

# ***Introduzione***

Il sistema Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei Mammiferi presenta un'elevata organizzazione strutturale nei vari campi neuronali garantendo alle diverse regioni encefaliche una differenziata ed efficace capacità moto-sensoriale. In linea con tale aspetto organizzativo, troviamo l'encefalo di un animale ibernante soprattutto quando si trova in una condizione di profonda depressione elettrofisiologica, in cui la sua integrità funzionale deve essere mantenuta, tanto è vero che il SNC dell'ibernante è in grado di mantenere costantemente in equilibrio la postura nonché la sensibilità agli stimoli interni ed esterni. In questo contesto, i neuroni degli ibernanti esibiscono una marcata plasticità durante le basse temperature dove si verifica la condizione di torpore. Va inoltre sottolineato che, durante il processo della plasticità, avviene una sensibile variazione della distribuzione proteica a livello sinaptico la quale viene ripristinata quando aumenta la temperatura corporea e l'animale ritorna ad uno stato di eutermia (Von der Ohe et al., 2007). Questo fenomeno non viene attribuito ad eventuali perdite delle componenti proteiche, bensì sembrerebbe legato a cambiamenti nell'organizzazione sinaptica che porterebbe alla creazione di un serbatoio proteico dal quale le proteine possono essere velocemente mobilizzate per una immediata ricostruzione sia delle sinapsi che delle spine dendritiche nel momento dell'eutermia. Pertanto, l'encefalo di un mammifero ibernante, rappresenta un modello di rapida e reversibile plasticità neuronale, con un elevato ritmo di cambiamento, assicurando all'ibernante necessarie informazioni strutturali encefaliche in grado di migliorare i processi ipotermici, attività motorie ed i meccanismi di memoria e di neuroprotezione (Arendt et al., 2003).

L'applicazione di approcci biomolecolari nonché tecniche immunocitochimiche e colorazioni citologiche mediante *Fluoro-Jade B* ed *Amino Cupric Silver Stain (ACS)* ha rappresentato un passaggio fondamentale per comprendere come specifiche regioni encefaliche, possano regolare diverse attività comportamentali quali il feeding, il ciclo sonno veglia, la locomozione e svariati processi neurofisiologici, tra cui l'ansia. In tale contesto, un ruolo importante è svolto dal sistema limbico coinvolto nei processi di ricompensa, nella modulazione della memoria, nelle manifestazioni delle emozioni quali paura, rabbia e nel controllo delle risposte viscerali (White et al., 2008). Tale sistema comprende una regione corticale che include l'ippocampo (HIP), il giro paraippocampale e il giro cingolato e una regione subcorticale costituita a sua volta dal nucleo *accumbens* (Acb), dall'ipotalamo (HTH), dai corpi mammillari e dall'amigdala (AMY; Rasia-Filho et al., 2000). Quest'ultima costituisce la principale regione encefalica coinvolta nella regolazione di diverse funzioni comportamentali e neurofisiologiche. L'AMY, difatti gioca

un ruolo chiave nell'adattamento cerebrale a situazioni non solo definite nuove ma soprattutto a quelle che tendono ad alterare strutturalmente questa regione telencefalica (LeDoux, 2000). Da un punto di vista anatomico, tale regione è costituita da una complessa rete di nuclei, quali il nucleo basolaterale (BLA) che a sua volta comprende il nucleo laterale (La), basale (B) e basomediale (BM), il nucleo centrale (Ce) e il gruppo dei nuclei della zona cortico-mediale. Studi anatomici hanno mostrato che il complesso amigdaloide è caratterizzato da un'ampia varietà di connessioni sia con altre regioni encefaliche che con strutture interne dello stesso complesso (Pitkanen, 2000). In particolare, la principale fonte d'informazioni sensoriali che giungono all'AMY è rappresentata dalla corteccia prefrontale (PFC). Alcuni lavori suggeriscono l'esistenza di anomalie di tali connessioni associate alla modulazione degli stati d'ansia (Davidson, 2002). Le numerose efferenze che dipartono dal complesso amigdaloide verso l'HIP, l'HTH, il tronco encefalico e regioni corticali depongono, inoltre, a favore di un suo coinvolgimento nelle risposte emotive, tra cui la paura (Le Doux, 2000). Il coinvolgimento dell'AMY in queste capacità neuro-comportamentali sono principalmente legate alle sue reciproche connessioni tra i diversi nuclei che consentono alle informazioni sensoriali di giungere inizialmente al BLA ed in seguito raggiungere il nucleo Ce, il quale da origine a risposte che mediano lo stress ed il ciclo sonno veglia (Pitts et al., 2009). Successivamente il nucleo Ce invia connessioni al *bed nucleus della stria terminalis* (BNST) che, innervando i nuclei ipotalamici, è in grado di attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e regolare (HPA) le risposte allo stress (Kalin et al., 2004).

Negli ultimi decenni la necessità di comprendere i numerosi e intricati meccanismi che regolano tali risposte hanno condotto alla scoperta di nuove sostanze biologicamente attive tra le quali l'orexina A e B ( ORX-A e ORX-B) definite anche ipocretine 1 e 2. Tali neuropeptidi, inizialmente conosciuti per il loro ruolo nel controllo del comportamento alimentare (Kokare et al., 2006), dell'omeostasi corporea, del ciclo sonno-veglia (Alam et al., 2005), hanno negli ultimi anni suscitato un crescente interesse come regolatori degli stati d'ansia (Berridge et al., 2010). Le ORXs sono prodotte da un precursore comune la prepro-orexina (PPORX) e solo in seguito al clivaggio di tale molecola e una conseguente modifica post-trascrizionale si ha la produzione di ORX-A e ORX-B (Nuñez et al., 2009). Le azioni delle ORXs sono mediate da due recettori accoppiati a proteine G definiti recettori di tipo 1 (ORX1R) e recettore di tipo 2 (ORX2R) dei quali il primo tipo mostra una maggiore affinità per l'ORX-A, mentre il secondo tipo ha uguale affinità sia per ORX-A che ORX-B (Kukkonen et al., 2002). In particolare, l'ORX2R è localizzato nelle cellule

basofile dell'ipofisi le quali, mediante la coespressione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH), è responsabile del rilascio dei glucocorticoidi da parte della corteccia surrenale e di conseguenze mediatori specifici dello stress (Holsboer, 2003). Molteplici studi hanno evidenziato che non solo i diversi fattori ma anche importanti sistemi neuronali interagiscono con il sistema ORXergico (Kaslin et al., 2004; Yoshida et al., 2006; Volkoff, 2006; Sakurai, 2007) che conducono all'inibizione e/o attivazione di tale sistema neuropeptidico. In questo lavoro, particolare attenzione è stata rivolta alle interazioni che intercorrono, a livello amigdalare, tra il sistema ORXergico e quello glutammatergico (Gluergico) e  $\gamma$ -amminobutirrergico (GABAergico; Henny et al., 2006; John et al., 2003).

I sistemi di trasmissione neuronale Gluergico e GABAergico, si pongono come ottimi modelli, in quanto il primo è noto come sistema eccitatorio dell'encefalo dei Vertebrati, il secondo come inibitorio e grazie ad una loro modulazione finemente regolata viene garantita la propagazione dell'informazione nervosa nelle varie aree encefaliche. Dal momento che GABA e Glu vengono sintetizzati a partire da un precursore comune glutamine per mezzo del acido glutammico decarbossilasi (GAD) l'interazione tra questi sistemi è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi; infatti alterazioni nella composizione e nella sintesi di tali precursori sono alla base di gravi malattie neurodegenerative, come l'epilessia (Petroff et al., 2002). Nel caso del sistema Gluergico, il Glu esercita la propria azione attraverso l'interazione su recettori ionotropici e recettori metabotropici: i primi sono assemblati multimerici di 4 o 5 subunità e sono suddivisi in tre gruppi in base alle loro caratteristiche strutturali e all'agonista che ne determina l'attivazione, i secondi appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alla trasduzione del segnale intracellulare (mGluR) attraverso le proteine G, a differenza dei recettori ionotropi direttamente associati a canali ionici. Gli ionotropici si distinguono perciò in recettori dell'alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolone propionato (AMPA), dell'N-metil-D-aspartato (NMDAR) e del Kainato (KAR). È noto che il sistema Gluergico sia attivamente coinvolto nei fenomeni ansiosi associati ad eventi neurodegenerativi soprattutto attraverso la modulazione degli NMDAR durante lo sviluppo (Scott et al., 2004). Le funzioni che gli NMDAR svolgono nella complessità del SNC sono molteplici ed articolate, infatti rientrano nella formazione ed eliminazione delle sinapsi, migrazione, differenziazione e morte cellulare (Hynd et al., 2004), nonché nelle funzioni encefaliche complesse quali cognizione, memoria ed apprendimento associabili agli eventi del potenziamento a lungo termine (LTP) (Shouval et al., 2002). Pertanto, l'attivazione di questi recettori sembrerebbe essere regolata dalla cellula, visto che una loro eccessiva

stimolazione potrebbe far scaturire gravi fenomeni eccitotossici, associabili a patologie di carattere neurodegenerativo, mentre la down-regulation favorisce tolleranza alle stesse condizioni durante lo sviluppo dell'encefalo di ratto.

Per quanto riguarda le sinapsi GABAergiche, esse agiscono mediante due tipi di recettori, i GABA<sub>A</sub> ed i GABA<sub>B</sub>. I primi sono ionotropi in quanto permettono il passaggio di ioni solo dopo il legame con il neurotrasmettitore, mentre i secondi sono metabotropi poichè agiscono tramite una cascata di segnali mediata dalle proteine G (Purves et al., 2004). Il sistema recettoriale del GABA<sub>A</sub> è considerato particolarmente importante in quanto è implicato in numerose attività neurofisiologiche, neuroendocrine e comportamentali. Il complesso proteico è formato dall'aggregazione di almeno 19 subunità:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-6}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ , tra cui della serie  $\alpha$ ,  $\alpha_1$  ed  $\alpha_5$  sono quelle maggiormente coinvolte in fenomeni di plasticità (Simon et al., 2004). Le subunità  $\gamma$ , combinandosi con quelle  $\alpha$  e  $\beta_x$  formano un recettore funzionale in grado di rispondere agli effetti, non solo del GABA, ma anche delle benzodiazepine, dei barbiturici e degli steroidi (Sieghart e Sperk, 2002). È noto che sia il sistema Gluergico che GABAergico sono fortemente coinvolti in specifiche condizioni patologiche, come ischemie cerebrali. E' interessante notare che nei processi neurodegenerativi legati all'interazione Glu-ORX, questi sono responsabili di un'elevata eccitazione neuronale e della riduzione delle inibizioni sinaptiche mentre in altri casi per tali processi sono stati osservati evidenti decrementi dell'espressione degli mRNA delle subunità dei GABA<sub>A</sub> o addirittura eventi di attivazione delle sinapsi GABAergiche che possano promuovere effetti neuroprotettivi (Fedele et al., 2000). Infatti, in questo lavoro di tesi è stato verificato come la somministrazione di agonisti dei GABA<sub>A</sub> possa prevenire la perdita neuronale in differenti regioni encefaliche del criceto in condizioni di ischemie cerebrali (Fedele et al., 2000; Avolio et al., 2010). Studi farmacologici hanno, inoltre, evidenziato che basse concentrazioni di zolpidem, un agonista della subunità GABAergica  $\alpha_1$ , possono inibire gli effetti tossici delle ORXs. Parallelamente, anche gli effetti Gluergici saranno oggetto di indagine sulla base di recenti dati dimostrando che l'iperattività dei recettori Gluergici innesca processi di apoptosi o morte cellulare, in patologie nervose come il morbo di Huntington, Parkinson e Alzheimer, Sclerosi multipla, Sclerosi amiotrofica laterale e glaucoma (Lipton, 2004).

Alla luce di tali considerazioni, lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare il ruolo del sistema ORXergico e del cross-talking tra tale sistema e  $\alpha_{1,2}$  GABA<sub>A</sub>R nella modulazione degli stati d'ansia e del feeding behaviors in un modello ibernante facoltativo quale *Mesocricetus auratus*. La scelta di tale modello animale è data dal fatto che

l'ibernazione, una strategia adattativa mirata a ridurre al massimo il dispendio energetico per garantire la sopravvivenza dell'organismo in condizioni ambientali estreme, viene considerata come un efficace modello naturale di tolleranza ad insulti cerebrali (Mc Ewen, 2007). Pertanto, in una prima fase del lavoro sperimentale sono state condotte valutazioni comportamentali mediante trattamento stereotassico nel nucleo BLA e Ce dell'AMY con ORX-A, ORX-B  $\pm$  zolpidem (agonista della subunità  $\alpha_1$  del GABA<sub>A</sub>R), flunitrazepam (agonista della subunità  $\alpha_{2,3}$  del GABA<sub>A</sub>R) ed NMDA (agonista del recettore Gluergico NMDA). I nuclei BLA e Ce sono stati scelti sia in base alla presenza di una buona densità di recettori ORXergici che per il loro ruolo nella modulazione del comportamento emotivo (Kalin et al., 2004). Tali valutazioni sono state effettuate con due test di emersione da un'area ritenuta sicura ad una pericolosa, il light-dark box test (LDT) e l'elevated plus-maze (EPM). In una seconda fase sono stati correlati i dati ottenuti dall'analisi comportamentale ad alterazioni neuronali ed ai livelli di espressione di ORX2R mediante rispettivamente le tecniche di ACS e di ibridazione *in situ* (ISH).

Sulla base di queste informazioni, si evince che l'AMY occupi un ruolo di primo piano nel controllo dei comportamenti animali associati al feeding behaviors ed agli stati d'ansia, non solo singolarmente ma anche attraverso la possibile realizzazione di interazioni nervose sia con altri sistema neuronali che con regioni encefaliche. Con questo intento è stata utilizzata la tecnica stereotassica per studiare il ruolo dell'AMY, in particolare del BLA e del Ce, nella modulazione delle principali attività comportamentali del criceto, associate al feeding e al drinking, attraverso l'azione combinata dei sistemi ORXergico e GABA/Gluergico sia in condizioni di eutermia che di ibernazione. I dati ottenuti in questo lavoro di tesi, potrebbero fornire utili indicazioni circa l'azione del cross-talking tra questi importanti sistemi di neurotrasmissione attribuendo agli ORX2Rs un ruolo di notevole importanza nel controllo degli stati d'ansia e del comportamento alimentare. Tali dati costituiscono, inoltre, un primo tentativo di individuare specifici centri amigdalari implicati nella regolazione dei processi neurofisiologici e potrebbero rappresentare un buon approccio per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche utili alla cura degli stati associati a situazioni di stress, ad eventi neurodegenerativi ed a patologie legate al sonno quali la narcolessia.