

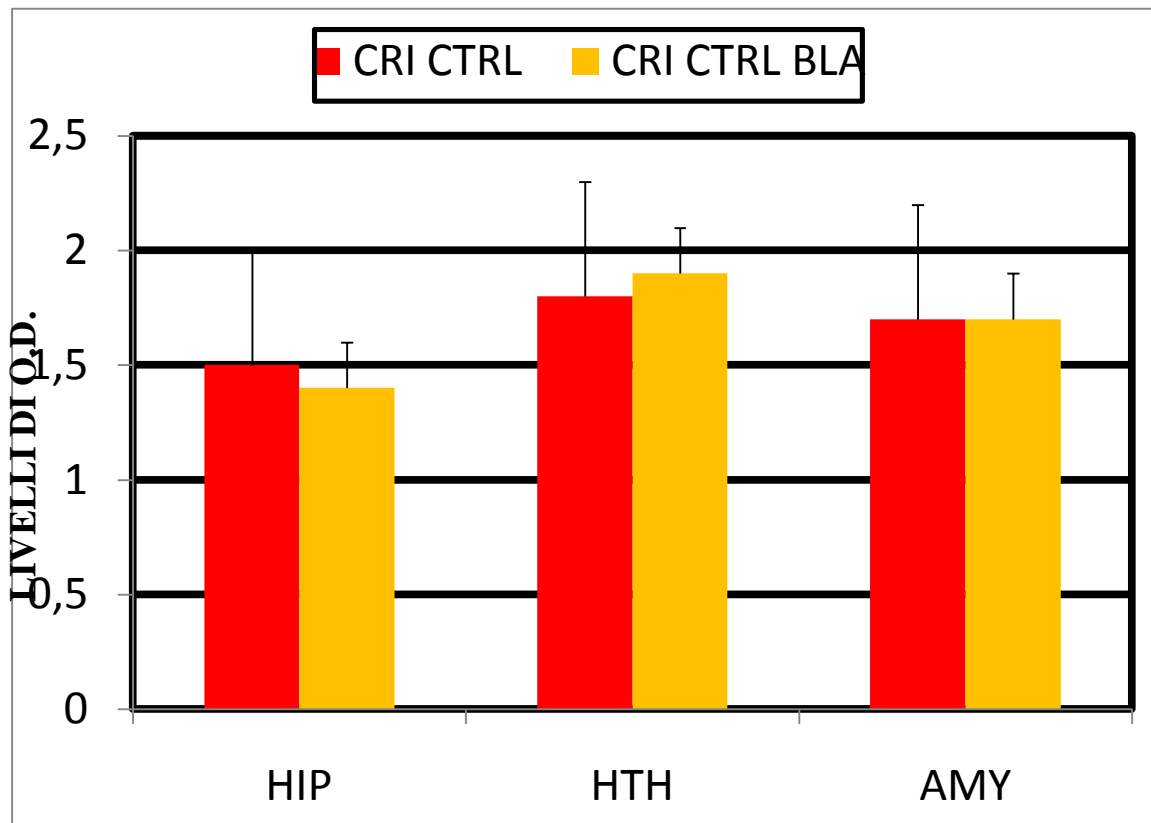
Risultati: II parte

4. Valutazione encefalica della trascrizione della subunità ORX2R

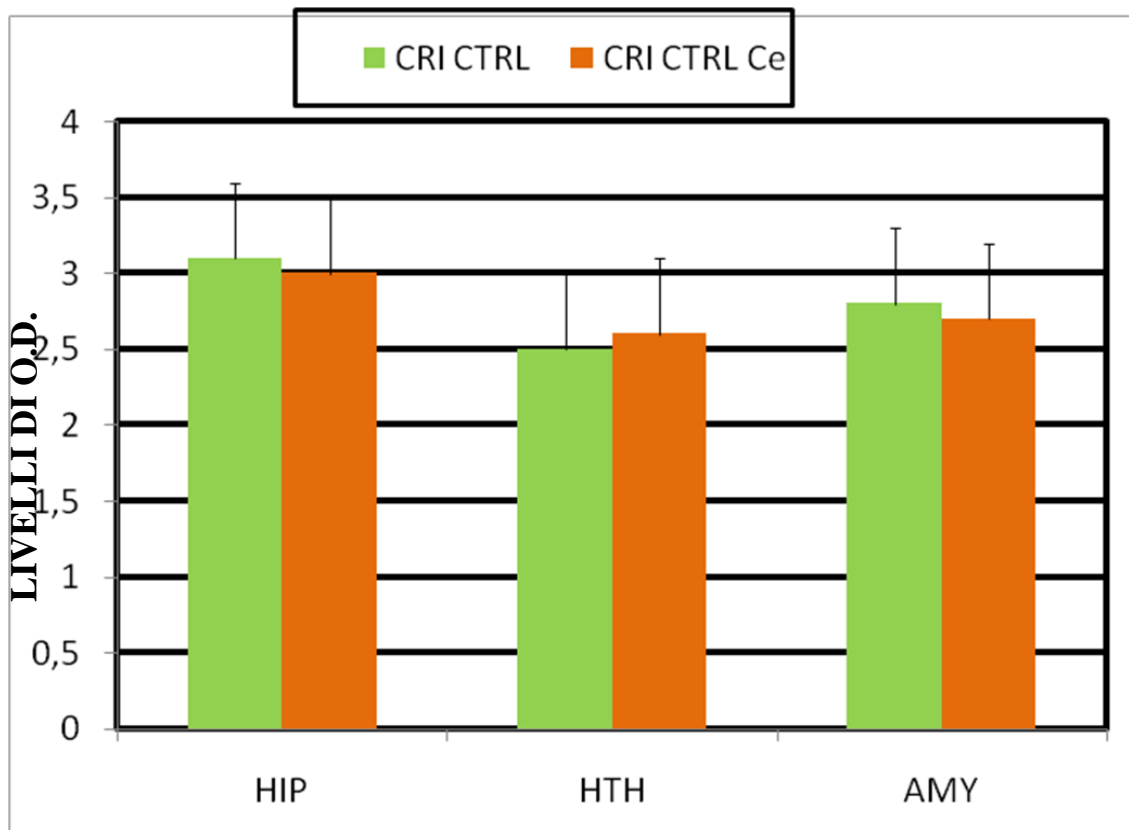
In quest'ultima fase del lavoro, nella prima parte dell'indagine molecolare, si è cercato di approfondire alcuni aspetti dell'espressione delle principali subunità recettoriali ORXergiche, in particolare l'attenzione è stata rivolta a ORX2R.

La valutazione statistica condotta sui risultati ottenuti con l'ibridazione *in situ* su encefali di criceti che non hanno avuto la somministrazione di alcuna sostanza, ha messo in evidenza la presenza di una eterogenea distribuzione dell'espressione degli mRNA di ORX2R a livello di differenti aree encefaliche.

L'espressione di ORX2R, misurata dai livelli di densità ottica (O.D.), in criceti CTRL BLA (trattati esclusivamente con soluzione salina) presenta una distribuzione paragonabile a quella osservata nei criceti CTRL (non sottoposti al trattamento stereotassico), per tutte le aree encefaliche considerate (Fig.40 A). Nel caso del CTRL Ce, si ha una distribuzione degli mRNA di ORX1R generalmente più bassa rispetto a quella misurata per CTRL, soprattutto a livello ippocampale ed amigdalare (Fig.40 B).



(A)



(B)

Fig. 40 Distribuzione (media±s.e.m.) dei livelli della O.D. di ORX2R in alcune aree limbiche che caratterizzano l'encefalo di criceto controllo (CTRL), CTRL BLA (A) e CTRL Ce (B).

4.1 Effetto di agonisti ORXergici e GABAergici (zolpidem agonista della subunità α_1 GABAergica) sulla trascrizione di ORX2R

Si è valutata la diversa espressione del ORX2R nei criceti, in diverse regioni encefaliche e si è osservata una condizione nettamente eterogenea nella maggior parte delle aree limbiche. La valutazione statistica condotta sui risultati ottenuti con l'ibridazione *in situ*, ha messo in evidenza la presenza di una differente espressione recettoriale a livello di differenti aree encefaliche.

In particolare si osserva una significativa differenza ($F_{(2,12)} = 20.23$ $p < 0.01$) di espressione dell'mRNA del ORX2R in particolari aree limbiche. Notiamo nella Fig. 41 A, nei trattati ORXA BLA e ORXA+ α_1 BLA, un'espressione del ORX2R a livello ippocampale ed ipotalamico, paragonabile al CTRL BLA. Per quanto riguarda l'espressione a livello dell'AMY si osserva una forte up-regulation del ORX1R nel trattato ORXA BLA (70%), mentre moderata, nel criceto trattato con ORXA+ α_1 BLA (35%).

Il grafico successivo (Fig. 41 B) evidenzia una moderata down-regulation dei livelli espressivi del ORX1R a livello ipotalamico nel trattato ORXB BLA (-33%), mentre, non si osservano variazioni significative negli altri animali analizzati.

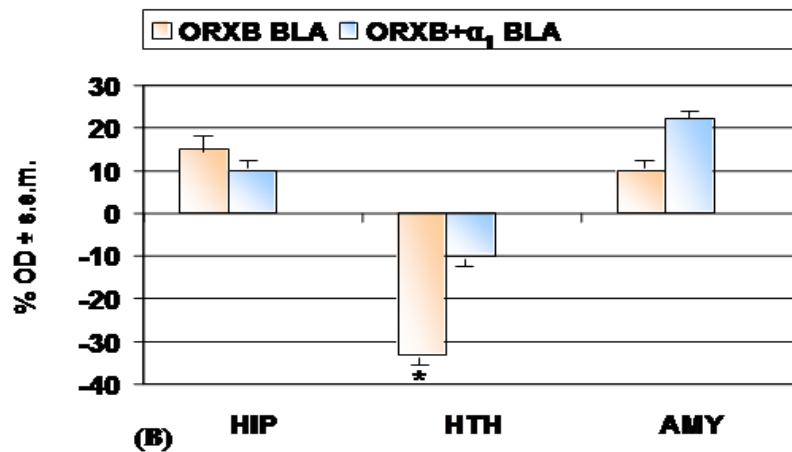
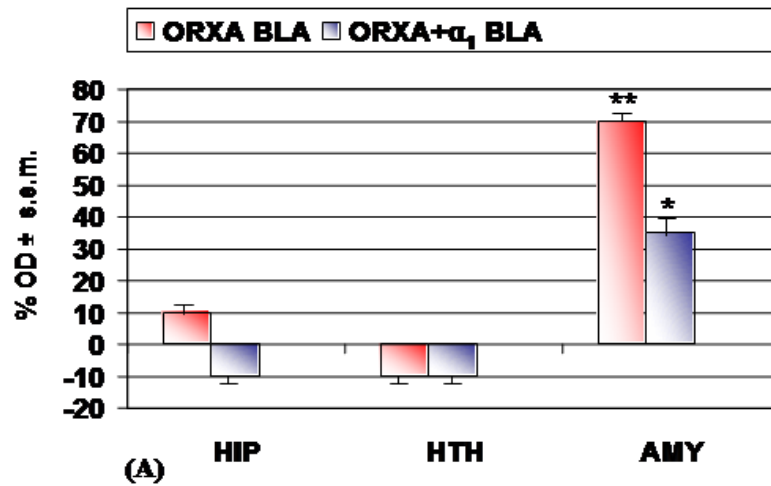
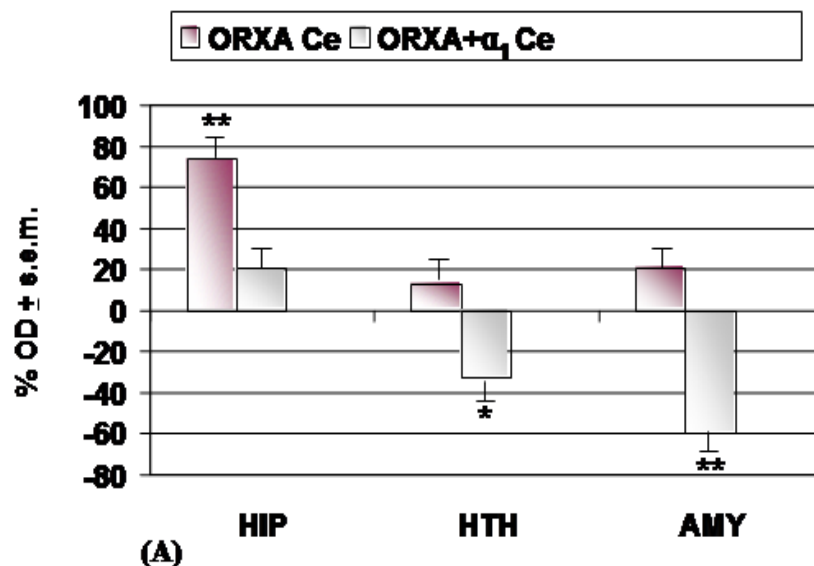


Fig. 41 Variazioni della trascrizione dell'mRNA del ORX2R evidenziati in gruppi di criceti trattati con ORXA BLA, ORXA+ α_1 BLA vs CTRL BLA (A) e trattati con

ORXB BLA, ORXB+ α_1 BLA vs CTRL BLA (B). I valori medi (media \pm s.e.m.) sono stati espressi in % e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls Test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto riguarda i livelli di trascrizione del ORX2R a livello del Ce, si può osservare nella Fig. 42 A una forte up-regulation a livello ippocampale nell'animale trattato con ORXA Ce (74%), mentre, notiamo nel trattato ORXA+ α_1 Ce, una moderata e forte down-regulation rispettivamente nell'HTH e nell'AMY (-33%; -60%). I livelli trascrizionali del ORX2R nel trattato ORXA Ce non risultano essere particolarmente rilevanti sia a livello dell'HTH (13%) che dell'AMY (21%).

Infine, nel grafico 42 B sono stati comparati i livelli di espressione del ORX2R nei trattati ORXB Ce, ORXB+ α_1 Ce vs CTRL Ce. Si osservano variazioni poco significative nei trattati ORXB Ce (10%) ed ORXB+ α_1 Ce (19%) nell'HIP, mentre, si nota una forte down-regulation nell'animale trattato con ORXB Ce sia a livello dell'HTH (-70%) che a livello dell'AMY (-42%). Per quanto riguarda i livelli trascrizionali del ORX1R nel trattato ORXB+ α_1 Ce, si evidenzia una moderata down-regulation nell'HTH (-31%) e nell'AMY (-42%).



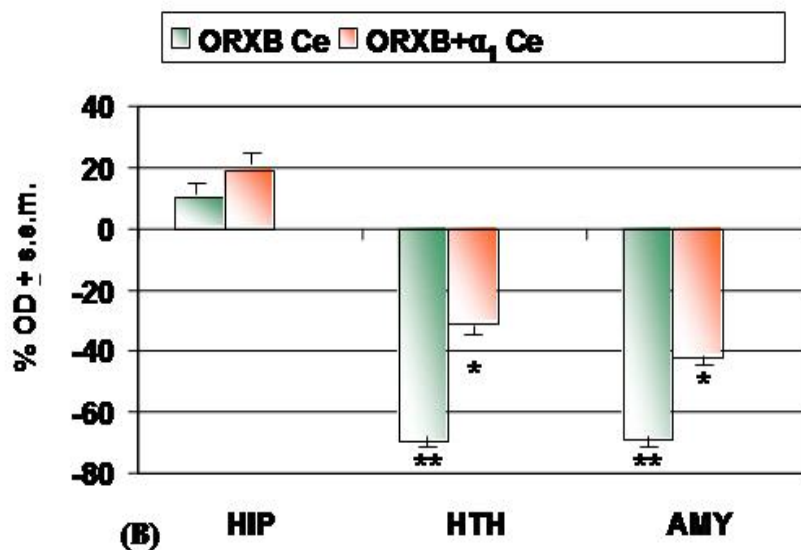


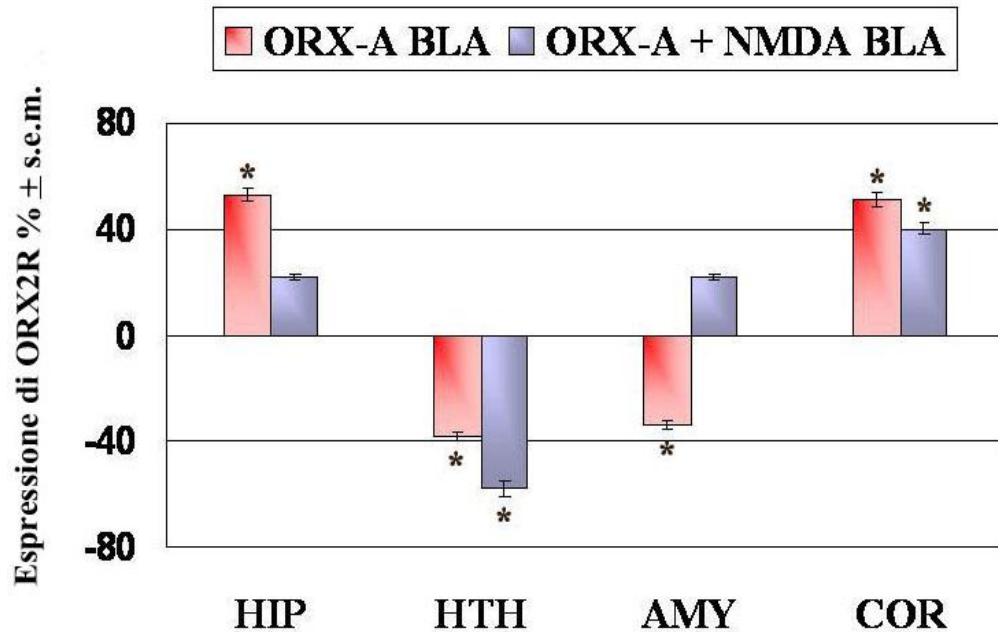
Fig. 42 Variazioni della trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziati in gruppi di criceti trattati con ORXA Ce, ORXA+α₁ Ce vs CTRL Ce (A) e trattati con ORXB Ce, ORXB+α₁ Ce vs CTRL Ce (B). I valori medi (media ± s.e.m.) sono stati espressi in % e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls Test* (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

4.2 Effetto di agonisti ORXergici e Gluergici (NMDA) sulla trascrizione di ORX2R

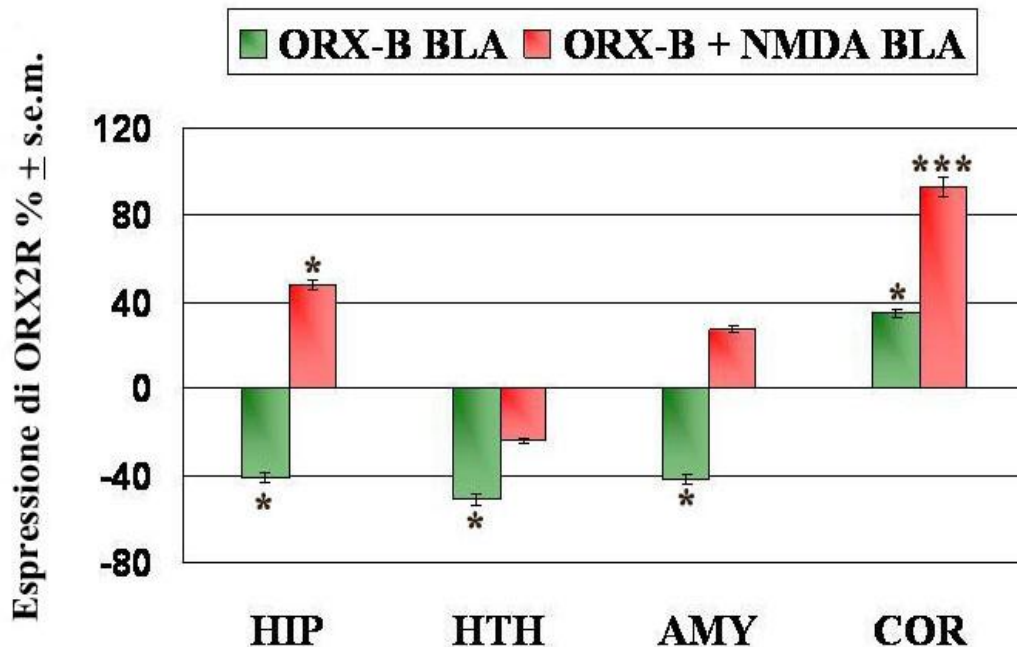
In questo lavoro di tesi si è valutata la diversa espressione del ORX2R in diverse regioni encefaliche di criceto e si è osservata una condizione nettamente eterogenea nella maggior parte delle aree limbiche. La valutazione statistica condotta sui risultati ottenuti con l'ISH, ha messo in evidenza la presenza di una differente espressione recettoriale a livello di diverse aree encefaliche.

In particolare si osserva una significativa differenza ($F_{(2,12)} = 20.23$ p<0.01) di espressione dell'mRNA del ORX2R in specifiche aree limbiche. Evidenziamo nella Fig. 43 A, nei trattati con ORX-A BLA una up-regulation moderata (53%) a livello ippocampale rispetto al controllo, mentre, per quanto riguarda l'espressione a livello ipotalamico, si osserva una moderata down-regulation del ORX2R sia nel trattato ORX-A BLA (-38%) che ORX-

A+NMDA BLA (-58%). Nell'AMY notiamo, invece, una down-regulation moderata esclusivamente nei gruppi ORX-A BLA (-34%). Osservando le variazioni trascrizionali nella COR, emerge una up-regulation moderata, sia nei trattati con ORX-A BLA (51%), che in quelli ORX-A+NMDA BLA (40%).



(A)

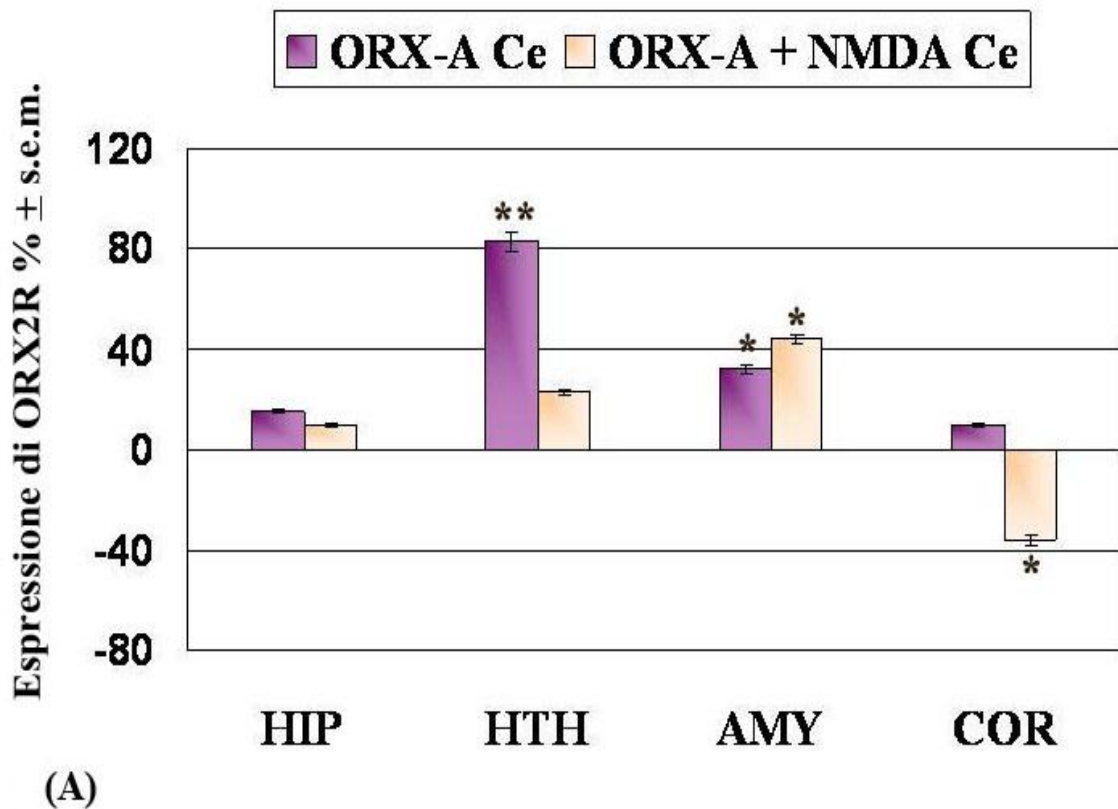


(B)

Fig. 43 Variazioni nella trascrizione dell'mRNA del ORX2R evidenziati in gruppi di criceti trattati con ORX-A BLA, ORX-A+NMDA BLA vs CTRL BLA (A) e trattati con ORX-B BLA, ORX-B+NMDA BLA vs CTRL BLA (B). I valori medi (media \pm s.e.m.) sono stati espressi in % e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA

sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls Test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Il grafico successivo (Fig. 43 B) evidenzia una moderata down-regulation dei livelli espressivi del ORX2R a livello ippocampale nel trattato ORX-B BLA (-41%) a differenza del criceto ORX-B+NMDA BLA che mostra livelli espressivi moderatamente up-regolati (48%). Per quanto riguarda i livelli trascrizionali ipotalamici ed amigdalari, si verifica una down-regulation moderata solo nei trattati con ORX-B BLA (-51%; -42%). In aggiunta, a livello della COR è emersa una up-regulation molto forte in seguito a trattamento con ORX-B+NMDA BLA (93%), mentre, nei criceti ORX-B BLA l'up-regulation corticale risulta moderata.



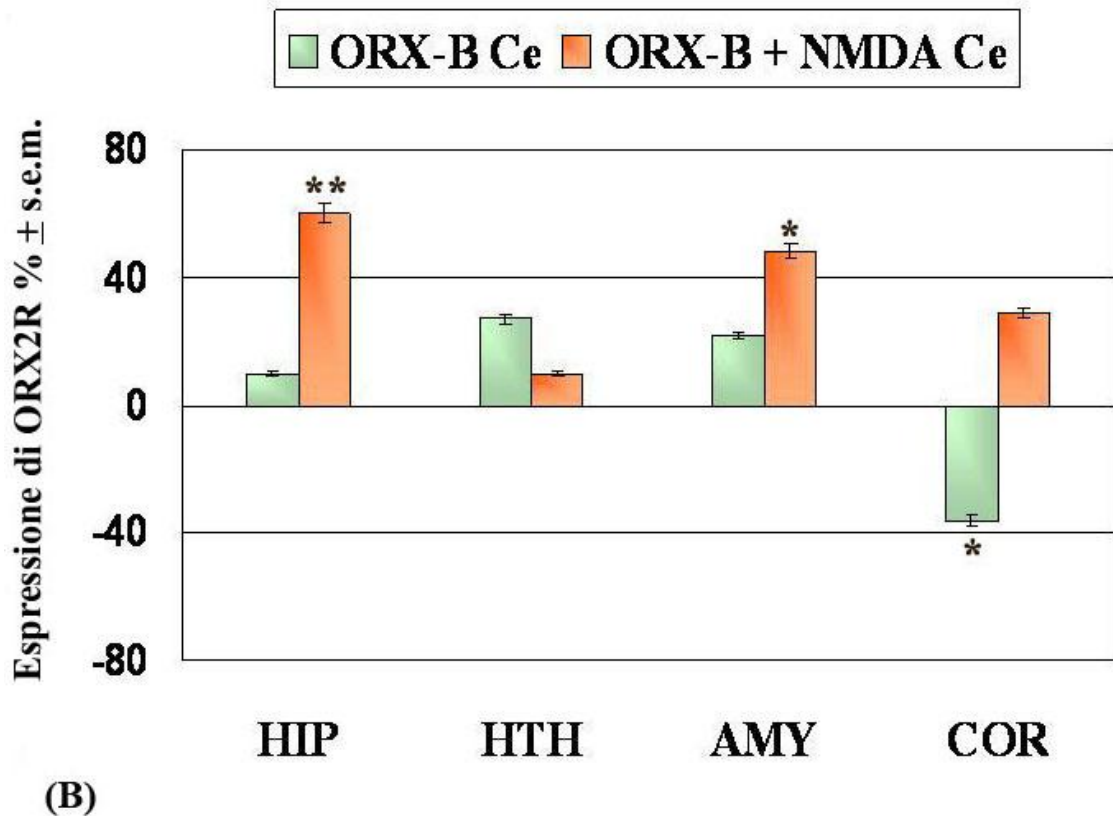


Fig. 44 Variazioni nella trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziati in gruppi di criceti trattati con ORXA Ce, ORXA+NMDA Ce vs CTRL Ce (A) e trattati con ORXB Ce, ORXB+NMDA Ce vs CTRL Ce (B). I valori medi (media \pm s.e.m.) sono stati espressi in % e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls Test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Nella figura 44 sono stati comparati i livelli di espressione di ORX2R nei trattati ORX-A Ce, ORX-A+NMDA Ce vs CTRL Ce e ORX-B Ce, ORX-B+NMDA Ce vs CTRL Ce. In modo particolare nel grafico 44 A osserviamo a livello ippocampale una up-regulation non significativa in entrambi i trattati con ORX-A Ce (15%) e ORX-A+NMDA Ce (10%). A livello ipotalamico si osserva, invece, una up-regulation significativamente forte esclusivamente nel gruppo ORX-A Ce (83%). Successivamente, si osserva nell'AMY, un'up-regulation moderata sia nei trattati con ORX-A Ce (32%) che con ORX-A+NMDA Ce (44%), mentre, a livello della COR notiamo una down-regulation moderata solo in ORX-A+NMDA Ce (-36%).

Nel grafico 44 B, viene invece messa in evidenza un'esclusiva up-regulation, nella trascrizione di ORX2R, forte a livello ippocampale e moderata nell'AMY in seguito a trattamento con ORX-B+NMDA Ce (+60%; +48%). Si nota, inoltre, che i criceti trattati con ORX-B Ce presentano una moderata down-regulation (-36%) solo a livello corticale.

4.3 Effetto di agonisti ORXergici e GABAergici (flunitrazepam agonista della subunità α_2 GABAergica) sulla trascrizione di ORX2R

Come detto in precedenza le azioni delle ORXs sono mediate da due tipi recettoriali, ORX1R e ORX2R, dei quali il primo lega con un'affinità dieci volte superiore l'ORX-A rispetto all'ORX-B, mentre il ORX2R tende a legarsi ad entrambi i recettori ORXergici con uguale affinità. In particolare, il tipo ORX2R è localizzato nelle cellule basofile dell'ipofisi le quali coesprimono l'ACTH responsabile del rilascio di glucocorticoidi o ormoni dello stress dalla corteccia surrenale. Alla luce di tali considerazioni e della dimostrazione che i maggiori target delle ORXs sono neuroni GABAergici la cui normale attività inibitoria dipende fortemente dalle α subunità fra le quali l' α_2 mostra effetti ansiolitici, l'interazione tra l'ORX2R/ α_2 potrebbe rappresentare un importante target neuronale per individuare non solo un probabile ruolo dell'ORX nelle risposte allo stress ma anche nei fenomeni di ricompensa alla base della plasticità cerebrale. Pertanto, si è proceduto alla valutazione dell'espressione recettoriale di ORX2R mediante ISH utilizzando una sonda oligonucleotidica specifica per questo tipo recettoriale.

I trattamenti con ORX-A, ORX-B e FLU inducono una up-regulation dell'mRNA di ORX2R nelle diverse aree prese in considerazione (Fig. 45).

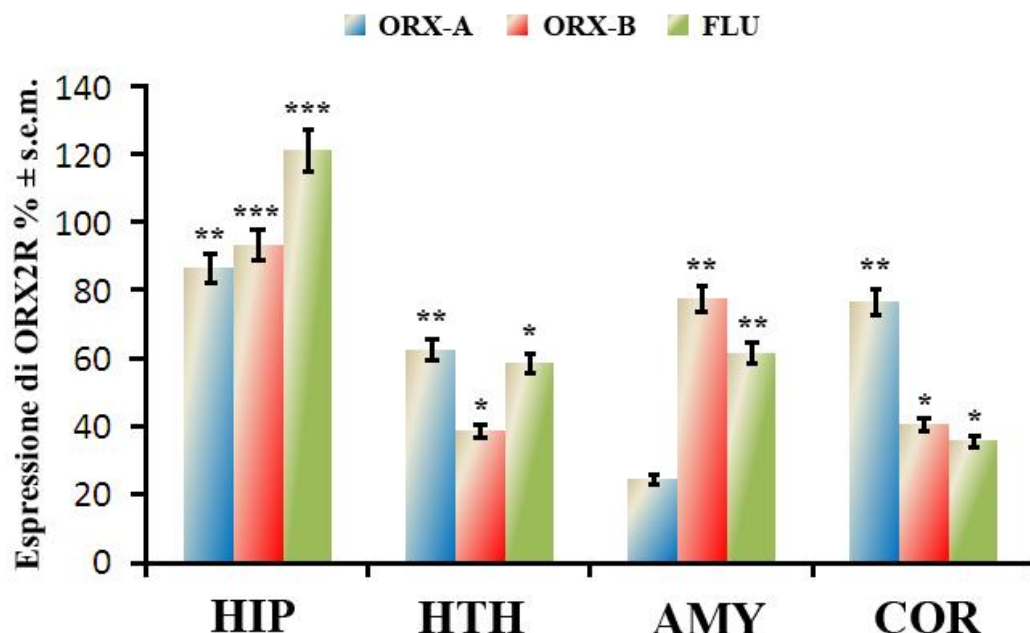


Fig. 45 Variazioni nella trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziate in gruppi di criceti trattati nel nucleo Ce con ORX-A, ORX-B e FLU. Le letture all'analizzatore, in doppio, sono state ripetute almeno 5 volte su ogni area encefalica considerata e i dati vengono riportati come % \pm s.e.m. dei valori medi calcolati nei gruppi di trattamento rispetto ai CTRs. Statistica: ANOVA e *Neumann Keuls Test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

In particolare in seguito al trattamento con ORX-A è stata osservata una forte up-regulation nella regione ippocampale (+87%), nell'HTH (+63%) e nella COR (+77%). Nei criceti trattati con ORX-B è stata rilevata una up-regulation molto forte (+94%) nell'HIP, forte (+78%) nell'AMY e moderata nei nuclei ipotalamici (+39%) e nella COR (+41%). Infine, la somministrazione di FLU determina un aumento molto forte nell'espressione di ORX2R (+122%) nell'HIP, forte (+65%) a livello dell'AMY e moderata sia nell'HTH (+59%) che nella COR (+36%; Fig. 45).

In un secondo momento, al fine di stabilire se gli effetti comportamentali indotti dal cross-talking tra il sistema ORXergico e quello GABAergico possano essere correlati a variazioni nell'espressione dell'mRNA dell'ORX2R, sono stati valutati gli effetti trascrizionali del cotrattamento con FLU. A tale scopo i livelli di espressione sono stati confrontati nei criceti trattati con ORX-B o ORX-A rispetto a quelli osservati nei criceti trattati con ORX-A e -B \pm FLU. Anche da tale confronto sono emersi dati paragonabili a quelli ottenuti dalle nostre precedenti valutazioni comportamentali che evidenziano maggiormente l'effetto ansiogenico indotto dalle ORXs.

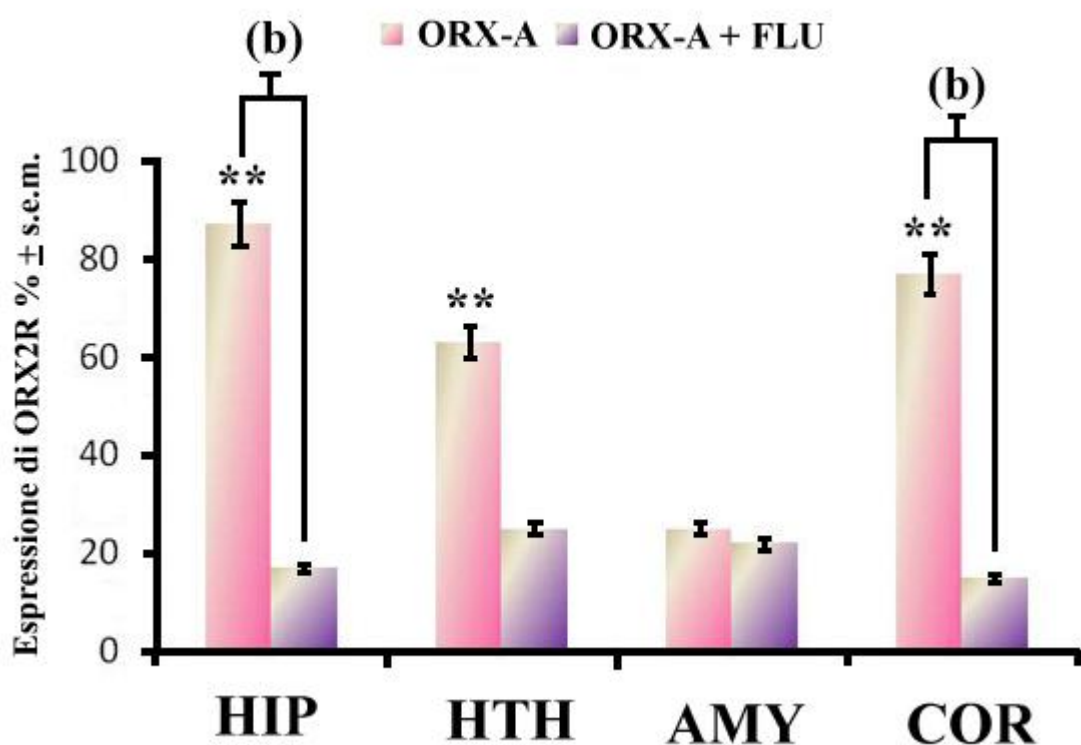


Fig. 46 Variazioni nella trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziate in gruppi di criceti trattati nel nucleo Ce con ORX-A ed ORX-A+FLU. Le letture all'analizzatore, in doppio, sono state ripetute almeno 5 volte su ogni area encefalica considerata e i dati vengono riportati come % \pm s.e.m. dei valori medi calcolati nei gruppi di trattamento rispetto ai CTRs. Statistica: ANOVA e *Neumann Keuls Test* (* $p < 0.05$;

**** p<0.01; *** p<0.001 rispetto ai CTRs. a, * p<0.05; b, ** p<0.01; c, *** p<0.001 rispetto al cotrattamento con FLU.**

Al contrario, il FLU antagonizza l'azione delle ORXs esercitando dunque un effetto ansiolitico. In particolare, la forte up-regulation dei livelli di espressione di ORX2R osservata a livello dell'HIP (+87%), dell'HTH (+63%) e della COR (+77%) nei criceti trattati con ORX-A rispetto ai CTRs risulta ridotta in maniera molto significativa ($p<0.01$) nei criceti che hanno subito il cotrattamento con FLU nell'HIP e nella COR (Fig. 46).

Infine, quando lo stesso tipo di valutazione è stata effettuata nei criceti trattati con ORX-B è stato possibile constatare che l'up-regulation dei livelli di espressione di ORX2R molto forte a livello dell'HIP (+94%) nei criceti trattati con ORX-B rispetto ai CTRs è ridotta in maniera molto significativa ($p<0.01$) nei criceti che hanno subito il cotrattamento con FLU. Tale effetto si osserva anche a livello dell'AMY (+78%) e della COR (+41%) dove però la moderata up-regulation di ORX2R rispetto ai CTRs risulta moderatamente significativa ($p<0.05$) anche rispetto a cotrattamento con FLU (Fig. 47).

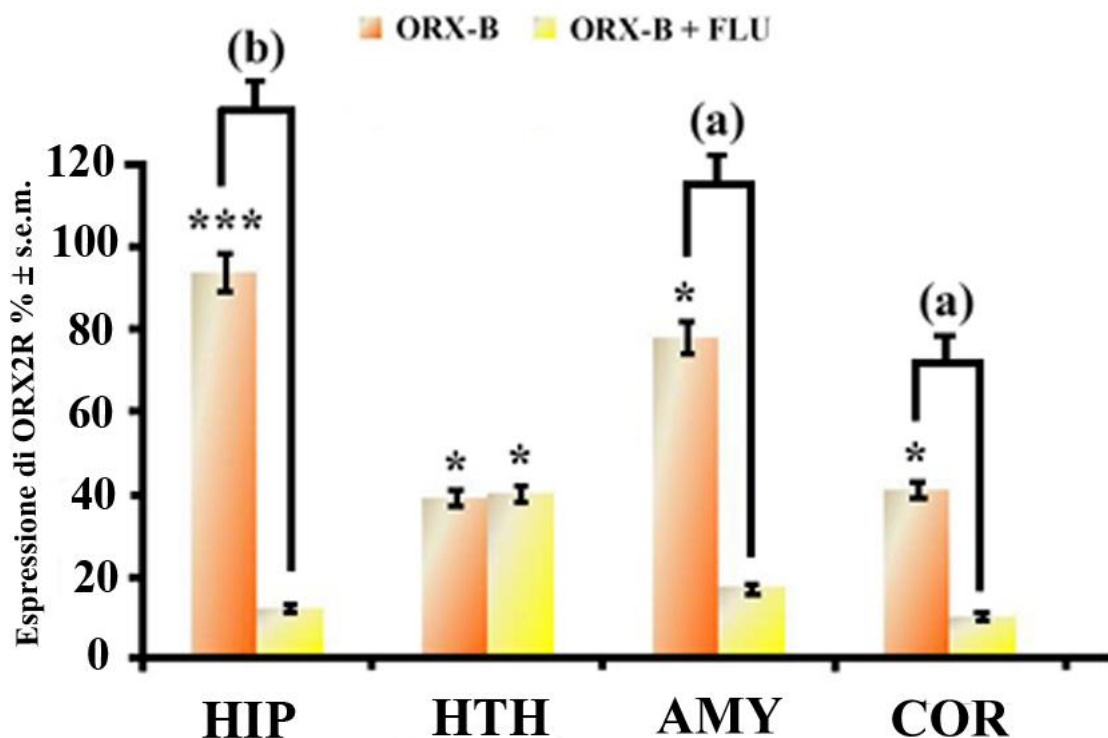


Fig. 47 Variazioni nella trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziati in gruppi di criceti trattati nel nucleo Ce con ORX-B e ORX-B+FLU. Le letture all'analizzatore, in doppio, sono state ripetute almeno 5 volte su ogni area encefalica considerata e i dati vengono riportati come % \pm s.e.m. dei valori medi calcolati nei gruppi di trattamento rispetto ai CTRs. Statistica: ANOVA e *Neumann Keuls Test* (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ rispetto ai CTRs. a, * $p<0.05$; b, ** $p<0.01$; c, *** $p<0.001$ rispetto al cotrattamento con FLU.

In conclusione, le variazioni nella trascrizione dell'mRNA di ORX2R evidenziate nei differenti gruppi di criceti trattati nel nucleo Ce dell'AMY con ORX-A, ORX-B \pm FLU pur dimostrando un effetto ansiogenico per entrambe le ORXs sembrano tuttavia indicare per l'ORX-B un ruolo di maggiore importanza nel regolare l'attività di circuiti neuronali coinvolti nella modulazione dell'ansia nonché nel controllo di attività locomotorie ad essa correlata.

4.4 Valutazione neuroanatomica

L'analisi neuroanatomica ci ha permesso di evidenziare in primo luogo mediante la colorazione con la tionina l'esattezza del sito di iniezione (Fig. 48) da noi prescelto.

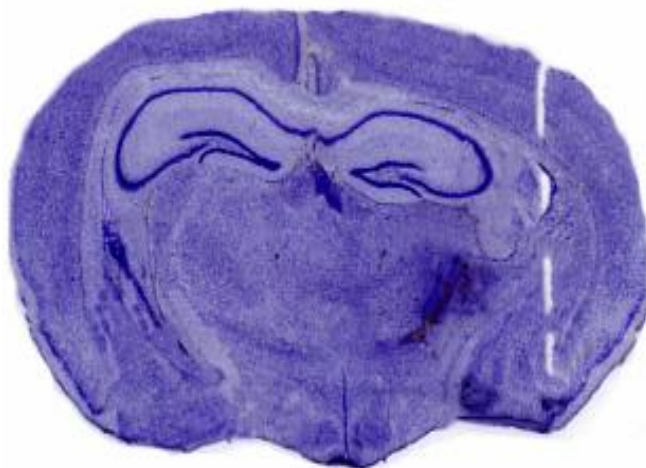


Fig. 48 Sezioni di criceto colorata con Tionina dove si evidenzia il passaggio dell'ago all'interno dell'encefalo nell'area da noi considerata.

In un secondo momento, l'applicazione della tecnica istologica ACS ha fornito dati che riflettono quanto rilevato in precedenza mediante lo studio comportamentale sull'azione ansiogenica del sistema ORXergico nel criceto. Innanzitutto, l'applicazione di tale tecnica ci ha consentito di dimostrare che nei criceti CTRs non vi è alcuna degenerazione neuronale e la possibilità di visualizzare dove i neuroni sono maggiormente addensati come ad esempio negli strati dell'HIP e dell'AMY. I trattamenti con ORX-A e ORX-B hanno invece indotto nei criceti uno stress che si traduce in una degenerazione neuronale a livello del nucleo abenulare ippocampale (Fig. 49 c,d) e dell'AMY (Fig. 49 e, f). In tali aree è stata infatti rilevata una evidente colorazione argirofilica. Anche il cotrattamento ORX-A e FLU ha indotto una degenerazione neuronale come si evince dalla presenza di alcuni campi neuronali alterati (marcati di nero) nell'HIP (Fig. 49 g). Tuttavia, tali tracce argentofiliche sono meno evidenti rispetto a quelle indotte dal singolo trattamento con

ORX-A. Tracce molto meno significative di argirofilia indotte dal cotrattamento con ORX-B e FLU sono invece osservabili a livello dell'AMY dove, in complesso, è visibile una più omogenea colorazione arancio per la deposizione del rame (Fig. 49 h).

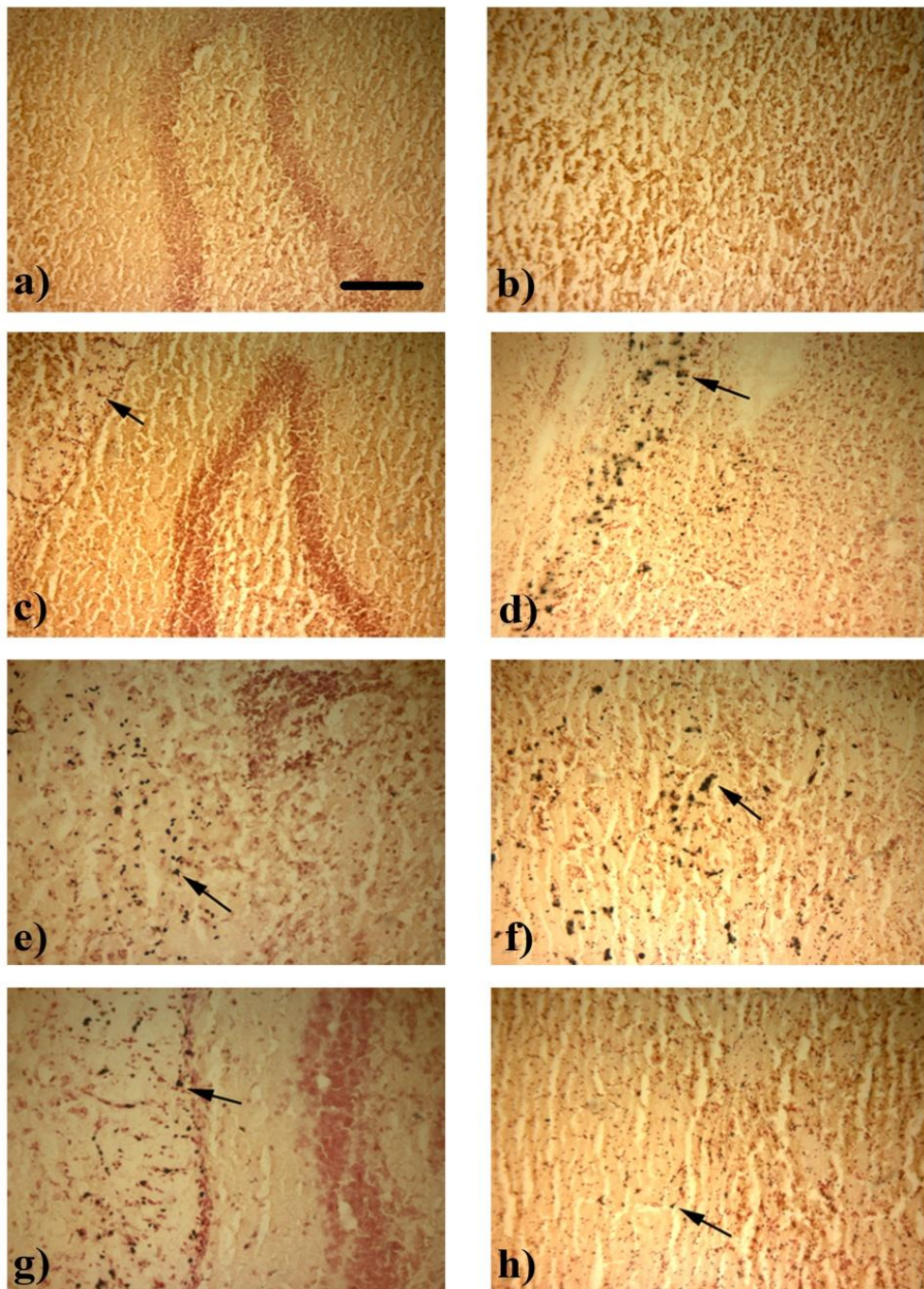


Fig. 49 Processi neurodegenerativi in alcune aree encefaliche di criceto. Fotogramma rappresentativo di ACS che mostra differenti zone di colorazione nera corrispondenti ai siti di neurodegenerazione a livello del nucleo abenulare dell'HIP in animali trattati con ORX-A (c) e ORX-B (d; n=3) ed a livello dell'AMY in animali trattati con ORX-A (e) e ORX-B (f; n=3). In aggiunta una lieve neurodegenerazione si osserva anche nel nucleo abenulare dell'HIP (g) che è ancor meno evidente nell'AMY (h) in seguito al cotrattamento con ORX-A+flunitrazepam e ORX-B+flunitrazepam (n=3), rispettivamente, di criceti trattati rispetto ai criceti CTRs (a, b; n=3). Scale bar (a, c, d)=60 μ m; scale bar (b, e-h)=40 μ m.