

Stato dell'arte

I NEUROTRASMETTITORI

Il sistema nervoso (SN), agendo come rete di comunicazione, governa le risposte agli stimoli, elabora le informazioni e genera complessi sistemi di trasmissione di segnali grazie all'attività delle cellule nervose e delle loro reciproche connessioni. Nella maggior parte dei casi la trasmissione delle informazioni tra un neurone e l'altro avviene mediante il rilascio di messaggeri chimici distinti in neurotrasmettitori a basso peso molecolare e neuropeptidi. Tali sostanze vengono sintetizzate a partire da vie enzimatiche regolate da specifici precursori, immagazzinate in vescicole e, una volta rilasciate nella fessura sinaptica con un meccanismo Ca^{2+} dipendente, legano una molecola recettrice situata sulla membrana postsinaptica alterando il potenziale di membrana della cellula nervosa.

Fino ad oggi sono state individuate un centinaio di sostanze chimiche che svolgono le funzioni di neurotrasmettitore che interagendo tra loro regolano svariate funzioni comportamentali. Tra i neurotrasmettitori a basso peso molecolare più conosciuti, possiamo citare l'adrenalina, la dopamina, la serotonina (5-HT), l'acetilcolina e, in particolare, il GABA. I neuropeptidi sono molecole di trasmettitore composte da un numero di amminoacidi (aa) variabile da 3 a 36. Ne sono un esempio la vasopressina, l'ossitocina (OXT), l'angiotensina II e, solo negli ultimi anni è stata individuata una nuova molecola, l'ORX che sembrerebbe agire prevalentemente a livello del sistema limbico ed in particolare nella regione amigdalare.

1. Il sistema limbico

Sotto la denominazione di sistema limbico si riuniscono alcune formazioni degli emisferi cerebrali e del diencefalo deputate a svolgere particolari funzioni, quali emozioni e risposte viscerali ad esse connesse, nonché attività associate alla memoria. Il sistema limbico è caratterizzato da una certa eterogeneità anatomica e infatti può essere diviso in una regione corticale e una subcorticale (Fig. 1). La prima include l'HIP, il giro dentato e il giro cingolato mentre la seconda comprende l'AMY, i nuclei del setto, il Acb, i corpi mammillari, l'HTH, il nucleo anteriore del talamo e il mesencefalo limbico (White et al., 2008).

Il sistema limbico è responsabile delle attività emozionali quali paura, rabbia, emozioni associate all'attività sessuale come il corteggiamento e cura della prole, nonché nelle manifestazioni delle emozioni (Cardinal et al., 2002). Il termine "limbico" è stato utilizzato per la prima volta alla fine dell'800 quando fu coniato il termine lobo limbico per indicare quelle regioni corticali che circondano strutture interne del diencefalo e mesencefalo sulla

superficie mediale degli emisferi cerebrali. Nel 1937, James Papez propose che il lobo limbico è un circuito neuronale che sta alla base del comportamento e dell'emotività e successivamente il termine lobo limbico è stato sostituito con quello di *sistema limbico* per intendere il lobo omonimo e le formazioni a esso funzionalmente correlate.

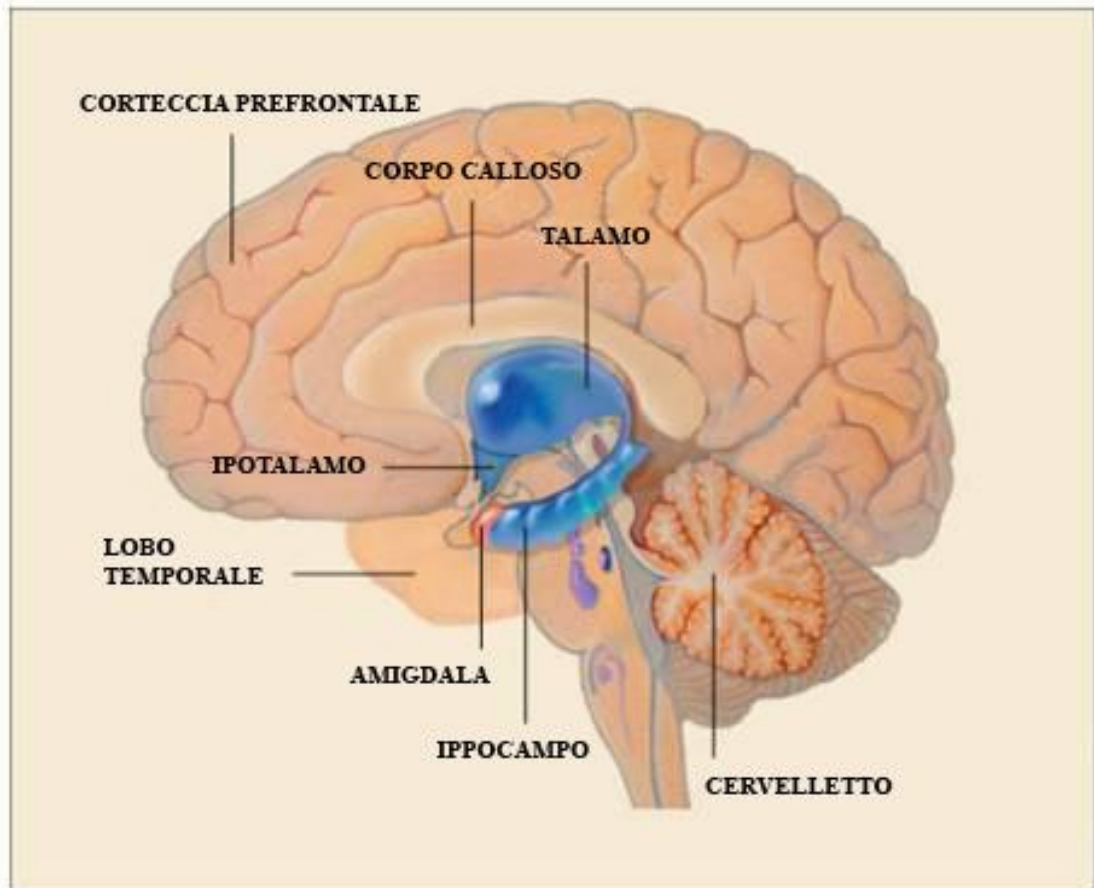


Fig. 1 Disegno schematico delle principali strutture del sistema limbico

Una delle più importanti tra le componenti limbiche è l'HIP implicata nella regolazione del comportamento emotivo e nel meccanismo della memoria. Dal punto di vista anatomico l'HIP è costituito da un insieme di formazioni che si svolgono attorno all'ilo dell'emisfero cerebrale in profondità e concentricamente al lobo limbico. Si tratta di formazioni filogeneticamente più antiche (archipallio) che con lo sviluppo del neopallio sono state spinte in profondità e ridotte di volume. Rispetto il corpo calloso, si distingue un HIP ventrale ed un HIP dorsale. L'HIP dorsale si trova vicino al corpo calloso ed è costituito da un esile strato di sostanza grigia che accoglie finissimi fasci di fibre nervose mieliniche della via olfattiva, mentre l'HIP ventrale (HIP propriamente detto) si sviluppa intorno al solco dell'HIP stesso, tra fascia dentata e circonvoluzione dell'HIP e costa di tre formazioni disposte parallelamente tra loro che, in

senso medio-laterale, sono: la fascia dentata, la fimbria e il corno di Ammone (Mezzogiorno et al., 1999). Procedendo dal solco dell'HIP verso l'alveo, la corteccia mostra tre strati cellulari: lo strato molecolare, lo strato piramidale e lo strato delle cellule polimorfe. Inoltre, i corpi cellulari dei neuroni piramidali, costituiscono diverse regioni dette CA1, CA2, CA3 e CA4, che prendono contatto con importanti strutture encefaliche. L'HIP maturo che si trova nell'adulto si è formato grazie alla migrazione di neuroni provenienti da altre regioni encefaliche, che hanno permesso lo sviluppo e la maturazione di questa regione limbica.

In particolare l'HIP è responsabile della formazione iniziale della memoria dichiarativa e del trasferimento di tali informazioni alle regioni encefaliche che si occupano del loro immagazzinamento. La formazione dei ricordi ha luogo grazie alle esperienze emotive soprattutto tramite i collegamenti con l'AMY che come sede dell'apprendimento di tipo associativo è in grado di indurre il potenziamento a lungo termine (Wright et al., 2002). L'attivazione dell'HIP, al contrario dell'AMY, sopprime il rilascio di CRH e difatti l'HIP contiene numerosi recettori glucocorticoidei che rispondono al cortisolo rilasciato dalle ghiandole surrenali in risposta all'attivazione del sistema HPA. Così, normalmente l'HIP partecipa nella relazione a feedback dell'asse HPA, inibendo il rilascio di CRH ed il successivo rilascio di ACTH e di cortisolo quando il livello di quest'ultimo in circolo diviene troppo alto (Bear et al., 2002).

Un'altra importante regione facente parte del sistema limbico è l'HTH che costituisce la porzione inferiore del diencefalo, essendo compreso tra il chiasma ottico anteriormente ed i peduncoli cerebrali posteriormente. Esso chiude in basso ed in avanti il terzo ventricolo, e alcune sue formazioni hanno rapporti con la sella turcica dello sfenoide e con la doccia ottica su cui poggia il chiasma dei nervi ottici. L'HTH si può dividere in una parte mediale e una laterale; nella prima sono presenti numerosi nuclei controllati sia dal talamo che dalla COR, in modo da modulare l'attività dell'ipofisi e di molti centri situati nel telencefalo. Inoltre l'HTH si divide in tre regioni, anteriore (regione chiasmatica o preottica), tuberale e posteriore (mammillare), mentre LH è una struttura diffusa all'interno della quale passano fibre del mesencefalo mediale (Sun et al., 2003). L'HTH svolge numerose funzioni come il mantenimento dell'omeostasi attraverso il controllo del sistema endocrino coordinando l'attività del sistema simpatico e parasimpatico, regola il ritmo circadiano e svolge un importante ruolo nei processi nocicettivi. Queste ed altre importanti funzioni sono regolate da specifici nuclei ipotalamici, il nucleo preottico ventromediale ed il nucleo preottico ventrolaterale, ad esempio, corrispondono rispettivamente ai centri della fame e della sazietà ed al centro della sete, su cui agiscono prevalentemente impulsi provenienti dal sistema

limbico. La parte anteriore dell'HTH contiene, inoltre, un centro del raffreddamento ed uno del riscaldamento responsabili della termoregolazione. Inoltre i corpi mammillari, componente ipotalamica del circuito di Papez, rappresentano un pathways multinucleare che invece controllano il comportamento emotivo e le sensazioni affettive grazie alle svariate connessioni con altre regioni del sistema limbico. (Eggers, 2007).

Una componente particolarmente importante del sistema limbico è il complesso amigdaloide localizzato nei Mammiferi in posizione dorso-mediale del lobo temporale al di sotto della COR olfattiva che mette in comunicazione le regioni corticali con i sistemi effettori dell'HTH e del tronco encefalico influenzando l'attività sia del sistema nervoso viscerale sia del sistema motorio somatico.

1.1 Organizzazione anatomo-funzionale del sistema amigdaloide

L'AMY è una regione limbica costituita da circa 13 nuclei a loro volta suddivisi in sottonuclei che possiedono estese connessioni intra e internucleari. Tale complesso si divide in tre parti comprendenti il gruppo dei nuclei della zona BLA costituito a sua volta dai nuclei La, B e BM, il gruppo dei nuclei della zona cortico-mediale che comprende i nuclei corticali e il nucleo del tratto olfattivo e il gruppo centro mediale (CeM) costituito dai nuclei mediali (M) e Ce. Il La è stato ulteriormente diviso nelle regioni dorsale, ventrolaterale e ventromediale, il nucleo BM nelle suddivisioni magnocellulare basale e parvocellulare basale, il nucleo Ce nelle regioni capsulare, laterale e mediale ed infine il nucleo M nelle suddivisioni dorsale e ventrale (Pitkanen et al., 2000).

Studi anatomici hanno dimostrato che ogni nucleo del complesso amigdaloide e ogni sottonucleo è caratterizzato da una ampia varietà di connessioni sia con altre regioni encefaliche che strutture interne dello stesso complesso (Pitkanen, 2000). Per quanto riguarda le vie afferenti che giungono all'AMY, si possono dividere in input corticali e talamici e input ipotalamici o derivanti dal tronco encefalico. Quelli corticali e talamici conducono informazioni dall'area sensoriale e da strutture connesse con i sistemi implicati nelle funzioni mnemoniche, mentre gli input ipotalamici e del tronco encefalico provengono da regioni coinvolte nel comportamento e nel sistema autonomo.

La principale fonte di informazioni sensoriali che giungono all'AMY è rappresentata dalla COR (Mc Donald, 1998) ma in particolare il complesso amigdaloide ha delle importanti connessioni con la PFC (Vertes, 2004). Infatti è stato osservato che quest'ultima invia segnali eccitatori sia nel La che nel B i quali attraverso un meccanismo di feedback inviano nuovamente delle proiezioni nella COR (Sah et al., 2003). La COR ha anche delle connessioni

con il Ce e questo risulta essere un'ulteriore conferma dell'influenza che tale area encefalica ha sull'AMY e sulle funzioni che questa svolge e difatti alcuni studi hanno dimostrato che la riduzione del condizionamento della paura è correlata alla connessione tra la COR e l'AMY (Milad et al., 2002; Royer et al., 2002; Rosenkranz et al.2002) ma non è ancora chiaro il meccanismo attraverso il quale questo avviene. In particolare sembra che la stimolazione della COR attiva direttamente gli interneuroni GABAergici all'interno dell'AMY con una conseguente inibizione di segnali efferenti all'interno del complesso (Rosenkranz et al., 2002). Tuttavia è noto che la maggior parte delle connessioni tra la COR e l'AMY sono di tipo eccitatorio e per spiegare questa contraddizione sono state proposte due ipotesi. Secondo la prima la COR stimola gli interneuroni inibitori contenenti il GABA nel La e nel B e questi interneuroni a loro volta diminuiscono la capacità della risposta eccitatoria delle proiezioni del La e B nel Ce, mentre la seconda ipotesi suggerisce che le proiezioni della PFC favoriscono la stimolazione di neuroni inibitori in una specifica regione amigdalare e tali neuroni inibiscono i segnali in uscita dal Ce (Quirk et al. 2003; Paré et al. 2004).

Ulteriore supporto del ruolo cruciale delle connessioni tra queste due aree encefaliche è stata dimostrato anche in studi condotti sull'uomo i quali hanno evidenziato come l'interazione tra la PFC e l'AMY possa essere coinvolta nella patogenesi di gravi disordini affettivi. Quando tale connessione viene compromessa, si possono sviluppare alcune patologie mentali quali la depressione (Siegle et al., 2003), l'ansia (Davidson, 2002) e DPTS (Quirk et al., 2003; Rothbaum et al., 2003). Alcuni studi hanno dimostrato infatti che in pazienti depressi e affetti da DPTS l'attività funzionale della PFC è inversamente correlata a quella dell'AMY (Anand et al., 2003) ed è stata inoltre constatata una anomala iperattività dell'AMY e una più bassa attività nella PFC (Shin et al. 2001).

All'AMY, oltre che dalla COR giungono input somatosensoriali, gustativi e viscerali, visivi, uditivi e olfattivi anche da altre aree encefaliche. Per quanto riguarda i segnali olfattivi, le proiezioni che arrivano nell'AMY, provengono sia dal bulbo olfattivo principale che accessorio, gli input somatosensoriali dall'area primaria somatosensoriale giungono nel La, Ce e B (Shi et al., 1998), mentre l'area associativa della COR invia all'AMY informazioni visive e uditive e tali pathways sono molto importanti nel condizionamento da paura (Shi et al., 1997).

Anche dal complesso amigdaloidale si dipartono proiezioni che raggiungono diverse aree encefaliche quali l'HTH, il tronco encefalico e regioni corticali. Dall'area BLA dell'AMY le proiezioni giungono nell'area corticale sensoriale, nel Acb e nel lobo temporale mediale con afferenze nell'HIP (Petrovich et al., 2001; Pitkanen, 2000). E' ampiamente dimostrato che

mediante tali afferenze l'AMY è coinvolta nelle risposte emotive e principalmente nella paura determinando un aumento del rilascio di ormoni legati allo stress, un'alterazione della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca modulati dall'attivazione del sistema autonomo e ormonale. Infatti è la stimolazione del Ce che induce queste risposte attraverso l'attivazione di un gruppo di neuroni del tronco encefalico che controllano appunto il sistema autonomo insieme ai nuclei dell'HTH (Le Doux, 2000). In accordo con queste risposte comportamentali, inoltre, la suddivisione mediale del Ce invia importanti proiezioni all'HTH, al BNST (Dong et al., 2001) e in alcuni nuclei del ponte e del mesencefalo. Per quanto riguarda l'HTH, contiene un gruppo di nuclei innervati dal Ce che hanno una maggiore influenza nella coordinazione dei meccanismi digestivi e comportamenti riproduttivi e di difesa (Swanson, 2000) e queste regioni ipotalamiche proiettano in un gruppo di cellule del sistema autonomo nel tronco encefalico e midollo spinale. Il Ce oltre che inviare dirette proiezioni all'HTH, ha delle importanti connessioni anche con il BNST, il quale a sua volta interagisce con un gruppo di neuroni monoaminergici e colinergici quali l'LC, la sostanza nera della VTA e il nucleo basale colinergico (Davis et al., 2006). È stato osservato inoltre che un gran numero di neuroni del Ce ed M sono GABAergici e le proiezioni efferenti di questi nuclei risultano essere quindi di tipo inibitorio (Saha et al., 2000) e a livello funzionale l'attivazione di tali neuroni nel Ce, nei ratti, provoca un aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca. Nell'AMY stessa, tuttavia, sono presenti connessioni tra i diversi nuclei, in particolare le informazioni sensoriali giungono all'AMY attraverso il BLA dove vengono processate e raggiungono il nucleo CeM che agisce come centro di output (Pitkanen 2000). Queste connessioni tra i diversi nuclei amigdalari sono state descritte dettagliatamente (Pitkanen, 2000) ed è stato osservato ad esempio che gli input unimodali sensoriali entrano nell'La, mentre, quelli polimodali e le proiezioni del sistema della memoria dichiarativa sono confinati verso la suddivisione mediale (Pitkanen, 2000). Quanto detto suggerisce che la suddivisione mediale potrebbe essere un sito di integrazione dell'informazione sensoriale. Il La invia, inoltre, proiezioni al B, alla parte capsulare del Ce (Sah et al., 2003) ed alla corteccia periamigdaloidale. Nonostante i primi studi dimostrino il contrario (Sah et al., 2003), tutte queste regioni eccetto il Ce (Jolkkonen et al., 1998), inviano connessioni reciproche al La (Sah et al., 2003).

Molte proiezioni amigdalari afferenti ed efferenti, creano sinapsi asimmetriche risultando quindi eccitatorie, mentre, altre creano sinapsi simmetriche, risultando inibitorie (Sah et al., 2003). I nuclei B e BM, che ricevono forti input corticali, presentano sia connessioni internucleari che intranucleari e le maggiori proiezioni di tali nuclei sono rivolte verso il Ce

(Sah et al., 2003), che rappresenta il principale centro di output e riceve input da tutti gli altri nuclei dell'AMY ma invia scarse proiezioni (Jolkkonen et al., 1998). Tali connessioni dimostrano quindi che c'è un'importante elaborazione delle informazioni che giungono nell'AMY prima che queste producono appropriate risposte comportamentali anche se dagli studi effettuati si sono ottenuti dei risultati ancora non molto chiari.

1.2 Nuclei amigdalari: Gruppo nucleare basolaterale

Il gruppo profondo o BLA include il La, il B e infine il BM. Il nucleo La è localizzato dorsalmente all'AMY, abbraccia centralmente il B e lateralmente è circondato dalla capsula esterna, mentre medialmente dal nucleo Ce. Esso presenta tre suddivisioni, la più piccola è chiamata suddivisione dorsolaterale, la più grande suddivisione ventromediale e infine vi è la suddivisione media.

Il nucleo B è localizzato ventralmente al La e si suddivide nella regione rostrale magnocellulare, caudale intermedia e parvicellulare. Il nucleo BM è situato centralmente al B ed è adiacente all'area amigdalopocampale. Questo nucleo comprende la suddivisione cellulare, quella intermedia e quella parvicellulare (Pitkanen, 2000). Nel caso del BLA, le cellule simili a quelle piramidali comprendono una morfologia che cambia da piramidali, a semipiramidali, a stellate (Faber et al., 2001) e in generale tali neuroni sono più grandi rispetto a quelli presenti nel La, con un diametro medio del soma di circa 15-20 μm (Sah et al., 2003). Il secondo tipo di cellule trovate nel BLA, presenta un corpo leggermente più piccolo (10-15) somigliante a quello delle cellule stellate non spinose della COR, di conseguenza vengono denominate cellule "S", oppure stellate o di classe 2 (Sah et al., 2003). A livello funzionale, è stato osservato che l'attivazione di alcuni geni nel nucleo BLA (nuclei L e B) è fondamentale per la regolazione sia di processi neurofisiologici quali gli stati d'ansia che un'ampia varietà di comportamenti quali il food-intake mediante le connessioni anatomiche con l'HTH e l'LH (Petrovich et al., 2001), la discriminazione degli odori, il condizionamento di paura.

L'AMY gioca un ruolo importante nel condizionamento pavloviano della paura uno stimolo neutrale condizionato è accoppiato ad uno stimolo avverso non condizionato provocando una risposta condizionata alla paura definita blocco, essa può dipendere da stimoli uditivi, visivi, olfattivi, tattili, oppure da fattori ambientali. In particolare è stato osservato che il nucleo La agisce da interfaccia con i sistemi sensoriali che trasmettono lo stimolo neutrale condizionato al Ce e rappresenta il collegamento con la regione motoria che controlla la risposta al condizionamento della paura. Il La ha delle importanti connessioni con

il Ce, ma anche con altre regioni dell'AMY come il nucleo B ed M ma per determinare quale di queste regioni sono necessarie per prevenire l'acquisizione del condizionamento della paura sono stati condotti alcuni studi effettuando delle lesioni in diverse aree amigdalari. Animali che ricevevano lesioni nel La e Ce, erano drasticamente compromessi mentre lesioni in altre regioni producevano effetti non molto importanti e questo dimostra dunque che il La e il Ce sono necessari per l'acquisizione della risposta al condizionamento della paura in seguito ad uno stimolo neutrale condizionato uditivo (Nader et al., 2001). Ulteriori conferme sono date dal fatto che tra il La e il Ce ci sono dirette connessioni per il condizionamento della paura a differenza di pathway indiretti che invece coinvolgono gli altri nuclei (Amorapanth et al., 2000). Sono comunque necessari ulteriori studi per determinare con maggiore precisione, come processi all'interno di questi circuiti permettono agli stimoli sensoriali di controllare le risposte alla paura a causa della loro associazione con stimoli dolorosi o avversi (Nader et al., 2001).

Il BLA inoltre è coinvolto nella modulazione del consolidamento della memoria connessa alla paura e alle emozioni e nella produzione di risposte a eventi che inducono stress (Rooney et al., 2003; Kim et al., 2002). Infatti lesioni in tale nucleo e il trattamento con un agonista per NMDA nell'AMY facilita l'estinzione della paura (Walker et al., 2002; Ledgerwood et al., 2003). Come osservato in alcuni studi anatomici, anche la trasmissione GABAergica ha un ruolo importante nell'estinzione della paura. Infatti nel BLA è presente un importante circuito inibitorio che utilizza il GABA come neurotrasmettitore e rispetto ad altri nuclei i recettori GABAergici-BZD risultano essere molto numerosi per cui il trattamento con agonisti per tali recettori riducono il condizionamento della paura e gli stati d'ansia. È stato ancora osservato che lo stress attenua il controllo GABAergico inibitorio nel BLA causando ipereccitabilità e aumento della plasticità sinaptica che facilitano l'apprendimento della paura. In particolare gli agonisti del recettore GABA_A prevengono un aumento dei sintomi correlati a traumi così come accade in pazienti affetti da DPST e fobie causate dall'esposizione a esperienze stressanti (Akirav et al., 2007).

1.3 Gruppo nucleare centromediale

Il gruppo nucleare CeM è situato nella porzione dorsomediale del complesso amigdaloidale e comprende i nuclei Ce, M e la parte amigdaloidale del BNST. Il primo è localizzato a livello della superficie cerebrale, nell'angolo dorsomediale del lobo temporale/piriforme, subito lateralmente al tratto ottico ed è connesso dorsalmente al gruppo nucleare simil-corticale superficiale e presenta uno strato molecolare con cellule sparse, che contiene fibre provenienti

dai lobi olfattivi principale ed accessorio ed una porzione profonda densamente cellularizzata. Per quanto riguarda il nucleo Ce, è posto appena lateralmente al nucleo M ed è ulteriormente suddiviso in altre porzioni neuronali, in tutte le specie di Mammiferi mentre nel ratto si osserva una regione tra la porzione laterale e l'adiacente area di transizione amigdalo-striatale. Questa è un'estensione ventrale, situata tra le porzioni anteriori del nucleo Ce e del nucleo basale magnocellulare dell'amigdala, che nel ratto, formano la divisione corticale del nucleo Ce dell'amigdala.

Al complesso amigdaloideo appartiene anche il BNST che però risulta separato, sia ontogeneticamente che filogeneticamente, dal gruppo CeM a causa dell'espansione della capsula interna, sebbene interconnesso a tale gruppo dalla stria terminale. Così come per il BLA, anche la morfologia del Ce è stata studiata mediante la tecnica di Golgi e sono stati individuati tre tipi di neuroni distribuiti in modo omogeneo: il primo tipo è rappresentato dai neuroni con spine medie (Sah et al., 2003), il secondo tipo di neuroni presenta, invece, un corpo alquanto più grande rispetto ai neuroni descritti precedentemente, con un dendrite primario folto e privo di spine. Infine, il terzo tipo di neuroni è rappresentato da neuroni privi di spine, che sono in minoranza rispetto agli altri due tipi cellulari (Sah et al., 2003).

Dal punto di vista funzionale il Ce è uno dei principali nuclei che riceve *outputs* dal BLA, invia *inputs* all'HTH, ed innumerevoli fibre al nucleo reticolare, per l'incremento dei riflessi, al nervo trigeminale ed al nervo facciale per le espressioni facciali di paura, alla VTA, al LC ed al nucleo tegmentale laterodorsale per regolare l'attività di neurotrasmettitori, come la dopamina, l'acetilcolina e l'epinefrina. Grazie alle innumerevoli connessioni che il nucleo Ce possiede con differenti regioni encefaliche, esso sembrerebbe essere il principale centro regolatore coinvolto nel risveglio emozionale. In particolare questo specifico nucleo amigdalare, appartenente al gruppo nucleare CeM, si trova in una posizione strategica per la mediazione di molti aspetti associati a stati di paura ed ansia, in quanto i suoi neuroni proiettano e ricevono *inputs* da molte strutture coinvolte nella risposta allo stress, inclusi l'HTH, il BF ed il tronco encefalico.

Per comprendere come il Ce media i comportamenti legati alla paura e all'ansia sono stati condotti diversi studi; in particolare è stato osservato che esiste una correlazione negativa tra lesione nel Ce e la concentrazione di ACTH e CRF, ormoni importanti coinvolti negli stati d'ansia. Infatti in ratti con lesioni bilaterale e asimmetrica del Ce, le concentrazioni di ACTH così come quelle di CRF sono molto basse dimostrando quindi che tali alterazioni nel nucleo riducono l'attività dell'asse HPA. Questi dati suggeriscono quindi che il Ce svolge un ruolo importante nel mediare sia comportamenti legati alla paura e all'ansia che l'attività del

sistema HPA (Kalin et al., 2004). Il ruolo modulatore del nucleo Ce dipende dai recettori GABA_A localizzati in questa struttura (Kang-Park et al., 2004) e difatti, studi dimostrano come i recettori GABA_A sono espressi in alte concentrazioni a livello del Ce (Marowsky et al., 2004) e come i neuroni vengono inibiti dagli *inputs* GABAergici (Finnegan et al., 2005). È stato inoltre dimostrato che somministrazioni di agonisti del GABA nel nucleo Ce portano ad una riduzione del *feeding* (Baldo et al., 2005) mentre altri studi riguardanti gli *inputs* GABAergici nel nucleo Ce dell'AMY fanno riferimento al coinvolgimento del GABA nelle risposte cardiovascolari. E' stato osservato che microiniezioni di Glu a livello del Ce evocano un decremento della pressione arteriosa e del battito cardiaco che può essere significativamente ripristinata dopo microiniezioni di antagonisti del GABA (Ciriello et al., 2003).

1.4 gruppo nucleare corticale

Il gruppo nucleare corticale o superficiale è situato superficialmente, la sua architettura appare simile a quella della COR olfattiva adiacente e presenta una struttura stratificata (Sah et al., 2003). Questo gruppo comprende il nucleo del tratto olfattivo laterale, il bed nucleus del tratto olfattivo accessorio, il nucleo corticale anteriore e posteriore e la corteccia periamigdaloidale. Il bed nucleus del tratto olfattivo accessorio si trova nella parte più rostrale dell'AMY, delimitato lateralmente dal nucleo corticale anteriore, il quale è una struttura stratificata localizzata lateralmente al nucleo del tratto olfattivo laterale in posizione rostrale e caudalmente al nucleo mediale. Anche il nucleo corticale posteriore è stratificato e localizzato nella parte più caudale dell'AMY, circondato dorsalmente dall'area amigdalolo-ippocampale e lateralmente dalla corteccia periamigdaloidale. Quest'ultimo si trova invece in posizione ventrale rispetto al nucleo basale ed è suddiviso in tre parti: corteccia periamigdaloidale, divisione mediale e solcale (Pitkanen et al., 2000). Dal punto di vista funzionale il nucleo corticale è coinvolto nei processi che regolano le informazioni olfattive importanti per il riconoscimento sociale. In particolare il tratto olfattivo sia accessorio che principale sono in grado di elaborare segnali chimici sessuali e modulare il comportamento sessuale (Keller et al., 2009).

1.5 Coinvolgimento amigdalare nella regolazione di varie funzioni cerebrali

La plasticità è la capacità del SN di modificarsi, ed è caratterizzata da tutta una serie di eventi particolarmente marcati che si verificano nel corso dello sviluppo. E' chiaro, tuttavia, che la capacità di apprendere nuove abilità e di memorizzare nuove informazioni resta presente per

tutta la vita anche se la comprensione dei meccanismi responsabili dell'apprendimento e di altre attività plastiche hanno luogo nell'encefalo adulto. Esiste, tuttavia, un ampio consenso intorno all'idea che alla base di questi fenomeni vi siano modificazioni, finemente regolate, della forza delle sinapsi che rimangono in vita. Esperimenti condotti su diversi modelli animali hanno dimostrato come la forza delle sinapsi possa modificarsi nell'arco di periodi compresi tra alcuni millisecondi e vari mesi.

I meccanismi cellulari alla base di questi cambiamenti sono costituiti da modificazioni transitorie dei processi di neurotrasmissione sinaptica, mentre nel caso di modificazioni più durature sono costituiti da cambiamenti dei processi di espressione dei geni (Purves et al., 2004). Per quanto riguarda la plasticità amigdalare, la principale stazione sensoriale dell'AMY è il nucleo La, esso infatti riceve informazioni sensoriali dalle regioni corticali e subcorticali le quali sono in stretto rapporto con popolazioni cellulari ed interneuroni. Dati raccolti *in vivo* dimostrano un potente controllo attraverso l'inibizione GABAergica sull'attività delle proiezioni di principali cellule; tramite questi prolungamenti si è potuto dimostrare che gli interneuroni GABAergici svolgono un ruolo speciale nel controllo dell'eccitazione in alcune importanti regioni encefaliche. Gli interneuroni GABAergici insieme al Glu, giocano un ruolo fondamentale soprattutto nei processi di plasticità sinaptica nell'AMY. La plasticità all'interno del nucleo La è regolata da recettori per NMDA ed AMPA, mediante segnali di tipo eccitatorio (Szinyei et al., 2000). Gli inputs Gluergici corticali ed interneuronali nei nuclei La e B vengono trasmessi ai recettori per AMPA i quali, tramite un aumento della permeabilità al Ca^{2+} , promuovono una particolare forma di plasticità sinaptica.

Al contrario, i segnali mediati dai recettori dell'NMDA, in questi tipi di neuroni, risultano essere molto scarsi (Rodrigues et al., 2001; Bauer et al., 2002). È noto, che anomalie strutturali dell'AMY e in particolare nel BLA sono causa di patologie nervose. Alterazioni fisiopatologiche dell'eccitabilità neuronale portano al manifestarsi di malattie psichiatriche come disordini di ansia e depressione. Sono stati scoperti due recenti meccanismi neuronali che regolano l'eccitabilità all'interno del BLA, dove la trasmissione inibitoria può essere modulata dal sistema GABAergico. Uno di questi meccanismi riguarda il rilascio di GABA attraverso il Kainato, tramite la subunità recettoriale GluR5. Nel BLA di ratto GluR5 è presente sia nella regione somatodendritica che in quella terminale presinaptica di interneuroni GABAergici che regolano appunto il rilascio di GABA. L'ipotesi che GluR5 moduli l'epilessia, è suggerita dal fatto che, il legame di un agonista possa indurre attività epilettica, mentre l'antagonista la previene. Il secondo meccanismo consiste nel facilitare il

rilascio di GABA tramite il recettore adrenergico presinaptico α_1a , il quale è severamente indebolito dallo stress (Aroniadou-Anderjaska et al., 2007).

Questa connessione funzionale che prevede l'alterazione del sistema noradrenergico nel favorire la trasmissione inibitoria nel BLA, è dovuta probabilmente ad una iperattività dell'AMY anche durante uno stato di riposo così come ad una maggiore reattività ad uno stimolo emotivo che può essere accompagnato da un danneggiamento nella trasformazione e interpretazione dello stimolo stesso. Il sistema noradrenergico modula diverse attività encefaliche quali aumento dell'attenzione, facilita la formazione della memoria e regola anche il comportamento esplorativo (Berridge et al., 2003). Questo è dovuto al fatto che estese innervazioni noradrenergiche dal LC e dal nucleo del tratto solitario giungono all'AMY. Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo della norepinefrina nella fisiologia e funzione dell'AMY in quanto l'attivazione del recettore adrenergico β nel BLA è importante per spiegare il ruolo dell'AMY nella codifica della memoria emozionale (Cahill et al., 2003; Miranda et al., 2003; Strange et al., 2004) mentre l'attivazione del recettore α_2 sembra avere un effetto contrario oltre che inibire l'induzione sia del potenziamento a lungo termine che la depressione a lungo termine.

È stato ancora osservato che la norepinefrina attivando il recettore adrenergico α_1a , se somministrato a determinate concentrazioni, facilita il rilascio di GABA poiché provoca una depolarizzazione dei neuroni e/o agisce direttamente sulle terminazioni presinaptiche dei neuroni GABAergici. Tale rilascio è però alterato quando si è sottoposti a fattori di stress ed è stato ipotizzato che livelli elevati di norepinefrina può essere causa della compromissione del recettore adrenergico. Questi risultati forniscono la prova diretta dell'alterata trasmissione inibitoria nell'AMY e dimostrano anche che l'iperattività di questa regione encefalica in diversi disturbi legati all'ansia come DPTS, sono dovuti ad una riduzione della trasmissione mediata dal recettore GABA_A poiché sia ha una riduzione del rilascio di GABA mediato dal recettore adrenergico α_1a (Aroniadou-Anderjaska et al., 2006).

Numerosi studi hanno evidenziato anche un importante ruolo svolto dalle ORXs nella plasticità sinaptica (Selbach et al., 2010). L'azione del sistema ORXergico nel controllo del ciclo sonno-veglia, nell'omeostasi energetica e nel feeding è molto conosciuto (Sakurai 2007), mentre è ancora poco chiaro il coinvolgimento dell'ORX nell'apprendimento e nella memoria (Lambe et al., 2007). È stato osservato che a livello ippocampale, la trasmissione sinaptica a lungo termine (Frey et al., 2008), correlata all'apprendimento e alla memoria, è aumentata da somministrazioni di ORX nel giro dentato o nell'LC *in vivo* (Wayner et al., 2004). In particolare l'ORX-A provoca un'importante forma di trasmissione sinaptica a lungo

termine basandosi sulla co-attivazione di recettori metabotropici, alterata funzione del recettore Gluergico inotropica e della plasticità (Selbach et al., 2010). Gli effetti dell'ORX all'interno dell'HIP stabilizzano la transizione rapida stato-dipendente tra l'attività neuronale associata durante la formazione e il consolidamento della memoria. Inoltre, i processi plastici che si verificano durante la fase di veglia, quando i livelli di ORX sono alti, sono associati ad un chiaro aumento della forza sinaptica e all'efflusso Gluergico in alcune aree encefaliche (Bonci et al., 2009). Al contrario, durante il sonno, quando i livelli di ORX e Glu sono bassi anche la forza sinaptica diminuisce (Aton et al., 2009). Dunque, l'ORX, favorisce i processi di memoria e in particolare nei cambiamenti metabolici, ambientali e comportamentali. È stato quindi ipotizzato che i deficit cognitivi e mnemonici osservati nella narcolessia e altre patologie associate a disfunzioni del sistema ORXergico, possono essere dovute anche ad alterazioni della modulazione ORXergica sulla plasticità sinaptica bidirezionale.

1.6 Il Sistema Orexinergico

Le ORXs vennero identificate per la prima volta nel 1998 simultaneamente da due gruppi di ricerca che utilizzando due strategie completamente diverse individuarono due peptidi, uno di 33 e l'altro di 28 aa, ligandi endogeni per i due recettori orfani "G-protein-coupled" (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Poiché tali peptidi derivavano dalla scissione proteolitica di un unico precursore con una sequenza amminoacidica simile alla secretina intestinale vennero definiti ipocretine 1 e 2 o ORX-A e ORX-B.

La distribuzione e l'attività farmacologica delle ORXs e dei recettori ad esse associati, suggeriscono un loro importante coinvolgimento nella regolazione del sistema neuroendocrino, nel controllo della temperatura, nell'omeostasi energetica, nella regolazione del feeding (Sakurai et al., 1998; Sutcliffe et al., 2000; Hervieu et al., 2001) e nel controllo gastrointestinale. Più recenti osservazioni hanno inoltre dimostrato un ruolo primario svolto dalle ORXs nel controllo del ciclo sonno-veglia (Peyron et al., 2000; Hara et al., 2001; Alam et al., 2005; Henny et al., 2006). Le ORXs, infatti, intervengono promuovendo lo stato di veglia, sostenendo la veglia attiva ed impedendo all'animale di addormentarsi in seguito ad un periodo prolungato di privazione di sonno (Saper et al., 2005). I neuroni ORXergici ricevendo numerosi input dal sistema limbico sono coinvolti anche in altri processi neurofisiologici come gli stati d'ansia e stress, nella coordinazione delle emozioni e nei processi di ricompensa (Harris et al., 2006).

1.7 La struttura delle ORXs

Le ORXs sono prodotte da un precursore comune, la PPORX, nei neuroni dell'ipotalamo laterale (LH) dei Mammiferi (Sakurai et al., 1998; De Lecea et al., 1998). La PPORX di uomo, ratto, topo, cane e suino è composta da 130-131 aa (Kukkonen et al., 2002) la cui sequenza è ben conservata all'interno del genoma delle specie suddette mostrando un alto grado di analogia (75%) e stretta somiglianza anche con quelli di specie inferiori quali lo *Xenopus laevis* (Voisin et al., 2003). In particolare la sequenza della PPORX del ratto è per l'83% identica a quella dell'uomo e per il 95% a quella del topo suggerendo che esse possano svolgere funzioni simili (Alvarez et al., 2002), tra cui un importante ruolo di neuromodulazione (Ohkubo et al., 2002).

La presenza della PPORX è stata riscontrata nell'HTH, nel nucleo subtalamico e nelle cellule endodermali (Sakurai et al., 1998; Kukkonen et al., 2002) e in apparati diversi del SNC quali cuore, polmone, rene, apparato digerente, ghiandole surrenali, placenta e muscolatura scheletrica (Sakurai et al., 1998; Nakabayashi et al., 2003). Il gene che codifica per la PPORX è localizzato, nel topo, sul cromosoma 11 e presenta varie analogie con il cromosoma umano 17q21-q24 (Sakurai et al., 1999). Tale gene è formato da due esoni ed un introne per un totale di 1432 paia di basi (Taheri et al., 2001) di cui la porzione più essenziale per la trascrizione della PPORX risulta essere costituita dalle 450 pb più prossimali (Kukkonen et al., 2002).

L'esone 1 di 143-bp include una regione non codificante all'estremità 5' e una regione codificante per i primi cinque residui della sequenza segnale secreta. L'introne 1, il solo introne individuato nel gene umano della PPORX è lungo 818-bp e l'esone 2 contiene la porzione rimanente dell'*open reading frame* e la regione 3' non codificante (Sakurai et al., 1999). L'assenza dei geni che codificano per la PPORX provoca nell'uomo manifestazioni sintomatologiche simili alla narcolessia (Peyron et al., 2000). Il clivaggio di una molecola di PPORX e una conseguente modifica post-trascrizionale porta alla produzione di una molecola di ORX-A e ORX-B (Fig.2). L'ORX-A è un peptide di 33 aa, dal peso molecolare di 3562 Da ed una struttura terziaria ad α -elica (Voisin et al., 2003). Il primo aa risulta essere la Glicina (Gly) che è ciclizzato in un residuo piroglutamico e finisce con un residuo carbossiamidato (Sakurai et al., 1998). All'interno della sua struttura l'ORX-A presenta due ponti disolfuro situati tra i residui cisteinici in posizione 6, 7, 12 e 14 (Soll et al., 2000), i quali sono essenziali per la sua attività funzionale (Darker et al., 2001; Okumura et al., 2001) così come il residuo 19 C-terminale (Darker et al., 2001). Infatti, i ponti disolfuro conferiscono una maggiore solubilità nei lipidi permettendo così all'ORX-A, a differenza dell'ORX-B, di attraversare la

barriera emato-encefalica e di concentrarsi nel liquido cefalorachidiano (Kukkonen et al., 2002).

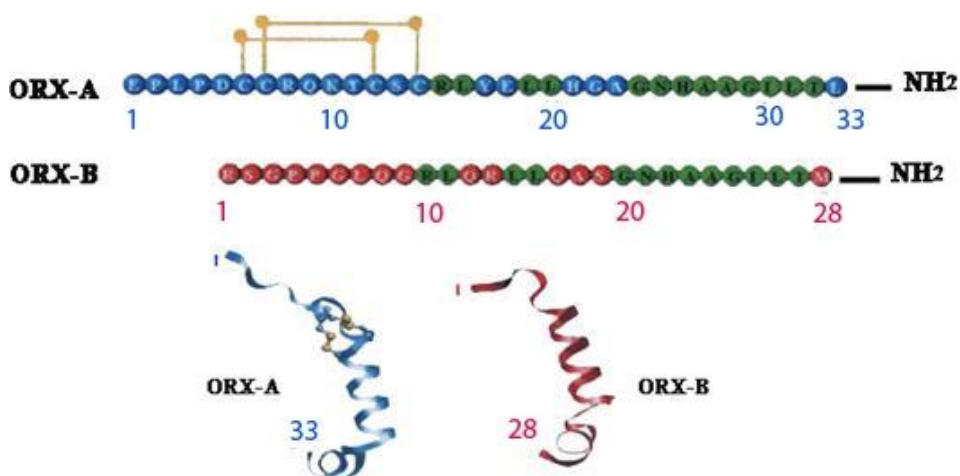


Fig. 2 Sequenza lineare e struttura terziaria di ORX-A ed ORX-B.

L'ORX-B è un peptide lineare costituito da 28 aa, dal peso molecolare di 2937 Da (Sakurai et al., 1998), dotato di un terminale carbossiamidato e contenente due α -eliche tenute insieme da un loop flessibile (Lee et al., 1999). I residui amminoacidici che formano la superficie idrofobica al C-terminale di ORX-A sono ben conservati anche in ORX-B mentre uno studio focalizzato sull'analisi della struttura secondaria dell'ORX-A umana ha evidenziato che la porzione N-terminale di quest'ultima, che comprende i due ponti disolfuro intracatena, è notevolmente differente rispetto alla porzione N-terminale di ORX-B (Fig.2). Confrontando la sequenza aminoacidica dei due peptidi nell'uomo si evidenzia che essi sono identici per il 46% della loro composizione e in particolare le ORX-B del topo e del ratto sono identiche (Sakurai et al., 1998), mentre quella umana si differenzia per la sostituzione di due soli aa (Kukkonen et al., 2002).

1.8 I recettori ORXergici

Le azioni delle ORXs sono mediate da due recettori accoppiati a proteine G definiti ORX1R e ORX2R (Sakurai et al., 1998). ORX1R è strutturalmente simile al recettore per il neuropeptide Y (NPY) e 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 ed il 20% di similarità con il recettore per la neurochinina (NK2). L'omologia dei recettori ORXergici nell'uomo e nel ratto è invece del 94% per ORX1R e del 95% per ORX2R indicando una elevata conservazione tra le varie specie dei geni codificanti per entrambi i recettori (Marcus

et al., 2001). L'ORX1R dell'uomo è accoppiato alla sottoclasse Gq di proteine recettoriali (Zhu et al., 2003), è costituito da 425 aa e presenta una struttura caratterizzata da più segmenti elicoidali transmembrana. Il gene per ORX1R è localizzato sul cromosoma 1p33 (Mazzocchi et al., 2001) ed è codificato da sei esoni (Peyron et al., 2000).

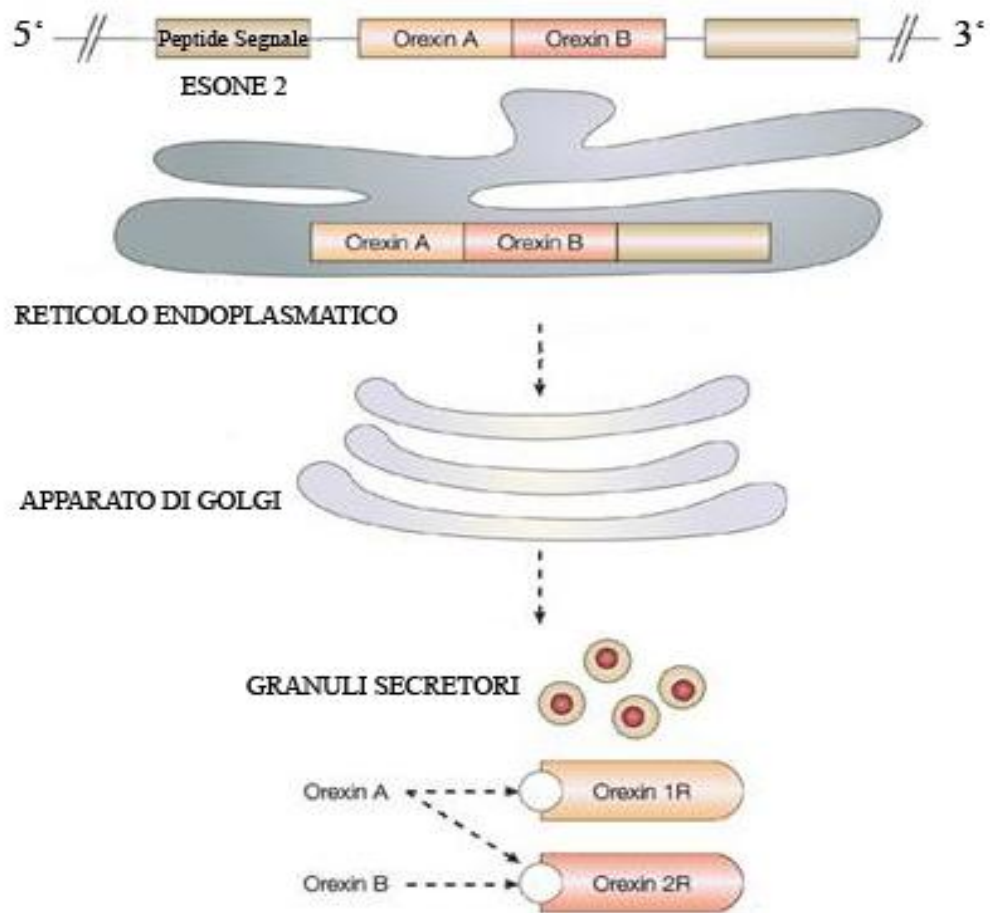


Fig. 3 Disegno schematico delle ORXs e dei suoi recettori. L'ORX-A e l'ORX-B derivano entrambe da uno stesso precursore, la PPORX. L'ORX-A lega con alta affinità entrambi i recettori di tipo 1 e di tipo 2, mentre l'ORX-B lega con alta affinità solo ORX-2R.

L'ORX2R dell'uomo, invece, è accoppiato alle sottoclassi Gq e Gi/o di proteine recettoriali (Zhu et al., 2003), esso è composto da 444 aa e presenta sette eliche transmembrana. Questo recettore è codificato da sette esoni (Peyron et al., 2000) ed il relativo gene è localizzato sul cromosoma 6p11-q11 (Mazzocchi et al., 2001). Recenti studi hanno dimostrato che ORX1R lega con un'affinità dieci volte superiore l'ORX-A rispetto all'ORX-

B, mentre il ORX2R tende a legarsi ad entrambi le ORXs (Fig. 3) apparentemente con uguale affinità (Kukkonen et al., 2002).

Il legame delle ORXs con gli specifici recettori accoppiati alle proteine G provocano l'aumento del Ca^{2+} intracellulare che, a seconda che risulti o non attivato l'inositoltrifosfato (IP3) citoplasmatico, genera un afflusso di Ca^{2+} proveniente dal pool extracellulare (Voisin et al., 2003). Inoltre, le ORXs determinano l'aumento di adenosinmonofosfato ciclico (cAMP) nella corteccia adrenergica dell'uomo e del ratto (Mazzocchi et al., 2001) ed attivano le proteina chinasi coinvolte nella crescita, differenziazione e morte cellulare (Ammoun et al., 2006) e la proteina chinasi coinvolta nelle mitosi (Kukkonen, 2002).

1.9 Distribuzione e sistema di trasduzione del segnale dei recettori ORXergici

I recettori ORXergici sono presenti in numerosi Mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Aree particolarmente ricche di ORX1R sono il nucleo ipotalamico ventromediale, la tenia tecta, l'HIP, il nucleo dorsale del raphe (DRN) ed il locus coeruleus (LC; Marcus et al., 2001). L'ORX2R è invece altamente espresso nel nucleo paraventricolare (PVN), nella corteccia cerebrale (COR), nel Acb, nel nucleo subtalamico, nel nucleo talamico paraventricolare e nell'area pretettale anteriore. Entrambi i recettori sono ampiamente espressi nell'ipofisi intermedia e nel lobo posteriore mentre nel lobo anteriore ORX1R è più espresso rispetto al recettore di tipo 2. Inoltre, ORX1R è presente nelle cellule acidofile dell'adenoipofisi dove è coespresso l'ormone della crescita (GH) a differenza di ORX2R che è localizzato invece nelle cellule basofile dell'ipofisi le quali coesprimono l'ormone ACTH. Studi di immunoistochimica hanno anche rilevato la presenza di ORX1R e ORX2R in molte altre strutture dell'encefalo quali il nucleo tegmentale dorsale laterale, il peduncolo pontino ed il complesso del trigemino (Greco et al., 2001).

Sebbene ORX1R e ORX2R presentano un'elevata espressione nel SNC, modeste densità recettoriali sono state identificate anche in alcuni tessuti periferici quali il pancreas, il tratto gastrointestinale e la ghiandola surrenale (Naslund et al., 2002). A conferma di ciò, recenti studi hanno dimostrato che le ORXs stimolano la secrezione dei glucorticoidi nell'uomo e nel ratto agendo esclusivamente tramite ORX1R (Ziolkowska et al., 2005). La presenza di ORX1R è stata inoltre osservata anche a livello testicolare, (Johren et al., 2001; Blanco et al., 2002), nel tessuto renale e nella tiroide, mentre ORX2R è stato rilevato a livello polmonare (Johren et al., 2001).

L'attivazione di specifici recettori ORXergici dalla quale dipendono le azioni svolte dalle ORXs è strettamente correlata alle loro proprietà strutturali (Lang et al., 2006). Una di queste proprietà riguarda la sequenza amminoacidica presente nella parte C-terminale che deve essere costituita almeno da 19 aa nel caso dell'ORX-A e da 21 aa nel caso dell'ORX-B. L'attivazione specifica dell'ORX-A richiede che tale sequenza amminoacidica sia completa, mentre i due ponti disolfuro intracatena non sembrano essere necessari per il mantenimento di tale attività (Lang et al., 2006). Diversi studi hanno inoltre dimostrato che la sostituzione di uno dei nove aa presenti nella zona idrofobica della parte C-terminale dell'ORX-A causa una riduzione dell'affinità del neurotrasmettitore con il proprio recettore, mentre, gli aa presenti nella zona idrofilia C-terminale e nella zona N-terminale, non sembrano alterare il legame dell'ORX-A con il proprio recettore. Sulla base di tali conoscenze è stato possibile capire che affinché avvenga il legame dell'ORX-A con il recettore è importante che la regione C-terminale idrofobica non sia mutata (Takai et al. 2006). Una volta attivati, i recettori ORXergici, trasmettono le informazioni all'interno della cellula attivando proteine G eterotrimeriche modulando sia i canali voltaggio dipendenti del Ca^{2+} che i canali del potassio (Zhu et al., 2003). In particolare l'attivazione di ORX1R porta ad un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Smart et al., 1999; Lund et al., 2000) e una stimolazione diretta della fosfolipasi C (Lund et al., 2000). Inoltre la stimolazione ORXergica induce il turnover di IP3 (Fig. 4) e nella ghiandola surrenale l'interazione tra ORX-A e recettore porta alla produzione di cAMP (Randeva et al., 2001).

Alcune evidenze sperimentali suggeriscono un coinvolgimento delle ORXs, soprattutto a livello ipotalamico (Bayer et al., 2001; Liu et al., 2001; Soffin et al., 2002) e nel midollo spinale (Antunes et al., 2001), nei processi di depolarizzazione (Bayer et al., 2000), la cui ampiezza massima è compresa tra 3-10 mV producendo un potenziale d'azione (Eggermann et al., 2001; Yamanaka et al., 2002). Ulteriori studi effettuati *in vivo* hanno dimostrato che sia ORX1R che ORX2R producono segnali eccitatori sui neuroni, infatti, le ORXs attivano le cellule adrenergiche del LC le quali esprimono esclusivamente ORX1R (Hagan et al., 1999), quelle adrenergiche dell'area tegmentale ventrale (VTA; Nakamura et al., 2000) e le cellule istaminergiche del nucleo tuberomammillare (TMN) che invece esprimono ORX2R (Yamanaka et al., 2002). È possibile, inoltre, che le ORXs localizzate nelle terminazioni presinaptiche aumentino il rilascio di glutammato (Glu) e che ORX2Rs accoppiati alle proteine G inibiscano il rilascio del neurotrasmettitore nelle terminazioni assoniche (Li et al., 2002).

1.10 I neuroni ORXergici e fibre nervose

I neuroni che producono ORXs sono localizzati esclusivamente nell'LH che include l'area perifornicale (PFA) e l'ipotalamo posteriore, regioni classicamente implicate in una ampia varietà di sistemi che regolano comportamenti quali il *feeding* e l'omeostasi energetica (Eriksson et al., 1999). All'interno dell'encefalo dei roditori, nel piano caudale e rostrale, i neuroni ORXergici si estendono dal caudale al PVN, dal rostrale al TMN ma la maggior parte dei neuroni si trova all'interno di PFA. Questi neuroni sono variabili per grandezza (15-40 μm di diametro), forma (sferica, fusiforme e multipolare) e si stima che il numero sia di circa 3000 nel ratto e 50000 nell'uomo.

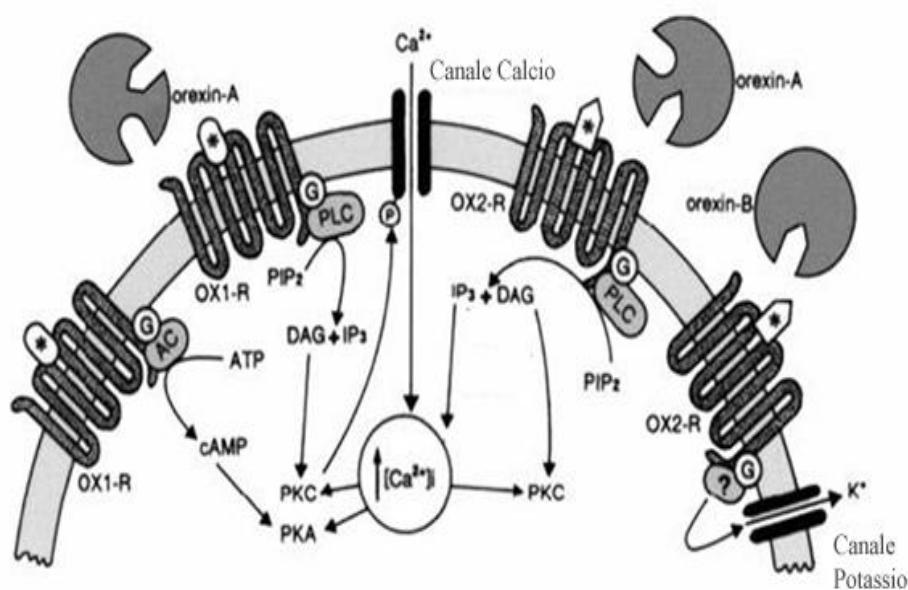


Fig. 4 Rappresentazione schematica dei principali processi di trasduzione attivati dall'interazione dell'ORX-A e dell'ORX-B con i rispettivi recettori. Abbreviazioni: G= proteina G; P= sito di fosforilazione; PKC= protein chinasi C; PKA protein chinasi A; IP₃= inositolo trifosfato; PLC= fosfolipasi C; PIP₂= fosfatidilinositolo bifosfato; DAG=diacilglicerolo.

L'ORX-A è co-espressa in neuroni che contengono la vasopressina, il NPY e peptide associato alla proteina agouti (AGRP) così come nel trascritto che regola le anfetamine (CART). Negli ultimi anni questi importanti neuromodulatori sono stati individuati anche in organi periferici, in modo particolare l'ORX-A è espressa dalle cellule pancreatiche- β (Kirchgessner 2002; Ehstrom et al., 2005), nella retina dell'uomo, suggerendo un loro probabile coinvolgimento anche nella regolazione della funzione visiva (Savaskan et al., 2004) e nella circolazione sistemica sanguigna dell'uomo e del ratto (Johren et al., 2001; Voisin et al., 2003). Per quanto riguarda la loro presenza nel SNC, le cellule ORXergiche, sono state ritrovate anche nel nucleo preottico ventrolaterale, nell'area preottica mediale e

laterale, nei nuclei del raphe, nell'eminenza mediana, nel nucleo arcuato (ARC) e in regioni associate alle emozioni e agli stati d'ansia e depressione (Kelley et al., 2005) quali l'AMY, la corteccia infralimbica, il Acb, e il sottonucleo anterolaterale del BNST (Yoshida et al., 2006). Da queste regioni le fibre ORXergiche nel ratto, proiettano in tutto il SNC ma le più importanti si trovano nell'HTH (Fig. 5), in particolare nell'area ipotalamica laterale (LHA), nell'PFA, nel nucleo ipotalamico ventromediale, nell'ipotalamo dorsomediale, nel ARC, nell'area preottica e nell'eminenza mediana (Kukkonen et al., 2002). Diverse fibre ORXergiche arrivano ai nuclei talamici ed in particolare al PVN, al nucleo centro mediale, al tronco encefalico più precisamente al LC, ai nuclei aminergici del *raphe*, al nucleo vagale, al nucleo del tratto solitario, alla formazione reticolare e per tutta la lunghezza del midollo spinale. Meno numerose sono le fibre ORXergiche che proiettano nelle regioni corticali, nell'HIP, lungo il sistema olfattivo, nell'AMY e nei gangli della base (Ciriello et al., 2003).

Le fibre che invece sono dirette ai neuroni ORXergici provengono dal nucleo soprachiasmatico, dal BNST, dalla zona supraventricolare e nell'ipotalamo dorso mediale (Sakurai et al., 2005; Yoshida et al., 2006). Molteplici afferenze provengono anche da altre regioni encefaliche e innervano principalmente i neuroni ORXergici nel PFA, e solo scarse proiezioni extraipotalamiche innervano i neuroni ORXergici nell'HTH mediale, ad eccezione della parte del setto laterale. Anche la parte dorsale del setto laterale e la corteccia infralimbica presentano proiezioni provenienti da neuroni ORXergici sia dell'HTH mediale sia dell'LHA. Ai neuroni dell'LHA giungono innervazioni provenienti inoltre dalla divisione laterale e mediale del nucleo Ce dell'AMY, dall'AMY mediale, dall'AMY mediale anterodorsale (Yoshida et al., 2006).

Numerosi studi hanno dimostrato che gli input neuronali dell'AMY e più in generale di tutto il sistema limbico sui neuroni ORXergici, possono essere implicati nella cataplessia una patologia nella quale sono conosciuti come causa principale forti stimoli emozionali in pazienti già affetti da narcolessia. Questo meccanismo permette di comprendere come le cellule ORXergiche giocano un ruolo importante nella risposta fisiologica associata alle emozioni nell'uomo.

1.11 Processi neurofisiologici regolati dal sistema ORXergico

Le ORXs, oltre che per il loro ruolo primario nella regolazione del comportamento alimentare, nell'omeostasi energetica e nel ciclo sonno veglia, sono note anche per il loro coinvolgimento nel controllo di molti altri sistemi come quelli neuroendocrino, gastrointestinale, cardiovascolare (Samson et al., 1999) e nel controllo del dolore (Sutcliffe et

al., 2000). Somministrazioni sistemiche e interocerebroventricolari (i.c.v.) di ORX dimostrano anche il ruolo svolto da questi neuropeptidi in altri processi come l'apprendimento e la memoria (Horvarth et al., 1999), nei processi neurofisiologici quali gli stati d'ansia e stress, la neurotrasmissione della dopamina, della 5-HT, dell'acetilcolina, del GABA e del Glu (Ida et al., 2000). In particolare, si è constatato che all'interno dell'AMY il rilascio di questi neurotrasmettitori dipende fortemente dalle ORXs (John et al., 2001).

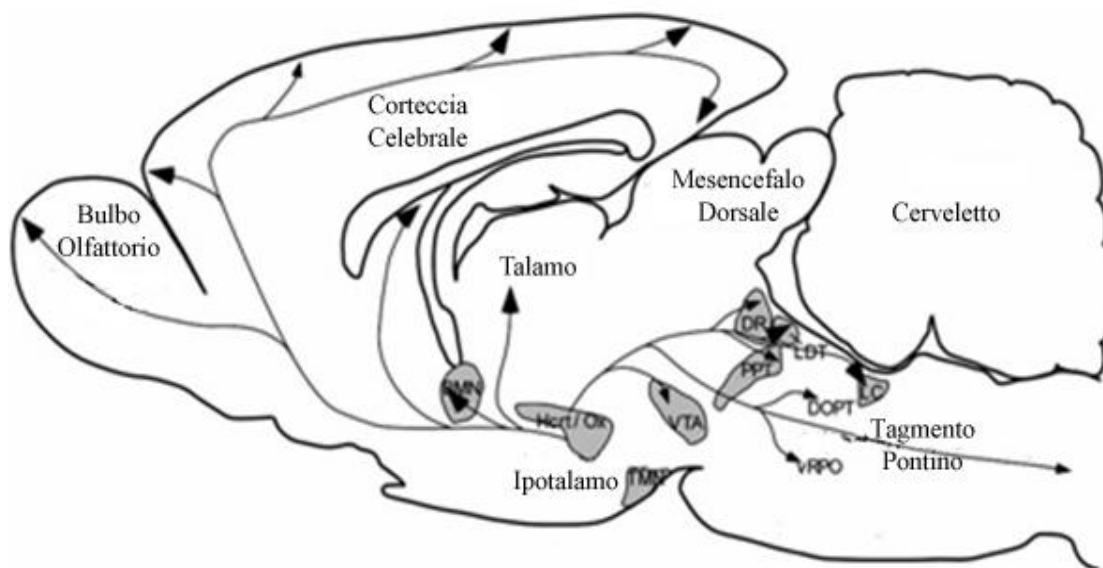


Fig. 5 Disegno schematico di una sezione sagittale di encefalo di ratto. I neuroni ORXergici dell' HTH inviano proiezioni in diverse aree encefaliche, in particolar modo nell' LC, nel TMN, nel prosencefalo basale (BF), nel nucleo dorsale del raphe.

Per quanto riguarda la regolazione del feeding, numerosi sono i siti ipotalamici ed extraipotalamici che stimolano l'assunzione di cibo in seguito a microiniezioni di ORX-A ed ORX-B (Dube et al., 1999). L'effetto dell'ORX-A sul feeding behavior è stato inoltre confermato mediante l'uso di un antagonista selettivo per ORX1R (SB334867), responsabile della riduzione nell'assunzione di cibo ORX-indotto (Haynes et al., 2000; White et al., 2005). Tuttavia è noto che, a livello ipotalamico e nell'ARC, l'assunzione di cibo e l'omeostasi energetica sono regolate dai sistemi mediati dal NPY e dalla leptina (Lep). E' stato dimostrato che, i neuroni ORXergici del LH coesprimono anche i recettori per la Lep (Horvath et al., 1999a) e forse sono sensibili ai livelli di questo importante aa nel plasma (Sakurai, 1999). Non è però ancora chiaro la relazione tra questi due sistemi ma recenti studi suggeriscono che i neuroni ORXergici non sono regolati dalla Lep o dall'insulina (Cai et al., 1999). Inoltre, iniezioni di ORX in neuroni NPY dell'ARC provocano un aumento di espressione della proteina fos suggerendo che il *feeding* ORX-indotto possa avvenire tramite *pathways* di NPY

(Yamanaka et al., 2000). L'ORX induce un aumento nell'assunzione di cibo, ma può essere precedentemente inibita con una somministrazione di BIBO3340, antagonista per il recettore NPY-Y1 (Yamanaka et al., 2000) suggerendo come il feeding behavior possa essere parzialmente regolato dall'attivazione dei neuroni NPY. Poichè nei ratti gli antagonisti di NPY diminuiscono il feeding ORX-indotto solo al 50% esistono sicuramente altri network coinvolti in questo processo ed in particolare uno specifico pathway neuronale potrebbe coinvolgere l'inibizione dei neuroni che esprimono la proiomelanocortina (Muroya et al., 2004). Poichè, la risposta al feeding ORX-indotto che provoca una riduzione dei livelli di glucosio nel sangue è determinato dalla presenza di cibo nell'intestino (Cai et al., 1999) è stato suggerito che l'ORX interviene nel controllo dell'omeostasi energetica anche fuori del SNC. Tale evidenze sono sostenute dalla presenza di mRNA sia di PPORX che dei recettori ORXergici nell'intestino di ratto e dall'aumento della motilità intestinale in tessuti isolati così come una maggiore secrezione di succhi gastrici indotto da ORX-A nei ratti in vivo (Okumura et al., 2001).

Molti studi hanno confermato anche il ruolo primario svolto dall'ORX nel controllo del ciclo sonno-veglia (Sutcliffe et al., 2000; Kilduff et al 2000). Cellule ORXergiche e specifiche proiezioni sono state individuate infatti in alcuni nuclei conosciuti come centri del sonno quali il LC, nucleo del raphe e in neuroni istaminergici localizzati nel TMN ventrale (Bayer et al., 2001). L'effetto eccitatorio di ORX-A dipende dall'attivazione del recettore istaminergico 1 (H1R) nel TMN con un conseguente aumento nel rilascio di istamina (Huang et al., 2001). Le ORXs agiscono sui neuroni istaminergici e insieme a neuroni noradrenergici, creano un forte sistema per il controllo dello stato di *arousal* (Jones, 2003). L'importanza funzionale di questi peptidi nella regolazione delle fasi di risveglio è stata messa in luce da numerosi studi che hanno dimostrato la stretta relazione esistente tra i deficit delle ORXs e i disordini del sonno (Peyron et al., 2000; Hara et al., 2001; Sakurai, 2007; Kilduff et al., 2008). Molto dibattuto è stato il ruolo dei neuroni ORXergici nelle manifestazioni sintomatologiche tipiche della narcolessia, malattia neurologica caratterizzata da una severa sonnolenza durante il giorno, aggravata dall'improvvisa insorgenza del sonno REM durante le fasi di veglia, da cataplessia e paralisi del sonno. I diversi studi, che hanno interessato sia l'uomo (Peyron et al., 2000) che altri Mammiferi (Hara et al., 2001), hanno confermato il ruolo chiave del sistema ORXergico nell'insorgenza delle suddette manifestazioni patologiche, dimostrando come alla base della narcolessia vi sia una deficienza di ORXs. Infatti in pazienti affetti da narcolessia si ha la riduzione di neuroni ORXergici per circa 85%-95% (Thannical et al., 2000). È stato sperimentalmente dimostrato che un gruppo di neuroni ORXergici in LHA promuove lo stato

di veglia (Li et al., 2002). Questi neuroni ricevono e integrano inputs da molte aree cerebrali e inviano fibre nervose ai maggiori centri di eccitazione del cervello (De Lecea et al., 2005; Yoshida et al., 2006). I neuroni ORXergici esercitano, infatti, un'influenza eccitatrice sui neuroni monoaminergici, sostenendone l'attività (Sakurai, 2007), e sui neuroni colinergici del proencefalo basale (Eggermann et al., 2001), un'area cerebrale importante nel mantenimento dello stato di veglia (Alam et al., 2005).

La distribuzione ipotalamica delle ORXs e dei loro recettori in specifiche aree come l'ARC ed il PVN (Hervieu et al., 2001), dimostra che il sistema ORXergico è coinvolto anche nel controllo delle funzioni neuroendocrine. Sicuramente le ORXs aumentano l'attività dei neuroni GABAergici in ARC *in vitro* ed, inoltre, determinano un cambiamento dei livelli ormonali *in vivo* (Taheri et al., 2001). In particolare, l'ORX-A inibisce i livelli di prolattina nel plasma (Russell et al., 2000) e la secrezione del GH *in vivo* (Hagan et al., 1999), mentre, ha un effetto positivo sul rilascio del peptide intestinale vasoattivo dell'ormone luteinizzante (Russell et al., 2000) e nella ghiandola surrenale del corticosterone (Jaszberenyi et al., 2000). Questo coordinato cambiamento dei livelli di tali ormoni conferma maggiormente il ruolo delle ORXs nel controllo del ciclo sonno-veglia. (Kilduff et al., 2000) e negli stati nutrizionali e riproduttivi.

Per quanto riguarda invece le funzioni svolte dall'ORX-B, in particolare, è stato osservato il suo ruolo nell'inibizione della trasmissione Gluergica sui neuroni che producono 5-HT nel DRN attraverso un meccanismo presinaptico che coinvolge una diminuzione nel rilascio di Glu. Questi risultati sono però in contrasto con quelli ottenuti in studi precedenti secondo i quali l'attivazione ORXergica aumenta l'ampiezza del potenziale sinaptico della corrente eccitatoria mediata dal Glu in particolari aree encefaliche (Burlet et al., 2002) quali LH e il nucleo del tratto solitario. Inoltre, l'aumento dell'attività sinaptica mediata dal Glu, è stata attribuita all'attivazione dei ORXs localizzati probabilmente nelle terminazioni Gluergiche e/o sui neuroni Gluergici. Studi più recenti hanno però dimostrato che l'inibizione nel rilascio di Glu nel DRN è mediata dalla stimolazione di ORXs localizzati nelle terminazioni postsinaptiche attraverso un feedback inverso endocannabinoidi; in particolare, agonisti del recettore dei cannabinoidi quale ad esempio WIN 55, 212-2 mimano e occludono l'inibizione del potenziale sinaptico della corrente eccitatoria e il blocco dei recettori CB₁ con l'antagonista AM 251 diminuisce gli effetti dell'ORX-B (Haj-Dahmane et al., 2005). Tali osservazioni sono una ulteriore conferma che l'inibizione del rilascio di Glu ORX-indotta è mediata da un rilascio "inverso" degli endocannabinoidi. Analisi farmacologiche condotti su "messaggeri retrogradi di potenziale" coinvolti nell'inibizione del rilascio di Glu indicano che

la 5-HT non è il messaggero che media gli effetti dell'ORX-B e infatti non ha alcun effetto sul potenziale sinaptico della corrente eccitatoria Gluergica (Auclair et al., 2000; Azad et al., 2003). Inoltre, affinché l'ORX-B possa svolgere la sua azione sulla trasmissione Gluergica, è necessaria l'attivazione del pathways enzimatico della fosfolipasi C e del diacilglicerolo ma non un aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} nelle terminazioni postsinaptiche. A livello del VTA, invece, l'ORX-B aumenta il rilascio presinaptico di Glu oltre che favorire il potenziamento postsinaptico dei recettori NMDR attraverso l'attivazione degli ORX2R e della proteinachinasi C (Borgland et al., 2008). Alcuni studi hanno però dimostrato che sebbene somministrazioni i.c.v. di ORX-B aumentano l'attività locomotoria ma non è ancora chiaro se tali effetti siano mediati dagli ORX2Rs. L'aumento della trasmissione sinaptica Gluergica nei neuroni dopaminergici del VTA è stata anche proposta come causa di alcuni cambiamenti associati all'uso cronico di droghe (Borgland et al., 2004; Kauer, 2004; Wolf et al., 2004), ma gli effetti dell'ORX-B, rilasciata presumibilmente con l'ORX-A, sulla plasticità sinaptica all'interno della VTA sono ancora poco conosciuti.

1.12 Ruolo delle ORXs negli stati d'ansia e stress

Recenti evidenze sperimentali mostrano che, oltre ai neurotrasmettitori classici, anche il sistema ORXergico, è coinvolto in condizioni di stati d'ansia, stress, insulto cellulare e stati patologici. In questo lavoro di tesi, attenzione particolare è stata rivolta, all'azione che i peptidi ORXergici svolgono in due importanti processi neurofisiologici quali gli stati d'ansia e stress (Berridge et al., 2010; Kayaba et al., 2003). Numerosi studi hanno evidenziato che in tutte le forme di stress associate ad un aumento di *arousal*, i neuroni ORXergici, localizzati nella regione ipotalamica coinvolta nelle reazioni di difesa (Zhang et al., 2007), vengono attivati dal fattore rilasciante la corticotropina (CRF; Winsky-Sommerer et al., 2005). Difatti, lo stato di veglia, l'esplorazione, la paura e la restrizione provocano un aumento dell'*arousal* ma solo la paura e la restrizione sono associati ad un forte stress (Estabrooke et al., 2001; Martinez et al., 2002; Espana et al., 2003; Kodama et al., 2005; Lee et al., 2005; Mileykovskiy et al., 2005). Inoltre, le ORXs *in vitro* agiscono sui neuroni preganglionici simpatici (Van den Pol et al., 2003) e quelli del nucleo del tratto solitario (Smith et al., 2002a) mentre *in vivo* iniezioni di ORX in questo stesso nucleo provoca un aumento della pressione sanguigna (Smith et al., 2002b) al contrario di quanto invece è stato osservato in topi knockout per le ORXs (Kayaba et al., 2003). Queste osservazioni dimostrano dunque che le ORXs favoriscono una varietà di risposte fisiologiche associate allo stress come un aumento

della temperatura corporea, della frequenza cardiaca, pressione arteriosa e consumo di ossigeno (Yoshimichi et al., 2001).

Le ORXs attivano ancora i neuroni che contengono CRF provocando di conseguenza l'attivazione dell'asse HPA (Jászberényi et al., 2000; Kuru et al., 2000) confermato anche dalla distribuzione dei recettori ORXergici nel PVN (Date et al., 1999) e dall'espressione dell'mRNA di ORX2R che in questa regione rappresenta il principale sito di produzione di CRF all'interno del SNC (Marcus et al., 2001). Oltre a CRF anche la 5-HT, il NPY e la proteina c-fos sono coinvolti nell'azione ansiogenica dell'ORX-A. Le cellule ORXergiche si trovano nel ARC e nel nucleo del raphe (Date et al., 1999; Peyron et al., 2000), regioni che contengono rispettivamente neuroni che esprimono NPY e 5-HT e le connessioni funzionali tra questi peptidi e l'ORX nel coinvolgimento degli stati d'ansia sono state confermate mediante l'utilizzo di specifici inibitori della 5-HT per il trattamento dei disordini legati all'ansia (Holmes et al., 2003a; Sajdyk et al., 2002). Inoltre, è stato osservato che, iniezioni di ORX attivano il sistema CRF, 5-HT e/o NPY ed il bilancio tra effetto ansiogenico e ansiolitico cambia in base proprio alla dose di ORX-A (Sakurai et al., 1998). Anche il sistema catecolaminergico sembra essere coinvolto nel manifestarsi di ansia e stress comportamentale (Berridge et al., 2003). Lo stress è associato con un aumento del rilascio di noradrenalina e dopamina in particolari regioni implicate nelle funzioni cognitive e affettive come la PFC e l'AMY (Berridge et al., 1998; Fig. 6). Somministrazioni di ORX nel ventricolo laterale o direttamente nel VTA provoca l'attivazione del sistema dopaminergico come nello stress con aumento del rilascio di dopamina all'interno della PFC e nella parte esterna del Acb ma non nel core (Narita et al., 2006; Vittoz et al., 2006).

1.13 Principali sistemi collegati alle ORXs

Numerosi studi hanno dimostrato che molti neurotrasmettitori e neuromodulatori interagiscono con i neuroni ORXergici attivandoli o inibendoli (Volkoff, 2006; Sakurai, 2007). In particolare, è stato osservato che gli agonisti dei recettori ionotropici per il Glu, ovvero l'acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-issossazol-propionico (AMPA) e l'N- metil- D- aspartato (NMDA), eccitano i neuroni ORXergici mentre gli antagonisti per gli stessi recettori, l'acido D-2-ammino-5-fosfomovalerico (AP-5), il 6-ciao-7-nitroquinoxalin-2,3-dione (CNQX) e il 6-nitro-7-sulfamoiibenzo(f)quinoxalin-2,3-dione (NBQX) riducono la loro attività (Yamanaka et al., 2003; Li et al., 2002) suggerendo una modulazione dei neuroni ORXergici da parte del Glu. Altri fattori che agiscono positivamente sul sistema ORXergico sono una forma ottapeptide-solfato della colecistochinina (CCK-8S), la neurotensina, l'OXT,

la ghrelina e la vasopressina (Tsujino et al., 2005), mentre, la Lep, la noradrenalina ed il glucosio lo inibiscono (Winsky-Sommerer et al., 2005). Infatti aumento extracellulare di glucosio induce una forte iperpolarizzazione e dunque la cessazione del potenziale d'azione nei neuroni ORXergici mentre una diminuzione di concentrazione provoca una depolarizzazione e di conseguenza un aumento della frequenza di scarica elettrica (Yamanaka et al., 2003; Burdakov et al., 2005). Recentemente è stato constatato che l'inibizione delle cellule ORXergiche indotta dal glucosio è mediata dal canale per il potassio rivelando un nuovo pathway nei neuroni che regolano gli stati di coscienza e bilancio energetico (Burdakov et al., 2006).

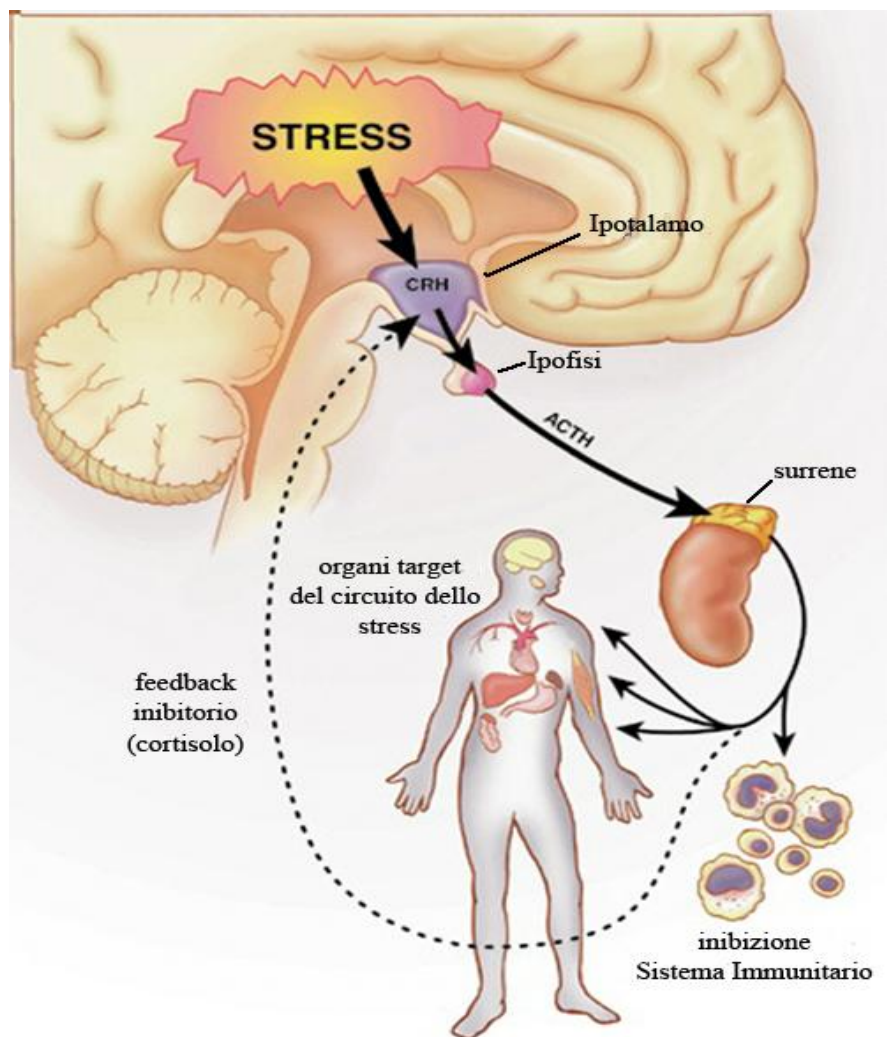


Fig. 6 Rappresentazione schematica del circuito encefalico che partecipa alla regolazione delle risposte neuroendocrine allo stress.

Molteplici studi, tra i vari sistemi di inibizione, hanno indicato quello GABAergico (Winsky-Sommerer et al., 2005; Song et al., 2006) che interagendo con il sistema ORXergico, regola specifiche funzioni neurofisiologiche quali gli stati d'ansia e stress, il ciclo sonno-

veglia (Alam et al., 2005; Henny et al., 2006), ed il *feeding* (Kokare et al., 2006). Più precisamente è stato ipotizzato che l'ORXA influenza l'assunzione di cibo mediante una diminuzione del tono GABAergico all'interno dell'LHA (Thorpe et al., 2006). Tale ipotesi è supportata dalle osservazioni che la somministrazione di GABA, in quest'area, riduce l'assunzione di cibo, mentre la somministrazione di un suo antagonista nella stessa regione encefalica ne determina un aumento (Thorpe et al., 2003). In esperimenti condotti su ratti, infatti, si è riscontrato che la somministrazione di antagonisti GABAergici non influenza l'appetito indotto dall'ORX-A, mentre un suo agonista tende ad inibirne l'azione. Inoltre, il rilascio di GABA all'interno delle regioni ipotalamiche diminuisce significativamente durante la prima ora dopo la somministrazione di ORX evidenziando un effetto inibitorio della stessa sul GABA con successivo aumento nell'assunzione di cibo. L'induzione dello stimolo della fame, sembrerebbe quindi correlato, anche all'area encefalica nella quale si osserva aumento o diminuzione della concentrazione di GABA. Il cross-talking tra il sistema GABAergico ed ORXergico interviene anche nella modulazione dell'attività motoria e nel dispendio energetico (Kotz et al., 2002). In particolare, a prova di ciò, è stato precedentemente dimostrato che l'ORX-A iniettata in siti ipotalamici quali PVN ed nell'area ipotalamica rostro laterale aumenta l'attività fisica in modo dose-dipendente (Novak et al., 2006; Teske et al., 2006). In quest'ultima regione la somministrazione di muscimol, agonista del GABA inverte completamente l'effetto che l'ORX-A ha sul movimento, mentre in PVN l'azione inibitoria del GABA non sembra influenzare il segnale dell'ORX-A (Kiwaki et al., 2004). Non è stato accertato che i siti testati siano gli unici a sostenere i meccanismi che associano l'ORX all'attività motoria, infatti diverse sono le regioni encefaliche che si pensa possano regolare l'attività fisica tra le quali le più importanti sembrerebbero essere TMN, LC, nel DRN e nucleo tegmentale peduncolopontino (Willie et al., 2001).

1.14 Il sistema GABAergico

Il GABA è uno dei principali neurotrasmettitori ad azione inibitoria nel SNC, dal momento che all'incirca il 50% delle sinapsi del SNC sono di natura GABAergica (Korpi et al., 2002). Le caratteristiche molecolari e farmacologiche di tale sistema neuronale sono state ampiamente caratterizzate (Olsen et al., 2009), supportando il ruolo del GABA nel controllo di molteplici funzioni cerebrali e nella fisiopatologia di disordini mentali e neurodegenerativi (Baron et al., 2002; Paoletti et al., 2004).

Nel SNC la sintesi del GABA avviene per decarbossilazione dell'acido glutammico da parte dell'enzima glutammico decarbossilasi, localizzato esclusivamente nei terminali

presinaptici dei neuroni GABAergici e che, come altre decarbossilasi amminoacidiche, richiede la presenza di un cofattore, il piridossal-fosfato. La principale via metabolica del GABA prevede una transaminazione da parte dell'enzima GABA- α -chetoglutarico transaminasi (GABA-T), con formazione della semialdeide succinica e rigenerazione del Glu che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA (Paoletti et al., 2004). La semialdeide succinica è successivamente ossidata ad acido succinico ad opera di una semialdeide-succinico-deidrogenasi (SSDH) NAD-dipendente. Il GABA, sintetizzato nel citoplasma, è successivamente immagazzinato nelle vescicole sinaptiche presenti nella porzione terminale degli assoni e può essere rilasciato sia spontaneamente sia in seguito a stimolazione per depolarizzazione in maniera Ca^{2+} -dipendente (Fig. 7).

Esistono molteplici proteine trasportatrici del GABA quali GAT-1, GAT-2, GAT-3 e BGT-1, che a livello delle terminazioni GABAergiche rimuovono rapidamente il GABA dallo spazio sinaptico, attraverso un cotrasporto tra GABA, Cl^- e Na^+ . Tali trasportatori sono presenti sia a livello delle terminazione nervose sia sulle cellule gliali, che sono considerate le principali responsabili del mantenimento delle basse concentrazioni di GABA negli spazi extracellulari (Paoletti et al., 2004). I neuroni GABAergici sono distribuiti principalmente nel cervelletto (Cb), nel tronco encefalico e nelle regioni talamiche. Nel Cb, il GABA è presente ad elevate concentrazioni a livello dello strato delle cellule del Purkinje e nei nuclei profondi dove proiettano gli assoni GABAergici delle cellule del Purkinje. Elevati livelli di GABA si riscontrano anche nelle cellule a canestro e stellate, con cui le cellule del Purkinje contraggono collegamenti sinaptici, e nelle cellule del Golgi di tipo II che sono in contatto sinaptico con i dendriti delle cellule dei granuli. La presenza di GABA è stata anche riscontrata nei bulbi olfattivi, nell'eminenza mediana e nelle regioni ipotalamiche del ARC e del PVN (Paoletti et al., 2004).

1.15 I recettori del GABA

Nel SNC gli effetti inibitori del GABA sono mediati dall'interazione con tre distinti sottotipi recettoriali: GABA_ARs (Olsen et al., 2008), GABA_CRs e il GABA_BRs (Pirker et al., 2000; Olsen et al., 2008). L'azione inibitoria rapida del GABA, in particolare, è mediata dall'attivazione dei GABA_ARs a livello encefalico (Seighart et al., 2002; Rudolph et al., 2004) e dei GABA_CRs nella retina, mentre la componente lenta e prolungata della trasmissione GABAergica è mediata dai GABA_BRs (Bettler et al., 2006). I GABA_ARs sono recettori ionotropi, permeabili agli ioni cloro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^- ; Farrant et al., 2007; Trigo et al., 2008), quindi la loro attivazione determina l'iperpolarizzazione del neurone. Il recettore

GABA_A è un canale ionico eteropentamerico che insieme ai recettori nicotinici dell'acetilcolina, della Gly e per la 5-HT rientrano a far parte della superfamiglia dei canali ionici attivati dal ligando (Olsen et al., 2008). Tutti i recettori appartenenti a questa famiglia sono organizzati in complessi pentamerici che attraversano la membrana plasmatica con un poro centrale attraverso cui lo ione può transitare.

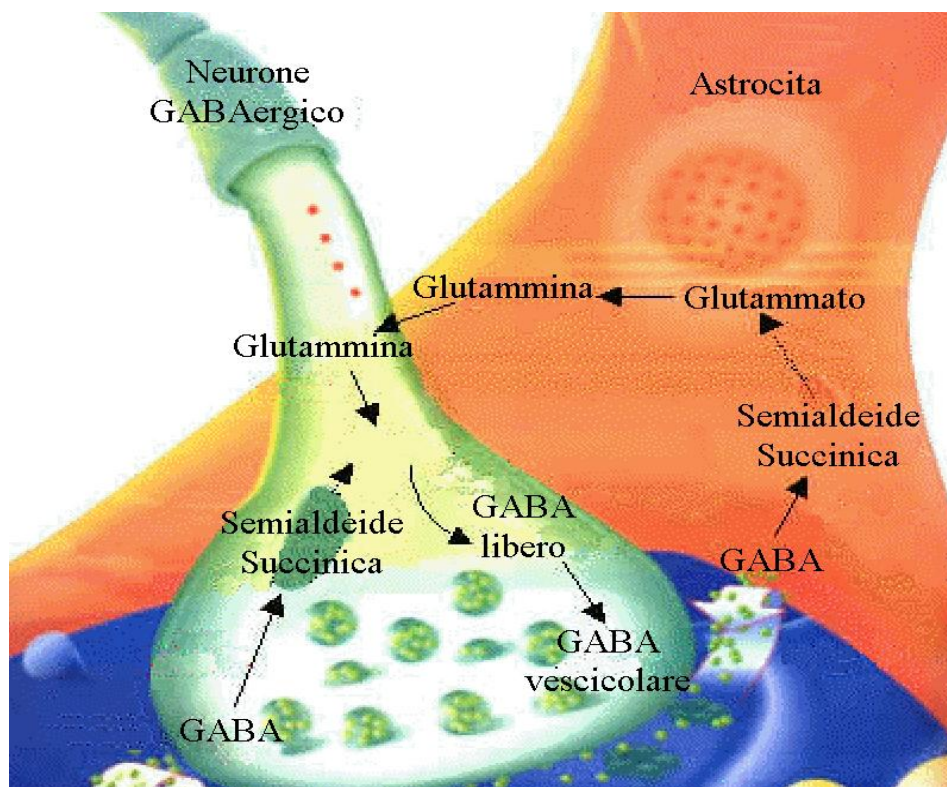


Fig. 7 Rappresentazione schematica della sintesi del GABA e legame al recettore

I GABA_BRs invece determinano l'attivazione di diversi sistemi effettori che dipendono dalla specifica proteina G cui risultano essere accoppiati. I GABA_BRs sono infatti recettori di tipo metabotropico a sette domini trans-membrana (Kittler et al., 2003), collegati a canali per il Ca²⁺ e per il potassio, attivi sia a livello presinaptico che a livello postsinaptico e sensibili positivamente al baclofen ma insensibili al muscimol ed alla bicucullina. Infine, i GABA_CRs sono recettori canale ionotropi permeabili anch'essi a ioni Cl⁻ e HCO₃⁻, attivi a livello postsinaptico e si differenziano dai GABA_ARs in quanto formati da subunità omoologomeriche (Martin et al., 2002). Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di diversi sottotipi dei recettori GABA_A, che nei mammiferi si formano dalla combinazione di 20 subunità codificate da altrettanti geni quali 1-6α, 1-4β, 1-3γ, δ, ε, π e 1-3ρ (Wafford, 2005). Ogni subunità è formata da circa 450 aa, con un grande loop N-terminale extracellulare necessario per il legame con il GABA ed altri ligandi, quattro domini transmembrana ed un grande loop

intracellulare tra i domini transmembrana 3 e 4 che contiene il sito per la fosforilazione proteica ad opera delle chinasi (Moss et al., 2001).

La maggior parte dei sottotipi recettoriali GABA_A sono composti da 2 α , 2 β e 1 γ ma l'assemblaggio delle diverse combinazioni delle subunità determina la formazione di diversi tipi di recettori GABA_A ognuno avente specifiche proprietà funzionali e farmacologiche (Korpi et al., 2002). Il successo funzionale di GABA_AR è garantito oltre che dalla presenza delle subunità α anche dalla loro colocalizzazione con le subunità β_2 e β_3 che sono abbondantemente distribuite nell'HIP e nella COR dei mammiferi (Carlisle et al., 1998). Tra le subunità α , la α_1 è quella maggiormente espressa a livello encefalico, mentre la subunità α_2 è localizzata soprattutto a livello del bulbo olfattivo, nell'HTH e nei nuclei Ce e La dell'AMY (Edenberg et al., 2004; Covault et al., 2004). Per quanto riguarda la subunità α_3 , è stato dimostrato, che è altamente espressa in aree encefaliche coinvolte negli stati d'ansia come l'AMY e il BNST (Pirker et al., 2000). La localizzazione di α_4 , in alcune aree encefaliche quali l'HTH ed il tronco encefalico è stata invece funzionalmente correlata nei Mammiferi con la modulazione del ciclo sonnoveglia ed il mantenimento degli stati di sonno profondo (Winsky-Sommerer et al., 2005), in quanto è la principale subunità GABA_Aergica extracellulare a controllo inibitorio in tali aree (Cope et al., 2005; Chandra et al., 2006). Per quanto concerne la subunità α_5 , la sua distribuzione, è completamente differente dalle altre subunità α , e infatti è maggiormente espressa nell'HIP ventrale dei ratti rispetto all'HIP dorsale (Sotiriou et al., 2005; Glykys et al., 2008), ove rappresenta la principale subunità coinvolta nell'apprendimento e nella memoria a lungo termine e di tipo associativo (Maubach, 2003; Yee et al., 2004). Il gene codificante per la subunità α_6 è prevalentemente espresso nelle cellule dei granuli cerebellari, ove un elemento di 60 kb nel promotore ne regola l'espressione (McLean et al., 2000).

La subunità β , invece, risulta essere particolarmente concentrata a livello delle aree corticali; nei gangli basali, ad esempio, vi è un'elevata concentrazione della subunità β_2 al pari della subunità β_3 . Al contrario, nei nuclei talamici solo la subunità β_2 risulta altamente concentrata, mentre le subunità β_1 e β_3 sono solo scarsamente rappresentate. Nell'HIP, le subunità β_1 e β_3 sono concentrate nei dendriti delle cellule piramidali (Sperk et al., 1997), mentre le β_2 e β_3 sono abbondanti nel Cb (Pirker et al., 2000).

La subunità δ è conosciuta per l'influenza sulla modulazione di neurosteroidi e sulla desensitizzazione (Adkins et al., 2001; Wohlfarth et al., 2002) con una localizzazione peri ed extrasinaptica (Peng et al., 2002; Wei et al., 2003) mentre la subunità ρ è espressa

principalmente nella retina e conferisce una maggiore specificità per i GABA_CRs (Bormann, 2000). Un pattern di distribuzione altamente eterogeneo è stato riscontrato anche in riferimento alle subunità γ . In particolare la subunità γ_2 risulta abbondantemente espressa a livello di bulbo olfattivo, COR, HIP, AMY, HTH, mentre livelli più bassi sono riscontrati nel talamo. La subunità γ_1 è, invece, prevalentemente localizzata nei nucleo mediale e centrale dell'AMY e nel BNST, mentre la subunità γ_3 risulta, infine, notevolmente distribuita in tutto l'encefalo. È importante però sottolineare che la maggior parte dei GABA_ARs comprende un solo tipo di subunità α e β e il sottotipo maggiormente espresso è dato dalla combinazione $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (Sperk et al., 1997).

1.16 Farmacologia del recettore GABA_A

I canali ionici attivati dal GABA sono bersaglio di numerosi farmaci clinicamente importanti che interagiscono in maniera specifica con i GABA_ARs. I recettori che contengono le subunità α_1 , α_2 , α_3 o α_5 associate alla subunità β e γ_2 sono quelli maggiormente espressi nell'encefalo. Tali recettori sono sensibili alla modulazione delle BZD. Queste sono una classe di farmaci i cui siti di legame sui GABA_ARs sono distinti dal sito per il GABA e dotati di proprietà sedative, ipnotiche, ansiolitiche, anticonvulsive e anestetiche (Mohler, 2006).

L'attivazione del sito di legame per le BZD potenzia la funzione dei GABA_ARs, facilitando l'interazione del GABA col proprio recettore e ciò si traduce in un aumento della frequenza dell'apertura del canale ionico (Ben-Ari et al., 2007). I recettori GABA_A, in particolare quelli sensibili al diazepam svolgono un ruolo molto importante per il trattamento farmacologico di alcuni processi neurofisiologici. Per quanto riguarda il ruolo svolto dal recettore GABA nell'attività ipnotica e nel sonno, è stato dimostrato che le subunità α_1 e α_2 sono quelle maggiormente coinvolte. Infatti, in topi nei quali il recettore GABA è stato reso insensibile al diazepam da una mutazione puntiforme nella subunità α_1 (H101R) viene a mancare l'effetto sedativo di tale farmaco. (Rudolph et al., 2004) ma in generale i ligandi con una maggiore affinità per la subunità α_1 sono utilizzati come ipnotici. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che lo zolpidem, una BZD sintetica, interagisce con α_1 presentando un forte potere sedativo ma un basso effetto ansiolitico (Kang- Park et al., 2004).

Per la cura degli stati d'ansia, alcuni sottotipi del recettore GABA_A sensibili alle BZD sono risultati molto importanti per i trattamenti farmacologici. La subunità α_2 di questi recettori è la prima candidata nel mediare gli effetti ansiolitici del diazepam (Low et al. 2000; Crestani et al. 2002) e infatti, in topi con mutazioni puntiformi in α_2 e non in α_3 e α_5 , l'effetto ansiolitico di tale BZD non viene osservato (McKernan et al., 2000). Studi di genetica

molecolare hanno dimostrato però che l'utilizzo del TP003, un agonista selettivo per la subunità α_3 , produce un forte effetto ansiolitico anche in topi che presentano una mutazione puntiforme in α_2 (Reynolds et al., 2003). Un'ulteriore conferma che la subunità α_2 ha un ruolo importante nel regolare gli effetti ansiolitici delle BZD è data dalla sua predominante localizzazione nell'AMY, un'area encefalica conosciuta come sito chiave sia per il controllo dell' ansia e della paura che per mediare gli effetti di questi farmaci (LeDoux, 2000).

In particolare la subunità α_2 ha un elevato livello di espressione nel Ce dell'AMY e regola gli effetti ansiolitici delle BZD; questo è dato dal fatto che ci sono delle dirette proiezioni dal Ce al nucleo tegmentale del peduncolo pontino, una regione coinvolta proprio negli stati d'ansia e depressione (Podhorna et al., 2000). Il ruolo svolto dalla subunità α_2 nel mediare l'effetto inibitorio del diazepam nell'AMY, sia nel Ce che nel nucleo BLA, è confermato da studi che dimostrano che questo segnale inibitorio è quasi completamente assente nel Ce di topi con mutazioni puntiformi all'interno di tale subunità mentre rimane inalterato nei topi con mutazioni nelle subunità α_1 e α_3 (Marowsky et al., 2004). L'interazione tra la subunità α_2 e il diazepam innesca un segnale che promuove gli effetti ansiolitici delle BZD e questo è stato, inoltre confermato da analisi comportamentali quali ad esempio l'EPM (Low et al., 2000), trattato in questo lavoro di tesi. In alcuni studi è stato ulteriormente osservato che il gene che codifica per la subunità α_2 , GABRA2, è associato alla dipendenza dell'alcol (Edenberg et al., 2004; Covault et al., 2004); infatti i disordini legati all'ansia hanno molte caratteristiche in comune con l'alcolismo e una maggiore conferma arriva anche da uno studio secondo il quale i geni associati alla dipendenza all'alcol possono anche essere coinvolti nei comportamenti ansiosi (Enoch et al., 2006).

Anche la α_3 gioca un ruolo molto importante nel mediare gli effetti ansiolitici delle BZD (Atack, 2005; Dias et al., 2005; Low et al. 2000; Rudolph et al., 2004) e questo è confermato dalla sua presenza in aree encefaliche coinvolte negli stati d'ansia come appunto l'AMY e il BNST (Pirker et al., 2000). Ulteriore supporto è dato da studi genetici che hanno dimostrato che il gene codificante la subunità α_3 è localizzato nella regione Xq28, un'area che risulta essere coinvolta nella trasmissione genetica dei disordini affettivi bipolari (Hayden et al., 2006). In alcune regioni encefaliche ci sono dei recettori GABA_A che non producono una risposta terapeutica in seguito al legame con il diazepam, flunitrazepam e zolpidem anche se i livelli di espressione di tali recettori risultano essere più bassi. Sono caratterizzati dalla presenza delle subunità α_4 e α_6 frequentemente assemblate con la subunità γ , e si trovano maggiormente espressi nel talamo e nel giro dentato (Pirker et al., 2000). Il recettore GABA oltre a legare le BZD, possiede anche altri siti con i quali può interagire con i barbiturici, gli

steroidi e l'etanolo (Fig. 8). Il sito di legame per i barbiturici e per il loro antagonista (picrotossina) ed il sito di legame per alcuni derivati organo-fosforici come il t-butilbiciclofosforotionato (TBPS), anch'esso ad azione antagonista, si trovano all'interno del canale del Cl⁻. I barbiturici sono agonisti GABAergici che interagiscono specificatamente con GABA_AR, determinando l'aumento del passaggio di ioni Cl⁻ e provocando la depressione dell'attività neuronale (Szabadi, 2006).

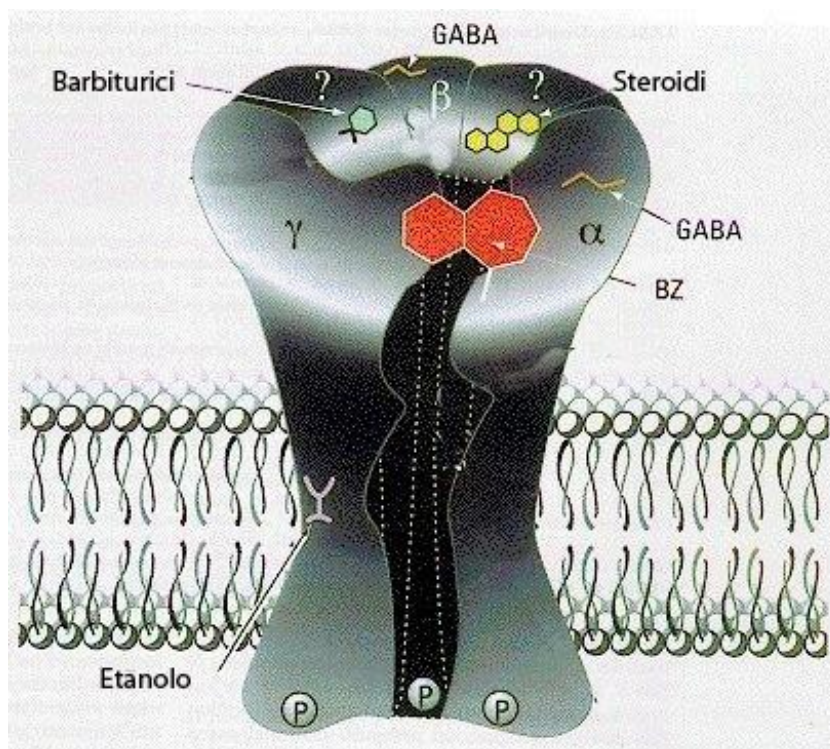


Fig. 8 Rappresentazione schematica del recettore GABA_A cui sono visibili i siti di legame per il GABA e per gli agonisti e/o antagonisti.

La loro somministrazione ad elevati dosaggi si traduce in un'attivazione funzionale di sinapsi GABAergiche centrali con depressione generalizzata, dose-dipendente, del SNC e successivo blocco dei centri respiratori fino alla morte. Al contrario, le BZD hanno effetti autolimitanti nel SNC, poichè se la sinapsi è inibita al punto di non liberare il GABA, l'effetto delle BZD scompare (Szabadi, 2006). Gli steroidi sembrano possedere dei siti di legame specifici a livello dei GABA_ARs ed inducono effetti simili alle BZD, facilitando la trasmissione GABAergica e aumentando la frequenza e la durata di apertura del canale per il Cl⁻ (Follesa et al., 2006). Il meccanismo d'azione molecolare dipende dalla concentrazione dello steroide, poichè basse concentrazioni potenziano l'attività del canale mediata da una facilitazione allosterica dell'azione del GABA, mentre alte concentrazioni sono capaci di attivare direttamente il canale in maniera analoga ai siti barbiturici. I siti di legame per il

GABA, le BZD, i barbiturici e gli steroidi, pur essendo entità strutturali ben distinte, presentano un legame funzionale, giacchè l'attivazione e l'inibizione di uno di questi siti da parte di agonisti o antagonisti determina una variazione nella capacità degli altri siti ad interagire con i propri ligandi specifici. Ciò può tradursi in una modulazione positiva (facilitazione) o negativa (inibizione) della funzione dell'attività del recettore-canale (Paoletti et al., 2004).

1.17 Interazione tra il sistema ORXergico ed il sistema GABAergico

Numerosi studi mettono in evidenza come il cross-talking tra i neuropeptidi ed i neurotrasmettitori classici possa essere coinvolto nella regolazione di aspetti comportamentali. E' stato dimostrato infatti che diversi sistemi peptidici, come quello ORXergico, modulano processi quali il ciclo sonno-veglia, il feeding e gli stati d'ansia e stress mediante l'interazione con il sistema GABAergico (Henny et al., 2006)

Per quanto riguarda il ciclo sonno-veglia è noto che il rilascio di istamina da parte del TMN induce il mantenimento di uno stato di veglia attiva e, sempre in quest'area, i neuroni istaminergici sono innervati da neuroni GABAergici i cui corpi cellulari sono localizzati nel nucleo preottico ventromediale. Questi neuroni inibiscono quelli istaminergici grazie all'attivazione dei GABA_ARs favorendo così il sonno (Eriksson et al., 2004). I neuroni istaminergici sono ampiamente innervati anche da quelli ORXergici i quali coesprimono, oltre alle ORXs, anche la dinorfina (Chou et al., 2003) che risulta essere implicata nella regolazione dei meccanismi alla base del sonno e della veglia. Quest'ultima, attraverso la sua azione sul TMN, agisce in sinergia alle ORXs nel promuovere uno stato di veglia attiva. In questo modo mentre le ORXs attivano i neuroni istaminergici, la dinorfina inibisce il rilascio di GABA nel TMN (Eriksson et al., 2004). Un'interazione funzionale tra il sistema GABAergico ed ORXergico è stata evidenziata anche nella PFC (Song et al., 2006), un'area cerebrale importante anch'essa nella regolazione del ciclo sonno-veglia (Yamasaki et al., 2002; Lambe et al., 2003) ed in diverse funzioni cognitive, come l'attenzione e la memoria.

In tale area la somministrazione di ORX-A induce, in modo dose-dipendente, un aumento dell'eccitabilità dei neuroni GABAergici ed ORXergici presenti in questa regione. Difatto, il GABA provoca uno stato di iperpolarizzazione inattivando i neuroni presenti nella PFC, al contrario l'ORX-A sugli stessi neuroni ha la capacità di stimolarne l'attivazione. È stato notato che, anche in presenza di GABA, l'ORX-A riesce ad attivare i neuroni piramidali della PFC, suggerendo che l'inibizione GABAergica possa essere parzialmente bloccata dall'azione della stessa ORX-A. I neuroni GABAergici nella PFC risultano attivi durante il sonno,

bloccando l'attività dei neuroni piramidali in tale regione, mentre, durante la fase di transizione tra sonno e veglia, l'aumento della concentrazione di ORX-A porta all'inibizione dei neuroni GABAergici e quindi all'attivazione di quelli piramidali nella PFC, stimolando in questo modo lo stato di veglia (Song et al., 2006).

Studi condotti sul ratto hanno evidenziato che l'azione del GABA modula l'attività dei neuroni ORXergici anche nell'PFA regolando il ritmo sonno-veglia (Alam et al., 2005). Nell'PFA e nell'LHA il GABA rilasciato si lega ai GABA_ARs espressi sia sui neuroni ORXergici sia sui neuroni esprimenti l'ormone concentrante la melanina, inducendo un'inibizione attraverso l'iperpolarizzazione della membrana cellulare. L'inattivazione dei neuroni ORXergici nell'area ipotalamica laterale e nell'PFA da parte del GABA porta ad una diminuzione della durata della veglia e ad un aumento del tempo trascorso negli stati di sonno REM (Alam et al., 2005). I neuroni ORXergici sono influenzati anche dai neuroni GABAergici localizzati a livello del BF i quali inviano dense proiezioni agli stessi neuroni ORXergici (Henny et al., 2006). Il BF è una regione encefalica importante nella regolazione del ciclo sonno-veglia in cui sono presenti soprattutto neuroni colinergici; quest'area contiene inoltre neuroni Gluergici e GABAergici (Jones et al., 2005) che innervano densamente i neuroni ORXergici dell'PFA.

Quando è necessario mantenere uno stato di veglia attiva si ha un aumento dell'attività dei neuroni Gluergici che attivano a loro volta i neuroni ORXergici, mentre quando si entra in uno stato di sonno, i neuroni GABAergici del BF tendono ad inibire i neuroni ORXergici, i quali a loro volta riducono la loro frequenza di scarica e l'espressione di *fos* che si traduce in una promozione del sonno (Henny et al., 2006). Ulteriori studi hanno dimostrato il coinvolgimento del recettore GABA_B nel ciclo sonno-veglia; infatti somministrazioni di baclofen, un antagonista del GABA_B, prolunga la fase di sonno riducendo quella di veglia. Questi effetti risultano essere alterati in topi che presentano la delezione del gene GABA_{B1} nei neuroni ORXergici; l'assenza del recettore GABA_B provoca una diminuzione nella sensibilità delle cellule ORXergiche sia agli input eccitatori che agli input inibitori a causa dell'inibizione mediata dal recettore GABA_A il quale aumenta a sua volta la conduttanza della membrana e lo shunt della corrente postsinaptica in questi neuroni (Matsuki et al., 2008).

Cross-talking tra il sistema ORXergico e GABAergico è stato osservato, come detto in precedenza, anche nel controllo del feeding behavior. Uno dei principali ruoli svolti dall'ORX-A è quello di indurre iperfagia; infatti in seguito a somministrazione di ORX-A, è stato osservato un aumento del food- intake dopo solo un'ora. L'aumento dell'assunzione di cibo indotto dall' ORX-A è mediato da agenti GABAergici come il muscimol e il diazepam

(Soderpalm et al., 2000). L'ORX inoltre favorisce un aumento del rilascio di GABA all'interno del ARC (Liu et al., 2002) e questo effetto è up-regolato dal digiuno (Lu et al., 2000). Le cellule GABAergiche del ARC rappresentano i maggiori target per le ORXs e il coinvolgimento di tale area encefalica nel feeding ORX-indotto è suggerito dalla densa innervazione ORXergica in questa regione. Le ORXs rilasciate in questo nucleo interagendo con i recettori ORXergici, inducono l'attivazione di una pompa di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con conseguente depolarizzazione della membrana cellulare e incremento della frequenza di scarica da parte dei neuroni GABAergici (Burdakov et al., 2003).

Tale attivazione porta ad un aumento della concentrazione extracellulare di GABA che rimane elevata per tutto il tempo di azione delle ORXs. Il GABA così rilasciato, promuove gli effetti delle ORXs sul food-intake agendo sui GABA_A Rs presenti sui neuroni del ARC, uno dei principali siti per la regolazione del *feeding*. E' stato anche dimostrato che microiniezioni di agonisti e antagonisti del GABA, nel ARC, stimolano e inibiscono rispettivamente il feeding (Burdakov et al., 2003), e alcuni neuroni GABAergici possono coesprimere altri messaggeri stimolanti l'appetito come ad esempio il NPY che è conosciuto come mediatore dell'effetto iperfagico della ORX (Yamanaka et al., 2000). L'ORX-A, inoltre, influenza l'assunzione di cibo mediante una diminuzione del tono GABAergico all'interno dell'area ipotalamica rostro laterale (Thorpe et al., 2006). Tale ipotesi è supportata dalle osservazioni che la somministrazione di GABA, in quest'area, riduce l'assunzione di cibo, mentre la somministrazione di bicucullina nella stessa regione encefalica l'aumenta (Thorpe et al., 2003).

E' importante sottolineare inoltre che variazioni nel sistema ORXergico e GABAergico o nella loro interazione possono provocare gravi condizioni patologiche. Come detto in precedenza, la regolazione del ciclo sonno veglia è senza dubbio controllata dal sistema ORXergico (Sutcliff et al., 2000; Kilduff et al., 2000) e dunque un non corretto funzionamento di tale sistema porta all'insorgenza di alcune patologie quali la narcolessia sia nell'uomo che in altri mammiferi. La narcolessia è un disordine del sonno e il principale sintomo è una eccessiva sonnolenza che si manifesta con attacchi di sonno durante il giorno, forte riduzione del sonno REM e il sonno notturno è disturbato da allucinazioni ipnagogiche, sogni e paralisi del sonno (Zeitler et al., 2003). La causa di questo disordine è stata per molto tempo sconosciuta finchè non si è arrivati alla scoperta delle ORXs; infatti da studi *post-mortem* in soggetti con narcolessia è stato rilevato una riduzione del numero di neuroni che contengono mRNA di PPROX nell'HTH (Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000) e una diminuzione dei livelli di ORX-A nel fluido cerebro spinale (Zeitler et al., 2003). I pazienti

affetti da narcolessia spesso manifestano anche cataplessia, la quale, è caratterizzata da un improvviso indebolimento del tono muscolare che può provocare una caduta, impossibilità di muoversi e di parlare fino ad un completo collasso dei muscoli posturali innescato da stimoli emozionali. I sintomi della narcolessia si possono suddividere in due fenomeni patologici; nel primo caso non si riesce a mantenere un lungo periodo di veglia caratterizzato da una improvvisa transizione al sonno non-REM. Questo sintomo clinicamente si manifesta con un'eccessiva sonnolenza e attacchi di sonno e la terapia oggi disponibile si avvale di farmaci psicostimolanti come le anfetamine, modafinil e caffeina. Nel secondo fenomeno patologico invece si ha un'intrusione del sonno REM nella fase di veglia e si manifesta con cataplessia, allucinazioni e paralisi del sonno. In questo caso la terapia consiste di antidepressivi triciclici come l'imipramina e di inibitori selettivi per la serotonina (SSRI; Zeitzer et al., 2003).

Per quanto riguarda invece il GABA, la più comune condizione patologica in cui è coinvolto è l'epilessia anche se è stato ampiamente dimostrato che alterazioni delle funzioni GABAergiche sono legate ad altri disordini neurologici quali l'ansia, schizofrenia e l'autismo. L'epilessia è un termine generico per indicare una sindrome multipla con distinti sintomi, eziologia, prognosi e trattamento. Il ruolo dei recettori GABA_A nella fisiopatologia dell'epilessia è stato studiato sperimentalmente in due principali malattie quali absence epilessia e epilessia del lobo temporale (TLE) (Noebels, 2003).

Una serie di recenti studi hanno focalizzato l'attenzione sulla identificazione di mutazioni a carico dei geni che codificano per le subunità del recettore GABA_A considerandole causa di questa patologia. Alterazioni dell'espressione e composizione delle subunità del recettore GABA_A nell'epilessia sono state ben documentate sia nell'uomo che in altri mammiferi (Loup et al., 2006). Alcuni studi hanno infatti dimostrato un ruolo importante dei recettori extrasinaptici GABA_A nel modificare la funzione inibitoria che potrebbe essere responsabile dell'insorgenza di questa patologia. Infatti nei topi affetti da TLE, è stata osservata una forte riduzione della subunità γ correlata con una redistribuzione della subunità γ_2 dai siti sinaptici a quelli perisinaptici dove è assemblata con la subunità α_4 che invece è normalmente associata con la subunità δ (Zhang et al., 2007). Inoltre, molti autori affermano che il decremento dell'azione inibitoria modulata dal sistema GABAergico sui neuroni ippocampali è un altro fattore fondamentale predisponente per l'epileptogenesi nell'uomo. Esperimenti neurochimici e farmacologici confermano, infatti, che l'attivazione della neurotrasmissione GABAergica tende in genere a bloccare le crisi convulsive, mentre la disinibizione di tale sistema per difetto di sintesi, di liberazione neurotrasmettitoriale o modificazione recettoriale a carico di distinte subunità quali $\beta_{2/3}$ promuove stati epilettici (Sperk et al., 2004; Goodkin et al., 2008).

L'identificazione di proteine coinvolte nell'epileptogenesi e nella modulazione dell'attività epilettica, quali il fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF; Koyama et al., 2005) ed alcuni neuropeptidi come la galanina (GAL) ed NPY (Capovilla et al., 2001), hanno ampliato l'utilizzo di targets molecolari per l'azione di farmaci antiepilettici. Questi fattori svolgono un ruolo fondamentale nell'epileptogenesi, come dimostrato dalle considerevoli *up-regulations* sia del BDNF che del suo recettore a livello dei neuroni GABAergici in presenza di tale patologia. In generale, il funzionamento di GABA_AR dipende dalla composizione delle sue subunità e può essere differentemente modulato dalla fosforilazione di residui chiave, in seguito all'attività della proteina chinasi A e della proteina chinasi C che può presentarsi alterata in condizioni patologiche (Kittler et al., 2003). A sua volta, il grado di fosforilazione può essere modulato da attività fosfatase, cosicché il sistema fosforilazione/defosforilazione è funzionalmente rilevante e lo sbilanciamento di tale processo, in seguito a variazioni nell'attività di BDNF, può alterare il livello di fosforilazione dei GABA_ARs e di conseguenza la loro funzione (Jovanovic et al., 2004; He et al., 2004).

Disfunzioni nella trasmissione GABAergica nell'HTH dell'uomo inducono disordini comportamentali e simil-depressivi associati all'instaurarsi di stati di panico (Goddard et al., 2001). Diversi centri regolatori limbici ed autonomi si pensa siano implicati nella fisiopatologia dei disordini da panico e nella sensibilità al lattato (Gorman et al., 2000, Shekhar et al., 2000). Ad esempio, il blocco della trasmissione GABA_Aergica nell'HTH dorso-mediale del ratto, considerato uno dei maggiori siti di coordinamento delle risposte neuroendocrine, autonome e comportamentali (Di Micco et al., 2002; Chou et al., 2003), provoca risposte panico-simili quali l'aumento del ritmo circadiano, del ritmo respiratorio, della pressione arteriosa e degli stati d'ansia. In tali condizioni il trattamento cronico con L-alliglicina (L-AG), inibitore della sintesi di GABA, promuove risposte fisiologiche alterate dopo l'iniezione di lattato, simili a quelle di pazienti affetti da disordini da panico (Shekhar et al., 2000).

La risposta ansiogenica è, dunque, una diretta conseguenza del bloccaggio cronico della sintesi di GABA nell'HTH dorso-mediale, cui consegue l'attivazione dei recettori Gluergici NMDA post-sinaptici. Attualmente alcune BZD, quali il Lexotan ed il Valium, sono i farmaci più utilizzati per ridurre gli stati di ansia patologici e la loro azione determina un potenziamento dell'affinità del GABA con il suo recettore (Endo et al., 2007). È chiaro quindi che il controllo e la regolazione dei meccanismi che sono alla base dei sistemi ORXergici e GABAergici, risulta essere importante per comprendere una varietà di disordini neurologici e riuscire a individuare dei trattamenti farmacologici per l'uomo.

1.18 Sistema Gluergico

Negli organismi più evoluti il SN regola svariate funzioni complesse mediante lo sviluppo e la costante maturazione delle connessioni sinaptiche tra i neuroni. Il sistema Gluergico ha un ruolo importante nella comunicazione e sopravvivenza neuronale, nel rifinire le connessioni sinaptiche durante lo sviluppo dell'encefalo e nella capacità plastica del SN. Il Glu è uno dei 20 amminoacidi utilizzati per la sintesi delle proteine, il cui nome iupac è acido 2(S)-ammino-1,5-pentandioico, ma è conosciuto anche con il nome di L-glutammico o acido L- α -amminoglutarico. Esso è il principale neurotrasmettitore ad azione eccitatoria dell'encefalo (Balazs et al., 2006) e in più rappresenta il precursore per la sintesi del neurotrasmettitore GABA.

Il Glu è distribuito uniformemente in tutte le regioni dell'encefalo e, poiché la membrana emato-liquorale è quasi impermeabile ad esso, viene sintetizzato nel tessuto nervoso attraverso due vie (Clementi e Fumagalli, 2004) (Fig. 9):

- 1) dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs si forma α -ketoglutarato che può ricevere un gruppo amminico per formare il Glu.
- 2) Desamidazione della glutammina (Gln) che si forma nella glia per poi passare nelle terminazioni presinaptiche, dove viene metabolizzata in Glu e ammonio ad opera dell'enzima mitocondriale glutamminasi. Dopo il suo immagazzinamento e la sua liberazione, il Glu viene rimosso dalla fessura sinaptica ad opera di trasportatori ad alta affinità presenti sia nelle cellule della glia sia nelle terminazioni presinaptiche. Questa via di sintesi è detta Glu-Gln.
- 3) dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs si forma α -ketoglutarato che può ricevere un gruppo amminico per formare il Glu.
- 4) Desamidazione della Gln che si forma nella glia per poi passare nelle terminazioni presinaptiche, dove viene metabolizzata in Glu e ammonio ad opera dell'enzima mitocondriale glutamminasi. Dopo il suo immagazzinamento e la sua liberazione, il Glu viene rimosso dalla fessura sinaptica ad opera di trasportatori ad alta affinità presenti sia nelle cellule della glia sia nelle terminazioni presinaptiche. Questa via di sintesi è detta Glu-Gln.

Tecniche di biologia molecolare hanno permesso di identificare cinque cDNA che codificano per proteine capaci di trasportare il Glu dall'esterno all'interno della cellula. Il Glu, dopo essere stato trasportato all'interno dei neuroni, può essere immagazzinato nelle vescicole sinaptiche dove raggiunge concentrazioni elevate e ciò dipende da un trasportatore presente a livello della membrana delle vescicole sinaptiche, inoltre, all'interno della vescicola, il neurotrasmettitore eccitatorio è trattenuto dalla differenza di potenziale e dalla differenza di pH fra i due lati della membrana vescicolare.

1.19 recettori del Glu

I recettori neuronali, ossia proteine situate sulla membrana plasmatica pre-e/o post-sinaptica, sono divisi in due grandi famiglie, di cui la prima comprende i recettori ionotropi che sono specifici per l'NMDA detti NMDAR, per l'AMPA chiamati AMPAR e per il Kainato KARs ossia acido cainico, e sono legati direttamente a canali ionici. La seconda famiglia di recettori è rappresentata dai recettori metabotropi mGluRs, denominati così poiché il movimento degli ioni attraverso un canale dipende da uno o più tappe metaboliche.

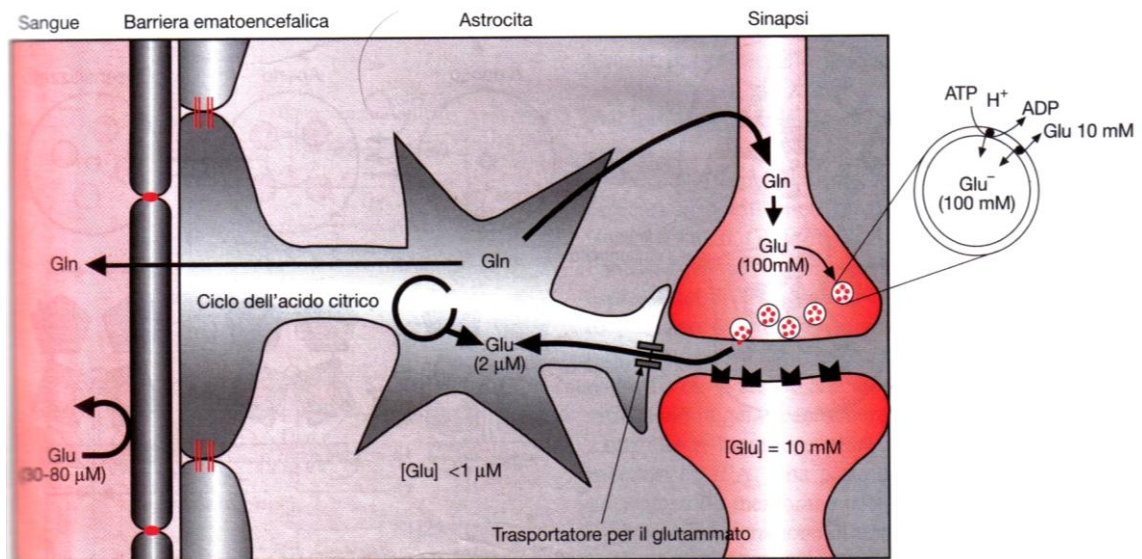


Fig. 9 Compartimentazione del Glu cerebrale. Il Glu neosintetizzato dalla Gln si accumula nelle vescicole sinaptiche ad opera di un trasportatore che sfrutta come fonte energetica il gradiente protonico tra il citoplasma e l'interno della vescicola. Parte del Glu liberato durante l'attività sinaptica è ricaptato da cellule gliali all'interno delle quali si riforma Gln. In questo modo le cellule gliali controllano la concentrazione del neurotrasmettitore eccitatorio nello spazio sinaptico e possono intervenire in modo consistente nella regolazione della funzionalità sinaptica. La Gln può essere riciclata nel pool trasmettitoriale di Glu o essere trasportata fuori dal sistema nervoso centrale attraverso la barriera ematoliquorale. Questo processo permette di eliminare un eventuale eccesso di ammonio cerebrale altrimenti dannoso. Le cellule gliali svolgono un ruolo chiave anche nel mantenimento della concentrazione di Glu nel liquido cefalo rachidiano e negli spazi extracellulari del SNC. Solo in condizioni patologiche queste concentrazioni aumentano fino a divenire eccitotossiche.

I recettori ionotropi sono complessi polimerici costituiti da quattro subunità che formano un canale ionico che si apre in seguito all'interazione con il Glu permettendo così l'ingresso di ioni all'interno della membrana (Fig. 10). Ogni subunità è costituita da un dominio amminico terminale (NTD), due domini S1 e S2 che costituiscono il sito di legame con il Glu, 4 domini lipofilici 3 dei quali attraversano completamente la membrana plasmatica (M1, M3 e M4) e uno ad ansa (M2), infine, si osserva una parte carbossilica terminale contenente siti di fosforilazione.

I recettori NMDA, associati a canali del Ca^{2+} , sono molto simili ai recettori AMPA poiché sono strutture multimolecolari prevalentemente localizzate in sede post-sinaptica. Sono recettori ionotropici che lasciano fluire ioni Na^+ e Ca^{2+} all'interno del neurone e ioni K^+ al suo esterno. Sono costituiti dalla subunità NR1 e da almeno una delle subunità NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A o NR3B, subunità queste che possono contenere un residuo di asparagina nel sito Q/R del territorio M2, importante nel conferire alla membrana un'elevata permeabilità al Ca^{2+} e impermeabilità al Mg^{2+} . Affinché i recettori dell'NMDA possano essere attivati è necessario che siano presenti Glu e Gly e che la membrana sia almeno parzialmente depolarizzata in maniera tale da allontanare lo ione Mg^{2+} .

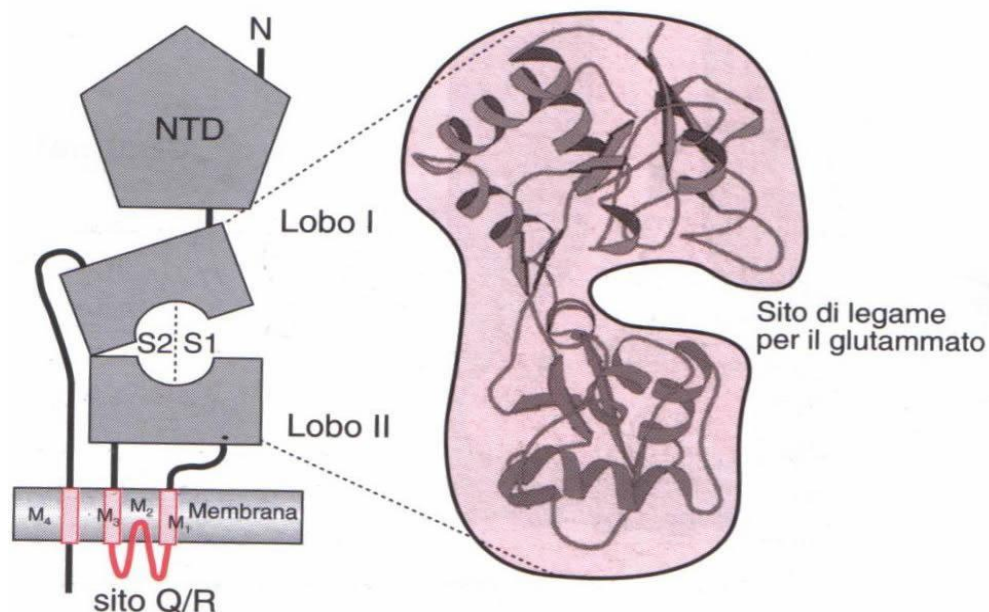


Fig. 10 Struttura, organizzazione e funzione molecolare dei recettori ionotropici per il Glu. Struttura di base di ogni subunità: la porzione N-terminale è extracellulare (NTD) ed è seguita da un'emidominio S1 e da tre porzioni idrofobe, due delle quali attraversano completamente la molecola proteica, mentre la seconda forma un'ansa nella membrana. La proteina è poi costituita dall'emidominio S2, da un'ultima porzione idrofoba che attraversa completamente la membrana e da una porzione C-terminale citoplasmatica contenente varie zone capaci di legare le proteine della densità post-sinaptica. Gli emidomini S1 ed S2 hanno una struttura analoga a quella delle proteine batteriche periplasmatiche capaci di legare la Gln. All'interno di questi emidomini si trova il sito di riconoscimento per il Glu e per le altre molecole agoniste.

Il recettore NMDA è un recettore ionotropico finemente regolabile che presenta vari siti di legame con i rispettivi composti, ossia inibitori, antagonisti e agonisti, che si suddividono in quattro categorie.

- Sito attivo e siti per agonisti: a questi siti si può legare il neurotrasmettitore primario (acido glutammico) e altri agonisti quali Gly, NMDA e poliamine. Sono presenti anche siti di legami per protoni, che stimolano positivamente l'azione del recettore.
- Siti per inibitori e antagonisti: in questi siti possono legarsi vari inibitori, come Mg^{2+} e Zn^{2+} , o antagonisti del Glu che legandosi generano modifiche nella struttura della proteina recettoriale tali da impedire il legame col neurotrasmettitore.
- Sito fosforilabile, si trova sul versante endoplasmatico ed interagisce con PKC. Questo sito è responsabile dell'interazione tra recettori ionotropici e metabotropici.

I recettori AMPA sono localizzati nella membrana post-sinaptica e sono responsabili della risposta eccitatoria rapida tipica delle sinapsi Gluergiche. Sono composti da quattro subunità recettoriali denominate GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 che formano un poro centrale che permette il passaggio di Na^+ e K^+ e a volte di piccole quantità di Ca^{2+} . La subunità GluR2 è la più diffusa e presenta un'arginina nel sito Q/R dell'ansa del secondo dominio idrofobico, che permette così al recettore AMPA di risultare impermeabile agli ioni Ca^{2+} . Nel gene che codifica per GluR2, inoltre, troviamo il codone per la Gln localizzato sul sito Q/R. L'attivazione degli AMPAR determina l'ingresso intracellulare di ioni Na^+ dal compartimento extracellulare e ciò causa una depolarizzazione della membrana. Alcune sinapsi Gluergiche presentano AMPAR o solo NMDAR, mentre la maggior parte delle sinapsi ha sia recettori per l'NMDA che per l'AMPA (Purves, 2004).

L'ultimo tipo di recettori Gluergici ionotropici sono i KARs, i quali possono essere costituiti da cinque complessi proteici: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. La subunità KA2 è in grado di assemblarsi in canali ionici eteromerici funzionali sia con GluR6 che con GluR5, formando recettori con proprietà elettrofisiologiche differenti (Swanson et al., 2002). Diversi studi hanno evidenziato la presenza di GluR5 a livello dell'HTH in modo specifico a livello del nucleo sopraottico (SNO), PVN, Arc e SCN (Eyigor et al., 2001). La distribuzione di questi recettori dipende dall'equilibrio tra processi di inserzione, rimozione e diffusione laterale degli stessi recettori, che sono fenomeni regolati dall'attività neuronale (Lerma., 2003). Negli ultimi anni è stata dimostrata anche una localizzazione di questi KARs sia pre- che post-sinaptica (Jaskolski et al., 2005). I KARs possono interagire con gli AMPA causando una depolarizzazione prolungata, parziale e non desensibilizzante che provoca un'alterazione dell'omeostasi cellulare (Clemente e Fumagalli., 2004).

I recettori metabotropi sono, invece, associati a proteine G (Coutinho and Knopfel, 2002), presentano una regione extracellulare che lega il neurotrasmettitore e una regione che

attraversa la membrana e forma un canale. Questi recettori vengono stimolati dall'acido 1-aminociclopentan-1,3-dicarbossilico (1S,3R-ACPD) e di essi ne sono stati identificati otto tipi tra cui mGluR1 e mGluR5 accoppiati a proteine G_q coinvolti nell'attivazione del ciclo degli inositoli, mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 accoppiati a proteine G_i e responsabili dell'inibizione dell'adenilato ciclasi. Questi recettori sono costituiti da un lungo dominio N-terminale formato da due porzioni globulari dette LB1 e LB2 che possiedono il sito di riconoscimento del Glu da una regione ricca di cisteina, da sette domini idrofobi che attraversano la membrana (M1-M7) e da un dominio carbossilico terminale (Fig. 11). I recettori metabotropi sono localizzati in maniera differenziale in tutto il SNC e possono avere effetti eccitatori e inibitori (come per esempio mGluR1 che nel cervelletto attiva i canali del K⁺ dipendenti dal Ca²⁺, mentre a livello ippocampale aumenta l'eccitabilità neuronale inibendo i medesimi canali). E' stato inoltre dimostrato che alcuni mGluR sono localizzati a livello presinaptico e sono in grado di regolare la liberazione del trasmettitore. Un esempio di questi recettori sono mGluR4 e mGluR7 che vanno a ridurre l'ingresso di Ca²⁺ nei terminali nervosi, riducendo così la liberazione sinaptica del trasmettitore (Clemente e Fumagalli, 2004).

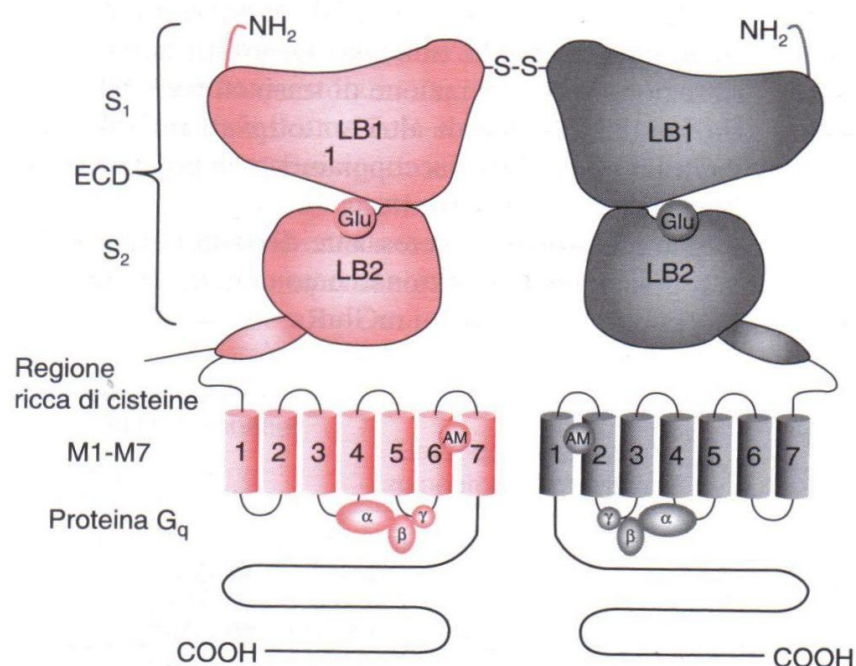


Fig. 11 Struttura e classificazione dei recettori metabotropi del Glu. Tutti i mGluRs hanno un largo dominio N-terminale extracellulare (ECD) che avrebbe nelle zone S₁ e S₂ una struttura analoga a quella delle proteine batteriche periplasmatiche. Nel largo dominio amminico extra cellulare sono localizzate due zone globulari che determinano il tipo di legame con il Glu (LB1 e LB2). E' poi presente una regione ricca di cisteine che connette la parte extracellulare con i sette domini

transmembrana della proteina. Nelle anse intracellulari sono presenti siti di integrazione con le diverse proteine G e nella regione TM6 e PM7 è presente un sito capace di riconoscere i modulatori (AM).

1.20 Funzioni mediate dal sistema Gluergico

Il sistema Gluergico interviene nella comunicazione e sopravvivenza dei neuroni, nel rifinire le connessioni sinaptiche durante lo sviluppo dell'encefalo, nella capacità plastica del SN e infine nel comportamento alimentare. In particolare gli AMPARs e i KARs hanno un ruolo chiave nel mantenimento del potenziale negativo di membrana e mediano la trasmissione sinaptica della stessa a riposo, a differenza degli NMDAR, i quali intervengono nella regolazione del flusso di Ca^{2+} e di conseguenza nell'innescamento del PA (Lopez de Armentia et al., 2003). Questi recettori sono inattivi quando la membrana plasmatica è a riposo, ma hanno un ruolo importante nei fenomeni di plasticità neuronale (Lopez de Armentia et al., 2003), in particolare durante i repentini cambiamenti nell'efficienza della trasmissione sinaptica neuronale sia dal punto di vista funzionale (cambiamenti nei recettori sinaptici, nelle molecole segnale) che strutturale (cambiamenti nel numero di connessione sinaptiche).

Alcuni ricercatori ritenevano che tali recettori per il Glu fossero espressi nel ratto durante il periodo embrionale e che durante lo sviluppo post-sinaptico questi fossero soggetti a cambiamenti molecolari, ad esempio una up-regolazione degli NMDAR durante i primi giorni post-natali potrebbe riorganizzare l'associazione delle subunità recettoriali alterando i processi che sono alla base della comunicazione interneuronale e del corretto sviluppo cerebrale causando anomalie funzionali. Altra importante caratteristica dei recettori Gluergici è quella di intervenire nell'organizzazione morfogenica di alcuni neuroni, infatti, è stato dimostrato che, bloccando gli NMDAR nelle cellule cerebellari ne viene inibita la crescita. Gli NMDAR sono importanti anche nella formazione delle sinapsi mediante la migrazione dei neuroni nelle fasi precoci dello sviluppo (Bear et al., 2007). Altri esperimenti, hanno invece messo in evidenza, l'importanza del Glu nella regolazione del comportamento alimentare, mediante iniezioni i.c.v. in topi, di agonisti e antagonisti di specifiche subunità recettoriali eccitatorie (Da Silva et al., 2003).

In modo particolare è emerso che la somministrazione di agonisti Gluergici nell'LH di ratto provoca una ridotta assunzione di cibo, mentre, la somministrazione di antagonisti dell'NMDAR provoca un aumento nel food intake. Il blocco degli AMPAR nel nucleo accumbens (Acb), causa invece una riduzione del feeding (Saulskaya and Mikhailova, 2002), dovuta ad una diminuzione di Glu nell'LH e un aumento nell'Acb, evidenziando così una connessione tra queste due regioni encefaliche.

1.21 Interazioni tra il sistema ORXergico ed il sistema Gluergico

Diversi studi condotti in laboratorio hanno evidenziato che entrambi i neuropeptidi ORX-A e ORX-B vengono sintetizzati da neuroni presenti nell'area subtalamica, in modo particolare nell'LH/PFA (Nixon and Smale, 2007), ossia una regione coinvolta nel controllo del comportamento alimentare, dimostrando così un loro coinvolgimento nella regolazione del feeding (Shiraishi et al., 2000) attraverso la stimolazione del risveglio e della locomozione (Sutcliffe and de Lecea, 2000; Muroya et al., 2004). In particolare, l'ORX-A somministrata direttamente nell'LH/PFA (Thorpe et al., 2003), sembrerebbe essere maggiormente coinvolta nei fenomeni di food-intake rispetto all'ORX-B. Queste diverse attività, però, possono anche essere ridotte mediante incremento di glucosio (Burdakov and Alexopoulos, 2005; Shiraishi et al., 2000) e di leptina, suggerendo così che lo stato metabolico dell'animale influenza le vie ORXergiche. I neuroni presenti nel LH/PFA sono in diretto contatto con il neuropeptide NPY (Kageyama et al., 2006; Toshinai et al., 2003), e l'ORX esogena è attivata dai neuroni NPY nell'ARC (Muroya et al., 2004; Van den Top et al., 2004), inoltre, la somministrazione di NPY, o l'applicazione esogena di grelina o galanina incrementano l'immunoreattività nei neuroni positivi all'ORX (Niimi et al., 2001). È stato inoltre dimostrato che le ORXs aumentano l'attività Gluergica in parecchie aree cerebrali come ad esempio l'LH/PFA (Gao and van den Pole, 2001; Li et al., 2002) innervate da fibre neuronali ORXergiche. Sia le ORXs che il Glu sono localizzati nelle fibre del PVN (Torrealba et al., 2003) e dell'HTH (Rosin et al., 2003) e l'azione post-sinaptica del primo, nella stimolazione delle cellule piramidali presenti nella PFC, è facilitata proprio dall'interazione sinergica con il Glu (Song et al., 2006). Il rilascio di Glu aumenta in risposta alla somministrazione sistemica di ORX-A sia nel LC (Kodama and Kimura, 2002) che nell'AMY (John et al., 2003). Da studi condotti è quindi emerso che l'ORX somministrata nell'LH/PFA stimola un notevole aumento del feeding e dell'attività sinaptica (Thorpe et al., 2003), mediante l'interazione con i circuiti Gluergici. È stato possibile dimostrare tutto ciò mediante due esperimenti condotti in laboratorio dove nel primo, i ratti sono stati privati del cibo fino a due ore dopo la somministrazione di ORX-A ed il risultato di ciò è stato un aumento molto evidente del feeding rispetto ai controlli. Il desiderio continuo di cibo potrebbe essere stato mediato in parte dall'aumento del rilascio di Glu, mentre l'incremento di GABA nell'ipotalamo ventromediale (VMH) risultava elevato fin quando i ratti avevano la possibilità di mangiare. Da questo primo esperimento è emerso che l'attivazione del Glu in assenza di cibo potrebbe dipendere dal fatto che esso, intervenga insieme alle ORXs, nel mantenere l'animale sveglio (Harris and Aston-Jones, 2006). Nel secondo esperimento invece, è emerso che il feeding

stimolato dall'ORX-A viene bloccato in seguito alla somministrazione nell'LH/PFA di un antagonista dell'NMDA ossia D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5), ciò conferma che le risposte di feeding in seguito alla somministrazione di ORX-A richiedono l'attivazione del Glu nel LH/PFA. (Duva et al., 2005). Questi risultati ottenuti suggeriscono che l'ORX-A, in questa regione encefalica, incrementa il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori come il Glu. Le ORXs intervengono anche in altre funzioni fisiologiche quali ad esempio la regolazione della memoria e dell'apprendimento (Akbari et al., 2006; Aou et al., 2003). Questi neuromodulatori, sono stati riscontrate nell'LH, nell'HIP e nell'AMY regioni essenziali per il controllo della cognizione (Kilduff and de Lecea, 2001), stati d'ansia e depressione (Kelley et al., 2005).

L'HTH è un centro di regolazione energetica ed un suo malfunzionamento può indurre obesità (Schwartz et al., 2000), diabete mellito di tipo 2, ipertensione e iperlipidemia (Kopelman, 2000). Le azioni delle ORXs, in questa struttura encefalica, sono mediate da due tipi di recettori, ossia ORX1R e ORX2R accoppiati a proteine G (Sakurai et al., 1998) ed inoltre, mediante studi di ISH sono stati riscontrati elevati livelli di mRNA di tali recettori nella COR (Hervieu et al., 2001; Kilduff and de Lecea., 2001). L'interazione tra il sistema Gluergico (NMDA, AMPA) ed ORXergico risulta di notevole importanza per il corretto funzionamento sinaptico. I recettori NMDA sono composti da diverse subunità quali NR1, NR2A-D e NR3, e la subunità NR1 è una componente necessaria per il funzionamento dei canali del recettore (Charton et al., 1999). I recettori dell'AMPA, invece, sono costituiti da subunità GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 e giocano un ruolo importante nella plasticità neuronale, relativa alla memoria e all'apprendimento, mediante l'interazione con altri recettori Gluergici (Bast et al., 2005; Schiapparelli et al., 2006). E' stato osservato che una deplezione della subunità NR2A del recettore NMDA in topi, induce una disfunzione mnemonica (Kiyama et al., 1998), mentre, un malfunzionamento della subunità NR2B indebolisce la memoria spaziale (Clayton et al., 2002), questo indebolimento può essere anche causato dalla somministrazione i.c.v. di antagonisti dei recettori Gluergici quali CNQX e NBQX (Schiapparelli et al., 2006; Bast et al., 2005). Aou e colleghi hanno dimostrato che l'ORX-A somministrata i.c.v. determina un indebolimento della memoria in un labirinto d'acqua e ciò viene dimostrato dalla down-regolazione delle subunità recettoriali Gluergiche NR1, NR2A e NR2B. Contrariamente, Akbari ed il suo gruppo di ricerca, dimostrarono che l'iniezione dell'antagonista selettivo del ORX1R all'interno della regione CA1 ippocampale, indebolisce l'acquisizione, il consolidamento e il recupero della memoria spaziale (Akbari et al., 2006). La capacità della subunità NR2A nel modulare le correnti del recettore NMDA potrebbero lasciar pensare ad un

suo coinvolgimento nei fenomeni di LTP e nell' apprendimento (Varas et al., 2003). A partire da queste conoscenze è di conseguenza emerso che, NR2A e NR2B giocano un ruolo importante nella memoria e nell'apprendimento e che le ORXs incrementano la plasticità e potenziano la trasmissione Gluergica nella PFC (Lambe et al., 2005; Selbach et al., 2004). Per dimostrare che il SN Gluergico ionotropico nella COR è mediato dalle ORXs sono state usate nell'esperimento colture neuronali corticali primarie in cui è emerso che questi neuropeptidi riducono le espressioni degli mRNA delle subunità recettoriali di NMDA e AMPA. Si è dimostrato, inoltre, che il ORX1R presenta un effetto post-sinaptico diretto sui neuroni piramidali isolati recentemente dalla corteccia prefrontale (PFC) (Song et al., 2005; Xia et al., 2005), una regione cerebrale la cui attività è collegata con il livello di insonnia (Lambe and Aghajanian, 2003; Yamasaki et al., 2002) .

Il Glu ed il GABA sono due neurotrasmettitori distintamente espressi nella PFC e la trasmissione prefrontale Gluergica e GABAergica svolge un ruolo importante nelle funzioni cognitive (Zhong et al., 2003). Studi elettrofisiologici hanno evidenziato una varietà di interazioni Glu-DA nei neuroni piramidali della PFC (Tseng and O'Donnell, 2005; Wirkner et al., 2004), inoltre, le vie recettoriali della serotonina 5-HT1A mostrano un effetto inibitorio sulle risposte mediate dal recettore dell'NMDA nei neuroni piramidali della PFC (Yuen et al., 2005). Si è anche riscontrato che l'attivazione dei segnali della serotonina possono sopprimere l'inibizione GABAergica nei circuiti presenti nella PFC (Cai et al., 2002; Feng et al., 2001). Quando il sistema Gluergico diviene attivo, solitamente durante l'insonnia, è possibile che l'attività nella PFC venga rinforzata dall'aumento della trasmissione Gluergica mediato dall'ORX, mentre, quando i sistemi GABA sono attivi, durante il sonno, l'attività neuronale inibita nella PFC, potrebbe riprendere ad opera degli stessi segnali ORXergici. Evidenze morfologiche mostrano che, soltanto l'espressione dell'mRNA dell'hcr1 è presente negli strati profondi neuronali V e VI dell'PFC di ratto (Marcus et al., 2001), anche se diversi tipi di recettori del Glu e del GABA sono stati identificati in regioni corticali (Muly et al., 2003). Altra funzione importante delle ORXs è quella di determinare il rilascio di norepinefrina dai siti cerebro corticali di ratto, principalmente mediante l'attivazione dei ORX1R, questo rilascio però può essere anche antagonizzato mediante SB334867-A (Hirota et al., 2001). In accordo con quanto dimostrato precedentemente, si è osservato che SB334867-A antagonizza l'attivazione dell'LC indotta dalle ORXs suggerendo che i neuroni ORXergici potrebbero interagire nell'encefalo con i neuroni noradrenergici. In alcuni lavori è stato ipotizzato che l'ORX e il recettore dell'NMDA potrebbero interagire a livello dei neuroni noradrenergici centrali e per verificare ciò sono stati effettuati studi in vitro e studi in vivo (Ryuji et al.,

2008)). Gli studi in vitro riguardano gli effetti di MK801 sul rilascio di norepinefrina evocato dall'ORX-A, mentre, quelli in vivo, concentrano l'attenzione sull'interazione tra ORX-A e l'antagonista del recettore dell'NMDA MK801 sul rilascio di norepinephrine dalla PFC usando la microdialisi. Mediante questa tecnica neurofisiologica, è emerso che sia l'ORX-A somministrata i.c.v. che MK801 i.p. incrementano il rilascio di norepinefrina dalla PFC di ratto. Da questi studi si è osservato che nei ratti tutti i neuroni noradrenergici nella PFC derivano dall'LC, inoltre, Mateo ed il suo gruppo di ricerca, dimostrarono che l'attivazione dell'LC incrementa il rilascio di norepinefrina nella COR mediante l'attivazione dei ORX1R presenti sui neuroni noradrenergici cerebrocorticali. Walling e colleghi, evidenziarono che la proiezione ORXergica verso l'LC determina il rilascio di noradrenalina nel GD favorendo l'LTP. Altri esperimenti, invece, misero in evidenza che l'ORX potrebbe eccitare direttamente sinapsi talamocorticali prefrontali senza depolarizzare le cellule e ciò comporta il rilascio di Glu sullo strato V dei neuroni piramidali, inoltre, sia ORX-A che la B inducono rilascio di norepinefrina dai siti cerebro corticali di ratto ed entrambi vengono antagonizzati da SB334867 (Kushikata et al., 2003). Quanto detto dimostra, quindi, che sia MK801, che le ketamine aumentano il rilascio di norepinefrina in vivo ma non in vitro (Hirota et al., 2000). Secondo altri, invece, MK801 aumenta il rilascio di noradrenalina dai siti cerebrali di ratto e ciò suggerisce che il blocco dei recettori NMDA potrebbe attivare i corpi cellulari del LC e i neuroni noradrenergici-LC. Tutte queste evidenze indicano chiaramente l'esistenza di forti interazioni tra neuroni ORXergici ed i recettori dell'NMDA. In aggiunta, è evidente che i neuroni ORXergici sono coinvolti nella regolazione del ciclo sonno-veglia (Mignot et al., 2002), in particolare la somministrazione i.c.v. di ORX-A nei ratti aumenta l'insonnia durante il periodo di luce (Espana et al., 2002). Il Glu, come l'ORX, interviene anche nel ciclo sonno-veglia, infatti Lopez e colleghi dimostrarono che le concentrazioni di questo neurotrasmettitore eccitatorio extracellulare nella corteccia orbito frontale, decrescono del 19% durante il sonno non-REM e aumentano del 28% durante il sonno-REM, paragonate a quelle durante lo stato di veglia. Ciò indica che ci potrebbe essere un'interazione tra i neuroni Gluergici e quelli ORXergici nella COR e nell' LH. E' inoltre possibile che vi siano interazioni tra ORX e i recettori dell'NMDA in altre regioni cerebrali, infatti, la sintesi del neuropeptide ORXergico A aumenta il rilascio del Glu dai siti ipotalamici (Van den Pole et al., 1998), ed amigdalari (John et al., 2003). La somministrazione di ORX-A, inoltre, causa un incremento del tono muscolare del mesentero quando viene applicata al nucleo del motore trigeminale, questa risposta però può essere anche bloccata mediante un pretrattamento con un antagonista del recettore dell'NMDA d-(-)-2aminophonovalerico (Peever et al., 2003). Dagli

esperimenti dell'elettroencefalogramma (EEG) si è notato che l'MK801 i.p. e l'ORX-A i.c.v. riducevano lo stato di sonno e la densità dell'EEG durante il sonno non REM nel periodo iniziale di un'ora. Comunque, quando MK801 e ORX-A venivano somministrati simultaneamente, lo stato di sonno e la densità dell'EEG erano simili a quelli seguenti la somministrazione salina, ciò suggerisce che l'ORX-A potrebbe antagonizzare le risposte dell'MK801. Infine, Kodoma e Kimura dimostrarono che l'ORX-A aumenta i livelli di Glu nel LC e contemporaneamente promuove l'insonnia (Kodoma and Kimura, 2002), ed inoltre, i neuroni del Glu regolano l'attività neuronale dell'ORX mediante un'azione presinaptica (Li et al., 2002).

1.22 Variazioni dei sistemi ORXergico e Gluergico/GABAergico in condizioni patologiche

Il sistema ORXergico ha un ruolo importante nella regolazione del ciclo sonno-veglia, questo è dimostrato dal fatto che la narcolessia, una malattia del sonno, è causata da un deficit di ORX sia in umani che in altri modelli animali (Franczek et al., 2008). Il primo a coniare il termine narcolessia fu un neuropsichiatra francese Gélinau nel 1880 che ha riconosciuto il disturbo come una specifica patologia clinica. Ci sono diverse ipotesi sulle cause della narcolessia: questa può essere causata da un deficit di ORX (Khatami et al. 2004), ma ultime evidenze sperimentali fanno risalire il manifestarsi della patologia anche ad una degenerazione dei neuroni che sintetizzano il neuromodulatore ORXergico (Blouin et al., 2005). In diversi studi è stato evidenziato che il numero dei neuroni ORXergici dell'LH è ridotto e ciò lascia pensare che la narcolessia possa derivare da una distruzione di tali cellule (Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Altra ipotesi, invece, potrebbe essere quella che spiega come la narcolessia possa essere frutto di una mutazione genetica dei recettori di tali neuropeptidi o che le cellule che producono ORX potrebbero essere distrutte da una reazione autoimmune associata all'area ipotalamica laterale (HLA) (Mignot, 2001). Questa patologia si manifesta attraverso due fenomeni caratteristici, il primo è rappresentato dall'impossibilità di mantenere un lungo periodo di veglia (caratterizzato da un'improvvisa transizione del sonno non-REM), sintomo che può essere curato mediante terapie che si avvalgono dell'uso di farmaci psicostimolanti, amfetamine, modafinil e caffeina ed il secondo è invece caratterizzato da una sregolata fase iniziale del sonno REM, questo causa cataplessia, allucinazioni e paralisi del sonno. Le terapie usate in questo caso riguardano l'uso di antidepressivi triciclici come l'imipramina e l'inibitore selettivo per la serotonina (SSRI) (Zeitzer et al., 2003). Da diversi studi è emerso che le ORXs sono coinvolte anche nello

sviluppo di un'altra patologia quale la schizofrenia, difatti, è evidente che esse eccitano i neuroni della linea-intralaminare del TH (Bayer et al., 2002) e le loro proiezioni nella PFC (Lambe and Aghajanian, 2003; Lambe et al., 2005), di conseguenza una perdita di connessione tra queste due regioni potrebbe contribuire a deficit cognitivi che sono stati scoperti in stati precoci di schizofrenia. Questa ipotesi è supportata dal fatto che in alcuni pazienti con il primo episodio di questa patologia le fibre nel limbo anteriore della capsula interna, che connettono la linea e il nucleo talamico anteriore alla PFC, sono ridotte di volume (Lang et al., 2006). I nuclei della linea-intralaminare del TH fanno parte del sistema eccitatorio ascendente, quindi la loro attivazione favorisce l'attenzione ed il risveglio, mentre, una lesione comporta disturbi di attenzione e di funzioni esecutive, simili a quelli visti nelle lesioni della PFC. Questi neuroni presentano proiezioni monosinaptiche, che terminano sui dendriti apicali dei neuroni piramidali corticali e questi assoni terminano maggiormente nel I e V strato della PFC. La nicotina usata nella cura della schizofrenia rappresenta una forma di self-medicazione per incrementare sia l'attenzione che la memoria (Kumari and Postma, 2005) e in maniera simile, l'attivazione degli input ORXergici diretti al TH o alla PFC può contribuire a effetti terapeutici (Fadel et al., 2002). I neuroni ORXergici sono presenti nell'LH e proiettano a molte regioni cerebrali coinvolte nell'attenzione e nel risveglio come il TH, dove questi assoni bersagliano maggiormente i nuclei della linea intralaminare permettendo così alle ORXs di svolgere un ruolo nell'attenzione e nel risveglio. È emerso che le ORXs depolarizzano i neuroni della linea intralaminare talamica e non i neuroni sensoriali talamici (Bayer et al., 2002), in più i primi presentano una elevata espressione del ORX2R (Marcus et al., 2001). Da questi studi è stato anche riscontrato che la somministrazione acuta di droghe tipiche o atipiche antipsicotiche attivano i neuroni della linea talamica e più precisamente che gli antipsicotici atipici incrementano indirettamente tale attivazione attraverso la stimolazione delle proiezioni dei neuroni ORXergici (Fadel et al., 2002). Questa interazione tra ORX e antipsicotici è stata anche dimostrata nell'area tegumentale ventrale dove si è osservato che, bloccando gli effetti dell'ORX endogena, mediante l'utilizzo di un antagonista del ORX1R, è possibile prevenire l'incremento del numero dei neuroni dopaminergici attivati spontaneamente dopo la somministrazione di droghe antipsicotiche (Rasmussen et al., 2007). L'ORX può anche eccitare direttamente una popolazione di neuroni nello strato corticale VI b (Bayer et al., 2004), la cui funzione non è ben conosciuta, ma si ritiene che essi mandino proiezioni superficiali corticocorticali (Bayer et al., 2004). Nell'esaminare gli effetti dell'ORX nella PFC si è notato che sono pochi quelli diretti riscontrati sui neuroni del V strato prefrontale e che quando viene somministrata nella corteccia prefrontale mediale

(mPFC), regione che riceve un'elevata densità di proiezioni rispetto ad altre regioni corticali (Fadel et al., 2002), essa incrementa il rilascio di Glu causando correnti eccitatorie post-sinaptiche (EPSCs). Si è così iniziato a sospettare che l'ORX presentasse una certa abilità nell'indurre potenziali nei terminali talamocorticali, poiché lesioni talamiche precedenti, sopprimevano questo effetto. Stimolando il rilascio di ORX si osserva depolarizzazione dei terminali talamocorticali fino alla soglia per determinare lo spike, questo effetto però può essere fisiologicamente contrastato dalla stimolazione del recettore μ -oppioidi accoppiato alla sottoclasse delle proteine citoplasmatiche di tipo G: Gi/Go. Recenti studi hanno dimostrato che individui colpiti dalla narcolessia presentano deficit relativi all'attenzione (Rieger et al., 2003). È stato inoltre dimostrato che la nicotina presenta una elevata affinità per i recettori nicotinici dell'acetilcolina sui terminali talamocorticali attivati dall'ORX e ciò comporta un incremento del rilascio di Glu nei neuroni del V strato piramidale prefrontale (Lambe et al., 2005), inoltre, la somministrazione di nicotina nella PFC incrementa la performance nei ratti (Hahn et al., 2003), causando un aumento dell'attenzione. Recentemente è stato dimostrato che anche il modafinil è in grado di migliorare l'attenzione e ridurre le disfunzioni cognitive (Huang et al., 2006), ciò indica che anche esso può essere utilizzato per la cura della schizofrenia. È emerso che sia lo stress che l'attivazione delle vie dei glucocorticoidi sono implicati in varie malattie psichiatriche come la schizofrenia (Jones and Fernyhough, 2006). Recentemente studi condotti in laboratorio hanno dimostrato che lo stress nei ratti causa atrofia dendritica delle cellule piramidali del II e III strato nella PFC (Brown et al., 2005; Cook and Wellman., 2004), ma questi cambiamenti atrofici vengono ristretti al campo dendritico apicale. Questo gruppo apicale di neuroni del V strato sono il bersaglio dei terminali Gluergici della linea intralaminare eccitati dall'ORX (Lambe et al., 2005). Questi dati suggeriscono che la trasmissione eccitatoria modulata dall'ORX potrebbe essere incrementata dall'atrofia causata dallo stress nella regione apicale dendritica.

Per quanto riguarda invece il Glu, un aumento delle concentrazioni negli spazi extracellulari encefalici è tossico per i neuroni. Esso, infatti, può causare una lesione detta eccitotossica che potrebbe essere patogena nel danno cerebrale che consegue ad ictus, trauma, arresto cardiaco, convulsioni (Fumagalli and Clementi, 2004). La componente eccitotossica del danno cerebrale contribuisce anche nel decorso di malattie neurodegenerative quali Alzheimer, la corea di Huntington ed il morbo di Parkinson. La morte neuronale causata da un eccessivo accumulo di Glu negli spazi extracellulari può avere sia le caratteristiche di necrosi che quelle di apoptosi a seconda dell'area coinvolta. Un ruolo importante nell'eccitotossicità è sicuramente svolto da un accumulo eccessivo di Ca^{2+} e attivazione di alcuni enzimi che

possono provocare un aumento di radicali liberi che danneggiano il DNA e attivano proteine che depletano la cellula di ATP e avviano sia processi di necrosi che di apoptosi.

Diversi studi hanno inoltre evidenziato che il blocco dei recettori del GABA nella regione DMH di ratti (Di Micco et al., 2002; Chou et al., 2003) provoca risposte di panico, quali: aumento del ritmo circadiano, del ritmo respiratorio, della pressione arteriosa e degli stati d'ansia, e può essere indotto mediante infusioni di L-alliglicina (L-AG) provocando risposte alterate in seguito all'iniezione di lattato. In seguito a tale inibizione si verifica, anche, un coinvolgimento degli NMDAR e AMPAR del Glu la quale iperattivazione può provocare risposte di panico (Shekhar and Keim, 2000). Ciò è stato dimostrato mediante iniezioni nella regione ipotalamica dorsomediale (DMH) di antagonisti dell'NMDAR, che hanno determinato il blocco della tachicardia, tachipenia e ipertensione, dimostrando che gli NMDAR e non-NMDAR mediano risposte di panico in ratti con disfunzione del GABA nel DMH. Inoltre, si è osservato che, quando l'inibizione del GABA è attiva nel DMH e quella del Glu è ridotta mediante un'infusione di antagonisti recettoriali, si verifica una riduzione del comportamento esplorativo nei ratti, mentre, quando la sintesi GABAergica ed il rilascio di Glu diminuiscono nel DMH, si verificano stati d'ansia (Shekhar and Keim, 2000), indicando che gli effetti ansiogenici vengono mediati dai NMDAR post-sinaptici.

Per quanto riguarda il GABA_A, la subunità α_1 , ampiamente espressa nelle membrane plasmatiche delle cellule granulari cerebellari e con alti livelli espressivi in tutto l'encefalo, rappresenta una delle componenti strutturalmente determinanti per la corretta organizzazione delle altre subunità nel cervelletto (Cb) di roditori adulti e per tutta la neurotrasmissione GABAergica. Inoltre, evidente è l'implicazione di α_1 nel mediare effetti sedativi, anestetici ed anticonvulsivi di molti agenti farmacologici. La differente espressione delle subunità del recettore GABA_A è stata osservata nell'HIP di animali affetti dall'epilessia del lobo temporale (TLE), anche se, nonostante questi cambiamenti siano significativi nel manifestarsi della malattia, il suo preciso sviluppo rimane ancora oggi sconosciuto. Studi effettuati sia su individui che su roditori affetti da TLE (Brooks-Kayal et al., 1999), hanno riscontrato una ridotta espressione della subunità α_1 associata ad un proporzionale aumento espressivo di α_4 nel giro dentato ippocampale (DG). Tali variazioni iniziano entro 24 ore dall'induzione della prima crisi epilettica in ratti adulti, e persistono per alcuni mesi dopo il completo sviluppo della malattia. In queste condizioni si hanno notevoli cambiamenti sia nella funzionalità che nella farmacologia recettoriale, inclusa un'aumentata inibizione delle correnti del GABA per lo Zn^{2+} , ed una riduzione dell'aumento delle correnti del GABA per agonisti delle BZN di tipo I (α_2 , β_2 , γ_2). Queste scoperte suggeriscono che, bassi livelli di α_1 nei neuroni del DG

potrebbero contribuire alla genesi dell'epilessia, mentre, elevati livelli potrebbero essere neuroprotettivi. Per scoprire la potenziale importanza del recettore α_1 nel manifestarsi del TLE, alcuni studiosi hanno utilizzato un vettore virale che trasferisce il gene della subunità recettoriale portando un aumento dei livelli di α_1 nel DG dell'ospite in seguito allo stato epilettico, in modo da inibire sostanzialmente lo sviluppo dell'epilessia in ratti affetti. Il virus utilizzato è di tipo II adeno-associato contenente un promotore per le subunità α_4 (GABRA4) che guida l'espressione transgenica nel DG dopo lo stato epilettico. L'utilizzo per la prima volta di un promotore up-regolato (dopo lo stato epilettico), ha portato ad un forte aumento dell'espressione dell'mRNA della subunità α_1 e della suddetta proteina nel DG dopo 1-2 settimane dal manifestarsi della crisi. L'aumentata espressione di tale subunità GABAergica nel DG ha portato ad un forte aumento del tempo trascorso tra una crisi ed un'altra, e ad una riduzione del 60% nel numero di ratti che sviluppano epilessia (affetti da periodiche crisi) nelle prime 4 settimane dopo la prima crisi. Bisogna tenere in considerazione, inoltre, che l'aumentata espressione di α_1 in seguito all'inserimento del vettore contenente il promotore, è data dal fatto che l'effetto di tale subunità è dovuto al corretto assemblamento della stessa con altre subunità endogene (β e γ) ed il successivo trasferimento nelle membrane cellulari. Questi risultati hanno dimostrato che, il vettore contenente il gene α_1 che segue la corrente del promotore di GABRA4, può essere usato per incrementarne i livelli nel DG. Il promotore genico presente nel vettore virale up-regolato viene inserito nelle cellule malate, facendo aumentare la produzione della subunità recettoriale α_1 ; questo aumento si verifica esclusivamente nel DG solo nelle 2 settimane seguenti lo stato epilettico. La riduzione dell'espressione di α_1 nelle successive 4 settimane suggerisce che il promotore del vettore virale è silenziato o down-regolato (Rosenquist et al., 2005).

La comprensione dei meccanismi neuronali ORXergici e Gluergici/GABAergici, che sono alla base del cross-talking tra questi sistemi di neurotrasmissione, potrebbe essere una buona strada per sviluppare trattamenti nuovi per la prevenzione dei problemi d'ansia e stress, patologie neurodegenerative e disturbi da sonno nell'uomo quali la narcolessia.