



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XX CICLO

***“Effetti del Rolipram sul modello di ratto QA e su topo
transgenico R6/2: studi neuroanatomici”***

Zena De March

Tutor: Dr.ssa F.R. Fusco

Coordinatore: Prof. A. Pisani

INDICE

INTRODUZIONE	9
1. SINTOMATOLOGIA	9
1.1 <i>SINTOMI FISICO/MOTORI</i>	9
1.2 <i>SINTOMI PSICHICI</i>	10
2. CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE	11
2.1 <i>CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DEI GANGLI DELLA BASE</i>	11
2.2 <i>ALTERAZIONI MACROSCOPICHE</i>	13
2.3 <i>ALTERAZIONI MICROSCOPICHE</i>	15
3. EZIOPATOGENESI	18
4. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE NELL'HUNTINGTON'S DISEASE	20
4.1 <i>ACQUISIZIONE DI FUNZIONE DA PARTE DELL'HUNTINGTINA MUTATA/FORMAZIONE DI AGGREGATI</i>	20
4.2 <i>ATTIVAZIONE DEL PROCESSO APOPTOTICO</i>	24
4.3 <i>DANNO MITOCONDRIALE/STRESS OSSIDATIVO/ECCITOTOSSICITÀ</i>	25
4.4 <i>DEPRIVAZIONE DI FATTORI DI CRESCITA</i>	27

5. DIAGNOSI E TERAPIA.....	29
6. MODELLI ANIMALI DI HD.....	31
6.1 <i>MODELLO DA LESIONE CON ACIDO QUINOLINICO.....</i>	<i>31</i>
6.2 <i>MODELLI MURINI TRANSGENICI.....</i>	<i>33</i>
6.2.1 <i>Modelli di Mangiarini.....</i>	<i>33</i>
7. ROLIPRAM E SCOPO DELLA RICERCA.....	35
 <i>MATERIALI E METODI.....</i>	 38
 1. 5. MODELLO DA LESIONE CON QA	 39
1.1 <i>CHIRURGIA E SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO.....</i>	<i>39</i>
1.2 <i>SACRIFICIO.....</i>	<i>39</i>
1.3 <i>VALUTAZIONE DELLA LESIONE STRIATALE E SOPRAVVIVENZA NEURONALE.....</i>	<i>40</i>
 2. TOPO TRANSGENICO R6/2.....	 41
2.1 <i>COLONIA E GENOTIPIZZAZIONE.....</i>	<i>41</i>
2.2 <i>SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO.....</i>	<i>43</i>
2.3 <i>VALUTAZIONE DEI DEFICIT NEUROLOGICI.....</i>	<i>43</i>
2.4 <i>STUDI ISTOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI: PROCESSAMENTO DEL TESSUTO.....</i>	<i>44</i>
2.4.1 <i><u>Immunoistochimica</u>.....</i>	<i>44</i>
a. <i>Valutazione del volume dell'encefalo.....</i>	<i>44</i>

<i>b. Sopravvivenza neuronale.....</i>	44
<i>c. Area dei neuroni striatali.....</i>	45
<i>d. Morfologia microgliale.....</i>	46
<i>e. Corpi di inclusione intranucleare.....</i>	46
3. ANALISI STATISTICA.....	47
<i>RISULTATI.....</i>	48
1. MODELLO DA LESIONE CON QA	48
<i>1.1 DEGENERAZIONE NEURONALE.....</i>	48
<i>a. Valutazione della lesione striatale.....</i>	48
<i>b. Sopravvivenza neuronale.....</i>	48
2. TOPO TRANSGENICO R6/2.....	49
<i>2.1 SOPRAVVIVENZA E PESO CORPOREO.....</i>	49
<i>2.2 VALUTAZIONE DEI DEFICIT NEUROLOGICI.....</i>	49
<i>2.3 NEUROPATOLOGIA.....</i>	49
<i>a. Valutazione del volume dell'encefalo</i>	49
<i>b. Sopravvivenza neuronale</i>	50
<i>c. Area dei neuroni striatali.....</i>	50
<i>d. Morfologia microgliale</i>	51
<i>e. Corpi di inclusione intranucleare.....</i>	51
<i>DISCUSSIONE.....</i>	52

***IMMAGINI E GRAFICI*..... 56**

1. MODELLO DA LESIONE CON QA..... 56

FIG 1.1 56

FIG 1.2 57

FIG 1.3 58

2. TOPO TRANSGENICO R6/2..... 59

FIG 2.1 59

FIG 2.2 60

FIG 2.3 61

FIG 2.4 62

FIG 2.5 63

FIG 2.6 64

FIG 2.7 65

FIG 2.8 66

FIG 2.9 67

***BIBLIOGRFIA*..... 68**

INTRODUZIONE

La malattia di Huntington (Huntington Disease HD) è la forma più importante di corea ereditaria: malattia autosomica dominante con penetranza completa, la cui prevalenza nelle popolazioni di origine caucasica può raggiungere i 10 casi per 100.000 abitanti (Quinn e Schrag, 1998).

1. SINTOMATOLOGIA

I sintomi della malattia cominciano in modo insidioso solitamente tra i 35 e i 50 anni ed il decorso è lentamente progressivo e fatale dopo circa 15-20 anni dall'esordio. La malattia può cominciare a qualsiasi età, può avere un esordio giovanile con un decorso più rapido (7-10 anni), mentre nelle forme tardive la sintomatologia clinica e le alterazioni neuropatologiche sono meno severe (Vonsattel et al., 1985; Quinn e Schrag, 1998).

1.1 SINTOMI FISICO/MOTORI

La malattia si manifesta con una tipica sintomatologia motoria, psichica ed intellettiva (Went et al. 1984). Il paziente non riesce a stare fermo né in piedi né seduto, né a mantenere gli arti superiori protesi o la lingua protrusa per più di un minuto: è agitato da rapidi movimenti di flessione-estensione o deviazione delle mani e dei piedi, da oscillazioni pluridirezionali del tronco e dondolio del bacino, dando l'impressione di essere impegnato in una danza bizzarra. I movimenti coreici non sono tuttavia ritmici, essi sono caratterizzati da scoppi improvvisi seguiti da intervalli di minore attività o di

riposo; possono essere presenti solo a livello della muscolatura del viso, o anche a livello distale degli arti o essere quasi continui e quasi generalizzati a tutto il corpo. L'attività manuale, il linguaggio e la deambulazione, aggravano l'intensità e l'estensione dei movimenti coreici, rimanendone a loro volta profondamente compromessi. Nel corso della malattia ai movimenti coreici si accompagnano dei movimenti distonici del tronco e degli arti.

Accanto alla più comune forma clinica di tipo ipercinetico-iponormotonico, si può osservare in meno del 5% dei casi una forma acinetica-rigida sia come forma primaria, sia come stadio terminale, della forma precedente (còrea rigida di tipo Westphal) (Went et al. 1984).

1.2 SINTOMI PSICHICI

Negli stadi iniziali della malattia le funzioni cognitive cominciano ad essere compromesse da un rallentamento dei processi ideativi e da un'alterazione quasi selettiva della memoria remota, mentre la capacità di acquisire nuove informazioni è relativamente conservata. I disturbi cognitivi si aggravano progressivamente fino a configurare il quadro di una grave demenza (Went et al. 1984). Molto frequenti sono i disturbi della personalità, che possono precedere di molti anni la comparsa delle disfunzioni motorie (Speedie et al., 1990). Osservati nel 38% dei pazienti, i disturbi dell'umore non sono distribuiti in modo casuale tra i pazienti, ma sono concentrati in particolari gruppi familiari. La depressione in questi pazienti, con il 5-10% di suicidi non rappresenta soltanto la comprensibile reazione ad una malattia fatale, giacché il 10% dei casi sviluppa episodi maniaco-depressivi.

2. CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE

2.1 CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DEI GANGLI DELLA BASE.

I gangli della base sono un gruppo di nuclei di sostanza grigia costituiti da: nucleo caudato e putamen (striato dorsale o neostriato NS), il segmento interno e quello esterno del globo pallido (GPi e GPe), la pars reticulata e quella compacta della sostanza nera (SNr e SNc) ed il nucleo subtalamico. Il neostriato è la sede principale delle afferenze ai gangli della base, ricevendo fibre da tutta la corteccia cerebrale e dai nuclei intralaminari del talamo. La principale via d'uscita dai gangli della base è rappresentata dal segmento interno del globo pallido e dalla pars reticulata della sostanza nera verso i nuclei talamici ventrale anteriore e ventrale laterale (VA e VL), che a loro volta proiettano alla corteccia premotoria (PMC), all'area motoria supplementare (SMA) ed alla corteccia prefrontale. Vi è, inoltre, una proiezione coinvolta nella locomozione al tronco dell'encefalo, specialmente al nucleo peduncolo-pontino (PPN), ed una coinvolta nei movimenti oculari, al collicolo superiore. I nuclei caudato e putamen sono costituiti per il 90% da neuroni di media grandezza (15-20 μm in diametro) (Fig.2) denominati spinosi perché caratterizzati da una ricca arborizzazione dendritica provvista di innumerevoli spine, i quali proiettano al globo pallido e alla sostanza nera, esercitando un'azione inibitoria (Gerfen, 1992; Parent and Hazrati, 1993). Tutti i neuroni striatali di proiezione contengono, infatti, il neurotrasmettitore inibitorio acido γ -amminobutirrico (GABA), ma questi non sono omogenei poiché alcuni contengono anche metaenkefalina e

proiettano al globo pallido esterno, mentre altri contengono anche sostanza P e proiettano al globo pallido interno ed alla sostanza nera.

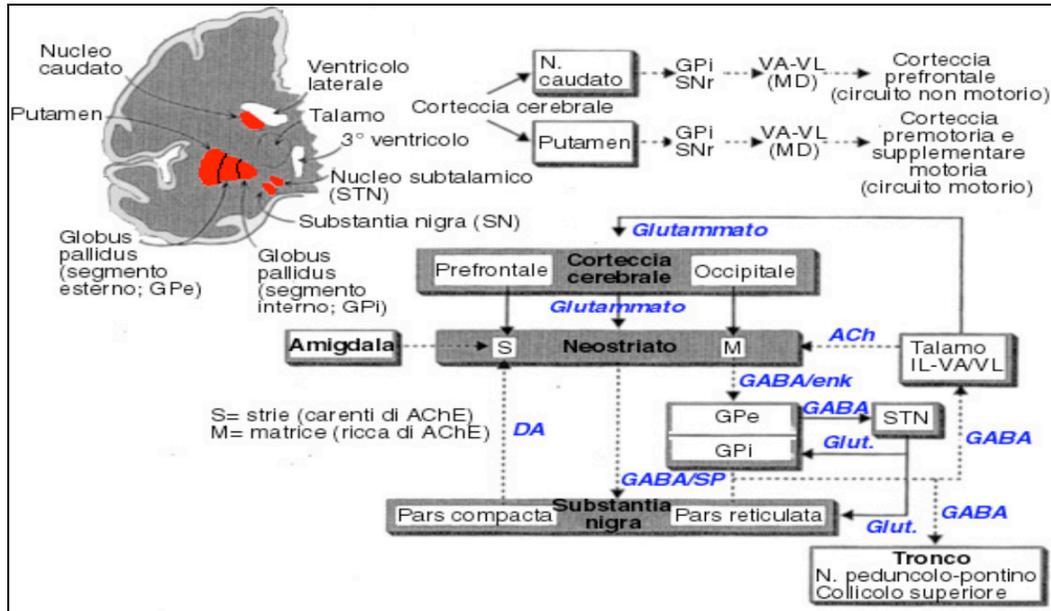


Fig.1 Circuito dei gangli della base (“Fondamenti di Neuroscienze e del comportamento” casa editrice Ambrosiana 1999).

Il restante 10% di neuroni striatari è costituito da neuroni di grandezza variabile, ma tutti caratterizzati da dendriti poveri di spine e quindi a superficie liscia, i quali costituiscono una popolazione eterogenea di interneuroni, con assoni brevi che rimangono interni allo striato, contenenti colina acetil transferasi (ChAT), o parvalbumina, somatostatina, neuropeptide Y, ossido nitrico sintetasi (NOS), NADPH diaforasi. I neuroni ChAT positivi sono di grandi dimensioni (30-50µm), mentre somatostatina, neuropeptide Y, NOS e NADPH solitamente coesistono all'interno degli stessi interneuroni striatari e sono di medie dimensioni (20 µm di diametro) (Figueredo-Cardenas et al., 1997; Calabresi et al., 2000).

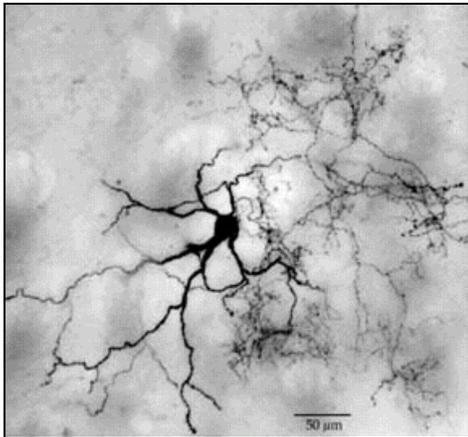


Fig. 2 Neurone di proiezione striatale di tipo spiny (Anthony E. et al. 1998)

2.2 ALTERAZIONI MACROSCOPICHE

Le alterazioni patologiche si sviluppano prima dell'inizio delle manifestazioni cliniche dell' HD, come può essere dimostrato dallo studio *in vivo* in pazienti presintomatici (Grove et al. 2003). Con studi effettuati utilizzando la risonanza magnetica è stato dimostrato che in soggetti adulti e clinicamente sani ma con un test genetico predittivo positivo per HD è già presente una significativa riduzione del volume della sostanza grigia della testa e del corpo del nucleo caudato di sinistra, del putamen e del globo pallido bilateralmente, dell'insula bilateralmente, del solco intraparietale bilateralmente e del mesencefalo dorsale, oltre che una significativa riduzione della sostanza bianca periventricolare. Pertanto il processo patologico dell'HD si manifesta fin dalle fasi iniziali come un processo politopico, suggerendo che non tutti i deficit cognitivi e motori propri della malattia siano imputabili ad un disfunzione isolata del caudato-putamen (Thieben et al., 2002; Barquero-Jimenez MS et al., 2001). L'atrofia della corteccia insulare è ipotizzata come responsabile della specifica perdita dell'esperienza olfattiva. All'atrofia della corteccia a livello del solco

intraparietale vengono imputati i disturbi dei movimenti oculari, i deficit dell'attenzione e delle capacità visivo-spaziali. Le precoci alterazioni che si instaurano a carico del caudato dorso-mediale e delle sue connessioni con il sistema limbico possono essere responsabili dei gravi disturbi psichiatrici che si manifestano nei pazienti huntingtoniani.

In fase clinica conclamata l'esame macroscopico dell'encefalo umano dimostra un ispessimento delle meningi ed una atrofia corticale moderata con assottigliamento delle circonvoluzioni soprattutto a livello frontale: conseguentemente il peso dell'encefalo a fresco può essere inferiore a 1000g (Roos, 1986). Le regioni più evidentemente colpite nel corso della malattia sono il nucleo caudato ed il putamen, che vanno incontro ad un intenso processo di atrofia con dilatazione dei corni frontali dei ventricoli laterali, i quali assumono nei casi più avanzati l'aspetto caratteristico ad ali di farfalla (Fig. 3). Sebbene si abbiano alterazioni strutturali dell'encefalo il processo di degenerazione neuronale negli studi autoptici sembra procedere dalle regioni caudali dello striato a quelle rostrali seguendo un gradiente dorso/ventrale e medio/laterale; al contrario negli studi in vivo nelle forme precliniche la riduzione di volume dello striato sembra essere concentrata rostralmente e centralmente (Roos, 1986; Gomez-Tortosa et al., 2001). Nelle sezioni coronali si osserva una marcata atrofia della testa del nucleo caudato, associata ad atrofia della sostanza grigia sottocorticale, del putamen, del globo pallido e del talamo, oltre che ad una generalizzata riduzione di volume della sostanza bianca, come chiaramente dimostrato da un assottigliamento del corpo calloso (Roos, 1986).

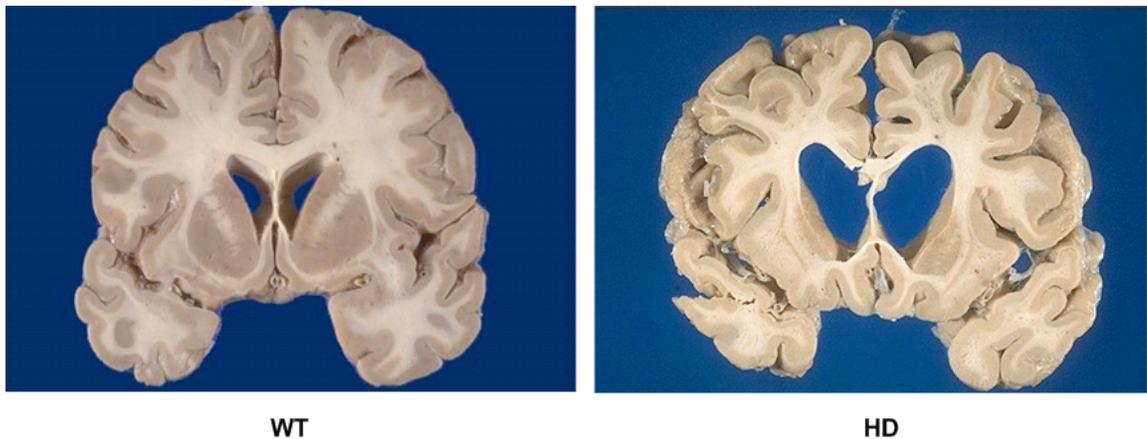


Fig. 3 *Encefalo umano WT e affetto da HD. Nell'encefalo HD si nota una marcata atrofia del nucleo caudato unitamente all'espansione dei ventricoli laterali (Dunnett et al. 2000).*

2.3 ALTERAZIONI MICROSCOPICHE

L'esame istologico dimostra che il processo di atrofia è selettivo per alcuni tipi neuronali, mentre altri tipi neuronali appaiono sopravvivere anche nelle fasi più avanzate della malattia. Nella corteccia cerebrale si osserva perdita neuronale e gliosi astrocitaria, limitatamente agli strati III°, V° e VI°. Nel talamo è colpita la parte ventrolaterale con una perdita di circa il 50% dei neuroni di piccole dimensioni, mentre i grandi neuroni talamici sono leggermente ridotti di grandezza ma non di numero (Roos, 1986; Hedreen et al., 1991; Sotrel et al., 1991). Le lesioni microscopiche dello striato sono caratterizzate da una perdita selettiva dei neuroni spinosi di proiezione, mentre gli interneuroni giganti colinergici sono sostanzialmente risparmiati (Ferrante et al., 1986, 1987ab).

I neuroni striatali degenerano secondo un ordine fisso, essendo primariamente colpiti i neuroni contenenti GABA/metaenkefalina, seguiti dai neuroni contenenti GABA/sostanza P, mentre due principali tipi di interneuroni striatali contenenti ChAT, o NOS, somatostatina e

neuropeptide Y appaiono in tutto o in parte risparmiati anche nelle fasi più avanzate della malattia (Albin et al., 1988; Ferrante et al., 1987ab).

Questi dati di immunocitochimica fanno supporre che i movimenti coreici siano il risultato di un processo di danno selettivo a carico dei neuroni contenenti enkefalina, con conseguente riduzione dell'azione inibitoria da parte dello striato sul globo pallido esterno. Il globo pallido esterno, caratterizzato anch'esso dalla presenza di neuroni contenenti GABA, non più inibito dalle proiezioni striatali enkefalinergiche risulta a sua volta iperattivo nell'inibire la struttura con cui è principalmente connesso cioè il nucleo subtalamico di Luys. Il nucleo subtalamico risulterebbe così funzionalmente quiescente e ridurrebbe la sua azione eccitatoria glutammatergica sul globo pallido interno, che sarebbe in tal modo scarsamente attivo nell'inibire il talamo e la sua eccitazione della corteccia motoria, determinando il quadro fisiopatologico della danza (Albin et al., 1989). Le forme acinetico-rigide tipo Westphal sono invece considerate la conseguenza di un coinvolgimento sia dei neuroni contenenti enkefalina sia sostanza P, con conseguente riduzione dell'input striatale inibitorio rispettivamente sul globo pallido esterno e interno (Albin et al., 1990).

Alla perdita di neuroni nello striato si accompagna un grado variabile di astrocitosi, particolarmente evidente nel nucleo caudato. Il normale rapporto 1 neurone/3,5 astrociti, cambia in 1/10 nell'HD. Tale aumento di astrociti può essere in parte primitivo, ma soprattutto secondario alla perdita massiva di neuroni (Roos, 1986).

In fase preclinica non si osservano nei neuroni striatali alterazioni ultrastrutturali caratteristiche del processo che conduce alla morte ed alla perdita dei neuroni (Roos, 1986). Questo suggerisce che la sintomatologia

clinica e la disfunzione dei circuiti striato-pallidali precedano sia il danno microscopico sia la perdita dei neuroni striatali (Gomez- Tortosa et al., 2001). Confrontando la sintomatologia clinica con il grado di atrofia striatale Vonsattel e coll. (1985) hanno proposto, per la valutazione della severità del danno anatomopatologico, un'utile scala da 0 a 4, qui di seguito riportata.

- Grado 0: assenza di atrofia macroscopica nello striato perdita neuronale iniziale non associata ad astrocitosi. (< 40%).
- Grado 1: assenza di atrofia macroscopica del caudato, con perdita neuronale, lieve aumento degli astrociti nella parte mediale del caudato e nella parte dorsale del putamen.
- Grado 2: atrofia macroscopica dello striato, che ancora conserva il suo margine convesso, con perdita neuronale evidente nella testa, corpo e coda del caudato e nella parte dorsale del putamen associata ad astrocitosi.
- Grado 3: atrofia striatale evidente, caudato con margine intraventricolare appiattito o lineare, associata atrofia del globo pallido e della capsula interna.
- Grado 4: atrofia severa dello striato con margine intraventricolare concavo associata ad atrofia della capsula interna che appare concava verso il putamen; perdita neuronale superiore al 90%.

3. EZIOPATOGENESI

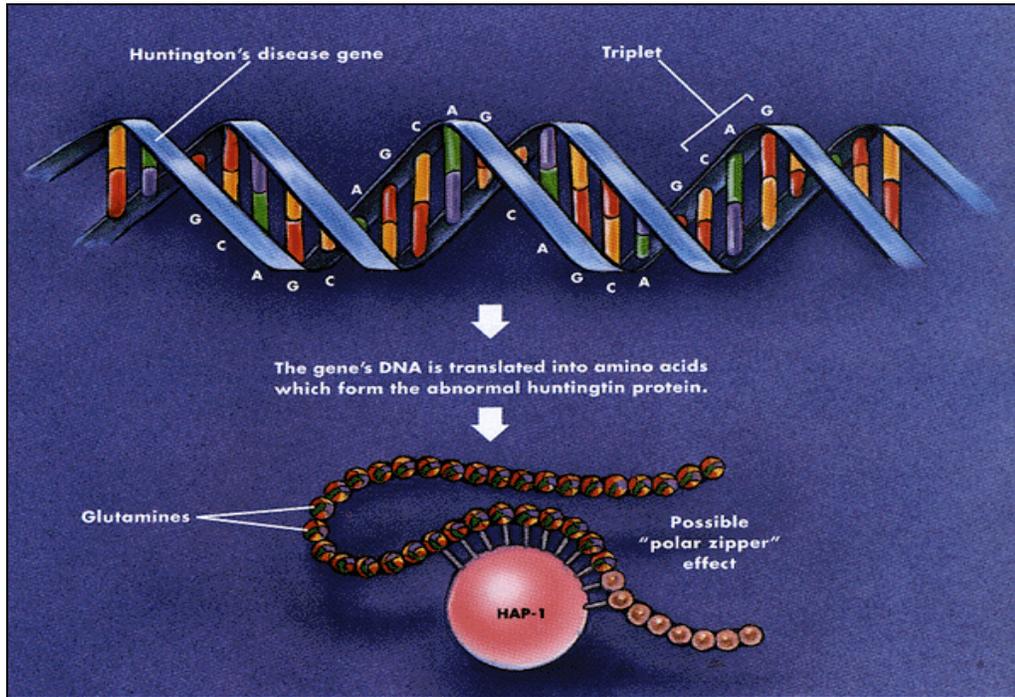


Fig. 4 In questa immagine è rappresentato il gene che codifica per l'huntingtina. Un numero superiore al normale (11-34) di ripetizioni della tripletta CAG presente nel primo esone del gene provoca la sintesi di Huntingtina mutata. Brain Briefings February 1997.

Tutti i casi di HD sono affetti dalla mutazione di un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 4, nella regione 4p16.3 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Quinn e Schrag, 1998; Ho et al., 2001). Questa regione normalmente contiene da 11 a 34 ripetizioni della sequenza trinucleotidica citosina–adenina–guanina (CAG) (Fig.4), che sono trasmesse secondo una modalità mendeliana. Nell'HD il numero di ripetizioni trinucleotidiche CAG diventa più elevato raggiungendo in media 45 unità (da 37 a 86): si stima che un numero di CAG inferiore a 30 escluda la diagnosi di HD, mentre un numero superiore a 40 ne indichi con certezza la presenza della mutazione; la zona intermedia tra 30 e 40 deve essere interpretata con cautela. Infatti, sono stati osservati casi di penetranza

incompleta in individui portatori di 36-39 ripetizioni CAG nella regione 4p16.3, i quali non hanno mai presentato alcuna manifestazione clinica o istopatologica di malattia fino alla decima decade di vita (Fig.5).

La lunghezza di queste ripetizioni è instabile e si modifica nella trasmissione alle generazioni successive. Il gene trasmesso per via paterna, tende ad essere più instabile portando ad un numero di ripetizioni CAG più elevato rispetto al gene trasmesso dalla madre. Studi epidemiologici infatti indicano che le forme giovanili (esordio prima dei 20 anni) sono soprattutto trasmesse per via paterna, mentre le forme più tardive (esordio dopo i 50 anni) sono di origine materna. Pertanto, il numero di ripetizioni CAG tende ad aumentare nel passaggio da una generazione all'altra, causando il fenomeno dell'anticipazione dell'esordio della malattia nelle generazioni successive.

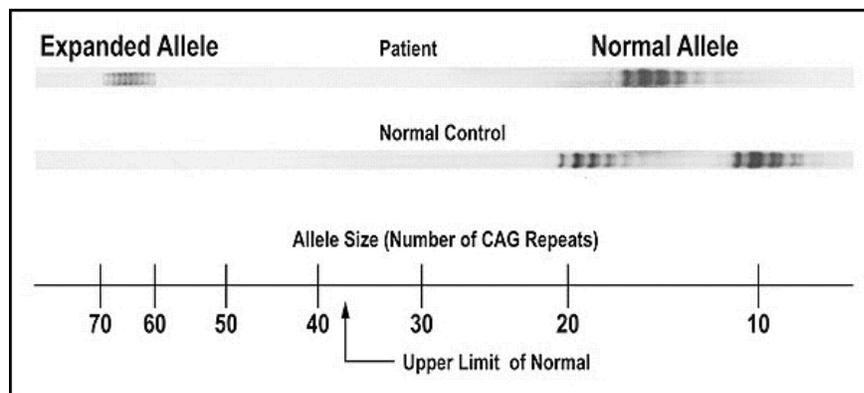


Fig. 5 Nell'immagine (elettroforesi su gel di poliacrilammide) è mostrato il cromosoma di un paziente malato di HD e quello di un paziente normale. Si nota nel paziente Huntingtoniano un allele che presenta amplificazione della tripletta CAG superiore alle 60 ripetizioni (amplificazione della tripletta ottenuta con tecnica PCR) (Goldberg et al., 1993).

4. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE NELL'HD

La morte cellulare a cui vanno incontro i neuroni in degenerazione nell'HD sembra sia dovuta ad alcuni processi cellulari. Le cause sinora identificate sono:

- 4.1 Acquisizione di funzione da parte dell'huntingtina mutata/formazione di aggregati.*
- 4.2 Attivazione del processo apoptotico;*
- 4.3 Danno mitocondriale/stress ossidativo/ eccitotossicità;*
- 4.4 Deprivazione di fattori di crescita (BDNF).*

4.1 ACQUISIZIONE DI FUNZIONE DA PARTE

DELL'HUNTINGTINA MUTATA/FORMAZIONE DI AGGREGATI

Alcune indicazioni mostrano un'acquisizione di tossicità da parte dell'huntingtina mutata (*gain of function*) altre invece ipotizzano che la degenerazione neuronale possa dipendere dalla cessazione delle funzioni fisiologiche della proteina normale (*loss of function*).

L'huntingtina mutata assume delle caratteristiche biofisiche ed una distribuzione intracellulare caratteristiche, formando degli aggregati o inclusioni intranucleari (DiFiglia et al., 1997; Ho et al., 2001; Wanker , 2000). La prima osservazione di aggregati intracellulari risale ad uno studio in cui venne condotta un'analisi morfologica di tessuto cerebrale proveniente da campioni autoptici di pazienti affetti da HD (DiFiglia et al., 1997). Riesaminando *post mortem* cervelli di pazienti affetti da HD le inclusioni furono in seguito osservate nei neuroni della corteccia e dello striato ma non del globo pallido e del cervelletto. Aggregati simili sono stati identificati

anche in modelli murini huntingtoniani (Davies et al., 1997). Le inclusioni possono essere rilevate solo da anticorpi contro epitopi vicini ai tratti poliglutaminici espansi e sono costituite da frammenti derivati dall'azione di taglio delle caspasi sulla proteina mutata. La sintesi e la frammentazione dell'huntingtina mutata avvengono nel citoplasma, mentre i suoi frammenti sono traslocati nel nucleo per diffusione passiva (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998a). Gli aggregati proteici intranucleari, infatti non contengono l'intera huntingtina mutata, ma solo il frammento N-terminale (DiFiglia et al., 1997). Questa porzione della proteina forma un numero maggiore di aggregati rispetto alla proteina intera. Inoltre, l'huntingtina di lunghezza completa è meno tossica dell'huntingtina frammentata (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998; Martindale et al., 1998) come confermato anche da studi in vivo su modelli R6 (Mangiarini et al., 1996).

Le inclusioni intranucleari d'aspetto rotondeggiante od ellittico, hanno una posizione variabile nel nucleo, sono spesso significativamente più grandi del nucleolo e, prive di membrana limitante, sono in continuità con il restante nucleoplasma. L'esame al microscopio elettronico dimostra che gli inclusi intranucleari hanno una composizione disomogenea e contengono un aggregato di granuli, filamenti lineari o tortuosi, fibrille parallele o orientate casualmente. Tali inclusioni intranucleari rappresentano un aspetto caratteristico di altre poliglutaminopatie (Evert and Wullner, 2000).

Sono stati quindi riscontrati tre tipi di aggregati nei cervelli colpiti dalla malattia:

- Inclusioni neuronali intranucleari (NII) (DiFiglia et al., 1997; Ho et al., 2001);
- Aggregati perinucleari (Becher et al., 1998; DiFiglia et al., 1997);

- Aggregati neuritici (Jackson et al., 1995).

La localizzazione degli aggregati è strettamente correlata con le dimensioni della proteina stessa, una sua frammentazione porta ad una facile traslocazione dei frammenti nel nucleo (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998a) e ciò è favorito anche dalla grande omologia di sequenza data dall'estremità N-terminale della proteina per le sequenze segnale di localizzazione nucleare (Hackam et al., 1998a). La distribuzione degli inclusi nucleari sia nei neuroni della corteccia che dello striato non è tuttavia coerente con la prevalente vulnerabilità di quest'ultimo in questa malattia (Suz et al., 2002). Alternativamente, la formazione di inclusi nucleari potrebbe costituire un processo di difesa sequestrando i tratti poliglutaminici espansi (Wanker et al., 2000; Takahashi et al. 2007). È stata pertanto ipotizzata la presenza di proteine specifiche nei neuroni vulnerabili che interagendo con l'huntingtina mutata possano determinare il danno selettivo caratteristico dell'HD (Evert and Wullner, 2000). Una proteina associata all'huntingtina (HAP-1) è stata identificata nel ratto e nell'uomo, la quale si lega debolmente alla proteina normale ma ha un legame forte con l'huntingtina mutata con una correlazione positiva rispetto alla espansione del tratto poliglutaminico. A differenza dell'huntingtina che è espressa in modo non selettivo, la HAP-1 è espressa selettivamente, soprattutto nello striato e nella corteccia, potendo in tal modo spiegare la particolare distribuzione del processo patologico nell'HD (Evert and Wullner, 2000). Inoltre l'huntingtina, così come il prodotto del gene responsabile dell'Atrofia Dentato-Pallido-Luysiana (DRPLA) e della atassia spinocerebellare di tipo 1 (SCA1), si lega alla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, enzima essenziale per la glicolisi. È noto infatti che dei tratti

poliglutaminici più lunghi inibiscono l'attività enzimatica più intensamente di quelli più corti.

Il ruolo della proteina mutata nell'eziopatogenesi dell'HD non è però chiaro. Per spiegare i meccanismi che portano alla formazione di inclusioni nucleari e citoplasmatiche, sono state proposte due teorie:

- Gli stretch di poli-Q interagiscono tra loro formando strutture polar zipper costituite da foglietti β legati da ponti idrogeno tra la catena principale e la catena laterale delle ammine (Perutz et al., 1994). Questa ipotesi però non spiega né perché si ha formazione degli aggregati con tratti di poli-Q superiori alle 40 glutammine, né perché debbano passare molti anni, prima che questi siano visibili. In supporto a questa ipotesi è stato dimostrato in vitro che l'huntingtina può formare tipi di aggregati amiloidi quando il tratto di poli-Q raggiunge la lunghezza patologica (Scherzinger et al., 1999).
- Nella seconda teoria, si ha il coinvolgimento nel meccanismo di patogenesi dell'enzima transglutaminasi tissutale (tTG), (famiglia di enzimi Ca^{2+} -dipendenti) (Green et al., 1993). Esso catalizzerebbe la reazione di formazione di legami crociati tra proteine tra i gruppi γ -carbossamidici dei residui di glutamina e gli amino gruppi della lisina delle catene peptidiche; tale reazione porta alla formazione di γ -ammidi monosostituite dell'acido glutammico resistenti al taglio proteolitico ed altamente insolubili (Rothnagel e Rogers, 1994). La formazione di aggregati è causata dal fatto che il gene difettoso attiva quindi la transglutaminasi che in condizioni normali, non verrebbe prodotta.

L'implicazione degli aggregati nella patogenesi della malattia è oggetto di controversia. Gli aggregati potrebbero non essere i principali responsabili della citotossicità, infatti, esperimenti su neuroni primari in coltura transfettati con huntingtina mutata, hanno mostrato che la formazione di aggregati non è correlata alla citotossicità (Saudou et al., 1998). Inoltre non sempre i neuroni con aggregati sono destinati obbligatoriamente a morire (Yamamoto et al., 2000).

4.2 ATTIVAZIONE DEL PROCESSO APOPTOTICO

La morte per apoptosi è un processo di “suicidio” delle cellule che avviene a diversi livelli e coinvolge differenti fattori cellulari. È stato dimostrato il possibile ruolo antiapoptotico dell'huntingtina, la quale agendo a monte nel processo di morte cellulare legato alla "cascata" di reazioni che portano all'attivazione della caspasi 3, previene il proprio processamento (Rigamonti et al. 2001).

Sembra comunque che la neurodegenerazione nell'HD non segua il classico processo di apoptosi. Studi ultrastrutturali e dell'espressione genica di cervelli di topi transgenici R6/1 portatori della malattia, sembrano escludere questo processo di morte cellulare: i neuroni in degenerazione mostrano condensazione nucleare e citoplasmatica ma non sono mai state riscontrate caratteristiche tipiche dell'apoptosi (come la presenza di corpi apoptotici); le alterazioni nell'espressione genica, inoltre, non sembrano compatibili con un processo apoptotico in atto, suggerendo una sorta di conflitto tra eventi pro e anti-apoptotici (Iannicola et al., 2000).

4.3 DANNO MITOCONDRIALE/STRESS OSSIDATIVO/ ECCITOTOSSICITÀ.

Vi sono degli studi che evidenziano alterazioni del metabolismo energetico nell'HD, le quali non sarebbero direttamente legate alla presenza dell'huntingtina mutata. Sono state osservate alterazioni del complesso I della catena respiratoria mitocondriale nelle piastrine e più recentemente del complesso II, III e IV nel nucleo caudato ma non nelle piastrine (Sawa A. et al., 2001). In accordo con questi risultati gli studi PET hanno dimostrato una precoce caduta del metabolismo energetico nello striato, mentre gli studi con la spettroscopia hanno indicato un aumento della concentrazione di lattato cerebrale (Quinn and Schrag, 1998). La moderata alterazione del metabolismo energetico provoca inoltre eccitotossicità. Dell'eccitotossicità è responsabile il glutammato, principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Esso agisce su praticamente tutti i neuroni centrali ed è presente a livello delle terminazioni nervose in concentrazioni notevolmente elevate (10^{-3} M). Quando la trasmissione sinaptica avviene normalmente, si verifica un aumento del livello di glutammato solo transitoriamente e solo a livello dello spazio sinaptico. Quando invece si ha un aumento persistente dei livelli di glutammato, anche al di fuori dello spazio sinaptico, le cellule vanno incontro a morte. Tale effetto "eccitotossico" è dovuto principalmente all'azione prolungata del glutammato sui recettori del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), che porta ad un eccessivo ingresso di ioni calcio all'interno della cellula. L'eccesso di ioni calcio ha sulla cellula effetti tossici, mediati sia dall'attivazione di proteasi calcio-dipendenti, sia dall'attivazione della fosfolipasi A, che libera

acido arachidonico, inducendo la produzione di sostanze infiammatorie e di radicali liberi.

L'eccitotossicità contribuisce alla morte dei neuroni striatali nell'Huntington (Coyle and Schwarcz, 1976; McGeer et al., 1978), i quali ricevono abbondanti segnali glutammatergici dalla corteccia (Cattaneo et al. 2001). Il recettore agonista del glutammato NMDA (N-Metil-D-aspartato) e l'acido quinolinico producono cambiamenti Huntington-simili, che includono: gliosi, selettiva morte dei neuroni di proiezione GABAergici con relativo risparmio di neuroni contenenti somatostatina, neuropeptide Y ed acetilcolina (Beal et al., 1986, 1991, 1993; Young et al., 1988). I neuroni spinosi di medie dimensioni nello striato di ratto trattato con acido quinolinico mostrano un cambiamento nella morfologia del neurite e nella calbindina D28k simile a quello osservato nel cervello affetto da HD (Huang et al., 1995). Inoltre la decorticazione del ratto, con rimozione delle proiezioni corticostriatali glutammatergiche, attenua l'eccitotossicità in questi modelli (McGeer et al., 1978). Ciò suggerisce un ruolo mediato dal recettore NMDA nell'eccitotossicità nell'HD. Tuttavia, con questa ipotesi è stato mostrato nei recettori NMDA una distribuzione simile nella neocorteccia, nel corpo striato, nell'ippocampo, come pure in altre regioni, mentre la patologia è altamente selettiva nei confronti dello striato, essendo l'ippocampo interessato solo in fasi tardive. Inoltre, per quanto riguarda la corteccia cerebrale, nel corso della malattia la neurodegenerazione colpisce gli strati profondi, mentre i recettori NMDA sono più abbondanti negli strati superficiali.

Lo stress ossidativo sembra essere anch'esso coinvolto nella morte neuronale in HD. Come detto in precedenza, il glutammato in eccesso,

incrementa l'attività della fosfolipasi A2 (PLA2) e delle proteasi calcio dipendenti, che attivate, scindono la xantina deidrogenasi, convertendola in xantina ossidasi. La successiva conversione della xantina e dell'ipoxantina in acido urico produce radicale superossido e perossido deidrogenasi. (Coyle & Puttfarcken, 1993; Dugan et al., 1995; Schulz et al., 1995). Un radicale libero coinvolto nei meccanismi di neurodegenerazione e nell'eccitotossicità, è l'ossido nitrico (NO), prodotto dall'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) (Pou et al., 1992; Fujisawa et al., 1993). I neuroni di topi knockout del gene NOS sono infatti risultati resistenti all'eccitotossicità (Dawson et al., 1995); e trattamenti con inibitori della NOS, effettuati su ratto portatore dell'HD, migliorano notevolmente le forme di tossicità suggerendo un ruolo dei radicali liberi nell'eccitotossicità nell'HD (Schulz et al., 1995).

4.4 DEPRIVAZIONE DI FATTORI DI CRESCITA

Le neurotrofine sono delle molecole dotate di azione trofica sui neuroni. Sono state isolate diverse neurotrofine tra cui il "brain derived neurotrophic factor" (BDNF). Si è dimostrato che esse svolgono un importante effetto protettivo sui neuroni cerebrali, permettendo lo sviluppo e il mantenimento delle cellule nervose anche in situazioni di sofferenza cellulare (Behrens et al. 1999).

Il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni striatali dipendono in modo specifico dal BDNF. I livelli di BDNF sono molto ridotti nel tessuto cerebrale di pazienti affetti dall'HD (Zuccato et al., 2001), così come appaiono ridotti i livelli di RNA messaggero, fenomeno indicativo di una diminuita trascrizione del fattore destinato ai neuroni dello striato. Essi però

non producono questa neurotrofina ma la ricevono dalla corteccia cerebrale (Desai N.S. et al., 1999; Gonzalez M. and W.F. Collins III, 1997; Altar et al., 1997). Il BDNF prodotto nel corpo cellulare dei neuroni corticali sotto lo stimolo dell'huntingtina viene, infatti, trasportato lungo le fibre nervose allo striato (Altar et al., 1997, Conner et al., 1997) (Fig. 7). Particolare valore riveste la connessione anatomica attraverso cui il BDNF giunge allo striato. Un suo malfunzionamento, infatti, ridurrebbe l'apporto di BDNF ai neuroni striatali rendendoli più vulnerabili. Si è quindi scoperto che l'huntingtina normale, oltre all'effetto antiapoptotico, stimola la produzione di BDNF. Svolge questo ruolo, favorendo la trascrizione del gene per il BDNF (esone 2) dal suo promotore. L'huntingtina normale induce quindi la produzione di BDNF mentre quella mutata perde quest'effetto (la corteccia cerebrale di animali che producono più huntingtina del normale presenta un maggior contenuto di BDNF) (Zuccato et al., 2001). Ad avvalorare ancor di più ciò è stato visto dal dimostrato che huntingtina e BDNF sono co-localizzate nelle stesse cellule corticali, ad indicare chiaramente una dipendenza dall'huntingtina nella produzione di BDNF da parte di tali neuroni (Fusco et al, 2003).

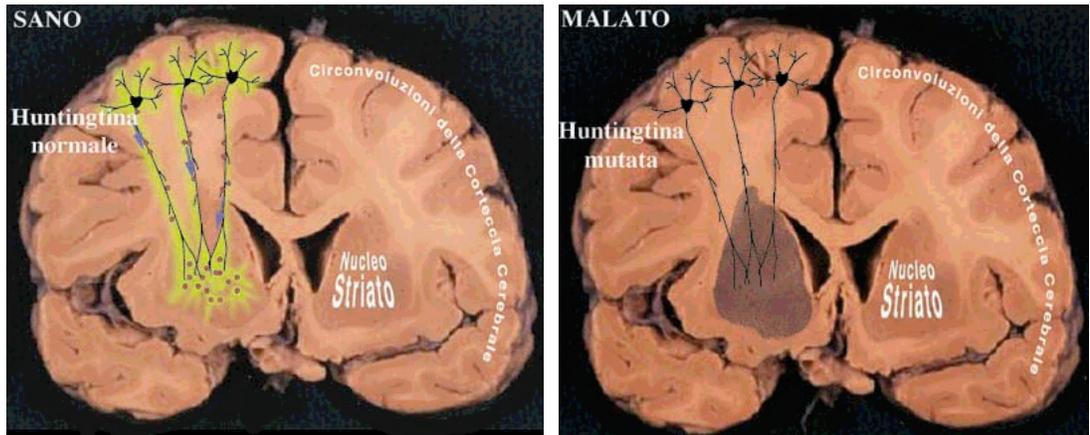


Fig. 7 Nell'immagine è mostrata l'azione trofica del BDNF, prodotto dalla corteccia, sullo striato. A sinistra si nota la normale attività del BDNF dovuta alla presenza di huntingtina, a destra invece l'assenza di huntingtina porta alla degenerazione del corpo striato per mancata attività del BDNF (Cattaneo et al. 2001).

5. DIAGNOSI E TERAPIA

Con la scoperta del gene nel 1993 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) è stato possibile iniziare a diagnosticare la malattia attraverso un test genetico nei pazienti HD con storia familiare positiva, anche presintomatici. Questo test permette di evidenziare il numero di triplette CAG nel gene IT15. Ulteriori informazioni possono essere fornite dalla diagnostica per immagini: risonanza magnetica nucleare (RMN) e PET (position emission tomography) consentono di osservare le strutture cerebrali e possono quindi mostrare modificazioni delle parti interne del cervello come il nucleo caudato e il putamen.

Non esistono delle terapie specifiche per curare l'HD. Vengono utilizzati farmaci utili per alleviare la sintomatologia e migliorare la qualità della vita del malato. L'olazapina e il risperidone sono per esempio farmaci utilizzati

che permettono di bloccare gli effetti della dopamina e quindi trattare sintomi come allucinazioni, paranoia o depressione e anche dei movimenti involontari. Un'altro farmaco utilizzato specificatamente per il trattamento della depressione con caratteristiche paranoiche o depressive è la fluvoxamina (inibitore selettivo del riassorbimento della serotonina).

Data l'ipotesi di una disfunzione nell'attività metabolica aerobica mitocondriale, è possibile ipotizzare interventi terapeutici mirati al supporto metabolico dei neuroni, al fine di fornire substrati energetici che attenuino l'insufficienza nei sistemi produttori di ATP. Uno di questi substrati è la creatina che agendo come attivatore dell'enzima creatin-chinasi determina una concentrazione intracellulare della fosfocreatina, che può costituire una riserva di energia e quindi sopperire per un breve periodo di tempo alla mancanza di ATP. Evidenze sperimentali su topi transgenici R6/2 dimostrano che un aumento di creatina al 2% nella dieta porta ad un incremento significativo della sopravvivenza dei topi di circa il 17% (Ferrante et al., 2000). Altri studi hanno portato alla scoperta di un nuovo farmaco che agisce a livello mitocondriale: la minociclina, la quale sembra aumentare la sopravvivenza in modelli di HD prevenendo la progressione di questa malattia e di altre patologie neurodegenerative (Denovan-Wright EM et al., 2002; Chen et al., 2000).

Secondo la teoria patogenetica dell'HD dell'eccitotossicità (precedentemente trattata), si potrebbero utilizzare invece farmaci che antagonizzano la trasmissione glutamatergica mediata da NMDA. Un primo studio fondato sulla somministrazione di idrocloride di remacemide (inibitore non competitivo del glutammato) in pazienti, ha evidenziato una presente risposta clinica a questo farmaco (Kieburz et al., 1996). Altri farmaci

antiglutamatergici testati clinicamente nell'HD sono il riluzolo e la lamotrigina (Jenkins et al., 1998). I dati ottenuti da questi studi non sono ancora stati dimostrati da un punto di vista clinico e statistico.

Ulteriori studi sono stati condotti su modelli animali, ed hanno portato a prospettare la possibilità di trapiantare nel sistema nervoso tessuto neuronale striatale di origine embrionale, e quindi dotato di una parziale capacità proliferativa in modo da sostituire alcune delle aree degenerate (Watts et al., 2000).

6. MODELLI ANIMALI

Il reperimento e il trattamento di materiale autoptico umano ha creato per molto tempo ovvie difficoltà nello studio della HD. Nell'ultimo ventennio, tuttavia, si è potuto superare questo grazie allo sviluppo di modelli cellulari ed animali, che riproducono alcuni aspetti neuropatologici e morfologici della malattia. I modelli animali, in particolar modo, permettono sia lo studio di cambiamenti morfologici di cellule colpite dalla malattia, sia di saggiare *in vivo* l'effetto di nuovi farmaci, aprendo nuove strade su possibili terapie.

Numerosi sono i modelli prodotti nei laboratori, alcuni imitano l'effetto patologico della malattia stessa nel tessuto, altri sono geneticamente modificati in modo da presentare il gene stesso della patologia.

6.1 MODELLO DA LESIONE CON ACIDO QUINOLINICO

In condizioni fisiologiche, quando la trasmissione sinaptica avviene normalmente si verifica un aumento dei livelli di glutammato solo

transitoriamente e solo a livello dello spazio sinaptico. Quando invece si ha un aumento persistente dei livelli di glutammato, anche al di fuori dello spazio sinaptico, le cellule vanno incontro a morte. Tale effetto “eccitotossico” è dovuto principalmente all’azione prolungata del glutammato sui recettori del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), che porta ad un eccessivo ingresso di ioni calcio all’interno della cellula. L’eccesso di ioni calcio ha sulla cellula effetti tossici, mediati sia dall’attivazione di proteasi calcio-dipendenti, sia dall’attivazione della fosfolipasi A, che libera acido arachidonico, inducendo la produzione di sostanze infiammatorie e di radicali liberi.

L’eccitotossicità contribuisce alla morte dei neuroni striatali nell’HD (Coyle and Schwarcz, 1976; McGeer et al., 1978; Stack et al., 2007), i quali ricevono abbondanti segnali glutamatergici dalla corteccia (Chen et al., 1996; Cattaneo et al. 2001).

Nel modello da lesione con acido quinolinico viene provocata una lesione intrastriatale (DiFiglia et al. 1990). Gli animali sono operati con l’utilizzo dell’apparato stereotassico e viene iniettata loro 1µl di soluzione di Acido Quinolinico (QA; 100mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) in PB 1M, nell’emisfero destro/sinistro o bilateralmente, dell’encefalo secondo le coordinate stereotassiche: antero-posteriore +0.7; medio-laterale – 3.0; dorso-ventrale – 5.0 mm, nel corpo striato. In tal modo l’acido porta alla morte cellulare per eccitotossicità. Il recettore agonista del glutammato NMDA (N-Metil-D-aspartato) e l’acido quinolinico producono infatti cambiamenti simili a quelli riscontrati nell’HD che includono: gliosi, selettiva morte dei neuroni di proiezione GABAergici con relativo risparmio di neuroni contenenti somatostatina, neuropeptide Y ed acetilcolina (Beal *et*

al., 1986, 1991, 1993; Figueredo-Cardenas et al., 1994; Young *et al.*, 1988). I neuroni spinosi di medie dimensioni nello striato di ratto trattato con acido quinolinico mostrano un cambiamento nella morfologia del neurite e nella calbindina D28k simile a quello osservato nel cervello affetto da HD (Huang et al., 1995).

Analizzando quindi i differenti tempi d'azione legati all'attività delle differenti proteine è possibile avviare studi preliminari per l'analisi di patologie come la Corea di Huntington.

6.2 MODELLI MURINI TRANSGENICI

Con questi modelli si può di riprodurre l'eziopatogenesi dell'HD umano. I principali gruppi di ricerca che hanno prodotto modelli transgenici sono tre: Mangiarini, Reddy, Hogdson. Essi differiscono tra loro per il decorso clinico della malattia e per l'età d'insorgenza dei sintomi.

6.2.1 MODELLI DI MANGIARINI

I topi appartenenti alle linee transgeniche R6 sono prodotti introducendo nella blastocisti di topo, cellule embrionali staminali in precedenza transfettate con un frammento genomico di 2 Kb, contenente il primo esone del gene umano dell'huntingtina (Mangiarini et al., 1996). I modelli R6/1, R6/2, R6/5, riproducono il fenotipo dell'HD sviluppando le caratteristiche cliniche della malattia, ma differenziandosi l'uno dall'altro per l'età di insorgenza dei sintomi (diversa è la lunghezza del tratto poli-Q espresso in ognuno dei modelli). La linea R6/0 non sviluppa invece alcun sintomo nonostante il numero di triplette CAG ripetute sia patologico (ciò è correlato all'inattivazione del transgene probabilmente a causa del sito d'integrazione).

Nelle due linee più utilizzate la R6/1 ha un'età d'insorgenza di 4-5 mesi, mentre la R6/2 manifesta i primi sintomi dopo 2 mesi. Le caratteristiche cliniche sono state ben definite in queste due linee transgeniche: i disordini motori includono un'andatura irregolare, movimenti stereotipati e la tendenza a retrarre gli arti quando sospesi per la coda (“feet-clasping”).

I topi R6/2, oltre ai sintomi motori, presentano progressiva perdita di peso (fino al 30% in meno rispetto ai controlli) di tono muscolare (Carter et al., 1999), diabete mellito e non sopravvivono oltre le 12 settimane. Anche la massa cerebrale mostra una progressiva diminuzione, a partire dalla sesta settimana postnatale (Davies et al., 1997). Le disfunzioni motorie sono simili a quelle dell'HD umana: movimenti di tipo coreico e mancanza di coordinazione, manifestazioni cliniche che peggiorano nel tempo. Aggregati simili a quelli osservati nel cervello umano (DiFiglia et al., 1997; Becher et al., 1998; Gourfinkel-An et al., 1998) sono stati identificati per la prima volta sotto forma di inclusi intranucleari nelle linee R6 (Davies et al., 1997). Le NII contengono sia huntingtina che ubiquitina, e possono quindi essere visualizzate al microscopio con tecniche di immunostochimica. Nei topi R6/2 appaiono già prima della quarta settimana di età nella corteccia e nell'ippocampo, mentre si riscontrano solo in casi isolati inclusi extranucleari (più frequenti invece nelle linee R6/1 e R6/5) (DiFiglia et al., 1997). Nello striato le differenti sottopopolazioni neuronali differiscono notevolmente nella loro capacità di formare le NII: gli interneuroni che sono noti resistere maggiormente alla neurodegenerazione mostrano un minor numero di NII (Kosinski et al. 1999). Più recentemente sono stati anche identificati aggregati dendritici; questi sono più piccoli delle NII e sono localizzati soprattutto nella corteccia e nello striato (Li et al., 1999; Meade

et al., 2002). Un'altra caratteristica della linea R6/2 è la presenza occasionale di inclusi in astrociti, oligodendrociti e microglia (glial intranuclear inclusions, GII) (Papp e Lantos 1994:, Spillantini et al., 1998).

Nel nostro studio siamo andati ad indagare la possibile attività di un farmaco antidepressivo (Rolipram) nei modelli animali che meglio potessero rispecchiare la neuropatogenesi dell'HD.

7. ROLIPRAM E SCOPO DELLA RICERCA

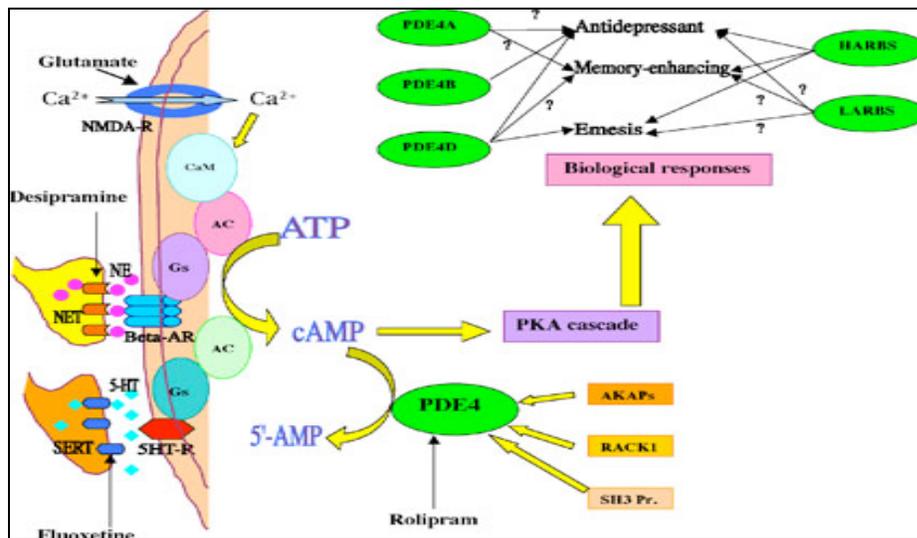


Fig 8 Coinvolgimento della fosfodiesterasi di tipo 4 (PDE4) nella cascata di secondi messaggeri cAMP dipendenti (O'Donnell et al. 2004).

Diverse funzioni neuronali sono controllate da livelli intracellulari di AMP ciclico (cAMP) e da risposte di protein chinasi dipendenti dal cAMP. Il livello di cAMP è di solito controllato dall'attivazione dell'adenilato ciclasi, enzima legato alla membrana cellulare con un sito di legame per l'ATP.

Quando il neurotrasmettitore si lega al recettore sulla faccia esterna della membrana cellulare, una proteina GTPasica trimerica (proteina G) che si trova sulla faccia citoplasmatica subisce un'alterazione conformazionale, assumendo così lo stato attivo ed interagendo con l'adenilato ciclasi attivandola (Fig 8). Il cAMP è anche regolato e degradato per attività della PDE che pone fine agli effetti della stimolazione recettoriale catalizzando l'idrolisi del cAMP in 5'-AMP (Beario et al., 1995). L'inibizione provocata dalla PDE porta ad un accumulo di cAMP intracellulare e ad un conseguente potenziamento delle funzioni cellulari da lui mediate. Sono noti dieci diversi tipi di PDE: la 4, la 7 e la 8 agiscono specificatamente sul cAMP; le PDE 1, 2, 3, 10 ed 11 agiscono sia sul cAMP che sul cGMP. Le PDE 5, 6 e 9 sono invece specifiche per il cGMP. Inoltre è stato dimostrato che le PDE 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10 hanno localizzazione encefalica (Beavo et al., 1995; Reinhard and Bondy 1996, Menniti et al., 2006).

Il Rolipram è un inibitore selettivo della fosfodiesterasi 4 (PDE4). È stato studiato come farmaco antidepressivo ma può avere effetto anche nel miglioramento della memoria a lungo termine, e nella neuroprotezione, su danno neuronale da ischemia e da eccitotossicità (Hiroyuzi et al., 1995, Block et al., 2001, 2002; O'Donnell et al. 2004). Inoltre, somministrazioni croniche di questo farmaco migliorano alcuni aspetti nella sintomatologia in modelli sperimentali per lo studio della depressione (Itoh et al., 2004). L'effetto neuroprotettivo è legato ad un aumento dei livelli intracellulari di cAMP con conseguente attivazione di proteine quali la CREB e fattori neurotrofici come il BDNF, elementi chiave nella regolazione della neuroprotezione e neuroplasticità sinaptica (Frechilla et al., 1998).

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di investigare la possibile attività neuroprotettiva da parte del Rolipram prima nel modello da acido quinolinico, poi nel topo transgenico R6/2. Sono stati analizzati i cambiamenti morfologici dell'encefalo di ratto e di topo a cui è stato somministrato Rolipram e sono stati paragonati ad animali controllo. Nel topo sono state studiate le caratteristiche principali della neuropatologia, ovvero le inclusioni intranucleari e l'attivazione microgliale.

MATERIALI E METODI

Per il nostro studio sono stati utilizzati due modelli animali:

1. Ratto normale Wistar, adulto di 2 mesi di circa 200-220 grammi di peso (Harlan, Italia), a cui è stata provocata una lesione intrastriatale dovuta a somministrazione da Acido Quinolinico.
2. Topo transgenico R6/2 (Jax mice, Bar Harbor, Maine) prodotto introducendo nella blastocisti di topo cellule embrionali staminali in precedenza transfettate con un frammento genomico di 2Kb, contenente il primo esone del gene umano dell'huntingtina (Mangiarini et al., 1996) con un numero variabile di ripetizioni CAG, che riproduce alcune caratteristiche cliniche ed istopatologiche della Corea di Huntington.

Tutti gli animali sono stati quotidianamente trattati con Rolipram somministrato per via intraperitoneale (i.p.).

Tutte gli studi sono stati condotti in accordo con le normative vigenti in materia di trattamento degli animali di laboratorio stabilite dal Consiglio della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) e adottata dalla Fondazione Santa Lucia Animal Care e Use committee.

1. MODELLO DA LESIONE CON QA

1.1 CHIRURGIA E SOMMINISTRAZIONE FARMACO

Sessanta animali dopo essere stati anestetizzati con una soluzione contenente chetamina (0.66 ml/Kg) e xilazina (0.16 ml/Kg) somministrata per via i.p., sono stati chirurgicamente trattati con l'utilizzo dell'apparato stereotassico (DK 900). È stata iniettata soluzione salina a 30 animali, utilizzati come controllo, mentre altri 30 sono stati operati con 1 μ l di soluzione QA (100mM; Sigma, St. Louis, MO, USA), iniettato nell'emisfero destro dell'encefalo secondo le coordinate stereotassiche: antero-posteriore +0.7; medio-laterale -3.0; dorso-ventrale -5.0 mm. Dopo essere stati lesionati gli animali sono stati sacrificati a due differenti time points: 2 ed 8 settimane e divisi in 3 gruppi di studio con diverso trattamento: 20 animali sono stati trattati (i.p.) con Rolipram 0.15mg/kg/giorno, altri 20 con Rolipram 1.5mg/kg/giorno (i.p.) e infine è stato mantenuto un gruppo di 20 animali come controllo a cui è stata somministrata (i.p.) soluzione fisiologica.

1.2 SACRIFICIO

Dopo 2 ed 8 settimane rispettivamente, gli animali sono stati sacrificati per perfusione (dopo essere stati anestetizzati), con 60 ml di soluzione salina contenente 0.05 ml di eparina, seguita da 200 ml di paraformaldeide al 4% in soluzione salina. L'encefalo è stato rimosso e lasciato postfissare tutta la notte a +4°C, crioprotetto in saccarosio al 10% e glicerolo al 20% in PB 0.1 M con sodio azide 0.02% per 48 ore a +4°C (Fusco et al., 1999). L'encefalo

è stato poi sezionato al microtomo congelatore con sezioni da 40 µm di spessore.

1.3 VALUTAZIONE DELLA LESIONE STRIATALE E SOPRAVVIVENZA NEURONALE

È stata analizzata la singola immunofluorescenza per l'anticorpo diretto contro i nuclei neuronali (anti-NeuN, Chemicon, Temecula, CA) al fine di marcare i neuroni striatali. Dopo una pre-incubazione con l'appropriato siero preimmune le sezioni sono state incubate con anticorpo mouse anti-NeuN ad una diluizione di 1:200 in PB 0.1 M contenente Triton X-100 allo 0.3% e sodio azide allo 0.02 %, per 72 ore a +4°C. Le sezioni sono state poi risciacquate per 3 volte ciascuna da 5 minuti in PB 0.1M e incubate con anticorpo secondario fluorescente anti-mouse cyanine 2 (Cy2) per 2 ore a temperatura ambiente. I tessuti sono stati montati su vetrini e coperti con coprivetrini con l'utilizzo del GEL-MOUNT™ ed esaminati con microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioskop 2) e microscopio confocale (CLSM; Zeiss LSM 510) quest'ultimo utilizzato anche come strumento di acquisizione di immagini.

La morfometria dei dati è stata analizzata in cieco. Il core della lesione striatale è stato misurato in tutti i tessuti con l'utilizzo del software Zeiss LSM™. L'area circostante la lesione è stata suddivisa in mediale, dorsale e laterale ed il core della lesione è stato calcolato separatamente (Fig 1.1). Sono state considerate tre sezioni rostrocaudali nell'emisfero lesionato da QA e tre nel controlaterale. Per ciascuna sezione sono stati contati tre campi di 1mm² di area distanti dal centro della lesione provocata da QA, rispettivamente 1.3mm e 1.5mm. I ratti trattati con veicolo sono stati

considerati come controllo. È stata inoltre calcolata la densità di neuroni per mm^2 .

Per confermare i dati ottenuti con il modello animale QA e per meglio valutare l'effetto del farmaco nella patologia HD si è andati successivamente a svolgere un lavoro parallelo nei topi transgenici R6/2 che presentano il primo esone del gene umano dell'huntingtina. Abbiamo quindi analizzato l'effetto neuroprotettivo del farmaco nei topi. È stato utilizzato un unico dosaggio, Rolipram 1,5 mg/Kg poichè nel lavoro sui ratti QA quest'ultimo è risultato avere maggiore effetto protettivo (De March et al., 2007).

2. TOPO TRANSGENICO R6/2

2.1 COLONIA E GENOTIPIZZAZIONE

Per il nostro studio sono stati utilizzati topi emizigoti R6/2 (B6CBA-tg(HDexon1)62Gpb/1j) i quali presentano il transgene all'estremità 5' del gene umano per l'HD con un numero di triplette CAG che varia da 115 a 159. Per il mantenimento della colonia una femmina emizigote è stata fatta accoppiare con topi normali B6BAF1/J della linea CBA X C57BL/6 F₁. La femmina emizigote è stata ottenuta da una femmina WT in cui è stato trapiantato l'ovario portatore della mutazione. Le coppie per il mantenimento della colonia sono state fornite dai laboratori Jackson (Bar Harbor, ME). La prole è stata svezzata a 22 giorni dalla nascita e genotipizzata mediante tecnica PCR di DNA estratto dalla coda eseguita secondo il protocollo modificato da Mangiarini e collaboratori (1996).

L'amplificazione per PCR è stata effettuata seguendo il protocollo fornito dai laboratori della Jackson per distinguere gli animali con il transgene t^+/t^- (R6/2) dagli animali wild-type. Sono stati utilizzate due coppie di primers per il transgene 5'-CGG-CTGAGGCAGCAGCGGCTGT-3' e 5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3'.

La prima coppia di primers oIMR1594 (5'-CCg-CTC-AGG-TTC-TGC-TTT-TA-3') e oIMR1595 (5'-GGC-TGA-GGA-AGC-TGA-GGA-G-3') si lega alle estremità della regione del gene contenete la tripletta CAG espansa e può monitorare l'ampiezza del tratto CAG amplificando un frammento genico di 284bp nel caso in cui l'allele contenga 21 copie di CAG (WT), oppure un frammento di 611bp nel caso in cui l'allele contenga 130 triplette CAG (R6/2). La seconda coppia di primers oIMR1594 e oIMR1596 (5'-TGGAAGGACTTGAGGGACTC-3') viene utilizzata per verificare la presenza o assenza del transgene ma non fornisce informazioni sul numero delle triplette. In questo caso si ha amplificazione di un frammento di 170bp.

Per la PCR sono stati utilizzati i seguenti reagenti: 5 µl di 10XAMBuffer; 2µl di 25Mm-MgCl₂ 2mM; 1µl di 2.5Mm-dNTP 0.2mM; 0.2µl di 20µM-oIMR1594 0.4µM; 0.2µl di 20µM-oIMR1595 0.4µM; 0.2µl di 20µM-oIMR1596 0.4µM; 5µl di DMSO; 0.4µl di 5U/µl Taq Pol. 0.025 U/µl; 1µl DNA; 34.2µl di H₂O per un volume totale di soluzione di 50µl. Per provare la mancata contaminazione del DNA, un campione è stato eseguito utilizzando dH₂O. Per l'amplificazione è stata utilizzata la macchina per PCR (MJ Research, Watertown, MA), seguendo le condizioni di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 58°C per 1 minuto, ed estensione a 72°C per 1 minuto, ciascuno per 35 cicli. Dopo

l'amplificazione per PCR il prodotto di reazione è stato analizzato con elettroforesi su gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio.

2.2 SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO

Il trattamento ha avuto inizio per tutti i topi (n=24) a quattro settimane dalla nascita. Sono stati così considerati 3 gruppi di studio: topi R6/2 a cui è stato iniettata (i.p.) soluzione salina (0.9%), topi R6/2 a cui è stato somministrato (i.p.) Rolipram 1.5mg/kg/giorno disciolto in soluzione salina, e topi WT non trattati. I topi sono stati trattati dallo stesso osservatore, alla stessa ora di ciascun giorno.

È stato utilizzato come parametro del sacrificio un test che permettesse di valutare se i topi fossero in grado di voltarsi entro 30 secondi da quando poggiati su un fianco, in accordo con Stack e collaboratori (2006).

2.3 VALUTAZIONE DEI DEFICIT NEUROLOGICI

I topi transgenici manifestano un particolare claspings della zampa quando vengono sospesi in aria dalla coda (Mangiarini et al. 1996). Il fenotipo del claspings è stato utilizzato come studio della progressione dell'HD nei topi (Hansson et al., 2003; Ma et al., 2007) e come misura del deficit neurologico (Hersh and Ferrante, 2004). I topi sono stati sospesi in aria per 180 secondi ed è stato calcolato il numero di claspings nell'intervallo di tempo.

2.4 STUDI ISTOLOGICI ED IMMUNOISTICHIMICI:

PROCESSAMENTO DEL TESSUTO

Per gli studi istologici gli animali sono stati perfusi a 12 settimane dalla nascita. Dopo essere stati anestetizzati è stata somministrata loro nell'aorta soluzione salina contenente 0.01 ml di eparina e successivamente 60 ml di soluzione salina contenete paraformaldeide al 4%. L'encefalo è stato rimosso e post-fissato per tutta la notte a +4°C, crioprotetto in saccarosio allo 10% e glicerolo al 20% in PB 0.01M con sodio azide allo 0.02% per 48 ore a +4°C. Il cervello è stato sezionato al microtomo congelatore con sezioni da 40 µm di spessore.

2.4.1 IMMUNOISTOCHIMICA

Per gli studi immunoistochimici è stato utilizzato il normale siero di topo e di coniglio e il controllo con siero preimmune, per confermare la specificità dell'anticorpo.

a. Valutazione del volume dell'encefalo:

È stata applicata la colorazione standard Nissl in sezioni coronali di neostriato rostrale, a livello della commessura anteriore (interaural 4.66 mm/bregma 0.86 mm a interaural 3.34 mm/bregma -0.46). Il volume dell'encefalo è stato misurato utilizzando il software NeuroLucida Stereo Investigator (MicroBrightfield, Cochester, VT, USA).

b. Sopravvivenza neuronale:

La singola immunofluorescenza è stata utilizzata per marcare neuroni striatali. A questo scopo è stato utilizzato anticorpo diretto contro nuclei neuronali (anti-NeuN Chemicon, Temecula, CA). Dopo una preincubazione con l'appropriato siero preimmune, le sezioni sono state incubate con anticorpo anti-NeuN ad una concentrazione di 1:200 in soluzione contenente

PB 0.1M , Triton X-100 allo 0.3% e 0.02% di sodio azide, per 72 ore a +4°C. Le sezioni sono state poi risciacquate per tre volte, ciascuna da 5 minuti in PB, ed incubate con anticorpo secondario fluorescente anti-mouse cyanine 2 (Cy2) per 2 ore a temperatura ambiente. I tessuti sono stati quindi montati in vetrini e coperti con l'utilizzo del GEL-MOUNT™ ed esaminati al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioskop 2) e confocale (CLSM: Zeiss LSM 510), quest'ultimo utilizzato anche come strumento di acquisizione di immagini. In questa fase del lavoro le sezioni sono state utilizzate per contare le cellule neuronali e determinare la degenerazione neuronale negli animali trattati con il farmaco rispetto ai malati e al controllo. Sono stati così analizzati tre campi, ciascuno di 1.0 mm² in 3 sezioni rostrocaudali per ogni emisfero per ogni gruppo di trattamento. I topi WT sono stati considerati il controllo. È stata così calcolata la densità neuronale per mm².

c. Area dei neuroni striatali:

È stata misurata l'area dei neuroni striatali per calcolare l'eventuale effetto protettivo dato dal farmaco. A tale scopo è stato utilizzato un marcatore che potesse evidenziare i neuroni maggiormente presenti nel corpo striato. Con singola immunofluorescenza siamo andati quindi a marcare i neuroni Calbindina positivi, medium spiny neurons, i quali sono i primi a degenerare nell'HD e sono presenti nello striato al 99% (Albin et al., 1992). È stata utilizzato un anticorpo diretto contro CALB D28K (SIGMA, St Lous, MO) ad una concentrazione di 1:200 in soluzione contenente PB 0.1 M, 0.3% di TritonX-100, sodio azide allo 0.02%, per 72 ore a +4°C, successivamente evidenziato con anticorpo secondario fluorescente Cy2 diretto specificatamente verso l'anticorpo primario. Sono stati considerati anche in questo caso 3 topi per ciascun gruppo, tre campi di 1.0 mm² di area tre

sezioni rostrocaudali per ciascun emisfero. Circa 200 neuroni per ogni topo sono stati analizzati. L'area è stata calcolata con l'utilizzo dello Zeiss LSM software.

d. Morfologia microgliale:

Per l'analisi microgliale è stata utilizzata la tecnica immuistochemica, DAB, con un anticorpo specifico della microglia, mouse anti-CD-11b (Serotec). Le sezioni sono state incubate con anticorpo primario (1:500) in soluzione contenente PB 0.1 M, 0.3% di TritonX-100, sodio azide allo 0.02%, per 72 ore a +4°C. Dopo essere state risciacquate per tre volte in PB, sono state poi incubate con anticorpo secondario mouse-biotinilato (1:50) in PB 0.1 M, 0.3% di TritonX-100, sodio azide allo 0.02% per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo sciacqui in PB le sezioni sono state incubate con un mix di avidina biotina (Vectastain ABC Kit, Vector, Burlingame, CA, USA) ciascuno con una diluizione di 1:100 in PB 0.1 M, 0.3% di TritonX-100, sodio azide allo 0.02% per 90 minuti a temperatura ambiente. Infine le sezioni sono state montate su vetrini polilesinati, deidratati e coperti con Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Germany).

e. Corpi di inclusione intranucleare:

Le inclusioni NII sono state studiate con singola DAB immunoistochemica per NII ubiquitinati (Meade et al., 2002) usando un anticorpo diretto contro l'ubiquitina (Chemicon, Temecula, CA) ad una concentrazione di 1:200, con il metodo precedentemente descritto per la microglia. I neuroni ubiquitina positivi sono stati usati per studi morfometrici delle NII, misurate con l'utilizzo del microscopio confocale. È stato calcolato il diametro delle NII con l'utilizzo dello Zeiss LSM software, considerando due topi per trattamento, per ciascuno tre quadrati da 1mm², tre sezioni rostrocaudali di

ciascun emisfero (i topi WT non hanno mostrato NII ubiquitina positivi). Infine un set di sezioni sono state contromarcate con Nissl per calcolare il numero di neuroni contenenti NII. Sono stati contati circa 150 neuroni per emisfero per ciascuna delle tre sezioni dei tre topi analizzati di ogni gruppo di trattamento. È stata determinata la percentuale di neuroni striatali nei topi R6/2 contenenti NII.

3. ANALISI STATISTICA

In entrambi i modelli animali, è stato utilizzato il test statistico ANOVA ad una via ed il test HSD Tuckey. Il valore di significatività considerato è stato di $p < 0.05$.

RISULTATI

1. MODELLO DA LESIONE CON QA

1.1 DEGENERAZIONE NEURONALE

a. Valutazione della lesione striatale:

Abbiamo osservato una significativa riduzione della dimensione della lesione striatale negli animali trattati con Rolipram 1.5mg/kg/giorno comparati agli altri gruppi ad entrambi i time points (Fig 1.2). L'area della lesione negli animali trattati con veicolo è risultata essere di $1135 \mu\text{m}^2 \pm 13.2 \text{ SEM}$ a 2 settimane e $1351 \mu\text{m}^2 \pm 12.7 \text{ SEM}$ a 8 settimane, mentre la dimensione della lesione è di $455 \mu\text{m}^2 \pm 7.35 \text{ SEM}$ a 2 settimane e $736 \mu\text{m}^2 \pm 8.51$ a 8 settimane negli animali trattati con Rolipram 1.5mg/kg/giorno ($p < 0.05$). La dimensione della lesione negli animali trattati con Rolipram 0.15 mg/Kg è invece comparabile a quella degli animali controllo.

b. Sopravvivenza neuronale:

Il numero dei neuroni, negli animali trattati con Rolipram 1.5mg/Kg, a 2 settimane è significativamente maggiore nel core della lesione nella zona dorsale e laterale rispetto agli animali trattati con veicolo e agli animali trattati con Rolipram 0.15mg/Kg ($p < 0.05$), mentre il numero dei neuroni presenti nella zona mediale adiacente alla lesione rispetto agli animali trattati con soluzione salina non è significativamente differente.

Gli effetti del Rolipram sono stati consistenti soprattutto a 8 settimane. A questo time point, il numero dei neuroni striatali ad entrambe le concentrazioni è stato significativamente maggiore degli animali trattati con

veicolo ($p < 0.05$) con un effetto significativamente maggiore nell'area dorsale (Fig 1.3).

2. TOPO TRANSGENICO R6/2

2.1 SOPRAVVIVENZA

Il Rolipram (1.5mg/Kg/giorno) aumenta significativamente la sopravvivenza dei topi R6/2. La media di sopravvivenza negli R6/2 trattati con soluzione salina è uguale a 88.9 +/- 4.2 mentre quella dei topi trattati con il farmaco risulta essere di 95.1 +/- 4.5 (media +/- SEM, n=20) (Fig 2.1). Inoltre il peso degli animali risulta essere costante tra le 10 e le 14 settimane di vita (Fig 2.2).

2.2 VALUTAZIONE DEI DEFICIT NEUROLOGICI

È stato osservato claspings della zampa in ciascun gruppo di trattamento a 12 settimane d'età. Il Rolipram (1.5 mg/Kg/giorno) migliora il deterioramento dell'attività locomotoria e assesta il claspings della zampa nei topi R6/2. Abbiamo osservato un inizio dell'attività del claspings anticipato nei topi R6/2 trattati con soluzione fisiologica. Il claspings ha inizio dopo 64 +/- 4 giorni nel gruppo trattato con soluzione salina, e dopo 76 +/- 3 giorni nel gruppo trattato con il Rolipram. Non si osserva invece claspings nei topi WT (Fig 2.3).

2.3 NEUROLOGIA

a. Valutazione del volume dell'encefalo:

In accordo con precedenti studi (Hockly et al., 2002; Stack et al., 2006), il volume dell'encefalo dei topi R6/2 trattati con soluzione salina, è marcatamente ridotto rispetto ai topi WT. La media del volume dell'encefalo è di $3.42 \pm 0.39 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ nei topi R6/2 trattati con soluzione salina rispetto al $4.32 \pm 0.41 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ negli animali WT. Il volume dell'encefalo degli R6/2 trattati con Rolipram (1.5 mg/Kg/giorno) è invece di $3.89 \pm 0.39 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ($p < 0.005$). Ciò dimostra che il Rolipram attenua l'atrofia dell'encefalo e l'ipertrofia ventricolare nei topi transgenici R6/2 (Fig 2.4).

b. Sopravvivenza neuronale:

L'analisi quantitativa mostra che topi R6/2 trattati con il Rolipram (1.5mg/Kg/giorno) presentano un numero significativamente maggiore di neuroni striatali rispetto agli animali trattati con soluzione salina. La media dei neuroni per campo microscopico è di 221.3 ± 17.2 nei topi WT, nei topi transgenici trattati con veicolo è di 65.7 ± 12.4 , e negli R6/2 trattati con Rolipram è di 192.5 ± 18.5 ($p < 0.05$) (Fig 2.5).

c. Area dei neuroni striatali:

Le nostre osservazioni istologiche mostrano che nei topi R6/2 trattati con veicolo i neuroni sono di dimensioni minori e mostrano il tipico aspetto "angular neuron". Gli studi quantitativi con anticorpo diretto contro la CALB, con l'utilizzo del LSM software, ci mostrano che in questo gruppo di trattamento i neuroni striatali di tipo spiny sono significativamente più piccoli rispetto a quelli del gruppo WT (la media dell'area è di $94.3 \mu\text{m}^2$ rispetto al WT dove raggiunge i $115.1 \mu\text{m}^2$) e che nei topi R6/2 trattati con il

Rolipram (1.5mg/Kg/giorno) i neuroni striatali di tipo spiny sono significativamente più grandi del gruppo trattato con il veicolo ($113\mu\text{m}^2$) ($p<0.05$) (Fig 2.6).

d. Morfologia microgliale:

È stata utilizzata un'immunoreazione diretta contro il CD-11b per studiare la microglia nei nostri campioni. Nei topi WT è stata osservata solo microglia quiescente, priva di processi e con corpo ovoidale. Il nostro anticorpo rileva un'intensa immunoreazione microgliale nei topi R6/2 trattati con soluzione salina. In questo gruppo le cellule microgliali appaiono infatti numerose con grande corpo ed arborizzazioni. Si ha un'attenuata reazione microgliale invece nei topi R6/2 trattati con il Rolipram con poche cellule immunoreattive ed arborizzazioni simili alle normali cellule quiescenti (Fig 2.7).

e. Corpi di inclusione intranucleare:

Abbiamo esaminato l'effetto del Rolipram sulla formazioni di NII nello striato. Non sono stati trovati NII ubiquitina positivi negli animali WT. L'analisi immunohistochimica per l'ubiquitina in sezioni contromarcate con il Nissl ci mostra che la frequenza di NII nello striato di topi R6/2 trattati con soluzione salina è significativamente maggiore rispetto ai topi R6/2 trattati con Rolipram. NII ubiquitinati si osservano nel 95% dei neuroni degli animali trattati con soluzione salina, mentre nei topi trattati con Rolipram sono il 54% ($p<0.05$). Inoltre, il diametro delle NII negli animali trattati con Rolipram è sensibilmente ridotto. Questa riduzione di numero e di dimensioni delle NII dimostra che il Rolipram blocca il formarsi di inclusioni nei topi R6/2 (Fig 2.8, Fig 2.9).

DISCUSSIONE

Nel sistema nervoso centrale, il controllo dell'espressione genica per mezzo di segnali extracellulari è importante in numerose funzioni fisiologiche come la crescita, la differenziazione, la morte cellulare. Ogni stimolo scatena segnali molecolari che possono controllare l'espressione di geni coinvolti nella risposta cellulare, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Le neurotrofine, per esempio, sono delle molecole dotate di azione trofica sui neuroni, svolgono un importante effetto protettivo permettendo lo sviluppo ed il mantenimento delle cellule nervose anche in situazioni di sofferenza cellulare. Il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni striatali dipendono in modo specifico dal BDNF. I livelli di BDNF sono, infatti, molto ridotti nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da HD (Zuccato et al., 2001), così come appaiono ridotti i livelli di RNA messaggero, fenomeno indicativo di una diminuita trascrizione del fattore destinato ai neuroni dello striato. Il BDNF è prodotto nel corpo cellulare dei neuroni corticali e sotto lo stimolo dell'huntingtina (proteina codificata dal braccio corto del cromosoma 4 che nella malattia va incontro a mutazione), viene poi trasportato lungo le fibre allo striato (Altar et al., 1997; Conner et al., 1997). Inoltre, il 99% circa delle cellule corticali nel ratto normale contiene sia BDNF che huntingtina (Fusco et al., 2003), ad indicare una chiara dipendenza dell'huntingtina nella produzione di BDNF da parte di tali neuroni. In malati di HD la sintesi di questa neurotrofina (e quindi la sua azione protettiva) viene meno a causa di una mancata regolazione

dell'attività trascrizionale da parte dell'huntingtina mutata (con il tratto poli-Q espanso). Le neurotrofine possono anche modificare la propria attività ed espressione genica e quindi la risposta cellulare attraverso sistemi di secondi messaggeri quali il cAMP.

Il Rolipram è stato sviluppato come farmaco antidepressivo il cui meccanismo d'azione si basa sulla disattivazione della fosfodiesterasi 4 (PDE4) enzima che ha come substrato il cAMP (Krause and Kuhne, 1993) ed è stato dimostrato esercitare un effetto protettivo sul danno neuronale da ischemia (Hiroyuki et al. 1995). È stato inoltre visto che somministrazioni croniche di questo farmaco migliorano alcuni aspetti della sintomatologia in modelli sperimentali per lo studio della depressione (Tetsuji itoh et al., 2004). L'effetto neuroprotettivo è legato ad un aumento dei livelli intracellulari di cAMP con conseguente attivazione di proteine quali la CREB e fattori neurotrofici come il BDNF, elementi chiave nella regolazione della neuroprotezione e neuroplasticità sinaptica (Frechilla et al., 1998). I nostri risultati mostrano un effetto benefico del Rolipram nel modello QA di ratto, confermando ed avvalorano l'estesa letteratura riguardante il Rolipram ed i suoi effetti sull'eccitotossicità ed infiammazione (Block et al., 2001; Block et al., 2002).

Con i nostri studi immunoistochimici siamo andati inizialmente ad analizzare gli effetti del Rolipram in modelli HD-simili ottenuti per lesione da QA. Precedenti lavori hanno infatti dimostrato che il Rolipram ha un effetto protettivo nel danno neuronale provocato da ischemia globale e da embolia nei ratti (Nagakura et al., 2002), e poichè l'istologia dello striato HD è simile a quella dell'encefalo ischemico (Meade et al., 2000), i nostri studi sono stati rivolti a determinare l'effetto del farmaco sulla

degenerazione striatale in termini di riduzione della lesione e incremento del numero di cellule. Il Rolipram nel modello QA mostra un effetto benefico dato dalle diminuite dimensioni dell'area colpita da degenerazione sia a due che otto settimane dalla lesione. Ciò è un diretto segnale dell'effetto neuroprotettivo prodotto dal farmaco (Salzberg-Brenhouse et al., 2003) dimostrato anche attraverso il risparmio neuronale osservato nella conta cellulare. Questo effetto è dose-dipendente e significativo ad entrambi i time points nell'area dorsale, molto vulnerabile sia a lesione da QA che a degenerazione HD. A due settimane osserviamo anche un significativo risparmio neuronale nel core della lesione e nell'area laterale adiacente alla lesione. Il precedente lavoro di Block et al. (2001) mostra che il Rolipram è in grado di indurre neuroprotezione in ratti QA con alte dosi di acido quinolinico. Pertanto i nostri dati oltre ad avvalorare il lavoro di Block aggiungono anche una prospettiva specificatamente rivolta all'utilizzo del Rolipram nella degenerazione provocata dalla corea di Huntington.

La seconda parte del nostro lavoro è stata rivolta ad analizzare l'effetto del farmaco in un modello animale che presentasse la stessa eziopatogenesi dell'HD umana: i topi transgenici R6/2. È stato condotto così un lavoro con approccio simile al precedente ma su un modello animale che potesse ancor più confermare ed avvalorare la nostra ipotesi. Nel lavoro con i topi è stata considerata un'unica concentrazione del farmaco (Rolipram 1.5mg/kg/giorno) poichè nello studio condotto sul ratto risultava essere maggiormente significativa ed efficace.

I topi R6/2 muoiono solitamente a 12 settimane e presentano degenerazione selettiva di neuroni di proiezione striatali. Il nostro lavoro ha permesso oltre di stabilire quale fosse la sopravvivenza dell'animale indotta dal farmaco,

anche di analizzare la condizione neuroanatomica dell'encefalo al time point critico per questo modello. I topi trattati con Rolipram mostrano una maggiore sopravvivenza ed una significativa diminuzione della degenerazione neuronale. Presentano inoltre, una ridotta atrofia dell'encefalo rispetto al gruppo trattato con veicolo, ed un risparmio di neuroni striatali di medie dimensioni che mantengono anche il loro aspetto morfologico. Nei topi trattati con Rolipram inoltre, solo una piccola percentuale di neuroni contengono NII e le dimensioni degli aggregati sono minori rispetto a quelle osservate nei topi trattati con soluzione salina. Si è infine dimostrata anche una riduzione della reazione microgliale.

Il nostro precedente lavoro ha dimostrato che il Rolipram è in grado di indurre neuroprotezione nel modello QA (DeMarch et al., 2007): questi dati non solo avvalorano i precedenti studi ma aggiungono la reale potenziale prospettiva all'uso del Rolipram nella corea di Huntington.

IMMAGINI E GRAFICI

1. MODELLO DA LESIONE CON QA

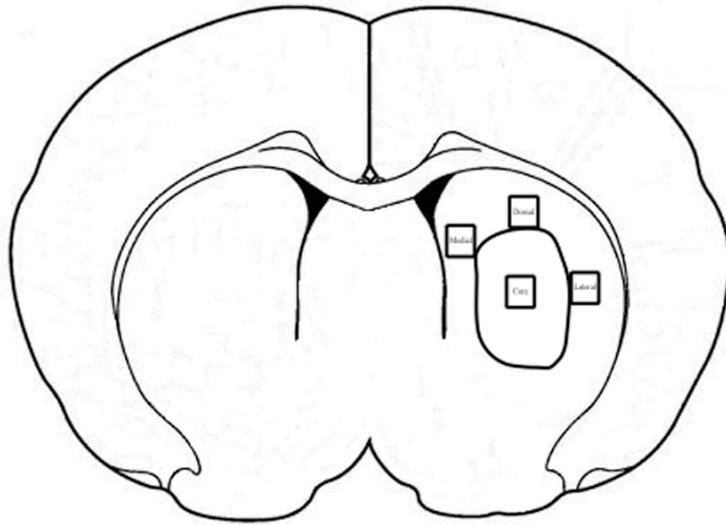


Fig 1.1 Ricostruzione dell'area striatale dei neuroni colpiti da neurodegenerazione indotta da QA, mappata dal Paxinos "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic Press 1998. Per la conta cellulare sono state considerate quattro zone: il core della lesione e le aree mediale, dorsale e laterale.

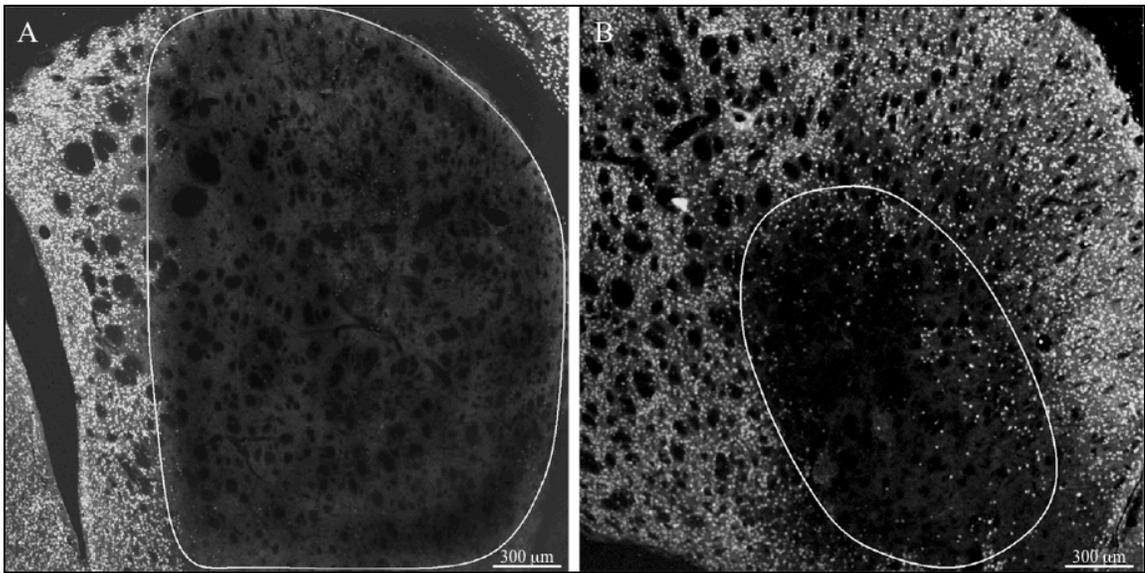


Fig 1.2 Immagini a fluorescenza single label del NeuN, acquisite con microscopio confocale laser scanning, nello striato di ratto dopo lesione da QA negli animali trattati con veicolo (A) e negli animali trattati con Rolipram 1.5 mg/Kg/giorno due settimane dopo la lesione. Le aree lesionate sono delineate con il software Zeiss LSM 510. Si nota una marcata differenza della dimensione della lesione.

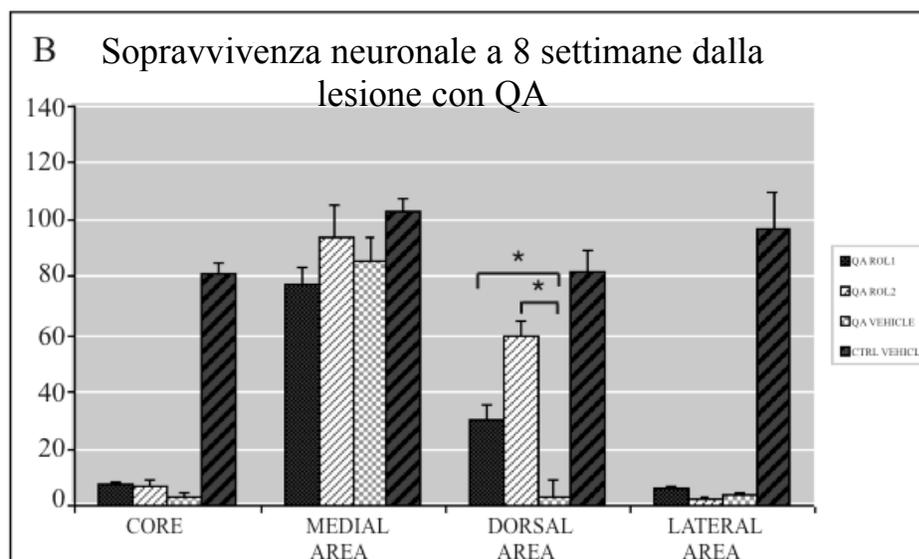
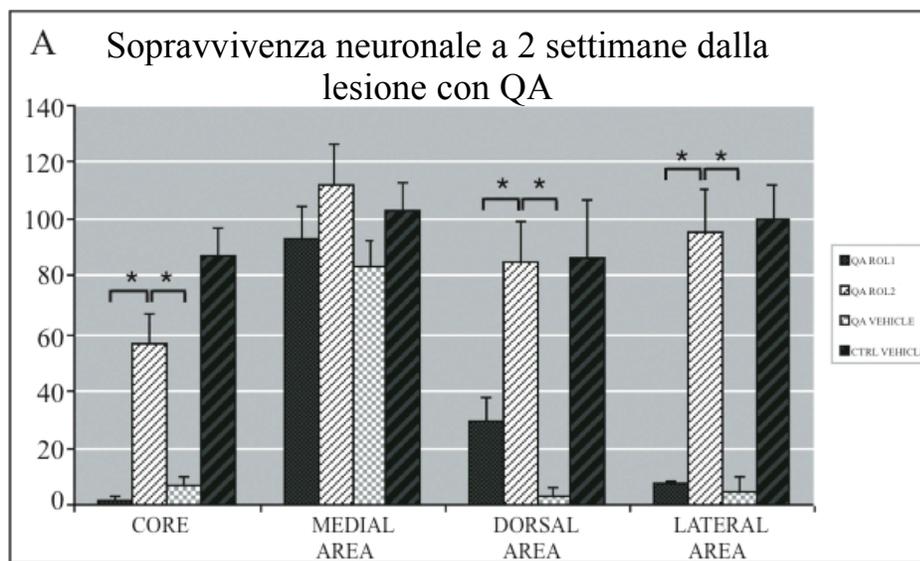


Fig 1.3 L'istogramma mostra il numero dei neuroni immunoreattivi al NeuN in differenti aree striatali a 2 settimane dalla lesione con QA (A) e ad 8 settimane dalla lesione con QA (B). Animali trattati con ROL1= Rolipram 0.15mg/kg; ROL2= Rolipram 1.5mg/kg/giorno dopo lesione con QA sono comparati ad animali controllo ed animali lesionati con QA e trattati con veicolo.

2. TOPO TRANSGENICO R6/2

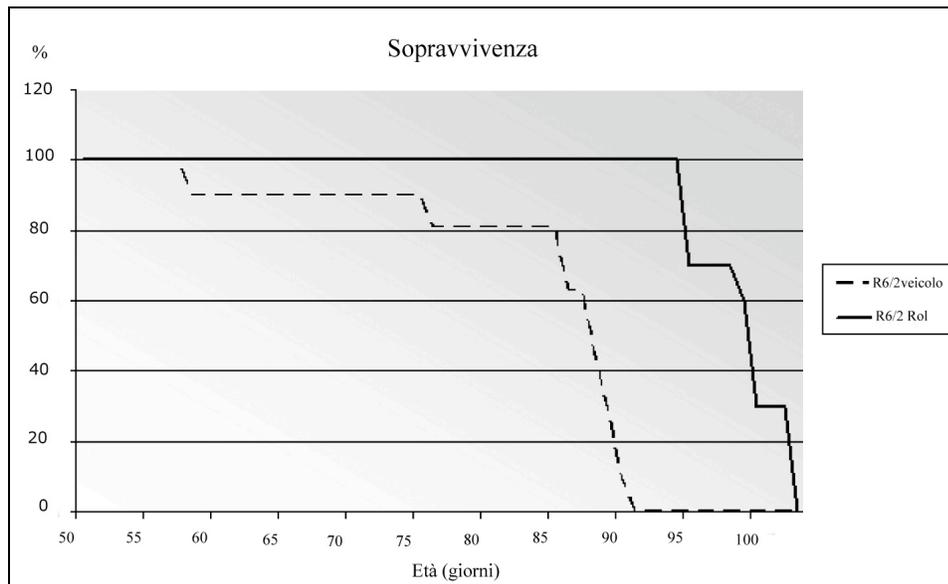


Fig 2.1 Nell'istogramma sono mostrate le curve di sopravvivenza dei topi R6/2 trattati con soluzione salina e dei topi R6/2 trattati con Rolipram. Topi R6/2 trattati con Rolipram 1.5 mg/Kg/giorno somministrato per via i.p. sopravvivono più a lungo degli animali trattati con veicolo ($p < 0.05$). Rol= Rolipram 1.5 mg/kg.

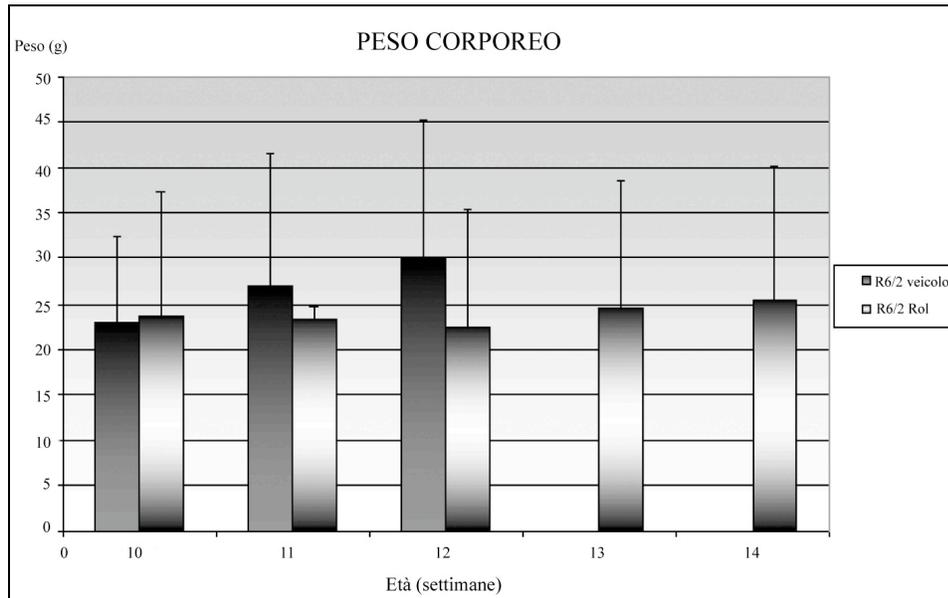


Fig 2.2 L'istogramma mostra il peso corporeo dei topi R6/2 trattati con soluzione salina e dei topi R6/2 trattati con Rolipram, tra le 10 e le 14 settimane d'età. Topi R6/2 trattati con Rolipram 1.5 mg/Kg/giorno somministrato per via i.p. mantengono costante il proprio peso corporeo. Rol= Rolipram 1.5 mg/kg.

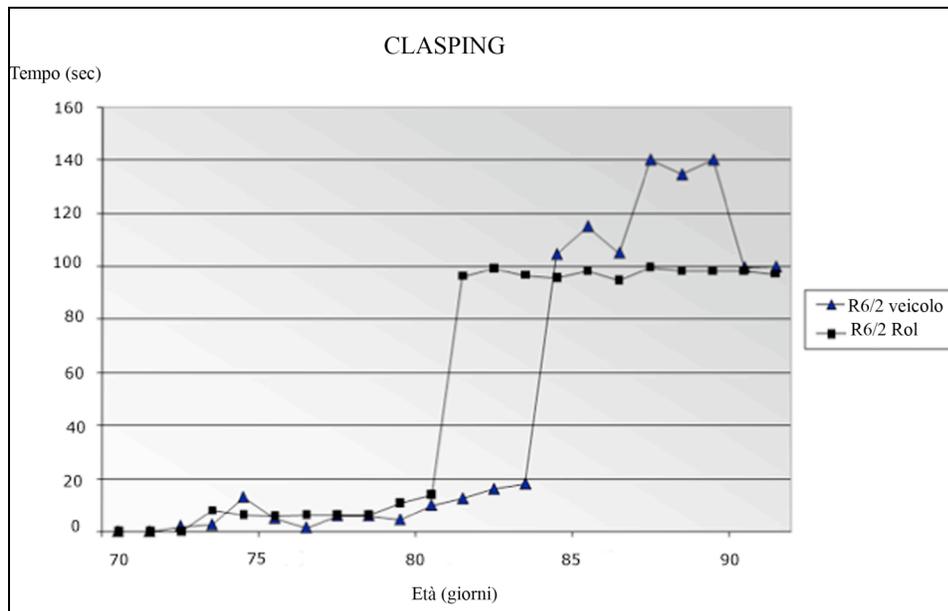


Fig 2.3 Nell'istogramma è mostrato il tempo di claspings in topi R6/2 trattati con soluzione salina e in topi R6/2 trattati con il Rolipram. Topi R6/2 trattati con Rolipram 1.5mg/Kg/giorno somministrato per via i.p. mostrano un tempo di claspings inferiore agli animali trattati con veicolo ($P < 0.05$). Rol= Rolipram 1.5 mg/kg.

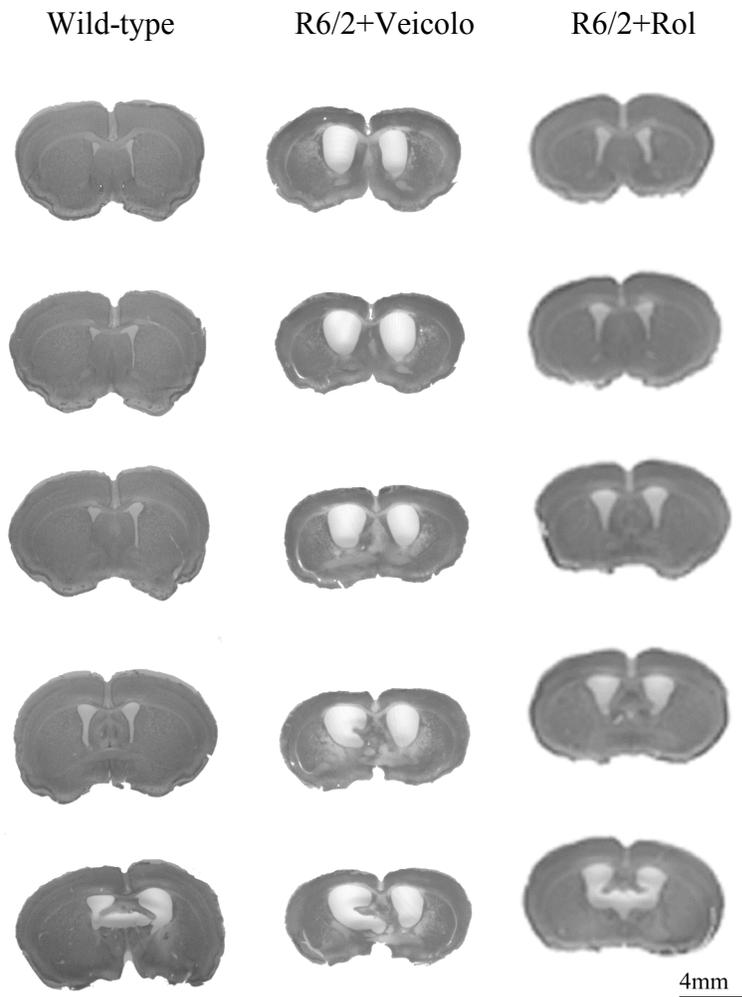


Fig 2.4 Microscopio a luce trasmessa mostra la colorazione Nissl di sezioni coronali di topo WT, R6/2 trattato con veicolo ed R6/2 trattato con Rolipram 1.5mg/kg/giorno. Si nota una marcata atrofia con grossa dilatazione dei ventricoli nei topi R6/2 trattati con veicolo rispetto agli animali trattati con Rolipram 1.5mg/Kg/giorno, in quest'ultimi l'atrofia ventricolare è marcatamente ridotta. Rol= Rolipram 1.5 mg/kg.

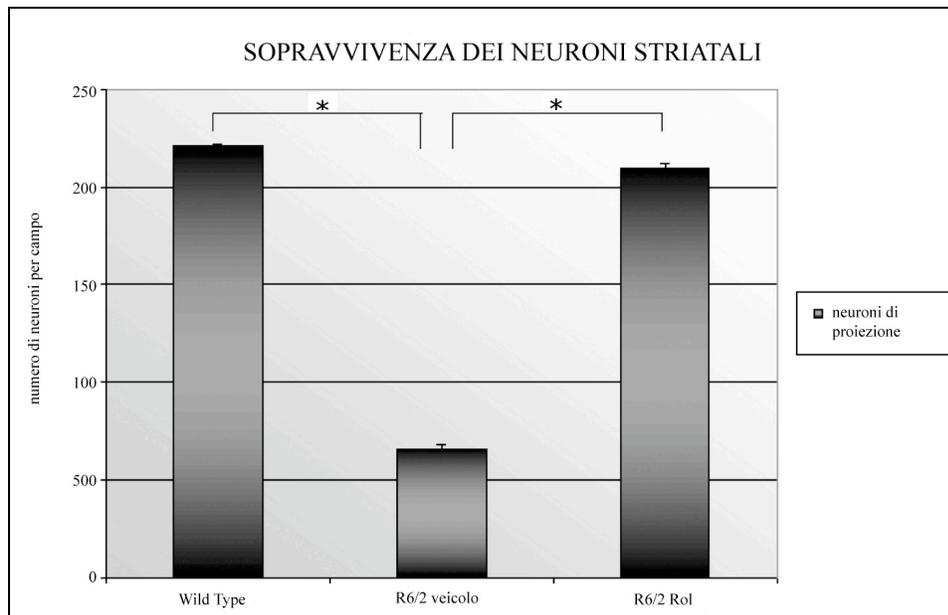


Fig 2.5 L'istogramma mostra il numero di neuroni immunoreattivi per il NeuN nello striato di topi WT, R6/2 trattati con veicolo, e R6/2 trattati con Rolipram 1.5mg/kg/giorno a 12 settimane d'età. Il numero di neuroni è significativamente minore nei topi R6/2 trattati con soluzione salina rispetto ai topi WT e agli R6/2 trattati con Rolipram 1.5 mg/Kg/giorno ($p < 0.05$).

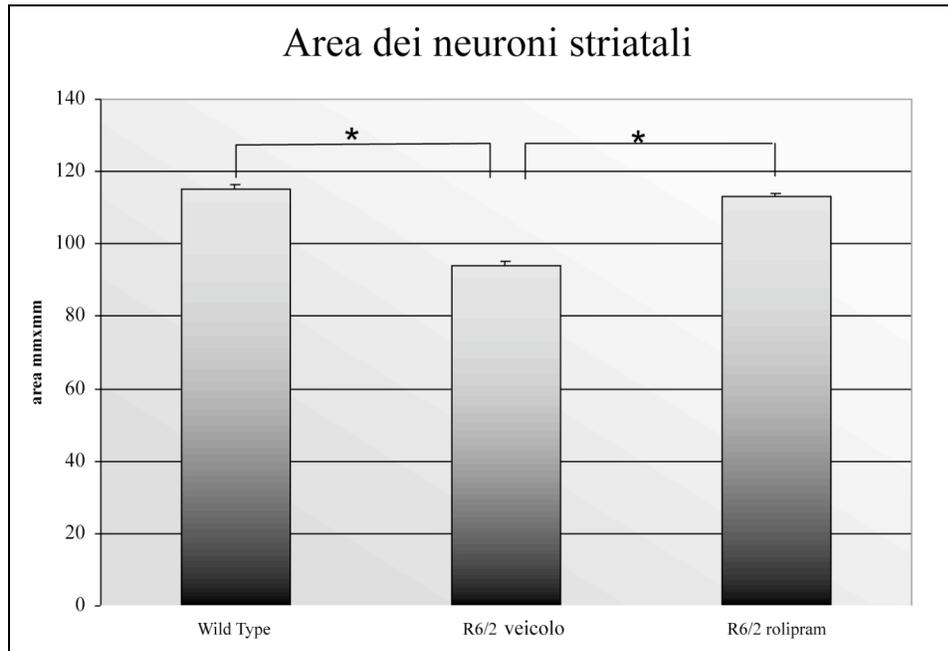


Fig 2.6 L'istogramma mostra le dimensioni dell'area dei neuroni striatali (immunoreattivi per la Calb) nei tre gruppi (WT, R6/2 trattati con veicolo, and R6/2 trattati con Rolipram 1.5mg/kg/giorno). Nei topi R6/2 trattati con Rolipram 1.5 mg/Kg/giorno l'area dei neuroni striatali è significativamente maggiore dell'area dei topi R6/2 trattati con veicolo ($p < 0.05$).

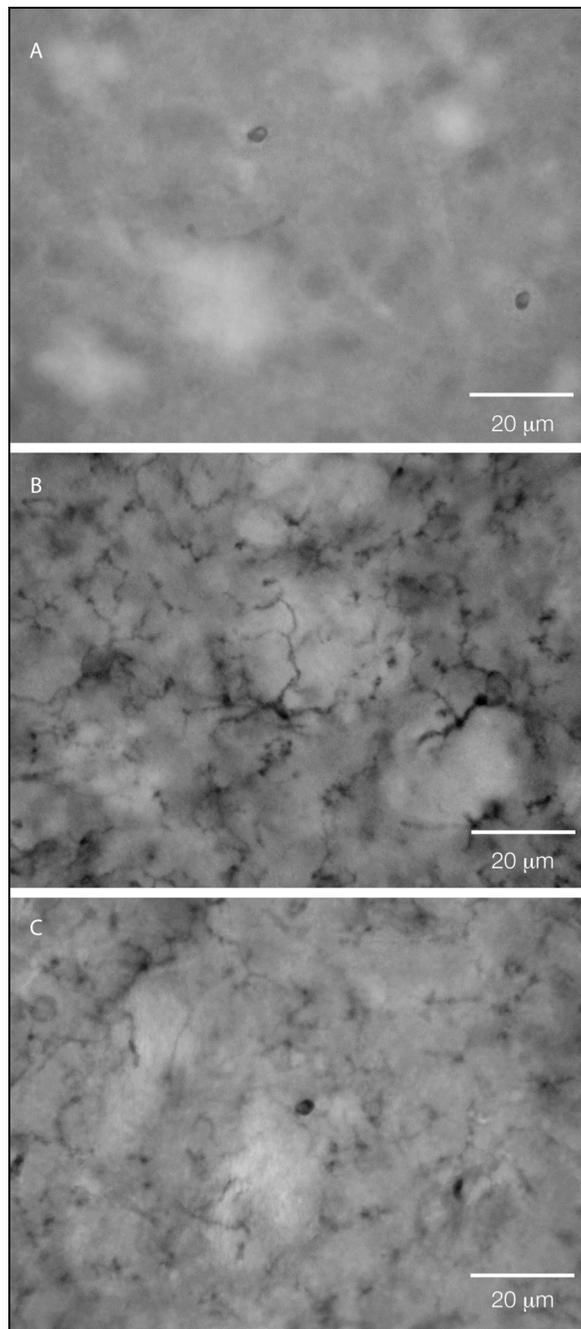


Fig. 2.7 Immunoistochimica (DAB) per CD-11b nello striato di sezioni di tessuto di topo WT (A), topo R6/2 trattato con soluzione salina (B), topo R6/2 trattato con Rolipram 1.5mg/Kg/giorno (C). Nei topi trattati con soluzione salina si ha un'intensa reazione microgliale, le cellule microgliali appaiono numerose con grosse arborizzazioni e corpi "rod-shaped". In (C) topi R6/2 trattati con Rolipram, vi è solo qualche cellula positiva con alcune arborizzazioni, insieme alle normali cellule quiescenti.

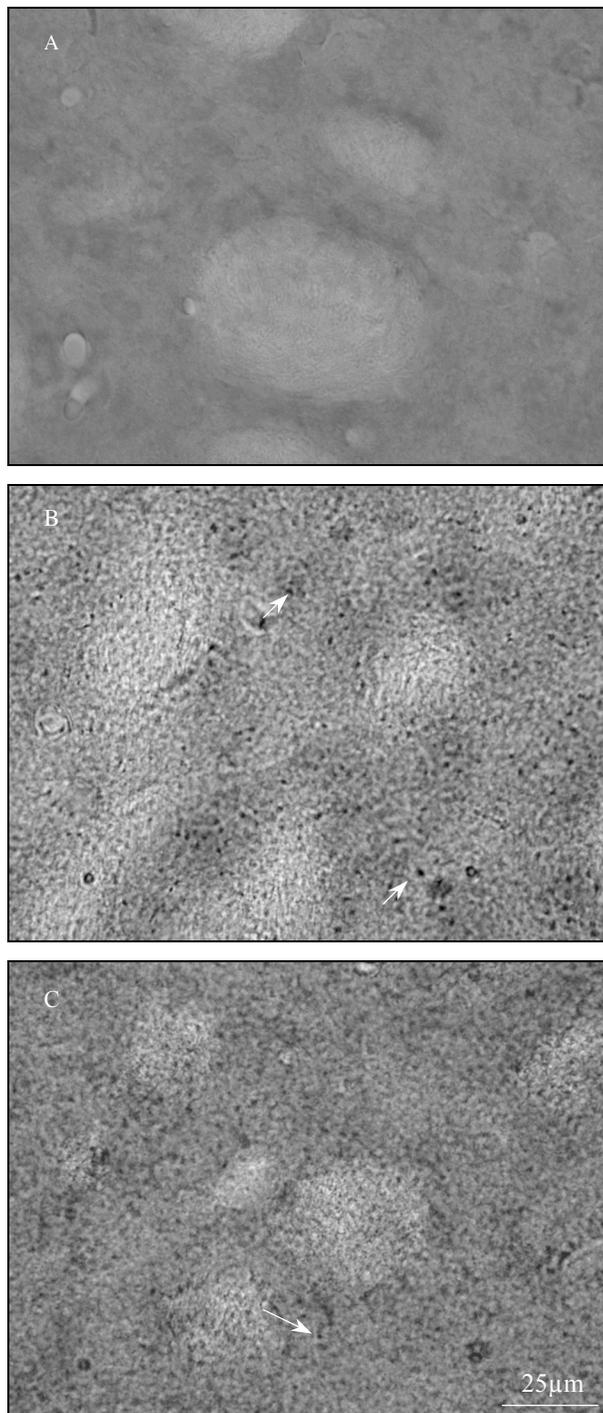


Fig 2.8 Immunoistochimica (DAB) per ubiquitina nello striato di topo WT (A), topo R6/2 trattato con soluzione salina (B), topo R6/2 trattato con Rolipram 1.5mg/kg/giorno (C). Il Rolipram riduce la frequenza e le dimensioni delle NII nello striato. (indicati dalle frecce).

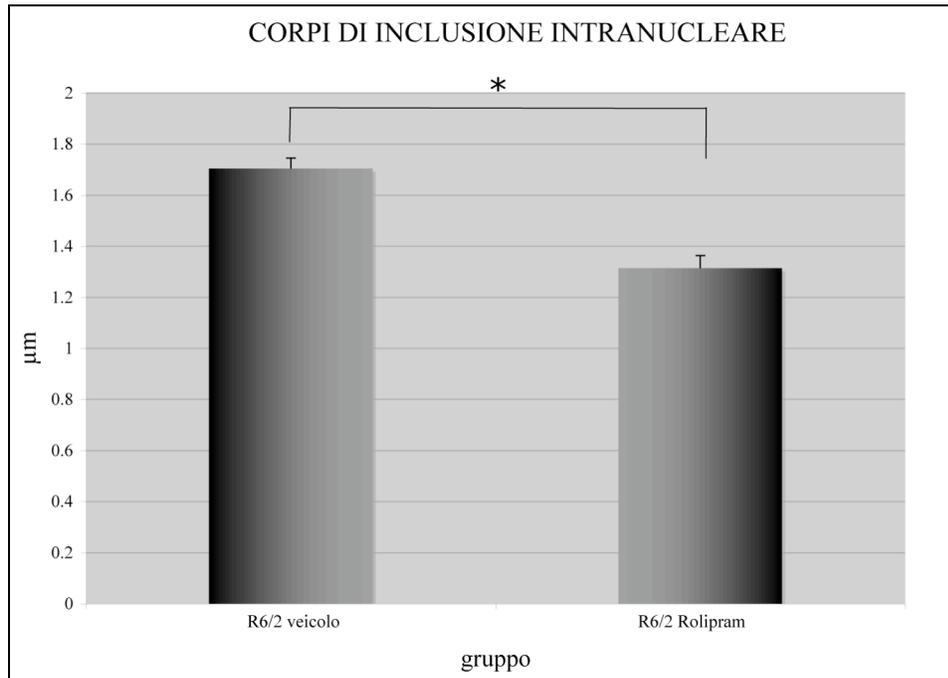


Fig 2.9 L'istogramma mostra le dimensioni delle NII nei topi R6/2 trattati con veicolo e nei topi R6/2 trattati con Rolipram. Il Rolipram riduce la dimensione delle NII ($p < 0.05$).

BIBLIOGRAFIA

- Albin, R. L., A. Reiner, et al. (1992). "Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease." *Ann Neurol* 31(4): 425-30.
- Albin, R. L., A. Reiner, et al. (1990). "Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia." *Ann Neurol* 27(4): 357-65.
- Albin, R. L. and A. B. Young (1988). "Somatosensory phenomena in Huntington's disease." *Mov Disord* 3(4): 343-6.
- Altar, C. A., N. Cai, et al. (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain." *Nature* 389(6653): 856-60.
- Anthony, D. C. and V. H. Perry (1998). "Stroke: a double-edged sword for cleaving clots?" *Curr Biol* 8(8): R274-7.
- Augood, S. J., R. L. Faull, et al. (1996). "Reduction in enkephalin and substance P messenger RNA in the striatum of early grade Huntington's disease: a detailed cellular in situ hybridization study." *Neuroscience* 72(4): 1023-36.
- Barquero-Jimenez, M. S. and E. Gomez-Tortosa (2001). "[Cognitive disorders in patients with Huntington's disease]." *Rev Neurol* 32(11): 1067-71.
- Beal, M. F., E. Brouillet, et al. (1993). "Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." *J Neurosci* 13(10): 4181-92.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, et al. (1991). "Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease." *J Neurosci* 11(6): 1649-59.

- Beal, M. F., N. W. Kowall, et al. (1986). "Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid." *Nature* 321(6066): 168-71.
- Becher, M. W., J. A. Kotzuk, et al. (1998). "Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidoluisian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length." *Neurobiol Dis* 4(6): 387-97.
- Behrens, M. M., U. Strasser, et al. (1999). "Neurotrophin-mediated potentiation of neuronal injury." *Microsc Res Tech* 45(4-5): 276-84.
- Block, F., W. Schmidt, et al. (2001). "Rolipram reduces excitotoxic neuronal damage." *Neuroreport* 12(7): 1507-11.
- Block, P. C. (1997). "Coronary artery stenting in MI and Abciximab: a necessary combination?" *Cathet Cardiovasc Diagn* 42(2): 180.
- Block, W., F. Traber, et al. (2002). "In-vivo proton MR-spectroscopy of the human brain: assessment of N-acetylaspartate (NAA) reduction as a marker for neurodegeneration." *Amino Acids* 23(1-3): 317-23.
- Calabresi, P., D. Centonze, et al. (2000). "Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration." *Prog Neurobiol* 61(3): 231-65.
- Calabresi, P., D. Centonze, et al. (2000). "Acetylcholine-mediated modulation of striatal function." *Trends Neurosci* 23(3): 120-6.
- Campodónico, J. R., E. Aylward, et al. (1998). "When does Huntington's disease begin?" *J Int Neuropsychol Soc* 4(5): 467-73.
- Carter, R. J., L. A. Lione, et al. (1999). "Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation." *J Neurosci* 19(8): 3248-57.
- Cattaneo, E., D. Rigamonti, et al. (2001). "Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research." *Trends Neurosci* 24(3): 182-8.

- Chen, M., V. O. Ona, et al. (2000). "Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease." *Nat Med* 6(7): 797-801.
- Chen, Q., C. L. Veenman, et al. (1996). "Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity." *Neuroscience* 73(3): 715-31.
- Conner, J. M., J. C. Lauterborn, et al. (1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport." *J Neurosci* 17(7): 2295-313.
- Cooper, A. J., K. F. Sheu, et al. (1998). "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase abnormality in metabolically stressed Huntington disease fibroblasts." *Dev Neurosci* 20(4-5): 462-8.
- Coyle JT, Schwarcz R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*. 16;263(5574):244-6.
- Cramer, H., J. M. Warter, et al. (1984). "Analysis of neurotransmitter metabolites and adenosine 3',5'-monophosphate in the CSF of patients with extrapyramidal motor disorders." *Adv Neurol* 40: 431-5.
- Davies, J. P., P. D. Cotter, et al. (1997). "Cloning and mapping of human Rab7 and Rab9 cDNA sequences and identification of a Rab9 pseudogene." *Genomics* 41(1): 131-4.
- Dawson, D. V., C. Ober, et al. (1995). "Extended HLA profile of an inbred isolate: the Schmiedeleut Hutterites of South Dakota." *Genet Epidemiol* 12(1): 47-62.
- DeMarch, Z., C. Giampa, et al. (2007). "Beneficial effects of Rolipram in a quinolinic acid model of striatal excitotoxicity." *Neurobiol Dis* 25(2): 266-73.

- Denovan-Wright, E. M., S. Devarajan, et al. (2002). "Maintained improvement with minocycline of a patient with advanced Huntington's disease." *J Psychopharmacol* 16(4): 393-4.
- Desai, N. S., L. C. Rutherford, et al. (1999). "BDNF regulates the intrinsic excitability of cortical neurons." *Learn Mem* 6(3): 284-91.
- DiFiglia, M. (1997). "Clinical Genetics, II. Huntington's disease: from the gene to pathophysiology." *Am J Psychiatry* 154(8): 1046.
- DiFiglia, M. (1990). "Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease." *Trends Neurosci* 13(7): 286-9.
- Dugan, L. L., T. S. Lin, et al. (1995). "Detection of free radicals by microdialysis/spin trapping EPR following focal cerebral ischemia-reperfusion and a cautionary note on the stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)." *Free Radic Res* 23(1): 27-32.
- Dunnett, S. B. (2000). "Functional analysis of fronto-striatal reconstruction by striatal grafts." *Novartis Found Symp* 231: 21-41; discussion 41-52.
- Evert, B. O., U. Wullner, et al. (2000). "Cell death in polyglutamine diseases." *Cell Tissue Res* 301(1): 189-204.
- Ferrante, R. J., O. A. Andreassen, et al. (2000). "Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease." *J Neurosci* 20(12): 4389-97.
- Ferrante, R. J., M. F. Beal, et al. (1987). "Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease." *Brain Res* 411(1): 162-6.
- Ferrante, R. J. and N. W. Kowall (1987). "Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity is distributed in the matrix compartment of normal human and Huntington's disease striatum." *Brain Res* 416(1): 141-6.
- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, et al. (1987). "Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 46(1): 12-27.

- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, et al. (1986). "Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum." *Neurosci Lett* 71(3): 283-8.
- Figueredo-Cardenas, G., Q. Chen, et al. (1997). "Age-dependent differences in survival of striatal somatostatin-NPY-NADPH-diaphorase-containing interneurons versus striatal projection neurons after intrastriatal injection of quinolinic acid in rats." *Exp Neurol* 146(2): 444-57.
- Figueredo-Cardenas, G., K. D. Anderson, et al. (1994). "Relative survival of striatal projection neurons and interneurons after intrastriatal injection of quinolinic acid in rats." *Exp Neurol* 129(1): 37-56.
- Frechilla, D., A. Otano, et al. (1998). "Effect of chronic antidepressant treatment on transcription factor binding activity in rat hippocampus and frontal cortex." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22(5): 787-802.
- Fujimaki, K., S. Morinobu, et al. (2000). "Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus." *Neuropsychopharmacology* 22(1): 42-51
- Fujisawa, T., K. Mulligan, et al. (1993). "The effect of exercise on fructose absorption." *Am J Clin Nutr* 58(1): 75-9.
- Fusco, F. R., Q. Chen, et al. (1999). "Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease." *J Neurosci* 19(4): 1189-202.
- Fusco, F. R., C. Zuccato, et al. (2003). "Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain." *Eur J Neurosci* 18(5): 1093-102.
- Gerfen, C. R. (1992). "The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia." *Annu Rev Neurosci* 15: 285-320.

- Goldberg, Y. P., S. E. Andrew, et al. (1993). "Familial predisposition to recurrent mutations causing Huntington's disease: genetic risk to sibs of sporadic cases." *J Med Genet* 30(12): 987-90.
- Gomez-Tortosa, E., M. E. MacDonald, et al. (2001). "Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease." *Ann Neurol* 49(1): 29-34.
- Gong, R., A. Rifai, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES." *J Am Soc Nephrol* 15(11): 2868-81.
- Gonzalez, M. and W. F. Collins, 3rd (1997). "Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor." *J Neurophysiol* 77(1): 502-6.
- Gourfinkel-An, I., G. Cancel, et al. (1998). "Neuronal distribution of intranuclear inclusions in Huntington's disease with adult onset." *Neuroreport* 9(8): 1823-6.
- Green F, Hamsten A, Blombäck M, Humphries S. (1993) The role of beta-fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. *Thromb Haemost.* 20;70(6):915-2
- Grove, M., J. P. Vonsattel, et al. (2003). "Huntington's disease." *Sci Aging Knowledge Environ* 2003(43): dn3.
- Hackam, A. S., R. Singaraja, et al. (1998). "The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity." *J Cell Biol* 141(5): 1097-105.
- Hansson, O., J. Nylandsted, et al. (2003). "Overexpression of heat shock protein 70 in R6/2 Huntington's disease mice has only modest effects on disease progression." *Brain Res* 970(1-2): 47-57.
- Hardingham, G. E. and H. Bading (1998). "Nuclear calcium: a key regulator of gene expression." *Biometals* 11(4): 345-58.

- Hedreen, J. C., C. E. Peyser, et al. (1991). "Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease." *Neurosci Lett* 133(2): 257-61.
- Hersch, S. M., B. J. Ciliax, et al. (1995). "Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents." *J Neurosci* 15(7 Pt 2): 5222-37.
- Hersch, S. M. and R. J. Ferrante (2004). "Translating therapies for Huntington's disease from genetic animal models to clinical trials." *NeuroRx* 1(3): 298-306.
- Hiroyuki, M. M., T. M. Ohe, et al. (1995). "[Classification of asthma based on genetics]." *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 33 Suppl: 97-9.
- Ho, L. W., R. Brown, et al. (2001). "Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease." *J Med Genet* 38(7): 450-2
- Huang, J., K. F. Roby, et al. (1995). "Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus." *J Leukoc Biol* 57(1): 27-35.
- Iannicola, C., S. Moreno, et al. (2000). "Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease." *J Neurochem* 75(2): 830-9.
- Itoh, T., M. Tokumura, et al. (2004). "Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats." *Eur J Pharmacol* 498(1-3): 135-42.
- Jackson, M. J., H. R. Zielke, et al. (1995). "Effect of dibutyryl cyclic AMP and dexamethasone on glutamine synthetase gene expression in rat astrocytes in culture." *Neurochem Res* 20(2): 201-7.
- Jenkins, B. G., H. D. Rosas, et al. (1998). "¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations cwith CAG repeat numbers." *Neurology* 50(5): 1357-65.

- Jiang, J. X., R. C. Choi, et al. (2003). "Muscle induces neuronal expression of acetylcholinesterase in neuron-muscle co-culture: transcriptional regulation mediated by cAMP-dependent signaling." *J Biol Chem* 278(46): 45435-44.
- Kazantsev, A., E. Preisinger, et al. (1999). "Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11404-9.
- Kieburz, K., A. Feigin, et al. (1996). "A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease." *Mov Disord* 11(3): 273-7.
- Kosinski, C. M., J. H. Cha, et al. (1999). "Intranuclear inclusions in subtypes of striatal neurons in Huntington's disease transgenic mice." *Neuroreport* 10(18): 3891-6.
- Krause, W., G. Kuhne, et al. (1993). "Biotransformation of the antidepressant DL-rolipram. I. Isolation and identification of metabolites from rat, monkey, and human urine." *Drug Metab Dispos* 21(4): 682-9.
- Lee, H. T., Y. C. Chang, et al. (2004). "cAMP response element-binding protein activation in ligation preconditioning in neonatal brain." *Ann Neurol* 56(5): 611-23.
- Li, X. J. (1999). "The early cellular pathology of Huntington's disease." *Mol Neurobiol* 20(2-3): 111-24.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." *Neuron* 35(4): 605-23.
- Luthi-Carter, R., A. Strand, et al. (2000). "Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* 9(9): 1259-71.
- Ma, J. N., H. H. Schiffer, et al. (2007). "Identification of the atypical L-type Ca²⁺ channel blocker diltiazem and its metabolites as ghrelin receptor agonists." *Mol Pharmacol* 72(2): 380-6.

- Mangiarini, L., K. Sathasivam, et al. (1996). "Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice." *Cell* 87(3): 493-506.
- Mantamadiotis, T., T. Lemberger, et al. (2002). "Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration." *Nat Genet* 31(1): 47-54.
- Martindale, D., A. Hackam, et al. (1998). "Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates." *Nat Genet* 18(2): 150-4.
- McGeer, E. G. and P. L. McGeer (1978). "Some factors influencing the neurotoxicity of intrastriatal injections of kainic acid." *Neurochem Res* 3(4): 501-17.
- Meade, C. A., Y. P. Deng, et al. (2002). "Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusions in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice." *J Comp Neurol* 449(3): 241-69.
- Meade, C. A., G. Figueredo-Cardenas, et al. (2000). "Transient global ischemia in rats yields striatal projection neuron and interneuron loss resembling that in Huntington's disease." *Exp Neurol* 166(2): 307-23.
- Menniti, F. S., W. S. Faraci, et al. (2006). "Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development." *Nat Rev Drug Discov* 5(8): 660-70.
- Nagakura, A., K. Miyake-Takagi, et al. (2002). "Impairment of adenylyl cyclase and of spatial memory function after microsphere embolism in rats." *J Neurosci Res* 68(3): 363-72.
- Nakano, K., T. Kayahara, et al. (2000). "Neural circuits and functional organization of the striatum." *J Neurol* 247 Suppl 5: V1-15.
- Nucifora, F. C., Jr., M. Sasaki, et al. (2001). "Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity." *Science* 291(5512): 2423-8.

- O'Donnell, J. M. and H. T. Zhang (2004). "Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4)." *Trends Pharmacol Sci* 25(3): 158-63.
- Papp, M. I. and P. L. Lantos (1994). "The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology." *Brain* 117 (Pt 2): 235-43.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (1993). "Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia." *Trends Neurosci* 16(3): 111-6.
- Perutz, M. F., T. Johnson, et al. (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5355-8.
- Pou, S., W. S. Pou, et al. (1992). "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase." *J Biol Chem* 267(34): 24173-6.
- Quinn, N. and A. Schrag (1998). "Huntington's disease and other choreas." *J Neurol* 245(11): 709-16.
- Rigamonti, D., S. Sipione, et al. (2001). "Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing." *J Biol Chem* 276(18): 14545-8.
- Rogers, L. J. and G. A. Bell (1994). "Changes in metabolic activity in the hyperstriatum of the chick before and after hatching." *Int J Dev Neurosci* 12(6): 557-66.
- Roos, R. A., G. T. Bots, et al. (1986). "Quantitative analysis of morphological features in Huntington's disease." *Acta Neurol Scand* 73(2): 131-5.
- Rothnagel, J. A., M. A. Longley, et al. (1994). "Prenatal diagnosis of epidermolytic hyperkeratosis by direct gene sequencing." *J Invest Dermatol* 102(1): 13-6.
- Rubinsztein, D. C. and J. Carmichael (2003). "Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration." *Expert Rev Mol Med* 5(20): 1-21.

- Salzberg-Brenhouse HC, Chen EY, Emerich DF, Baldwin S, Hogeland K, Ranelli S, Lafreniere D, Perdomo B, Novak L, Kladis T, Fu K, Basile AS, Kordower JH, Bartus RT. "Inhibitors of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1 provide structural and functional protection against quinolinic acid-induced neurodegeneration". *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jul;306(1):218-28.
- Sathasivam, K., C. Hobbs, et al. (1999). "Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue." *Hum Mol Genet* 8(5): 813-22.
- Saudou, F., S. Finkbeiner, et al. (1998). "Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions." *Cell* 95(1): 55-66.
- Sawa, A. (2001). "Mechanisms for neuronal cell death and dysfunction in Huntington's disease: pathological cross-talk between the nucleus and the mitochondria?" *J Mol Med* 79(7): 375-81.
- Scherzinger, E., A. Sittler, et al. (1999). "Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4604-9.
- Schulz, J. B., R. T. Matthews, et al. (1995). "Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases." *Curr Opin Neurol* 8(6): 480-6.
- Sotrel, A., P. A. Paskevich, et al. (1991). "Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease." *Neurology* 41(7): 1117-23.
- Stack, E. C., A. Dedeoglu, et al. (2007). "Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice." *J Neurosci* 27(47): 12908-15.
- Speedie, L., P. Rabins, et al. (1990). "Confrontation naming deficit in dementia of depression." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2(1): 59-63.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, et al. (1998). "Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." *Neurosci Lett* 251(3): 205-8.

- Stack, E. C., K. M. Smith, et al. (2006). "Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice." *Biochim Biophys Acta* 1762(3): 373-80.
- Steffan, J. S., L. Bodai, et al. (2001). "Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*." *Nature* 413(6857): 739-43.
- Steffan, J. S., A. Kazantsev, et al. (2000). "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6763-8.
- Sugars, K. L., R. Brown, et al. (2004). "Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis." *J Biol Chem* 279(6): 4988-99.
- Sugars, K. L. and D. C. Rubinsztein (2003). "Transcriptional abnormalities in Huntington disease." *Trends Genet* 19(5): 233-8.
- Takahashi, T., S. Kikuchi, et al. (2007). "Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic." *Hum Mol Genet*.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes." *Cell* 72(6): 971-83.
- Thieben, M. J., A. J. Duggins, et al. (2002). "The distribution of structural neuropathology in pre-clinical Huntington's disease." *Brain* 125(Pt 8): 1815-28.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, et al. (1985). "Neuropathological classification of Huntington's disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 44(6): 559-77.
- Walton, D. M., D. C. Thomas, et al. (2000). "Morbid hypocalcemia associated with phosphate enema in a six-week-old infant." *Pediatrics* 106(3): E37.

- Walton, M., E. Sirimanne, et al. (1996). "The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair." *Brain Res Mol Brain Res* 43(1-2): 21-9.
- Wanker, E. E. (2000). "Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations." *Biol Chem* 381(9-10): 937-42.
- Wanker, E. E. (2000). "Protein aggregation in Huntington's and Parkinson's disease: implications for therapy." *Mol Med Today* 6(10): 387-91.
- Watts, C., P. J. Brasted, et al. (2000). "The morphology, integration, and functional efficacy of striatal grafts differ between cell suspensions and tissue pieces." *Cell Transplant* 9(3): 395-407.
- Went, L. N., M. Vegter-van der Vlis, et al. (1984). "Parental transmission in Huntington's disease." *Lancet* 1(8386): 1100-2.
- Went, L. N., M. Vegter-van der Vlis, et al. (1983). "Huntington's Chorea in the Netherlands. The problem of genetic heterogeneity." *Ann Hum Genet* 47(Pt 3): 205-14.
- Wytenbach, A., J. Swartz, et al. (2001). "Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* 10(17): 1829-45.
- Yamamoto, A., J. J. Lucas, et al. (2000). "Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease." *Cell* 101(1): 57-66.
- Young, A. B., J. T. Greenamyre, et al. (1988). "NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease." *Science* 241(4868): 981-3.
- Zuccato, C., A. Ciammola, et al. (2001). "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease." *Science* 293(5529): 493-8.

Per il conseguimento di questa tesi e del dottorato di ricerca ci sono molte persone a cui devo un ringraziamento. Cercherò di essere coincisa nella speranza di non dimenticare nessuno, ma se così non fosse mi scuso e ringrazio in anticipo.

Il primo ringraziamento va alla Fondazione Santa Lucia e con essa al Professor Bernardi per avermi dato la possibilità di svolgere e portare a termine con successo il mio lavoro di ricerca.

Un ringraziamento di cuore a tutti i colleghi (compagni di piano e non) della Santa Lucia, al personale del CERC (Bar, ufficio del personale, manutenzione, ufficio tecnico etc etc) e tutti coloro che hanno permesso a me e agli altri dottorandi di lavorare con serenità e con sempre un sorriso sulle labbra.

Grazie ai colleghi di Tor Vergata, a tutti i collaboratori (coautori e non) per aver condiviso questi anni di formazione insieme.

E poi...

Per ultimo ma assolutamente primo in ordine di importanza, è il ringraziamento per il mio gruppo di lavoro, capitanato dalla Dr.ssa Fusco. Grazie a Carmen e Stefano quotidiani compagni "d'avventura", e a Francesca per avermi guidata nell'affrontare questo lavoro con professionalità, serietà e determinazione.

La dedico alla mia Famiglia...

Zena