

UNIVERSITÀ DI PISA



FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE,

FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA

**AZIONE DEGLI INIBITORI DELLA SINTESI
PROTEICA SU FORME DI
APPRENDIMENTO NON ASSOCIATIVO
NELL'INVERTEBRATO *HIRUDO
MEDICINALIS* IN SEGUITO A
TRATTAMENTO CON ACETIL-L-
CARNITINA (ALC)**

CANDIDATO

Emanuele Gambacciani

RELATORE

Prof. Marcello Brunelli

Anni Accademici 2005-2006

*Ai miei genitori,
senza il cui sostegno non avrei
mai raggiunto questo traguardo;
ai miei fratelli, Carlo e Filippo
ed infine a Giulia
ed ai miei amici/amiche
che insieme, hanno reso questi anni
certamente indimenticabili*

ABBREVIAZIONI

- 5HT**: serotonina (5-idrossitriptamina)
- 5-HPETE**: acido 5-idrossieicosatetraenoico
- 8-Br-cAMP**: 8-bromo-adenosin monofosfato ciclico
- AA**: acido arachidonico
- Ach**: acetilcolina
- AHP**: iperpolarizzazione postuma
- ALC**: Acetil-L-Carnitina
- cAMP**: 3'-5' adenosin monofosfato ciclico
- CAT**: Carnitina Acetil Transferasi
- CoA**: Coenzima A
- GABA**: acido gamma amino butirrico
- H. medicinalis***: *Hirudo medicinalis*
- Ik/Ca**: corrente potassio calcio-dipendente
- L_M**: latenza media della risposta basale
- LT1**: latenza di risposta misurata al 1° stimolo
- LT15**: latenza di risposta misurata al 15° stimolo
- LT16**: latenza di risposta misurata al 16° stimolo
- LTP**: long term potentiation
- MDL-12330A**: N-(Cis-2-fenil-ciclopentil)azaciclotridecan-2-imino-idrocloride
- N**: nocicettiva
- Na⁺/K⁺ ATPasi**: sodio-potassio adenosin trifosfato fosfatasi
- p***: livello di significatività
- P**: pressoria
- PKA**: protein chinasi AMPciclico dipendente
- PKC**: protein chinasi Ca⁺⁺ dipendente
- SIU**: Standard Isolation Unit
- SSH**: Ibridazione Sottrattiva Soppressiva
- SQ-22536**: [9-(tetraedro-2-furil) adenina]
- T**: tattile

RIASSUNTO

Questa tesi sperimentale si inserisce in un ampio progetto di ricerca in cui sono stati studiati gli effetti della Acetil-L-Carnitina (ALC) sul sistema nervoso della sanguisuga *Hirudo medicinalis*.

Questo Invertebrato presenta atti comportamentali i cui circuiti neurali sono stati ben identificati e che vanno incontro a forme di apprendimento non associativo quali abitudine, sensitizzazione e disabitudine.

Il modello comportamentale studiato nei nostri laboratori è l'induzione al nuoto.

In sanguisughe in cui sia stata eseguita una sezione del connettivo intergangliare tra il ganglio cefalico e il primo ganglio segmentale, al fine di eliminare l'inibizione tonica esercitata dalla massa cefalica sull'attività natatoria, l'applicazione nella regione caudale di un treno di impulsi (durata 5 msec, frequenza 8,3 Hz, durata totale del treno 1,6 sec) determina un ciclo di nuoto con un intervallo di tempo pressoché costante tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio della risposta comportamentale (latenza).

Una stimolazione ripetuta alla frequenza di 1/min induce nell'animale un progressivo aumento della latenza (abitudine) mentre l'applicazione di uno stimolo nocicettivo (*brushing*) rappresentato da 15 spazzolate sulla cute dorsale, produce un rapido accorciamento della latenza sia in animali naïve (sensitizzazione) che in animali precedentemente abituati (disabitudine).

Esperimenti condotti in precedenza nei nostri laboratori hanno evidenziato che animali trattati con una singola iniezione di ALC 2 mM presentano un blocco della sensitizzazione e una riduzione della

disabitudine e tali effetti si instaurano a partire da 2 ore dal trattamento e permangono fino a 11 giorni.

Il fatto che gli effetti di ALC perdurassero così a lungo nel tempo ci ha portato ad ipotizzare che questa sostanza potesse agire modulando la sintesi proteica.

Per verificare tale ipotesi abbiamo condotto esperimenti di sensitizzazione e disabitudine, indotte da *brushing*, in presenza di diversi inibitori della sintesi proteica (emetina 1 mM, cicloesimide 1 mM e actinomicina D 2 mM). Un gruppo di sanguisughe è stato iniettato con ALC (gruppo sperimentale) mentre ad un secondo gruppo (gruppo di controllo) è stata somministrata soluzione fisiologica. Successivamente, entrambi i gruppi sono stati trattati con l'inibitore in esame e, a distanza di 2 ore, sia il gruppo sperimentale che il gruppo di controllo sono stati sottoposti ad una tipica sessione di sensitizzazione o disabitudine indotte da *brushing*. Dopo 6 giorni, abbiamo nuovamente sottoposto i due gruppi di animali ad una sessione di sensitizzazione o disabitudine.

L'analisi dei dati ottenuti è stata condotta confrontando il gruppo sperimentale, il gruppo di controllo e un gruppo di animali trattati con sola ALC 2 mM. Da questo confronto è emerso che, a distanza di due ore, il gruppo sperimentale mostrava il blocco della sensitizzazione e una riduzione della disabitudine che non differiva significativamente da quello osservato nel gruppo di animali trattati con sola ALC 2 mM. A distanza di 6 giorni, invece, il trattamento con gli inibitori si è dimostrato efficace nel ridurre gli effetti dell'iniezione di ALC 2 mM. Questi risultati confermano l'ipotesi inizialmente formulata riguardo ad un coinvolgimento di ALC nella modulazione della sintesi proteica

e sono avvalorati da studi di biologia molecolare dai quali è emersa la capacità di ALC di influenzare l'espressione genica.

SUMMARY

This experimental work is part of a wider research project on the effects produced by Acetyl-L-Carnitine (ALC) on the nervous system of *Hirudo medicinalis*.

Despite the amount of data suggesting that ALC can control multiple neural functions on various targets, many cellular and molecular mechanisms through which Carnitine system acts in regulating neural processes are still unknown. At the aim of understanding some of these mechanisms, we have analysed the effects of ALC on the nervous system of *Hirudo medicinalis*. This Invertebrate is a very useful model to study the process underlying learning and memory and the non associative learning processes such as habituation, sensitization and dishabituation are well characterized.

In this thesis, the swimming induction has been used as experimental behavioural model. In leeches with the cephalic ganglion surgically disconnected from the segmental nerve cord, the application of a single impulse (5 msec at 8,3 Hz, 0,8-1,6 V) onto the caudal region of the body wall elicits swimming activity with an almost constant interval between the stimulus application and the onset of the swim episode (i. e. latency). Such a stimulation, repeatedly applied with 1 minute inter-trial interval, induces a progressive increase of the latency (habituation). The delivery of a nociceptive stimulation (brushing) on the dorsal skin of the leech produces a sudden potentiation of the behavioural response (that is a latency decrement) in both naïve animals (sensitization) and previously habituated animals (dishabituation).

In experiments carried out in our laboratories it was observed that animals treated with a single 2 mM ALC injection showed a sensitization block and a reduction of dishabituation; such effects began two hours after the treatment and lasted up to 11 days.

The long lasting effects of ALC made us hypothesise that this drug could modulate the protein synthesis.

Experiments were carried out to verify this hypothesis, in which sensitization and dishabituation were induced by brushing in presence of various inhibitors of the protein synthesis (1 mM emetine, 1 mM cycloheximide and 2 mM actinomycin D). A group of leeches were injected with ALC (experimental group) while a second group (control group) was injected with a physiological solution. Eventually, both groups were treated with the inhibitor. After 2 hours the experimental group and the control group went through a typical sensitization or dishabituation brushing-induced session. After 6 days, the behavioural protocol of sensitization and dishabituation was repeated for both groups.

The analysis of the collected data consisted in comparing the experimental group, the control group and another group of animals treated with only 2 mM ALC. The comparison showed that, after 2 hours, the target group experienced a sensitization block together with a reduction of dishabituation which did not differ significantly with the group treated with 2 mM ALC. After 6 days, on the other hand, the inhibitor treatment resulted efficient in reducing the effects of the 2 mM ALC injection. These results confirm the initial hypothesis of a possible intervention of ALC in modulating the protein synthesis and are further validated by molecular biology studies showing that ALC is able to positively modulate genes expression.

INDICE

1. <u>INTRODUZIONE</u>	pag. 1
1.1 Effetti della Acetil-L-Carnitina sul sistema nervoso	pag. 3
1.2 Caratteristiche morfologiche della sanguisuga <i>H. medicinalis</i>	pag. 8
1.3 Sistema nervoso di <i>H. medicinalis</i>	pag. 12
1.3.1. Organizzazione generale	pag. 12
1.3.2. Principali neuroni identificati	pag. 14
1.3.3. Neuroni serotoninergici	pag. 17
1.3.4. Fenomeno dell'iperpolarizzazione postuma (AHP)	pag. 18
1.4 Circuito del nuoto	pag. 23
1.5 Apprendimento non associativo negli Invertebrati	pag. 28
1.5.1. Apprendimento non associativo in <i>H. medicinalis</i>	pag. 33
2. <u>SCOPO DELLA TESI</u>	pag. 36
3. <u>MATERIALI E METODI</u>	pag. 38
3.1 Materiali	pag. 38
3.2 Metodi neuroetologici	pag. 38

4. <u>RISULTATI</u>	pag. 45
4.1 Azione degli inibitori della sintesi proteica sulla sensitizzazione in sanguisughe trattate con ALC	pag. 45
4.1.1. Effetti dell'Emetina 1mM	pag. 46
4.1.2 Effetti della Cicloesimide 1mM	pag. 50
4.1.2 Effetti della Actinomicina D 2 mM	pag. 54
4.2 Azione degli inibitori della sintesi proteica sulla disabitudine in sanguisughe trattate con ALC 2 mM	pag. 59
4.2.1 Effetti dell'Emetina 1 mM	pag. 60
4.2.2 Effetti della Cicloesimide 1 mM	pag. 63
4.2.3 Effetti della Actinomicina D 2 mM	pag. 66
5. <u>DISCUSSIONE</u>	pag. 71
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 79

1. INTRODUZIONE

La Acetil-L-Carnitina (ALC) rappresenta l'estere di carnitina più abbondante nel sistema nervoso (Shug *et al.*, 2002) ed il trattamento con questa molecola su modelli animali ha evidenziato una sua azione neuroprotettiva e neuromodulatrice.

ALC riduce infatti lo stress ossidativo e l'azione dei radicali liberi, e si è dimostrata inoltre in grado di ridurre la perossidazione lipidica preservando così la cellula da danni determinati da disfunzioni mitocondriali (Arduini *et al.*, 1994; Yasui *et al.*, 2002; Zbigniew and Ashraf, 2003; Hinerfeld *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). In animali anziani la somministrazione di ALC si è rivelata particolarmente efficace e, in particolare, il trattamento cronico determina il miglioramento di alcuni parametri età-dipendenti quali il decremento del numero di sinapsi e la marcata riduzione della superficie sinaptica totale delle reti dendritiche.

Quindi, oltre a migliorare la funzionalità dei circuiti neuronali, ALC si è dimostrata efficace nel proteggere il tessuto nervoso dalla neurotossicità indotta da una iperattività della secrezione glutammatergica (via recettori NMDA).

Una eccessiva liberazione di questo neurotrasmettitore determina una serie di disordini neurodegenerativi che vanno ad alterare i processi cognitivi ed ALC sembrerebbe in grado di prevenire tale tossicità andando ad aumentare l'affinità del glutammato nei confronti dei recettori metabotropici (Minana *et al.*, 1996).

In questi anni le ricerche condotte sulla capacità di questa biomolecola di migliorare il funzionamento del sistema nervoso sono state tutte di

natura clinica e quindi, a tutt'oggi, poco o nulla si conosce dell'azione di ALC sulle cellule neuronali e sui suoi possibili *targets* molecolari.

Questo lavoro sperimentale si inserisce all'interno di un ampio progetto di ricerca che si pone come obiettivo quello di comprendere i meccanismi attraverso i quali ALC potrebbe influenzare l'insorgenza di forme semplici di apprendimento.

Nei nostri laboratori viene da tempo utilizzato il modello dell'induzione al nuoto nella sanguisuga *H. medicinalis* e questo perché tale modello comportamentale si presta molto bene a ricerche di natura neuroetologica.

Infatti, la sanguisuga *H. medicinalis* mostra un'ampia gamma di atti comportamentali quali il nuoto, lo *shortening* e il *local bending* le cui reti neuronali sono ben conosciute (Nusbaum and Kristan, 1986; Friesen, 1989a,b; Shaw and Kristan, 1999; Friesen and Cang, 2001; Brodfuehrer and Thorogood, 2001) e sulle quali è stato possibile studiare i cambiamenti plastici che determinano l'insorgenza di forme elementari di apprendimento quali l'abitudine, la sensitizzazione e la disabitudine.

1.1 EFFETTI DELLA ACETIL-L-CARNITINA (ALC) SUL SISTEMA NERVOSO

La Acetil-L-Carnitina (ALC) (Fig. 1) è una molecola naturale ubiquitariamente presente nell'organismo e rappresenta l'estere di L-Carnitina a corta catena più abbondante nel cervello (Shug *et al.*, 1982) e in particolare nell'ipotalamo (Bresolin *et al.*, 1982). ALC fa parte del "sistema Carnitina", che comprende un grosso complesso enzimatico oltre alle altre Acil-Carnitine e alla Carnitina libera, il quale permette il controllo della concentrazione degli esteri del CoA e la permeabilità del gruppo acile attraverso la membrana mitocondriale interna, impermeabile al CoA e ai suoi derivati (Zammit, 1999). La Carnitina può essere sintetizzata nel cervello, nel fegato o nel rene ad opera dell'enzima ALC-transferasi a partire da lisina, metionina ed in presenza di vitamina C. Per entrare nei mitocondri l'acido grasso reagisce con l'acil CoA sintetasi il quale è presente a livello della membrana esterna del mitocondrio formando un acil CoA. Questa molecola non è però in grado di oltrepassare liberamente la membrana mitocondriale e quindi l'enzima Carnitina Palmitoil Transferasi I (CPT I) catalizza il suo legame con una molecola di Carnitina determinando così la liberazione di una molecola di CoA e la conseguente formazione di Acil-Carnitina che entra a livello della matrice mitocondriale grazie all'enzima Carnitina/Acil-Carnitina Traslocasi (CT) (Indiveri *et al.*, 1994). Una volta dentro la matrice questo composto viene legato ad una molecola di CoA mediante l'azione di una seconda Transferasi, la Carnitina Palmatoil Transferasi

II, la quale determina la liberazione di una molecola di carnitina libera e una di Acil CoA il quale subisce il processo di *beta*-ossidazione.

La Carnitina libera formatasi reagisce infine con l'Acetil CoA formatosi con la *beta*-ossidazione determinando la formazione di Acetil-L-Carnitina e la conseguente liberazione di CoA: questa reazione è catalizzata dalla Carnitina Acetil Transferasi (CAT) (Edwards *et al.*, 1974). Tutte le reazioni riguardanti il metabolismo della L-Carnitina e dell'Acetil-L-Carnitina sono mostrate in Fig. 2.

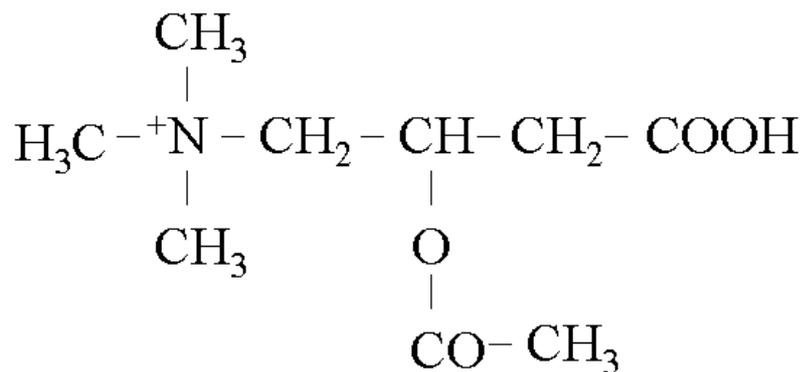


Fig. 1: Struttura molecolare della Acetil-L-Carnitina (ALC).

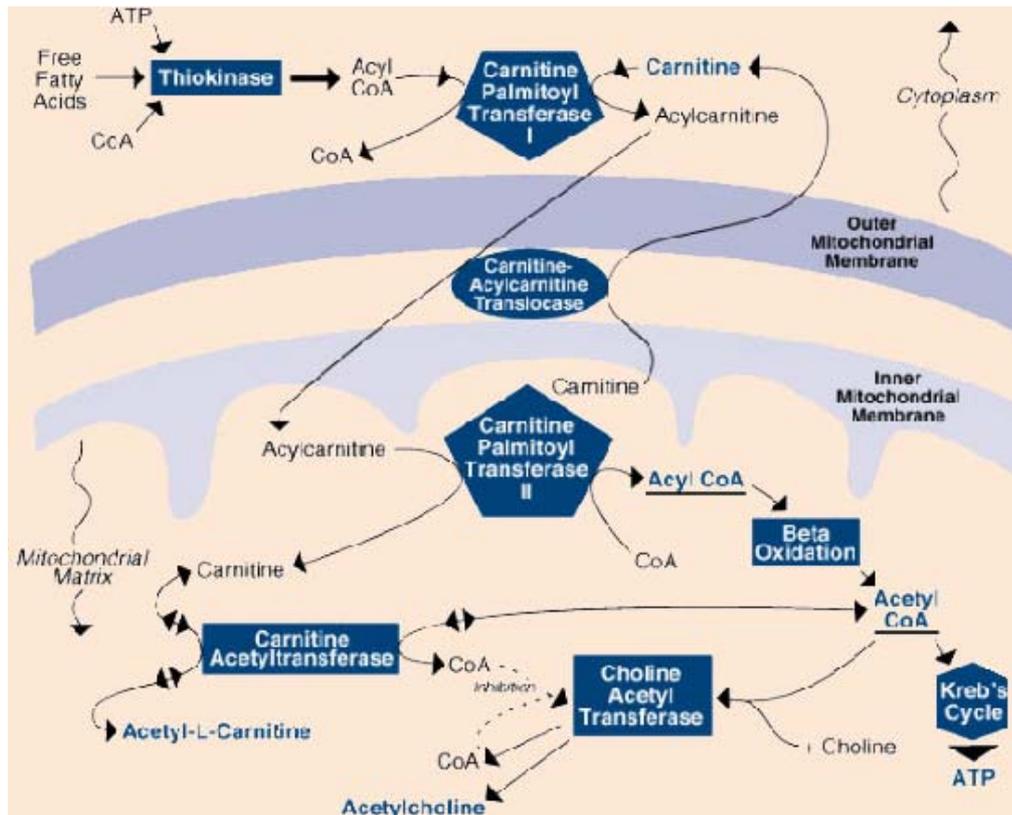


Fig. 2: Il sistema Carnitina nel mitocondrio.

Negli ultimi anni è stata identificata una superfamiglia di trasportatori di ioni inorganici alla quale appartengono i trasportatori OCTN1 e OCTN2. Questi trasportatori sono stati isolati nel topo, nel ratto e nell'uomo ed il primo presenta una bassa affinità nei confronti di Carnitina e di ALC mentre il secondo promuove il trasporto di ALC attraverso la barriera ematoencefalica (Kim *et al.*, 1990).

Studi condotti sul macaco *Rhesus* hanno evidenziato che, una volta avvenuto il trasporto all'interno del cervello (principalmente a livello della corteccia cerebrale), il gruppo acetile si distacca subito da ALC: la facilità con la quale questa molecola è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica ha permesso di ipotizzare che ALC possa intervenire positivamente su alcuni aspetti funzionali del sistema nervoso.

Sembra infatti che ALC eserciti una azione neuroprotettiva soprattutto a livello dell'ippocampo, dello striato, della *substantia nigra* e nelle zone cerebrali ricche di recettori muscarinici: questa azione viene esercitata principalmente determinando una riduzione della quantità di radicali liberi ed aumentando la disponibilità di energia mitocondriale. ALC, oltre ad inibire la produzione di radicali liberi, presenta anche un'attività antiossidante secondaria poiché determina la riparazione delle catene di acidi grassi (Arduini *et al.*, 1994): a tal proposito questa molecola si è rivelata efficace nei soggetti parkinsoniani (Mazzio *et al.*, 2003; Steffen *et al.*, 1995).

I benefici più evidenti, in seguito a trattamento cronico con ALC sono stati però evidenziati in animali anziani in cui i processi di invecchiamento determinano un decadimento delle capacità cognitive. Studi elettrofisiologici condotti su fettine di ippocampo di ratti anziani hanno dimostrato un effetto di ALC sul potenziamento a lungo termine o LTP (*Long Term Potentiation*): è stato infatti evidenziato un potenziamento registrato sul campo CA1 in seguito a stimolazione tetanica delle vie efferenti di *Schaffer* (Tancredi *et al.*, 1992).

Non è però possibile affermare con certezza se gli effetti di facilitazione indotti da ALC siano da attribuirsi ad un reale potenziamento di LTP e non più probabilmente ad un miglioramento, in seguito a trattamento con questa molecola, dell'organizzazione sinaptica delle strutture cerebrali senescenti.

ALC si è dimostrata inoltre in grado di migliorare l'apprendimento e la memoria compromessi dall'invecchiamento. A tal riguardo, il trattamento con questa molecola si è rivelato efficace in animali sottoposti a tests sperimentali quali il *Morris water maze* (Caprioli *et*

al.,1995; Taglialatela *et al.*, 1996), l'AKON-1 *maze* (Ando *et al.*, 2001), il T-*maze*, il *radial 8-arm maze* (Barnes *et al.*, 1990).

Anche utilizzando questi tests sperimentali non è stato possibile però dimostrare se ALC intervenga direttamente sui processi di apprendimento o se questa sostanza migliora solamente il metabolismo neuronale deteriorato dall'invecchiamento.

Il trattamento cronico con ALC potrebbe aumentare l'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi andando a contrastare alcuni processi correlati con l'invecchiamento.

Infatti, un decremento dell'attività della pompa di membrana in determinate zone del cervello (corteccia, ippocampo e striato) determinerebbe, in ratti anziani, una diminuzione dell'efficacia sinaptica (Tanaka and Ando, 1990; Kaur *et al.*, 1998). L'azione di ALC sulla pompa è comunque molto probabile poiché, andando questa sostanza a diminuire le disfunzioni mitocondriali correlate con l'avanzamento dell'età, l'organismo avrebbe una maggior disponibilità di ATP che a sua volta può produrre un incremento dell'attività della pompa (Hagen *et al.*, 1998; Kaur *et al.*, 2001).

Infine è ormai sicuro che ALC vada ad influenzare anche il sistema colinergico determinandone una maggior attivazione. I più importanti studi a riguardo sono stati condotti in vitro su sinaptosomi isolati da ratti trattati cronicamente con ALC (Curti *et al.*, 1989) e in esperimenti di microdialisi cerebrale (Imperato *et al.*, 1989). Nel primo caso è stato riscontrato un aumento di *uptake* di colina da parte di ALC, mentre nel secondo, un aumento della sintesi e del rilascio di Acetilcolina (Ach) nello striato e nell'ippocampo. Si pensa che l'aumento della sintesi di Ach in conseguenza al trattamento con ALC sia dovuta essenzialmente al trasferimento del gruppo acetile di ALC

alla colina mediato dall'Acetil-CoA e catalizzato dagli enzimi CAT e colina-acetil-transferasi (White and Scates, 1990). Si ipotizza inoltre che l'aumento della sintesi di Ach determini un incremento del rilascio della stessa.

Per quanto riguarda invece l'aumento dell'*uptake* di colina promosso da ALC, i meccanismi sono ancora poco chiari.

1.2 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DELLA SANGUISUGA *H. MEDICINALIS*

La sanguisuga *H. medicinalis* è un anellide hirudineo appartenente all'ordine degli Gnatobdellidi. Il suo corpo appare allungato in senso dorso-ventrale e presenta due apparati a ventosa: uno all'estremità cefalica (ventosa buccale) contenente la bocca e l'altro all'estremità caudale (ventosa caudale) utilizzato per la locomozione (Fig. 3).

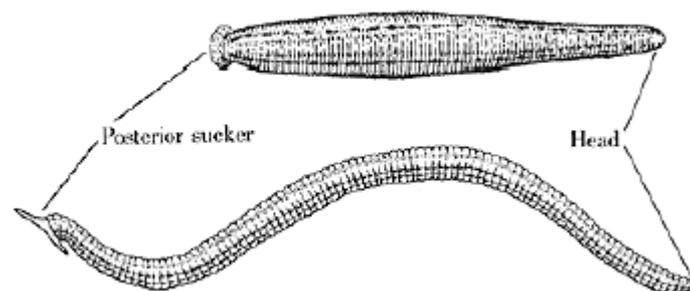


Fig. 3: Morfologia esterna della sanguisuga *H. medicinalis*.

Il peso dell'animale adulto può variare da 1 a 3 gr ma può aumentare notevolmente in seguito ad un pasto con il quale la sanguisuga è in

grado di ingerire da 5 a 10 ml di sangue. A riposo, la lunghezza della sanguisuga varia da 4 a 10 cm.

Il corpo dell'animale è composto da 34 metameri o segmenti, ognuno dei quali è formato da 1 a 5 anelli o *annuli*: l'anello centrale di ogni segmento presenta, sul lato dorsale, dei raggruppamenti di cellule fotorecettive e meccanorecettive dette *sensillae*.

La cute dell'animale è un organo complesso che assolve a molte funzioni vitali: rappresenta infatti una resistente barriera contro gli agenti esterni ma, essendo notevolmente elastica e selettivamente permeabile a gas e ioni, rappresenta anche il principale organo per la respirazione (Sawyer, 1986). Sulla superficie cutanea sono inoltre distribuite, in modo irregolare, particolari ghiandole adibite alla produzione di muco le quali vengono attivate dalle cellule di Retzius (neuroni serotoninergici presenti in coppia in ogni ganglio segmentale, vd. Par. 1.3.3). Il muco, che riveste il corpo dell'animale, oltre a costituire una protezione contro gli agenti esterni dannosi (batteri e parassiti) favorisce la respirazione, l'osmoregolazione e sembra che sia implicato anche nel riconoscimento della specie. La pigmentazione della cute differisce tra la superficie dorsale e quella ventrale: la prima è verde scuro e presenta generalmente due larghe strisce arancioni, associate con linee nere, che decorrono in senso longitudinale sulla superficie dorso-laterale; mentre la seconda è verde più chiaro ed ha due striature laterali nere.

L'apparato buccale di *H. medicinalis* è provvisto di tre mascelle semicircolari (il cui movimento è controllato dalla contrazione ritmica dei muscoli mascellari) le quali presentano delle seghettature nel punto in cui sboccano i dotti salivari.

L'apparato digerente è costituito da una serie di diverticoli laterali e si apre all'esterno con l'ano che è situato dorsalmente prima della ventosa caudale. La digestione è totalmente a carico di batteri simbiotici (*Pseudomonas hirudineae*) che elaborano gli enzimi necessari per il processo digestivo (Sawyer, 1986) (Fig. 4).

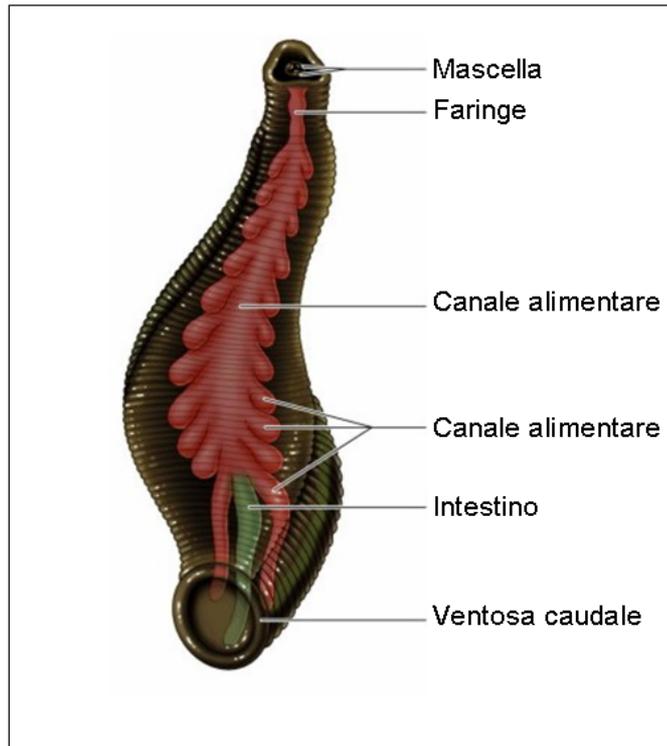


Fig. 4: Sistema digerente di *H. medicinalis*.

La funzione escrettrice è a carico dei nefridi, strutture metameriche il cui numero può arrivare fino a 17 paia per segmento.

Il sistema emovascolare è costituito da 4 seni venosi: uno dorsale, uno ventrale e due laterali che sono in comunicazione tra loro a livello della porzione cefalica e caudale. Il seno ventrale è posizionato al di sotto del canale digerente e racchiude tutta la corda nervosa: la circolazione è dovuta dalla contrazione ritmica delle pareti dei seni che permettono al sangue di attraversare i tessuti.

La sanguisuga è un animale ermafrodita e presenta gonadi distinte: gli organi sessuali maschili si trovano a livello del quinto segmento mentre quelli femminili nel sesto.

Il sistema muscolare ricopre l'intera parete corporea ed è suddiviso in 3 strati: uno strato esterno trasversale che permette l'allungamento dell'animale, uno strato intermedio obliquo utilizzato principalmente durante gli spostamenti e infine uno strato interno longitudinale responsabile dell'accorciamento (Sawyer, 1986). Tutti e 3 gli strati sono attraversati dorso-ventralmente da una serie di muscoli (muscoli dorsoventrali) la cui contrazione permette l'appiattimento del corpo dell'animale.

1.3 SISTEMA NERVOSO DI *H. MEDICINALIS*

1.3.1 ORGANIZZAZIONE GENERALE

Il sistema nervoso di *H. medicinalis* è costituito da una catena di ventuno gangli segmentali connessa anteriormente con una massa cefalica e posteriormente con una massa nervosa caudale (Fig. 5A).

La massa cefalica deriva dalla coalescenza di sei gangli segmentali e può essere suddivisa in una porzione sovraesofagea (due gangli) e una porzione sottoesofagea (quattro gangli) che insieme formano il cingolo periesofageo (Muller *et al.*, 1981; Sawyer, 1986).

La massa caudale deriva invece dalla fusione di sette gangli.

Ogni ganglio della catena nervosa è connesso a quelli adiacenti tramite un connettivo intergangliare all'interno del quale decorrono alcune fibre nervose. Tra queste riconosciamo due cordoni laterali e uno mediale (il nervo di Faivre), all'interno del quale decorrono gli assoni dei neuroni S (Bagnoli *et al.*, 1973) e delle cellule 204 e 205 che prendono parte al circuito del nuoto (vedi Par. 1.4) (Weeks and Kristan, 1978).

Ogni ganglio presenta, inoltre, quattro radici laterali, due posteriori e due anteriori, che prendono contatto con la periferia.

In ogni ganglio sono stati riconosciuti circa quattrocento neuroni ad eccezione del 5° e del 6° che innervano gli organi sessuali e che contengono circa settecento neuroni e ognuno di questi gangli innerva un preciso segmento corporeo.

L'organizzazione interna di ciascun ganglio è pressoché costante e infatti, i corpi cellulari delle cellule che li formano, sono sempre

organizzati in pacchetti, sei nella superficie ventrale e quattro in quella dorsale, ognuno dei quali è formato dai prolungamenti di una cellula gliale che avvolge i pirenofori.

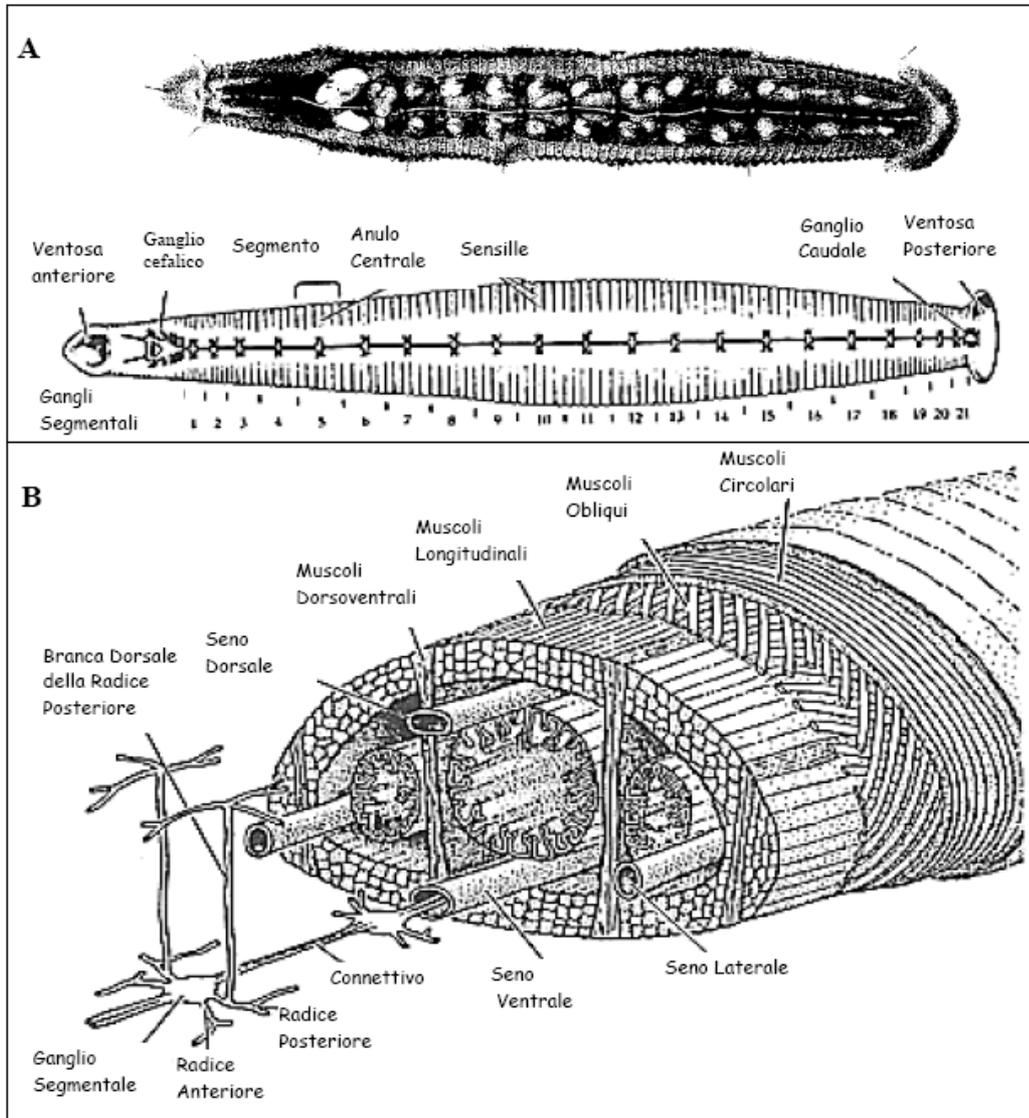


Fig. 5: (A) Segmentazione del corpo della sanguisuga *H. medicinalis*. Sopra: sanguisuga dissezionata ventralmente; Sotto: schema della segmentazione metamERICA e disposizione del sistema nervoso. (B) Schema tridimensionale della sezione trasversale della sanguisuga che mostra la disposizione della corda nervosa all'interno del seno ventrale.

1.3.2 Principali neuroni identificati

All'interno di ciascun ganglio segmentale si possono identificare un determinato numero di motoneuroni, interneuroni e neuroni sensoriali.

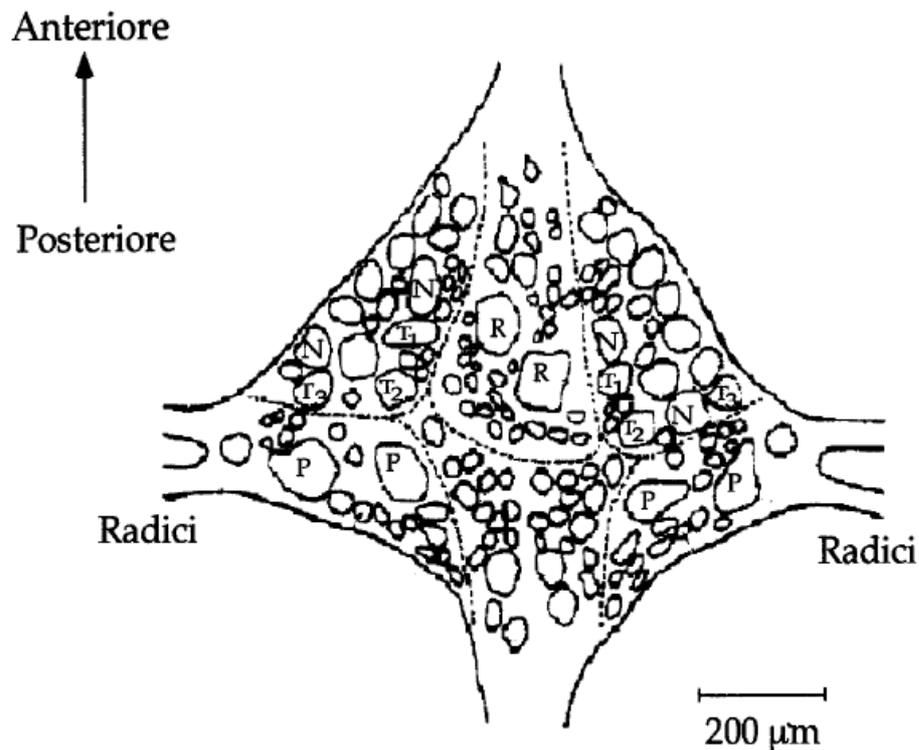


Fig. 6: Schema del lato ventrale di un ganglio segmentale. Sono evidenti i neuroni sensoriali T, P e N e le cellule serotoninergiche di *Retzius*.

I motoneuroni sono trentaquattro (Stuart, 1970), ventotto ad azione eccitatoria e sei ad azione inibitoria sulla muscolatura.

Il motoneurone L è uno dei più studiati e va ad innervare le fibre longitudinali che determinano l'accorciamento del corpo dell'animale. Ogni ganglio presenta inoltre sul suo lato ventrale un interneurone S (Bagnoli *et al.*, 1973) dal cui corpo cellulare si diparte un assone che si divide in due rami, uno diretto anteriormente e l'altro

posteriormente: esso è localizzato nel ramo mediano dei connettivi intergangliari (nervo di Faivre) e prende il nome di fibra di Rhode.

La fibra di Rhode contiene gli assoni della cellula S che costituisce un sistema di conduzione veloce di impulsi, la cui via di uscita efferente è rappresentata dal motoneurone L.

Questo sistema di conduzione su cui convergono stimoli sensoriali, tattili e fotorecettoriali è chiamato *Fast Conducting System* (FCS) (Bagnoli *et al.*, 1973) e permette la coordinazione di alcuni movimenti dell'intero corpo, in particolare l'accorciamento (*shortening*), in risposta a stimoli di natura meccanica o pressoria (Magni and Pellegrino, 1978).

All'interno di ciascun ganglio possiamo inoltre riconoscere neuroni sensoriali che rispondono a diversi stimoli esterni: i **neuroni T** vengono attivati dagli stimoli tattili, i **neuroni P** da stimoli pressori mentre i **neuroni N** da stimoli di natura nocicettiva (Baylor and Nicholls, 1969a; Van Essen, 1973).

All'interno di ogni ganglio segmentale sono presenti quattordici neuroni sensoriali: sei cellule T (3 per lato), quattro P (2 per lato) e quattro N (2 per lato).

Ogni neurone innerva aree di cute ben definite, la cui estensione corrisponde a quella innervata dal ganglio a cui la cellula appartiene, determinando così ampie aree di sovrapposizione con i campi recettoriali limitrofi.

Attraverso il connettivo intergangliare le derivazioni assoniche di ciascuna cellula si portano ai gangli adiacenti e da qui proseguono verso la periferia tramite le radici laterali (Yau, 1976).

Le cellule sensoriali sono tutti di tipo unipolare e mostrano sempre ampie arborizzazioni: indagine morfologiche hanno messo in evidenza

alcune differenze tra di esse che riguardano soprattutto la loro distribuzione e la forma dei contatti sinaptici all'interno di ciascun ganglio (Muller and McMahan, 1976).

Le cellule T contraggono tra di loro sinapsi miste, elettriche e chimiche: le connessioni di tipo elettrico sono molto particolari poiché permettono la conduzione degli impulsi depolarizzanti in entrambi le direzioni ma impediscono il passaggio di correnti iperpolarizzanti (sinapsi a doppia rettificazione) (Baylor and Nicholls, 1969b; Acklin, 1988, Bagnoli *et al.*, 1973). I neuroni T sono connessi tra loro anche da sinapsi chimiche, mediate anche da neuroni inibitori. Tutti i neuroni sensoriali prendono contatto monosinaptico prevalentemente di tipo elettrico con il motoneurone L.

I neuroni sensoriali di tipo T, P e N nei gangli segmentali e nel ganglio subesofageo, costituiscono il primo elemento del circuito del nuoto (Par. 1.4): l'attivazione di queste cellule determina una serie di successive attivazioni dei gruppi di neuroni dei sottostanti livelli che determina l'inizio dell'attività natatoria.

Registrazioni intracellulari hanno inoltre dimostrato che le tre classi di cellule scaricano in modo leggermente differente (Fig. 7).

L'attivazione delle cellule T determina una scarica di treni di potenziali d'azione di ampiezza ridotta e l'insorgenza del fenomeno dell'adattamento interviene molto rapidamente.

Le cellule P e N scaricano invece singoli potenziali d'azione più ampi ed adattano più lentamente.

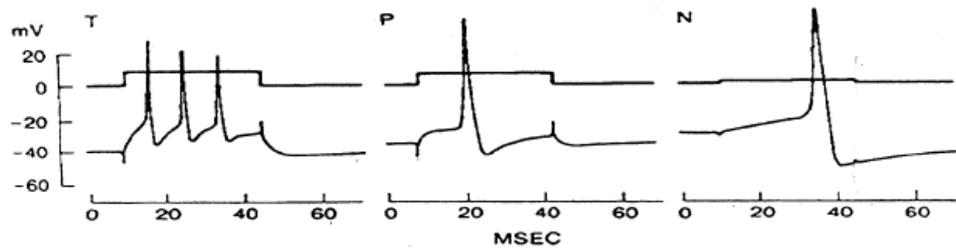


Fig. 7: Registrazioni intracellulari dei potenziali d'azione dei neuroni sensoriali T, P e N (tracce inferiori), ottenute iniettando impulsi di corrente depolarizzante (tracce superiori) tramite un microelettrodo (da Nicholls J. G. and Baylor D.A., *J. Neurophysiol.*, 31: 740-756, 1968).

Una caratteristica presente in tutte le cellule sensoriali è la *iperpolarizzazione postuma* o *AHP* (*Afterhyperpolarization*), una deflessione in senso iperpolarizzante del voltaggio di membrana associata alla scarica quando questi vengono attivati (Par. 1.3.4).

1.3.3 Neuroni serotoninergici

Tramite l'utilizzo di coloranti vitali, quali il rosso neutro, è stato possibile identificare numerose cellule in grado di accumulare e rilasciare serotonina (5HT). Queste cellule fanno parte del sistema nervoso di *H. medicinalis* e sono tutte accoppiate elettricamente tra loro: il numero delle cellule serotoninergiche per ganglio decresce in senso rostro-caudale e quindi il contenuto medio di 5HT risulta essere massimo nel 2°, 3° e 4° ganglio e minimo nel ganglio caudale (Lent *et al.*, 1991). Il contenuto di questo neurotrasmettitore endogeno all'interno di ciascun ganglio varia a seconda delle stagioni ed i livelli più alti si hanno nel periodo tra Ottobre e Marzo mentre è minimo nei mesi tra Aprile e Giugno (Catarsi *et al.*, 1990).

In ciascun ganglio si trovano sempre un numero fisso di neuroni serotoninergici e tra questi possiamo distinguere due coppie di interneuroni, una di neuroni dorso-laterali (cellule 61 o DL) e una di neuroni ventro-laterali (cellule 21 o VL), una coppia di neuroni giganti e le cellule di Retzius. Le cellule 21 e 61 fanno parte del circuito del nuoto (Par. 1.4).

Le cellule di Retzius sono sempre presenti in coppia ed ognuna invia terminazioni nelle due radici ipsilaterali di ogni ganglio: ogni cellula è connessa con quella adiacente tramite sinapsi elettriche ed entrambe presentano potenziali sinaptici e assonici spontanei (Lent and Dickinson, 1984).

La stimolazione delle cellule di Retzius determina, in pochi minuti, un aumento dei livelli di 5HT la quale va a potenziare l'attività natatoria (Willard, 1981).

Infine, queste cellule presentano sulla propria superficie cellulare un'ampia gamma di recettori che le rendono sensibili a molti neurotrasmettitori (glutammato e la stessa 5HT) (Leake and Koubanakis, 1995).

1.3.4 Il fenomeno dell'iperpolarizzazione postuma (AHP)

L'*iperpolarizzazione postuma* o AHP si può registrare nei somi delle cellule sensoriali in seguito alla scarica di potenziali d'azione generata dalla stimolazione dei loro campi recettoriali o all'iniezione intracellulare di treni di impulsi depolarizzanti (Nicholls and Baylor, 1968) (Fig.8).

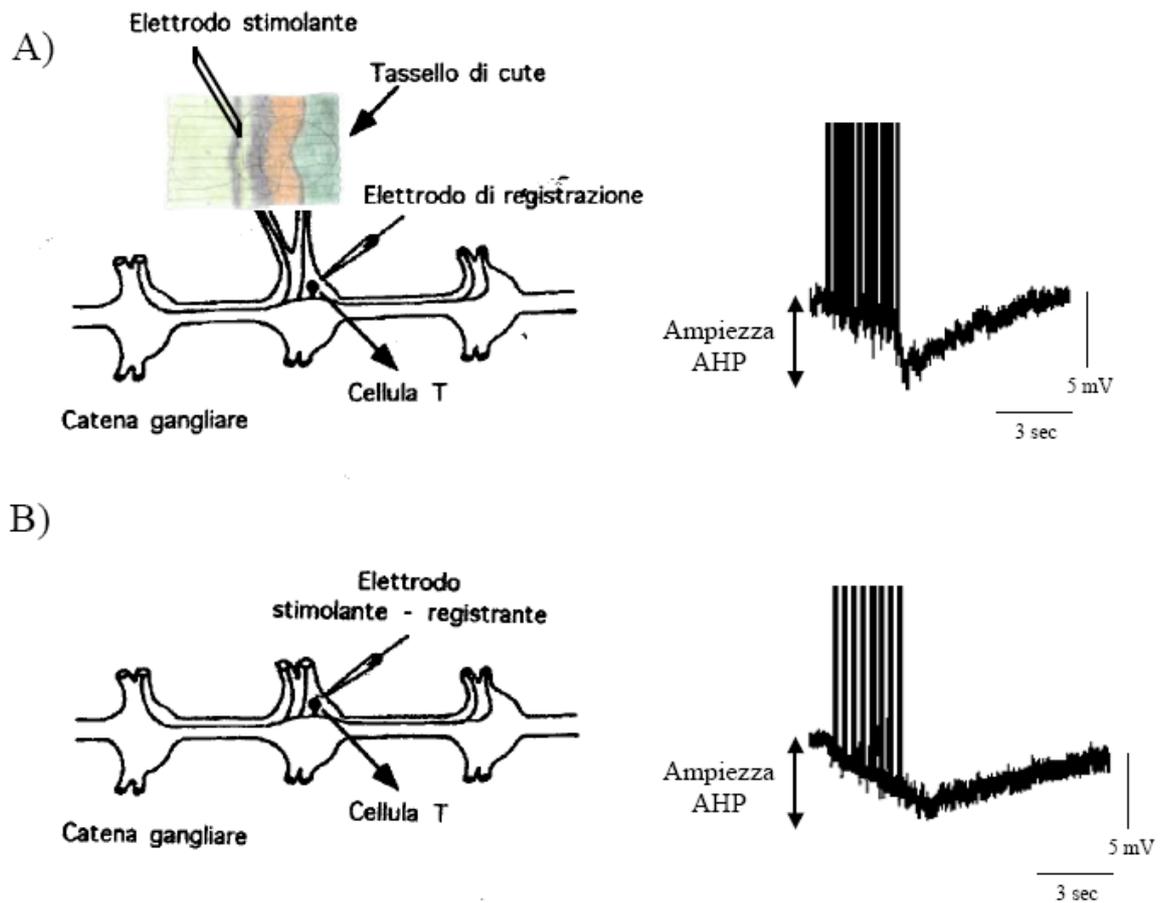


Fig. 8: Induzione dell'AHP. **A:** la stimolazione del campo recettivo di una cellula T (schema a sinistra) induce una evidente iperpolarizzazione post-scarica (AHP) che si registra intracellaramente dal soma della cellula (traccia a destra). **B:** l'iniezione intracellulare di un treno di impulsi depolarizzanti in un neurone T (schema a sinistra) induce una AHP del tutto simile a quella ottenuta in A (schema di destra) (modificato da Scuri *et al.*, 2002; *J. Neurophysiol.*, **88**: 2490-2495).

Questo fenomeno è stato evidenziato in molti neuroni di Invertebrati tra cui i recettori da stiramento dei crostacei (Nakajima and Takahashi, 1966) e le cellule nervose di *Helix* (Kerkut and Thomas, 1965). Nel ratto l'AHP è stata osservata a livello dei motoneuroni del nucleo dorsale del vago (Sah and McLachan, 1992), nei neuroni

neostriatali (Pineda *et al.*, 1992) ed infine nelle cellule piramidali dell'ippocampo (Storm, 1987, 1989; Williamson and Alger, 1990).

Nell'uomo sono stati individuati tre diversi tipi di AHPs che sono stati classificati in base al loro *time course* (Lorenzon and Foehring, 1992): le registrazioni sono state effettuate soprattutto sui neuroni ottenuti da fettine di neocorteccia i quali sono stati espianati durante interventi chirurgici per il trattamento di forme di epilessia.

Nella sanguisuga *H. medicinalis* l'AHP nei neuroni sensoriali è determinata da due meccanismi cellulari distinti (Baylor and Nicholls, 1969b; Jansen and Nicholls, 1973; Van Essen, 1973).

L'AHP è dovuta all'aumento dell'attività basale di un enzima di membrana, la Na^+/K^+ ATPasi, e all'attivazione di una conduttanza $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ -dipendente (gK/Ca). La Na^+/K^+ ATPasi estrude il sodio che accumula durante la scarica dei potenziali d'azione scambiandolo con il potassio e ristabilisce così i gradienti ionici ai due lati della membrana; agisce in modo elettrogenico poiché porta 2 K^+ dentro la cellula ed estrude 3 Na^+ generando così una corrente iperpolarizzante. Nelle cellule T l'ampiezza dell'AHP è sostenuta per un 75% dall'aumento dell'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi e per un 25% dall'aumento della conduttanza della membrana nei confronti del K^+ . Nei neuroni P i due meccanismi contribuiscono in ugual misura mentre nelle cellule N prevale l'aumento della conduttanza $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ dipendente (Jansen and Nicholls, 1973).

L'AHP riveste molti ruoli fisiologici:

- provoca un innalzamento della soglia di attivazione della cellula.
- determina una inversione dei potenziali sinaptici.

- modifica la quantità di neurotrasmettitore rilasciato dai terminali sinaptici.
- causa l'inibizione di una via precedentemente attivata.
- genera blocchi di conduzione nei punti di diramazione assonale (*branching points*), dove i processi neuritici di calibro minore convergono nei rami di calibro maggiore.

In senso generale l'AHP è in grado di disconnettere temporaneamente la cellula sensoriale dai neuroni con i quali essa interagisce (Baylor and Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973; Yau, 1976).

Infatti, la stimolazione dei campi recettoriali di una cellula sensoriale successiva ad una scarica di potenziali d'azione che ha generato una AHP, può non raggiungere il soma della cellula sensoriale a causa del "blocco" della sua propagazione a livello dei *branching points*.

Recentemente, si è dimostrato che la funzione dell'AHP è più complessa e sembra essere alla base di eventi di modulazione della plasticità sinaptica. Infatti, esperimenti di elettrofisiologia condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato che l'AHP è modulabile: il neurotrasmettitore endogeno (5HT) determina infatti una riduzione dell'ampiezza dell'AHP (Fig. 9A) e il suo effetto è reversibile, dose-dipendente e bloccato dalla metisergide (bloccante generico dei recettori serotoninergici) (Belardetti *et al.*, 1984).

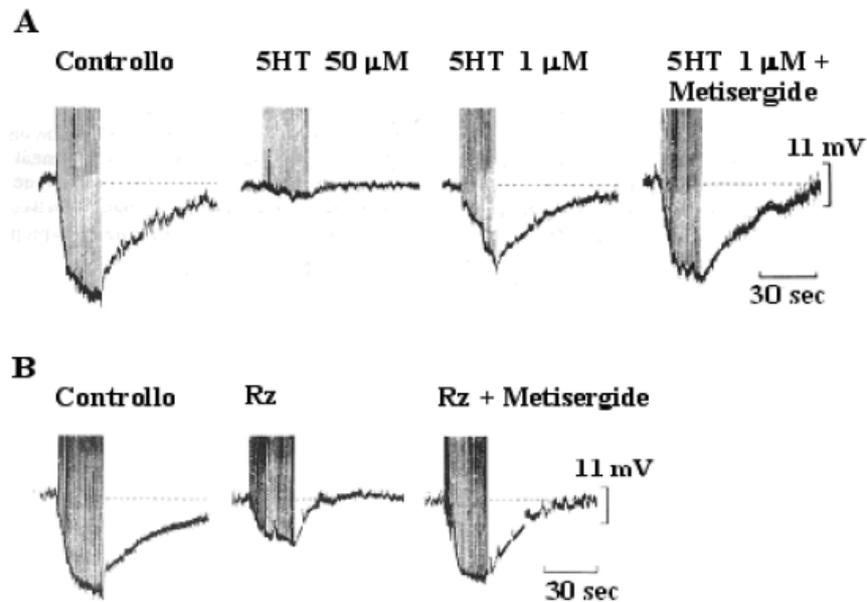


Fig. 9: (A) Effetto della serotonina sull'iperpolarizzazione postuma nei neuroni T: registrazioni in seguito a perfusione con soluzione fisiologica, con serotonina a due diverse concentrazioni e con serotonina in presenza di metisergide (bloccante dei recettori serotoninergici). (B) Effetto della stimolazione delle cellule serotoninergiche di Retzius che determina una riduzione dell'ampiezza della AHP antagonizzata dalla metisergide. (Modificata da Belardetti *et al.*, *Brain Res*, 300: 91-102).

E' stato infatti osservato che alla concentrazione di 50 μM la 5HT produce una riduzione dell'ampiezza dell'AHP di circa l'80% e nelle cellule T, tale riduzione, è determinata anche dalla stimolazione delle cellule di Retzius ipsi e controlaterali alla cellula T presa in esame (Belardetti *et al.*, 1984).

La 5HT determinerebbe una diminuzione dell'AHP per inibizione della pompa di membrana Na⁺/K⁺ ATPasi. L'azione della 5HT è mediata dal secondo messaggero cAMP (Catarsi *et al.*, 1993). Più recentemente, si è visto che la riduzione dell'ampiezza dell'AHP produce un potenziamento del potenziale sinaptico nei neuroni *followers* della cellula T (Lombardo *et al.*, 2006) (Fig. 10). Mentre la

stimolazione ripetuta della cellula T produce un aumento dell'AHP e una riduzione del potenziale sinaptico (Scuri *et al.*, 2002) (Fig. 10).

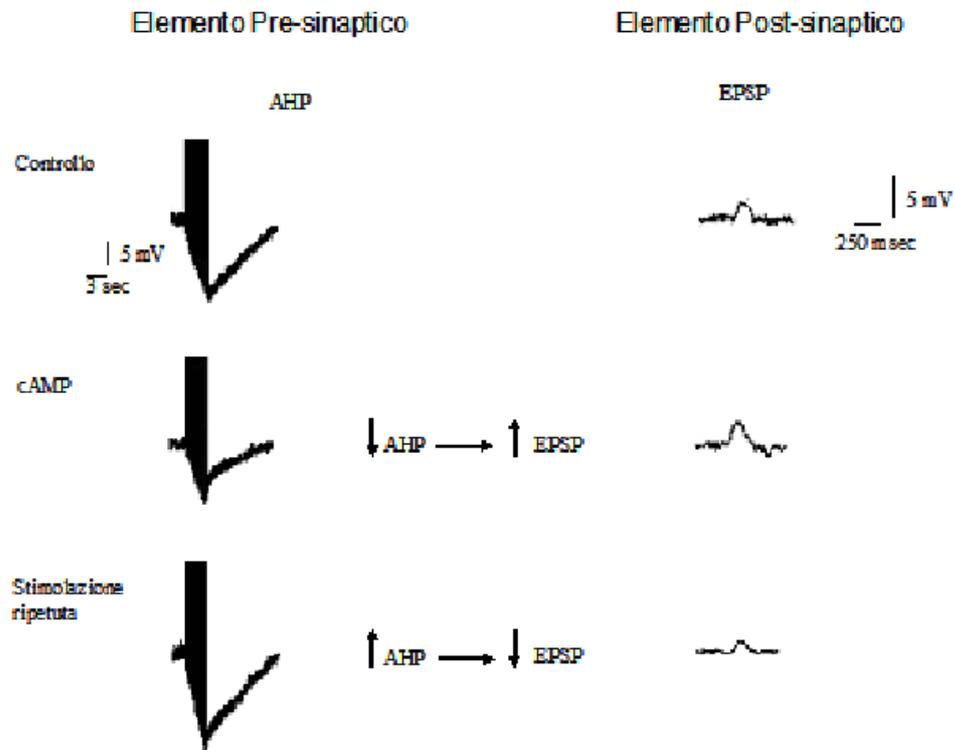


Fig. 10: Modulazione sinaptica indotta dalle variazioni di ampiezza dell'AHP nei neuroni T. Ad una diminuzione dell'ampiezza dell'AHP, dovuta ad inibizione della Na^+/K^+ ATPasi, corrisponde un aumento dell'efficacia sinaptica tra il neurone T e le cellule *followers*. Al contrario, all'aumento dell'ampiezza dell'AHP, per potenziamento dell'attività della Na^+/K^+ ATPasi, corrisponde una riduzione del potenziale sinaptico registrato in un neurone *follower*.

1.4 IL CIRCUITO DEL NUOTO

La contrazione alternata dei muscoli longitudinali dorsali e ventrali permette alla sanguisuga di nuotare compiendo movimenti ondulatori del corpo sul piano dorso-ventrale. La progressione dell'onda di contrazione in direzione rostro-caudale è dovuta al fatto che la contrazione dei muscoli di un segmento precede sempre quella dei

muscoli del segmento posteriore adiacente (Stent and Kristan, 1981; Kristan, 1983) (Fig. 11).

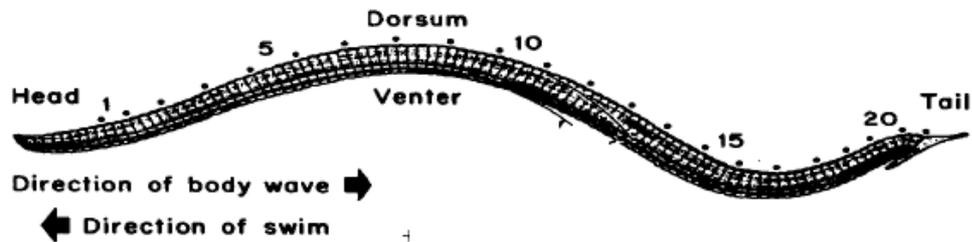


Fig. 11: Movimenti ondulatori di tipo sinusoidale che si verificano durante il nuoto.

L'attività natatoria è dovuta alla successiva attivazione di cinque categorie di cellule: (1) neuroni sensoriali, (2) neuroni *trigger*, (3) interneuroni *gating*, (4) interneuroni oscillatori, (5) motoneuroni (Fig. 12).

Generalmente, nell'animale intatto, una stimolazione di natura meccanica o elettrica sulla cute della sanguisuga determina un evento natatorio: la stimolazione delle cellule sensoriali dei gangli segmentali e del ganglio subesofageo determina la conseguente eccitazione dei neuroni *trigger*, i quali rappresentano la seconda "stazione" del circuito del nuoto (Brodfuehrer and Friesen, 1986c; Debski and Friesen, 1987; Kristan, 1983).

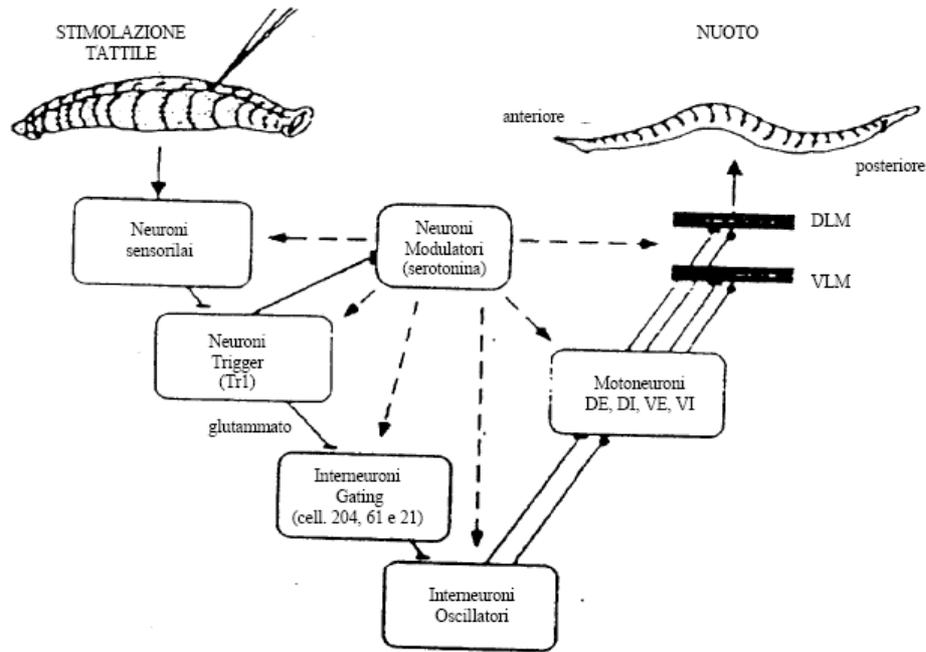


Fig. 12: Rappresentazione schematica del circuito del nuoto. Spiegazione nel testo. (Modificato da: Brodfuehrer P. D. and Friesen W. O., *J. Comp. Physiol. (A)*, 159: 511-519, 1986c).

Le cellule *trigger* sono tre coppie di neuroni localizzate nel ganglio subesofageo e la loro breve stimolazione dà origine a episodi di nuoto. La coppia di neuroni Tr1 è di natura glutammatergica e le loro diramazioni assoniche si proiettano posteriormente innervando la corda dorsale fino ed oltre il 18° ganglio segmentale. I bersagli cellulari di questi neuroni sono i neuroni *gating* e le cellule serotoninergiche di Retzius le quali vengono eccitate tramite l'attivazione di recettori per il glutammato di tipo non-NMDA (Thorogood and Brodfuehrer, 1995). La coppia di neuroni Tr2 è del tutto simile a quella Tr1 ma in questo caso i *targets* cellulari sono diversi. Infatti, queste cellule prendono parte alla cessazione dell'attività natatoria poiché vanno ad inibire sia i neuroni *gating* che altri neuroni ad attività oscillatoria. La terza coppia di neuroni *trigger*,

Tr3 o BN, viene attivata in seguito alla stimolazione delle cellule P e determina la conseguente attivazione di particolari neuroni *gating*, i “neuroni contenenti serotonina”. Quindi, i neuroni *trigger* non attivano tutti la medesima via e quindi determinano effetti diversi sull’attività natatoria.

I neuroni *gating* si dividono in due classi di cellule, gli “interneuroni iniziatori del nuoto” (SII, *Swim Initiating Interneurons*) che sono rappresentati dalle cellule 204 e 205, e gli “interneuroni contenenti serotonina” (SCN, *Serotonin Containing Interneurons*), rappresentati dalle cellule 61 (o VL) e 21 (o DL). La cellula 204 è un interneurone impari presente nei gangli dal 10° al 16°; la cellula 205 è invece presente solo nel 9° ganglio e proietta solo anteriormente. Le cellule 61 e 21 sono presenti in copia in tutti i gangli segmentali (Weeks and Kristan, 1978).

I neuroni oscillatori rappresentano la quarta stazione del circuito del nuoto e vengono attivati dai neuroni *gating*. I neuroni oscillatori sono stati individuati lungo tutta la corda dorsale e sono rappresentati da 21 cellule: sette coppie di interneuroni (cellule 27, 28, 33, 60, 115, 119 e 123) un interneurone singolo (208) e tre coppie di motoneuroni (DI-1, VI-2, DI-102). L’attivazione dei neuroni oscillatori determina la contrazione ritmica dei muscoli longitudinali dorsali e ventrali (Brodfuehrer and Friesen, 1986d) i quali determinano la caratteristica attività natatoria propria della sanguisuga. Alla base di questo circuito neuronale risiedono meccanismi di inibizione reciproca tra le varie coppie di neuroni oscillatori.

I motoneuroni controllano infine la contrazione ordinata dei muscoli longitudinali dorsali e ventrali e, a seconda delle fibre muscolari innervate, possono essere suddivisi in quattro gruppi: motoneuroni

eccitatori ed inibitori dei muscoli longitudinali ventrali (VE e VI rispettivamente), motoneuroni eccitatori ed inibitori dei muscoli longitudinali dorsali (DE e DI rispettivamente). La ritmica contrazione dei fasci muscolari che determina l'episodio di nuoto è permessa dall'alternanza delle influenze eccitatorie ed inibitorie (Fig. 13).

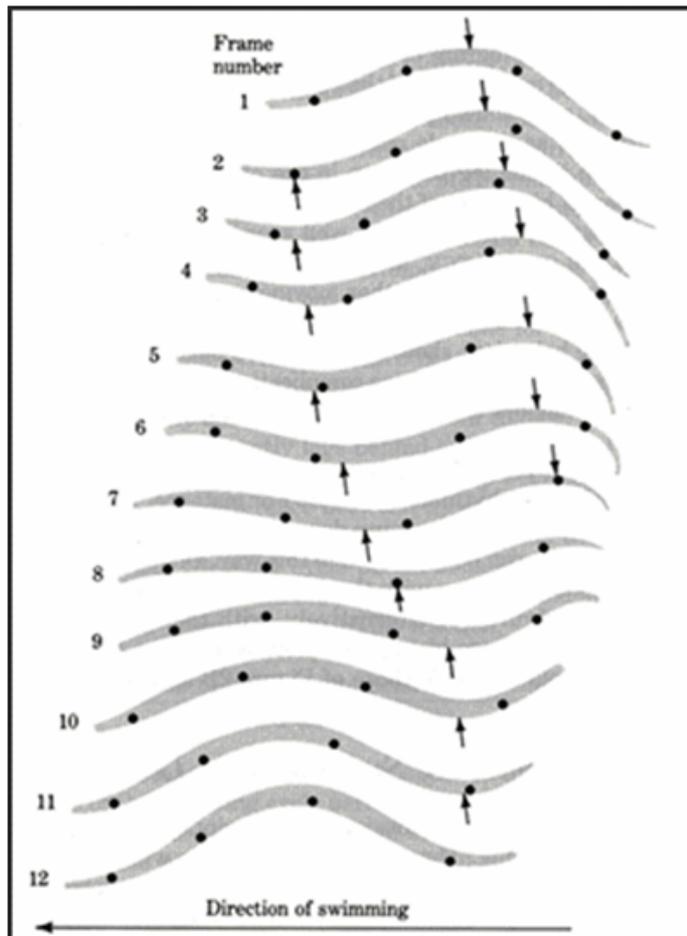


Fig. 13: Progressione dei movimenti del corpo durante l'attività natatoria di *H. medicinalis*.

1.5 L'APPRENDIMENTO NON ASSOCIATIVO NEGLI INVERTEBRATI

L'apprendimento è un processo attraverso il quale gli animali acquisiscono e immagazzinano nuove informazioni relative al mondo esterno. Tra tutte le forme di apprendimento, l'apprendimento non associativo è senza dubbio quello più semplice ed è caratterizzato da una modificazione del comportamento in seguito all'esposizione, singola o ripetuta, di uno o più stimoli privi di correlazione temporale. Le modificazioni comportamentali con il quale questo tipo di apprendimento si rivela sono l'**abitudine**, la **sensitizzazione** e la **disabitudine**.

L'abitudine è la forma più semplice di apprendimento non associativo che insorge in seguito alla ripetizione a intervalli di tempo costante di stimoli innocui: la risposta comportamentale normalmente evocata negli animali subisce così un progressivo decremento nel tempo.

Gli animali imparano infatti a riconoscere le caratteristiche dello stimolo e ad abituarsi ad esso.

Nella sensitizzazione, invece, gli animali esposti a stimoli nocicettivi potenziano i loro riflessi difensivi e rispondono a stimoli precedentemente considerati neutri (stimoli test) con maggiore efficacia; quando questo potenziamento della risposta comportamentale si instaura su una risposta precedentemente decrementata in seguito ad abitudine, si parla di disabitudine.

Lo studio di queste forme di apprendimento ha avuto enormi vantaggi utilizzando animali aventi un sistema nervoso relativamente semplice, e naturalmente ben conosciuto, sul quale è stato possibile individuare

la precisa localizzazione e i meccanismi alla base delle modificazioni cellulari che si instaurano in seguito alle sessioni di addestramento.

Le maggiori conoscenze sui meccanismi cellulari e molecolari che determinano l'insorgenza di forme di apprendimento non associativo provengono dalle ricerche compiute sull'Invertebrato *Aplysia californica* nel quale è stato studiato il riflesso di retrazione delle branchie e del sifone. La rete neuronale che sottende a questo riflesso è infatti molto semplice e quindi, con un appropriato protocollo sperimentale, è stato possibile studiare i meccanismi elementari che determinano l'instaurarsi dell'abitudine, della sensitizzazione e della disabitudine di questo riflesso. Una leggera stimolazione tattile sul mantello cutaneo determina infatti una rapida e prolungata retrazione delle branchie e del sifone (*gill withdrawal reflex*) dovuta alla attivazione di un semplice arco riflesso.

La cute del sifone è innervata da 24 meccanorecettori le cui terminazioni proiettano su un gruppo di 6 motoneuroni (che innervano la muscolatura delle branchie e del sifone) e su alcuni gruppi di interneuroni eccitatori ed inibitori che a loro volta contraggono sinapsi con i motoneuroni (Kandel, 1994) (Fig. 14A).

Stimolazioni tattili del mantello cutaneo ripetute ad intervalli regolari producono una progressiva riduzione della durata e dell'ampiezza della retrazione, fino ad arrivare addirittura alla soppressione del riflesso (abitudine); uno stimolo elettrico applicato alla testa o alla coda dell'animale fa sì che la successiva stimolazione tattile del sifone produca una retrazione delle branchie più intensa e duratura di quella che si osserva in seguito ad un'analogha stimolazione che precede lo stimolo elettrico (sensitizzazione) (Carew *et al.*, 1971; Kandel and Schwarz, 1982).

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che sia l'abitudine che la sensitizzazione sono dovute a modificazioni dell'efficacia sinaptica tra i neuroni sensoriali e i motoneuroni (Castellucci and Kandel, 1974; Kandel *et al.*, 1976).

La stimolazione tattile del sifone attiva un gruppo di neuroni sensoriali che generano potenziali sinaptici eccitatori nei motoneuroni: se lo stimolo viene presentato in maniera ripetitiva la trasmissione sinaptica tra il neurone sensoriale e il motoneurone diviene progressivamente meno efficace producendo una *depressione omosinaptica*.

Quest'ultima si realizza per un decremento nel numero di quanti di neurotrasmettitore rilasciati a livello del terminale presinaptico (Castellucci and Kandel, 1974; Kandel and Swartz, 1982). Gli eventi molecolari alla base del processo di abitudine in *Aplysia* non sono ancora stati chiariti comunque esperimenti condotti anche su altri Invertebrati quali il gambero d'acqua dolce e *Helix pomatia*, hanno confermato che alla base del fenomeno dell'abitudine vi è un minor rilascio di neurotrasmettitore dovuto sia ad una inattivazione dei canali Ca^{++} di tipo N nel terminale presinaptico che ad una riduzione della mobilizzazione di vescicole sinaptiche dalla zona di accumulo (*storage pool*) alla zona attiva (*releasing pool*). Alla base della sensitizzazione vi è invece un meccanismo di *facilitazione eterosinaptica* (Castellucci *et al.*, 1970): lo stimolo sensitizzante va infatti ad attivare un gruppo di interneuroni estrinseci al circuito di retrazione ma in contatto sinaptico con le terminazioni dei neuroni sensoriali afferenti (Fig 14A). Questo gruppo di interneuroni sono

cellule serotoninergiche e l'effetto

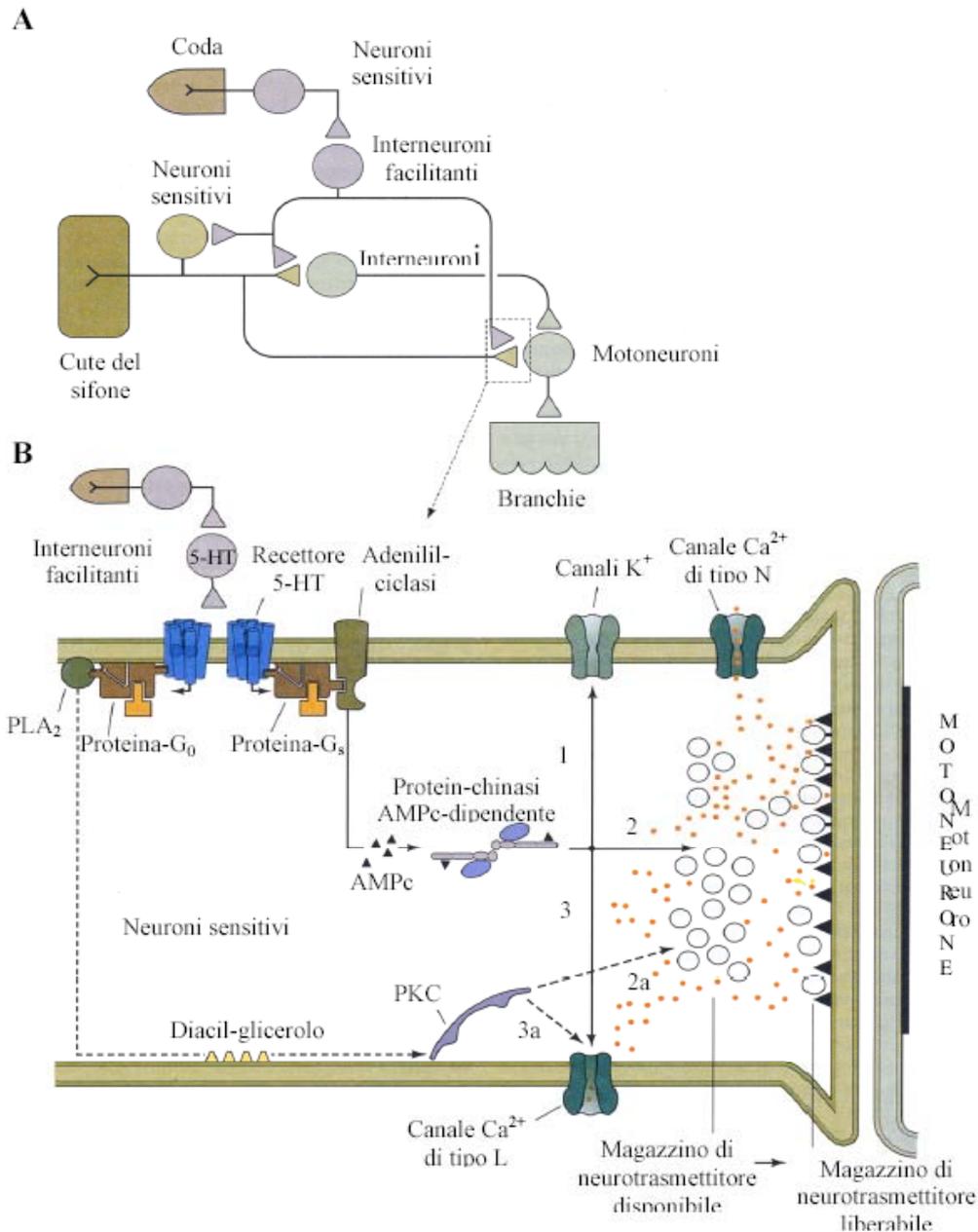


Fig. 14: (A) Circuito semplificato del riflesso di retrazione della branchia e del sifone in *Aplysia californica*; (B) Meccanismi molecolari alla base della facilitazione presinaptica nelle terminazioni dei neuroni sensoriali. Spiegazione nel testo. (Kandel, 1994).

potenziante sulla sinapsi sensori-motoria viene mimato dall'applicazione di 5HT e non si osserva invece dopo la sua deplezione dal sistema nervoso dell'animale (Brunelli *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1989). Le vie serotoninergiche attivate dalla stimolazione nocicettiva prendono contatto sinaptico con i terminali delle cellule sensoriali ove vengono attivati almeno due diversi recettori serotoninergici, uno accoppiato positivamente all'adenilato ciclasi ed uno che induce l'attivazione della fosfolipasi C.

Nel primo caso si osserva una successiva attivazione della PKA (via cAMP) (Brunelli *et al.*, 1976) che tramite la fosforilazione di alcuni substrati produce l'attivazione di un canale K^+ di tipo S (K_S): questo è un canale ionico voltaggio- e sostanza- dipendente che di solito è aperto al normale potenziale di riposo della cellula e la fosforilazione promossa dalla PKA aumenta la sua probabilità di chiusura. Ciò determina quindi un aumento della durata del potenziale d'azione e, di conseguenza, un aumento di neurotrasmettitore liberato (Schuster *et al.*, 1985). L'attivazione della fosfolipasi C determina invece la formazione di diacilglicerolo che stimola l'attività della PKC. L'attivazione di due protein chinasi differenti nel processo di sensitizzazione determina un potenziamento dell'efficacia sinaptica dovuto essenzialmente alla attivazione di due vie parallele e relativamente indipendenti tra di loro: la PKA determina l'ampliamento del potenziale d'azione mentre la PKC aumenta la disponibilità di neurotrasmettitore a livello della zona attiva (Braha *et al.*, 1990; Sugita *et al.*, 1994; Byrne and Kandel, 1996; Sutton and Carew, 2000). Il processo di disabitudine in *Aplysia* è molto simile a quello della sensitizzazione ma differisce da questo per quanto riguarda i tempi di instaurazione e la sensibilità all'intensità della

stimolazione (Marcus *et al.*, 1988). Inoltre queste due forme di apprendimento non associativo compaiono in tempi diversi durante lo sviluppo poiché la disabitudine compare prima (Rankin and Carew, 1988).

1.5.1 Apprendimento non associativo in *H. medicinalis*

La sanguisuga *H. medicinalis* è un ottimo modello per lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari che determinano le modificazioni plastiche osservabili in seguito all'instaurarsi di semplici forme di apprendimento non associativo quali abitudine, sensitizzazione e disabitudine.

I comportamenti soggetti ad apprendimento associativo sono il nuoto, il *local bending* (Lockery and Kristan, 1985; 1986; 1991), il riflesso di *shortening* in risposta a stimoli fotici (Bagnoli *et al.*, 1975; Lockery *et al.*, 1985) o tattili (Bagnoli *et al.*, 1975; Boulis and Sahley, 1988). Il riflesso di *shortening* è soggetto ad abitudine e sensitizzazione. Il circuito nervoso che ne è alla base è oggi ben conosciuto: la stimolazione delle cellule sensoriali presenti sulla superficie del corpo determina l'attivazione di una coppia di interneuroni i quali sono in contatto sinaptico con le cellule S. Queste, a loro volta, attivano le cellule L (una coppia di motoneuroni) la cui eccitazione attiva la muscolatura longitudinale in ogni segmento, determinando così l'accorciamento (*shortening*) dell'animale. Questa rete neuronale viene chiamata *Fast Conducting System* (FCS) (Par. 1.3.2) e la sua integrità è indispensabile per indurre le forme di apprendimento non associativo: la stimolazione tattile ripetuta provoca, infatti, una progressiva riduzione della risposta comportamentale (abitudine), al

contrario, il riflesso di *shortening* in risposta ad uno stimolo test neutro, risulta potenziato per alcuni minuti dopo la somministrazione di uno stimolo nocicettivo (sensitizzazione o disabitudine).

Anche nella sanguisuga il potenziamento della risposta comportamentale successivo all'evento nocicettivo è determinato da un aumento del livello intracellulare di cAMP, nei neuroni sensoriali, determinato dal legame della 5HT (rilasciata da neuroni estrinseci al circuito dello *shortening*) ai propri recettori presenti sulle membrane dei neuroni sensoriali. In seguito alla preincubazione con metisergide (un bloccante dei recettori serotoninergici) (Belardetti *et al.*, 1982) o alla deplezione di 5HT (Ehrlich *et al.*, 1992), il potenziamento della risposta risulta essere, rispettivamente, bloccato o ridotto.

Anche nel riflesso di *local bending* è stato dimostrato un coinvolgimento della 5HT: la stimolazione meccanica della cute determina infatti un'attivazione dei neuroni sensoriali P i quali provocano una flessione locale del corpo dell'animale (Kristan, 1982; Lockery and Kristan, 1990; Lockery and Sejnowski, 1992). Se le stimolazioni vengono ripetute, il riflesso va incontro ad abitudine ma, l'applicazione di 5HT o la stimolazione dei neuroni serotoninergici, determina l'insorgenza della disabitudine (Lockery and Kristan, 1991). Nei nostri laboratori viene da anni studiato il modello comportamentale dell'induzione al nuoto che si è rivelato efficace per individuare le basi neuronali dell'apprendimento. Agli animali viene praticata, tramite una sezione microchirurgica, la disconnessione della massa cefalica dal primo ganglio segmentale. Ogni qual volta viene applicato loro uno stimolo tattile o lievi stimoli elettrici nella porzione caudale gli animali iniziano a nuotare con una latenza costante e questo perché la massa cefalica non è più in grado di inibire l'attività

natatoria. Stimolazioni ripetute (alla frequenza 1/min), inducono un progressivo incremento della latenza al nuoto (abitudine).

Uno stimolo nocicettivo (*brushing*), rappresentato da 15 spazzolate applicate sulla cute dorsale dell'animale, provoca una repentina riduzione della latenza sia in animali precedentemente abituati (disabitudine), che in animali *naïve* (sensitizzazione) (Brunelli *et al.*, 1993; Zaccardi *et al.*, 2001).

L'instaurarsi del processo di abitudine dipende dall'intensità dello stimolo applicato e dall'intervallo tra uno stimolo e l'altro (*Inter Stimulus Interval*, ISI). Stimoli deboli con ISI minori sono risultati più efficaci nell'indurre abitudine rispetto alla stessa stimolazione applicata ad ISI maggiori: se però si aumenta l'intensità dello stimolo l'abitudine compare più velocemente in presenza di ISI più lunghi (Groves *et al.*, 1969; Groves and Thompson, 1970; Boulis and Sahley, 1988; Sahley, 1995). Il modello comportamentale dell'induzione al nuoto in *H. medicinalis*, ha permesso di chiarire i meccanismi molecolari che sono alla base dell'abitudine.

È stato infatti dimostrato un coinvolgimento dell'acido arachidonico e dei suoi metaboliti della via 5-lipossigenasica (Scuri *et al.*, 1998; Scuri *et al.*, 2005). La stimolazione elettrica ripetuta a bassa cadenza delle cellule T determina l'apertura di canali Ca^{++} voltaggio-dipendenti nifedipina-sensibili che permettono l'entrata del calcio all'interno della cellula. Il calcio extracellulare agisce andando a liberare il calcio dai depositi intracellulari: l'aumento della concentrazione di questo ione all'interno del citoplasma determina l'attivazione della fosfolipasi A_2 la quale, mantenuta attiva dal calcio citosolico, scinde l'acido arachidonico (AA) dai fosfolipidi di membrana. L'AA seguendo la via 5-lipossigenasica subisce la metabolizzazione in

prodotti del tipo 5-HPETE, i quali agiscono direttamente o indirettamente, sulla pompa Na^+/K^+ ATPasi potenziando la sua attività e inducendo l'aumento dell'ampiezza dell'AHP.

La somministrazione di 5HT si è inoltre rivelata efficace nel mimare la sensitizzazione e la disabitudine dell'induzione al nuoto (Zaccardi *et al.*, 2004) mentre l'applicazione di metisergide (bloccante generico dei recettori serotoninergici) elimina e riduce, rispettivamente, il potenziamento della risposta comportamentale osservato nella sensitizzazione e nella disabitudine.

Inoltre è stato dimostrato che la somministrazione di bloccanti dell'adenilato ciclastasi quali MDL-12330A o SQ-22536 impedisce la riduzione della latenza al nuoto in seguito a stimolazione nocicettiva o all'applicazione di 5HT (Zaccardi *et al.*, 2004). Altri esperimenti condotti nei nostri laboratori hanno rivelato che il GABA, la dopamina e la glicina non inducono disabitudine mentre l'8-Br-cAMP (un analogo permeabile del cAMP) è in grado di mimare l'effetto sensitizzante e disabituante indotto da *brushing* (Zaccardi *et al.*, 2004).

2. SCOPO DELLA TESI

Molte evidenze sperimentali indicano che ALC ha una importante azione neurotrofica e neuromodulatoria. Nei nostri laboratori da anni vengono studiati gli effetti di questa biomolecola su forme elementari di apprendimento. Il modello comportamentale da noi utilizzato è l'induzione al nuoto nella sanguisuga *H. medicinalis*. In questo Invertebrato sono infatti ben note gran parte delle reti neuronali che sottendono a determinati atti comportamentali e, grazie alla loro

semplicità, la sanguisuga si è dimostrata un ottimo modello sul quale è possibile compiere studi di natura neurofisiologica e neuroetologica. Sono stati perciò studiati i meccanismi molecolari che sono alla base delle forme di apprendimento non associativo quali l'abitudine, la sensitizzazione e la disabitudine. Il trattamento con ALC determina notevoli modificazioni a livello cellulare e molecolare. In particolare, è stato osservato che, ALC 2 mM determina il blocco della sensitizzazione e una riduzione della disabitudine, indotte da *brushing*, a partire da 2 ore dal trattamento e che tali effetti perdurano fino a 6 e 11 giorni. Il fatto che una singola iniezione di ALC determini effetti a lungo termine ha fatto pensare che questa biomolecola vada in qualche modo a stimolare la produzione di nuove proteine. Questo lavoro sperimentale va ad integrare altri studi di natura molecolare con i quali è stato dimostrato che il trattamento con ALC modula l'espressione di alcuni geni.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi quello di correlare i risultati ottenuti con tecniche di biologia molecolare con risultati ottenuti con studi comportamentali.

Per far ciò abbiamo contemporaneamente trattato gli animali con ALC 2 mM e con inibitori della sintesi proteica al fine di verificare se, gli effetti a lungo termine determinati dal trattamento con ALC coinvolgessero la sintesi proteica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Per lo svolgimento degli esperimenti oggetto di questo lavoro sperimentale sono state utilizzate sanguisughe della specie *Hirudo medicinalis* fornite dalla ditta Ricarimpex (Eysines, Francia).

Gli animali vengono mantenuti in ambiente termostato alla temperatura di 16° C, all'interno di recipienti ben areati contenenti acqua oligominerale "Panna".

La Acetil L-Carnitina (ALC) è stata fornita dalla ditta Sigma-Tau (Pomezia Roma, Italia) mentre gli inibitori della sintesi proteica utilizzati (Emetina, Cicloesimide ed Actinomicina D) sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

La soluzione salina era così composta: NaCl 115 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glucosio 10 mM, tamponata a pH 7,4 con Tris-maleato 10 mM ed è stata utilizzata sia per l'operazione microchirurgica che per disciogliere la Acetil-L-Carnitina e gli inibitori della sintesi proteica.

3.2 Metodi neuroetologici

Tutte le sostanze utilizzate durante il lavoro sperimentale sono state somministrate nel corpo dell'animale tramite siringhe da insulina. Le iniezioni, una nella porzione caudale e una nella porzione rostrale, contenevano una quantità di soluzione pari a 100 µl/gr di peso dell'animale.

Prima di sottoporre gli animali alle sessioni di addestramento, viene effettuata una sezione microchirurgica tra il ganglio cerebrale e il

primo ganglio segmentale. Ciò permette di eliminare l'inibizione tonica che la massa cefalica esercita sull'attività natatoria (Fig. 15).

In queste condizioni, quindi, lo sperimentatore può lavorare con animali che rispondono con una latenza (tempo che intercorre tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio della attività natatoria) pressoché costante.

Prima di effettuare l'operazione, gli animali vengono anestetizzati in etanolo al 10% per 15 minuti e successivamente, vengono fissati con il ventre rivolto verso l'alto sul fondo di una vaschetta di plexiglas contenente paraffina.

L'operazione è compiuta tramite l'utilizzo di bisturi per la chirurgia oftalmica e comporta il taglio del connettivo intergangliare tra la massa cefalica e il primo ganglio segmentale (Fig. 15): per aver risultati migliori vengono inoltre disconnesse anche le radici laterali della massa cefalica.

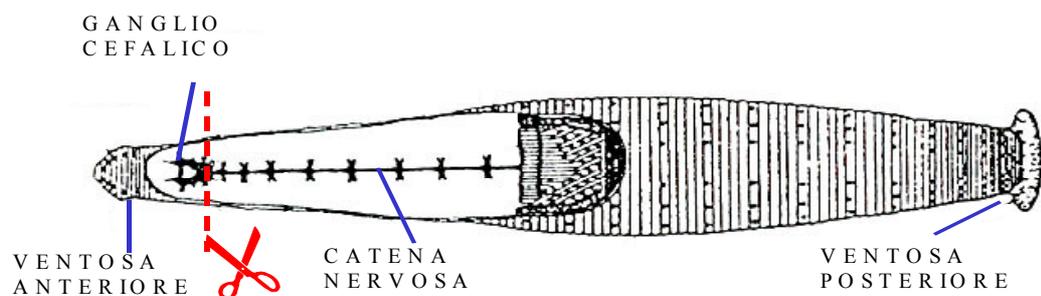


Fig. 15: Disegno schematico di *H. medicinalis* illustrante il livello della sezione chirurgica effettuata sugli animali.

Il taglio viene successivamente saturato con filo da sutura SETA (Ethicon 6/0) ed un filo di cotone viene introdotto a livello della

ventosa caudale per fissare successivamente la sanguisuga all'apparato di registrazione.

Dopo due giorni dall'operazione gli animali vengono sottoposti ad una tipica sessione di addestramento.

Ogni sanguisuga viene quindi posta all'interno di un'apposita vaschetta (Fig. 16) riempita con acqua oligominerale "Panna" e successivamente viene fissata ad un supporto di paraffina grazie al filo di cotone precedentemente inserito nella ventosa caudale.

Un elettrodo bipolare di argento clorurato viene poi posto al di sotto della ventosa caudale: in questo modo, l'animale è libero di nuotare senza però allontanarsi dall'elettrodo di stimolazione.

L'elettrodo è collegato ad una SIU (*Standard Isolation Unit*) sulla quale è possibile impostare il voltaggio di stimolazione (0,9-1,3V) e sulla quale sono presenti due pulsanti che comandano l'inizio (ON) e il termine (OFF) della stimolazione. La SIU è a sua volta collegata ad uno stimolatore sul quale è possibile impostare i parametri di stimolazione

Ogni stimolo è costituito da treni di impulsi quadri della durata di 5 msec, con una frequenza di 8,3 Hz per una durata complessiva del treno di 1,6 sec.

Lo stimolatore è a sua volta collegato con un interruttore tramite il quale lo sperimentatore può contemporaneamente fornire lo stimolo all'animale ed inviare ad un computer il segnale di inizio e di arresto della stimolazione per acquisirne le latenze in secondi. Un'apposita interfaccia e un *software* permettono l'acquisizione in tempo reale delle latenze: il programma per l'acquisizione in tempo reale delle risposte natatorie è stato appositamente creato dalla ditta Numerica Progetti S.r.l. (Pisa).

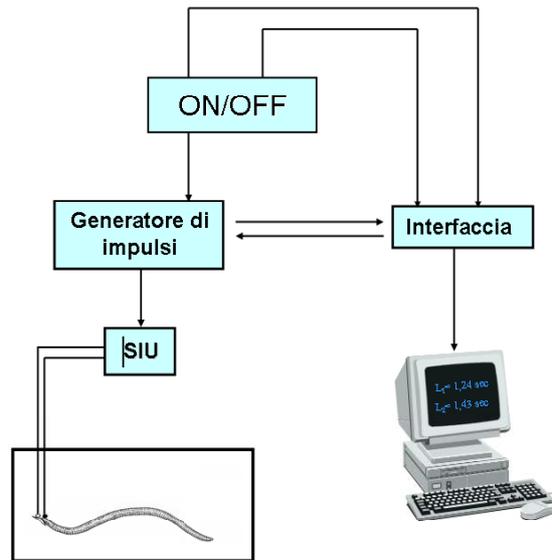


Fig. 16: Illustrazione schematica dell'apparato di registrazione. Spiegazione nel testo.

Ogni stimolazione produce un ciclo di nuoto e nel nostro protocollo sperimentale viene misurata la latenza tra lo stimolo applicato e l'inizio del nuoto.

Il parametro della "latenza" è fondamentale perché permette di valutare e descrivere l'insorgenza di processi di apprendimento quali l'abitudine, la disabitudine e la sensitizzazione.

Infatti, un aumento della latenza è osservabile nel processo di abitudine mentre una sua riduzione è sintomo di avvenuta sensitizzazione o disabitudine.

Per tutti gli animali sottoposti ad una tipica sessione di apprendimento non associativo è indispensabile trovare il voltaggio soglia, ovvero il voltaggio minimo in corrispondenza del quale la sanguisuga risponde con un ciclo di nuoto avente una latenza pressochè costante. Di solito il voltaggio oscilla tra 0,9 e 1,3 V mentre la latenza tra 1,2 e 1,8 sec.

L'**abitudine** viene indotta grazie all'applicazione di 15 stimolazioni alla frequenza costante di 1/min durante il quale si può osservare un progressivo aumento della latenza al nuoto che testimonia un progressivo decremento della risposta comportamentale (Fig. 17).

In un tipico esperimento di **sensitizzazione**, dopo aver individuato il voltaggio soglia, vengono fornite quattro stimolazioni "test" ad intervalli casuali (compresi tra 30 sec e 5 min) in modo da non indurre abitudine comportamentale. La media ponderata delle latenze al nuoto relative a ciascun stimolo "test" rappresenta la "latenza media".

Dopo aver trovato la "soglia" dell'animale viene applicato uno stimolo nocicettivo rappresentato da 15 spazzolate (*brushing*) (durata totale 15 secondi) sulla cute dorsale dell'animale seguito da una tipica sessione di abitudine a voltaggio costante (Fig. 18).

Negli esperimenti di **disabitudine**, dopo aver individuato il voltaggio soglia, gli animali vengono prima sottoposti ad una sequenza di 15 stimolazioni che fanno insorgere l'abitudine. Successivamente viene applicato il *brushing* cui segue una sequenza di 15 stimolazioni con frequenza di 1/min (Fig. 19).

Il potenziamento della risposta comportamentale che segue l'evento nocicettivo, osservabile nelle sessioni di sensitizzazione e disabitudine, è caratterizzato (come già descritto), da una riduzione della latenza nell'induzione al nuoto.

Perciò, nei grafici da noi utilizzati per descrivere i processi di apprendimento non associativo, viene riportata sull'asse delle ordinate l'entità della risposta comportamentale come inverso della latenza misurata ($1/L$), mentre sull'asse delle ascisse viene indicata la successione temporale delle stimolazioni.

L'inverso della latenza media misurata sugli stimoli test ($1/L_M$) viene considerato come il nostro 100% e tutti i successivi valori della serie vengono normalizzati a questo dato ($L_1/L_X \cdot 100$, dove L_X è la latenza relativa ad ogni stimolazione fornita).

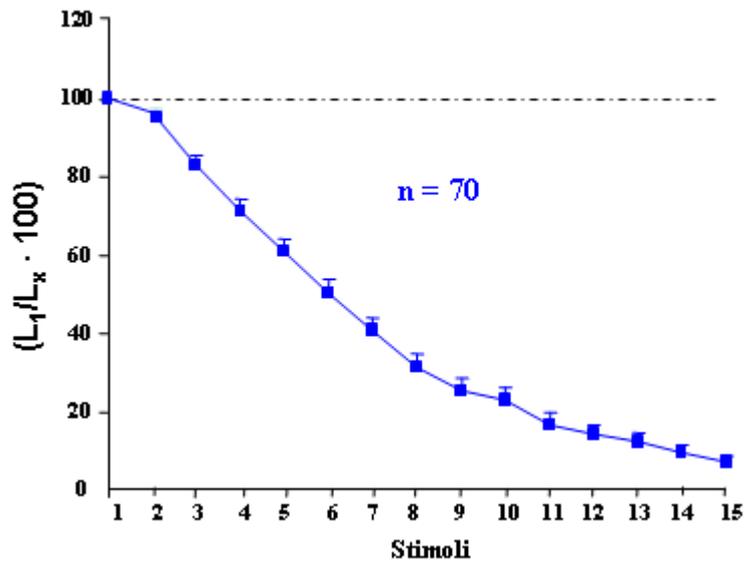


Fig. 17: Rappresentazione grafica dell'abitudine.

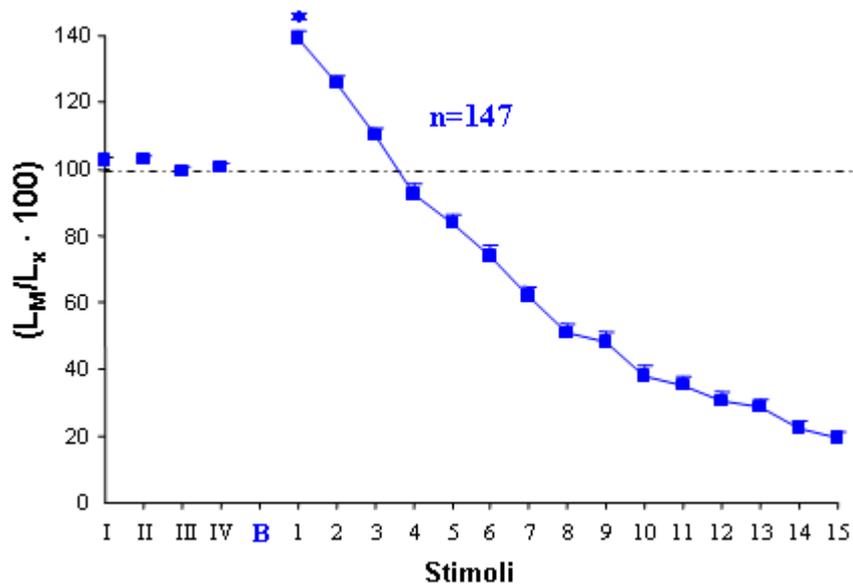


Fig. 18: Rappresentazione grafica della sensitizzazione

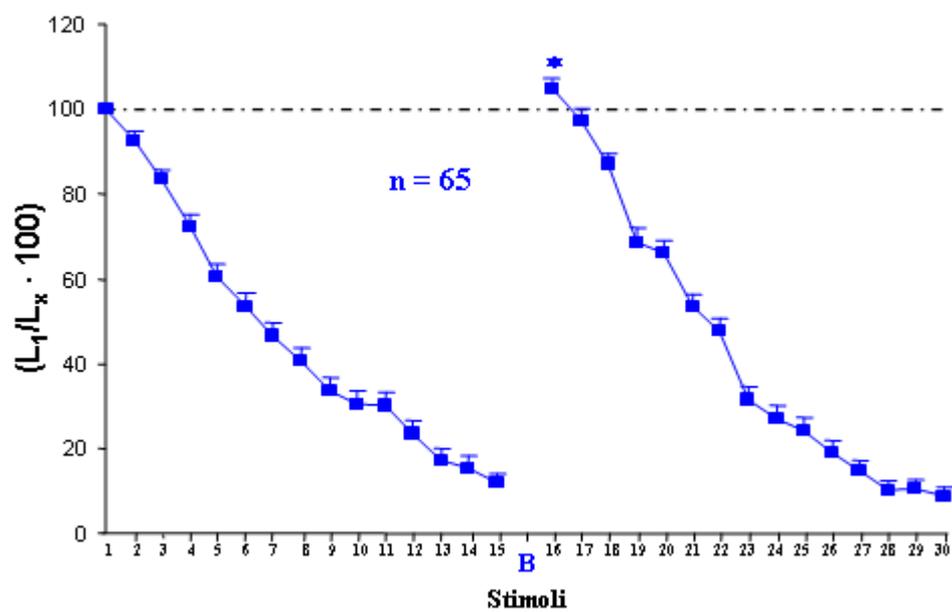


Fig. 19: Rappresentazione grafica della disabitudine.

4. RISULTATI

4.1 AZIONE DEGLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA SULLA SENSITIZZAZIONE IN ANIMALI TRATTATI CON ALC 2 mM

Esperimenti condotti nei nostri laboratori hanno evidenziato che dopo 2 ore dal trattamento con ALC 2 mM si osserva un blocco della sensitizzazione e che questo effetto permane fino ad 11 giorni.

Negli esperimenti eseguiti in questa tesi si è cercato di verificare se l'azione di depressione della sensitizzazione promossa da ALC 2 mM veniva inibita in presenza di inibitori della sintesi proteica (Emetina e Cicloesimide) ed inibitori di mRNA (Actinomicina D).

Gli animali da noi utilizzati sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo sperimentale che è stato trattato con 2 iniezioni di ALC 2 mM (una nella porzione caudale e una nella porzione rostrale), contenenti ciascuna una quantità di sostanza pari a 100 µl/gr di animale, e un gruppo di controllo in cui le due iniezioni contenevano soluzione fisiologica.

Dopo 30 minuti tutti gli animali sono stati trattati con 2 iniezioni contenenti inibitori della sintesi proteica.

A distanza di 90 minuti e 6 giorni da quest'ultimo trattamento tutti gli animali sono stati sottoposti ad una tipica sessione di sensitizzazione indotta da *brushing*.

Il protocollo sperimentale in questi esperimenti è stato uguale a quello utilizzato nei lavori sperimentali precedenti. Ciò ha permesso il

confronto dei risultati da noi ottenuti con quelli relativi agli animali trattati con la sola ALC 2 mM.

I risultati ottenuti sono stati graficati come descritto in MATERIALI E METODI (Par. 3.2). Inoltre, sono stati riportati nel testo degli istogrammi opportunamente costruiti per mettere in evidenza l'entità della risposta comportamentale successiva al *brushing*. A tale scopo, sull'asse delle ascisse delle Figg. 26 e 27 sono stati riportati i tre gruppi di animali presi in considerazione (gruppo sperimentale, gruppo di controllo e gruppo trattato con ALC 2 mM) per ciascun inibitore della sintesi proteica utilizzato mentre sull'asse delle ordinate è stata riportata una scala di valori espressi in percentuale. Ciascuna colonna indica il valore di T1 relativo al primo stimolo successivo al *brushing* e normalizzato al valore di L_M che rappresenta il 100% (linea tratteggiata). Per indicare la significatività risultante ($p < 0,01$) dal confronto tra il primo stimolo successivo al *brushing* del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM è stato effettuato il test statistico *Mann Whitney U test* (rombo blu).

4.1.1 Effetti dell'Emetina (1 mM) sulla sensitizzazione

Ad un gruppo di 26 animali è stata somministrata ALC 2 mM (gruppo sperimentale) mentre ad un gruppo di controllo (n=29) è stata iniettata soluzione fisiologica.

Dopo 30 minuti entrambi i gruppi sono stati iniettati con Emetina 1 mM e, a distanza di 2 ore dal trattamento con ALC (o soluzione fisiologica), gli animali sono stati sottoposti ad una tipica sessione di sensitizzazione indotta da *brushing*.

La curva verde riportata in Fig. 20 è ottenuta dagli animali appartenenti al gruppo di controllo e mostra un notevole potenziamento della risposta comportamentale successivo al *brushing*, ovvero una riduzione significativa della latenza al nuoto. Questo dato è stato confermato anche dal confronto statistico effettuato tra la latenza media e la latenza relativa al primo stimolo dopo l'evento nocicettivo (T1) (*Wilcoxon test*).

Il gruppo di animali appartenente invece al gruppo sperimentale (curva viola) non presenta potenziamento della risposta comportamentale dopo il *brushing* ed il confronto statistico effettuato con il *Mann Whitney U test* (Fig. 26) ha permesso di verificare che il valore T1, il quale descrive un notevole depotenziamento della risposta comportamentale successivo all'evento nocicettivo (*Wilcoxon test*), non è significativamente diverso da quello relativo agli animali iniettati con ALC 2 mM (curva rossa).

Dopo 90 minuti dall'iniezione di Emetina, il blocco della sensitizzazione promosso da ALC 2 mM è sempre presente e quindi il trattamento con questo inibitore non è ancora risultato essere efficace. Dopo 6 giorni tutti gli animali sono stati nuovamente sottoposti ad una classica sessione sensitizzante e i dati ottenuti sono stati riportati nel grafico della Fig. 21.

Il grafico mostra che vi sono alcune differenze tra la curva relativa al gruppo sperimentale e quella ottenuta dagli animali trattati con sola ALC 2 mM.

Infatti, gli animali trattati con ALC 2 mM presentano sempre un permanente blocco della sensitizzazione successivo all'evento nocicettivo mentre in quelli trattati con ALC 2 mM ed Emetina 1 mM si può osservare un notevole recupero della risposta comportamentale

successiva al *brushing*: il confronto statistico tra il T1 relativo al gruppo sperimentale (ALC 2 mM + Emetina) è significativamente diverso rispetto a quello relativo agli animali iniettati con solo ALC 2 mM (*Mann Whitney U test*) (Fig. 27).

Il gruppo di controllo, iniettato con soluzione fisiologica, presenta il caratteristico potenziamento della risposta (*Wilcoxon test*) mentre per il gruppo sperimentale non è stata rivelata alcuna differenza statistica tra il T1 ed L_M : ciò è una ulteriore prova dell'avvenuta azione farmacologica da parte dell'emetina 1 mM anche se il recupero della attività natatoria non è completo. Il blocco della sensitizzazione promosso da ALC 2 mM è quindi parzialmente presente.

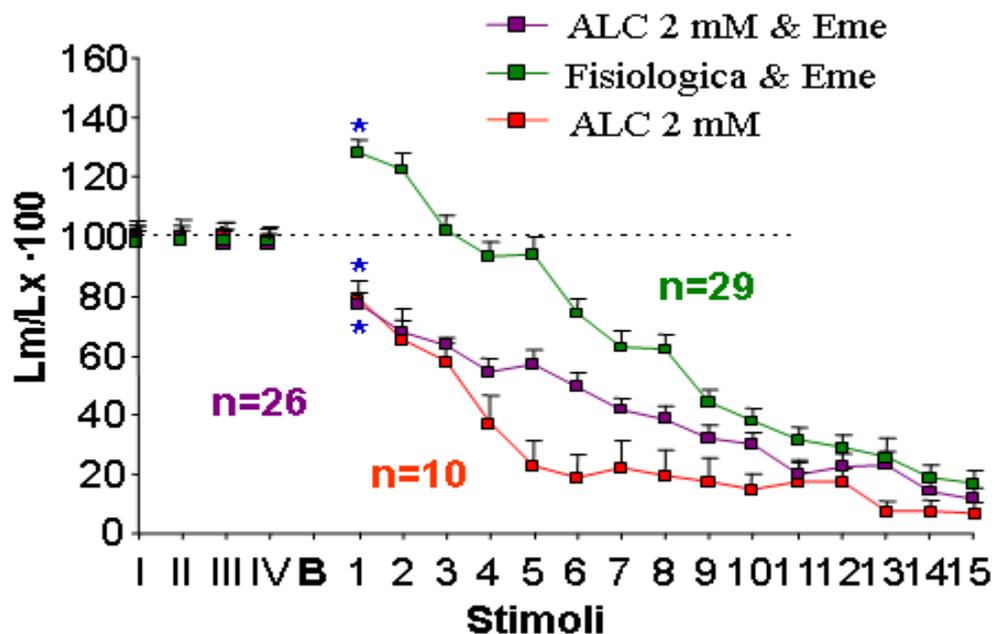


Fig. 20: Effetto della Emetina 1 mM sulla sensitizzazione dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Sull'asse delle ascisse è riportata la successione temporale delle stimolazioni fornite; sull'asse delle ordinate l'inverso delle latenze normalizzate al 100% che rappresenta la

risposta ai quattro stimoli test (I, II, III, IV) (latenza media, L_M). Dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM e 90 minuti dall'iniezione di Emetina 1 mM, gli animali così trattati non presentano potenziamento della risposta natatoria dopo il *brushing*. Non si osservano quindi differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) e quelli trattati con la sola ALC 2 mM (curva rossa). Si evidenziano invece differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale e quelli appartenenti al gruppo di controllo (curva verde).

Gli asterischi indicano la significatività risultante dal confronto statistico (effettuato sui dati espressi in secondi) tra la latenza media e la latenza relativa al primo stimolo successivo al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,00014$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,0000008$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

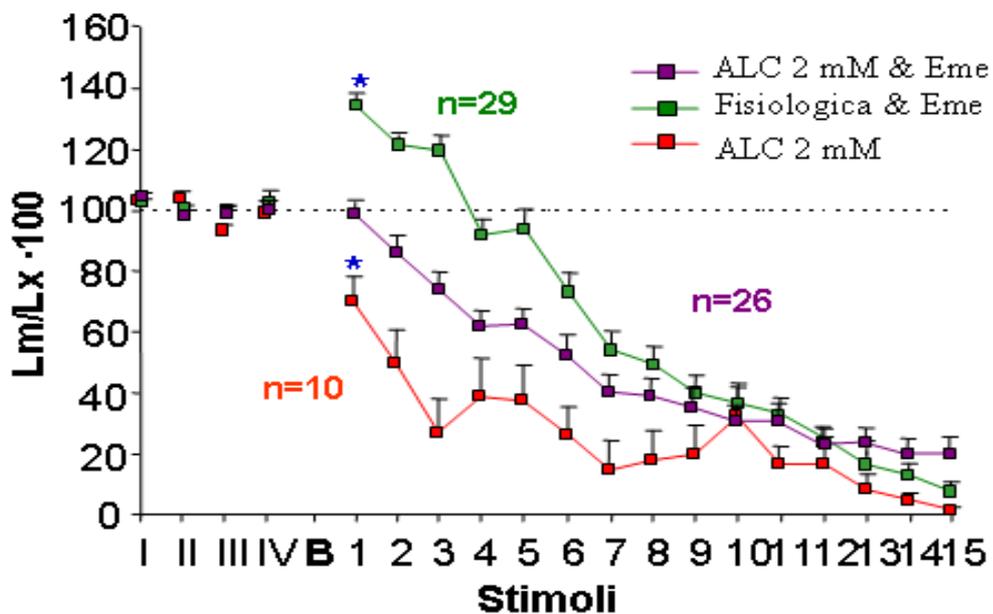


Fig. 21: Effetto della Emetina 1 mM sulla sensitizzazione dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente. Dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2mM e di emetina 1 mM, gli animali mostrano un recupero della attività natatoria (in secondi) dopo il *brushing* e la risposta comportamentale torna "a soglia". Gli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde) mostrano ancora il tipico potenziamento della risposta comportamentale in seguito al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,000004$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,221$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

4.1.2 Effetti della Cicloesimide (1 mM) sulla sensitizzazione in animali trattati con ALC 2 mM

In questo lavoro sperimentale abbiamo esaminato anche l'effetto sulla sensitizzazione di un secondo inibitore della sintesi proteica in animali trattati con ALC 2 mM.

A tal proposito abbiamo seguito il medesimo protocollo sperimentale utilizzato negli esperimenti condotti in presenza di Emetina 1 mM ma quest'ultima è stata sostituita con Cicloesimide 1 mM. Il gruppo sperimentale (curva viola) (ALC 2 mM + Cicloesimide 1 mM) e il gruppo di controllo (curva verde) (soluzione fisiologica + Cicloesimide 1 mM) sono ora formati rispettivamente da 13 e 15 animali mentre il gruppo di animali trattati con ALC 2 mM (curva rossa) è sempre il solito con il quale abbiamo confrontato i risultati ottenuti negli esperimenti precedenti (Fig. 22). Anche in questo caso l'inibitore della sintesi proteica non risulta essere efficace dopo 90

minuti dalla sua somministrazione poiché, la stimolazione elettrica successiva al *brushing* (T1), non determina un potenziamento della risposta comportamentale. Inoltre, anche per la Cicloesimide non si osservano significative differenze tra la risposta T1 relativa al gruppo sperimentale e quella relativa agli animali trattati con solo ALC 2 mM (*Mann Whitney U test*) (Fig. 26). Il gruppo di controllo presenta invece il tipico potenziamento della risposta comportamentale successiva all'evento nocicettivo (*Wilcoxon test*).

Dopo 6 giorni la Cicloesimide 1 mM ha mostrato una significativa azione farmacologica ed i grafici ottenuti dai nostri dati sperimentali mostrano un notevole recupero della risposta natatoria successiva al *brushing*. Infatti, il tempo T1 relativo agli animali appartenenti al gruppo sperimentale risulta essere significativamente diverso rispetto a quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (*Mann Whitney U test*) (Fig. 27).

Anche la Cicloesimide 1 mM non determina però un completo recupero della risposta comportamentale poiché gli animali iniettati con soluzione fisiologica presentano sempre il tipico potenziamento successivo all'evento nocicettivo (*Wilcoxon test*) mentre il tempo T1 degli animali trattati con Cicloesimide 1 mM e ALC 2 mM non è significativamente diverso da L_M (*Wilcoxon test*).

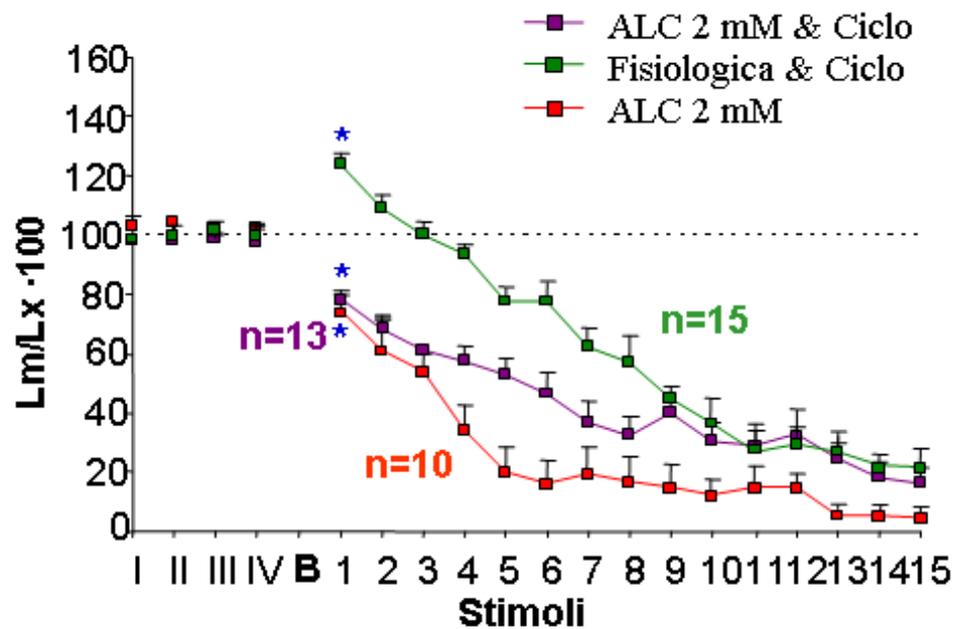


Fig. 22: Effetto della Cicloesimide 1 mM sulla sensitizzazione dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente.

Dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2mM e 90 minuti dall'iniezione di Cicloesimide 1 mM, gli animali così trattati non presentano potenziamento della risposta natatoria dopo il *brushing*. Non si osservano quindi differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) e quelli trattati con la sola ALC 2 mM (curva rossa). Si evidenziano invece differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale e quelli appartenenti al gruppo di controllo (curva verde).

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,000987$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,001474$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

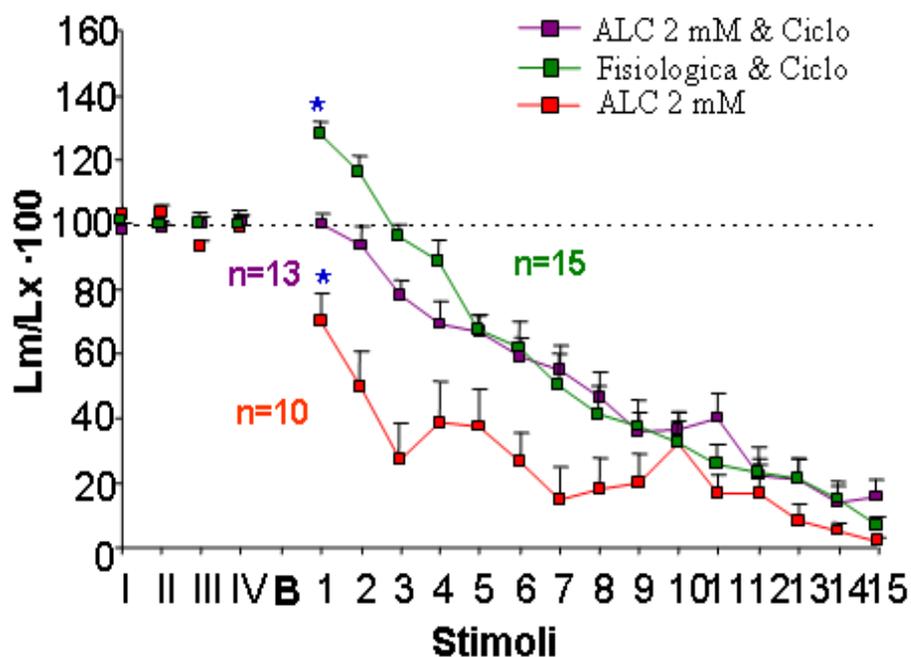


Fig. 23: Effetto della Cicloesimide 1 mM sulla sensitizzazione dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig precedente. Dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2mM e dall'iniezione di cicloesimide 1 mM, negli animali così trattati si osserva un recupero della attività natatoria (in secondi) dopo il *brushing* e la risposta comportamentale torna "a soglia". Gli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde) mostrano ancora il tipico potenziamento della risposta comportamentale in seguito al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,00655$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,5524$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

4.1.3 Effetti di Actinomicina D (2 mM) sulla sensitizzazione in animali trattati con ALC 2 mM

Abbiamo infine ritenuto importante utilizzare anche l'Actinomicina D 2 mM, un inibitore del mRNA, al fine di osservare gli effetti della sua somministrazione in animali trattati con ALC 2 mM.

Il protocollo sperimentale è rimasto immutato e gli animali appartenenti al gruppo sperimentale sono 12 mentre quelli appartenenti al gruppo di controllo sono 10.

I risultati sperimentali ottenuti in seguito a questo trattamento sono simili a quelli osservati in seguito alla somministrazione di emetina 1 mM e cicloesimide 1 mM.

Infatti, nella prima sessione di addestramento, la curva ottenuta dagli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) risulta del tutto simile a quella relativa agli animali trattati con ALC 2 mM (curva rossa).

I confronti statistici hanno infatti evidenziato che, dopo 90 minuti, il trattamento con Actinomicina D risulta essere inefficace nel rimuovere il blocco della sensitizzazione promosso da ALC 2 mM (*Mann Whitney U test*) (Fig. 26) mentre gli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde) mostrano il tipico potenziamento della risposta comportamentale successiva al *brushing* (*Wilcoxon test*). Dopo 6 giorni dal trattamento anche l'Actinomicina D risulta efficace e la risposta comportamentale, successiva all'evento nocicettivo è potenziata rispetto a quella relativa agli animali trattati con sola ALC 2 mM (*Mann Whitney U test*) (Fig. 27).

Da notare però che in questo caso gli animali appartenenti al gruppo sperimentale mostrano un minimo potenziamento della risposta natatoria successiva al *brushing* (*Wilcoxon test*) e quindi l'Actinomicina D risulta più efficace degli altri inibitori presi in considerazione.

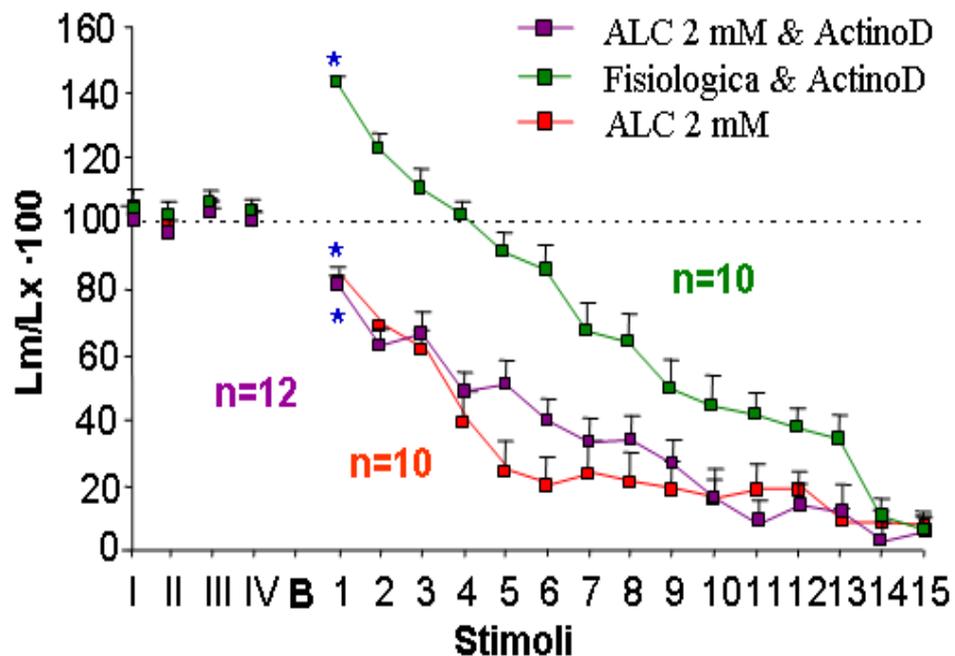


Fig. 24: Effetto della Actinomicina D 2 mM sulla sensitizzazione dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente.

Dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2mM e 90 minuti dall'iniezione di Actinomicina D 2 mM, gli animali non presentano potenziamento della risposta natatoria dopo il *brushing*. Non si osservano quindi differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) e quelli trattati con la sola ALC 2 mM (curva rossa). Si evidenziano invece differenze significative tra gli animali appartenenti al gruppo sperimentale e quelli appartenenti al gruppo di controllo (curva verde).

Gli asterischi indicano la significatività risultante dal confronto statistico (effettuato sui dati espressi in secondi) tra la latenza media e la latenza relativa al primo stimolo successivo al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,003346$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,00655$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

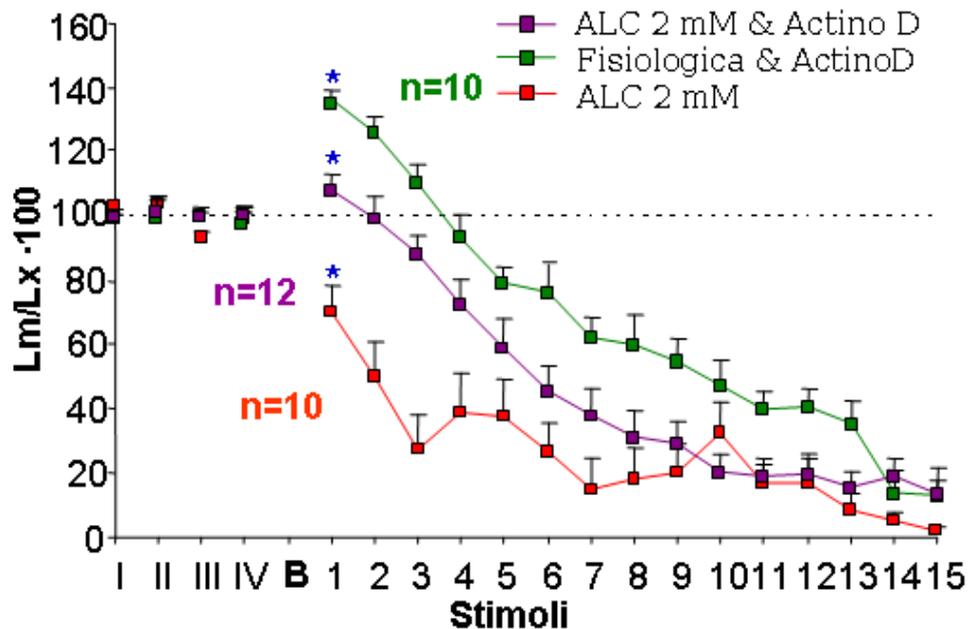


Fig. 25: Effetto della Actinomicina D 2 mM sulla sensitizzazione dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente.

Dopo 6 giorni dall'iniezione di ALC 2mM e dall'iniezione di Actinomicina D 2mM, negli animali si osserva un recupero della attività natatoria (in secondi) dopo il *brushing* e la risposta comportamentale appare leggermente potenziata. Gli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde) mostrano ancora il tipico potenziamento della risposta comportamentale in seguito al *brushing*.

Gli asterischi indicano la significatività risultante dal confronto statistico (effettuato sui dati espressi in secondi) tra la latenza media e la latenza relativa al primo stimolo successivo al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,003346$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,00641$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,0050$

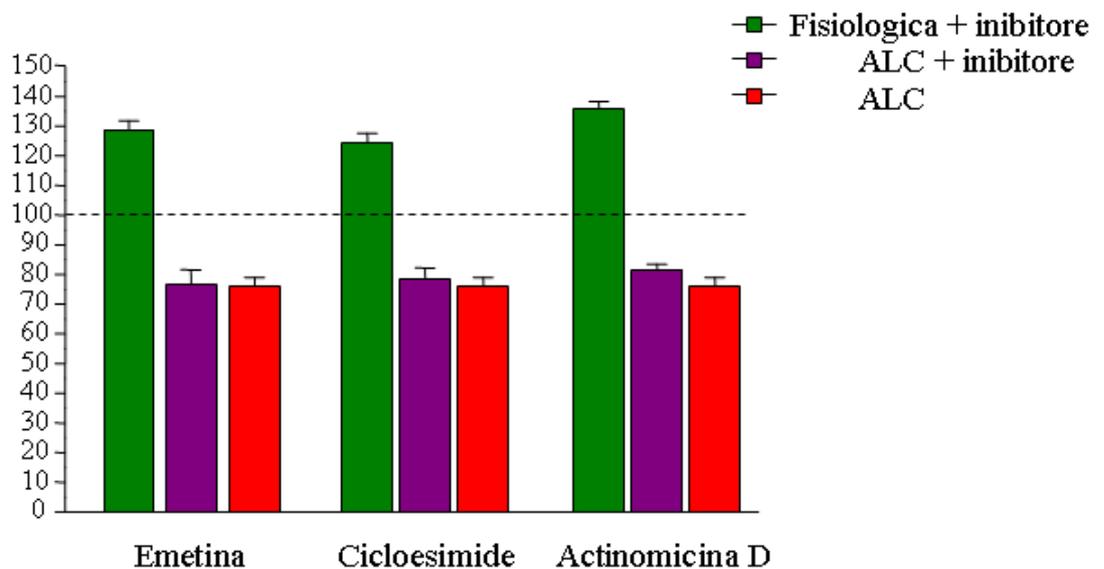


Fig. 26: Blocco della sensitizzazione promosso da ALC 2 mM dopo 2 ore dal trattamento.

Gli istogrammi rappresentano l'entità della risposta comportamentale dei tre gruppi di animali presi in considerazione. La colonna verde indica il potenziamento della risposta comportamentale successivo al *brushing* del gruppo di controllo, le colonne viola e rosse indicano rispettivamente il blocco della sensitizzazione presente sia nel gruppo sperimentale che in quello degli animali trattati con la sola ALC 2 mM. Dal controllo statistico del *Mann Whitney U test* non risulta alcuna significatività risultante tra il primo stimolo successivo al *brushing* del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con la sola ALC 2 mM

Mann Whitney U test Emetina = 0,3027

Mann Whitney U test Cicloesimide = 0,6926

Mann Whitney U test Actinomicina D = 0,3407

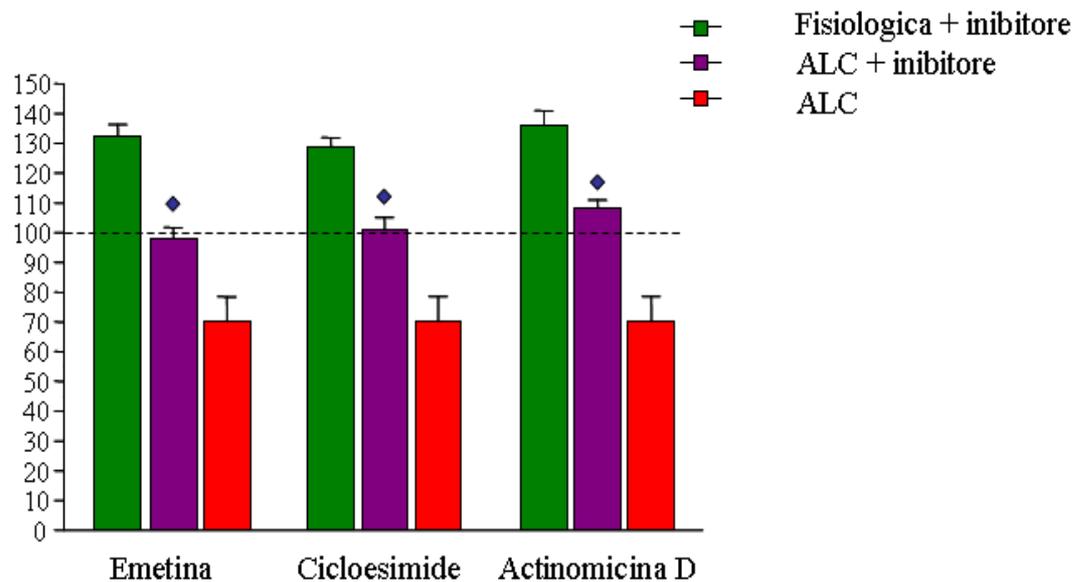


Fig. 27: Recupero della attività natatoria osservato negli animali appartenenti al gruppo sperimentale.

Gli istogrammi rappresentano anche in questo caso l'entità della risposta comportamentale nei tre diversi gruppi di animali. In particolare, con il *Mann Whitney U test* viene evidenziata la significatività risultante (rombo blu) tra il primo stimolo successivo all'evento nocicettivo del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con la sola ALC 2 mM. Tutti e tre gli inibitori della sintesi proteica sono stati efficaci nel determinare un significativo recupero dell'attività comportamentale.

Mann Whitney U test Emetina = **0,0282**

Mann Whitney U test Cicloesimide = **0,0098**

Mann Whitney U test Actinomicina D = **0,000068**

4.2 AZIONE DEGLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA SULLA DISABITUDINE IN ANIMALI TRATTATI CON ALC 2 mM

Negli esperimenti condotti nei nostri laboratori sono stati studiati anche gli effetti di ALC 2 mM sulla disabitudine.

Come per la sensitizzazione, ALC 2 mM si è rivelata efficace nel ridurre il potenziamento della risposta comportamentale in seguito a *brushing* e, anche in questo caso, gli effetti compaiono dopo 2 ore e permangono per 11 giorni.

I risultati ottenuti negli esperimenti di sensitizzazione hanno confermato che gli inibitori della sintesi proteica riducono gli effetti di ALC 2 mM e quindi, è stato nostro interesse verificare se, anche per la disabitudine si ottenevano risultati analoghi.

Il protocollo sperimentale utilizzato è stato fedelmente riprodotto come per gli esperimenti di sensitizzazione e, anche in questo caso, gli inibitori della sintesi proteica utilizzati sono stati l'Emetina 1 mM, la Cicloesimide 1 mM e l'Actinomicina D 2 mM per l'mRNA.

I risultati sperimentali ottenuti sono stati graficati come descritto in MATERIALI E METODI (Par. 3.2) ed anche per la disabitudine sono stati costruiti opportuni istogrammi per evidenziare l'entità della risposta comportamentale successiva al *brushing*. Sull'asse delle ascisse sono stati quindi riportati i tre gruppi di animali presi in considerazione per ogni inibitore della sintesi proteica utilizzato mentre sull'asse delle ordinate è stata riportata una scala di valori espressi in percentuale. Le colonne indicano il valore di T16 successivo all'evento nocicettivo e normalizzato alla risposta basale

che rappresenta il 100% (linea tratteggiata). Anche in questo caso è stato utilizzato il *Mann Whithney U test* per indicare la significatività risultante dal confronto statistico tra il primo stimolo successivo al *brushing* del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (rombo blu).

4.2.1 Effetti di Emetina 1 mM sulla disabitudine in animali trattati con ALC 2 mM

Il gruppo sperimentale (ALC 2mM + Emetina 1 mM) (curva viola) ed il gruppo di controllo (curva verde) (soluzione fisiologica + Emetina 1 mM) sono rispettivamente formati da 16 e 11 animali e, a distanza di 30 minuti dal trattamento con ALC 2 mM o soluzione fisiologica, gli animali sono stati iniettati con emetina 1 mM.

La sessione di disabitudine inizia quindi dopo 90 minuti da quest'ultimo trattamento e, i risultati sperimentali ottenuti, descrivono un potenziamento della risposta comportamentale successiva al *brushing* di tutti gli animali (*Wilcoxon test*) (Fig. 28).

L'entità di questo potenziamento presenta delle differenze e, nel caso del gruppo di controllo, la risposta comportamentale successiva all'evento nocicettivo supera addirittura il 100% del valore iniziale mentre per gli altri due gruppi di animali il tempo T16 risulta essere maggiore rispetto alla latenza media.

Il confronto statistico dei tempi T16 degli animali appartenenti al gruppo sperimentale e quelli relativi agli animali trattati con la sola ALC 2 mM non risulta inoltre essere statisticamente diverso (*Mann Whithney U test*) (Fig. 34) e ciò dimostra che l'Emetina 1 mM non ha

ancora esercitato la sua azione farmacologica dopo 90 minuti dalla sua somministrazione.

In seguito alla sessione di disabitudine effettuata dopo 6 giorni dal trattamento (Fig. 29) si può invece osservare che l'Emetina 1 mM è risultata essere efficace: la risposta comportamentale successiva al *brushing* degli animali trattati con ALC 2 mM e questo inibitore della sintesi proteica appare potenziata rispetto a quella relativa agli animali trattati con la sola ALC 2 mM (*Mann Whithney U test*) (Fig. 35).

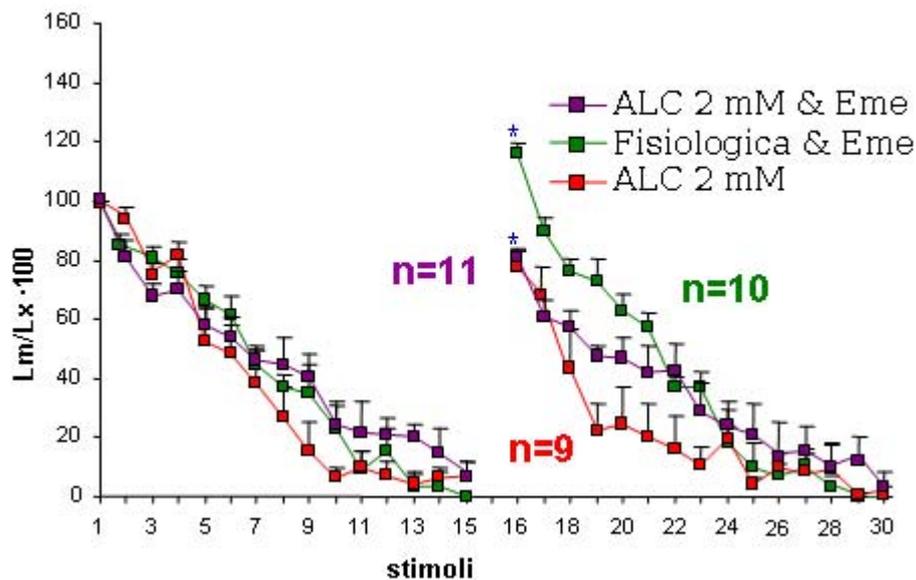


Fig. 28: Effetto dell'Emetina 1 mM sulla disabitudine, a distanza di 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Sull'asse delle ascisse è riportata la successione temporale delle stimolazioni fornite, sull'asse delle ordinate l'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza al primo stimolo nella prima sessione di abitudine considerata come il 100%.

Si può osservare che a dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM e 90 minuti da quella di Emetina 1 mM tutti gli animali presentano una risposta comportamentale successiva al *brushing* potenziata ma, gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola)

mostrano un potenziamento ridotto, simile a quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (curva rossa). Nel gruppo di controllo (curva verde) il potenziamento supera addirittura il 100%. Gli asterischi indicano la significatività risultante dal confronto statistico (effettuato sui dati espressi in secondi) tra la latenza media e la latenza relativa al primo stimolo successivo al *brushing*.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0015$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,00147$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00335$

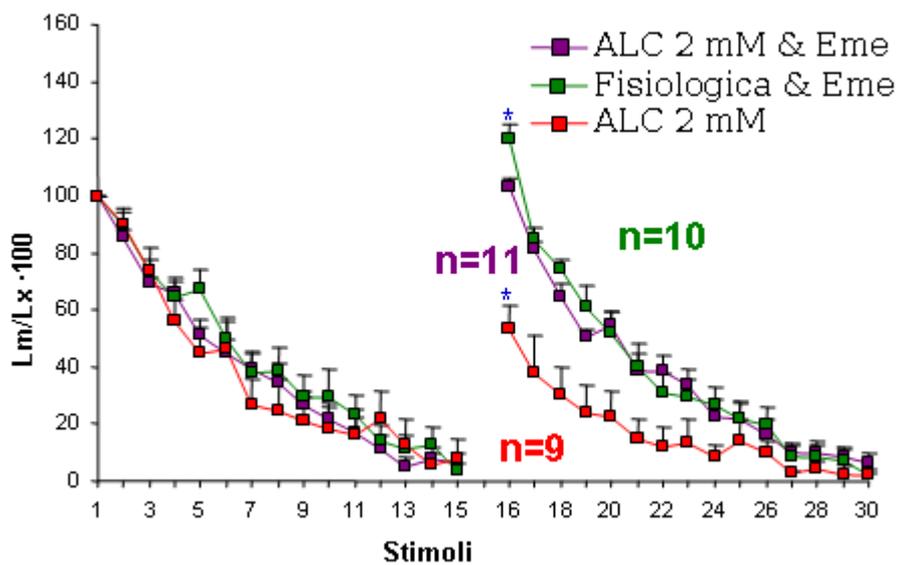


Fig. 29: Effetto dell'Emetina 1 mM sulla disabitudine, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente.

Si può osservare che, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM ed Emetina 1 mM, gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) mostrano un potenziamento della risposta, successiva al *brushing*, simile agli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde). La curva rossa descrive invece la curva relativa agli animali trattati con ALC 2 mM i quali presentano una riduzione del potenziamento rispetto al gruppo di controllo.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0015$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,0014$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00765$

4.2.2 Effetti della Cicloesimide 1 mM sulla disabitudine in animali trattati con ALC 2 mM

Il protocollo sperimentale è stato ripetuto per il trattamento con cicloesimide 1 mM e questa volta, il gruppo sperimentale (curva viola) e quello di controllo (curva verde) sono entrambi costituiti da 10 animali (Fig. 30).

Dopo 90 minuti dall'iniezione di Cicloesimide 1 mM si può notare che il quadro generale dei risultati sperimentali ottenuti è pressoché identico a quello relativo al trattamento con emetina 1 mM.

Tutti gli animali mostrano infatti un potenziamento della risposta comportamentale successiva all'evento nocicettivo (*Wilcoxon test*) e i tempi T16 relativi agli animali appartenenti al gruppo sperimentale e a quelli trattati con ALC 2 mM non risultano essere significativamente diversi (*Mann Whithney U test*) (Fig. 34).

Dopo 6 giorni dal trattamento anche la Cicloesimide ha esercitato la sua azione farmacologica (Fig. 31) ed il potenziamento della risposta natatoria successiva al *brushing* risulta essere statisticamente superiore rispetto a quello degli animali trattati con ALC 2 mM (*Mann Whithney U test*) (Fig. 35). La Cicloesimide però risulta essere più efficace rispetto all'emetina 1 mM poiché dal confronto statistico tra il tempo T16 degli animali appartenenti al gruppo di controllo e quelli appartenenti al gruppo sperimentale non vi sono osservate differenze significative (*Mann Whithney U test*) (dato non riportato in grafico).

Ciò permette di concludere che la Cicloesimide 1 mM reverte completamente la riduzione della disabitudine ottenuta col trattamento con ALC 2 mM.

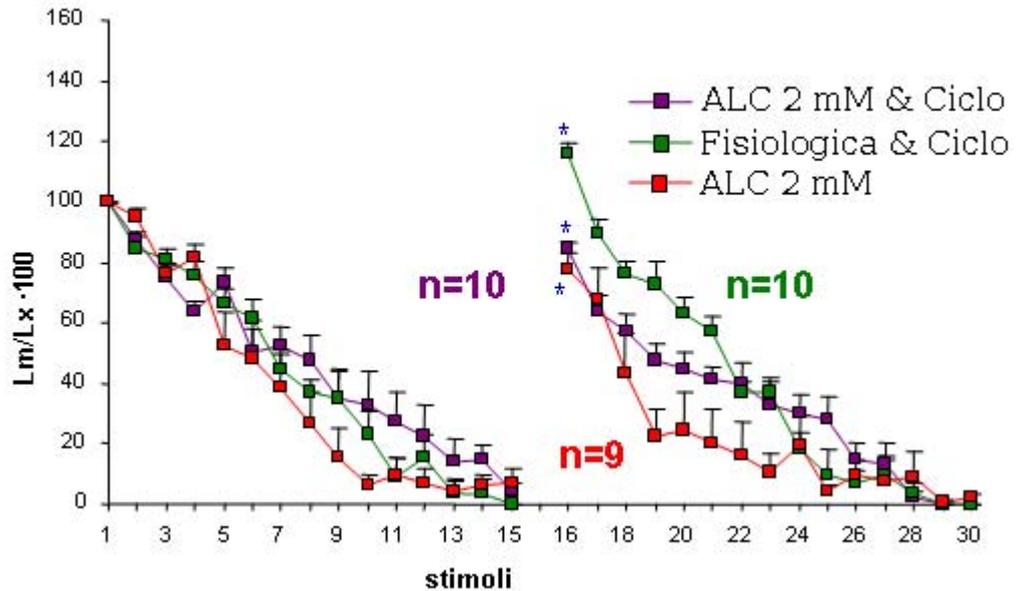


Fig. 30: Effetto della Cicloesimide 1 mM sulla disabitudine, a distanza di 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente

Si può osservare che dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM e 90 minuti da quella di Cicloesimide 1 mM gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) presentano una riduzione del potenziamento dopo il *brushing* simile a quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (curva rossa). Nell gruppo di controllo (curva verde) invece il potenziamento supera addirittura il 100%.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0077$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,0051$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00335$

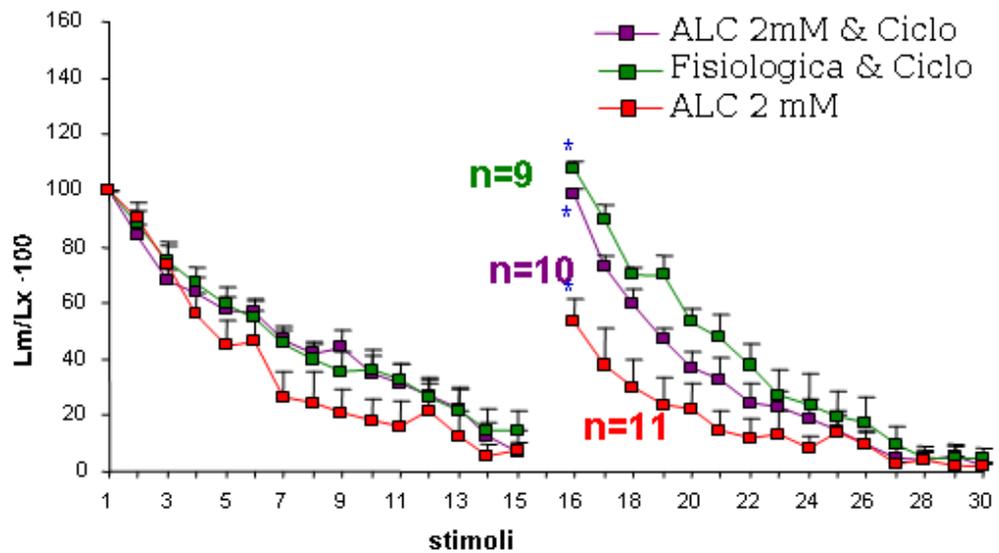


Fig. 31: Effetto della Cicloesimide 1 mM sulla disabitidine, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente

Si può osservare che, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM e Cicloesimide 1 mM, gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) mostrano un potenziamento della risposta, successiva al *brushing*, del tutto simile a quello relativo agli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde). La curva rossa descrive invece la riduzione della disabitidine presente per gli animali trattati con ALC 2 mM.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0077$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,00506$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00765$

4.2.3 Effetti della Actinomicina D sulla disabitudine in animali trattati con ALC 2 mM

Gli esperimenti di disabitudine in presenza di ALC 2 mM sono continuati sostituendo la Cicloesimide 1 mM con la Actinomicina D 2 mM. Il gruppo sperimentale (curva viola) conta ora 12 animali mentre quello di controllo 11 (curva verde) (Fig. 32).

I risultati sperimentali sono anche in questo caso simili a quelli ottenuti negli esperimenti precedenti e, dopo 90 minuti dal trattamento con actinomicina D 2 mM, tutti gli animali hanno una risposta comportamentale successiva al *brushing* potenziata (*Wilcoxon test*). Il potenziamento però è diverso nei vari gruppi: nel gruppo sperimentale esso è del tutto simile a quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (*Mann Whithney U test*) (Fig. 34) ma inferiore a quello degli animali appartenenti al gruppo di controllo (*Mann Whithney U test*) (dato non riportato).

Dopo 6 giorni anche l'Actinomicina D 2 mM è in grado di revertire totalmente gli effetti determinati dal trattamento con ALC 2 mM (Fig. 33) poiché i tempi T16 relativi al gruppo sperimentale e al gruppo di controllo non sono più significativamente diversi (*Mann Whithney U test*) (Fig. 35). La curva rossa mostra invece il duraturo effetto della ALC 2 mM in assenza di Actinomicina D 2 mM.

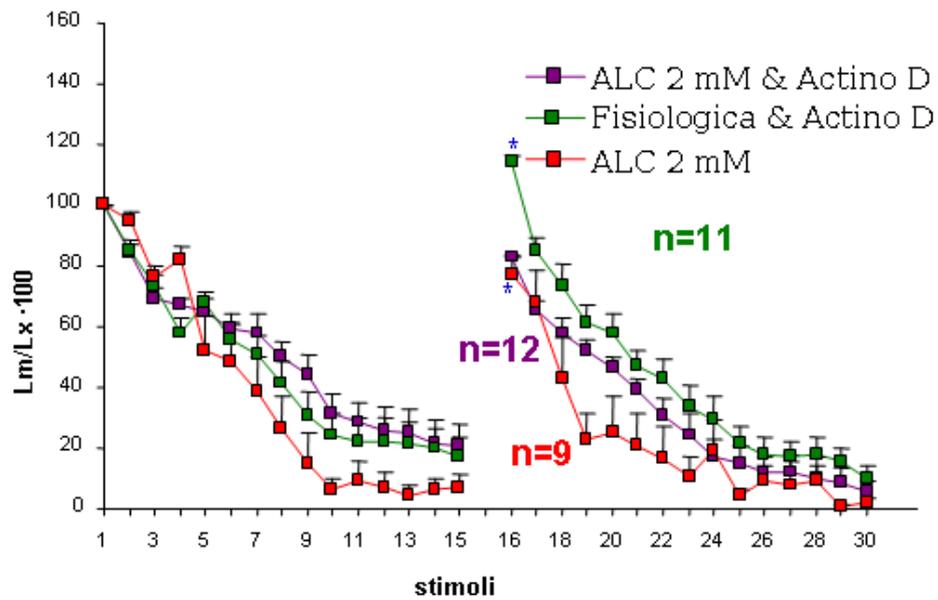


Fig. 32: Effetto dell'Actinomicina D sulla disabitudine, a distanza di 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente.

Si può osservare che a dopo 2 ore dall'iniezione di ALC 2 mM e 90 minuti da quella di 1 mM gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) presentano una riduzione del potenziamento dopo il *brushing* simile a quello relativo agli animali trattati con ALC 2 mM (curva rossa). Non si osservano quindi differenze significative tra le curve ottenute da questi due gruppi di animali. Nel gruppo di controllo (curva verde) il potenziamento supera addirittura il 100%.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0015$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,00147$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00335$

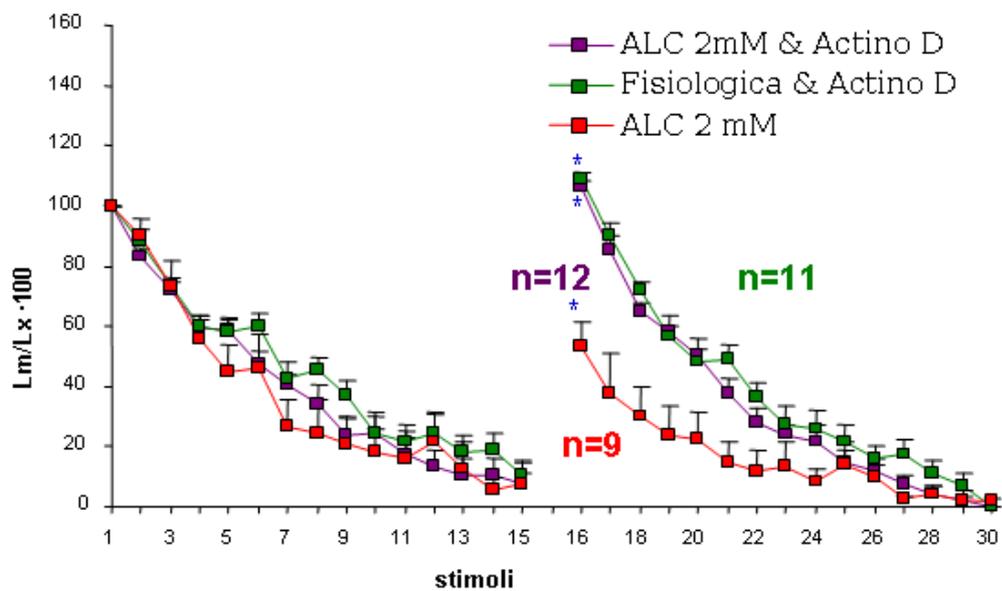


Fig. 33: Effetto della Actinomicina D 2 mM sulla disabitudine, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

Ascisse e ordinate come in Fig. precedente

Si può osservare che, a distanza di 6 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM ed Actinomicina D 2 mM, gli animali appartenenti al gruppo sperimentale (curva viola) mostrano un potenziamento della risposta, successiva al *brushing*, simile agli animali appartenenti al gruppo di controllo (curva verde). La curva rossa descrive invece la curva relativa agli animali trattati con solo ALC 2 mM i quali presentano una riduzione del potenziamento rispetto al gruppo di controllo.

* Wilcoxon test: controllo, $p = 0,0015$

* Wilcoxon test: sperimentale, $p = 0,0015$

* Wilcoxon test: ALC, $p = 0,00765$

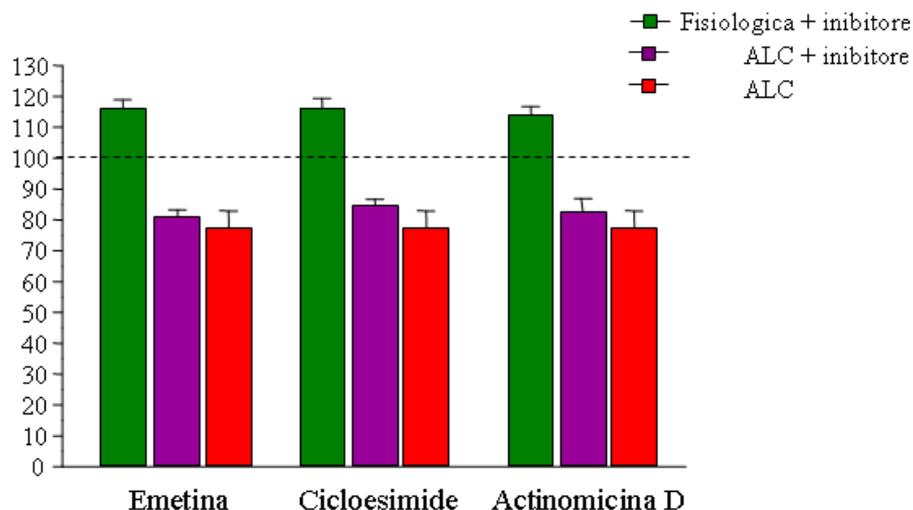


Fig. 34: Riduzione della disabitudine dopo due ore dal trattamento con ALC 2 mM.

Istogrammi rappresentano l'entità della risposta comportamentale dei tre gruppi di animali presi in considerazione. La colonna verde indica il potenziamento della risposta comportamentale successivo al *brushing* del gruppo di controllo, le colonne viola e rosse indicano rispettivamente la riduzione della disabitudine presente sia nel gruppo sperimentale che in quello degli animali trattati con la sola ALC 2 mM. Dal controllo statistico del *Mann Whitney U test* ($p < 0,01$) non risulta alcuna significatività risultante tra il primo stimolo successivo al *brushing* del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con la sola ALC 2 mM.

Mann Whitney U test Emetina = 0,095

Mann Whitney U test Cicloesimide = 0,497

Mann Whitney U test Actinomicina D = 0,175

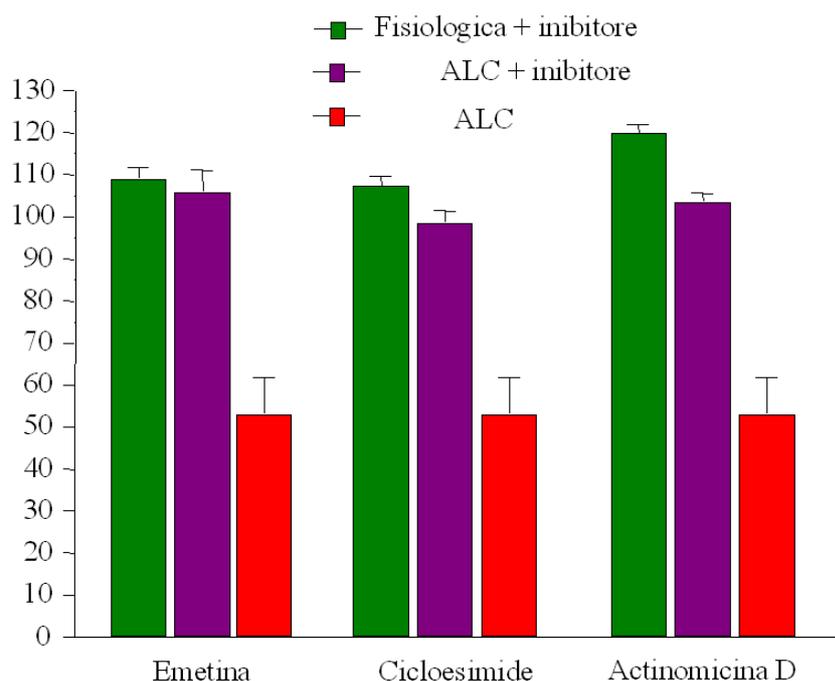


Fig. 35: Recupero della attività natatoria osservato negli animali appartenenti al gruppo sperimentale.

Gli istogrammi rappresentano anche in questo caso l'entità della risposta comportamentale nei tre diversi gruppi di animali. Anche in questo caso il *Mann Whitney U test* ($p < 0,01$) evidenzia la significatività risultante (rombo blu) tra il primo stimolo successivo all'evento nocicettivo del gruppo sperimentale e quello relativo agli animali trattati con la sola ALC 2 mM. Come per la sensitizzazione anche in questo caso tutti e tre gli inibitori della sintesi proteica sono stati efficaci nel determinare un significativo recupero dell'attività comportamentale.

Mann Whitney U test Emetina = **0,000007**

Mann Whitney U test Cicloesimide = **0,000152**

Mann Whitney U test Actinomicina D = **0,000012**

5. DISCUSSIONE

Questo lavoro sperimentale si colloca all'interno di un ampio progetto di ricerca finalizzato ad identificare quali siano gli effetti di ALC su forme di apprendimento non associativo in *H. medicinalis*.

Le proprietà neuroprotettive e neuromodulatorie esercitate da ALC sul sistema nervoso sono oggi ben documentate.

Evidenze sperimentali, ottenute soprattutto su modelli di Vertebrati, hanno infatti dimostrato la capacità di questa biomolecola di influenzare il metabolismo neuronale andando a preservare la cellula da eventuali danni dovuti a disfunzioni mitocondriali: ALC determinerebbe infatti una riduzione dello stress ossidativo e dell'azione dei radicali liberi (Arduini, 1994; Yasui *et al.*, 2002; Zbigniew and Ashraf, 2003; Hinerfeld *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda invece le proprietà neuromodulatorie, ALC si è dimostrata in grado di modulare sia la sintesi che il rilascio di Ach (Curti *et al.*; 1989; Imperato *et al.*, 1989) ed inoltre è risultata efficace nell'indurre una *up-regulation* dei recettori metebotropici glutammatergici (Chiechio *et al.*; 2002).

In una delle linee di ricerca più attuali, è stato osservato che ALC è in grado di migliorare le capacità mnemoniche e cognitive: nell'animale anziano, dove l'attività sinaptica e la capacità di modulazione plastica sono ridotte, il trattamento cronico con ALC determina un miglioramento delle prestazioni nel corso di alcuni test sperimentali di apprendimento (Barnes *et al.*, 1990; Tagliatela *et al.*, 1996; Ando *et al.*, 2001).

Nei nostri laboratori vengono studiati da alcuni anni i meccanismi che sottendono alle forme più semplici di apprendimento e, in particolare dell'apprendimento non associativo.

Il modello comportamentale da noi utilizzato è quello dell'induzione al nuoto nella sanguisuga *H. medicinalis* con il quale è stato possibile chiarire come ALC vada ad influenzare i meccanismi che determinano l'instaurarsi della sensitizzazione e della disabitudine.

ALC viene somministrata in modo da ottenere una distribuzione il più omogenea possibile all'interno del corpo dell'animale e proprio per questo motivo viene somministrata una iniezione nella porzione caudale ed una in quella rostrale, ciascuna contenente 100 µl per grammo di peso dell'animale.

Nei primi esperimenti condotti nei nostri laboratori, è stato studiato l'effetto di questa biomolecola su forme di apprendimento non associativo ed è stato osservato che la concentrazione 2 mM di ALC era la più efficace nel bloccare la sensitizzazione e nel ridurre la disabitudine indotte da *brushing*. Gli effetti in seguito a questo trattamento non sono però immediati ma compaiono solo dopo 2 ore dalla somministrazione del farmaco.

Per verificare inoltre se gli effetti di ALC perdurano nel tempo tutti gli animali sono stati sottoposti a 2 ulteriori sessioni di addestramento a distanza di 6 e 11 giorni dall'iniezione di ALC 2 mM.

I dati sperimentali ottenuti hanno confermato che l'effetto depressivo prodotto da ALC non solo si era mantenuto ma dopo 11 giorni era addirittura maggiore rispetto a quello osservato dopo 2 ore dall'iniezione.

Nel loro insieme quindi, i risultati ottenuti rilevano che ALC non produce un miglioramento delle capacità di apprendimento in *H.*

medicinalis e ciò sembrerebbe essere in contrasto con i dati maggiormente presenti in letteratura nei quali viene invece descritta una azione opposta. Resta però il fatto che tutti gli studi che riferiscono di un miglioramento delle prestazioni cognitive in seguito a trattamento con ALC sono stati condotti su animali anziani nei quali i processi di invecchiamento determinano un decremento delle capacità di apprendimento.

Dopo aver quindi constatato che una sola iniezione di ALC 2 mM è sufficiente rispettivamente per bloccare e ridurre i processi di sensitizzazione e disabitudine indotte da *brushing*, si è cercato di capire quali fossero le modalità con le quali questa sostanza esercita la sua azione farmacologica.

Inizialmente è stato verificato se ALC andava ad influenzare il grado di attività degli animali e per far ciò è bastato confrontare i movimenti spontanei di *crawling* e di nuoto esibiti da animali *naïve* e animali iniettati con ALC.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che non vi sono significative differenze di motilità tra i due gruppi di animali.

Successivamente è stato ipotizzato che ALC eserciti la sua azione su alcuni neuroni sensoriali. Questa ipotesi ha trovato numerose conferme e registrazioni intracellulari dalle cellule N hanno evidenziato che, in seguito a trattamento con ALC, queste risultano iperpolarizzate e ciò determina un notevole innalzamento della loro soglia di scarica (Lombardo *et al.*, 2003).

Da queste evidenze sperimentali si è potuto quindi ipotizzare un eventuale effetto analgesico di ALC: una ridotta attivazione delle cellule N determina infatti una minor liberazione di 5HT che è il neurotrasmettitore endogeno in grado di indurre sensitizzazione e

disabitudine, sia nella sanguisuga (Burrell and Sahley, 2005; Zaccardi *et al.*, 2004) che in altri Invertebrati quali *A. californica* (Mauelshagen *et al.*, 1998; Fox and Lloyd, 2002).

Esperimenti successivi hanno però indebolito quest'ultima ipotesi poiché, la sostituzione dell'evento nocicettivo con iniezioni di 5HT non è risultata efficace nel rimuovere l'effetto determinato dal trattamento con ALC. Ciò ha suggerito che ALC non influenza l'efficienza dei recettori serotoninergici ma che altri meccanismi entrano in gioco.

ALC si è inoltre dimostrata capace di bloccare la sensitizzazione e ridurre la disabitudine indotte da 8-Br-cAMP, un analogo permeabile del cAMP che si è dimostrato in grado di mimare l'effetto sensitizzante e disabituante del *brushing* e della 5HT (Zaccardi *et al.*, 2004).

Gli studi più recenti hanno preso in considerazione il fenomeno dell'iperpolarizzazione postuma (AHP) che si osserva nei neuroni sensoriali in seguito alla scarica di un treno di potenziali.

5HT, via cAMP, riduce l'ampiezza della AHP (Catarsi and Brunelli, 1991) per un'azione inibitoria sulla pompa Na^+/K^+ ATPasi (Catarsi *et al.*, 1993). La Na^+/K^+ ATPasi è la principale responsabile dell'insorgenza dell'AHP (Baylor and Nicholls, 1969b; Jansen and Nicholls, 1973).

Recentemente è stato dimostrato che ad una riduzione dell'ampiezza dell'AHP corrisponde un aumento dell'efficacia sinaptica tra il neurone T e le cellule ad esso collegate (cellule *followers*) (Lombardo *et al.*, 2006). Poiché il circuito neuronale del nuoto viene attivato in seguito alla stimolazione delle cellule T, la diminuzione dell'AHP in seguito alla somministrazione di 5HT e il conseguente aumento della

efficacia sinaptica potrebbero rappresentare uno dei meccanismi alla base del potenziamento della risposta comportamentale che caratterizza sia la sensitizzazione che la disabitudine.

Analisi elettrofisiologiche condotte nei nostri laboratori sulle cellule T hanno evidenziato che ALC determina un prolungato aumento dell'ampiezza della AHP dovuto essenzialmente ad un aumento sostenuto nel tempo dell'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi (Lombardo *et al.*, 2004). Ciò determinerebbe una depressione della connessione sinaptica tra le cellule T e i neuroni *followers* (Scuri *et al.*, 2002) per una riduzione dei potenziali d'azione che raggiungono i terminali sinaptici (Lombardo *et al.*, 2004). Al contrario, una riduzione di AHP aumenta il numero di potenziali di azione che invadono i terminali sinaptici (Lombardo *et al.*, 2006).

Quindi, poiché ALC determina un aumento della AHP nelle cellule T questo potrebbe prevalere sulla riduzione della ampiezza promossa da 5HT e ciò si manifesta, a livello comportamentale, con il mancato potenziamento della risposta natatoria.

Un aspetto interessante è stato cercare di capire perché l'effetto di ALC sulla sensitizzazione e sulla disabitudine permane per molti giorni. L'ipotesi avanzata fu di una sua probabile modulazione dell'espressione genica.

Negli esperimenti condotti in passato nei nostri laboratori è stato evidenziato che animali trattati con ALC 2 mM presentano un blocco della sensitizzazione e una riduzione della disabitudine dopo 2 ore dal trattamento e che questo effetto permane fino ad 11 giorni. Per spiegare il perdurare dell'azione di ALC su queste forme di apprendimento si è quindi ipotizzato che questa molecola fosse in grado di modulare l'espressione genica e, a tal riguardo, è stata

utilizzata la tecnica della SSH che ha permesso di confermare l'ipotesi da noi formulata. ALC si è infatti dimostrata in grado di migliorare il metabolismo mitocondriale compromesso dall'invecchiamento mediante la regolazione dell'espressione genica (Gadaleta *et al.*, 1990) ed inoltre è stato evidenziato che il trattamento cronico con ALC determina, nel Vertebrato, un *up-regulation* del gene per il canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC) e una *down-regulation* della ATP-sintasi legante i lipidi a localizzazione mitocondriale (Traina *et al.*, 2004; Traina *et al.*, 2006).

Partendo da quest'ultime evidenze sperimentali abbiamo ritenuto interessante osservare se alcuni inibitori della sintesi proteica (Emetina, Cicloesimide ed Actinomicina D) fossero in grado di ridurre o eliminare gli effetti determinati dalla somministrazione di ALC 2 mM sulla sensitizzazione e sulla disabitudine.

Poiché il nostro scopo era quello di confermare una modulazione di ALC 2 mM sulla trascrizione genica, le sanguisughe da noi trattate hanno subito solamente due sessioni di addestramento, una dopo 2 ore e una dopo 6 giorni dal trattamento.

La sessione di addestramento dopo 11 giorni si è realizzata perché, se avessimo osservato un recupero della attività natatoria dopo 6 giorni, potevamo concludere che effettivamente il blocco della sintesi proteica era stato efficace.

I risultati da noi ottenuti sono stati soddisfacenti poiché, tutti e tre gli inibitori sono stati efficaci nel revertire, parzialmente o totalmente, sia il blocco della sensitizzazione che la riduzione della disabitudine.

Per quanto riguarda la sensitizzazione, dopo 2 ore dal trattamento con ALC 2 mM (e 90 minuti da quello con gli inibitori), non abbiamo rivelato differenze significative rispetto alle curve relative agli animali

trattati con la sola ALC 2 mM. Ciò ha portato a concludere che nella prima sessione di addestramento nessuno degli inibitori della sintesi proteica presi in considerazione aveva ancora esercitato la propria azione farmacologica e quindi il blocco della sensitizzazione era sempre presente.

Nella sessione di addestramento successiva, è stato possibile evidenziare invece un notevole recupero dell'attività natatoria successiva al *brushing*. La risposta natatoria è infatti apparsa potenziata rispetto al gruppo di sanguisughe iniettato con la sola ALC ma il recupero non è stato totale.

Nel processo di disabitudine i risultati sono stati praticamente identici poiché, anche in questo caso, dopo la prima sessione di addestramento gli animali presentavano una riduzione della disabitudine del tutto identica a quella degli animali trattati con la sola ALC 2mM: le curve ottenute erano in tutti e 3 i casi praticamente sovrapponibili. Nella sessione successiva si è potuto invece notare un significativo recupero dell'attività natatoria e, nel caso della Cicloesimide e della Actinomicina D, esso è praticamente totale.

I risultati sperimentali da noi ottenuti suffragano quindi i dati di biologia molecolare e confermano quindi che ALC va a modulare l'espressione genica.

Da un punto di vista comportamentale sono sorti alcuni interrogativi ai quali esperimenti futuri potranno probabilmente dare delle risposte. Infatti, si notano delle differenze "quantitative" riguardo dell'entità del recupero della risposta comportamentale nei due processi.

Come detto precedentemente, il recupero osservato per la disabitudine è praticamente totale mentre per la sensitizzazione è significativamente inferiore. Per dare una spiegazione ai risultati da

noi ottenuti è opportuno fare una prima osservazione ovvero che il blocco promosso dagli inibitori non è totale e quindi, proteine di nuova sintesi, che determinano gli effetti a lungo termine dovuti al trattamento con ALC, potrebbero essere regolarmente prodotte.

Poichè gli inibitori della sintesi proteica risultano meno efficaci per il processo di sensitizzazione rispetto a quello di disabitudine, potremmo aver suffragato ulteriormente l'idea che i due fenomeni sottendono a meccanismi diversi. Quindi, la parziale efficacia degli inibitori nel revertire il blocco della sensitizzazione promosso da ALC potrebbe essere dovuto ad una incompletezza del blocco della sintesi oppure perché, gli effetti duraturi sulla attività natatoria successiva al *brushing*, sono determinati da altri meccanismi non direttamente connessi con la sintesi di nuove proteine.

Per quanto riguarda invece il processo della disabitudine, i risultati da noi ottenuti, permettono di ipotizzare che gli effetti duraturi in seguito al trattamento con ALC 2 mM siano dovuti essenzialmente ad una modulazione dell'espressione genica e che gli inibitori da noi utilizzati determinano effettivamente il blocco della produzione di proteine di nuova sintesi.

6. BIBLIOGRAFIA

Acklin S.E. (1988) "Electrical properties and anion permeability of doubly rectifying junctions in the leech central nervous system". *J. Exp. Biol.*, **137**: 1-11.

Ando S., Tadenuma T., Tanaka Y., Fukui F., Kobayashi S., Ohashi Y. and Kawabata T. (2001) "Enhancement of learning capacity and cholinergic synaptic function by carnitine in aging rats". *J. Neurosci. Res.*, **66**: 266-271.

Arduini A., Denisova N., Birmani M.A., Avrova N., Federici G. and Arrigoni-Martelli E. (1994). "Evidence for the involvement of carnitine-dependent long-chain acyltransferases in neuronal triacylglycerol and phospholipid fatty acid turnover". *J. Neurochem.*, **62**: 1530-1538.

Bagnoli P., Brunelli M. and Magni F. (1973) "Afferent connections to the fast conduction pathway in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*". *Arch. Ital. Biol.*, **111**: 58-75.

Bagnoli P., Brunelli M., Magni F. and Pellegrino M. (1975) "The neuron of the fast conducting system in *Hirudo medicinalis*: identification and synaptic connections with primary afferent neurons". *Arch. Ital. Biol.*, **113**: 21-43.

Barnes C.A., Markowska A.L., Ingram D.K., Kametani H.M., Spangler E.L., Lemken V.J. and Olton D.S. (1990) "Acetyl-L-carnitine: effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes". *Neurobiol. Aging*, **11**: 499-506.

Baylor D.A. and Nicholls J.G. (1969a) "Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurons in the central nervous system of the leech". *J. Physiol.*, **203**: 591-609.

Baylor D.A. and Nicholls J.G. (1969b) "After effects of nerve impulse on signaling in the central nervous system of the leech". *J. Physiol.*, **203**: 571-589.

Belardetti F., Biondi C., Colombaioni L., Brunelli M. and Trevisani A. (1982) "Role of serotonin and cAMP on facilitation of the fast conducting system activity in the leech *Hirudo medicinalis*". *Brain Res.*, **288**: 95-104.

Belardetti F., Brunelli M., Demontis G.C. and Sonetti D. (1984) "Serotonin and Retzius cell depress the hyperpolarization following impulses of the leech touch cell". *Brain Res.*, **300**: 91-102.

Boulis N.M. and Sahley C.L. (1988) "Behavioral analysis of habituation and sensitization of shortening in the semi-intact leech". *J. Neurosci.*, **8**: 4621-4627.

Braha O., Dale N., Hochner B., Klein M., Abrams T.W. and Kandel E.R. (1990) "Second messengers involved in the two process of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2040-2044.

Bresolin N., Freddo L., Vergani L. and Angelini C., (1982) "Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function". *Exp. Neurol*, **78**: 285-292.

Brodfehrer P.D. and Friesen W.O. (1986c) "Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. II. Role of segmental swim-initiating interneurons". *J. Comp. Physiol. (A)*, **159**: 503-510.

Brodfehrer P.D. and Friesen W.O. (1986d) "Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. III. Sensory input to Tr1 and Tr2". *J. Comp. Physiol. (A)*, **159**: 511-519.

Brodfehrer P.D. and Thorogood M.S.E. (2001) "Identified neurons and leech swimming behavior". *Progr. Neurobiol.*, **63**: 371-381.

Brunelli M., Castellucci V.F. and Kandel E.R. (1976) "Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: a possible role of serotonin and cAMP". *Science*, **1974**: 1178-1181.

Brunelli M., Catarsi S., Garcia-Gil M., Scuri R. and Traina G. (1993) "Recenti acquisizioni sui meccanismi cellulari e molecolari dei processi di apprendimento". In "Apprendimento e memoria", Ed. Giuditta, Pythagora press, Milano

Burrell B.D. and Sahley C.L. (2005). "Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability". *J. Neurophysiol.*, **94**: 4002-4010.

Byrne J.H. and Kandel E.R. (1996) "Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence". *J. Neurosci.*, **16**: 425-435.

Caprioli A., Markowska A.L. and Olton D.S. (1995) "Acetyl-L-carnitine: chronic treatment improves spatial acquisition in a new environment in aged rats". *J. Gerontol.*, **50**: B232-B236.

Carew T.J., Castellucci V.F. and Kandel E.R. (1971) "An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*". *Int. J. Neurosci.*, **2**: 79-98.

Castellucci V.F. and Kandel E.R. (1974) "A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*". *Int. J. Neurosci.*, **77**: 7492-7496.

Castellucci V.F., Pinsker H.M., Kupfermann I. and Kandel E.R. (1970) "neural mechanism of habituation and dishabituation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*". *Science*, **167**: 1745-1748.

Catarsi S. and Brunelli M. (1991) "Serotonin depresses the after-hyperpolarization through the inhibition of the Na^+/K^+ electrogenic pump in the sensory neurones of the leech". *J. Exp. Biol.*, **155**: 261-273

Catarsi S., Garcia-Gil M., Traina G. and Brunelli M. (1990) "Seasonal variations of serotonin content and non-associative learning of swim induction in the leech *hirudo medicinalis*". *J. Comp. Physiol. (A)*, **167**: 469-474.

Catarsi S., Scuri R. and Brunelli M. (1993) "Cyclic AMP mediates inhibition of the Na^+/K^+ electrogenic pump by serotonin in tactile sensory neurons of the leech". *J. Physiol.*, **462**: 229-242.

Chiechio S., Caricasole A., Barletta E., Storto M., Catania M.V., Copani A., Verthechy M., Nicolai R., Calvani M., melchiorri D. and Nicoletti F. (2002). "L-Acetylcarnitine induces analgesia by selectively up-regulation mGLU2 metabotropic glutamate receptors". *Mol. Pharmacol.*, **61**: 989-996.

Curti D., Dagani F., Galmozzi M.R. and Marzatico F. (1989) "Effects of aging and Acetyl-L-Carnitine on energetic and cholinergic metabolism in rat brain regions". *Mech. Ageing Dev.*, **47**: 39-45.

Debski E.A. and Friesen W.O. (1987) "Intracellular stimulation of sensory cells elicits swimming activity in the medicinal leech". *J. Comp. Physiol. (A)*, **160**: 447-457.

Edwards Y.H., Chase J.F.A. and Edwards M.R. (1974) "Carnitine acetyltransferase: the question of multiple forms". *Eur. J. Biochem.*, **46**: 209-215.

Ehrlich J.S., Boulis N.M., Karrer T. and Sahley C.L. (1992) "Differential effects of serotonin depletion on sensitization and dishabituation in the leech, *Hirudo medicinalis*". *J. Neurobiol.*, **23**: 270-279.

Fox L.E. and Lloyd P.E. (2002) "Mechanisms involved in persistent facilitation of neuromuscular synapses in *Aplysia*". *J. Neurophysiol.*, **87**: 2018-2030.

Friesen W.O. (1989a) "Neuronal control of leech swimming movements. I. Inhibitory interactions between motor neurons". *J. Comp. Physiol. (A)*, **166**: 195-203.

Friesen W.O. (1989b) "Neuronal control of leech swimming movements. II. Motor neuron feedback to oscillator cells 115 and 28". *J. Comp. Physiol. (A)*, **166**: 205-215.

Friesen W.O. and Cang J (2001) "Sensory and central mechanisms control intersegmental coordination". *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**: 678-683.

Gadaleta M.N., Petruzzella V., Renis M., Fracasso F. and Cantatore P. (1990) "Reduced transcription of mitochondrial DNA in the senescent rat: tissue dependence and effect of acetyl-L-carnitine". *Eur. J. Biochem.*, **187**: 501-506.

Groves P.M., Lee D. and Thompson R.F. (1969) "Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat". *Physiol. Behav.*, **4**: 383-388.

Groves P.M. and Thompson R.F. (1970) "Habituation: a dual process theory". *Psych. Rev.*, **77**: 419-450.

Hagen T.M, Wehr C.M. and Ames B.N. (1998) "Mitochondrial decay in ageing. Reversal through supplementatio of acetyl-L-carnitine and N-tetri-butyl-alpha-phenyl-nitron". *Ann. NY Acad. Sci.*, **854**: 214-223

Hinerfeld D., Traini M.D., Weinberger R.P., Cochran B., Doctrow S.R., Harry J. and Melov S. (2004) "Endogenous mitochondrial oxidative stress:

neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice”. *J. Neurochem.*, **88**: 657-667.

Imperato A., Ramacci M.T. and Angelucci L. (1989) “Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats”. *Neurosci. Lett.*, **107**: 251-255.

Indiveri C., Tonazzi A. and Calmieri F. (1994) “The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of other mitochondrial translocators”. *Biochem. Biophys. Acta*, **1189**: 65-73.

Jansen J.K.S. and Nicholls J.G. (1973) “Conductance changes, an electrogenic pump and the hyperpolarization of the leech neurons following impulses”. *J. Physiol.*, **229**: 635-655.

Kandel E.R. (1994) “I meccanismi cellulari dell'apprendimento e le basi biologiche dell'individualità”. In “Principi di neuroscienze”, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., II ed., Casa Editrice Ambrosiana (Milano), pp. 1035-1059.

Kandel E.R., Brunelli M., Byrne J. and Castellucci V.F. (1976) “A common presynaptic locus for the synaptic changes underlying short-term habituation and sensitization of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*”. In *Cold Spring harbour Laboratory Symposia on Quantal Biology*, vol. XL.

Kandel E.R. and Schwartz J.H. (1982) “Molecular biology of learning: modulation of transmitter release”. *Science*, **218**: 433-443.

Kaur J., Sharma D. and Singh R. (2001) “Acetyl-L-carnitine enhances Na⁺/K⁺-ATPase glutathione-S-transferase and multiple unit activity and reduces lipid peroxidation and lipofuscin concentration in aged rat brain regions”. *Neurosci. Lett.*, **301**: 1-4.

Kerkut G.A. and Thomas R.C. (1965) "An eletrogenic sodium pump in snail nerve cells". *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**: 167-183.

Kim C.S., Roe C.R. and Ambrose W.W. (1990) "L-Carnitine prevents mitochondrial damage induced by octanoic acid in the rat choroids plexus". *Brain Res.*, **536**: 335-338

Kristan W.B. Jr (1982) "Sensory and motor neurons responsible for the local bending response in leeches". *J.Exp.Biol.*, **96**: 161-180.

Kristan W.B. Jr (1983) "The neurobiology of swimming in the leech". *Trends Neurosci.*, **6**: 84-88.

Leake L.D. and Koubanakis M. (1995) "Central and peripheral 5-HT receptors in the leech *Hirudo medicinalis* redefined". *Gen. Pharmacol.*, **26**: 1709-1717.

Lent C.M. and Dickinson M.H. (1984) "Retzius cells retain functional membrane properties following 'ablation' by the neurotoxin 5,7-DHT". *Brain Res.*, **300**: 167-171.

Lent C.M., Zundel D., Freedman E. and Groome J.R. (1991) "Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects". *J. Comp. Physiol. (A)*, **168**: 191-200.

Liu J., Head E., Kukuratsune H., Cotman C.W. and Ames B. (2004) "Comparison of the Effects of L-Carnitine and Acetyl-L-Carnitine on Carnitine Levels, Ambulatory Activity, and Oxidative Stress Biomarkers in the Brain of Old Rats". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1033**: 117-131.

Lockery S.R. and Kristan W.B. Jr (1985). "Neural correlates of habituation and sensitization in the leech". *Soc. Neurosci. Abstr.*, **11**: 794.

Lockery S.R. and Kristan W.B. Jr (1986) "Neural correlates of habituation and sensitization of local bending in the leech". *Soc. Neurosci. Abstr.*, **12**: 40.

Lockery S.R. and Kristan W.B. Jr. (1990) "Distributed processing of sensory information in the leech. I. Input-output of the local bending reflex". *J. Neurosci.*, **10**: 1811-1815.

Lockery S.R. and Kristan W.B. Jr. (1991) "Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech". *J. Comp. Physiol. (A)*, **168**: 165-177.

Lockery S.R., Rawlins J.N. and Gray J.A. (1985) "Habituation of the shortening reflex in the medicinal leech". *Behav. Neurosci.*, **99**: 333-341.

Lockery S.R. and Sejnowski T.J. (1992) "Distributed processing of sensory information in the leech. III. A dynamical neural network model of the local bending reflex". *J. Neurosci.*, **12**: 3877-3895.

Lombardo P., Scuri R. and Brunelli M. (2003) "Effects of acetyl-L-carnitine on sensory neurons of the leech *Hirudo medicinalis*". *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.*, **445**: R60.

Lombardo P., Scuri R., Cataldo E., Calvani M., Nicolai R., Mosconi L. and Brunelli M. (2004) "Acetyl-L-carnitine induces a sustained potentiation of the afterhyperpolarization". *Neuroscience*, **128**: 293-303.

Lombardo P., Scuri R., Cataldo E., Ristori C. and Brunelli M. (2006) "The inhibition of the Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in leech T sensory neurons". *Submitted to Eur. J. Neurosci.*

Lorenzon N.M. and Foehring R.C. (1992) "Relationship between repetitive firing and afterhyperpolarization in human neocortical neurons". *J. Neurophysiol.*, **67**: 350-363.

Mackey S., Kandel E.R. and Hawkins R.D. (1989) "Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons". *J. Neurosci.*, **9**: 4227-4235.

Magni F. and Pellegrino M. (1978) "Patterns of activity and effect of activation of the fast conduction system on the behaviour of the medicinal leech". *J. Exp. Physiol.*, **76**: 123-125.

Marcus E.A., Nolen T.G., Rankin C.H. and Carew T.J. (1988) "Behavioral dissociation of dishabituation, sensitization and inhibition of *Aplysia*". *Science Wash. DC*, **241**: 210-213.

Mauelshagen J., Sherff C.M. and Carew T.J. (1998) "Differential induction of long-term synaptic facilitation by spaced and massed applications of serotonin at sensory neuron synapses of *Aplysia californica*". *Learn & Mem.*, **5**: 246-256.

Mazzio E., Yoon K.J. and Soliman K.F.A. (2003) "Acetyl-L-Carnitine cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in neuroblastoma cells" *Biochem. Pharmacol.*, **66**: 297-306.

Minana M.D., Hermenegildo C., Llansola M., Montoliu C., Grisolia S. and Felino V. (1996) "Carnitine and coline derivatives containing a trimethylamine group prevent ammonia toxicity in mice and glutamate toxicity in primary cultures of neurons" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**: 194-199.

Muller K.J. and McMahan V.J. (1976) "The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase". *Proc. Royal Soc. B*, **194**: 481-499.

Muller K.J., Nicholls J.G. and Stent G.S. (1981) "Neurobiology of the leech". *Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory*.

Nakajima S. and Takahashi K. (1966) "Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na^+ -pump in stretch receptor neuron of crayfish". *J. Physiol.*, **187**: 105-127.

Nicholls J.G. and Baylor D.A. (1968) "Specific modulation and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech". *J. Neurophysiol.*, **31**: 740-756.

Nusbaum M.P. and Kristan WB Jr (1986) "Swim initiation in the leech by serotonin containing neurones, cells 21 and 61". *J. Exp. Biol.*, **122**: 277-302.

Pineda J.C., Galarraga E., Bargas J., Cristancho M. and Aceves J. (1992) "Caribdotoxin and apamine sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons". *J. Neurophysiol.*, **68**: 287-294.

Sah P. and McLachlan E.M. (1992) "Potassium current contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons". *J. Neurophysiol.*, **68**: 1834-1841.

Sahley C.L.(1995) “What we have learned from the study of learning in the leech”. *J. Neurobiol.*, **27**: 434-445.

Sawyer R.T. (1986) “Leech biology and behaviour”. In: *Oxford Science Publications-Clarendon Press, Oxford, Vol.I.*

Scuri R., Mozzachiodi R. and Brunelli M. (2002) “ Activity-dependent increase of the AHP amplitude in T sensory neurons of the leech” *J. Neurophysiol.*, **88**: 2490-2495.

Scuri R., Mozzachiodi R. and Brunelli M. (2005) “Role for calcium signalling and arachidonic acid metabolites in the activity-dependent increase of AHP amplitude in leech T sensory neurons”. *J. Neurophysiol.*, **94**: 1066-1073.

Scuri R., Zaccardi M.L., Mozzachiodi R. and Brunelli M. (1998) “Molecular pathways underlying non associative learning in the leech”. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, Suppl. 1: 262.

Shaw B. and Kristan W.B. Jr. (1999) “Relative roles of the S-cell network and parallel interneuronal pathways in the whole-body shortening reflex of the medicinal leech”. *J. Neurophysiol.*, **82**: 1114-1123.

Shug A.L., Schmidt M.J., Golden G.T. and Fariello R.G. (1982) “The distribution and role of carnitine in the mammalian brain. *Life Sci.*, **31**: 2869-2874.

Shuster M.J., Camardo J.S., Siegelbaum S. and Kandel E.R. (1985) “Cyclic cAMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K⁺ channels in Aplysia sensory neurons”. *Nature*, **299**: 413-417.

Steffen V., Santiago M., De La Cruz C.P., Revilla E., Machado A. and Cano J. (1995) “Effects of intraventricular injection of 1-methyl-4-phenilpyridinium: protection by Acetyl-L-Carnitine”. *Hum. Exp. Toxicol.*, **14**: 865-871.

Stent G.S. and Kristan W.R. (1981) "Neuronal circuits generating rhythmic movement". In : "Neurobiology of the leech", *Cold Spring Harbour laboratory*, pp. 113-146.

Storm J.F. (1989) "An afterhyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells" . *J. Physiol.*, **409**: 171-190.

Stuart A.E. (1970) "Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech". *J. Neurophysiol.*, **72**: 1240-1259.

Sugita S., Baxter D.A. and Byrne J.H. (1994) "Activators of protein Kinase C mimic serotonin-induced modulation of a voltage dependent potassium current in pleural sensory neurons of *Aplysia*". *J. Physiol.*, **72**: 1240-1259.

Sutton M.A. and Carew T.J. (2000) "Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*". *Neuron*, **26**: 219-231.

Tagliatela G., Caprioli A., Giuliani A. and Ghirardi O. (1996) "Spatial memory and NGF levels in aged rats: natural variability and effects of acetyl-L-carnitine treatment". *Exp. Gerontol.*, **31**: 577-587.

Tanaka Y. and Ando S. (1990) "Synaptic ageing as revealed by changes in membrane potential and decreased activity of Na⁺,K⁺-ATPase". *Brain Res.*, **506**: 46-52.

Tancredi V., Lo Giudice P., D'Arcangelo G., Siniscalchi A., Pacifici L. and Ramacci M.T. (1992) "Acetyl-L-carnitine effects synaptic transmission in aged rats". *22nd annual Meeting of the society for Neuroscience*, Anaheim, California, USA, October 25-30, *Soc. Neurosci. Abstr.*, **18**: 639.

Thorogood M.S. and Brodfuehrer P.D: (1995) "The role of glutamate in swim initiation in the medicinal leech". *Invertebrate Neuroscience*, **1**: 223-233.

Traina G., Bernardi R., Rizzo M., Calvani M., Durante M. and Brunelli M. (2006) "Acetyl-L-carnitine up-regulates expression of voltage-dependent anion channel in the rat brain". *Neurochem. Internat.*, **48**: 673-678.

Traina G., Valleggi S., Bernardi R., Rizzo M., Calvani M., Nicolai R., Mosconi L., Durante M. and Brunelli M. (2004). "Identification of differentially expressed genes induced in the rat brain by acetyl-L-carnitine as evidenced by suppression subtractive hybridization". *Mol. Brain Res.*, **132**: 57-63.

Van Essen D.C. (1973) "The contribution of membrane hyperpolarization to adaption and conduction block in sensory neurons of the leech". *J. Physiol.*, **230**: 509-534.

Weeks J.C. and Kristan W.B., Jr (1978) "Initiation, maintenance and modulation of swimming in the medicinal leech by the activity of a single neuron". *J. Exp. Biol.*, **77**: 71-88.

White H.L. and Scates P.W. (1990) "Acetyl-L-carnitine as a precursor of acetylcholine". *Neurochem. Res.*, **15**: 597-601.

Willard A.L. (1981) "Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming in the medicinal leech". *J. Neurosci.*, **1**: 936-944.

Yasui F., Matsugo S., Ishibashi M., Kajita T., Ezashi Y., Oomura Y., Kojo S. and Sasaki K. (2002) "Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice". *Neurosci. Lett.*, **334**: 177-180.

Yau K.W. (1976) "Receptive fields and conduction block of sensory neurons in the central nervous system of the leech". *J. Physiol.*, **263**: 513-538.

Zaccardi M.L., Traina G., Cataldo E. and Brunelli M. (2001) “Nonassociative learning in the leech *Hirudo medicinalis*”. *Behav. Brain Res.*, **126**: 81-92.

Zaccardi M.L., Traina G., Cataldo E. and Brunelli M. (2004) “Sensitization and dishabituation of swim induction in the leech *Hirudo medicinalis*: role of serotonin and cyclic AMP”. *Behav. Brain Res.*, **153**: 317-326.

Zammit V.A. (1999) “Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology”. *Prog. Lipid Res.*, **38**:199-224.

Zbigniew B. and Ashraf V. (2003) “The Mitochondriotropic Effects of L-carnitine and its Esters in the Central Nervous System”. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, **3**: 275-282.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Direzione Scientifica della SIGMA-TAU (Roma, Italia) per l'apporto tecnico-scientifico che ha reso possibile la realizzazione di questa tesi sperimentale.