

# ***Discussione***

Dai risultati del presente lavoro emerge da una parte una stretta correlazione tra il sistema ORXergico ed alcune chiavi subunità del recettore GABA<sub>A</sub> ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e dall'altra parte il ruolo esercitato dal mediatore (NMDA) del sistema eccitatorio Gluergico sulle attività indotto dal sistema neuropeptidico. Queste relazioni rientrano nella recente ipotesi di un loro coinvolgimento negli eventi plastici che stanno alla base del rimodellamento sinaptico. Difatti, molti studi ritengono che le disfunzioni del sistema Gluergico ed ORXergico sembrano essere causa di gravi malattie neurodegenerative e stati ansiosi (Palmer et al., 2005; Lerma, 2006; Johnson et al., 2010) mentre l'alterazione dei meccanismi inibitori GABAergici determinerebbe disfunzioni associabili a malattie neuropsichiatriche (Ballanger, 2001). Per questo lavoro, come indicato precedentemente, è stato necessario utilizzare un modello animale che potesse adattarsi al meglio non solo alle esigenze di laboratorio ma soprattutto che rappresentasse un esempio valido di adattabilità e plasticità encefalica. Il criceto dorato (*Mesocricetus auratus*), un ibernante facoltativo, ha risposto ampiamente alle necessità sperimentali, soprattutto per la sua peculiare capacità di reagire ai trattamenti farmacologici. E' necessario ricordare, tuttavia, che l'ORX-A risente notevolmente dei ritmi circadiani (Haynes et al., 1999), infatti, l'aumento del *food intake* ORX-indotto, si manifesta nella fase luminosa precoce e dopo circa 6 ore dall'inizio di quella oscura quando, normalmente, l'assunzione è ai livelli minimi. Contrariamente, iniezioni di ORX-A all'inizio del periodo di buio, quando il tasso di nutrimento è ai massimi livelli, non determina variazioni significative. In base al fatto che gli interventi sono stati realizzati sempre nella fase centrale del periodo di luce è stato quasi atteso un incremento della quantità di cibo ingerito come osservato dalla somministrazione di ORX-A a livello del BLA provocando una forte assunzione di cibo ed un corrispondente aumento peso corporeo in criceti eutermici. La contemporanea somministrazione di ORX-A e dell'agonista della subunità  $\alpha_1$  (zolpidem) nel BLA, ha invece indotto un calo ponderale molto forte probabilmente a causa del piccolo circuito di feedback ORXergico-GABAergico dell'AMY che in seguito allo stimolo di fame indotto dal primo sistema neurorecettoriale il secondo (GABAergico) tende a bloccare l'effetto della prima azione e precisamente riducendo la quantità di cibo ingerito come risulta da precedenti lavori effettuati sul ratto (Kokare et al., 2006). In accordo con il ruolo predominante dell'AMY in questo meccanismo, anche l'HTH regola medesime attività comportamentali, come si è potuto constatare dal denso numero di neruoni GABAergici nel nucleo ARC che regolano il rilascio di ORXs (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 (Viaggiano et al., 2004). Il GABA così rilasciato, promuove gli effetti delle ORXs sul food-intake. E' interessante notare che nei criceti trattati con ORX-B più zolpidem a livello del BLA in condizioni di eutermia, si verifica un'azione stimolatoria dello stesso agonista ORXergico sulla subunità GABAergica  $\alpha_1$ . Una possibile spiegazione in questo caso potrebbe risiedere nella capacità di tale subunità nel determinare piuttosto che un effetto inibitorio, un effetto stimolatorio sul sistema ORXergico, con un conseguente aumento nell'assunzione di cibo ed un forte incremento del peso corporeo. Una situazione paragonabile è stata riscontrata per il nucleo Ce sia per i criceti trattati con ORX-A più zolpidem che per quelli trattati con ORX-B + zolpidem dovuto probabilmente all'azione inizialmente inibitoria delle ORXs che permette di potenziare la corrente GABAergica portando ad una diminuzione della trasmissione mediata dal NMDA, come dimostrato dall'aumento nell'assunzione di cibo in seguito al trattamento con muscimol, un agonista del GABA (Martin et al., 2002). Di particolare rilievo è il consumo giornaliero d'acqua verificatosi solo quando il nucleo Ce dei criceti è stato trattato con ORX-B conducendo ad un altro e forse più importante ruolo svolto dal nucleo Ce nel controllo omeostatico dei liquidi corporei.

Nei criceti trattati con ORX-A a livello del BLA durante la fase d'ibernazione si osserva, nonostante la forte assunzione di cibo, un calo ponderale molto forte. Una situazione paragonabile si osserva nei criceti trattati con ORX-A, ORX-B ed ORX-B accoppiata allo zolpidem a livello del nucleo Ce dell'AMY. E' noto che durante l'ibernazione, il criceto subisce un rallentamento di tutte le attività metaboliche, nonché del comportamento alimentare, del bilancio energetico e delle attività motorie rispetto alla fase eutermica (Drew et al., 2001). Dai risultati ottenuti si riscontra, invece, un comportamento contrario determinato dalla somministrazione di ORXs che porta a variazioni dei ritmi circadiani, ad una maggiore assunzione di cibo e ad una diminuzione di peso consistente probabilmente legata ad un aumento del metabolismo energetico. Il cross-talking, tra il sistema GABAergico ed ORXergico, interviene oltre che nel dispendio energetico anche nella modulazione dell'attività motoria (Kotz et al., 2002). In questo contesto si può cominciare a supporre come effettivamente in condizioni di eutermia la somministrazione di ORX-A promuove un marcato incremento del motor behavior sia a livello del BLA che del Ce.

Al contrario, il contemporaneo trattamento di ORX-A ed NMDA nel BLA ha indotto un forte incremento nell'assunzione del cibo. Ciò tende a confermare quanto osservato nell'LH di individui trattati con ORX-A come dimostrato dalla forte attività iperfagica e

conseguente aumento di peso corporeo ORXergica (Thorpe et al., 2003). Diversamente, la somministrazione del nucleo Ce con NMDA ha invece provocato un effetto inibitorio sulla quantità di cibo ingerito, mentre, questo tipo di trattamento ha indotto negli eutermici un maggior stimolo della sete. Una relazione che trova riscontro con un'incrementata attività ORXergica responsabile di un elevato stato di veglia consentendo, di conseguenza, una dedizione più lunga all'attività d'esplorazione nell'intento di trovare cibo (Yamanaka et al., 2003). Anche in questi roditori è stato individuato un periodo, precedente all'assunzione di cibo, in cui i neuroni ORXergici sono più attivi (Mieda et al., 2004) e quindi permettono una specifica regolazione dello stato sonno-veglia probabilmente attraverso un loro coinvolgimento nel bilancio energetico (Sakurai, 2005). E' interessante notare che i diversi studi suggeriscono che i Mammiferi ibernanti vanno incontro ad una serie di cambiamenti fisiologici e biochimici quali: l'accumulo stagionale di riserve energetiche sottoforma di lipidi, la presenza di *stress* ossidativi con contemporaneo aumento dei sistemi di difesa antiossidanti, cambiamenti delle attività metaboliche implicate nel rallentamento del comportamento alimentare e di conseguenza un'ipolocomozione (Storey, 2001). Nel nostro modello sperimentale prevale, invece, la forte riduzione sia nell'assunzione d'acqua che di cibo negli ibernanti trattati con ORX-A/B+NMDA lasciando supporre un controllo plastico da parte del complesso amigdalare per limitare effetti degenerativi indotti da una "over-excitation" (Li et al., 2002).

In seguito alla valutazione del feeding behaviors, si è cercato successivamente di valutare se questo principale sistema neuropeptidico con finalità fagica intervenisse, a livello amigdalare, anche nella regolazione di fenomeni più complessi quali gli stati d'ansia e la depressione. A sostegno di ciò vi sono evidenze sperimentali che dimostrano un'iperattività dell'AMY associata a disturbi d'ansia quali la fobia, la depressione, e gli attacchi di panico (Stein et al., 2006). In particolare, sembrerebbe che i nuclei Ce e BLA svolgano un ruolo chiave nella modulazione delle emozioni negative e non piacevoli come si nota dalle informazioni sensoriali del nucleo BLA che inviata ai neuroni del nucleo Ce danno origine a risposte che modulano lo stress mediante importanti connessioni con alcune sedi corticali quali la corteccia prefrontale (Siegle et al., 2003; Schwartz et al., 2003). Di fatti, proprio a livello del nucleo Ce è stata osservata un'importante azione eccitatoria delle ORXs correlata all'attivazione dell'asse HPA che fa supporre un importante coinvolgimento di tale nucleo amigdalare nel controllo dei comportamenti d'ansia e paura (Samson et al., 2002; Sakamoto et al., 2004). Numerose sono inoltre le evidenze sperimentali che mostrano una modulazione di diversi comportamenti indotti

dall'interazione di vari fattori, ed importanti sistemi neuronali, con il sistema ORXergico (Kaslin et al., 2004; Yoshida et al., 2006; Volkoff et al., 2006; Sakurai, 2007) inibendo o attivando tale sistema per via di particolari neurotrasmettitori. Tra questi, senza dubbio il GABA esplica un ruolo di primaria importanza nel controllo degli stati ansiosi, mediante l'attivazione di recettori ionotropi, GABA<sub>A</sub>Rs e GABA<sub>C</sub>Rs, e recettori metabotropi GABA<sub>B</sub>Rs (Alam et al., 2005). Sicuramente i GABA<sub>A</sub>Rs costituiscono sia la grande maggioranza di tutti i recettori per il GABA che il principale sito d'azione delle BZD e di altri agenti farmacologici. Inoltre, diversi sono gli aspetti comportamentali ad essere regolati dalle connessioni reciproche che intercorrono tra i neuroni GABAergici e ORXergici (; Kokare et al., 2006; Kotz et al., 2006). A tal proposito, l'effetto indotto dal cross-talking tra ORXs e l'agonista (FLU) della subunità  $\alpha_2$  sugli stati d'ansia di *Mesocricetus auratus* mediante i test d'ansia EPM e LDT, sottolinea in accordo con altri studi (Ida et al., 2000; Suzuki et al., 2005), che l'ORX-A nel Ce influenza prevalentemente lo stato ansioso, in maniera paragonabile all'ORX-B, come si evince dal significativo incremento del tempo trascorso nella camera buia dell'LDT. In ogni caso, tali effetti sembrano assumere un significato ancora più importante in seguito all'analisi comportamentale condotta mediante il più sofisticato test d'ansia, l'EPM. Difatti, il significativo decremento del tempo trascorso nei bracci aperti e del numero di entrate in questi stessi bracci nei criceti trattati sia con ORX-A che con ORX-B sottolinea maggiormente l'effetto ansiogenico di questi due neuropeptidi. Tuttavia, dalla valutazione dell'attività locomotoria degli animali, espressa come l'attività esplorativa totale di entrata nei bracci chiusi ed aperti, sebbene di lieve differenze tra ORX-A e ORX-B, tende a favorire un incremento significativo da parte dell'ORX-B. In effetti, come dimostrato da altri, i nostri risultati tendono a suggerire un incremento dell'attività esplorativa (Suzuki et al., 2005) indotta dall'ORX-A che dunque esercita un significativo effetto ansiogenico (Avolio et al., 2010). In questo caso l'effetto del FLU sull'azione ansiogenica delle ORXs. comincia a diventare fondamentale per il controllo ansiolitico di alcune benzodiazepine. (Alam et al., 2005; Henny et al., 2006; Kokare et al., 2006). In particolare, diverse evidenze sperimentali indicano la subunità  $\alpha_2$  come quella maggiormente espressa nei nuclei Ce e La dell'AMY (Edenberg et al., 2004; Covault et al., 2004) oltre a rappresentare la principale candidata nel mediare gli effetti ansiolitici degli agonisti GABAergici (Marowsky et al., 2004) come riportato da topi con una mutazione puntiforme a livello della subunità  $\alpha_2$  che non mostrano tale effetto (Low et al., 2000; Crestani et al., 2002) ed inoltre, sembrerebbe che agonisti selettivi per tale subunità presentino lo stesso effetto

ansiolitico (Johnstone et al., 2004). E' importante notare come il cotrattamento di ORX-A e ORX-B con l'agonista FLU nel nucleo Ce dell'AMY abbia comportato sia un significativo decremento del tempo trascorso nella camera buia dell'LDT che un significativo incremento del numero di entrate nei bracci aperti e del tempo trascorso negli stessi bracci dell'EPM. Ciò evidenzia l'effetto antagonista del FLU sull'attività ansiogenica, effetto che si osserva anche sull'attività esplorativa totale di entrata nei bracci chiusi la quale diminuisce in maniera significativa, confermano il ruolo inibitorio del sistema GABAergico sulle risposte comportamentali assimilabili a stati d'ansia e panico (He et al., 2007).

In una fase successiva, l'indagine molecolare ha permesso di approfondire alcuni aspetti dell'espressione della principale subunità recettoriale ORXergica. In seguito all'analisi dei livelli espressivi del recettore con affinità per entrambi i neuropeptidi (ORX2R), dopo somministrazione di ORX-A e di ORX-A più zolpidem nel nucleo BLA, si è riscontrata una moderata up-regulation solo a livello amigdalare a differenza della somministrazione di ORX-B che porta, invece, ad una moderata down-regulation nell'HTH. In questa regione limbica, l'mRNA per ORX2R è abbondante nell'area anteriore ed in quella ventromediale (VMH), mentre in altre aree cerebrali alti livelli di mRNA sono rilevati nella tenia tecta (TT), nell'HIP, nel nucleo dorsale del *raphe* (DR) e nel LC (Matsumura et al., 2001). Questi dati trovano riscontro con i livelli trascrizionali di ORX2R dopo trattamento nel nucleo Ce, dove si osserva una forte up-regulation a livello ippocampale in seguito a somministrazioni di ORX-A, ed una down-regulation moderata a livello ipotalamico ed amigdalare di criceto, in seguito a doppio trattamento con ORX-A+zolpidem. Diversamente, somministrazione con ORX-B induce una forte down-regulation dei livelli trascrizionali di ORX2R nell'HTH e nell'AMY e questo effetto viene bloccato con la somministrazione sequenziale di ORX-B+zolpidem che provoca una moderata up-regulation a livello amigdalare ed ipotalamica che lascia presupporre un'azione stimolatrice della subunità  $\alpha_1$  sul sistema ORXergico. Da questi dati si evince, pertanto, un ruolo modulatore dei recettori GABA<sub>A</sub> nel nucleo Ce (Kang et al., 2004) sostenuto da alte concentrazioni di tali recettori a livello del nucleo Ce (Marowsky et al., 2004) e dall'inibizione dagli *inputs* GABAergici dei neuroni di questa importante stazione amigdalare (Finnegan et al., 2005).

Dall'indagine molecolare è stato, inoltre, possibile attribuire le variazioni del feeding behaviors e del ciclo sonno-veglia, al sistema Gluergico. I criceti ibernanti trattati con ORX-A ed NMDA a livello del BLA hanno mostrato una moderata up-regulation di

ORX2R a livello dell'HIP e della COR, mentre, una moderata down-regulation è stata riportata nell'AMY e nell'HTH. Questo tipo di relazione tendono a rafforzare il coinvolgimento dell'ORX2R nel controllo del comportamento di feeding in maniera simile a quanto riportato nel ratto (Matsumura et al., 2001). In relazione a ciò, il coinvolgimento dell'ORX-B nell'assunzione di acqua tende a suscitare enorme interesse in relazione allo stato di ibernazione e precisamente sembra che il nucleo Ce degli ibernanti trattati con ORX-B+NMDA sia responsabile di una up-regulation di ORX2R a livello ipotalamico ed amigdalare che tenderebbe a sottolineare in maniera simile un'azione sinergica ORX-Glu sulle funzioni autonome e sull'attività dei neuroni reticolari che normalmente inibiscono il sonno REM (Calvo et al., 2001). Tali risultati sono in linea con l'effetto stimolatorio Gluergico sull'assunzione di liquidi, confermando il ruolo modulatore dei recettori NMDAergici del Ce sul rilascio di fattori omeostatici come la vasopressina che di conseguenza condurrebbe allo stato di arousal nel criceto (Hrabovszky et al., 2006). I nostri risultati dimostrano, inoltre, che ORX2R è distribuito in maniera eterogenea a livello di tutto il SNC di *Mesocricetus auratus*. In particolare, i trattamenti con ORX-A, ORX-B e FLU inducono una significativa up-regulation di ORX2R in tutte le aree encefaliche prese in considerazione in questo studio. I valori più elevati si osservano soprattutto a livello del HIP (Greco et al., 2001), un'area encefalica preferenzialmente coinvolta nella regolazione dei processi di memoria ed apprendimento spaziale (Wright et al., 2002) avvalorando l'ipotesi di un coinvolgimento dell'HIP nella modulazione degli stati ansiosi (Bush et al., 2000) attraverso connessioni con le strutture subcorticali normalmente attivate dalle situazioni che generano stress (Lopez 1999). L'HIP è soprattutto riconosciuta come una regione particolarmente ricca di neuroni che producono CRH (Bennett, 2008) i quali risultano essere importanti per il controllo dell'asse HPA suggerendo quindi che il rilascio di ACTH stress-indotto sia mediato da ORX2R (Chang et al., 2007). In maniera simile anche il cotrattamento con ORX-A e FLU nel nucleo Ce determina una significativa up-regulation dei livelli di trascrizione di ORX2R nell'HIP, nell'HTH e nell'AMY, con eventuali influenze sui ritmi di feeding e motor behavior che sono regolati da tali centri limbici di Mammiferi. Tali risultati, dunque, oltre ad essere in linea con le nostre precedenti osservazioni confermano l'attività modulatore del nucleo Ce dell'AMY dipendente dagli inputs inibitori GABAergici (Kang-Park et al., 2004; Marowsky et al., 2004; Finnegan et al., 2005).

Considerate le variazioni comportamentali e la capacità neurodegenerativa di ORX-A e ORX-B nei roditori (Van den Pole et al., 1998), abbiamo anche investigato se nel nostro

modello sperimentale tali sostanze fossero capaci di indurre danno neuronale, mediante l'utilizzo di una tecnica istologica, come l'ACS, specifica per l'individuazione dei neuroni degenerati (Eiland et al., 2002). Tale tecnica ha evidenziato una degenerazione sito-specifica a livello ippocampale e dell'AMY indotta sia dai trattamenti con ORX-A che da quelli con ORX-B in accordo con quanto osservato nel ratto (Gerashchenko et al., 2001). Riguardo all'effetto dell'agonista di  $\alpha_2$  somministrato sia con ORX-A ed in maniera più cospicuo con ORX-B nel nucleo Ce dell'AMY, si osserva una minore degenerazione neuronale e quindi un effetto neuroprotettivo di questa subunità (Mikkelsen et al., 2008). La scarsa neurodegenerazione a livello dell'AMY in seguito alla somministrazione di ORX-B+FLU suggerisce una specifica capacità neuroprotettiva che è in accordo con il ruolo fondamentale del GABA nei processi di plasticità sinaptica nell'AMY (Szinyei et al., 2000) il cui rilascio, a livello di quest'area encefalica, dipende fortemente dalle ORXs (John et al., 2001).

**In conclusione:** il presente lavoro dimostra che nel *Mesocricetus auratus*, la somministrazione di agonisti ORXergici influenza diversi aspetti comportamentali quali il ciclo sonno-veglia (de Lecea et al., 2005) l'attività locomotoria (Hagan et al., 1999). In particolare, è emerso che l'ORX-B somministrata a livello del Ce è coinvolta nell'assunzione d'acqua e nella regolazione della sua omeostasi mentre l'ORX-A somministrata nel nucleo BLA, interviene maggiormente nella regolazione del feeding. È stata, inoltre evidenziata, una funzione modulatrice della subunità  $\alpha_1$  del recettore GABA<sub>A</sub>, sul sistema ORXergico. I risultati osservati nella fase di ibernazione, mettono in evidenza una stretta interazione tra il sistema ORXergico ed il GABAergico a livello amigdalare. I risultati comportamentali integrati ai livelli recettoriale (ORX2R) hanno sottolineato un ruolo fondamentale dell'AMY, in particolare del nucleo Ce, nella regolazione dei comportamenti ansiosi. In questo contesto si può confermare il maggiore effetto ansiogenico da parte dell'ORX-B che viene antagonizzato dall'azione inibitoria del GABA<sub>A</sub>. Per quanto riguarda l'espressione recettoriale, è importante sottolineare il ruolo stimolatorio svolto dalla subunità GABAergica  $\alpha_1$  sulla trascrizione di ORX2R in tutte le regioni del sistema limbico, in particolare a livello ipotalamico ed amigdalare. Il fatto che, il sistema GABAergico lavori in stretto contatto con quello ORXergico, rafforza la sua partecipazione nel regolare importanti fenomeni neurofisiologici e comportamentali come il feeding-behaviors, il ciclo sonno-veglia, il bilancio energetico e l'attività motoria nel criceto sia durante la fase eutermica che ibernante (Drew et al., 2007). I nostri risultati

evidenziano per la prima volta in *Mesocricetus auratus* la presenza di un cross-talking tra i sistemi ORXergico e GABAergico che porta un effetto neuroprotettivo esercitato dalla subunità  $\alpha_2$  sugli stimoli emotivi in risposta allo stress. Resta da chiarire è se le azioni di tali sistemi neuronali avvengano direttamente a livello sinaptico o se, invece, vengono mediati da altri fattori citoplasmatici implicati nel controllo degli stati d'ansia. Dai dati del present studio emerge prevalentemente un effetto sinergico tra il sistema ORXergico e quello Gluergico a livello amigdalare che garantisce il successo di alcune importanti attività comportamentali e neurofisiologiche. Il meccanismo di sinergia tra il sistema ORXergico e quello Gluergico conferma il coinvolgimento del Glu nel ciclo sonno-veglia e nel feeding behaviors non solo nella fase di eutermia ma anche in quella di ibernazione (Vecsey et al., 2009).

Allo scopo di chiarire questi punti oscuri, altri studi potrebbero essere condotti nell'ottica di individuare nuove terapie per la cura di malattie alimentari (obesità, bulimia, anoressia), stati d'ansia (attacchi di panico, depressione), patologie neurodegenerative (Alzheimer, Parkinson), disordini legati al sonno (narcolessia) e di capire come poter favorire l'innescò di fenomeni plastici, la cui carenza è causa di malattie del SN. Conseguentemente, sarebbe auspicabile definire i patterns spazio-temporali di specifiche connessioni neuronali portando avanti uno studio su criceti dai primi stadi di sviluppo postnatale sino alla maturità. In tal modo si potrebbe stabilire l'eventuale esistenza di una flessibilità comportamentale specie-specifica attribuibile ad una regione encefalica bersaglio ed alla sua interazione anatomo-funzionale con altre regioni. In tale contesto il criceto, proprio in relazione all'alto potenziale neuroplastico, in analogia con quanto avviene durante la transizione torpore-eutermia, rappresenta il modello di studio ideale per possibili nuovi approcci terapeutici.