106-11.
- Ginsberg MD & Busto R (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, **20**: 1627-1642.
- Giusi G, Alò R, Avolio E, Zizza M, Facciolo RM, Talani G, Biggio G, Sanna E, Canonaco M (2012). Brain excitatory/inhibitory circuits cross-talking with chromogranin A during hypertensive and hibernating states. *Curr Med Chem*, **19**: 4093-4114.
- Giusi G, Alò R, Crudo M, Facciolo RM, Canonaco M (2008). Specific cerebral heat shock proteins and histamine receptor cross-talking mechanisms promote distinct lead-dependent neurotoxic responses in teleosts. *Toxicol and Appl Pharmacol*, **227**: 248-256.
- Goldberg MP & Choi DW (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture-calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*, **13**: 3510-3524.
- Gordon FJ & McCann LA (1988). Pressor responses evoked by microinjection of L-glutamate in the caudal ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res*, **457** (2): 251-8.
- Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC (1976). The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med*, **27**: 465-484.
- Guyenet PG (1990). Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: Loewy AD & Spyer KM (Editors), Central Regulation of Autonomic Functions. Oxford University Press, New York, 145-167.
- Haak LL, Mignot E, Kilduff TS, Dement WC, Heller HC (1991). Regional changes in central monoamine and metabolite levels during the hibernation cycle in the golden-mantled ground squirrel. *Brain Res*, **563** (1-2): 215-20.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 10911-10916.
- Han HS, Karabiyikoglu M, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA (2003). Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, **23** (5): 589-98.

- Harris MB & Milsom WK (1995). Parasympathetic influence on heart rate in euthermic and hibernating ground squirrels. *J Exp Biol*, **198** (Pt 4): 931-7.
- Helle KB, Reed RK, Ehrhart M, Aunis D, Hogue Angeletti R (1990). Chromogranin A: osmotically active fragments and their susceptibility to proteolysis during lysis of the bovine chromaffin granules. *Acta Physiol Scand*, **138** (4): 565-74.
- Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B (2007). The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci*, **64**: 2863-2886.
- Heller HC & Colliver GW (1974). CNS regulation of body temperature during hibernation. *Am J Physiol*, **227** (3): 583-9.
- Heller HC (1979). Hibernation: neural aspects. *Annu Rev Physiol*, **41**: 305-21.
- Herbison AE (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocr Rev*, **19** (3): 302-30.
- Heuschmann PU, Berger K, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Adelman M, Buecker-Nott HJ, Rother J, Neundoerfer B, Kolominsky-Rabas PL (2003). Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group. *Stroke*, **34**: 1106-1113.
- Hiller-Sturmhöfel S & Bartke A (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World*, **22**: 153-164.
- Hirota K, Kushikata T, Kudo M, Kudo T, Smart D, Matsuki A (2003). Effects of central hypocretin-1 administration on hemodynamic responses in young-adult and middle-aged rats. *Brain Res*, **981** (1-2): 143-50.
- Hossmann KA (1998). Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res*, **39**: 106-120.
- Huang SC, Dai YWE, Lee YH, Chiou LC, Hwang LL (2010). Orexins depolarize rostral ventrolateral medulla neurons and increase arterial pressure and heart rate in rats mainly via orexin 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **334** (2): 522-9.
- Huck UW & Lisk RD (1985). Determinants of mating success in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): I. Male capacity. *J Comp Psychol*, **99**: 98-107.
- Hudgel DW (1992). Mechanisms of obstructive sleep apnea. *Chest*, **101**: 541-549.
- Hwang LL, Chen TD, Dun NJ (2001). Mechanisms of orexin-induced depolarizations in the rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. *J Physiol*, **537** (Pt 2): 511-20.
- Iijima T, Bauer R, Hossmann KA (1993). Brain resuscitation by extracorporeal circulation after prolonged cardiac arrest in cats. *Intensive Care Med*, **19**: 82-88.
- Irving EA, Harrison DC, Babbs AJ, Mayes AC, Campbell CA, Hunter AJ, Upton N, Parsons AA (2002). Increased cortical expression of the orexin-1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Lett*, **324**: 53-56.
- Jamrozik K, Broadhurst RJ, Anderson CS, Stewart-Wynne EG (1994). The role of lifestyle factors in the etiology of stroke. A population-based case control study based at Perth, Western Australia. *Stroke*, **25**: 51-59.

- Jansen AS, Nguyen XV, Karpitskiy V, Mettenleiter TC, Loewy AD (1995). Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science*, **270** (5236): 644-6.
- Ji X, Luo Y, Ling F, Stetler RA, Lan J, Cao G, Chen J (2007). Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. *Front Biosci*, **12**: 1737-47.
- John J, Wu MF, Siegel JM (2000). Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Res Online*, **3** (1): 23-8.
- Johnston RE & Rasmussen K (1984). Individual recognition of female hamsters by males: role of chemical cues and of the olfactory and vomeronasal systems. *Physiol Behav*, **33**: 95-104.
- Jöhren O, Brüggemann N, Dendorfer A, Dominiak P (2003). Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology*, **144** (4): 1219-25.
- Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P (2001). Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology*, **142** (8): 3324-31.
- Kalueff AV (2007). Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plast*, **2007**: 78171.
- Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T (1985). Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model. *Stroke*, **16**: 76-84.
- Kanenishi K, Ueno M, Momose S, Kuwabara H, Tanaka H, Sato C, Kobayashi T, Hino O, Sakamoto H, Hata T (2004). Prepro-orexin mRNA expression in the rat brain is increased during pregnancy. *Neurosci Lett*, **368**: 73-77.
- Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, Cvorov V, Wartolowska K, Haga K, Armitage PA, Bastin ME, Dennis MS (2009). Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. *Brain*, **132**: 955-964.
- Karibe H, Chen SF, Zarow GJ, Gafni J, Graham SH, Chan PH, Weinstein PR (1994). Mild intraischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. *Brain Res*, **649** (1-2): 12-8.
- Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG (1989). Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **29**: 403-414.
- Karteris E, Chen J, Randeva HS (2004). Expression of human prepro-orexin and signalling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 1957-1962.
- Katz LM, Young AS, Frank JE, Wang Y, Park K (2004). Regulated hypothermia reduces brain oxidative stress after hypoxic-ischemia. *Brain Res*, **1017** (1-2): 85-91.
- Katz L, Ebmeyer U, Safar P, Radovsky A, Neumar R (1995). Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, **15**: 1032-1039.

- Kaufman MP & Forster HV (1996). Reflexes controlling circulatory, ventilator and airway responses to exercise. *Exercise: Regulation and integration of multiple systems*, vol 12: 381-447.
- Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T (2003). Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**: 581-593.
- Kenney JW & Gould TJ (2008). Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol Neurobiol*, **38**: 101-121.
- Kerman IA (2008). Organization of brain somatomotor-sympathetic circuits. *Exp Brain Res*, **187** (1): 1-16.
- Kessler BA, Stanley EM, Frederick-Duus D, Fadel J (2011). Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. *Neuroscience*, **31**: 178:82-8.
- Khatri N & Man HY (2013). Synaptic Activity and Bioenergy Homeostasis: Implications in Brain Trauma and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol*, **4**: 199.
- Kilduff TS, Miller JD, Radeke CM, Sharp FR, Heller HC (1990). 14C-2-deoxyglucose uptake in the ground squirrel brain during entrance to and arousal from hibernation. *J Neurosci*, **10** (7): 2463-75.
- Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke*, **33**: 809-815.
- Kim T & Loh YP (2005). Chromogranin A: a surprising link between granule biogenesis and hypertension. *J Clin Invest*, **115**: 1711-1713.
- Kline DD (2008). Plasticity in glutamatergic NTS neurotransmission. *Respir Physiol Neurobiol*, **164** (1-2): 105-11.
- Kmiec Z (2006). Central regulation of food intake in ageing. *J Physiol Pharmacol*, **57** Suppl **6**: 7-16.
- Knutson JS, Harley MY, Hisel TZ, Chae J (2007). Improving hand function in stroke survivors: a pilot study of contralaterally controlled functional electric stimulation in chronic hemiplegia. *Arch Phys Med Rehabil*, **88**: 513-520.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986). Experimental studies of ischemic brain edema: 1 A new experimental model of cerebral embolism in rats which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J*, **8**: 1-8.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**: 656-660.
- Koller A & Toth P (2012). Contribution of flow-dependent vasomotor mechanism to the autoregulation of cerebral blood flow. *J Vasc Res*, **49**: 375-389.
- Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ (2001). Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest*, **108**: 1533-1540.

- Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP (2010). Reprint of: Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept*, **165** (1): 95-101.
- Krahulik D, Zapletalova J, Frysak Z, Vaverka M (2010). Dysfunction of hypothalamic-hypophysial axis after traumatic brain injury in adults. *J Neurosurg*, **113**: 581-584.
- Kreisel SH, Hennerici MG, Bätzner H (2007). Pathophysiology of stroke rehabilitation: the natural course of clinical recovery, use-dependent plasticity and rehabilitative outcome. *Cerebrovasc Dis*, **23**: 243-255.
- Krieger DW, Yenari MA (2004). Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke*, **35** (6): 1482-9.
- Krukoff TL, Harris KH, Linetsky E, Jhamandas JH (1994). Expression of c-fos protein in rat brain elicited by electrical and chemical stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, **59** (6): 590-602.
- Kubo T (1998). Cholinergic mechanism and blood pressure regulation in the central nervous system. *Brain Res Bull*, **46** (6): 475-81.
- Kubo T, Nagura J, Kihara M, Misu Y (1986). Cardiovascular effects of L-glutamate and g-aminobutyric acid injected into the rostral ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **279** (1): 150-61.
- Kukko-Lukjanov TK, Soini S, Taira T, Michelsen KA, Panula P, Holopainen IE (2006). Histaminergic neurons protect the developing hippocampus from kainic acid-induced neuronal damage in an organotypic coculture system. *J Neurosci*, **26**: 1088-1097.
- Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KEO (2002). Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **283**: 1567-1591.
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T (1999). Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res*, **842** (1): 256-61.
- Lang M, Bufe B, De Pol S, Reiser O, Meyerhof W, Beck-Sickinger AG (2005). Structural properties of orexins for activation of their receptors. *J Pept Sci*, **12** (4): 258-66.
- Lassen NA (1959). Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev*, **39**: 183-238.
- Lauer KK, Shen H, Stein EA, Ho KC, Kampine JP, Hudetz AG (2002). Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurol Res*, **24**: 181-190.
- Lawrence AJ, Cowen MS, Yang HJ, Chen F, Oldfield B (2006). The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br J Pharmacol*, **148** (6): 752-9.
- Lee I & Kesner RP (2002). Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci*, **5**: 162-168.
- Lewis CJ, Becker JJ, Manis AD, Hamilton JS, Horowitz JM, Horwitz BA (2012). Neuroprotection supports signal processing in the hippocampus of Syrian hamsters, a facultative hibernator. *Neurosci Lett*, **520**: 20-25.
- Li DP & Yang Q (2007). Membrane and synaptic properties of nucleus tractus solitarius neurons projecting to the caudal ventrolateral medulla. *Auton Neurosci*, **136** (1-2): 69-81.

- Li J, Hu Z, de Lecea L (2014). The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *Br J Pharmacol*, **171**: 332-350.
- Li Q, Zhang R, Guo YL, Mei YW (2009). Effect of neuregulin on apoptosis and expressions of STAT3 and GFAP in rats following cerebral ischemic reperfusion. *J Mol Neurosci*, **37**: 67-73.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, De Jong PG, Nishino S, Mignot E (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, **98** (3): 365-76.
- Liu ZW & Gao XB (2007). Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons via A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol*, **97** (1): 837-48.
- Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z (2013). Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomed Rep*, **1**: 861-867.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci*, **24**: 8885-8895.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, **20**: 84-91.
- López M, Seoane LM, Tovar S, Nogueiras R, Dieguez C, Senaris R (2004). Orexin-A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin mRNA content in a growth hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur J Neurosci*, **19** (8): 2080-8.
- Lubkin M & Stricker-Krongrand A (1998). Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **253** (2): 241-5.
- Lucas SJE, Tzeng YC, Galvin SD, Thomas KN, Ogoh S, Ainslie PN (2010). Influence of Changes in Blood Pressure on Cerebral Perfusion and Oxygenation Cerebral Blood Flow. *Hypertension*, **55**: 698-705.
- Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, Kieffer B, Aunis D, Metz-Boutigue MH (2002). Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A (47-66)-derived peptide. *Ann N Y Acad Sci*, **971**: 359-61.
- Luiten PG, Ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB (1985). The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res*, **329** (1-2): 374-8.
- Luong LN & Carrive P (2012). Orexin microinjection in the medullary raphe increases heart rate and arterial pressure but does not reduce tail skin blood flow in the awake rat. *Neuroscience*, **202**: 209-217.
- Lyman CP (1951). Effect of increased CO₂ on respiration and heart rate of hibernating hamsters and ground squirrels. *Am J Physiol*, **167** (3): 638-43.
- Ma X, Zubcevic L, Bruning JC, Ashcroftm FM, Burdakov D (2007). Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J Neurosci*, **27**: 1529-1533.

- Machado BH, Bonagamba LG, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ (2002). Pressor response to microinjection of orexin/hypocretin into rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Regul Pept*, **104** (1-3): 75-81.
- Macrae I (1992). New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*, **34**: 302-308.
- Mahata SK, Mahapatra NR, Mahata M, Wang TC, Kennedy BP, Ziegler MG, O'Connor DT, (2003). Catecholamine secretory vesicle stimulus-transcription coupling in vivo. Demonstration by a novel transgenic promoter/photoprotein reporter and inhibition of secretion and transcription by the chromogranin A fragment catestatin. *J Biol Chem*, **278** (34): 32058-67.
- Mahata SK, Mahata M, Fung MM, O'Connor DT (2010). Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*, **162**: 33-43.
- Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM, Parmer RJ (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*, **100**: 1623-1633.
- Makarchenko AF (1968). Role of hypothalamus in regulation of the vegetative and cortical functions. *Fiziol Zh*, **14**(6): 723-31.
- Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG (1999). Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signalling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **70**: 185-188.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, **435** (1): 6-25.
- Marques-Lopes J, Van Kempen T, Waters EM, Pickel VM, Iadecola C, Milner TA (2014). Slow-pressor angiotensin II hypertension and concomitant dendritic NMDA receptor trafficking in estrogen receptor beta-containing neurons of the mouse hypothalamic paraventricular nucleus are sex and age dependent. *J Comp Neurol*, **522** (13): 3075-90.
- Marston OJ, Williams RH, Canal MM, Samuels RE, Upton N, Piggins HD (2008). Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. *Mol Brain*, **1**: 19.
- Martynska L, Polkowska J, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Wasilewska-Dziubinska E, Bik W, Baranowska B (2006). Orexin A and its role in the regulation of the hypothalamo-pituitary axes in the rat. *Reprod Biol*, **2**: 29-35.
- Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K (2002). Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept*, **104** (1-3): 119-23.
- Mayhan WG, Simmons LK, Sharpe GM (1991). Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am J Physiol*, **260**: 319-326.
- Mayr M, May D, Gordon O, Madhu B, Gilon D, Yin X, Xing Q, Drozdov I, Ainali C, Tsoka S, Xu Q, Griffiths J, Horrevoets A, Keshet E (2011). Metabolic homeostasis is maintained in myocardial hibernation by adaptive changes in the transcriptome and proteome. *J Mol Cell Cardiol*, **50**: 982-990.

- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG (2001). Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of adenylate cyclase-dependent signalling cascade. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**: 778-782.
- McCullough L, Blizzard K, Simpson E, Oz O, Hurn P (2003). Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci*, **23**: 8701-8705.
- McCullough L, Zeng Z, Blizzard KK, Debchoudhury I, Hurn PD (2005). Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**: 502-512.
- Meister B (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm*, **59**: 265-304.
- Mele M, Alò R, Avolio E, Canonaco M (2014). Bcl-2/Bax Expression Levels Tend to Influence AMPAergic Trafficking Mechanisms During Hibernation in *Mesocricetus auratus*. *Journal of Molecular Neuroscience*. DOI 10.1007/s12031-014-0342-3.
- Mele M, Avolio E, Alò R, Fazzari G, Mahata SK, Canonaco M (2014). Catestatin and Orexin-A neuronal signals alter feeding habits in relation to hibernating states. *Neuroscience*, **269**: 331-342.
- Menaker M (1962). Hibernation-hypothermia: an annual cycle of response to low temperature in the bat *Myotis lucifugus*. *J Cell Comp Physiol*, **59**: 163-73.
- Mieda M & Yanagisawa M (2004). Sleep, feeding and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Curr Opin Neurobiol*, **12** (3): 339-45.
- Miura M & Takayama K (1991). Circulatory and respiratory responses to glutamate stimulation of the lateral parabrachial nucleus of the cat. *J Auton Nerv Syst*, **32** (2): 121-33.
- Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Sato N, Kurosawa M, Funakoshi A (2002). Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas*, **25** (4): 400-4.
- Mochizuki T, Klerman EB, Sakurai T, Scammell TE (2006). Elevated body temperature during sleep in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291** (3): R533-40.
- Mohns EJ, Karlsson KA, Blumberg MS (2006). The preoptic hypothalamus and basal forebrain play opposing roles in the descending modulation of sleep and wakefulness in infant rats. *Eur J Neurosci*, **23** (5): 1301-10.
- Moossy J (1993). Pathology of cerebral atherosclerosis. Influence of age, race, and gender. *Stroke*, **24**: 22-23.
- Morin LP & Wood RI (2000). A stereotaxic atlas of the golden hamster brain. *Academic Press*, San Diego, CA.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med*, **39**: 1291-1304.
- Mouland AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN (1994). Human chromogranin A gene: molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell specific expression. *J Biol Chem*, **269** (9): 6918-26.
- Murtagh B & Smalling RW (2006). Ictus cardioembolico. *Curr Atheroscler Rep*, **8**: 310-316.

- Nagasawa H & Kogure K (1989). Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, **20**: 1037-1043.
- Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H (2003). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol*, **205**: 43-50.
- Nakamachi T, Endo S, Ohtaki H, Yin L, Kenji D, Kudo Y, Funahashi H, Matsuda K, Shioda S (2005). Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *Regul Pept*, **126**: 49-54.
- Nakamura T, Miyamoto O, Yamagami S, Toyoshima T, Negi T, Itano T, Nagao S (1999). The chronic cell death with DNA fragmentation after post-ischaemic hypothermia in the gerbil hippocampus. *Acta Neurochir Wien*, **141** (4): 407-12.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2000). Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res*, **873**: 181-187.
- Nakamura W (2012). Circadian regulation of sleep-wake cycles and food anticipation. *Brain Nerve*, **64** (6): 647-56.
- Nakanishi N, Tu S, Shin Y, Cui J, Kurokawa T, Zhang D, Chen HS, Tong G, Lipton SA (2009). Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci*, **29**: 5260-5265.
- Neuhaus W, Burek M, Djuzenova CS, Thal SC, Koepsell H, Roewer N, Förster CY (2012). Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. *Neurosci Lett*, **506**: 44-49.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1998). Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, **102-103**: 139-142.
- Nixon JP & Smale L (2007). A comparative analysis of the distribution of immunoreactive orexin A and B in the brains of nocturnal and diurnal rodents. *Behav Brain Funct*, **3**: 28.
- Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M, Malendowicz LK (2000). Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci*, **66** (5): 449-54.
- Núñez A, Rodrigo-Angulo ML, De Andrés I, Garzòn M (2009). Hypocretin/Orexin Neuropeptides: Participation in the control of Sleep-Wakefulness Cycle and Energy Homeostasis. *Current Neuropharmacology* **7** (1): 50-9.
- O'Hara BF, Watson FL, Srere HK, Kumar H, Wiler SW, Welch SK, Bitting L, Heller HC, Kilduff TS (1999). Gene expression in the brain across the hibernation cycle. *J Neurosci*, **19** (10): 3781-90.
- O'Rourke MF (2007). Arterial aging: pathophysiological principles. *Vasc Med*, **12**: 329-341.
- Ocskó T, Gálfi M, Radács M, Molnár Z, Kis GK, Rákosi K, Molnár AH, László F, László FA, Varga C (2012). Effects of orexin-monoaminergic interactions on oxytocin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures. *Regul Pept*, **175**: 43-48.
- Ohkubo T, Tsukada A, Shamoto K (2003). cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J Mol Endocrinol*, **31** (3): 499-508.

- Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ (1994). Pselectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*, **25**: 202-211.
- Okumura T, Takeuchi S, Motomura W, Yamada H, Egashira Si S, Asahi S, Kanatani A, Ihara M, Kohgo Y (2001). Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **280** (4): 976-81.
- Opitz T, De Lime AD, Voigt T (2002). Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol*, **88**: 2196-2206.
- Osborne PG & Hashimoto M (2003). State-dependent regulation of cortical blood flow and respiration in hamsters: response to hypercapnia during arousal from hibernation. *J Physiol*, **547**(3): 963-970.
- Osborne PG, Gao B, Hashimoto M (2004). Determination in vivo of newly synthesized gene expression in hamsters during phases of the hibernation cycle. *Jpn J Physiol*, **54**(3): 295-305.
- Osborne PG & Hashimoto M (2006). Brain antioxidant levels in hamsters during hibernation, arousal and cenothermia. *Behav Brain Res*, **168**: 208-214.
- Osborne PG & Hashimoto M (2008). Mammalian cerebral metabolism and amino acid neurotransmission during hibernation. *J Neurochem*, **106**(4): 1888-99.
- Padley JR, Kumar NN, Li Q, Nguyen TB, Pilowsky PM, Goodchild AK (2007). Central command regulation of circulatory function mediated by descending pontine cholinergic inputs to sympathoexcitatory rostral ventrolateral medulla neurons. *Circ Res*, **100**(2): 284-91.
- Palou M, Sánchez J, Rodríguez AM, Priego T, Picó C, Palou A (2009). Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem*, **23**: 115-124.
- Patil SP, Schneider H, Schwartz AR, Smith PL (2007). Adult obstructive sleep apnea: pathophysiology and diagnosis. *Chest*, **132**: 325-337.
- Pawlik MW, Obuchowicz R, Biernat J, Szczepanski W, Pajdo R, Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW (2011). Effects of peripherally and centrally applied ghrelin in the pathogenesis of ischemia-reperfusion induced injury of the small intestine. *J Physiol Pharmacol*, **62**: 429-439.
- Pedroso AP, Watanabe RL, Albuquerque KT, Telles MM, Andrade MC, Perez JD, Sakata MM, Lima ML, Estadella D, Nascimento CM, Oyama LM, Rosa JC, Casarini DE, Ribeiro EB (2012). Proteomic profiling of the rat hypothalamus. *Proteome Sci*, **10**(1): 26.
- Penna C, Tullio F, Perrelli MG, Mancardi D, Pagliaro P (2012). Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and chromogranin A-derived peptides. *Curr Med Chem*, **19**: 4074-4085.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, **21**: 1228-1237.
- Peterson EC, Wang Z, Britz G (2011). Regulation of Cerebral Blood Flow. *Int J Vasc Med*, **2011**: 823525.

- Petrovich GD, Ross CA, Mody P, Holland PC, Gallagher M (2009). Central, but not basolateral, amygdala is critical for control of feeding by aversive learned cues. *J Neurosci*, **29**(48): 15205-12.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, **6**: 991-997.
- Peyron C, Tighe DK, Van Den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, **18** (23): 9996-10015.
- Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N (2000). Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathology*, **20** (4): 273-82.
- Pinchera, Faglia, Giordano, Martini (1991). *Endocrinologia e metabolismo*. Editore: Casa Editrice Ambrosiana. McGraw-Hill.
- Poon MM, Choi SH, Jamieson CAM, Geschwind DH, Martin KC (2006). Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons. *J Neurosci*, **26**: 13390-13399.
- Pujadas R, Arboix A, Anguera N, Rafel J, Sagués F, Casañas R (2008). Mitral Annular Calcification as a Marker of Complex Aortic Atheroma in Patients with Stroke of Uncertain Etiology. *Echocardiography*, **25**: 124-132.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, **11**: 491-498.
- Pulsinelli WA & Buchan AM (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, **19**: 913.
- Purdy PD, Devous MD, Sr Batjer HH, White CL, Meyer Y, Samson DS (1989). Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke*, **20**: 1361-1367.
- Puskás N, Papp RS, Gallatz K, Palkovits M (2010). Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline- expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides*, **31** (8): 1589-97.
- Qu P, Tang H, Gao Y, Zhang LP, Wang S (2010). Polyethersulfone composite membrane blended with cellulose fibrils. *Bioresources*, **5**: 2323-2336.
- Raddino R, Bonadei I, Teli M, Robba D, Caretta G, Madureri A, Zanini G, Pedrinazzi C, Vizzardì E, Cas LD (2008). Diabetes and ischemic heart disease: specific treatment. *G Ital Cardiol*, **9**: 52-55.
- Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW (2001). Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*, **86** (10): 4808-13.
- Remondes M & Schuman EM (2004). Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature*, **431**: 699-703.

- Rivest S (2010). Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Prog Brain Res*, **181**: 43-53.
- Roos MW, Ericsson A, Berg M, Sperber GO, Sjoquist M, Meyerson BJ (2003). Functional evaluation of cerebral microembolization in the rat. *Brain Res*, **961**: 15-21.
- Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ (1984). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressin. *J Neurosci*, **4** (2): 474-94.
- Russel SH, Kim MS, Small CJ, Abbott CR, Morgan DG, Taheri S, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2000). Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol*, **12** (12): 1213-8.
- Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DGA, Ghatei MA, Bloom SR (2001a). The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol*, **13** (6): 561-6.
- Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR (2001b). Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology*, **142** (12): 5294-302.
- Sabatier N, Leng G, Menzies J (2013). Oxytocin, feeding, and satiety. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **4**: 35.
- Saderi N, Salgado-Delgado R, Avendaño-Pradel R, Basualdo Mdel C, Ferri GL, Chávez-Macías L, Roblera JE, Escobar C, Buijs RM (2012). NPY and VGF immunoreactivity increased in the arcuate nucleus, but decreased in the nucleus of the Tractus Solitarius, of type-II diabetic patients. *PLoS One*, **7** (7): e40070.
- Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoï K, Krane RJ, Cohen RA (1989). Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*, **320**: 1025-1030.
- Sakurai T (2007). Regulatory mechanism of sleep/wakefulness states by orexin. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **52** (14): 1840-8.
- Sakurai T, Amameya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R, Tanaka H, Williams S, Richardson J, Kozlowski G, Wilson S, Arch J, Buckingham R, Haynes A, Carr S, Annan R, MacNulty D, Li W, Terret J, Elshourbagy N, Bergsma D, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell*, **92** (4): 573-85.
- Sakurai T, Amameya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R, Tanaka H, Williams S, Richardson J, Kozlowski G, Wilson S, Arch J, Buckingham R, Haynes A, Carr S, Annan R, MacNulty D, Li W, Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, et al (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, **46**: 297-308.
- Sakurai T, Mieda M, Tsujino N (2010). The orexin system: roles in sleep/wake regulation. *Ann N Y Acad Sci*, **1200**: 149-161.
- Sallmen T, Lozada AF, Anichtchik OV, Beckman AL, Leurs R, Panula P (2003). Changes in hippocampal histamine receptors across the hibernation cycle in ground squirrels. *Hippocampus*, **13**: 745-754.

- Samson WK, Bagley SL, Ferguson AV, White MM (2007). Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292** (1): R382-7.
- Sánchez-Margalet V, González-Yanes C, Najib S, Santos-Alvarez J (2010). Metabolic effects and mechanism of action of the chromogranin A-derived peptide pancreastatin. *Regul Pept*, **161**: 8-14.
- Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ (2008). Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes*, **57** (8): 2046-54.
- Satoh Y, Uchida M, Fujita A, Nishio H, Takeuchi T, Hata F (2001). Possible role of orexin A in nonadrenergic, noncholinergic inhibitory response of muscle of the mouse small intestine. *Eur J Pharmacol*, **428** (3): 337-42.
- Savaskan E, Muller-Spahn F, Meier F, Wirz-Justice A, Meyer P (2004). Orexins and their receptors in the human retina. *Pathobiology*, **71** (4): 211-6.
- Schaller B & Graf R (2004). Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*, **24**: 351-371.
- Schmid GM, Meda P, Caille D, Wargent E, O'Dowd J, Hochstrasser DF, Cawthorne MA, Sanchez JC (2007). Inhibition of insulin secretion by betagranin, an N-terminal chromogranin A fragment. *J Biol Chem*, **282** (17): 12717-24.
- Schmidt-Kastner R & Freund TF (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, **40**: 599-636.
- Schwartz C, Hampton M, Andrews MT (2013). Seasonal and regional differences in gene expression in the brain of a hibernating mammal. *PLoS One*, **8** (3): e58427.
- Seung HY & Ferretti JA (1993). Nature of the pH-induced conformational changes and exposure of the C-terminal region of chromogranin A. *FEBS Lett*, **334** (3): 373-7.
- Shafton AD, Ryan A, Badoer E (1998). Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res*, **801** (1-2): 239-43.
- Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, Ihara M, Goto K (1999). Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*, **20** (10): 1169-76.
- Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, Liang J, Hua L, Yasuoka S, Zhou Y, Noda M, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A (2009). Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J Exp Med*, **217**: 87-92.
- Shirasaka T, Nazakato M, Takasaki M, Kannan H (1999). Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in the conscious rat. *Am J Physiol*, **277** (6 Pt 2): R1780-5.
- Siesjö BK & Bengtsson F (1989). Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, **9**: 127-140.

- Sikder D & Kodadek T (2007). The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Genes Dev*, **21**: 2995-3005.
- Small CJ, Goubillon ML, Murray JF, Siddiqui A, Grimshaw SE, Young H, Sivanesan V, Kalamatianos T, Kennedy AR, Coen CW, Bloom SR, Wilson CA (2003). Central orexin A has a site-specific effects on luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology*, **144** (7): 3225-36.
- Smeets PA, Charbonnier L, Van Meer F, Van der Laan LN, Spetter MS (2012). Food-induced brain responses and eating behaviour. *Proc Nutr Soc*, **71** (4): 511-20.
- Soderberg S, Ahren B, Stegmayr B, Johnson O, Wiklund PG, Weinehall L, Hallmans G, Olsson T (1999). Leptin is a risk marker for first-ever hemorrhagic stroke in a population based cohort. *Stroke*, **30**: 328-337.
- Sokołowska P, Urbańska A, Biegańska K, Wagner W, Ciszewski W, Namiecińska M, Zawilska JB (2014). Orexins protect neuronal cell cultures against hypoxic stress: an involvement of Akt signaling. *J Mol Neurosci*, **52**: 48-55.
- Sokołowska P, Urbańska A, Namiecińska M, Biegańska K, Zawilska JB (2012). Orexins promote survival of rat cortical neurons. *Neurosci Lett*, **506**: 303-306.
- Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM (1995). Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest*, **96**: 1897-1904.
- Song NN, Wu JB, Wei XB, Guan HS, Zhang XM (2009). Paeonol attenuates oxygen-glucose deprivation injury and inhibits NMDA receptor activation of cultured rat hippocampal neurons. *Yao Xue Xue Bao*, **44**: 1228-1232.
- Sowers JR (2003). Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med*, **8**: 37-41.
- Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG (2006). Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev*, **58**: 46-57.
- Spyer KM (1994). Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol*, **474** (1): 1-19.
- Storey KB, Heldmaier G, Rider MH (2010). Mammalian Hibernation: Physiology, Cell Signaling, and Gene Controls on Metabolic Rate Depression. *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, doi:10.1007/978-3-642-12422-8_13.
- Stranahan AM, Zhou Y, Martin B, Maudsley S (2009). Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. *Curr Med Chem*, **16**: 4668-4678.
- Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, Capon C, Lopez M, Moniatte M, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH (1996). Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem*, **271** (45): 28533-40.
- Sudlow C & Warlow C (1997). Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. *Stroke*, **28**: 491-499.
- Swanson LW & Kuypers H (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal

- vagal complex and spinal cord as documented by retrograde fluorescence double-labelling methods. *J Comp Neurol*, **194**: 555-570.
- Swanson LW & Sawchenko PE (1983). Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*, **6**: 269-324.
- Taheri S & Bloom S (2001). Orexins/hypocretins: waking up the scientific world. *Clin Endocrinol*, **54**: 421-429.
- Takano S, Kanai S, Hosoya H, Ohta M, Uematsu H, Miyasaka K (2004). Orexin-A does not stimulate food intake in old rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287** (6): G1182-7.
- Takakura AC, Colombari E, Menani JV, Moreira TS (2011). Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**: 501-510.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981a). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, **1**: 53-60.
- Tang XJ & Xing F (2013). Calcium-permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Biomed Rep*, **1**: 828-832.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003). The chromogranin secretogranin family. *N Engl J Med*, **348**: 1134-1149.
- Teitelbaum P & Stellar E (1954). Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science*, **120** (3126): 894-5.
- Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA (1991). Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest*, **87**: 1643-1648.
- Thomas J (1985). Hibernation. In: *Animal Physiology*.
- Toni R, Kakucska I, Mosca S, Marrama P, Lechan RM (1992). Hypothyroidism increases vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactivity and gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, **131**: 976-978.
- Tortorolo P, Ramos OV, Sampogna S, Chase MH (2011). Hypocretinergic neurons are activated in conjunction with goal-oriented survival-related motor behaviors. *Physiol Behav*, **104**: 823-830.
- Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*, **71**: 1185-1195.
- Tsujino N & Sakurai T (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci*, **7**: 28.
- Tsuneki H & Sasaoka T (2013). Hypothalamic orexin system regulates energy and glucose metabolism. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **142**: 316-317.
- Tyson GW, Teasdale GM, Graham DI, McCulloch J (1984). Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann Neurol*, **15** (6): 559-67.
- Uchigashima M, Fukaya M, Watanabe M, Kamiya H (2007). Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *J Neurosci*, **27**: 8088-8100.

- Ustrell X & Pellisé A (2010). Cardiac workup of ischemic stroke. *Current Cardiol Rev*, **6**: 175-183.
- Verberne AJM & Guyenet PG (1992). Midbrain central gray: Influence on medullary sympathoexcitatory neurons and the baroreflex in rats. *Am J Physiol*, **263** (1Pt 2): R24-33.
- Videen JS, Mezger MS, Chang YM, O'Connor DT (1992). Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *J Biol Chem*, **267** (5): 3066-73.
- Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M (2003). Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci*, **60**: 72-87.
- Vornow JJ, Tasker RC, Coyle JT (1994). Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke*, **25**: 457-464.
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*, **1**: 191-203.
- Waldrop TG, Eldridge FL, Iwamoto GA, Mitchell JH (1996). Central neural control of respiration and circulation during exercise. Regulation and integration of multiple systems, **12**: 333-380.
- Wang JB, Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T (2003). Variation in the expression of orexin and orexin receptors in the rat hypothalamus during the estrous cycle, pregnancy, parturition and lactation. *Endocrine*, **22**: 127-134.
- Webster CM, Kelly S, Koike MA, Chock VY, Giffard RG, Yenari MA (2009). Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, **33**(2): 301-12.
- Weiss SW, Albers DS, Iadarola MJ, Dawson TM, Dawson VL, Standaert DG (1998). NMDAR1 Glutamate Receptor Subunit Isoforms in Neostriatal, Neocortical, and Hippocampal Nitric Oxide Synthase Neurons. *The Journal of Neuroscience*, **18**: 1725-1734.
- Wester P, Watson BD, Prado R, Dietrich WD (1995). A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke*, **26**: 444-4450.
- Westermann R, Stogbauer F, Unsicker K, Lietzke R (1988). Calcium-dependence of chromogranin A-catecholamine interaction. *FEBS Lett*, **239** (2): 203-6.
- Whalen MJ, Clark RS, Dixon CE, Robichaud P, Marion DW, Vagni V, Graham S, Virag L, Hasko G, Stachlewitz R, Szabo C, Kochanek PM (2000). Traumatic brain injury in mice deficient in poly-ADP(ribose) polymerase: a preliminary report. *Acta Neurochir Suppl*, **76**: 61-4.
- Wikol M, Hartmann B, Brendle J, Crane M, Beuscher U, Brake J, Shickel T (1998). Expanded Polytetrafluoroethylene Membranes and Their Applications. *Filtration in the Biopharmaceutical Industry*, pp. 71.
- Xie M, Yi C, Luo X, Xu S, Yu Z, Tang Y, Zhu W, Du Y, Jia L, Zhang Q, Dong Q, Zhu W, Zhang X, Bu B, Wang W (2011). Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol*, **70**: 121-132.

- Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y, Naoi M (2002). Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*, **109**: 1-13.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2003). Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*, **303** (1): 120-9.
- Yang L, Zou B, Xiong X, Pascual C, Xie J, Malik A, Xie J, Sakurai T, Xie XS (2013). Hypocretin/orexin neurons contribute to hippocampus-dependent social memory and synaptic plasticity in mice. *J Neurosci*, **33**: 5275-5284.
- Yang Y, Yang T, Li Q, Wang CX, Shuaib A (2002). A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study. *J Neurosci Methods*, **118**: 199-206.
- Yang Y, Zhou LB, Liu SQ, Tang JF, Li FY, Li RY, Song HD, Chen MD (2005). Expression of feeding-related peptide receptors mRNA in GT1-7 cell line and roles of leptin and orexins in control of GnRH secretion. *Acta Pharmacol Sin*, **26** (8): 976-81.
- Yenari MA & Hemmen TM (2010). Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke*, **41** (10 Suppl): S72-4.
- Yenari MA & Han HS (2006). Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int*, **49** (2): 164-9.
- Yonekura J, Hamada J, Kanazawa N, Sakai (2008). Plasma orexin-A levels in patients with migraine. *Kitasato Med J*, **38**: 77-80.
- Yoshimoto S, Ishizaki Y, Kurihara H, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaki T, Takakura K, Murota S (1990). Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res*, **508**: 283-285.
- Yu LXY, Zhang J, Zhu JN, Wang JJ (2010). Orexins excite neurons of the rat cerebellar nucleus interpositus via orexin 2 receptors in vitro. *Cerebellum*, **9** (1): 88-95.
- Yu L, Wang N, Zhang Y, Wang Y, Li J, Wu Q, Liu Y (2014). Neuroprotective effect of muscone on glutamate-induced apoptosis in PC12 cells via antioxidant and Ca(2+) antagonism. *Neurochem Int*, **70**: 10-21.
- Yuan H, Geballe MT, Hansen KB, Traynelis SF (2008). Structure and Function of the NMDA Receptor. *Structural and Functional Organization Of The Synapse*, 289-316.
- Yuan LB, Dong HL, Zhang HP, Zhao RN, Gong G, Chen XM, Zhang LN, Xiong L (2011). Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat. *Anesthesiology*, **114**: 340-354.
- Zanutto BS, Valentinuzzi ME, Segura ET (2010). Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. *Bio Med Engin*, **9**: 4-16.
- Zhang F, Li C, Wang R, Han D, Zhang QG, Zhou C, Yu HM, Zhang GY (2007). Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience*, **150**: 938-949.

- Zhang H, Schools GP, Lei T, Wang W, Kimelberg HK, Zhou M (2008). Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation. *Exp Neurol*, **212**: 44-52.
- Zhang HA, Gao M, Chen B, Shi L, Wang Q, Yu X, Xuan Z, Gao L, Du G (2013). Evaluation of hippocampal injury and cognitive function induced by embolization in the rat brain. *Anat Rec (Hoboken)*, **296**: 1207-1214.
- Zhang S, Blache D, Vercoe PE, Adam CL, Blackberry MA, Findlay PA, Eidne KA, Martin GB (2005). Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Reg Pept*, **124**: 81-87.
- Zhang YM & Bhavnani BR (2006). Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci*, **7**: 49.
- Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA (2001). Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*, **95** (1-2): 75-85.
- Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR (2005). Orexin-A projections to the caudal medulla and orexin-induced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. *J Comp Neurol*, **485** (2): 127-42.
- Zhou Y, Li HL, Zhao R, Yang LT, Dong Y, Yue X, Ma YY, Wang Z, Chen J, Cui CL, Yu AC (2010). Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia. *Neurochem Res*, **35**: 2124-2134.
- Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y (2003). Orexin receptor type 1 couples exclusively to pertussin toxin- insensitive G-protein, while orexin receptor type 2 couples to both pertussin toxin-sensitive and-insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci*, **92**: 259-266.
- Zito K (2009). NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. *Elsevier Ltd, CA, USA*.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio infinitamente e di vero cuore il Prof. Marcello Canonaco per avermi dato l'opportunità di crescere al suo fianco e imparare quanto importante sia tenere duro e andare sempre avanti "pensando positivo". **Grazie DEAR Prof.**

Grazie alla Dr.ssa Raffaella Alò per la disponibilità e l'amicizia dimostratami in tutti questi anni... soprattutto nei momenti più duri!

Ringrazio la Dr.ssa Rosa Maria Facciolo, persona per la quale nutro profonda stima e rispetto.

Grazie al Dr. Antonio Carelli per essere sempre stato gentile e disponibile.

Un grazie complessivo va ai miei colleghi Merylin, Gilda ed Ennio...resterete sempre nel mio cuore!!!