



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
"Farmacologia e Tossicologia"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Moroni Flavio

NUOVI BERSAGLI FARMACOLOGICI PER LA
NEUROPROTEZIONE ISCHEMICA DA IPOTERMIA IN
UN MODELLO MURINO DI ISCHEMIA CEREBRALE

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

Dottorando

Dott. Muzzi Mirko

Tutore

Prof. Chiarugi Alberto

Anni 2010/2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
- L'ISCHEMIA CELEBRALE.....	8
- FISIOPATOLOGIA DELL'ISCHEMIA CEREBRALE.....	13
IL RUOLO DEL GLUTAMMATO.....	13
L'APOPTOSI NELL' ISCHEMIA CEREBRALE.....	19
LA FLOGOSI POST-ISCHEMICA.....	21
- STRATEGIE NEUROPROTETTIVE.....	23
TERAPIA TROMBOLITICA ED ALTRI PRESIDI.....	23
L'IPOTERMIA.....	24
- TRIALS CLINICI DI IPOTERMIA TERAPEUTICA.....	30
- SISTEMA PURINERGICO E TERMOREGOLAZIONE.....	32

- RECETTORI TRPV1 E TERMOREGOLAZIONE....34

2. SCOPO DELLA RICERCA.....36

3. MATERIALI E METODI 39

- MATERIALI.....40

- PROTOCOLLO DEI TRATTAMENTI.....40

- ISCHEMIA CELEBRALE

FOCALE.....40

- MONITORAGGIO DEL FLUSSO EMATICO

CEREBRALE.....42

- VALUTAZIONE DEL DANNO IN ISCHEMIA

FOCALE.....43

- REGISTRAZIONI A SINGOLA UNITA' DI

ATTIVITA' SPONTANEA DA NEURONI DI

IPOTALAMO ANTERIORE.....	44
- REGISTRAZIONI DEL POTENZIALE DI CAMPO ECCITATORIO POST-SINAPTICO	
IPPOCAMPALE.....	45
- EMOGASANALISI.....	46
- VALUTAZIONE DELLA PRESSIONE SANGUINEA.....	46
- VALUTAZIONE DEL CONSUMO DI OSSIGENO.....	46
- PCR.....	46
- ANALISI DELL'ATTIVITA' DELLA 5'- NUCLEOTIDASI.....	47
- WESTERN BLOTTING.....	48
- ANALISI STATISTICA DEI	

DATI.....	48
-----------	----

4. RISULTATI49

PARTE 1: NEUROPROTEZIONE ISCHEMICA DA

IPOTERMIA INDOTTA DALLA STIMOLAZIONE DEI

RECETTORI TRPV1.....50

- EFFETTO DEL RINVANIL SULLA REGOLAZIONE DELLA

TEMPERATURA CORPOREA.....50

- EFFETTO DEL RINVANIL NEL DANNO DA ISCHEMIA-

RIPERFUSIONE CEREBRALE.....54

PARTE 2: REGOLAZIONE DELLA

TERMOREGOLAZIONE DA AMP ED EFFETTO

NEUROPROTETTIVO DA IPOTERMIA.....60

- AMP INDUCE IPOTERMIA ATTIVANDO I RECETTORI A1

IPOTALAMICI.....	60
- AMP DIMINUISCE L'ATTIVITÀ SINAPTICA ECCITATORIA IN MODO A1R DIPENDENTE.....	71
- AMP RIDUCE L'ATTIVITÀ DI FIRING SPONTANEO NEI NEURONI IPOTALAMICI.....	75
- L' IPOTERMIA INDOTTA DA AMP RIDUCE IL DANNO DA ISCHEMIA CEREBRALE E LA FEBBRE.....	81
5. DISCUSSIONE.....	88
6. BIBLIOGRAFIA.....	95
7. PRODUZIONE SCIENTIFICA.....	110

1. INTRODUZIONE

L'ISCHEMIA CEREBRALE

L'Ischemia (o ictus) Cerebrale è definita dall'OMS come "una sindrome clinica a rapida comparsa caratterizzata da un deficit neurologico, focale o globale, di durata superiore a 24 ore". L'Ictus rappresenta la seconda causa di morte nei paesi occidentali e una delle prime cause di disabilità nell'adulto.

Circa il 35 % dei pazienti con ictus presenta una grave invalidità residua nello svolgimento delle funzioni quotidiane e, soltanto negli Stati Uniti, circa 4 milioni di persone convivono con le sue debilitanti conseguenze. Tale sindrome colpisce quasi esclusivamente l'età avanzata, tanto che, almeno nella popolazione di razza bianca, tre quarti di tutti gli ictus interessano soggetti di età superiore ai 65 anni. L'incidenza è approssimativamente intorno ai 250-400 casi ogni 100.000 abitanti, e standardizzata per età e sesso, varia di poco nelle diverse aree geografiche, pur apparendo più bassa in alcune regioni della Francia e più alta in Siberia. Ogni anno in Italia sono attesi 130.000 nuovi casi d'ictus, 180.000 se si considerano anche le recidive; la prevalenza si aggira intorno agli 800.000 casi.

La mortalità da ictus, nei paesi occidentali, si colloca intorno al 15%, stime approssimate alla media europea, e varia enormemente tra i diversi paesi nei quali è possibile il rilevamento dei dati; due terzi delle morti da ictus cerebrale si verificano nei paesi meno sviluppati. Dai primi anni '90, la mortalità è in riduzione nell'Europa Occidentale, negli Stati Uniti, in Australia e in Giappone, ma rimane alta nell'America Meridionale e continua ad aumentare nei paesi dell'Europa dell'Est e nelle repubbliche dell'ex-Unione Sovietica. Si calcola che nel 2020, la mortalità per stroke sarà quasi raddoppiata, principalmente per un aumento dell'età media, ma anche per la crescente abitudine al fumo nei paesi meno sviluppati (Warlow et al. 2003).

L'età è il maggiore fattore di rischio per l'ictus. L'incidenza d'ictus aumenta con l'età e, a partire dai 55 anni, raddoppia per ogni decade.

Tra i fattori di rischio modificabili e ben documentati ritroviamo il diabete mellito, il fumo di sigaretta, l'iperomocisteinemia, l'ipertensione arteriosa, l'ipertrofia ventricolare sinistra, alcune cardiopatie (in particolare,

fibrillazione striale) e la stenosi carotidea. L'ipercolesterolemia è da considerare il più importante fattore di rischio per la malattia coronaria, mentre l'associazione con l'ictus resta non del tutto chiarita. E' possibile che sia ereditata una predisposizione a essere colpiti da ictus, ma il ruolo dei fattori genetici nella determinazione del rischio d'ictus non è tuttora definito. Il rischio di morte per ictus aumenta all'aumentare del numero dei fattori, anche quando il rischio attribuibile a ciascuno di essi sia limitato.

Due sono le tipologie di Ictus cerebrale: l'**Ictus Ischemico** (circa 80% dei casi) e l'**Ictus Emorragico** (circa 20% dei casi) (Warlow et al. 2003).

L'Ictus Emorragico è il risultato di un'emorragia intracerebrale o di un'emorragia subaracnoidea. Nel primo caso è solitamente legato alla rottura spontanea di una delle piccole arterie penetranti nella profondità degli emisferi cerebrali. Le sedi più comuni di tale lesione sono i gangli della base, gli emisferi cerebellari e il ponte. Nel secondo caso l'emorragia è associata alla rottura di un aneurisma sacculare con sede a livello di una delle arterie del poligono di Willis. Il deficit neurologico che ne consegue è legato alla perdita di parenchima cerebrale, nonché alla deformazione e alla compressione del tessuto sano adiacente alla raccolta emorragica. In entrambi i casi, l'ipertensione arteriosa gioca un ruolo essenziale perché da un lato induce alterazioni a carico delle pareti di tali vasi, rendendoli più vulnerabili ai danni indotti dall'ipertensione stessa, e dall'altro favorisce la rottura delle formazioni aneurismatiche.

L'Ictus Ischemico, al contrario, è associato a un quadro d'ischemia cerebrale, vale a dire una riduzione del flusso ematico in una regione più o meno ampia di parenchima cerebrale con successivo danno neuronale se le anomalie della perfusione persistono per alcuni minuti. E' causato, nel 50% dei casi, dalla presenza di lesioni aterotrombotiche a carico delle arterie extracraniche o intracraniche. Di solito l'aterosclerosi raggiunge la massima gravità alla biforcazione delle arterie e comunemente interessa l'origine dell'arteria carotide interna nel collo e l'origine dei rami arteriosi maggiori e minori all'interno del cranio. Le lesioni aterosclerotiche inducono una stenosi del lume arterioso che produce un'ostruzione emodinamica al flusso; se tale diminuzione localizzata del flusso ematico scende al di sotto di un livello critico, si verificherà un evento ischemico

transitorio o permanente. Quando una placca aterosclerotica parietale si ulcera, il materiale necrotico può dislocarsi e generare emboli responsabili di occlusione a livello distale. Circa il 20% degli ictus ischemici è il risultato di emboli di origine cardiaca che provocano occlusione di una delle principali arterie cerebrali; il 25% è rappresentato dai cosiddetti infarti lacunari legati all'occlusione di una o più tra le piccole arterie perforanti cerebrali. I restanti casi sono associati ad altre condizioni patologiche come vasculiti, dissezioni arteriose, infezioni pericraniche, neoplasie sistemiche. Tali percentuali sono comunque approssimative perché, soprattutto in persone anziane, possono concorrere più cause (es. la coesistenza di fibrillazione atriale e stenosi della carotide) o può essere difficile individuare una causa anche dopo approfondite indagini (Warlow et al. 2003).

L'Ictus ischemico, da un punto di vista clinico, evolve tipicamente fino a raggiungere la massima gravità nell'arco di poche ore. Spesso l'infarto è preannunciato da uno o più TIA nei giorni, nelle settimane o nei mesi precedenti; il TIA (Attacco Ischemico Transitorio) è definito come un deficit neurologico focale, attribuibile a insufficiente apporto di sangue, che dura meno di 24 ore (di solito da 5 a 20 minuti), caratterizzato da sintomi e/o segni a rapida insorgenza.

I sintomi e i segni di un ictus ischemico variano a seconda della localizzazione dell'occlusione e del grado di risparmio del circolo collaterale; la presentazione tipica è l'esordio acuto di un'emiparesi in un individuo che per età rientra nel gruppo di coloro che sono affetti da aterosclerosi, anche se teoricamente si può manifestare qualsiasi sintomo di disfunzione cerebrale. Gli ictus di origine trombotica spesso esordiscono con sintomi a intermittenza, fluttuanti, che peggiorano nell'arco di alcuni minuti o ore; gli ictus di origine embolica di solito esordiscono con un deficit neurologico che si presenta con il massimo della gravità sin dall'inizio.

Studi sperimentali sull'ischemia cerebrale focale suggeriscono che vi sia un'area centrale di grave ischemia, il "**core**" ischemico dove il flusso ematico è ridotto a meno del 15-20% rispetto ai valori normali, circondata da una zona di ridotta perfusione, la "**penombra ischemica**" dove al contrario il flusso è compreso tra il 15 e il 40% rispetto ai valori

normali e nella quale le cellule rimangono vitali per alcune ore (Fig.1.1). All'interno del "core" ischemico il mancato apporto di glucosio e ossigeno conduce a una rapida deplezione delle riserve energetiche e, infine, alla morte cellulare. La "penombra" ischemica presenta al contrario un metabolismo residuo ma può, con il passare del tempo o in assenza di trattamento, andare incontro a un danno irreversibile, a causa di eventi come l'eccitotossicità, le depolarizzazioni intrainchemiche, l'infiammazione post-ischemica e l'apoptosi o morte cellulare programmata.

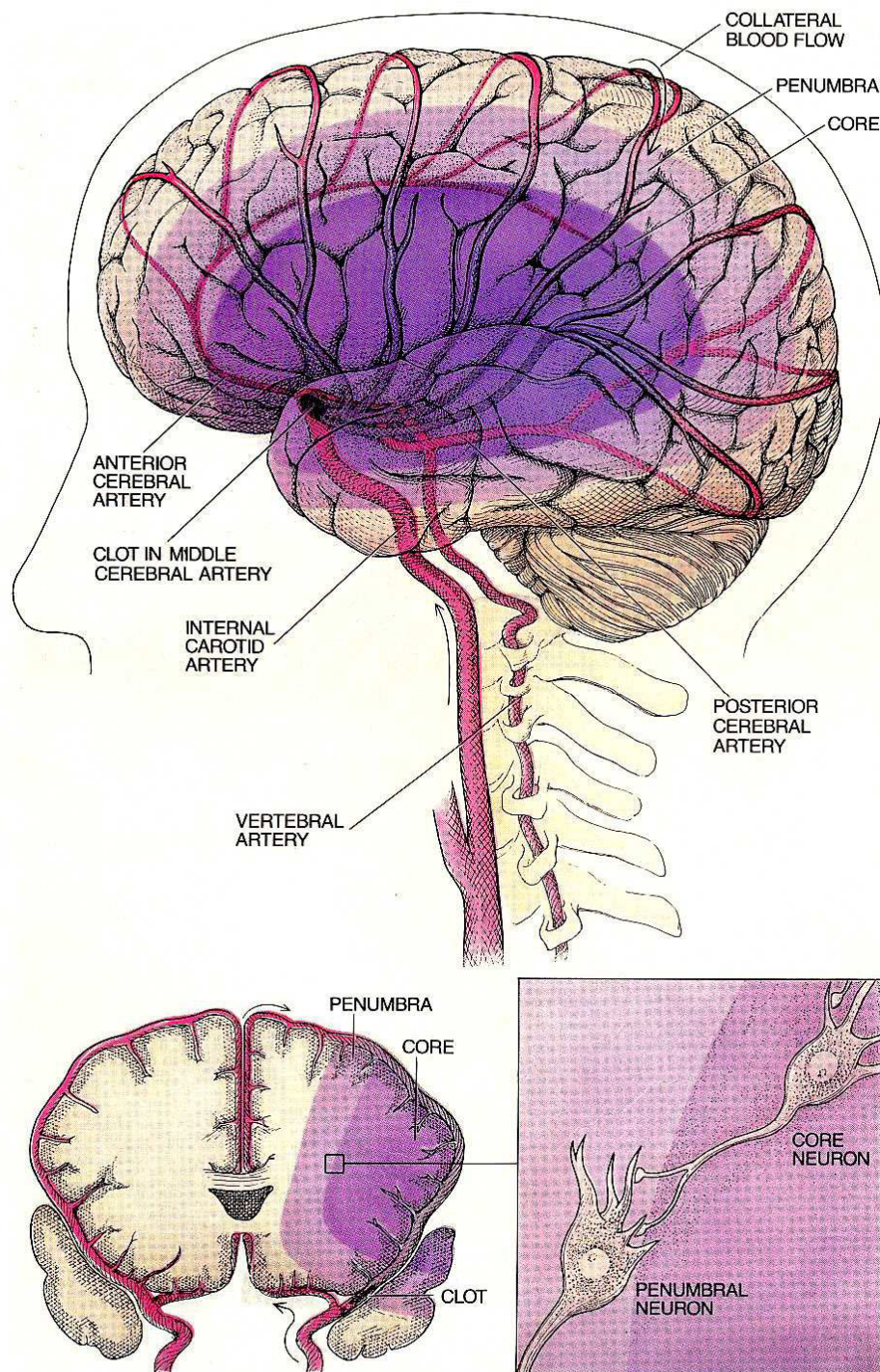


Figura 1.1. Il core e la penombra ischemica

FISIOPATOLOGIA DELL'ISCHEMIA CEREBRALE

L'ischemia cerebrale è il risultato di una complessa sequenza di eventi fisiopatologici che evolvono nel tempo e nello spazio e che concorrono, in misura maggiore o minore, al danno neuronale.

I principali meccanismi di tale cascata, come già accennato, sono l'eccitotossicità, le depolarizzazioni intraischemiche, la morte cellulare programmata e la flogosi post-ischemica.

Il ruolo del glutammato

La caduta dei livelli di ATP intracellulari, la perdita dei gradienti ionici di membrana e la massiccia liberazione di glutammato (Glu) nello spazio extracellulare sono le più immediate conseguenze dell'ischemia cerebrale. L'origine delle alte concentrazioni di Glu extracellulari nel corso d'ischemia cerebrale non è certa, ma diverse evidenze sperimentali sembrano convergere sulla calcio-indipendenza di tale release (Pellegrini-Giampietro et al. 1990), e un'ipotesi che ha preso sempre più campo è quella che imputa l'aumento delle concentrazioni extracellulari di Glu indotte da ischemia, a un meccanismo d'inversione del trasportatore del glutammato responsabile della sua ricaptazione a livello presinaptico (Brown and Reymann 1995; Bruno et al. 1995; Gribkoff and Bauman 1992; Siesjo 2001; Swartz et al. 1990).

Le membrane plasmatiche della glia e dei neuroni presentano, infatti, efficaci sistemi di trasporto che trasferiscono il Glu dall'esterno all'interno della cellula, associando al recupero di una molecola di Glu il cotrasporto di due atomi di Na^+ e il cotrasporto di un atomo di K^+ e di uno ione OH^- . I trasportatori sfruttano il gradiente Na^+/K^+ creato dalla pompa Na^+/K^+ -ATPasi di membrana: in condizioni di ipossia-ischemia il livello di ATP diminuisce causando il rallentamento di tale pompa e un progressivo aumento della concentrazione intracellulare dello ione Na^+ (Hansen 1985). Tale modificazione del gradiente ionico transmembranario provoca la depolarizzazione della membrana e quindi la liberazione di Glu Ca^{2+} -dipendente, attraverso la classica via esocitotica. Questo processo

necessita di ATP ed è quindi di breve durata in situazioni di deficit energetico prolungato, quali l'ischemia. In questi casi, l'alta concentrazione di ioni K^+ e la bassa concentrazione di ioni Na^+ a livello extracellulare promuovono l'inversione del trasportatore, con ulteriore rilascio di Glu nello spazio sinaptico (Nicholls and Attwell 1990). In seguito a questi eventi la concentrazione di Glu extracellulare aumenta fino a 50-100 μM , mentre, in condizioni di normalità, la sua concentrazione, negli spazi extracellulari del cervello e nel liquido cefalorachidiano è di 1-5 μM .

Un aumento della concentrazione di Glu nello spazio intersinaptico a questi livelli e la conseguente sostenuta attivazione dei recettori post-sinaptici possono indurre morte neuronale eccitotossica. Il termine eccitotossicità fu coniato da Olney (Olney 1990) per descrivere il danno neuronale che deriva da un'eccessiva stimolazione dei recettori per il Glu. I principali mediatori degli effetti neurotossici dell'aminoacido sono i suoi **recettori ionotropi (iGluRs)**. Essi sono costituiti da 4 o 5 subunità che partecipano alla formazione di un canale ionico transmembranario che si apre in seguito all'interazione con il Glu e risultano classificati in tre sottotipi in base all'agonista selettivo in grado di attivarli e alle differenze in termini di cinetiche di attivazione/inattivazione, permeabilità e conduttanza ionica:

- **recettori per l'acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico (AMPA);**
- **recettori per il kainato (KA);**
- **recettori per l'N-metil-D aspartato (NMDA).**

Fino agli anni '80 si pensava che le azioni del Glu nel SNC fossero mediate esclusivamente dall'attivazione di iGluRs. Nel 1985 si evidenziò che il Glu era in grado di attivare la fosfolipasi C (PLC) in cellule di striato coltivate in vitro e che tale azione era mediata da un tipo di recettore diverso da quelli fino ad allora conosciuti (NMDA, AMPA, kainato) (Sladeczek et al. 1985). Questa osservazione, insieme ai risultati di esperimenti analoghi condotti su altre cellule del SNC (Nicoletti et al. 1986), portarono a formulare l'ipotesi che il Glu potesse agire anche su recettori associati alle proteine G. Questa ipotesi fu poi confermata da

studi su oociti di *Xenopus* (Sugiyama et al. 1987), che portarono a individuare una nuova classe di recettori per il Glu, i **recettori metabotropi (mGluRs)**.

In base 1) ad alcuni tratti comuni della sequenza aminoacidica, 2) al diverso meccanismo di trasduzione del segnale a essi associato e 3) alla loro farmacologia, i diversi sottotipi di mGluRs possono essere suddivisi in 3 gruppi:

mGluRs del gruppo 1: i mGluRs del gruppo 1 sono mGluR1 e mGluR5, e sono associati a proteine Gq, così chiamate perché attivano la fosfolipasi C PLC.

mGluRs del gruppo 2: i mGluRs del gruppo 2 (mGluR2 e mGluR3) sono associati a proteine G inibitrici, così chiamate perché inibiscono gli aumenti di cAMP (Conn and Pin 1997).

mGluRs del gruppo 3: i mGluRs del gruppo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) sono anch'essi associati a proteine G inibitrici.

I mGluRs hanno effetti opposti sulla tossicità da Glu: un effetto potenziante grazie all'attivazione neuronale e al potenziamento dei recettori NMDA mediato dai mGluRs del gruppo 1; ed un effetto protettivo dovuto all'inibizione presinaptica del rilascio di Glu mediato dai mGluRs del gruppo 3 (Bruno et al. 2001). Poiché l'attivazione dei mGluRs del gruppo 1 porta alla mobilizzazione del calcio intracellulare, questi recettori sono stati ampiamente studiati per verificarne il coinvolgimento nei meccanismi patogenetici dell'ischemia cerebrale. Numerose ricerche hanno dimostrato che gli antagonisti dei mGluRs del gruppo 1 sono protettivi in vari modelli di ischemia cerebrale (Bruno et al. 2001; Cozzi et al. 2002; Pellegrini-Giampietro et al. 1999a; Pellegrini-Giampietro et al. 1999b). In particolare, sono i recettori mGlu1 che appaiono maggiormente coinvolti nella neurodegenerazione post-ischemica, come dimostra l'assenza di un effetto protettivo da parte di antagonisti selettivi per mGlu5 (Meli et al. 2002).

In seguito alla stimolazione dei recettori al glutammato, intervengono eventi post-recettoriali che sono direttamente responsabili della morte neuronale. Il Glu, agendo sui recettori NMDA, provoca un aumento

notevole della concentrazione di calcio intracellulare cui contribuiscono anche le condizioni ischemiche stesse che interferiscono con i sistemi atti a sequestrare e legare il Ca^{++} . Tale ione è tamponato mediante gruppi carichi negativamente, in maniera analoga a quanto accade per H^+ , pertanto questi due ioni potrebbero competere per gli stessi tamponi e l'acidosi presente nella zona ischemica, potrebbe contribuire al rilascio di calcio dai suoi siti di legame (Siesjo 1992). Inoltre il lavoro svolto dai trasportatori ATP-dipendenti che pompano il calcio all'esterno della cellula o all'interno del reticolo endoplasmatico, a causa della drastica riduzione dei livelli di ATP nel corso di ischemia, è considerevolmente ridotto, arrivando a compromettere questo meccanismo di omeostasi cellulare. Anche i mitocondri partecipano al mantenimento dei livelli intracellulari di calcio entro limiti fisiologici, ma alterazioni significative di questi equilibri, compromettono anche le concentrazioni di calcio mitocondriali cui segue una modificazione della permeabilità della membrana di tali organuli con liberazione nel citoplasma cellulare di vari componenti tra cui il citocromo C, attivatore delle caspasi (Green and Reed 1998a). L'incremento di calcio porta all'attivazione di enzimi proteolitici responsabili della degradazione del citoscheletro e della matrice, oltre che all'attivazione della fosfolipasi A2 e della cicloossigenasi che contribuiscono a quella che è una delle cause fondamentali di morte in seguito ad un insulto ischemico, cioè la produzione di radicali liberi (Furukawa et al. 1997). Questi si formano in tutte le cellule a seguito di processi aerobi, dal momento che l'ossigeno può andare incontro a reazioni di riduzione molto lente e formare radicali, ovvero molecole contenenti uno o più orbitali con un elettrone spaiato. Tali molecole sono molto reattive e tossiche, pertanto la cellula possiede appropriati sistemi di difesa, enzimatici (come la superossido-dismutasi, la catalasi, la glutatione-perossidasi) e non enzimatici (come certe vitamine e loro analoghi) definiti "Free Radical Scavengers" proprio per questa loro capacità. È stato dimostrato che animali che mancano di questi sistemi di protezione, sono più suscettibili al danno di tipo ischemico (Kondo and Yamanouchi 1997). Molti enzimi che catalizzano reazioni di ossidazione sono capaci di produrre il radicale superossido (O_2^-), direttamente dall' O_2 o per mezzo di ioni metallo che mediano il trasferimento di elettroni fra il substrato e l' O_2 . Il superossido

attraverso una reazione di dismutazione, è trasformato in H_2O_2 : tale molecola, reagendo con la forma ridotta di alcuni ioni metallo, può portare alla formazione di $OH\cdot$, radicale idrossilico estremamente tossico, che reagisce con il DNA, proteine, carboidrati e lipidi di membrana, alterandone la struttura e quindi la funzionalità con conseguenti danni cellulari irreversibili (Fig.1.2).

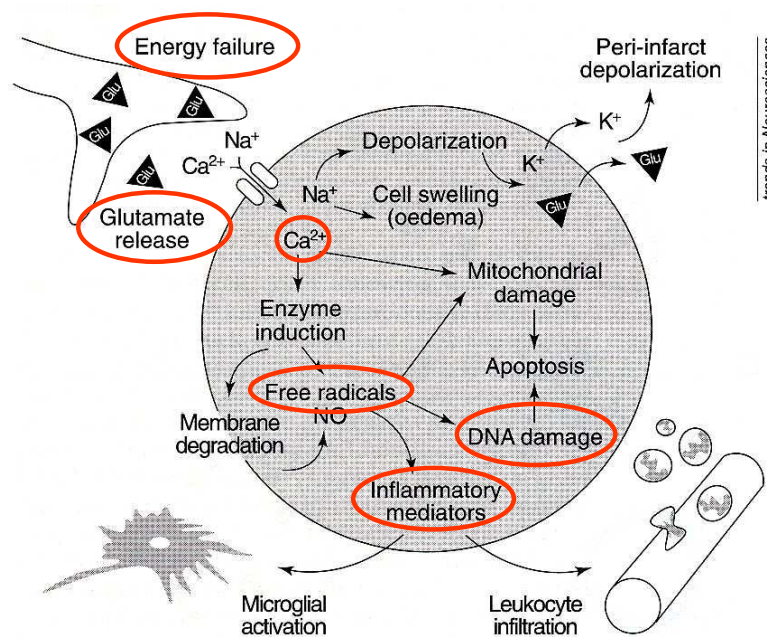


Figura 1.2. Meccanismi responsabili del danno neuronale in corso di ischemia cerebrale.

Un'altra sorgente per la produzione di radicali liberi nel corso del processo ipossico/ischemico è il nitrossido (NO). NO è formato a partire dall'arginina tramite l'enzima nitrossido sintasi (NOS), enzima Ca^{++} dipendente sia costitutivo che inducibile, di cui esistono tre isoforme presenti a livello endoteliale, neuronale e macrofagico (Bredt and Snyder 1994). NO prodotto all'interno dell'endotelio diffonde verso le cellule dello strato muscolare liscio dove induce vasodilatazione attraverso la stimolazione della guanilato ciclasi e successivo miorelaxamento, infatti topolini sprovvisti di eNOS sono ipertesi (Huang 2003). A livello neuronale, il NO svolge un'azione come neurotrasmettitore sempre tramite la guanilato ciclasi, mentre a livello dei macrofagi esso risulta

essere una molecola killer utilizzata dal macrofago per distruggere le cellule tumorali o batteriche.

Anche a livello del sistema nervoso l'NO prodotto dalla forma costitutiva dell'enzima nNOS, può agire come neurotossina: l'incremento di calcio intracellulare che si osserva in seguito ad un evento ischemico causa una prolungata attivazione della nNOS con un aumento nella produzione di NO che risulta essere tossico alterando la funzionalità mitocondriale, modificando la funzionalità di alcuni enzimi e danneggiando la doppia elica del DNA. In particolar modo il danno al DNA può essere indotto attraverso due principali meccanismi: il primo prevede l'ossidazione delle amine primarie e secondarie e le basi degli acidi nucleici, il secondo prevede la reazione dell'NO con lo ione superossido per formare il perossinitrito (OONO^-), che a sua volta si decompone in altre specie radicaliche attive come il radicale ossidrilico. Recenti evidenze suggeriscono comunque che il radicale principale responsabile del danno al DNA è il perossinitrito (Szabo 1996). La formazione di questi radicali liberi è la diretta responsabile del danno al DNA che si ha in corso di ischemia. La produzione di rotture nel DNA originate dall'azione lesiva dei radicali liberi porta all'attivazione della Poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP-1), la cui azione è quella di promuovere la riparazione di tale danno. Infatti, il volume di infarto cerebrale indotto da una ischemia focale sia permanente sia transitoria risulta essere notevolmente ridotto da inibitori PARP-1 e in topi PARP $-/-$. Inoltre in colture corticali murine sempre gli inibitori della PARP-1, come anche gli inibitori della nNOS, sono in grado di diminuire la morte eccitotossica indotta da NMDA, ad ulteriore conferma del collegamento esistente tra stimolazione dei recettori NMDA per il glutammato, produzione di radicali dell'ossigeno ad opera della nitrossido sintetasi, danno al DNA ed attivazione della PARP-1 (Virag and Szabo 2002).

La produzione di radicali liberi comporta altre due conseguenze estremamente importanti nell'evoluzione della lesione ischemica a livello cerebrale: l'innesco del processo apoptotico e la comparsa di una flogosi post-ischemica che contribuisce al danno neuronale secondo diverse modalità.

L'apoptosi nell'ischemia cerebrale

L'apoptosi è un processo coordinato ed attivo che richiede la sintesi e l'attivazione di nuove proteine ed il consumo di energia, tanto da essere definito "morte cellulare programmata". Le principali caratteristiche morfologiche dell'apoptosi comprendono l'integrità delle membrane nucleare e citoplasmatica, la condensazione e la marginazione della cromatina sotto forma di grossi aggregati nucleari, l'estrusione di materiale nucleare e citoplasmatico associato alla membrana (corpo apoptotico) e la progressiva riduzione del volume cellulare (Kerr et al. 1972;Wyllie et al. 1980). Questi eventi, inoltre, interessano generalmente una singola cellula, o comunque un numero molto ristretto di elementi all'interno di un tessuto, ed avvengono spesso in modo spontaneo, cioè senza l'intervento di stimoli esterni. Essa interviene durante la normale embriogenesi nell'eliminazione delle popolazioni cellulari divenute non più necessarie, così come in altri processi fisiologici dell'organismo adulto. Si suppone che il processo apoptotico costituisca la modalità con cui una cellula giunge spontaneamente al termine della propria vita. Tuttavia è stato dimostrato che il processo avviene anche quando il tessuto è sottoposto ad insulti di debole intensità (Steller 1995;Thompson 1995) ed anche in seguito ad ischemia cerebrale (Lee et al. 1999)

I mitocondri e il nucleo rivestono un ruolo centrale nel meccanismo dell'apoptosi: i mitocondri con il loro complesso di proteine proapoptotiche, liberate a seguito dell'insulto ischemico; il nucleo non più visto solo come un bersaglio di tali segnali ma anche come un effettore della morte cellulare programmata in quanto in grado di favorire il rilascio molecole in grado di reclutare gli altri organelli citoplasmatici nel processo di morte cellulare (Lo et al. 2003).

L'attivazione di tale processo dipende dall'intensità dello stimolo, dal tipo di cellula interessata e dallo stadio del ciclo e di sviluppo in cui la cellula si trova. Sembra che la morte apoptotica interessi soprattutto le cellule che si trovano nella penombra ischemica. In tale area la perfusione, anche se estremamente ridotta, è ancora garantita; ciò permette l'afflusso di ossigeno e di glucosio, la conseguente produzione di energia e quindi l'attivazione del processo apoptotico che necessita di energia per

attuarsi.

Sono stati descritti due diversi meccanismi in grado di causare la morte cellulare programmata. Il primo e più conosciuto è mediato dalle caspasi. Le caspasi sono enzimi appartenenti alla famiglia delle cisteina proteasi, che scindono selettivamente le proteine in corrispondenza dei residui aminoacidici di aspartato; esse sono responsabili della proteolisi di alcune importanti proteine durante l'apoptosi (Nicholson and Thornberry 1997). Le caspasi sono presenti nelle cellule in forma cataliticamente inattiva, sottoforma di zimogeni. La loro attivazione è legata alla liberazione del citocromo c da parte dei mitocondri a seguito dell'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale interna ad opera dei radicali liberi. Il citocromo C, in presenza di ATP (Green and Reed 1998b), forma, assieme al fattore attivante l'apoptosi (APAF-1) e alla caspasi 9, un complesso in grado di attivare la caspasi 3, la più abbondante fra le caspasi presenti nell'encefalo. Se attivata, la caspasi 3 è in grado di agire su numerose proteine cellulari portando la cellula a morte. La morte cellulare può essere inibita somministrando inibitori delle caspasi durante o dopo l'occlusione vasale, anche se ciò non si verifica in tutti i modelli di ischemia cerebrale.

La PARP-1 è stato il primo enzima per il quale si sia dimostrato il clivaggio da parte della caspasi-3 nel processo di morte cellulare apoptotica (Kaufmann et al. 1993a; Nicholson et al. 1995; Tewari et al. 1995). Essa risulta inoltre il substrato verso il quale le caspasi, mostrano la maggiore affinità (Kaufmann et al. 1993b). La caspasi-3, che insieme alle caspasi 2, 6, 7, 8 e 10 sembra promuovere il processo apoptotico, inattiva la PARP-1 degradandola in due frammenti: uno carbossi-terminale di 85-89 kDa, che comprende il dominio di automodificazione, il sito di legame per il NAD⁺ e il sito catalitico ed un frammento più piccolo di 24-25 kDa contenente i due motivi *zinc-finger* (Lazebnik et al. 1994). In seguito a tale degradazione, la PARP-1 perderebbe la sua capacità di segnalare un eventuale danno nel patrimonio genetico e di reclutare gli enzimi nel sito danneggiato, rallentando i processi che conducono alla riparazione del DNA. Inoltre, con la perdita dell'attività della PARP-1 si verificherebbe una riduzione della poli(ADP-ribosil)azione delle

endonucleasi Ca^{2+} - e Mg^{2+} - dipendenti e dell'istone H1, necessaria per la soppressione dell'apoptosi (Yoon et al. 1996). Se la poli(ADP-ribosil)azione viene a mancare si ha inoltre l'attivazione delle endonucleasi, che determinano la comparsa di interruzioni nella doppia elica e l'avvio del processo apoptotico.

Il clivaggio della PARP-1 si è dimostrato cruciale per l'apoptosi, perché l'inattivazione dell'enzima sembra necessaria per preservare i substrati energetici destinati agli eventi apoptotici (Earnshaw 1995). I livelli di ATP, infatti, possono modulare i processi di morte cellulare trasformando l'apoptosi in necrosi in presenza di deplezione energetica (Eguchi et al. 1997; Leist et al. 1997). Fino a poco tempo fa, sembrava, quindi che, nel processo apoptotico, la PARP-1 funzionasse unicamente da substrato, subendo la degradazione da parte delle caspasi e portando alla rimozione di un blocco della cascata apoptotica. Recenti ricerche hanno però dimostrato che l'attivazione della PARP-1 porta al rilascio dai mitocondri dell'apoptosis-inducing factor (AIF), una proteina proapoptotica. Si è quindi aperta la strada per una rivalutazione del ruolo "passivo" della PARP-1 nei processi apoptotici (Yu et al. 2002). La morte cellulare mediata da AIF risulterebbe resistente a qualunque trattamento con inibitori delle caspasi e pare possa essere inibita solo impedendo la traslocazione nucleare di tale fattore o la sintesi di PAR (poli-ADP-ribosio).

La flogosi post-ischemica

La flogosi post-ischemica, anch'essa indotta in parte dalla produzione di radicali liberi, sembra avere un ruolo cruciale nell'evoluzione del danno da ischemia. Pochi minuti dopo la comparsa di ischemia, si assiste ad un aumento nell'espressione di numerosi geni proinfiammatori indotta da fattori trascrizionali come NF- κ B (O'Neill and Kaltschmidt 1997), Hypoxia inducible factor (Ruscher et al. 1998), STAT 3 (Planas et al. 1996) e Interferon regulatory factor 1 (Iadecola et al. 1999). Citochine come il PAF (Platelet activating factor), il TNF (tumor necrosis factor) e l'interleuchina 1 sono prodotte dalle cellule lese. Conseguentemente è indotta la sintesi di molecole di adesione a livello vascolare come ICAM 1,

P selectina, E selectina. I neutrofili aderiscono all'endotelio, attraversano la parete vasale e giungono nel parenchima cerebrale; i macrofagi e i monociti seguono i neutrofili e diventano le cellule predominanti dopo 5-7 giorni dall'ischemia (Iadecola et al. 1999). Anche le cellule del parenchima cerebrale sono coinvolte nella risposta flogistica. Le cellule della microglia retraggono i loro processi e assumono un aspetto ameboide che è tipico della microglia attivata e tale reazione è visibile già 24 ore dopo l'ischemia soprattutto nella penombra ischemica. Gli astrociti diventano invece ipertrofici già dopo 4-6 ore dall'ischemia. La flogosi contribuisce al danno neuronale in vari modi. I neutrofili possono causare occlusione a livello del microcircolo aggravando l'ischemia, ma è la produzione di radicali liberi da parte delle cellule infiammatorie ad avere il ruolo più importante secondo meccanismi già presentati in precedenza. Il ruolo della risposta flogistica nel danno da ischemia cerebrale è dimostrato dalla riduzione dell'area ischemica in presenza di neutropenia sistemica, in presenza di molecole o anticorpi in grado di bloccare le molecole di adesione come ICAM 1 (Connolly, Jr. et al. 1996), in presenza di un blocco nell'azione di citochine proinfiammatorie come l'interleuchina 1 (Loddick and Rothwell 1996), in topi che presentano delezioni a carico dei geni che codificano per iNOS, COX2, interleuchina 1, proteina chemiotattica dei monociti (MCP).

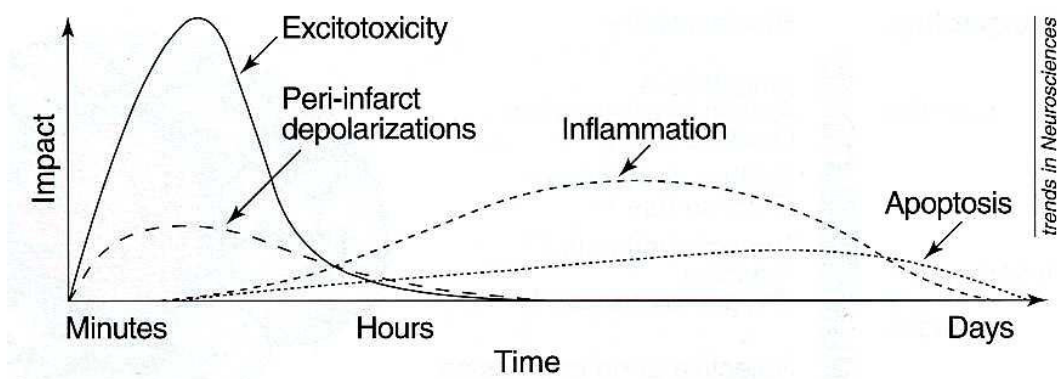


Figura 1.3. Tempistica dei diversi meccanismi coinvolti nella patogenesi del danno neuronale ischemico

STRATEGIE NEUROPROTETTIVE

Terapia trombolitica ed altri presidi

Quando si verifica un infarto cerebrale, l'obiettivo terapeutico più immediato è quello di ripristinare la perfusione cerebrale dell'area ischemica. Attualmente, l'unica terapia rivelatasi efficace in tal senso è la terapia trombolitica il cui ruolo nell'infarto cerebrale non è stato comunque del tutto chiarito. Alcuni trials clinici hanno dimostrato l'efficacia di un **attivatore tissutale ricombinante del plasminogeno** (rt-PA), l'**alteplasi** (0,9 mg/Kg fino ad un massimo di 90 mg, il 10% come bolo e il resto nell'arco di 60 minuti). Il trattamento con quest'agente trombolitico, nonostante aumenti l'incidenza di emorragia cerebrale sintomatica (un soggetto ogni venti trattati) rispetto ai soggetti trattati con placebo, comporta, se somministrato entro 3 ore dall'ischemia, un miglioramento del decorso clinico. L'efficacia di tale trattamento diminuisce ma è ancora presente quando la somministrazione è effettuata dopo le 3 ore e fino a 4,5 ore dall'esordio dei sintomi, mentre il trattamento fra le 4,5 e le 6 ore presenta ancora una efficacia tendenziale ma non più statisticamente significativa. La trombolisi per via endovenosa con rt-PA entro tre ore è approvata come trattamento negli Stati Uniti, in Canada, e Sud America, mentre in Europa solo nell'ambito di studi randomizzati.

Accanto alla terapia trombolitica, nel trattamento acuto dell'ictus cerebrale, si può ricorrere ad altri presidi. **Il mannitolo** per via endovenosa e la **restrizione idrica** possono essere utili per innalzare l'osmolarità plasmatica e ridurre l'edema cerebrale. Il 5-10% dei pazienti con ictus sviluppa un edema cerebrale sintomatico, che si manifesta con ottundimento e può essere causa di erniazione cerebrale. Il massimo grado di edema si osserva al secondo-terzo giorno, ma esso induce un effetto massa per 10 giorni, e più ampio è l'infarto, più è probabile che l'edema costituisca un problema.

E' indicata la somministrazione di ossigeno in presenza di ipossiemia ($SaO_2 < 92\%$), comune soprattutto in presenza di ictus grave o in pazienti con malattie cardiopolmonari.

Nei pazienti con ictus ischemico acuto e pressione sistolica >185 mmHg o diastolica > 105 mmHg è indicata la terapia antipertensiva, ma dovrebbe essere associata ad un attento monitoraggio dello stato neurologico per rilevare prontamente la comparsa di deterioramento. Nei pazienti con febbre è indicata la correzione farmacologica dell'ipertermia, mantenendo la temperatura al di sotto di 37°C. La febbre compare in circa il 50 % dei soggetti nell'arco delle prime 48 ore, è dannosa a livello della lesione ischemica ed è associata sia ad un peggioramento clinico sia ad un peggior esito funzionale. Al contrario l'ipotermia ha un effetto protettivo. Eventuali squilibri glicemici vanno corretti. L'iperglicemia, come del resto l'ipoglicemia, è associata ad una maggiore gravità della lesione ischemica cerebrale e ad un'aumentata morbosità e mortalità sia in condizioni sperimentali che nell'uomo (Warlow et al. 2003).

Non è stata ancora dimostrata l'efficacia di altri trattamenti dell'ischemia cerebrale. Nonostante il gran numero di sostanze, che negli animali da esperimento, hanno mostrato un ruolo neuroprotettivo, nessuna di queste si è ancora dimostrata efficace nell'uomo. Ancora lontana, perciò, sembra essere l'introduzione di una terapia parenchimale, a base di farmaci neuroprotettivi, da affiancare alla terapia vascolare (trombolisi) per il trattamento acuto dell'ictus cerebrale.

L' ipotermia

Negli ultimi anni l'ipotermia è stata considerata una delle più promettenti terapie neuroprotettive (Diller and Zhu 2009). L'applicazione dell'ipotermia contribuisce significativamente a ridurre la mortalità associata a patologie cardiache e cerebrali precedentemente non operabili ma, purtroppo, fino ad ora la maggior parte degli effetti neuroprotettivi sono risultati più evidenti in modelli animali che nei pazienti.

Fino agli anni '70 ed '80, era ritenuta efficace l'induzione di un profondo stato di ipotermia ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) e non stupisce quindi come molti anni di sperimentazione sono stati necessari per identificare il legame terapeutico attraverso il quale l'ipotermia presenta una chiara efficacia. Le ricerche sono proseguite con lo scopo di migliorare il recupero del tessuto cerebrale dopo l'attacco ischemico. Vista la difficoltà di gestione

termica e l'incertezza delle prestazioni, nonché dannose complicazioni sistemiche associate con l'ipotermia profonda, l'idea di una lieve ipotermia ha preso sempre più campo.

Vista la capacità di quest'ultimo metodo di controllare meglio lo stato di ipotermia negli animali, molti esperimenti sono stati condotti per valutare l'entità e la durata della diminuzione di temperatura, la finestra terapeutica di raffreddamento e il processo di recupero della temperatura corporea rispetto all'evento ischemico.

A tale proposito vi è una grande quantità di prove sperimentali di neuroprotezione indotta da ipotermia in lesioni ischemiche in animali da laboratorio ma dati di supporto in soggetti umani sono ancora limitati, in particolare per gli studi clinici randomizzati multicentrici (Yenari and Hemmen 2010a). Negli studi clinici, la terapia con ipotermia sembra di maggior successo nelle operazioni a cuore aperto rispetto al trauma cranico. Questo non è inaspettato in quanto l'avvio del raffreddamento prima dell'attacco ischemico, ed un ritardo medio di 2 ore o più nel raggiungere temperature neuroprotettive, hanno dimostrato benefici limitati sia in modelli animali sia in studi clinici.

È stato suggerito che l'ipotermia può modificare una vasta gamma di meccanismi necrotici nelle cellule.

I primi studi hanno attribuito gli effetti protettivi dell'ipotermia alla capacità di ridurre le spese energetiche ed i tassi metabolici cerebrali in termini di glucosio e ossigeno. Il consumo di ossigeno a livello celebrale può diminuire di circa il 5-7% per ogni grado centigrado perso in un range di temperatura corporea che va dai 22 ai 37°C. Tuttavia, dati associati ad una lieve ipotermia suggeriscono che essa può giocare un ruolo anche nel ritardare la progressione della cascata ischemica e la neuroeccitazione patologica (Maier et al. 2002). Da dati più recenti, i principali meccanismi di neuroprotezione da ipotermia risultano essere l'attenuazione della rottura della barriera emato-encefalica, la riduzione del rilascio di glutammato, la capacità di alleviare l'infiammazione ed una riduzione della generazione e del rilascio di radicali liberi (Diller and Zhu 2009). Tutti i meccanismi hanno a comune la capacità di prolungare la sopravvivenza neuronale e migliorare i risultati dopo la riperfusione.

Effetti sul metabolismo ed il flusso sanguigno cerebrale- Il metabolismo cerebrale, che si riflette in consumo di ossigeno, utilizzazione del glucosio e livelli di lattato, è dipendente dalla temperatura, e l'ipotermia è in grado di diminuire ciascuno di questi parametri (Erecinska et al. 2003). In condizioni di danno cerebrale, l'ipotermia preserva le perdite di fosfati organici ad alta energia (ATP) e rallenta sia i tassi di consumo metabolico sia l'accumulo di acido lattico, migliorando l'utilizzazione del glucosio. Tuttavia l'ipotermia rallenta ma non impedisce completamente l'eventuale deplezione di ATP, e diversi altri studi suggeriscono che il metabolismo non è significativamente alterato a fronte di una notevole neuroprotezione. Quindi, l'influenza dell'ipotermia sul metabolismo cerebrale non spiega a pieno il suo effetto protettivo. Il tasso metabolico cerebrale dovrebbe essere ridotto del 20-25% ad una temperatura cerebrale di 33° C, ma il grado di protezione documentata da diversi laboratori, dell'ordine del 50%-80% (Krieger and Yenari 2004) supera di molto questo livello. E' pertanto ragionevole pensare che l'ipotermia influenzi altri fattori, in modo tale da indurre neuroprotezione. A tale proposito è dimostrato che il raffreddamento del cervello può portare anche a diminuzione del flusso ematico cerebrale (CBF). In condizioni fisiologiche CBF diminuisce linearmente tra temperature di 18 e 37° C, e l'accoppiamento tra CBF e metabolismo cerebrale è conservato anche a temperature diverse. Tuttavia i dati riguardanti l'influenza dell'ipotermia sul CBF sono contrastanti. Alcuni studi indicano che effettivamente l'ipotermia aumenta il CBF durante il periodo di ischemia, mentre altri riportano un ridotto CBF o addirittura una assenza di effetti (Erecinska et al. 2003).

Ipotermia e riduzione del rilascio del glutammato- Diversi studi hanno correlato la protezione ipotermica con la soppressione dell'accumulo o del rilascio di glutammato (Liu and Yenari 2007). La perdita di ATP, che si verifica durante l'ischemia, porta ad un abbassamento dei gradienti di concentrazione di alcuni ioni, ed eventualmente ad un efflusso di potassio ed afflusso di sodio e calcio. Proprio l'afflusso di calcio e l'accumulo extracellulare di glutammato portano ad una diretta neurotossicità. Coerentemente con l'idea che l'ipotermia riduce il

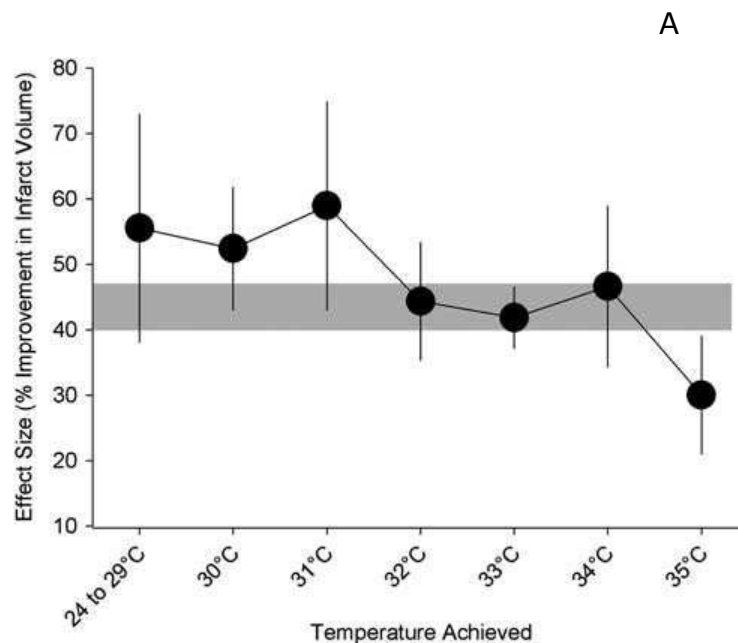
metabolismo, studi sperimentali hanno dimostrato che sia una lieve sia una moderata riduzione della temperatura attenuano l'incremento iniziale e ritardato di potassio extracellulare ed impediscono l'accumulo di calcio intracellulare, determinando in tal modo un ridotto rilascio di glutammato. Tuttavia l'ipotermia, ed in particolare quella ritardata, può proteggere con altri meccanismi, in quanto effetti protettivi non sono sempre correlati al rilascio di glutammato.

Ipotermia, stress ossidativo ed effetti sulla barriera emato-encefalica- Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti salutari dell'ipotermia nel ridurre la produzione di specie reattive per l'ossigeno, nella riduzione dell'edema cerebrale e nella prevenzione della distruzione della barriera emato-encefalica (Liu and Yenari 2007). Un potenziale meccanismo è che l'ipotermia inibisca le metalloproteinasi della matrice e prevenga la degradazione delle proteine della lamina basale in seguito a ischemia cerebrale (Lee et al. 2005).

Ipotermia e regolamento genico, infiammazione e apoptosi- L'effetto ipotermico è stato correlato con favorevoli cambiamenti dell'espressione genica, effetti antinfiammatori e antiapoptotici, con il miglioramento dei processi di recupero. E' stato documentato come l'ipotermia sia in grado di modificare l'espressione genica normalmente osservata dopo ischemia cerebrale. Mentre la maggior parte dei geni risulta inibita durante l'ipotermia, un certo numero di geni risultano anche upregulati (Ohta et al. 2007). Molti geni ritenuti dannosi per la lesione ischemica (proinfiammatori e proapoptotici) tendono ad essere inibiti (Han et al. 2002), mentre quelli che possono giocare un ruolo benefico (regolando la sopravvivenza cellulare e geni trofici) sembrano essere upregulati (Zhao et al. 2005). Le ragioni per questa espressione genica differenziale non sono chiare, ma potrebbe essere attribuibile ad una dipendenza dalla temperatura di alcuni fattori di trascrizione o ad una upregolazione delle proteine dello shock freddo. Tra i processi inibitori regolati dalla temperatura, correlati con l'infiammazione, vi sarebbe una inibizione dell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF-kB) tramite una inibizione, dipendente dalla temperatura, del suo inibitore proteina chinasi IKK (Han et al. 2003). Altri studi indicano che

l'ipotermia ha effetti antiapoptotici quali la riduzione del rilascio di citocromo C, l'inibizione delle caspasi e l'espressione di geni proapoptotici (Zhao et al. 2005). È interessante notare che, sebbene l'ipotermia regoli negativamente una maggioranza di pathways di morte cellulare, sembra anche in grado di regolare positivamente meccanismi di sopravvivenza cellulare, come Akt o ERK, ed aumentare la secrezione di fattori trofici (D'Cruz et al. 2002).

Non solo i target molecolari, ma anche parametri fisici quali il momento in cui iniziare il raffreddamento, la sua durata e profondità ed il tasso di recupero della temperatura corporea sono importanti variabili che devono essere approfondite al fine di sviluppare una strategia neuroprotettiva efficace. E' dimostrato che in modelli animali i maggiori effetti di neuroprotezione si hanno quanto la temperatura corporea non scende al di sotto dei 32°C (Fig. 1.4 A), l'ipotermia viene mantenuta per tempi lunghi (fig. 1.4 B) e viene indotta il prima possibile (Fig. 1.4 C) rispetto all'insorgenza dell'episodio ischemico (van der Worp et al. 2010a).



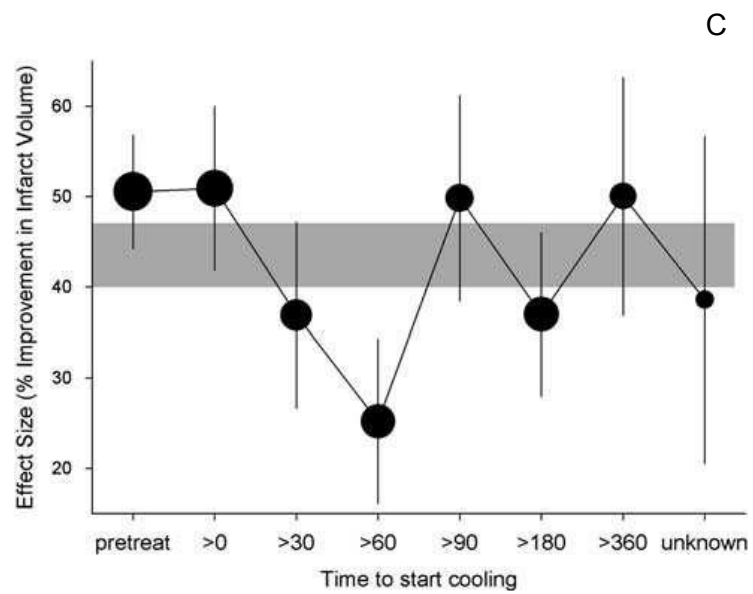
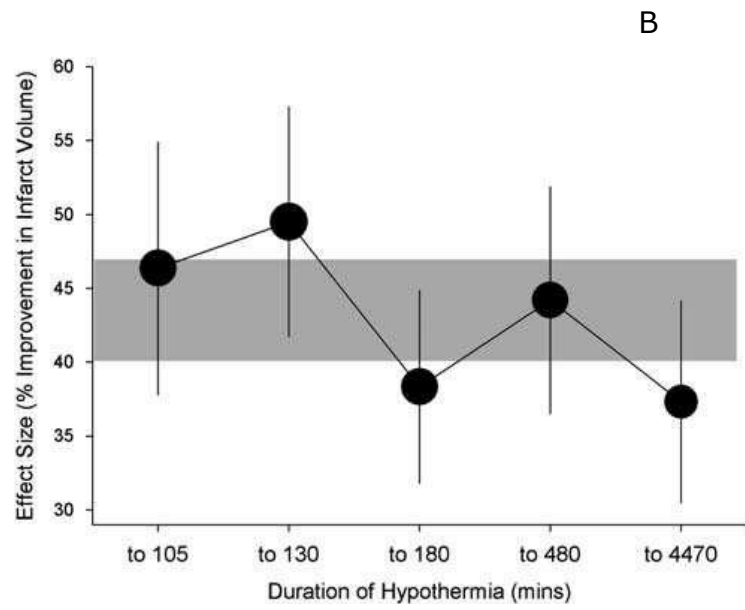


Figura 1.4. Effetto dell'entità A) della durata B) e del tempo di inizio C) dell'ipotermia sul danno ischemico in un modello animale.

TRIALS CLINICI DI IPOTERMIA TERAPEUTICA

Studi randomizzati in pazienti affetti da arresto cardiaco, dimostrano come l'ipotermia terapeutica sia associata ad un'aumentata sopravvivenza ed un migliore esito neurologico. Il risultato di questi trials ha fatto sì che ad oggi l'ipotermia terapeutica sta diventando uno standard di cura per le vittime di arresto cardiaco in diversi centri.

Studi clinici di ipotermia terapeutica in neonati con encefalopatia ipossica suggeriscono un beneficio anche in questa popolazione di pazienti. Ad oggi, ci sono stati due grandi studi multicentrici randomizzati in neonati con encefalopatia ipossica. In uno di questi studi è stato dimostrato che, neonati con moderata ma non grave encefalopatia neonatale e anormale EEG sottoposti a raffreddamento cerebrale per 72 ore (temperatura rettale 34-35° C), entro 6 ore dalla nascita hanno mostrato un beneficio che persiste fino a 18 mesi di vita (Gluckman et al. 2005). In un altro studio, che prevedeva il raffreddamento di tutto corpo fino a 33.5° C per 72 ore nei neonati con encefalopatia moderata o grave, è stato evidenziato un ridotto rischio di morte e moderata o grave disabilità valutata a 18-22 mesi (Clifton et al. 2001; Shankaran et al. 2005).

I pazienti con trauma cranico non sembrano beneficiare del raffreddamento. In un ampio studio di fase III in pazienti con trauma cranico, che sono stati raffreddati entro 6 ore dal trauma ad una temperatura corporea di 33° C per 48 ore, l'ipotermia non ha migliorato le condizioni rispetto ai pazienti mantenuti a temperatura ambiente (Clifton et al. 2001). Tuttavia, è degno di nota il fatto che quei pazienti che erano già ipotermici al momento della presentazione, e sono stati tenuti al fresco, presentavano un esito neurologico migliore rispetto a quelli che erano o riscaldati o si erano presentati normotermici e successivamente erano stati raffreddati.

Se l'ipotermia è efficace nei pazienti con ictus non è noto, ma un paio di studi pilota di ipotermia per l'ictus sono stati pubblicati (Hemmen and Lyden 2007). In sostanza, questi studi hanno dimostrato che una lieve ipotermia terapeutica è fattibile, anche se non completamente senza complicazioni. Effetti indesiderati come trombocitopenia, bradicardia, ipotensione moderata, ipopotassemia, polmonite, pancreatite,

coagulopatia e insufficienza cardiaca sono stati osservati in seguito ad un raffreddamento molto profondo (inferiore ai 33° C). Una sfida importante per l'applicazione dell'ipotermia in pazienti colpiti da ictus è che, a differenza di altre malattie neurologiche, i pazienti ischemici sono generalmente svegli e non tollerano il raffreddamento. Un altro problema riscontrato è l'aumento della pressione intracranica durante il riscaldamento, un fenomeno non ancora ben studiato in laboratorio (Schwab et al. 2001). Due studi clinici hanno utilizzato dispositivi di raffreddamento intravascolari per raffreddare pazienti con ictus acuto. COOL-AID (De Georgia et al. 2004) è stato uno studio randomizzato controllato eseguito su 40 pazienti che si presentavano entro le 12 ore dall'insorgenza dei sintomi, di cui 18 pazienti hanno ricevuto il raffreddamento e 22 hanno ricevuto il trattamento medico standard. La maggior parte dei pazienti ha ben tollerato l'ipotermia, e gli esiti clinici sono stati simili in entrambi i gruppi. ICTuS, altro studio clinico randomizzato, prevedeva un diverso metodo di raffreddamento intravascolare per lo studio di 18 pazienti acuti con tempi di raffreddato entro le 12 ore dall'insorgenza della sintomatologia (Lyden et al. 2005). I pazienti potevano anche ricevere rt-PA per via endovenosa, se ritenuto necessario. Nel complesso, anche questi pazienti tolleravano il raffreddamento e l'incidenza di emorragia cerebrale non sembrava aumentata nonostante il piccolo numero di pazienti (n = 5) somministrati con rt-PA.

SISTEMA PURINERGICO E TERMOREGOLAZIONE

I recettori per le purine sono monomeri dotati di una struttura molto simile tra di loro. Ogni proteina recettoriale è costituita da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana, con l'estremità amminotermine extracellulare e quella carbossiterminale intracellulare (Fig. 1.5 A e B) (Ralevic and Burnstock 1998). Nel 1978 Burnstock propose l'esistenza di almeno due tipi di recettori per le purine, denominati P1 e P2. Questa distinzione era basata sull'ordine di potenza di vari nucleotidi e nucleosidi: P1 identifica la famiglia di recettori maggiormente sensibili ad adenosina, mentre i recettori P2 sono preferenzialmente attivati da ATP e ADP. Un'ulteriore criterio di differenziazione tra recettori P1 e P2 è basato sulla diversa sensibilità agli antagonisti di tipo xantinico. I recettori P1 sono inibiti competitivamente da farmaci xantini quali caffeina, teofillina e teobromina, che sono inattivi sui recettori P2. Questa suddivisione generale in recettori P1 e P2 ha rappresentato la base per l'attuale classificazione e nomenclatura di questi recettori. Ciascuna delle due famiglie comprende diversi sottotipi recettoriali identificabili in base al profilo farmacologico, al meccanismo di traduzione del segnale e alla struttura molecolare (Fredholm et al. 2001). L'adenosina può interagire con 4 sottotipi recettoriali localizzati a livello della membrana citoplasmatica (A1, A2A, A2B, A3) e che hanno una distribuzione variabile in diversi sistemi (sistema nervoso centrale, cardiovascolare, renale, respiratorio, immunitario e gastrointestinale) dove partecipano alla modulazione delle normali funzioni biologiche (Ralevic and Burnstock 1998). Ciascun sottotipo è accoppiato ad un determinato tipo di proteina G, che può essere stimolatoria (Gs) o inibitoria (Gi). La stimolazione di questi recettori può determinare l'attivazione (nel primo caso) o l'inibizione (nel secondo) dell'adenilato ciclasi. Inoltre, in alcuni tessuti, i recettori A1 e A3 sono capaci di modulare l'attività della fosfolipasi C e, nel caso del recettore A1, di canali ionici per il Ca^{2+} o K^{+} . La classificazione dei sottotipi recettoriali dipende anche dai profili di affinità per agonisti ed antagonisti. In base alla diversa affinità per il nucleoside purinico, è stato possibile definire i recettori A1, e A2A come recettori ad alta affinità, mentre A2B e A3 sono

recettori caratterizzati da una bassa affinità per l'adenosina (Poulsen and Quinn 1998). I recettori P2 legano ATP e, con affinità minore, UTP, ADP e UDP. Sono a loro volta suddivisi in P2X e P2Y, rispettivamente di tipo ionotropo multimerico e accoppiati a proteine G.

E' stato dimostrato che sia AMP che il suo analogo non idrolizzabile deossadenosina monofosfato sono in grado di attivare direttamente i recettori A1, in un modello in vitro con cellule tumorali umane (Rittiner et al. 2012a). Diversi lavori dimostrano l'esistenza di una relazione diretta tra il sistema purinergico e l'ipotermia. Adenosina ed in particolare i suoi recettori A1 risultano aumentati durante la fase di ibernazione nel cervello di criceti e scoiattoli (Wang LCH et al.,1993). Nella lettera a *Nature* (Zhang et al. 2006) è dimostrato come in topi nei quali è indotto uno stato di ipotermia attraverso il digiuno, i livelli plasmatici di AMP risultano elevati rispetto ad animali normotermici. Come conferma a questo dato, gli stessi autori, dimostrano che somministrazioni intraperitoneo di AMP inducono nei topi una riduzione della temperatura corporea in maniera dose dipendente.

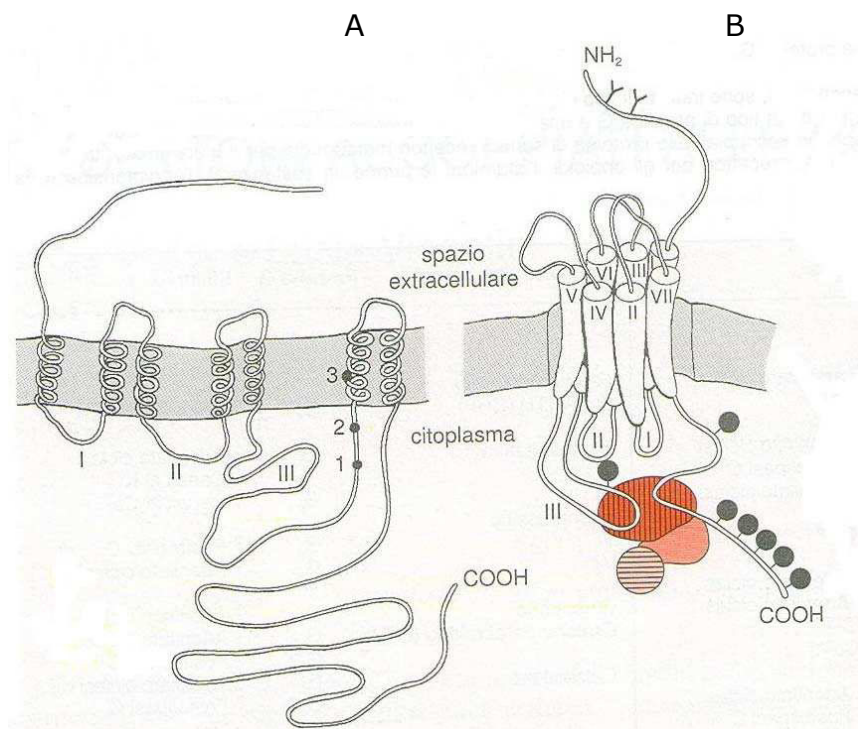


Figura 1.5. A) Schematizzazione e B) modello tridimensionale di un recettore accoppiato a proteine G (Clementi e Fumagalli, 1999).

RECETTORI TRPV1 E TERMOREGOLAZIONE

La famiglia dei transient receptor potential (TRP) rappresenta una grande classe di canali ionici caratterizzata dalla permeabilità allo ione Ca^{2+} ed una comune struttura molecolare, costituita da sei domini trans membrana (Fig. 1.6).

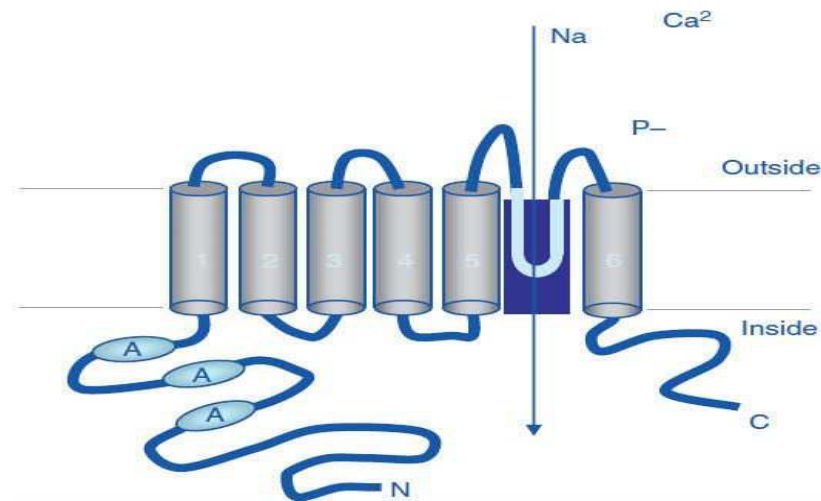


Figura 1.6. A) Schematizzazione di un recettore della famiglia TRP.

La famiglia può essere suddivisa in diverse classi in funzione dell'omologia di sequenza e della funzionalità: ankirina (TRPA), canonical, melastatina (TRPM), mucolipina, policistina e vanilloidi (TRPV) (Romanovsky et al. 2009). Tra i canali TRP, nove risultano altamente sensibili alla temperatura e per questo motivo sono detti "canali termo-TRP", anche se il più importante risulta il canale transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Questo canale è il target cellulare della capsaicina, il composto attivo del peperoncino, e svolge un ruolo importante nella conduzione degli stimoli del dolore, incluso il calore ed il pH. Ormai da anni è noto che antagonisti del TRPV1, come ad esempio la capsazepina, sono in grado di indurre ipertermia negli animali da laboratorio e nei pazienti (Gavva 2008a). Viceversa, agonisti endogeni come Anandamide (AEA), Oleoiletanoloamide (OEA) e N-arachidonoildopamina (NADA) causano ipotermia quando somministrati sistematicamente a ratti e topi a dosi millimolari (Romanovsky et al. 2009), anche se studi sugli effetti di agonisti endogeni dei recettori

TRPV1 sulla temperatura corporea sono ancora scarsi. È dimostrato che i meccanismi attraverso cui questi recettori sono in grado di indurre ipotermia risultano la vasodilatazione cutanea e una diminuzione della termogenesi (Toth et al. 2011). Dalla letteratura si evince comunque che vi è ancora un dibattito aperto se il controllo di questi meccanismi di termoregolazione avvenga a livello centrale o periferico, anche se la prima ipotesi risulta la più accreditata ed in particolare a livello ipotalamico. Alla base di questa incomprendenza vi sono esperimenti che dimostrano come da un lato somministrazioni direttamente nell'ipotalamo di ratti causano ipotermia (Hori 1984a), dall'altro come antagonisti incapaci di permeare la barriera emato-encefalica sono comunque in grado di indurre ipertermia (Gavva et al. 2007a).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Numerosi studi testimoniano la relazione tra un abbassamento della temperatura corporea e un effetto di protezione in seguito ad ischemia cerebrale, sia in animali da laboratorio sia in pazienti. Nonostante ciò, uno dei principali problemi riscontrato durante numerosi trials clinici, in seguito al quale l'effetto di neuroprotezione da ipotermia viene meno, è da ascrivere all'importante ritardo che intercorre tra l'insorgenza dell'episodio ischemico e il raggiungimento di una temperatura corporea tale da permettere i processi protettivi (Meloni et al. 2009). Dall'analisi di questi dati nasce chiaramente la necessità di identificare molecole in grado di ridurre la temperatura corporea in tempi relativamente brevi, in consistenza con un effetto neuroprotettivo. Attualmente solo poche molecole (neurotensina, 3-iodiotironamina e idrogeno solforato) presentano questa caratteristica, perciò vi è un crescente interesse nell'ambiente scientifico nell'identificare farmaci in grado di indurre una riduzione della temperatura corporea in maniera rapida e sicura (Yenari and Hemmen 2010b).

Risulta interessante notare come l'attivazione dei recettori transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1), oltre a mediare la trasduzione di segnali sensoriali, regola negativamente la temperatura corporea. È stato inoltre dimostrato come nel siero murino l'espressione di enzimi chiave per il metabolismo risulta regolata da oscillazioni circadiane del nucleotide Adenosina 5'-monofosfato (AMP), e correlano con uno stato di torpore in questi animali. Il nucleotide induce un profondo e duraturo stato d'ipotermia quando iniettato ad alte dosi nei roditori (Zhang et al. 2009a).

Detto questo, nella letteratura scientifica non sono presenti né studi che approfondiscono la correlazione tra l'effetto ipotermizzante dato dalla stimolazione TRPV1 e la neuroprotezione, né il sito di azione, il meccanismo molecolare e il potenziale neuroprotettivo alla base dell'effetto ipotermizzante dell'AMP.

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di studiare da un lato gli effetti del rinvanil, un potente agonista dei recettori TRPV1 sintetizzato

presso il laboratorio del Prof. Giovanni Appendino del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale, sulla temperatura corporea e il danno da ischemia cerebrale nel topo.

Dall'altro identificare il sito di azione ed il meccanismo molecolare con cui AMP altera la termogenesi e se questo effetto può essere sfruttato per indurre un'ipotermia terapeutica per il trattamento del danno da ischemia cerebrale.

3. MATERIALI E METODI

MATERIALI

Il rinvanil è stato sintetizzato presso il laboratorio del Prof. Appendino, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale (Novara, Italia). Adenosina (Ado), Adenosina 5'-monofosfato (AMP), Metilene-ADP (AMPCP), 8-fenilteofillina (8SPT), 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), Dimetilsolfossido (DMSO), Dipiridamolo e Prostaglandina E2 (PGE2) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia), mentre la Capsazepina dalla Tocris (Minneapolis MN, USA). 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA) ci è stato gentilmente fornito dal Prof. Corradetti del Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Firenze.

PROTOCOLLO DEI TRATTAMENTI

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su topi maschio C57/Bl6 (Harlan Nossan, UK). Ado, AMP, AMPCP, 8SPT e MDMA sono stati sciolti in soluzione salina mentre tutti gli altri composti sono stati sciolti in DMSO. I composti somministrati per via intraperitoneale (i.p.) sono stati sciolti in 100µl di veicolo, mentre i composti somministrati per via intracerebroventricolare (i.c.v.) sono stati sciolti in 3µl di veicolo e somministrati ad una velocità di 1µl /min attraverso una finestra cranica (P+1, L+1, V-3 mm da bregma) in animali anestetizzati con isoflurano al 2% in una miscela comprendente ossido di azoto al 70% ed ossigeno al 30%. Negli esperimenti volti allo studio della perdita di calore, gli animali sono stati posti in una gabbia equipaggiata con un termostato e un ricircolo di aria ed esposti ad una temperatura ambientale (RT) di 40°C. Tutte le procedure animali sono state condotte in accordo con le linee guida della Comunità Europea per la Salute degli Animali DL 116/92, ed in accordo con le linee guida ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments).

ISCHEMIA CEREBRALE FOCALE

L' ischemia focale viene indotta per mezzo dell' occlusione dell' arteria cerebrale media (MCA), la quale viene effettuata inserendo un filamento

di nylon rivestito di silicone del diametro finale di 0.28 mm secondo quanto descritto in letteratura (Belayev et al. 1996). Il filamento è preparato il giorno precedente l'operazione rivestendolo con del silicone. Il giorno successivo, una volta verificato che il silicone si è seccato, si segnano sul filamento due punti di riferimento rispettivamente a 1.7 cm e a 1.9 cm dall'estremità terminale che deve essere introdotta. Questa distanza rappresenta il tratto che il filamento deve percorrere per occludere in maniera corretta il vaso. Durante l'operazione gli animali sono anestetizzati con isoflurano (usato al 5% per l'induzione dell'anestesia, al 2-3% per il mantenimento della stessa) con una miscela comprendente ossido di azoto al 70% ed ossigeno al 30%. La temperatura corporea è monitorata con una sonda rettale della Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA), e mantenuta sui $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per mezzo di un tappetino termostato per tutta la durata dell'operazione. Tutta l'operazione si svolge utilizzando un microscopio Leica modello MZ75. L'operazione ha inizio con un taglio longitudinale in modo da rendere evidente la trachea. Si scosta il muscolo obliquo inferiore in modo da individuare l'arteria carotide comune. Questa viene isolata mediante un filo di seta (Ethicon 5/0) e clampata. Dopodiché ci si sposta in direzione craniale in modo da individuare, in posizione lateromediale, il punto di sovrapposizione tra la trachea ed il muscolo obliquo superiore (muscolo sternocleidomastoideo). Scostando il muscolo si individua l'arteria carotide esterna. Si effettua una legatura con il medesimo filo di seta in questa arteria appena oltre la biforcazione con cui la carotide comune si divide generando il ramo dell'interna e dell'esterna. All'altezza della biforcazione viene effettuata una terza legatura che non viene stretta, a differenza delle altre, ma è lasciata lenta. A questo punto si clampo la carotide interna e sulla carotide comune viene aperto un foro mediante un taglio a 45° , in modo che risulti delle dimensioni opportune per permettere il passaggio del filamento al suo interno. Il filamento viene inserito e spinto fino ad incontrare la clip che occlude l'interna dopodiché, si stringe la terza sutura che avevamo lasciato lenta ma in modo da assicurare lo stesso lo scorrimento del filamento. Si rimuove la clip e si spinge il filo piegandolo leggermente verso il basso, in modo che superi la

biforcazione a livello della quale la carotide interna si divide e genera l'arteria pterigopalatina; in questo modo, il filamento imbocca il percorso giusto seguendo il tragitto della carotide interna. Spingendo ancora, oltrepassa il punto di origine dell'arteria cerebrale media e blocca in maniera definitiva il flusso di sangue dalle arterie anteriori comunicanti del poligono del Willis. A questo punto si opera un doppio nodo alla terza legatura in modo da garantirne la tenuta e si richiude l'animale utilizzando punti da sutura metallici. Gli animali vengono posti singolarmente in gabbie con libero accesso a cibo e acqua e collocati in una stanza termostata. Dopo 60 o 90 minuti dall'inserimento del filamento gli animali subiscono un secondo intervento e il filamento viene rimosso. L'anestesia viene sempre indotta con isofluorano al 5% ma la percentuale di mantenimento viene ridotta dal 2-3% allo 0,5-1% per tutta la durata del secondo intervento onde evitare crisi respiratorie. In questo secondo intervento si procede in primo luogo alla rimozione dei punti di sutura, si riapre la ferita, il nodo della terza sutura viene allentato ed il filamento rimosso in modo da garantire la riperfusione della zona precedentemente lesionata. La ferita viene chiusa nuovamente con punti metallici e gli animali vengono posti singolarmente in gabbie con libero accesso a cibo e acqua e sacrificati dopo 24 ore per la valutazione del danno a breve termine o a tempi più lunghi, fino ad una settimana, per la valutazione del danno a lungo termine.

MONITORAGGIO DEL FLUSSO EMATICO CEREBRALE

Per assicurarci che l'intervento di occlusione dell'arteria cerebrale media fosse eseguito correttamente, in maniera da ottenere una caduta del flusso cerebrale nell'emisfero irrorato dal vaso, determinare una buona ischemia focale e quindi rendere ragionevole un eventuale successivo trattamento, abbiamo deciso di porci nelle condizioni di poter valutare in tempo reale il calo di flusso al momento della chiusura dell'arteria cerebrale media. Questo è reso possibile grazie all'utilizzo del Laser Doppler (Perimed) che ci permette di visualizzare durante tutta la durata dell'operazione, sotto forma di unità di flusso al secondo, l'irrorazione del parenchima cerebrale ad opera dell'arteria cerebrale media e delle sue

collaterali. Questa rivelazione avviene attraverso una sonda che viene fissata, all'inizio dell'operazione, per mezzo di una goccia di resina, sull'osso temporale, a 2-3 mm di distanza dalla sutura temporo-parietale dove si ha una buona ricezione del segnale. Per fare questo, una volta anestetizzato con isoflurano, si posiziona l'animale sul fianco sinistro, e si procede con l'incisione della cute per mezzo di un taglio trasversale di circa 1 cm, in un punto che si trova a metà strada tra l'orecchio e l'occhio dell'animale stesso. Il lembo di pelle viene retratto e fissato in modo che rimanga sollevato. In questo modo si scopre il muscolo temporale che viene staccato dall'osso mediante la rescissione dei tendini che ancorano il muscolo a livello della scissura temporo-parietale. Un successivo taglio trasversale sul muscolo permette di scoprire l'osso temporale sottostante sul quale, una volta adeguatamente pulito, si procede all'ancoraggio del probe in un punto dove si riceveva un buon segnale (300-400 unità di pulsazione) mediante qualche goccia di resina. Non appena questa si è seccata, si procede alla rotazione dell'animale che viene posto in posizione supina sul tavolo operatorio in modo da poter procedere con l'operazione vera e propria. A questo punto si comincia a registrare il segnale grazie ad un computer connesso al Laser Doppler e si segnala, lungo il tracciato, dapprima il momento di posizionamento del probe, successivamente il momento di occlusione della carotide comune che è associato ad un calo del flusso, estremamente variabile da animale ad animale (riduzione che oscilla tra il 20-50%) ed il momento dell'inserimento del filamento nella carotide interna fino all'occlusione della cerebrale media in cui si osserva un drammatico calo del flusso sanguigno. Tale riduzione di flusso deve risultare del 70-90%, ed animali che presentano un calo inferiore non vengono inseriti nel gruppo sperimentale.

VALUTAZIONE DEL DANNO IN ISCHEMIA FOCALE

Al termine del protocollo sperimentale, 24 ore per la valutazione del danno a breve termine o a tempi più lunghi per la valutazione del danno a lungo termine, gli animali precedentemente anestetizzati con cloralio idrato 400mg/kg somministrato per via intraperitoneale, vengono

sacrificati e il cervello viene rapidamente rimosso. Una volta isolato, il cervello viene messo in un congelatore per circa venti minuti in modo da aumentare la consistenza del tessuto e permetterne il suo taglio per mezzo di lamette affilate dopo averlo posto in un apparecchio adibito all'uso (ungestean). Per ciascuno animale si ottengono 12 fettine dello spessore di 20 μm , alla distanza di 500 μm una dall'altra, le quali vengono poste in un vetrino porta-oggetto. Le fettine vengono fissate in etanolo assoluto (Abs) a -80°C per 10 minuti dopodiché subiscono un processo di idratazione attraverso una serie di lavaggi, di 1 minuto ciascuno, in etanolo a concentrazioni decrescenti per poter poi subire la colorazione vitale nel colorante idrofilico Toluidine Blue alla concentrazione 1,7mM sciolto in 250 ml di soluzione (2% di Sodio Acetato 0,2 M e 98% di Acido Acetico 0,2 M).

Le fettine vengono abbondantemente lavate con acqua, lasciate asciugare a temperatura ambiente e le immagini vengono acquisite al computer mediante uno scanner Epson perfection mod. 1640SU. Sulle immagini così ottenute viene calcolata l'area della zona infartuata e tramite interpolazione statistica il volume totale della stessa, mediante un programma di analisi dell'immagine, image 3.0 plus.

REGISTRAZIONI A SINGOLA UNITÀ DI ATTIVITÀ SPONTANEA DA NEURONI DI IPOTALAMO ANTERIORE

Al fine di eseguire questa tipologia di registrazioni elettrofisiologiche, sezioni coronali dello spessore di 300 μm sono ottenute dalla porzione di ipotalamo anteriore (POA) di topi adulti CD1. I topi sono anestetizzati con isoflurano e decapitati. Una volta estratto, il cervello viene affettato in una soluzione artificiale di liquido cerebro-spinale (aCSF) ossigenata (95% O_2 + 5% CO_2) contenente (in mM) 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 10 glucosio, 2 CaCl_2 and 2 MgCl_2 . La commissura anteriore viene utilizzata per individuare la regione anatomica di interesse. Per consentire la registrazione, le fettine vengono trasferite in una camera di registrazione montata su un microscopio (Nikon Eclipse E600 FN) equipaggiato con una telecamera ad infrarossi (Hamamatsu). La soluzione aCSF viene mantenuta all'interno dell'intervallo di

temperature desiderato (da 32 a 39°C) mediante un controller di temperatura TC344B. Le registrazioni sono effettuate in una configurazione Cell-attached (R_{SEAL} al di sotto di 100M Ω) in modalità voltage clamp ($V_{HOLD}=0$). I segnali sono stati campionati a 20 KHz e filtro passa-basso a 10 KHz, acquisiti con un Multiclamp Axon 700B e digitalizzati con un Digidata 1440 A e CLAMPEX 10 (Axon). Le tracce e l'analisi statistica sono stati realizzati con Clampfit 10 (Axon) e Origin 8.1 (Microcal). Tutti i farmaci sono stati applicati direttamente nel bagno e diluiti 1000X.

REGISTRAZIONE DEL POTENZIALE DI CAMPO ECCITATORIO POST-SINAPTICO IPPOCAMPAL

Ratti Wistar o topi C57/Bl6 maschio (Harlan, Udine) precedentemente anestetizzati con isoflurano somministrato per via intraperitoneale, vengono sacrificati e l'ippocampo viene rapidamente rimosso dal cervello e mantenuto in una soluzione di liquido cerebro-spinale artificiale (aCSF) fredda ed ossigenata (95% O₂ + 5% CO₂). Le fettine di ippocampo sono tagliate in sezione parasagittale ad uno spessore di 400 μ m mediante un chopper per tessuto Mcllwain della Mickle Lab. Engineering (Gomshall, UK) e sono mantenute in aCSF ossigenato per almeno un'ora a temperatura ambiente. Una singola fettina viene adagiata su una rete metallica all'interno di una piccola camera (0,8 ml), completamente immersa in aCSF ossigenato, ad una temperatura tra i 31 ed i 32°C e con un flusso costante tra 1,5 e 1,8 ml/minuto. Tutte le molecole, conservate ad una temperatura di -20°C in soluzioni da 1.000 a 10.000 volte la concentrazione finale desiderata, sono state sciolte nel buffer ACSF ed applicate alla fettina di ippocampo in superfusione. Il test elettrofisiologico prevede la generazione di impulsi (100 microsecondi, 0,066 Hz) erogati attraverso un elettrodo bipolare al nichelcromo posizionato nella porzione CA1 dello strato radiatum dell'ippocampo, allo scopo di stimolare la collaterale di Schaffer/fibre commissurali. I potenziali di campo postsinaptici eccitatori (fEPSPs) evocati, sono stati registrati con microelettrodi di vetro da 2 a 10M Ω della Harvard Apparatus (Edenbridge, UK), riempiti con 150 mmol / L di NaCl e collocati

nello strato radiatum della regione CA1 dell'ippocampo. Le risposte sono state amplificate (BM 622, Mangoni, Pisa, Italia), digitalizzate (frequenza di campionamento, 33.33 kHz) e conservate per una successiva analisi con il programma LTP (versione 2.30D) dell'Università di Bristol (Bristol, UK).

EMOGASANALISI

I campioni di sangue arterioso del volume di 1mL sono stati raccolti con una siringa eparinizzata da topi trattati e non con AMP ed utilizzati per l'analisi con un gas analizzatore della Ciba-Corning Diagnostics (Medfield, MA, USA). Mediante questo strumento sono stati misurati la pressione di O₂ (pO₂), la pressione di CO₂ (pCO₂), il pH, la concentrazione degli elettroliti (K⁺, Na⁺, Ca²⁺ e Cl⁻) e la glicemia.

VALUTAZIONE DELLA PRESSIONE SANGUINEA

I topi, trattati e non con AMP o AMPCP, sono stati posizionati nell'apposito strumento per la misurazione della pressione sanguinea e del battito cardiaco BP-2000 Blood Pressure Analysis System della Visitech Systems Inc. (Apex, NC, USA). Inserendo la coda dell'animale all'interno dell'apposita cuffia, questo strumento è in grado di valutare il battito cardiaco mediante un sensore laser e di monitorare la pressione sanguinea sia diastolica sia sistolica nonché di calcolarne il valore medio.

VALUTAZIONE DEL CONSUMO DI OSSIGENO

I topi, trattati e non con AMP o AMPCP sono stati posizionati, immediatamente dopo la somministrazione della sostanza, all'interno di un respirometro chiuso della Columbus Instruments (Columbus, OH, USA) ed il consumo di ossigeno è monitorato per 20 minuti.

RT-PCR

1 mg del RNA totale, isolato da tessuto ipotalamico di topo o di ratto, è stato retrotrascritto utilizzando il kit iScript della Bio-Rad (Hercules, CA, USA), utilizzando il seguente protocollo: 5 minuti a 25°C, 30 minuti a

42°C e 5 minuti a 85°C. Per la reazione di amplificazione della 5' Nucleotidasi (5'-NT) sono stati usati i seguenti primers: Topo Forward 5'-GGCTCTTTACCAAGGTGCAGC-3', topo Reverse 5'-ATCAATCAGTCCTTCCACACCG-3'; Ratto Forward 5'-TTCACCAAGGTGCAGCAGATC-3' e ratto Reverse 5'-ATCAATCAGTCCTTCCACACCG-3'. Per la reazione di amplificazione del gene housekeeping RNA ribosomale 18S, utilizzato come controllo, sono invece state usate le seguenti coppie di primers: 18 S Forward 5'-GGGAGGTAGTGACGAAAATAACAAT-3' e 18 S Reverse 5'-TTGCCCTCCAATGGATCCT-3'. La reazione di Real-time PCR (RT-PCR) è infine stata eseguita utilizzando il kit Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit della Qiagen (Milan, Germany) ed analizzata con lo strumento Rotor-Gene 3000 cyler system della Corbett Research (Mortlake, Australia).

ANALISI DELL'ATTIVITA' DELLA 5'-NUCLEOTIDASI

L'ippocampo di topo o di ratto è stato rimosso dal cervello, per un totale di 4 ippotalami per specie, e velocemente omogenato in un buffer di Tris 50mmol/L a pH 8 contenente KCl 50 mmol/L, DTT 1 mol/L, Cocktail di inibitori di proteasi 10 µL/mL e MgCl₂ 2 mmol/L. L'omogenato è stato centrifugato a 16.000 g ed il sovrinatante così ottenuto è nuovamente centrifugato a 100.000 g per 40 minuti. Il pellet depositato, contenente la frazione di membrane, è stato risospeso in 500 µl dello stesso buffer precedentemente utilizzato ma arricchito con Triton X-100 al 2% v/v e mantenuto per 30 minuti a 4° C. La soluzione contenente le membrane è stata quindi utilizzata per il saggio enzimatico.

Il saggio enzimatico per valutare l'attività della 5'-NT è stato eseguito in presenza di 50µl di estratto di cervello e 50µl del buffer di omogeneizzazione, contenente AMP 100 µmol/L ed in presenza o assenza di diverse concentrazioni di AMPCP (da 0.01 a 1 mmol/L). La reazione è stata incubata a 37°C per 5 minuti, bloccata con un volume equivalente di HClO₄ 0.4 N e successivamente centrifugata a 10,000 g per 10 minuti. La formazione di Adenosina è stata misurata, in seguito a derivatizzazione, mediante un sistema di cromatografia liquida ad alto rendimento (HPLC) associato ad un fluorimetro.

WESTERN BLOTTING

La corteccia cerebrale e la porzione preottica dell'ippocampo sono state prelevate da topi e ratti trattati e non con AMP (50 mg/kg, i.p. 20 minuti prima del sacrificio), poste in tubi eppendorf ed immediatamente congelati in azoto liquido. I campioni sono stati successivamente risospesi in un lysis buffer [50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsolfonil fluoride (PMSF), 4 µg/ml aprotinina e leupeptina, 100 µM acido okadaico, 10 mM ortovanadato di sodio, 10 mM sodio fluoride, 1% SDS]. 20-40 µg di proteine sono stati caricati in ciascun pozzetto di un gel con un gradiente variabile, dal 4 al 20%, di poliacrilamide (SDS-PAGE) e sottoposte a migrazione e separazione, all'interno delle maglie del gel, in funzione della diversa dimensione, sotto la spinta motrice di un campo elettrico (elettroforesi). Dopo la separazione proteica ed il trasferimento delle proteine dal gel su membrane di nitrocellulosa (blotting), le membrane (Immobilon-P, Millipore, MA, USA) sono state bloccate con un buffer salino fosfato (PBS) contenente 0.1% Tween-20 e 5% di latte magro (TPBS/latte 5%). Successivamente le membrane sono state incubate per tutta la notte con una sonda costituita da un anticorpo primario anti p-AMPK (1:1000 in TPBS/latte 5%) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Le membrane sono state poi lavate con TPBS ed incubate per 1 h in TPBS/latte 5% contenente il corrispondente anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi (1:2000). Dopo lavaggio in TPBS, la presenza delle proteine è resa possibile dalla reazione enzimatica della perossidasi, la quale sviluppa luce in presenza del proprio substrato ECL (Amersham, UK).

ANALISI STATISTICA DEI DATI

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il programma di analisi WinLTP 1.11 ed il software GRAPHPAD PRISM (versione 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Tutti i risultati numerici sono stati espressi come valore medio \pm s.e.m. La significatività statistica di tutti gli esperimenti è stata valutata tramite paired two-tailed Student's ttest o analisi della varianza (one-way ANOVA) seguita da test di Tukey per la comparazione multipla. Le differenze con $P < 0,05$ sono state considerate significative.

4. RISULTATI

PARTE 1: NEUROPROTEZIONE ISCHEMICA DA IPOTERMIA INDOTTA DALLA STIMOLAZIONE DEI RECETTORI TRPV1.

Effetto del rinvanil sulla regolazione della temperatura corporea

Conoscendo gli effetti dei diversi composti della famiglia dei capsaicinoidi sulla termoregolazione (Gavva 2008b), inizialmente abbiamo studiato come il potente agonista dei recettori TRPV1 rinvanil influenza la temperatura corporea (T_c) nel topo. Alla dose di 25 mg/Kg gli animali raggiungono una T_c di $33.4 \pm 0.6^\circ \text{C}$ circa 30 minuti dopo l'iniezione (Fig. 4.1.1), e ritornano al valore basale dopo 2.2 ± 0.3 ore. Dosi più elevate inducono un effetto ipotermico di simile entità dopo 30 minuti ($33.2 \pm 3^\circ \text{C}$ a 50 mg/kg e $32.5 \pm 5^\circ \text{C}$ a 100 mg/kg) ma tale effetto risulta mantenuto per tempi più lunghi (4.4 ± 0.3 e 4.9 ± 0.5 ore a 50 e 100 mg/kg, rispettivamente).

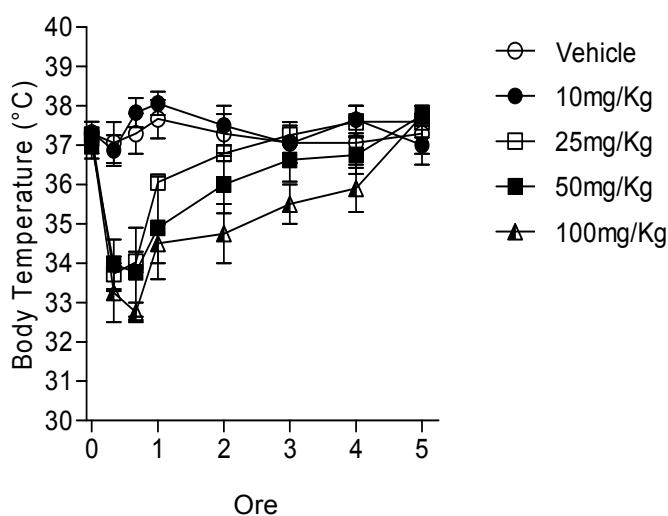


Figura 4.1.1. Effetto della somministrazione intraperitoneo del rinvanil a diverse dosi

Lavori precedenti suggeriscono che l'ipotermia indotta da analoghi della capsaicina è dovuta all'attivazione di recettori TRPV1 situati all'esterno del sistema nervoso centrale (Fosgerau et al. 2010;Gavva 2008b). Nonostante ciò, abbiamo trovato che anche somministrazioni i.c.v. di

rivanil sono in grado di indurre un abbassamento della Tb in maniera dose-dipendente (Fig. 4.1.2).

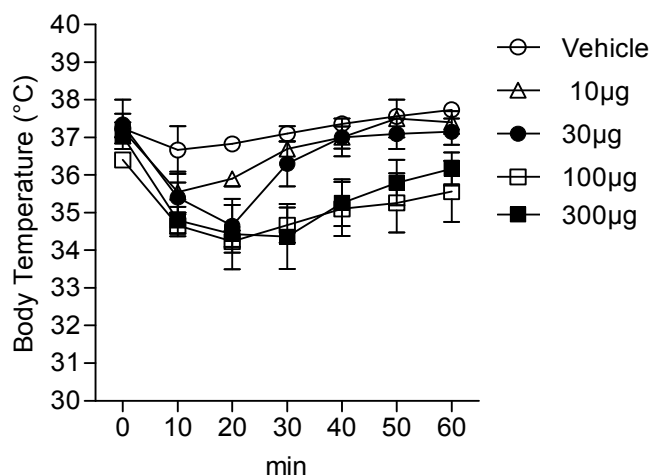


Figura 4.1.2. Effetto della somministrazione intracerebroventricolare del rivanil a diverse dosi

Al fine di confermare che l'effetto ipotermizzante indotto dal rivanil avviene attraverso la stimolazione dei recettori TRPV1 a livello cerebrale, abbiamo somministrato contemporaneamente rivanil i.p. e l'antagonista TRPV1 capsazepina i.c.v. L'ipotermia osservata alla dose di 25 mg/kg di rivanil i.p., è ridotta dalla contemporanea iniezione dell'antagonista capsazepina 50 µg (Fig. 4.1.3).

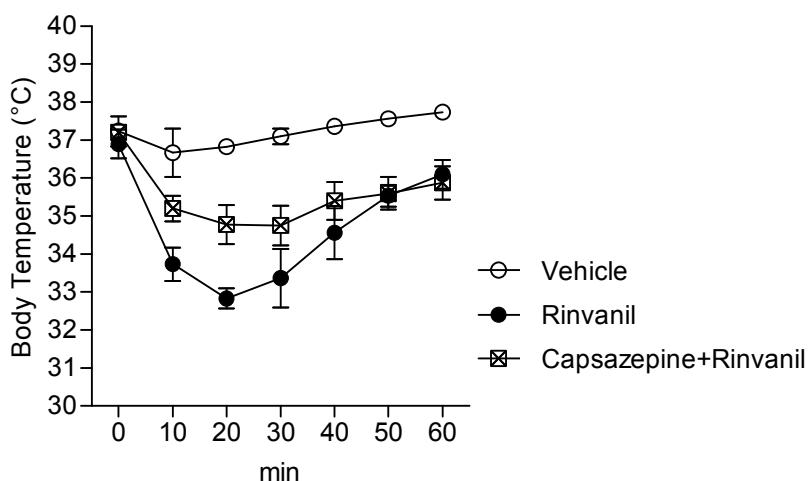


Figura 4.1.3. Effetto dell'antagonista TRPV1 capsazepina su l'ipotermia indotta da rivanil

L'antagonismo tra farmaci può essere principalmente di due tipologie: *competitivo* e *non competitivo*.

Nel caso di antagonismo di tipo *competitivo* l'antagonista compete per lo stesso recettore con la sostanza agonista. Entrambe le sostanze si possono legare, mediante legami reversibili, allo stesso recettore ed è proprio per questo che si crea una sorta di competizione tra le due. In base alla concentrazione delle due sostanze, sarà in grado di legarsi al recettore la sostanza presente a concentrazione maggiore.

Nel caso di antagonismo di tipo *non competitivo* le sostanze antagoniste si vanno a legare al recettore con un legame di tipo covalente, quindi irreversibile. Ciò vuol dire che una volta che la sostanza si lega covalentemente al recettore non la si può più staccare dal sito di legame, nemmeno aumentando la concentrazione della sostanza agonista.

Per valutare quale tipo di antagonismo si instaura tra il rinvanil e l'antagonista capsazepina abbiamo valutato come cambia l'effetto di ipotermia indotta dal rinvanil, somministrato i.p. a diverse concentrazioni, in presenza della capsazepina 50 µg (Fig. 4.1.4). L'effetto inibitorio della capsazepina risulta sormontabile aumentando la dose di rinvanil indicando un effetto di inibizione di tipo competitivo.

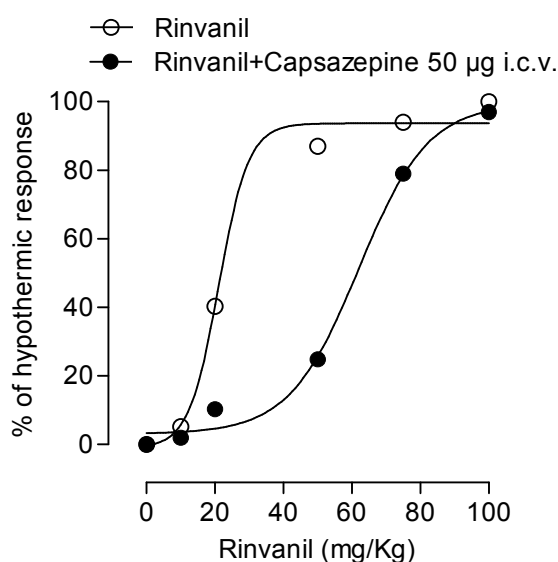


Figura 4.1.4. Effetto del rivani a diverse concentrazioni sul tono inibitorio della capsazepina.

Per avere informazioni sul meccanismo attraverso il quale rinvanil altera la termoregolazione nel topo, abbiamo analizzato il consumo di O₂ e la temperatura cutanea, a livello della coda, come indice rispettivamente del metabolismo basale e del tono vascolare. Abbiamo osservato che rinvanil reduce sia il consumo di O₂, durante una registrazione di 20 minuti (Fig. 4.1.5 A e B), sia la temperatura cutanea (Fig. 4.1.6).

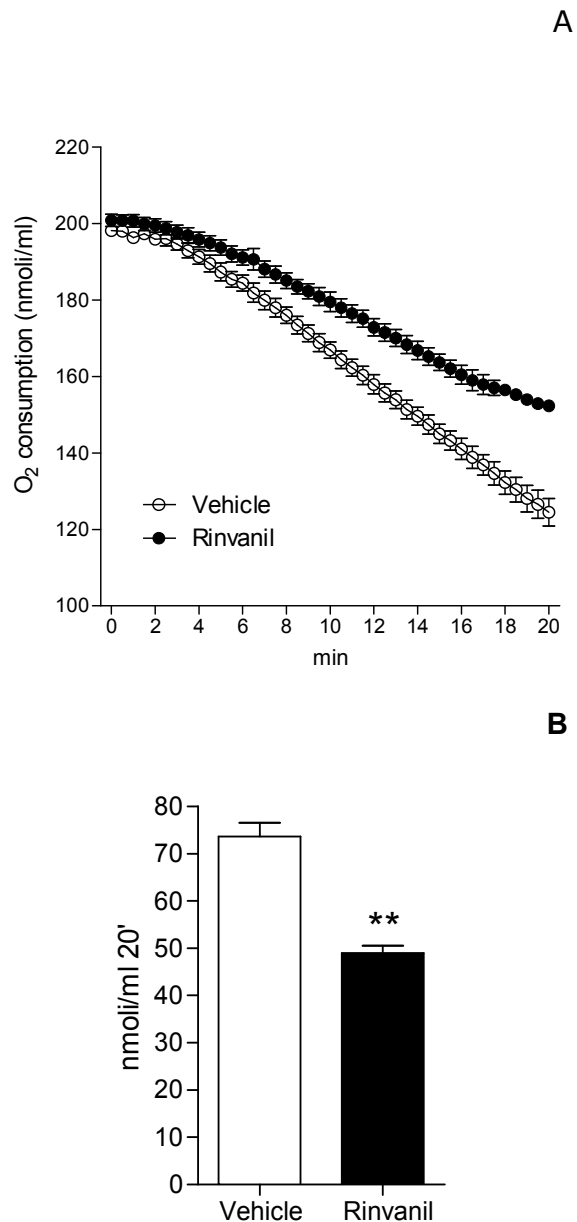


Figura 4.1.5. Effetto del rinvanil sul consumo di O₂ espresso su una scala temporale A) o come consumo totale nei 20 minuti di registrazione B).

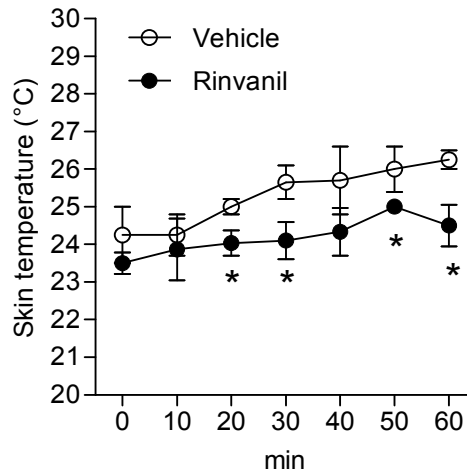


Figura 4.1.6. Effetto del rinvanil sulla temperatura cutanea nel topo

Effetto del rinvanil nel danno da ischemia-riperfusione cerebrale.

Per valutare se l'attivazione dei recettori TRPV1, indotta dal rinvanil, possa apportare un'ipotermia neuroprotettiva nel danno da ischemia cerebrale, abbiamo valutato gli effetti del composto in topi soggetti ad occlusione transiente dell'arteria cerebrale media (MCAo). Come dimostrato in figura 4.1.7, l'ipotermia indotta dal rinvanil alla dose di 25 mg/kg, in topi sottoposti ad 1 ora di MCAo, è simile a quella indotta nei topi sham ma mantenuta più a lungo (6.5 ± 0.8 e 2.5 ± 0.2 ore rispettivamente), indice del fatto che l'ischemia cerebrale rende gli animali più sensibili a l'ipotermia indotta da stimolazione dei recettori TRPV1.

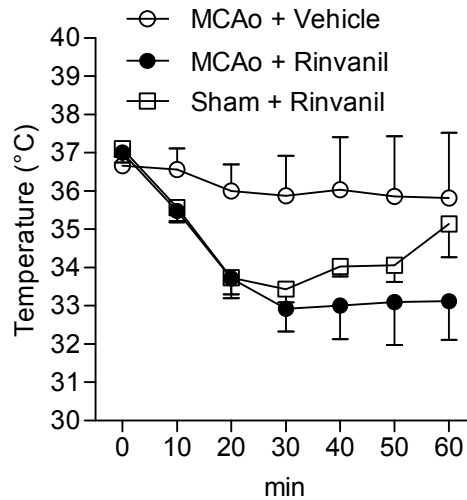


Figura 4.1.7. Effetto del rinvanil sulla temperatura corporea in topi soggetti ad 1 ora di MCAo.

Le somministrazioni di rinvanil comunque non alterano i parametri fisiologici come pressione arteriosa, paO_2 , $paCO_2$ e pH del sangue né il flusso sanguigno cerebrale durante il periodo di ischemia e riperfusione (dati non mostrati). In accordo con la neuroprotezione ischemica da ipotermia, i volumi di infarto di topi soggetti a 1 ora MCAo/24 ore di riperfusione sono significativamente ridotti negli animali trattati con rinvanil alla dose di 25 mg/kg ($74 \pm 12 \text{ mm}^3$ negli animali controllo e $49 \pm 8 \text{ mm}^3$ in quelli trattati con rinvanil; $n=8/\text{gruppo}$, $p<0.05$) (Fig. 4.1.8 A e B). Per assicurarci che la neuroprotezione fosse dovuta all'effetto ipotermico, e non ad altri effetti centrali e/o periferici della stimolazione dei recettori TRPV1, abbiamo analizzato la neurodegenerazione ischemica in topi trattati con rinvanil ma artificialmente mantenuti alla temperatura fisiologica di 37°C . In questo caso il rinvanil non è in grado di ridurre i volumi ischemici in questi animali (Fig. 4.1.8 A e B).

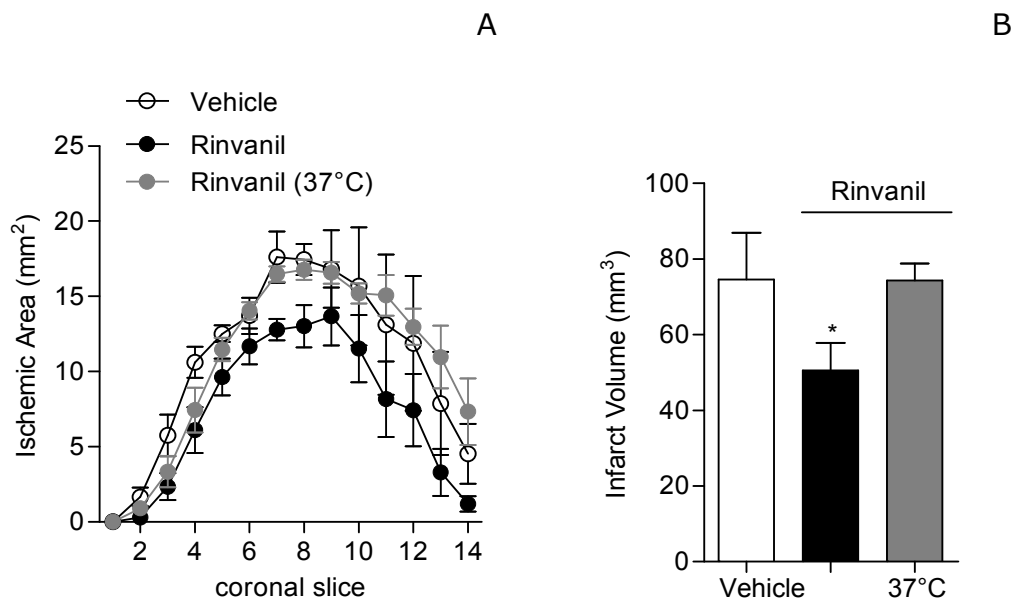


Figura 4.1.8. Effetto del rinvanil sulle aree A) ed i volumi B) di infarto in topi soggetti ad 1 ora di MCAo/24 ore di riperfusione.

Quanto il composto è testato in topi soggetti ad un insulto ischemico ed a tempi di riperfusione prolungati (1,5 ore MCAo/48 ore di riperfusione), la riduzione dei volumi di infarto dovuta all'agonista dei recettori TRPV1 è ancora evidente (94 ± 4 mm³ negli animali controllo e 76 ± 5 mm³ in quelli trattati con rinvanil; $n = 8$ /gruppo, $p < 0.001$) ed avviene con un meccanismo dipendente da l'ipotermia (Fig. 4.1.9).

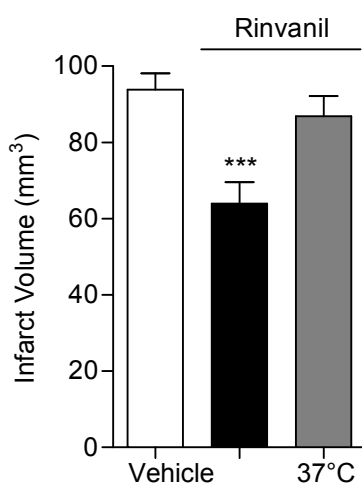


Figura 4.1.9. Effetto del rinvanil sui volumi di infarto in topi soggetti ad 1,5 ore di MCAo/48 ore di riperfusione.

Per correlare la rilevanza clinica della neuroprotezione ischemica indotta dai recettori TRPV1, abbiamo analizzato gli effetti di più somministrazioni di rinvanil in un modello di trattamento post-ischemico. Con questo fine, topi sono sottoposti a 1 ora MCAo/24 ore di riperfusione sono stati trattati con rinvanil alla dose di 25 mg/kg in una finestra terapeutica di 8 ore dall'occlusione della cerebrale media, per un totale di 5 somministrazioni (Fig. 4.1.10). Anche se le somministrazioni sono state eseguite quando la temperatura superava i 34°C, abbiamo osservato che l'effetto ipotermico di somministrazioni ripetute diminuiva in ampiezza, suggerendo una desensitizzazione dei recettori TRPV1.

Ciò nonostante, gli animali soggetti a questo modello di trattamento post-ischemico, dimostravano aree e volumi ischemici ridotti se comparati con gli animali trattati con il solo veicolo (79.5 ± 7 negli animali controllo e $43 \pm 12 \text{ mm}^3$ in quelli trattati con rinvanil; $n = 8/\text{gruppo}$, $p < 0.05$) (Fig. 4.1.11 A e B).

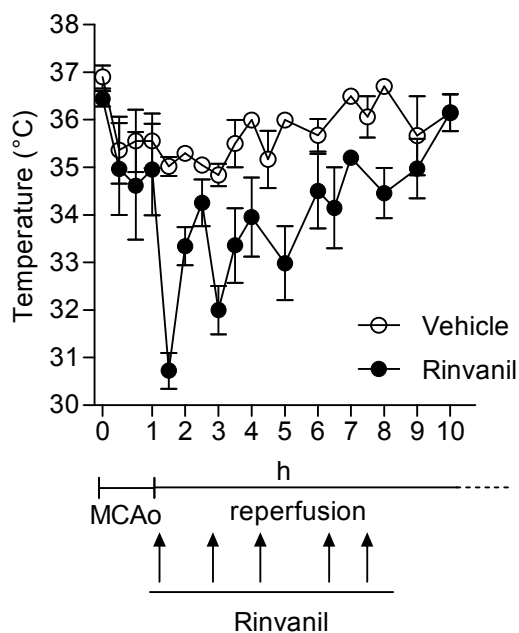


Figura 4.1.10. Effetto di somministrazioni ripetute di rinvanil sulla temperatura corporea in topi soggetti ad 1 ora di MCAo/24 ore di riperfusione.

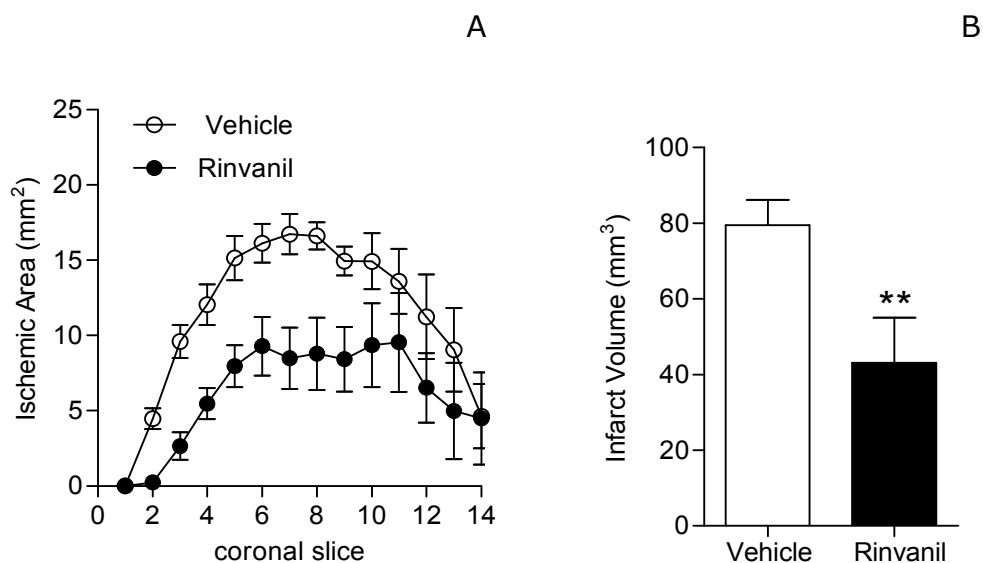


Figura 4.1.11. Effetto di somministrazioni ripetute di rinvanil sulle aree A) ed i volumi B) di infarto in topi soggetti ad 1 ora di MCAo/24 ore di riperfusione.

E' noto che l'attivazione dei recettori TRPV1 causa un importante aumento dei livelli di Ca²⁺ intracellulare nei neuroni. Di conseguenza, una massiva attivazione di questi recettori porta alla morte neuronale sia in vitro sia in vivo (Kim et al. 2005; Shirakawa et al. 2008). Come principio, questa proprietà può contrastare la neuroprotezione ischemica dipendente da ipotermia apportata dalla stimolazione TRPV1. Per rispondere a questo problema, abbiamo analizzato gli effetti di una dose di rinvanil più elevata, 50mg/kg, in topi sottoposti ad 1 MCAo/24 ore di riperfusione. La neuroprotezione ischemica è persa nei topi che hanno ricevuto questa dose i.p. al momento dell'occlusione dell'arteria cerebrale media (75.8±8 negli animali controllo e 84.5±13 mm³ in quelli trattati con rinvanil; n = 9/gruppo, p<0.05) (Fig. 4.1.12 A e B).

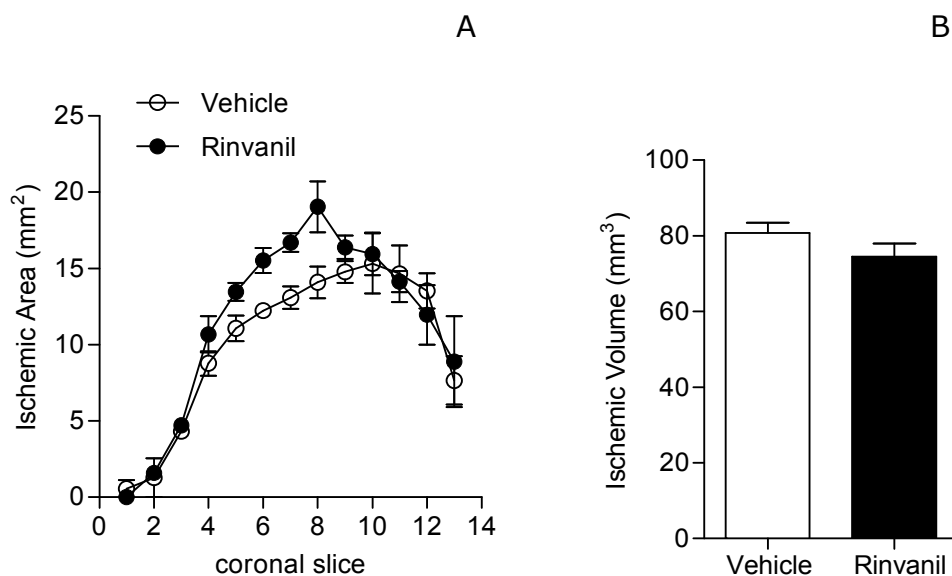


Figura 4.1.12. Effetto di elevate dosi di rinvanil sulle aree A) ed i volumi B) di infarto in topi soggetti ad 1 ora di MCAo/24 ore di riperfusione.

Tale risultato ci ha portato a domandarci se la neuroprotezione, indotta dal rinvanil alla dose di 25 mg/kg, fosse transitoria o permanente. Come dimostrato nella figura 4.1.13 (A e B), negli animali trattati con il veicolo, 7 giorni dopo MCAo, la dimensione dell'infarto risulta minore rispetto a quella misurata dopo 24 ore, in accordo con un lavoro precedente (Yamada et al. 2003). Comunque, la riduzione dell'area infartuata indotta dal rinvanil risulta ancora evidente (39.5 ± 8 negli animali controllo e 22 ± 4 mm³ in quelli trattati con rinvanil; $n = 7$ /gruppo, $p < 0.05$), indice di una neuroprotezione permanente.

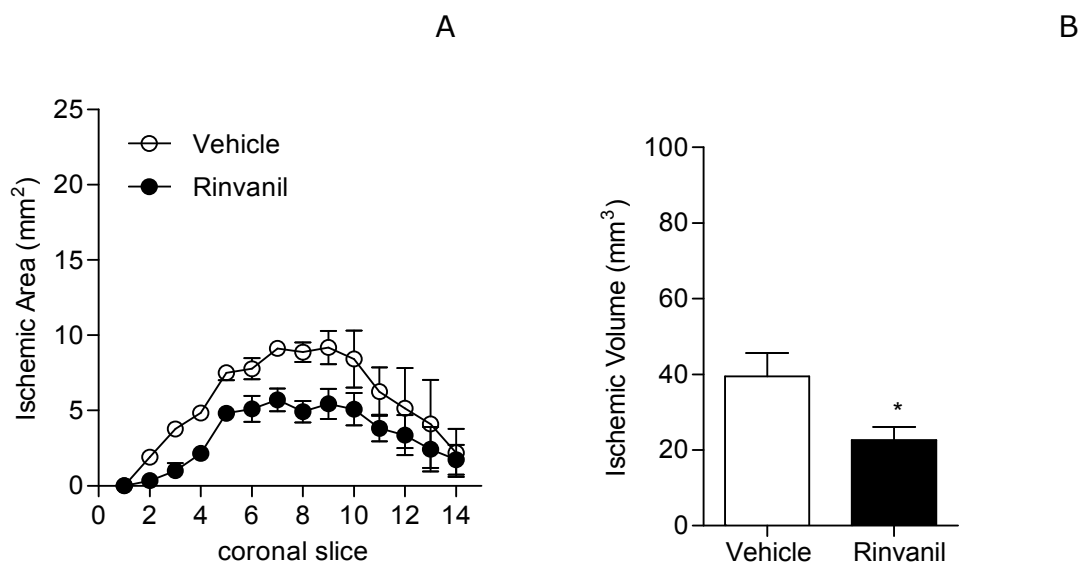


Figura 4.1.13 Effetto di 24 ore di ipotermia ottenuta mediante iniezioni ripetute (13) di rinvanil sulle aree A) ed i volumi B) di infarto in topi soggetti ad 1 ora di MCAo/7 giorni di reperfusion.

PARTE 2: REGOLAZIONE DELLA TERMOREGOLAZIONE DA AMP ED EFFETTO NEUROPROTETTIVO DA IPOTERMIA

AMP induce ipotermia attivando i recettori A1 ipotalamici

Inizialmente abbiamo trovato che somministrazioni i.p. di AMP sono in grado di ridurre la temperatura corporea nei topi con una dipendenza dalla dose, dalla temperatura dell'ambiente (RT) e con un effetto transitorio (Fig. 4.2.1 A e B).

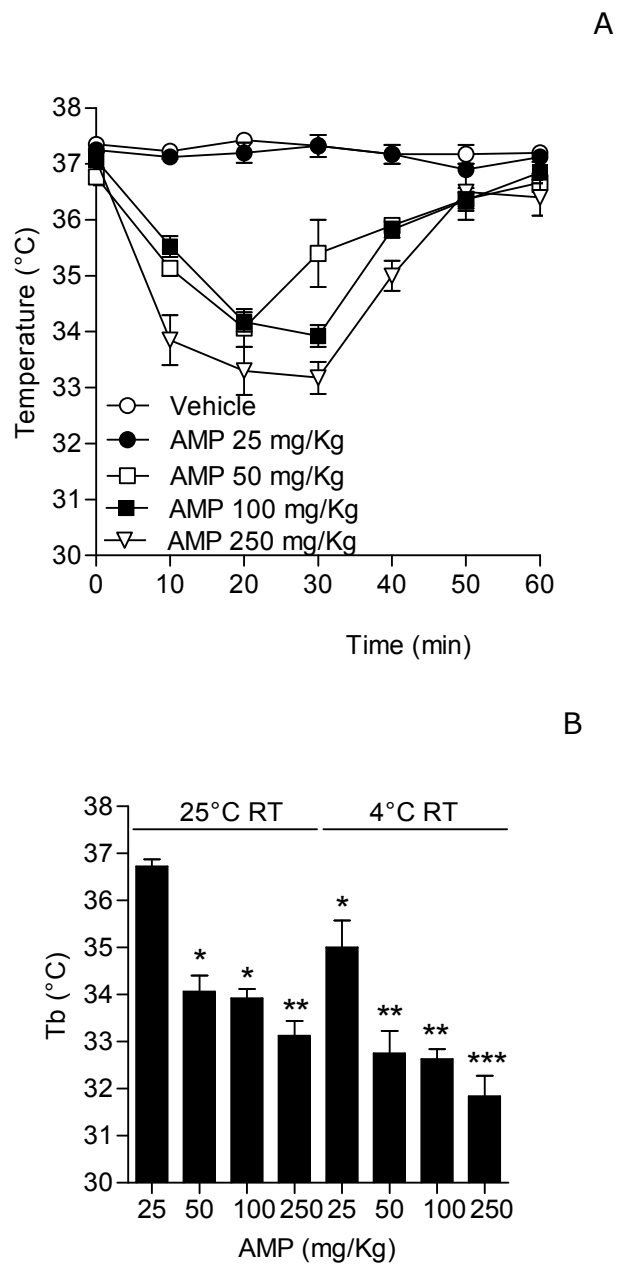


Figura 4.2.1 (A) Effetto di differenti dosi di AMP sulla temperatura corporea. (B) Effetto della temperatura ambientale sulla perdita di calore indotta da AMP.

Anche somministrazioni i.c.v. o intra-ipotalamiche, direttamente cioè all'interno della porzione anteriore preottica (POA) dell'ipotalamo, inducono un effetto ipotermizzante con caratteristiche simili (Fig. 4.2.2 A e B).

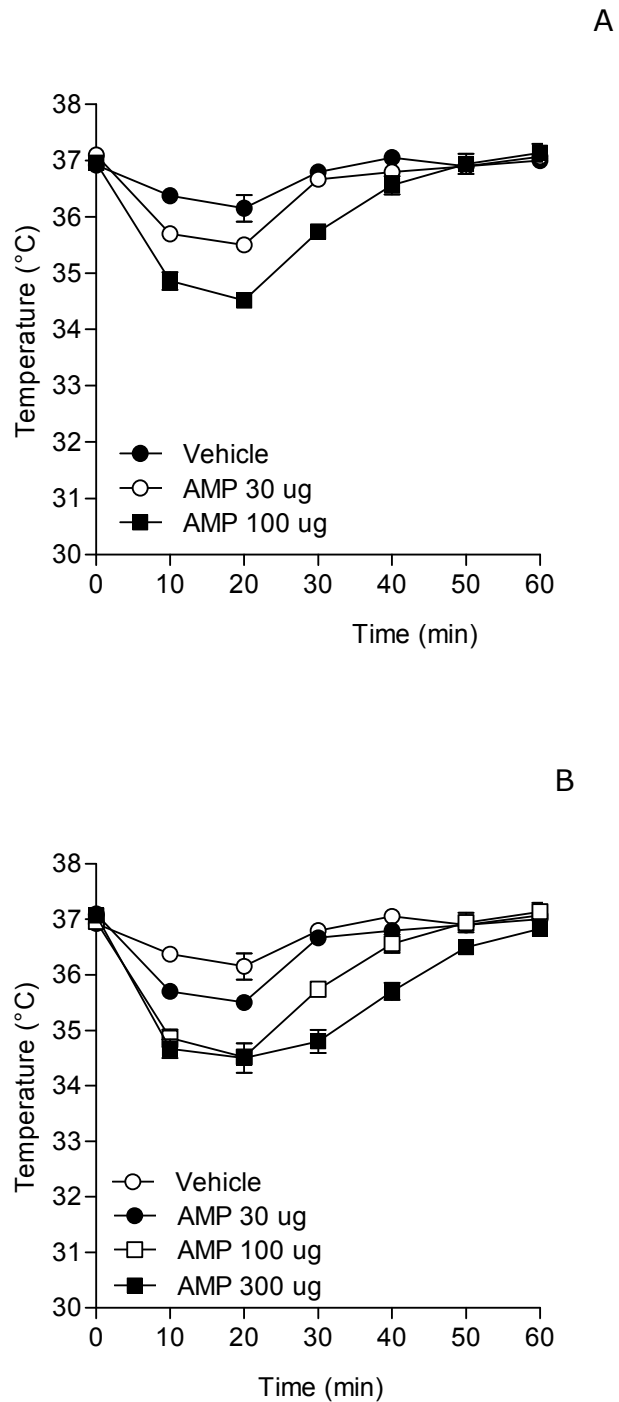


Figura 4.2.2. Effetto sulla temperatura corporea dell'AMP somministrato i.c.v. (A) o intraipotalamico (B).

E' da notare il fatto che a differenza con un lavoro precedente, eseguito

nel ratto (Zhang et al. 2009b), l'ipotermia indotta da AMP somministrato i.p. non risulta correlata con una diminuzione della pressione sanguinea nel topo, se non a dosi elevate. Infatti un effetto di ipotensione transitoria è stato registrato a partire da dosi uguali o superiori a 100 mg/kg (Fig. 4.2.3), nonostante dosi di 50 mg/kg siano in grado di indurre un'ipotermia completa.

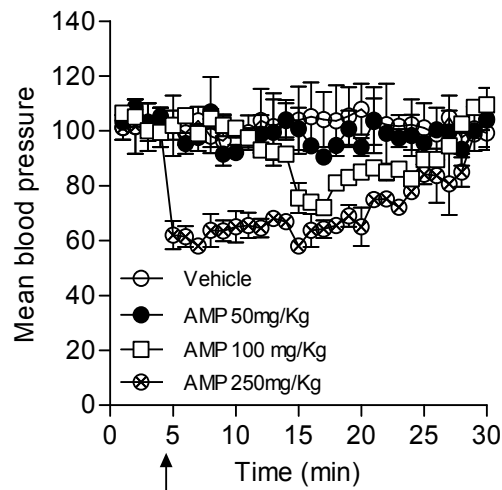


Figura 4.2.3 Effetto di AMP somministrato 4 minuti dall'inizio della registrazione (freccia) sulla pressione sanguinea nel topo.

Ulteriori parametri del sangue non risultano alterati dalla somministrazione di AMP 50 mg/kg, ad eccezione di una lieve iperglicemia (Tabella 1). Inoltre a dosi comprese tra 50 e 250 mg/kg non si verificano complicazioni nell'attività locomotoria mentre si può osservare un leggero effetto sedativo (dati non mostrati).

	Control	AMP
Blood pH	7,21 ± 0.02	7,15 ± 0,07
Blood pCO ₂ (mmHg)	43,24 ± 3,56	52,17 ± 7,3
Blood pO ₂ (mmHg)	136,26 ± 8,2	131,32 ± 5,1
Blood Glucose (mg/dL)	194,04 ± 7,5	233,17 ± 12,7 *
Blood electrolytes (meq/L):		
K ⁺	4,44 ± 0,07	5,08 ± 0,76
Na ⁺	142,4 ± 0,75	142,17 ± 1,19
Ca ²⁺	5,16 ± 0,06	5,23 ± 0,1
Cl ⁻	121 ± 1,22	122,83 ± 1,19

Tabella 1. Effetto di AMP su diversi parametri ematici nel topo.

Siccome AMP extracellulare è rapidamente convertito in adenosina (Ado) (Colgan et al. 2006), abbiamo analizzato se l'attivazione del sistema purinergico possa essere il meccanismo responsabile dell'effetto ipotermizzante dipendente da AMP. Abbiamo trovato che il raffreddamento è completamente prevenuto da l'applicazione dell'antagonista A1R 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) 0.1 mg/kg iniettato i.p. Anche 50 µg dell'antagonista 8-sulfofenil teofillina (8-SPT), non permeabile alla barriera emato-encefalica, previene l'ipotermia, ma solo se somministrato i.c.v. Al contrario il bloccante A2AR SCH58261, 50µg i.c.v., non ha avuto nessun effetto (Fig.4.2.4).

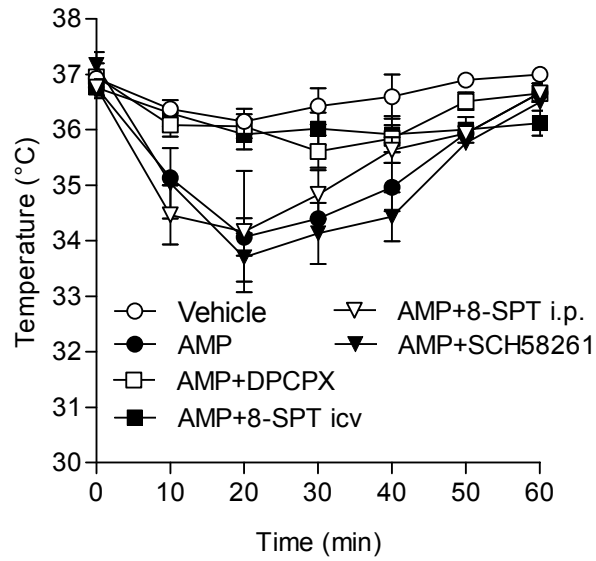


Figura 4.2.4. Effetto degli antagonisti A1R DPCPX e 8-sulfofenil teofillina e del bloccante A2AR SCH-58261 sulla temperatura corporea. Tutti i composti sono stati somministrati 10 minuti prima di AMP.

In linea con ciò, 10 µg del potente agonista A1R N⁶-Ciclopentiladenosina (CPA) sono in grado di indurre un profondo effetto ipotermizzante quando iniettati i.c.v. nel topo. 25 µg dell'agonista del recettore A1/P2Y1 2-methylthio-ADP i.c.v. non hanno effetti di raffreddamento, permettendoci di escludere il coinvolgimento di tale recettore dimerico (Nakata et al. 2005). Il coinvolgimento dei recettori A3R è stato infine escluso dato che, tali recettori, sono insensibili all' antagonismo del DPCPX (Fishman et al. 2011) (Fig. 4.2.5).

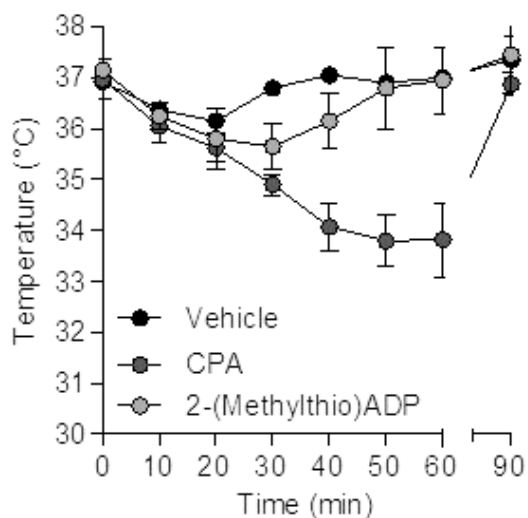
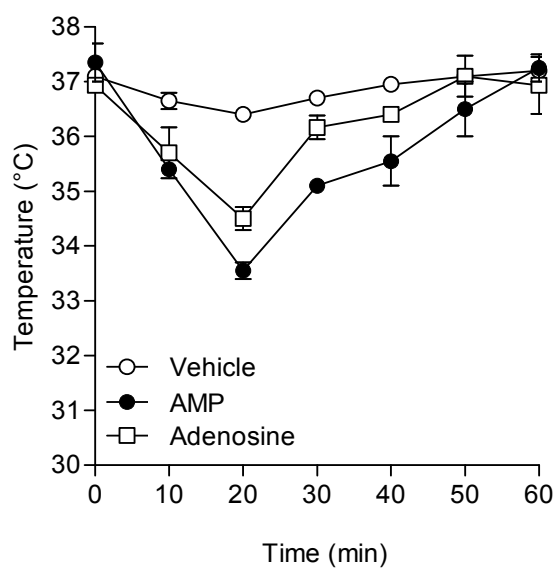


Figura 4.2.5. Effetto dell'agonista A1R N⁶-ciclopentiladenosina o dell'agonista A1/P2Y1 2-methylthio-ADP sulla temperatura corporea. I composti sono somministrati a T=0.

Sebbene questi dati indicano un coinvolgimento esclusivo dei A1R, con nostra sorpresa abbiamo trovato che somministrazioni di Ado inducono un effetto ipotermizzante minore rispetto all'AMP quando somministrati entrambi alla dose di 50 mg/Kg i.p. e 30 µg i.c.v. (Fig. 4.2.6 A e B).

A



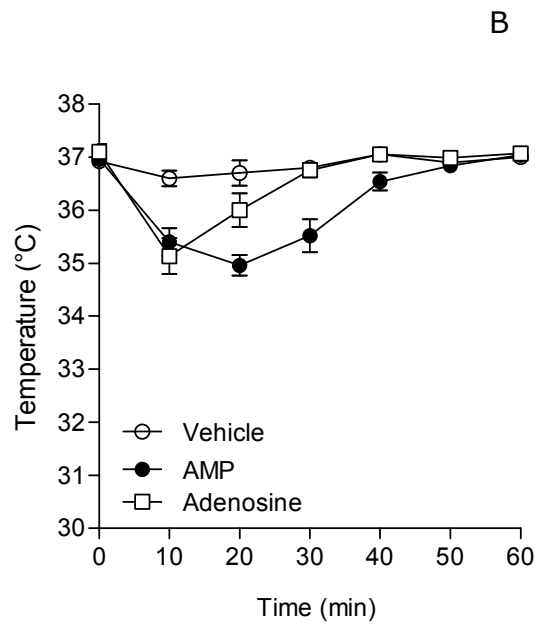


Figura 4.2.6. Comparazione dell'effetto ipotermizzante tra AMP ed Ado somministrati i.p. (A) o i.c.v. (B).

Abbiamo quindi ipotizzato che questo possa essere dovuto al rapido uptake di Ado da parte dei trasportatori equilibrativi per i nucleosidi (ENTs) (Huber-Ruano and Pastor-Anglada 2009). In linea con questa interpretazione, sia 10 mg/kg di dipiridamolo (bloccante ENT non specifico) i.p. che 50µg di nitrobenziltioinosina (bloccante ENT specifico) i.c.v. aumentano l'effetto ipotermizzante di Ado (Fig. 4.2.7).

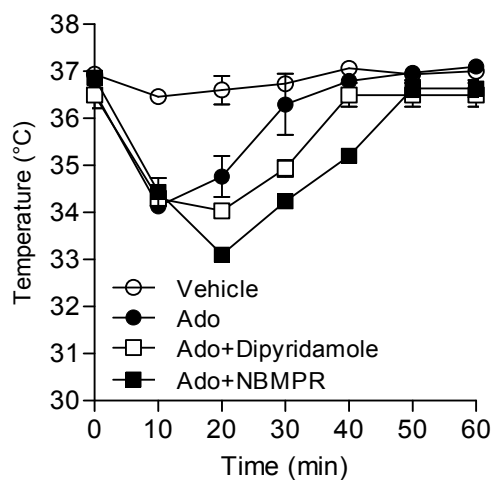


Figura 4.2.7. Effetto dell'inibitore ENTs specifico nitrobenziltioinosina (NBMPR) e non specifico dipiridamolo su l'ipotermia indotta da Ado.

Dopo di ciò abbiamo testato l'effetto del metilene-ADP (AMPCP), un classico inibitore della 5'-nucleotidasi (l'enzima di membrana responsabile della conversione extracellulare di AMP in Ado) (Colgan et al. 2006; Lovatt et al. 2012), ed abbiamo trovato che anche questo composto risulta in grado di ridurre in maniera dose dipendente la temperatura corporea nel topo. La diminuzione di temperatura risulta simile a quella indotta da AMP ma mantenuta per tempi più lunghi. Da notare che, somministrazioni di 0.1 mg/kg di DPCPX i.p. risultano in grado di contrastare l'effetto di diminuzione della temperatura indotto da 50µg di AMPCP somministrato i.c.v. (Fig. 4.2.8).

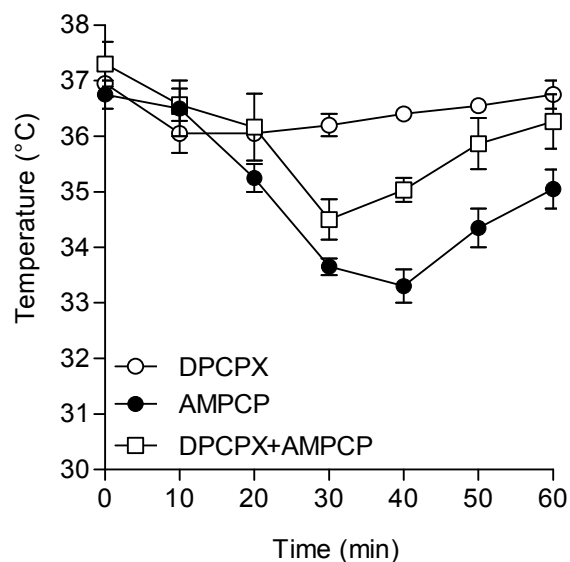


Figura 4.2.8. L'antagonista A1R DPCPX contrasta l'effetto inibitorio dell'AMPCP sulla temperatura corporea.

Abbiamo valutato anche se AMPCP, incrementando i livelli di AMP endogeni, fosse in grado di alterare la pressione sanguinea. Somministrazioni i.c.v. di AMPCP a dosi in grado di indurre ipotermia (50-100 µg) non sono in grado di modificare significativamente la pressione dei topi (Fig. 4.2.9.).

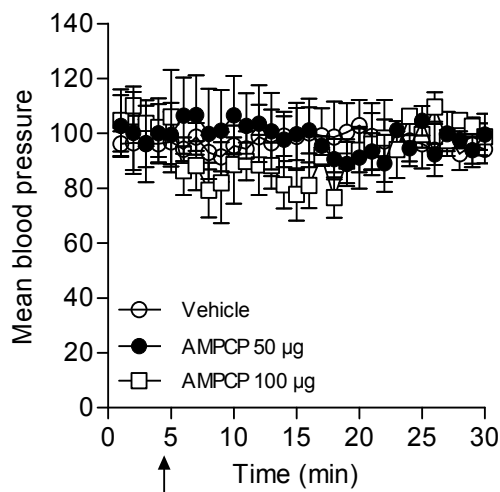


Figura 4.2.9. Effetto di somministrazioni di AMPCP sulla pressione sanguinea

Quando AMPCP ed AMP, alla dose di 50 µg i.c.v. e 50 mg/kg i.p. rispettivamente, sono somministrati contemporaneamente, si verificava un effetto additivo (Fig. 4.2.10).

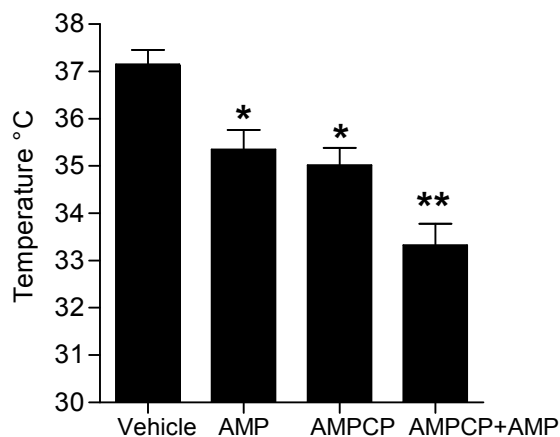


Figura 4.2.10 Effetto additive di AMPCP e AMP sulla temperatura corporea.

Tutti questi dati ci indicano che sia AMP esogeno che quello endogeno sono in grado di indurre ipotermia, attraverso una stimolazione diretta dei recettori A1R nel topo.

Abbiamo notato con interesse che il ratto risulta meno sensibile all'effetto ipotermizzante di AMP (Fig. 4.2.11).

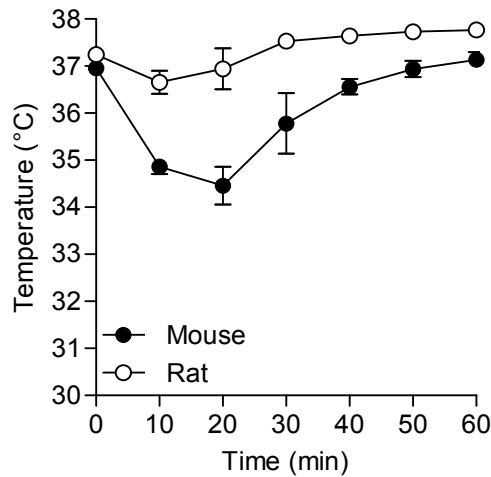


Figura 4.2.11 Effetto ipotermico di AMP (50 mg/kg i.p.) nel topo e nel ratto.

Comunque, AMPCP (50µg i.c.v.) risulta in grado di ridurre la temperatura corporea nel ratto e lo rende sensibile all'effetto di raffreddamento da parte di AMP (50 mg/kg i.p.) (Fig. 4.2.12).

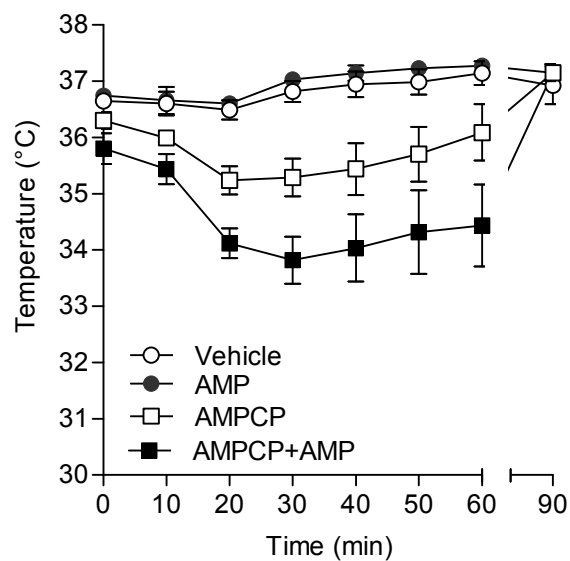


Figura 4.2.12. Effetto di AMPCP, AMP o entrambi i composti sulla temperatura corporea nel ratto.

Questo suggerisce che la ridotta sensibilità del ratto ad AMP sarebbe dovuta all'abilità di questo animale di degradare rapidamente AMP ad Ado. In linea con ciò, sia i livelli del trascritto sia l'attività enzimatica della 5'-NT risultano più elevati nell'ipotalamo di ratto che in quello di topo (Fig. 4.2.13 A e B).

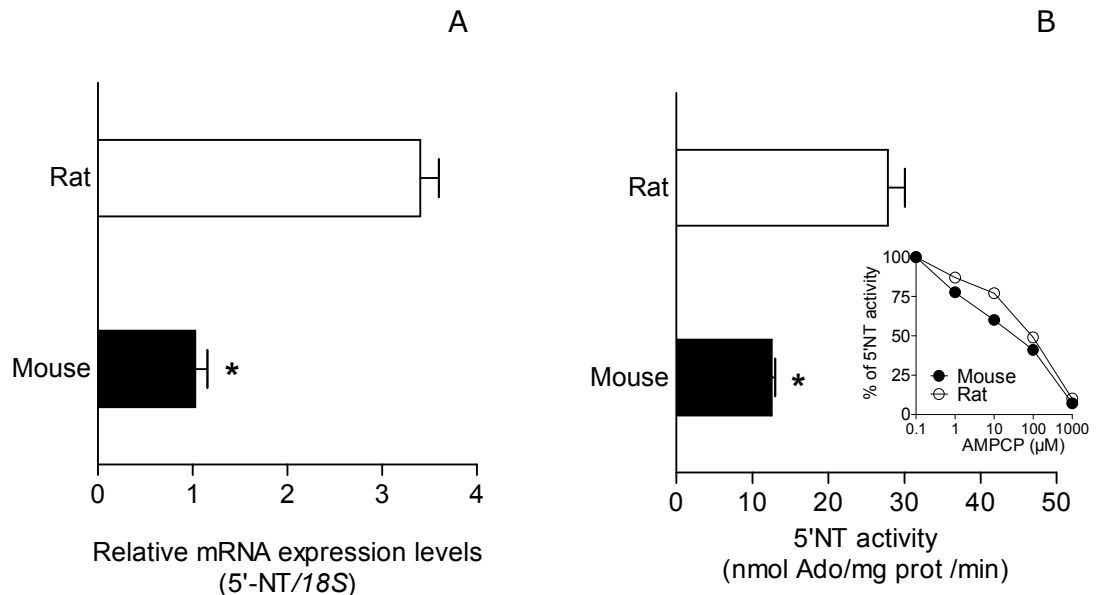


Figura 4.2.13. (A) Livelli di espressione della 5'-NT nell'ipotalamo di ratto e topo misurati mediante RT-PCR. (B) Attività della 5'-NT nell'ipotalamo di ratto e topo. L'attività è completamente inibita dalla presenza di AMPCP al saggio enzimatico (inserto B).

Nel complesso questi risultati suggeriscono che l'enzima 5'-NT, a livello ipotalamico, svolge un ruolo chiave nella termoregolazione regolando il rapporto tra le concentrazioni extracellulari di AMP ed Ado nella porzione preottica dell'ipotalamo. Questi dati indicano inoltre che l'attività ipotalamica della 5'-NT detta la sensibilità di una data specie all'effetto ipotermizzante di AMP, e fornisce la spiegazione del perché alte dosi del nucleotide risultano necessarie per indurre l'ipotermia nel ratto (Zhang et al. 2009b).

AMP diminuisce l'attività sinaptica eccitatoria in modo A1R dipendente.

Per correlare gli inaspettati risultati riguardanti la capacità dell'AMP esogeno, o dell'AMP accumulato mediante l'inibizione della 5'-NT, di attivare direttamente i recettori A1 all'interno del cervello dei roditori, abbiamo deciso di analizzare gli effetti del nucleotide nella regione CA1 dell'ippocampo, un circuito neuronale ben caratterizzato nel quale la stimolazione A1R riduce l'attività sinaptica eccitatoria (Wetherington and Lambert 2002). Abbiamo trovato che AMP riduce il potenziale di campo eccitatorio post-sinaptico (fEPSP) sia in fettine provenienti da l'ippocampo di topo sia di ratto in maniera DPCPX sensibile (Fig. 4.2.14 A-C).

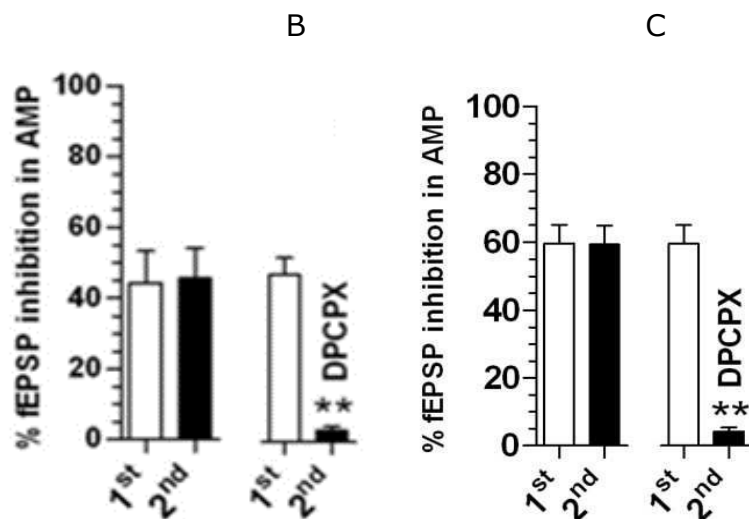
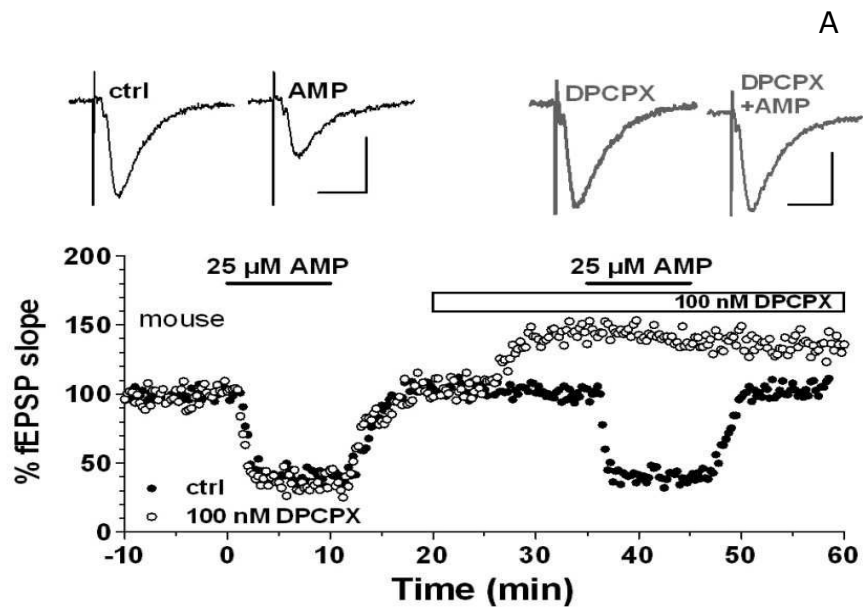
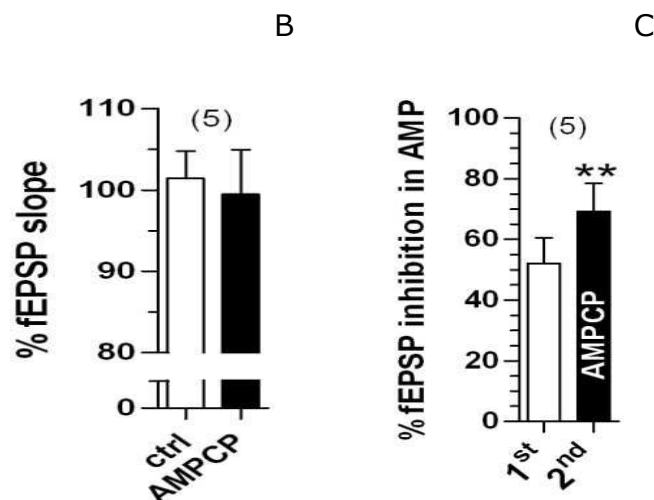
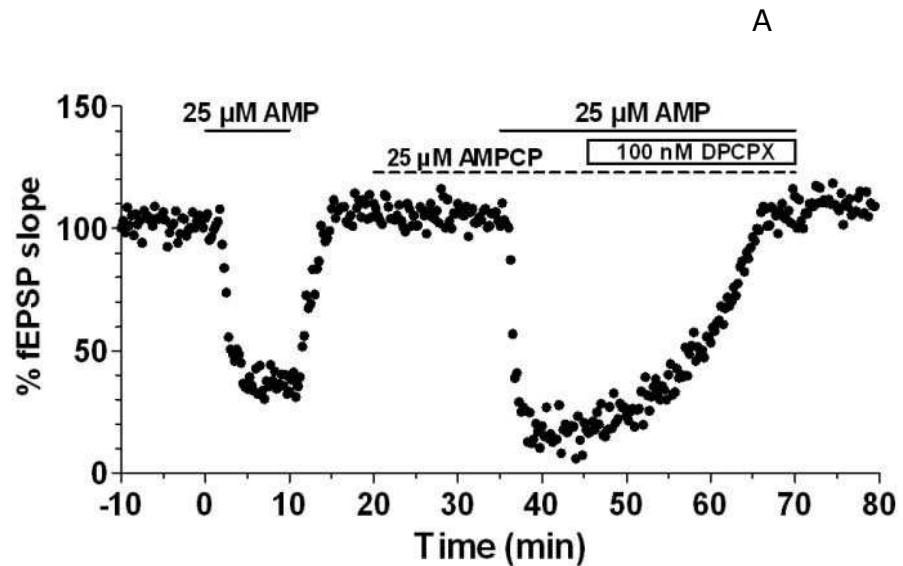
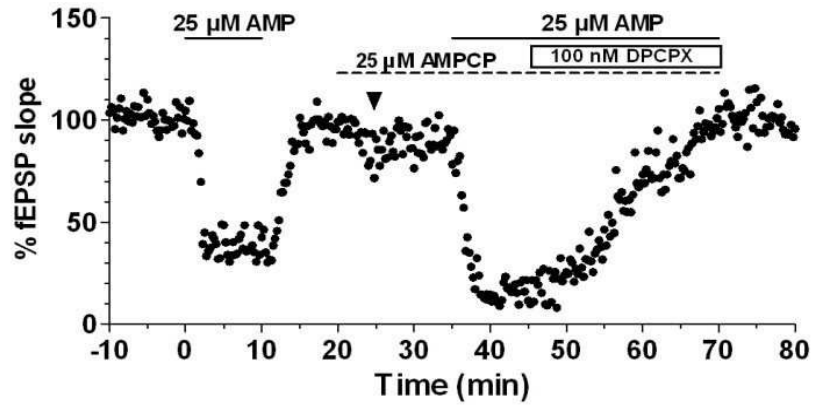


Figura 4.2.14. (A) Tracciato rappresentativo l'effetto di AMP da solo o in combinazione con DPCPX sul fEPSP registrato nella regione CA1 di fettine di ippocampo di topo. Tracce rappresentative il fEPSP, registrate sotto i diversi trattamenti, sono mostrate sopra il tracciato. Barre della scala: 10 ms, 0.5 mV. Quantificazione dell'effetto di AMP 25 μ M da solo o in presenza di DPCPX 100 nM sul fEPSP nella regione CA1 nelle fettine di ippocampo di topo (B) o di ratto (C).

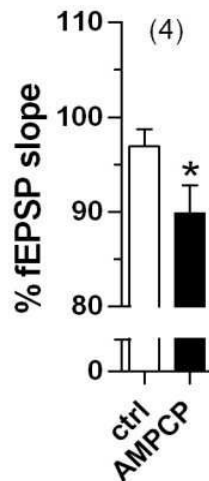
In accordo con i dati ottenuti in vivo, AMPCP potenzia l'inibizione della neurotrasmissione, dipendente da AMP, sia in fettine cerebrali di topo (Fig. 4.2.15 A-C) sia di ratto (Fig. 4.2.15 D-F), indice di un'attiva degradazione dell'AMP esogeno da parte della 5'-NT.



D



E



F

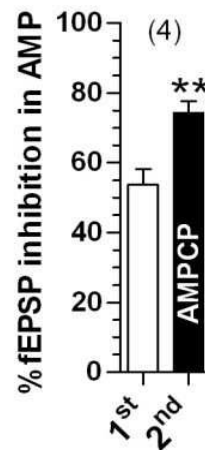


Figura 4.2.15. (A) La riduzione del fEPSP nella CA1 di fettine di ippocampo di topo, indotta da AMP 25 μ M, è potenziata da AMPCP 25 μ M ed inibita da DPCPX 100nM. Quantificazione dell'effetto di AMPCP 25 μ M da solo (B) o in presenza di AMP 25 μ M (C) sul fEPSP in fettine di ippocampo di topo. (D) La riduzione del fEPSP nella CA1 di fettine di ippocampo di ratto, indotta da AMP 25 μ M, è potenziata da AMPCP 25 μ M ed inibita da DPCPX 100nM. Quantificazione dell'effetto di AMPCP 25 μ M da solo (E) o in presenza di AMP 25 μ M (F) sul fEPSP in fettine di ippocampo di ratto.

Da sottolineare il fatto che AMPCP da solo risulta sufficiente per ridurre il

fEPSP nelle fettine di ratto (Fig. 4.2.15 D, E), mentre risulta privo di effetto in quelle di topo (Fig. 4.2.15 A, B).

Questo dato, insieme all'evidenza che i livelli di espressione della 5'-NT risultano circa 2 volte più alti nell'ippocampo del ratto che del topo (Fig. 4.2.16), conferma ulteriormente l'ipotesi che la conversione di AMP in Ado a livello extracellulare, da parte della 5'-NT, è più attiva nel cervello di ratto che in quello di topo.

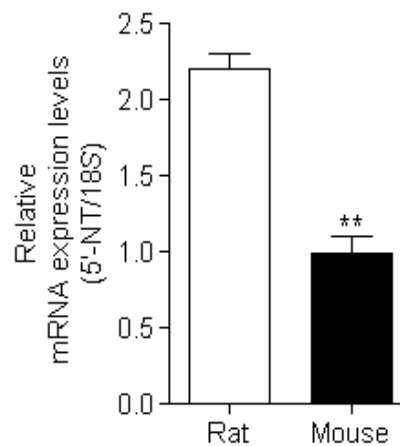


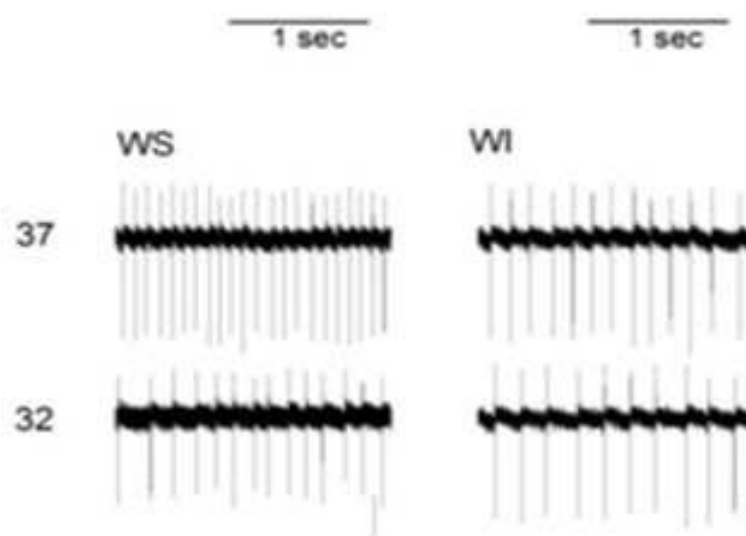
Figura 4.2.16. Valutazione mediante RT-PCR dei livelli di espressione dell'enzima 5'-NT nell'ippocampo di ratto e di topo.

Questi dati indicano che le aumentate concentrazioni di AMP, a livello dello spazio extracellulare cerebrale, portano ad un grado di attivazione degli A1R maggiore rispetto a quello indotto da un simile aumento nelle concentrazioni di Ado. Tutto ciò è in accordo con la nozione che AMP, a differenza di Ado, non viene internalizzato nelle cellule dai trasportatori dei nucleosidi (Huber-Ruano and Pastor-Anglada 2009; Podgorska et al. 2005).

AMP riduce l'attività di firing spontaneo nei neuroni ipotalamici

Il passo successivo è stato quello di studiare se AMP influenza direttamente l'attività dei neuroni ipotalamici coinvolti nella termoregolazione. Numerose evidenze suggeriscono che nell'area preottica della porzione anteriore dell'ipotalamo di ratto (POA), due popolazioni di neuroni, caratterizzati da un firing spontaneo, chiamati warm-sensitive (WSN) e temperature-insensitive (TIN), sono gli effettori della termoregolazione ipotalamica (Boulant 2006; Morrison and Nakamura 2011). Nel ratto, i TIN rappresentano circa il 70% dei neuroni della POA e si comportano come un pace-maker della temperatura, dettando il set-point termoregolatorio. Al contrario, WSN sono circa il 20% dei neuroni della POA e sono ritenuti coinvolti nella risposta di perdita di calore (Boulant 2006; Morrison and Nakamura 2011). Mediante registrazioni elettrofisiologiche in single-cell dalla POA di fettine di ipotalamo di topo eseguite in acuto, abbiamo confermato l'esistenza di neuroni con attività spontanea anche in questa specie animale. Per identificare la possibile presenza di TIN e WSN, abbiamo valutato se l'attività di firing cambia quando la temperatura del bagnetto viene variata da 32 a 37°C. Abbiamo trovato che il firing dimostra una bassa sensibilità all'incremento di temperatura nel 86% delle cellule (TIN), mentre una minore popolazione di cellule, corrispondente al 14%, mostra un'alta sensibilità intrinseca al calore (WSN) (Fig. 4.2.17 A e B).

A



B

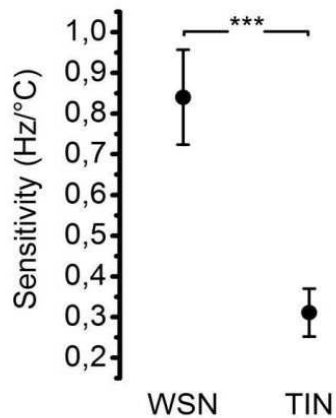
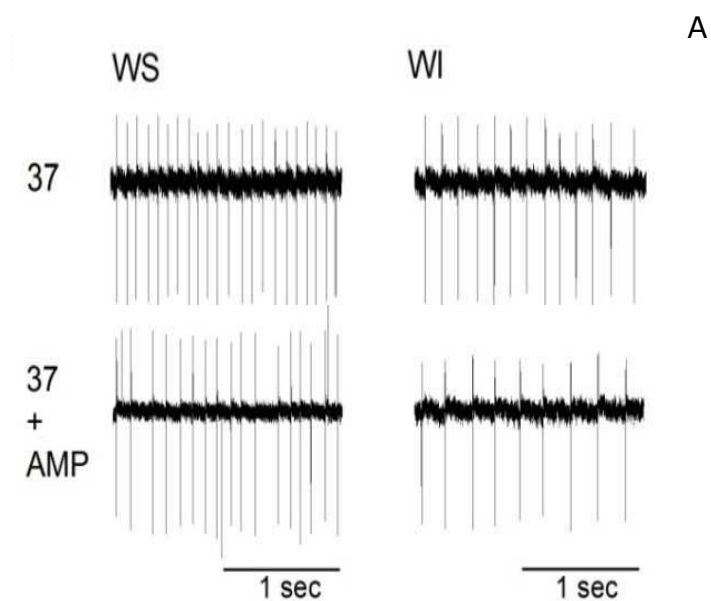


Figura 4.2.17. Effetto della temperature sulla frequenza spontanea di firing dei WSN e TIN in fettine di ipotalamo di topo. (A) Traccia rappresentativa l'attività spontanea a 32 e 37°C. (B) Sensibilità termica dei WSN e TIN quando la temperatura aumenta da 32 a 37°C.

L'evidenza che a 37°C l'attività di firing dei WSN sia 2 volte rispetto a quella dei TIN, consistente con i dati ottenuti nel ratto, (Boulant 2006) è un'ulteriore indice della distinta natura di queste due popolazioni neuronali. Per nostra conoscenza, questa è la prima evidenza che WSN e TIN esistono anche nell'ipotalamo del topo. Da notare che, AMP aggiunto alla soluzione del bagnetto risulta in grado di ridurre il firing spontaneo di entrambi, TIN e WSN (Fig. 4.2.18 A-D).



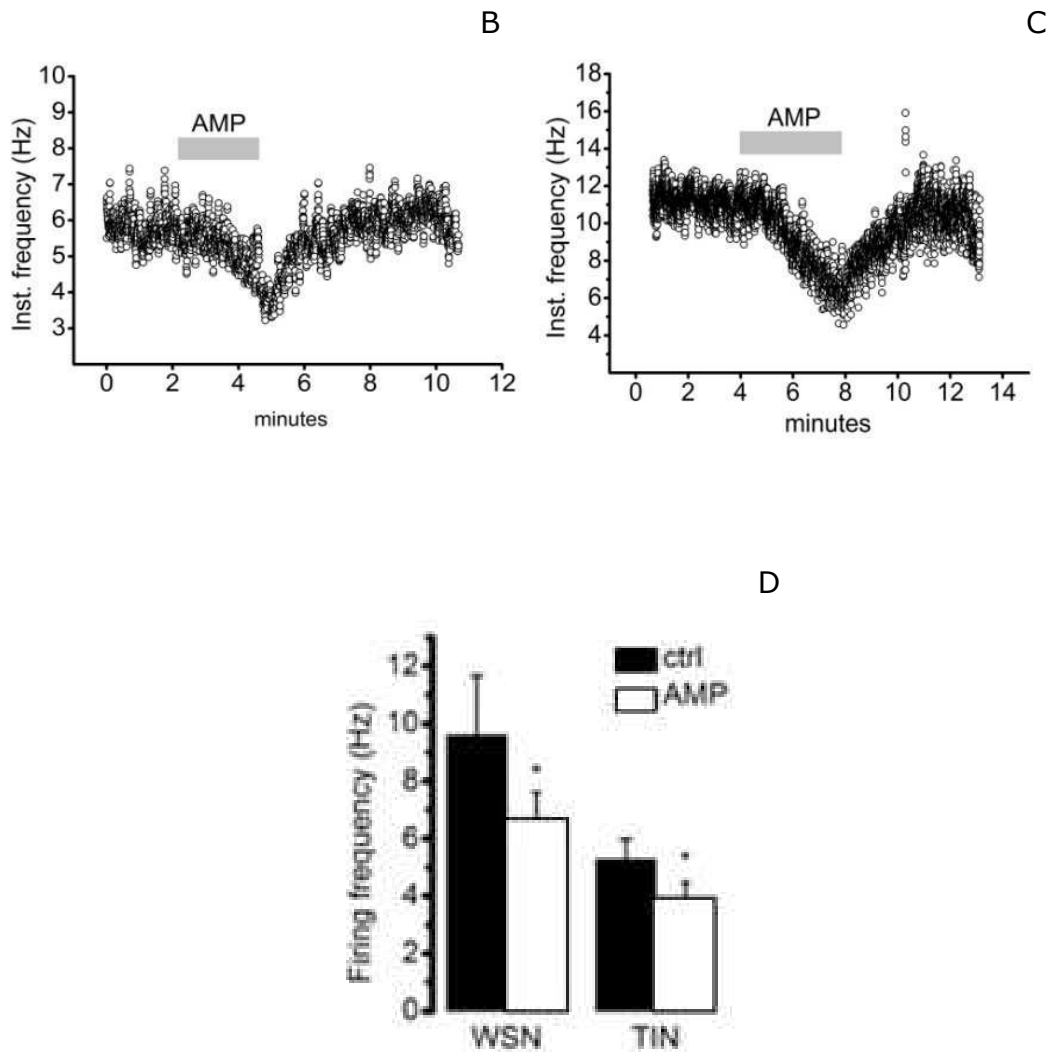


Figura 4.2.18. (A) Tracce rappresentative l'attività spontanea di firing dei TIN o WSN mantenuti a 37°C, in assenza o in presenza di AMP 50 μ M. Plot di frequenza mostrano l'effetto di AMP 50 μ M su l'attività di firing spontaneo dei TIN (B) o WSN (C) mantenuti a 37°C. (D) Effetto di AMP 50 μ M sulla frequenza spontanea di firing dei TIN e WSN nell'ipotalamo di topo.

E' possibile bloccare questo effetto utilizzando DPCPX (Fig. 4.2.19), indice del coinvolgimento dei recettori A1.

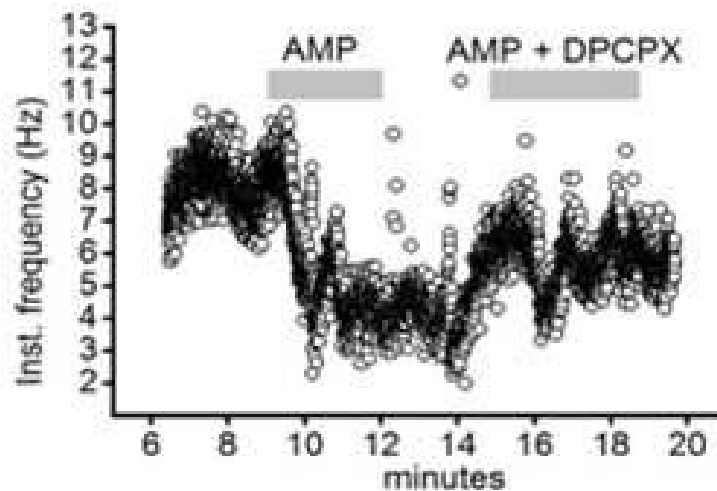


Figura 4.2.19 Plot di frequenza mostra l'effetto di AMP 50 μ M o AMP 50 μ M+DPCPX 1 μ M su l'attività di firing spontaneo dei WSN mantenuti a 37°C.

Dato che gli esperimenti in vivo dimostrano che AMP induce ipotermia agendo direttamente all'interno della POA, abbiamo ipotizzato che la soppressione dell'attività di firing nei TIN possa essere il meccanismo che sottostà all'effetto di raffreddamento indotto dal nucleotide. Infatti, l'attività dei TIN detta il set point ipotalamico della termoregolazione (Boulant 2006; Morrison and Nakamura 2011), e la riduzione della loro frequenza di firing porta ad un accomodamento verso temperature più basse del loro segnale di riferimento. Sintonizzando il set point ipotalamico verso temperature più basse, una serie di risposte autonome vengono messe in movimento, incluso la riduzione del metabolismo basale e del consumo di ossigeno. In linea con ciò, e con l'abilità di AMP di resettare la termogenesi a livello ipotalamico, abbiamo trovato che sia 50 mg/Kg di AMP i.p. sia 50 μ g di AMPCP i.c.v. sono in grado di ridurre il consumo di ossigeno nel topo (Fig. 4.2.20 A e B).

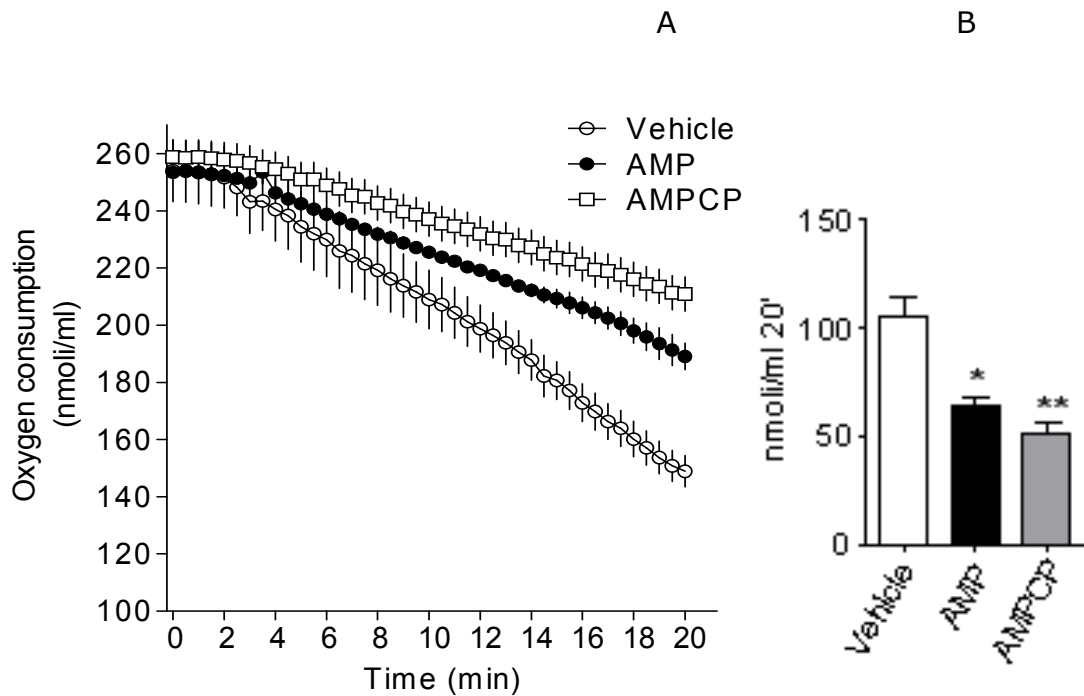


Figura 4.2.20. (A) Time course dell'effetto di AMP o AMPCP sul consumo di ossigeno nel topo. (B) Quantità totale di ossigeno consumata nei 20 minuti di registrazione dai tre gruppi di animali.

E' comunque da sottolineare come l'impatto negativo che AMP esercita su l'attività di firing dei WSN risulta in contrasto con l'effetto ipotermizzante del nucleotide. Infatti, in accordo con un modello proposto sulla termoregolazione ipotalamica (Boulant 2006), la riduzione dell'attività di firing dei WSN dovrebbe da un lato promuovere la ritenzione di calore e da l'altro contrastarne la perdita. Così, per meglio comprendere se l'inibizione dei WSN da parte di AMP in vitro possa avere un correlato funzionale in vivo, abbiamo analizzato se la risposta di perdita di calore dipendente da WSN possa essere compromessa in topi trattati con AMP. A questo scopo, abbiamo esposto i topi ad una temperatura ambientale di 40° C ed abbiamo valutato la risposta termoregolatoria. Come principio, il blocco della risposta di perdita di calore mediata dai WSN, da parte di AMP, dovrebbe compromettere la capacità degli animali di evitare l'ipertermia. Quando esposti a 40° C, i topi di controllo iniziano ad ansimare e sudare (particolarmente evidente nell'area periorale, dato non mostrato), così da limitare l'aumento della temperatura corporea a

38±0.7°C. Da segnalare, come stabilito da due valutatori in cieco, un simile effetto di ansimazione e sudorazione periorale si è verificato negli animali trattati con 50 mg/Kg di AMP i.p. (non mostrato). In accordo con ciò, gli animali trattati con AMP hanno subito un aumento di temperatura corporea simile agli animali che hanno ricevuto il veicolo (Fig. 4.2.21).

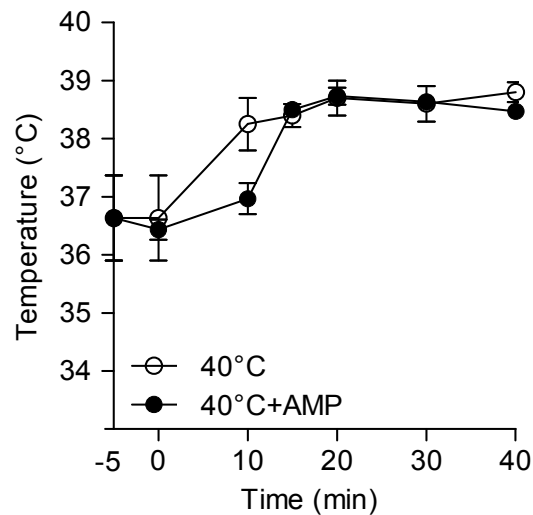


Figura 4.2.21. Effetto di AMP sulla risposta di perdita di calore in topi esposti a T=0 ad una temperatura esterna di 40°C.

Questi risultati pertanto dimostrano che l'inibizione dipendente da AMP dei WSN non compromette la risposta di perdita di calore nel topo, in linea con l'effetto ipotermico del nucleotide.

L'ipotermia indotta da AMP riduce il danno da ischemia cerebrale e la febbre

Data la rilevanza terapeutica dell'ipotermia sperimentale nella neuroprotezione ischemica (Yenari and Han 2012; Yenari and Hemmen 2010c), abbiamo analizzato se il raffreddamento dipendente da AMP può essere utilizzato per il trattamento dell'ischemia cerebrale a livello sperimentale. In topi soggetti ad 1 ora di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo)/24 ore di riperfusione, l'ipotermia dipendente da AMP 50 mg/Kg i.p., durante il periodo di ischemia, riduce i volumi di infarto. La neuroprotezione è persa nei topi trattati con la stessa dose di AMP ma artificialmente mantenuti a 37°C durante MCAo (Fig. 4.2.22 A e B), indice del fatto che l'ipotermia è il solo meccanismo attraverso il quale AMP induce neuroprotezione.

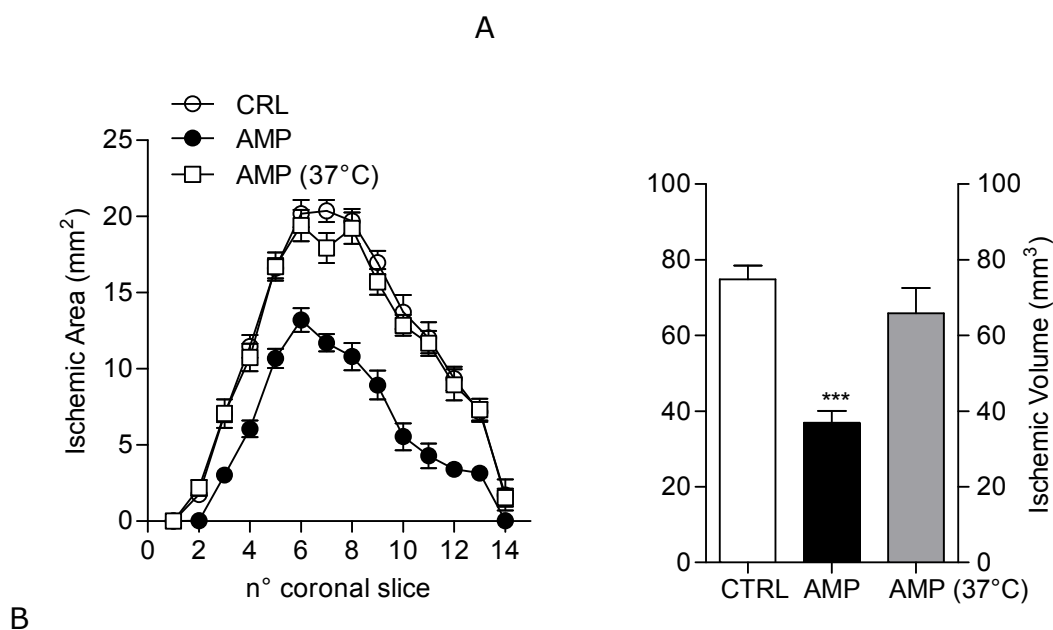


Figura 4.2.22 Effetto di somministrazioni intraischemiche di AMP sulle aree (A) ed i volumi (B) di infarto cerebrale, in topi soggetti a 1 ora MCAo/24 ore di riperfusione. La neuroprotezione ischemica è persa in topi trattati con AMP ma artificialmente mantenuti a 37°C.

Importante, anche le somministrazioni intraischemiche di 50µg di AMPCP i.c.v. inducono una neuroprotezione dipendente da ipotermia (Fig.4.2.23

A e B).

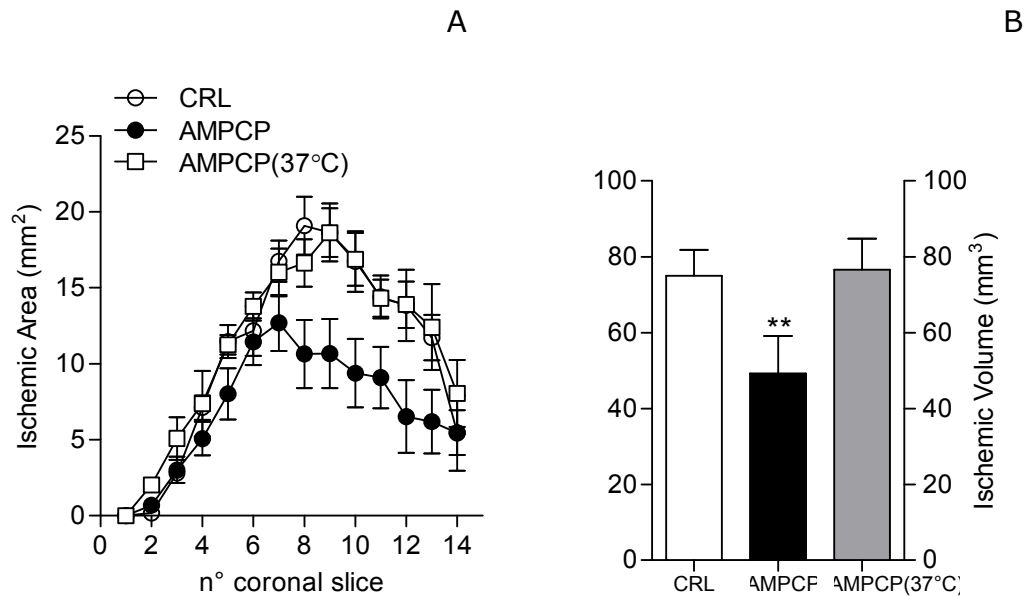


Figura 4.2.23. Effetto di somministrazioni intraischemiche di AMPCP sulle aree (A) ed i volumi (B) di infarto cerebrale, in topi soggetti a 1 ora MCAo/24 ore di riperfusione. La neuroprotezione ischemica è persa in topi trattati con AMP ma artificialmente mantenuti a 37°C.

Siamo poi passati a tempi di riperfusione e protocolli di trattamento più lunghi, per escludere la neuroprotezione temporanea e rafforzare il significato clinico dell'utilizzo di AMP per la terapia dell'ischemia cerebrale. Abbiamo trovato che in topi soggetti a 1 ora MCAo, protocolli di ipotermia post-ischemica/riperfusione di 10/24 ore o 24/72 ore non inducono lo sviluppo di tolleranza all'effetto ipotermico di AMP 50 mg/Kg i.p. (Fig.4.2.24. A e B).

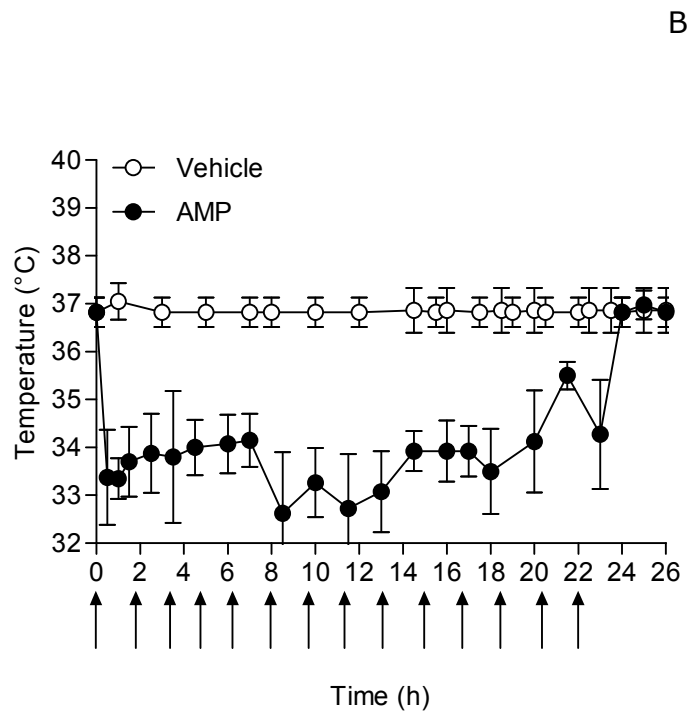
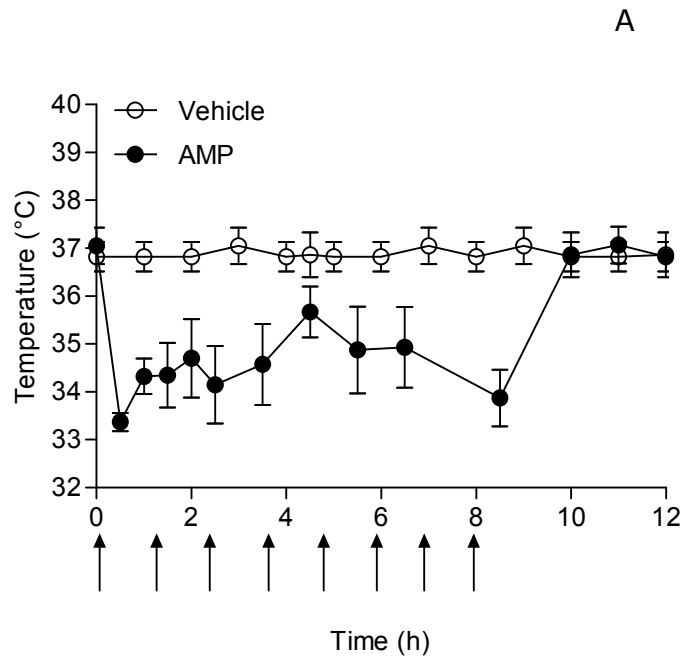


Figura 4.2.24. Temperatura corporea di topi soggetti a 1 ora MCAo e protocolli di post trattamento di 10 ore ipotermia/24 ore di riperfusione (A) o 24 ore ipotermia/72 ore di riperfusione (B) ottenuta con somministrazioni di AMP (freccie) ogni 90 minuti.

Da notare che entrambi i protocolli inducono protezione dal danno da ischemia cerebrale (Fig. 4.2.25. A-D).

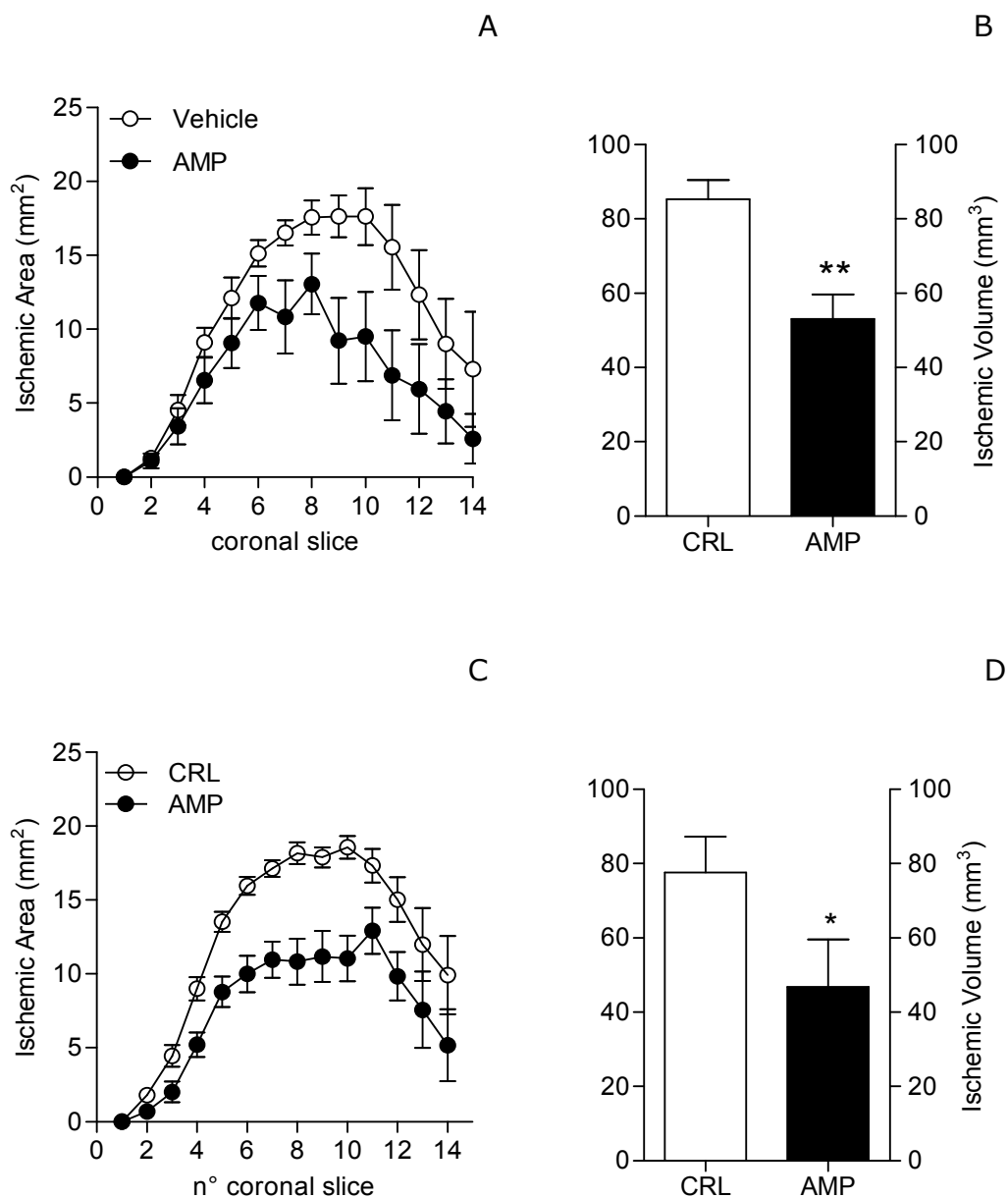
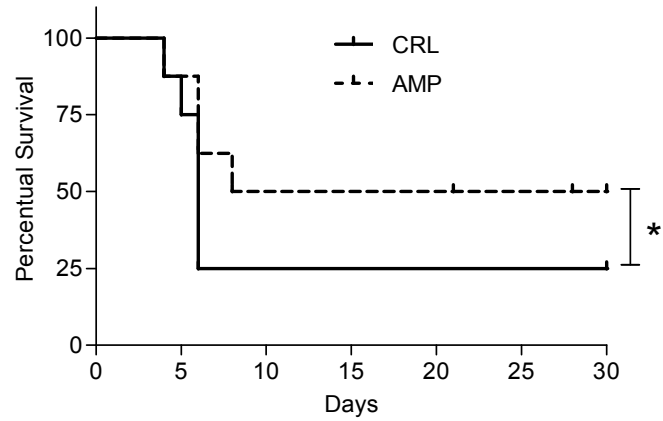


Figura 4.2.25. Effetto del protocollo di post-trattamento di 10 ore ipotermia/24 ore ri-perfusione sulle aree (A) ed i volumi (B) ischemici. Effetto del protocollo di post-trattamento di 24 ore ipotermia/72 ore ri-perfusione sulle aree (C) ed i volumi (D) ischemici.

Un ulteriore rafforzamento alla rilevanza clinica dell'ipotermia da AMP, per la cura dell'ictus cerebrale, è data dal fatto che sia il protocollo di trattamento con AMP in-traischemico, sia quello con AMP post-ischemico, aumentano la sopravvivenza degli animali (Fig. 4.2.26 A e B).

A



B

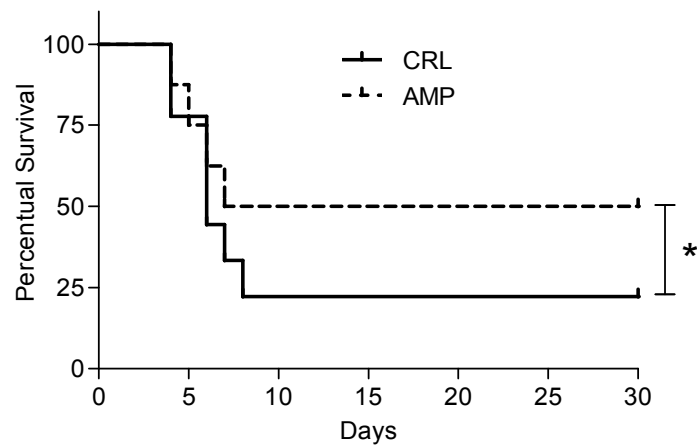


Figura 4.2.26. Effetto dei protocolli di trattamento di ipotermia da AMP intraischemico (A) o post-ischemico (24h) (B) sulla sopravvivenza di topi soggetti ad 1 ora MCAo.

La mancata attivazione dell'enzima AMP-kinasi nel cervello dei topi trattati con AMP 50 mg/Kg i.p. (Fig. 4.2.27), esclude la sua possibile partecipazione alla neuroprotezione ischemica (Li and McCullough 2010).

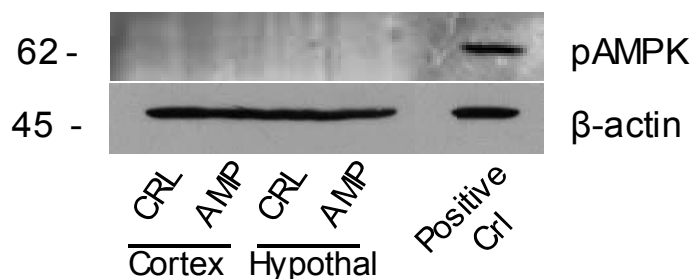


Figura 4.2.27. Effetto di AMP sulla fosforilazione della AMPK cerebrale nel topo. Gli animali ricevono AMP e le regioni cerebrali (corteccia e ipotalamo) sono raccolte 20 minuti dopo. Il controllo positivo è costituito da cellule HeLa private di siero per 12 ore.

Infine, per ampliare lo spettro terapeutico dell'ipotermia dipendente da AMP, abbiamo testato l'effetto del nucleotide in condizioni di aumentata temperatura corporea come febbre (come modello di ipertermia centrale) o overdose da dioximetamfetamina (MDMA) (come forma di ipertermia periferica). Abbiamo trovato che nel topo AMP 50 mg/Kg i.p. previene (Fig. 4.2.28 A) ed abroga (Fig. 4.2.28 B) la febbre indotta da 10 nmoli di prostaglandina E2 (PGE2) somministrata i.c.v. La contemporanea somministrazione della stessa dose di AMP sommata a 50µg di AMPCP i.c.v., inducono un effetto additivo sulla capacità di abrogare la febbre indotta da PGE2 (Fig. 4.2.28 B). Comunque, AMP da solo o in combinazione con AMPCP, non ha effetto su l'ipotermia apportata da 10 mg/Kg di MDMA somministrato i.p. (Fig. 4.2.28 C).

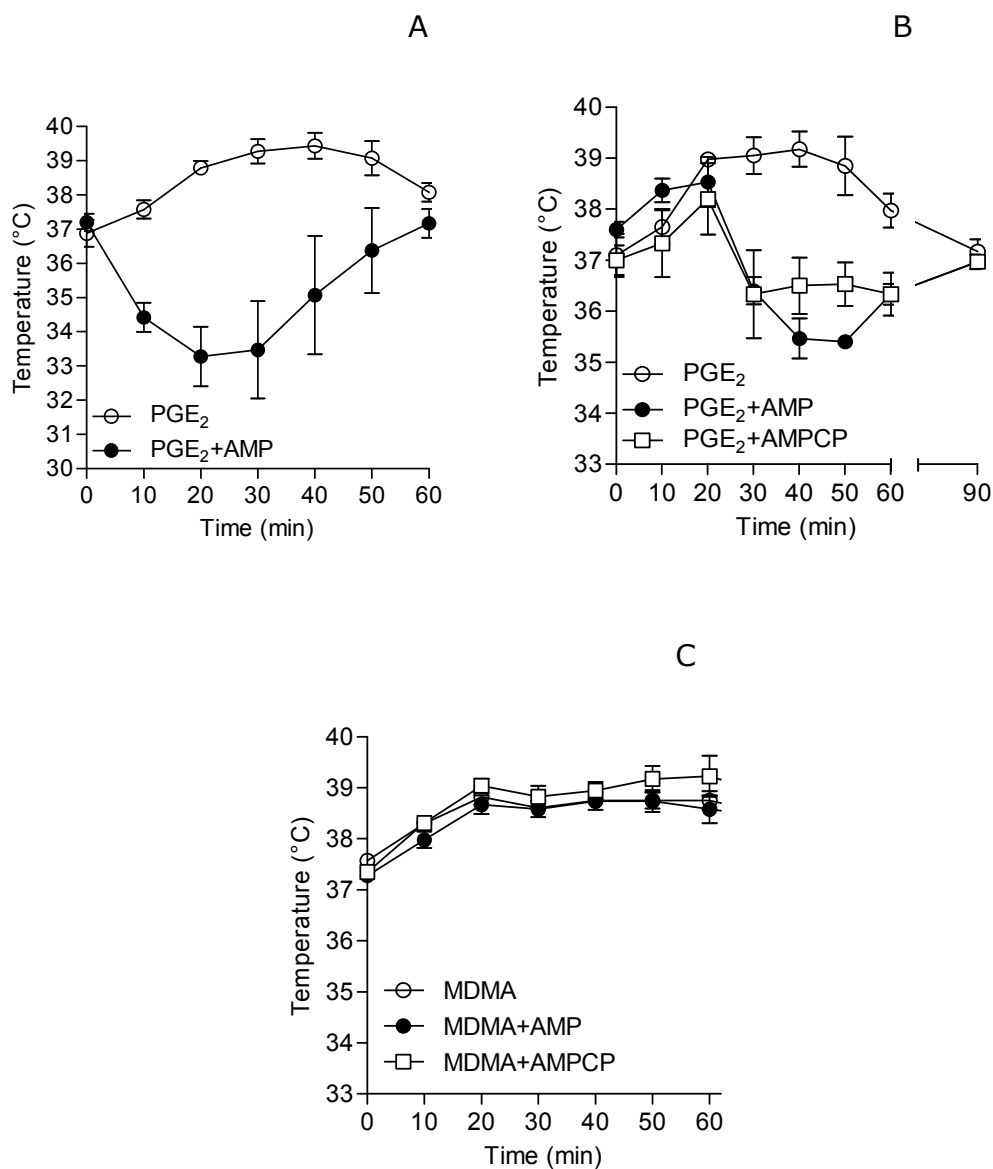


Figura 4.2.28. (A) Gli animali ricevono AMP e 3 minuti dopo un'iniezione di PGE₂. (B) Gli animali ricevono PGE₂ e 20 minuti dopo un'iniezione di AMP o AMPCP. (C) Effetto di AMP o AMPCP su l'ipertermia indotta da MDMA.

Dato che MDMA causa ipertermia attraverso meccanismi non correlabili con un resettaggio ipotalamico (Parrott 2012), anche quest'ultimo dato supporta la nostra ipotesi che la stimolazione dei recettori A₁ all'interno dell'ipotalamo è il solo meccanismo responsabile dell'effetto di raffreddamento da parte di AMP.

5. DISCUSSIONE

L'ipotermia rappresenta un potente meccanismo di protezione contro il danno da ischemia cerebrale, sebbene la sua rilevanza clinica necessita di ulteriori studi al fine di stabilirne l'effettiva efficacia. Studi pilota indicano chiaramente che, tra i vari parametri e variabili che devono essere tenuti in considerazione, la rapidità con cui viene indotto l'abbassamento della temperatura corporea è un parametro chiave per l'efficienza clinica (van der Worp et al. 2010b;Yenari and Hemmen 2010c). Sotto questa luce, vi è un ampio accordo che molecole in grado di indurre un abbassamento della temperatura corporea rapido e sicuro rappresentano una necessità.

In questa ricerca abbiamo dimostrato che sia la stimolazione dei recettori TRPV1 all'interno del sistema nervoso centrale (SNC), da parte del potente agonista rinvanil, sia la stimolazione dei recettori A1 ipotalamici da parte del nucleotide AMP inducono un abbassamento significativo della temperatura corporea. La presenza di studi che correlano l'effetto ipotermico con la neuroprotezione ischemica suggeriscono che entrambi i sistemi recettoriali possono essere un valido bersaglio da sfruttare per il trattamento ipotermico dell'ischemia cerebrale.

Per quanto riguarda il rinvanil, i nostri risultati dimostrano che il potente agonista TRPV1 induce un effetto ipotermico in maniera dose-dipendente all'interno del SNC ed inibito dall'antagonista recettoriale capsazepina. Questi dati sono in accordo con il fatto che un effetto di ipertermia si verifica quando vengono utilizzati farmaci in grado di bloccare l'attivazione tonica dei recettori TRPV1 (Gavva 2008b). A tale proposito, è stato dimostrato che la termoregolazione dipendente da TRPV1 è dovuta alla modulazione di tali recettori al di fuori della barriera emato-encefalica, più precisamente a quelli tonicamente attivati nelle viscere (Gavva et al. 2007b). I nostri dati sull'effetto del rinvanil somministrato i.c.v. indicano comunque che l'agonismo sui recettori TRPV1 a livello centrale risulta sufficiente per indurre ipotermia. Sebbene questo sia in linea con i complessi effetti della capsaicina sui neuroni termosensibili a livello ipotalamico (Hori 1984b;Hori et al. 1988), l'esatta localizzazione dei recettori TRPV1 a livello ipotalamico, sia nei roditori che nell'uomo, è

ancora dibattuta (Menigoz and Boudes 2011). E' riportato che i recettori TRPV1 periferici sopprimono tonicamente le difese al freddo, inibendo la termogenesi e la vasocostrizione cutanea (Gavva 2008b). Sebbene abbiamo confermato che l'attivazione dei recettori TRPV1 riduce il consumo di O₂ (un indice della termogenesi), abbiamo trovato che, anziché vasodilatazione, l'agonismo TRPV1 causa vasocostrizione cutanea. Questo può essere interpretato come una risposta di difesa al freddo dovuta all'ipotermia. Alternativamente, l'ipotermia dovuta all'attivazione dei recettori TRPV1 a livello centrale può attivare risposte autonome parzialmente diverse da quelle messe in moto bloccando i recettori TRPV1 tonicamente attivi a livello periferico. A questo proposito, la presente ricerca qualifica gli agonisti dei recettori TRPV1 come molecole promettenti per la neuroprotezione ischemica da ipotermia. Il dato che la riduzione del danno ischemico si verifica anche quando il rinvanil è utilizzato in un modello di trattamento post-ischemico, enfatizza ancora di più il suo potenziale terapeutico. Quest'ultimo comunque può essere ridotto in quanto, dopo ripetute somministrazioni, si verifica una desensitizzazione dei recettori TRPV1 o per l'effetto neurotossico, dovuto al massivo ingresso di Ca²⁺ intracellulare, in seguito all'eccessiva attivazione dei recettori TRPV1 (Kim et al. 2005; Shirakawa et al. 2008).

In conclusione, vista l'urgente necessità di farmaci ipotermizzanti per trial clinici in pazienti colpiti da ischemia cerebrale, i nostri dati suggeriscono che l'ipotermia dovuta all'attivazione dei recettori TRPV1 può essere utilizzata per trattamenti innovativi. Inoltre, data la rilevanza clinica dell'ipotermia per l'arresto cardiaco o l'ipossia neonatale, l'effetto di raffreddamento da parte di molecole simili al rinvanil può essere sfruttato per lo sviluppo di strategie terapeutiche aggiuntive.

Successivo argomento trattato in questa ricerca è stato l'effetto ipotermizzante di AMP. Per la prima volta abbiamo dimostrato che il nucleotide endogeno AMP risulta in grado di indurre un abbassamento della temperatura corporea attraverso la stimolazione dei recettori A1R a livello ipotalamico. I risultati dimostrano inoltre che l'enzima 5'-NT risulta

un determinante importante per la termoregolazione A1R dipendente. 5'-NT catalizza uno step chiave nella formazione extracellulare di Ado a partire da ATP, giocando un ruolo centrale nell'attivazione dei recettori purinergici P1 (Colgan et al. 2006). Con queste prospettive, è stato proposto che la manipolazione genetica o farmacologica dell'attività della 5'-NT può rappresentare una strategia adatta alla modulazione della neurotrasmissione di Ado (Zylka 2011). Studi molto recenti sono parzialmente in contrasto con questo scenario, dimostrando che sarebbe l'uscita di Ado intracellulare attraverso i trasportatori ENTs neuronali, e non la conversione extracellulare di AMP in Ado, il meccanismo attraverso il quale si verifica l'accumulo di Ado nell'ambiente extracellulare in condizioni di eccessiva stimolazione dei neuroni (Lovatt et al. 2012). Comunque, i nostri risultati dimostrano che in condizioni fisiologiche l'inibizione della 5'-NT cerebrale potenzia la segnalazione dipendente da A1R, indice del fatto che l'enzima attivo partecipa alla modulazione dell'omeostasi della neurotrasmissione purinergica. Con ciò riteniamo che il potenziamento dell'attivazione dei recettori A1, da parte dell'inibizione della 5'-NT, sia dovuto all'accumulo di AMP extracellulare il quale risulta in grado di attivare A1R ma, non essendo captato dagli ENTs, prolunga l'attivazione di A1R. Al contrario, Ado, che dimostra una capacità di attivare A1R simile a quella di AMP (Rittiner et al. 2012b), è rapidamente captata da ENTs, (Zhang et al. 2011), portando così ad una ridotta attivazione A1R se comparata con il nucleotide. In linea con ciò, abbiamo trovato che l'ipotermia indotta da somministrazioni i.c.v. o inraipotalamiche di AMP dura più a lungo di quella indotta da una stessa dose di Ado somministrata attraverso le stesse vie e, sorprendentemente, risulta potenziata dall'inibizione della 5'-NT. Inoltre, il fatto che gli inibitori ENT potenziano l'effetto di raffreddamento di Ado, risulta in linea con l'ipotesi che il nucleotide esercita un effetto ipotermico più debole in quanto rapidamente captato nell'ambiente intracellulare. Se sommati assieme, i nostri risultati indicano che all'interno di specifiche regioni cerebrali, la 5'-NT risulta un regolatore negativo (Zylka 2011), piuttosto che positivo, della neurotrasmissione dipendente da A1R. Su queste basi, AMP extracellulare può essere considerato un "modulatore della

neurotrasmissione purinergica" attivo selettivamente sui recettori A1, piuttosto che un semplice precursore metabolico di Ado. Risultati molto recenti, ottenuti in cellule tumorali transfettate, sono in accordo con la capacità di AMP di stimolare A1R (Rittiner et al. 2012b). Ancora, 5'-NT sembra essere l'unico enzima responsabile della degradazione extracellulare di AMP in Ado (Lovatt et al. 2012), ed i suoi livelli di espressione risultano piuttosto bassi in diverse regioni del cervello (Langer et al. 2008). Questi risultati dimostrano che l'enzima è costitutivamente una tappa limitante nella formazione di Ado da AMP, una condizione che può favorire l'accumulo extracellulare del nucleotide, e di conseguenza, l'attivazione A1R all'interno di specifiche regioni cerebrali. I dati sull'effetto di AMP nella neurotrasmissione aggiungono importanti nuove informazioni ai meccanismi di termogenesi centrale. Per la prima volta abbiamo descritto il ruolo chiave di A1R nel ridurre l'attività di firing dei TIN, favorendo così le nostre conoscenze sulla neurochimica ipotalamica in grado di regolare la temperatura corporea. L'evidenza che l'inibizione dell'attività di firing dei WSN in vitro correla con l'effetto di raffreddamento in vitro, è inoltre di importanza per rivalutare il ruolo di questa popolazione neuronale nella risposta di perdita di calore. A tale proposito, i nostri risultati permettono di identificare un ordine funzionale gerarchico tra i TIN e i WSN. I dati suggeriscono che la soppressione dell'attività dei TIN è sufficiente per indurre perdita di calore, indipendentemente da come il firing dei WSN è contemporaneamente ridotto (una condizione che può portare a ritenzione di calore). Questo può essere ascritto, almeno in parte, al fatto che i TIN risultano notevolmente più numerosi dei WSN (86 vs 14 %, rispettivamente). Di conseguenza, l'entità della risposta di perdita di calore dovuta alla riduzione dell'attività dei TIN può mascherare il segnale di ritenzione di calore originato da l'inibizione dei WSN. Anche gli effetti antipiretici di AMP sono in linea con un modello nel quale i TIN giocano un ruolo di dominio nella termoregolazione ipotalamica. Infatti, AMP contrasta efficientemente la febbre nonostante il suo impatto negativo sui WSN che, di per se, faciliterebbe l'inibizione WSN dipendente da PGE2 e la conseguente risposta piretica. Tutti gli antipiretici attualmente disponibili,

i farmaci anti-infiammatori non-steroidi (FANS) o i corticosteroidi, sono pensati per alleviare la febbre contrastando l'inibizione dei WSN dipendente da PGE2 (Boulant 2006; Morrison and Nakamura 2011). Con ciò, l'effetto antipiretico di AMP prova la prima dimostrazione farmacologica che, resettare il segnale di riferimento originato dai TIN è un'alternativa ed efficiente strategia per contrastare la risposta alla febbre. Questo concetto indica i recettori A1 sui TIN come un nuovo target farmacologico per i disordini febbrili, ed ha potenziali implicazioni nello sviluppo di nuove strategie per il trattamento di stati febbrili ostinati, insensibili ai FANS. Il presente studio dimostra che l'ipotermia dipendente da AMP ottenuta sia attraverso somministrazione diretta del nucleotide sia inibendone la degradazione endogena ad Ado, può essere utilizzata per strategie innovative di raffreddamento d'importanza per la neuroprotezione ischemica. Questa ipotesi è rafforzata dal fatto che l'ipotermia dipendente da AMP non è correlata con una significativa soppressione del sistema cardiocircolatorio, ipoglicemia e/o ridotta funzionalità del SNC. Evidenze che somministrazioni ripetute di AMP non inducono tolleranza all'effetto ipotermizzante e sono ben tollerate da topi soggetti a ischemia cerebrale, una condizione che di per se sensibilizza gli animali a cambiamenti dei parametri cardiovascolari, conferma il potenziale traslazionale dell'ipotermia dipendente da AMP per la terapia dell'ischemia. Interessante notare che la capacità di Ado di prevenire i brividi (Marshall and Stoner 1979; Tse and Wei 1986), suggerisce che l'ipotermia terapeutica dovuta all'attivazione A1R non può essere compromessa da questo riflesso autonomo di termoregolazione che contrasta l'efficienza di raffreddamento (Sessler 2009). In fine i risultati dimostrano che AMP riduce significativamente la neurotrasmissione eccitatoria ippocampale, allargando le proprietà neurochimiche del nucleotide. AMP potrebbe quindi giocare un ruolo inaspettato nella neurotrasmissione purinergica e potrebbe contribuire alla regolazione delle (dis)funzioni neuronali dipendenti da A1R come memoria e dolore così come neurodegenerazione e danno da epilessia. Riteniamo inoltre che la deregolazione dell'attivazione dei recettori A1 dipendente da AMP

potrebbe concorrere a deficit neurologico associato a errori congeniti del metabolismo delle purine (Camici et al. 2010).

In conclusione, il presente studio dimostra il ruolo di AMP e dell'enzima 5'-NT nella termoregolazione attraverso l'attivazione dei recettori A1. Indica inoltre che l'ipotermia dipendente da AMP può essere sfruttata per il trattamento delle vittime d'ischemia cerebrale, arresto cardiaco e ipossia neonatale così come in pazienti con malattie febbrili. Dato che la sensibilità di una data specie all'effetto ipotermizzante di AMP appare inversamente correlato all'espressione ipotalamica dell'enzima degradante AMP 5'-NT (Muzzi et al. 2012), riteniamo che valga la pena proseguire con gli studi al fine di valutare la sensibilità dell'uomo ad AMP.

6. BIBLIOGRAFIA

- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 27:1616-1622
- Boulant JA (2006) Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* 100:1347-1354
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63:175-195
- Brown RE, Reymann KG (1995) Class I metabotropic glutamate receptor agonists do not facilitate the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat in vitro. *Neurosci Lett* 202:73-76
- Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1013-1033
- Bruno V, Copani A, Knopfel T, Kuhn R, Casabona G, Dell'Albani P, Condorelli DF, Nicoletti F (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* 34:1089-1098
- Camici M, Micheli V, Ipata PL, Tozzi MG (2010) Pediatric neurological syndromes and inborn errors of purine metabolism. *Neurochem Int* 56:367-378
- Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR, Jr., Muizelaar JP, Wagner FC, Jr., Marion DW, Luerssen TG, Chesnut RM, Schwartz M (2001) Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N Engl J Med* 344:556-563
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351-360

- Conn PJ, Pin J-P (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237
- Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97:209-216
- Cozzi A, Meli E, Carla V, Pellicciari R, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE (2002) Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonists enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity? *Neuropharmacology* 43:119-130
- D'Cruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, Hicks SD, DeFranco DB, Callaway CW (2002) Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:843-851
- De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, Devlin TG, Jaus M, Davis SM, Koroshetz WJ, Rordorf G, Warach S (2004) Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 63:312-317
- Diller KR, Zhu L (2009) Hypothermia therapy for brain injury. *Annu Rev Biomed Eng* 11:135-162
- Earnshaw WC (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7:337-343
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57:1835-1840
- Erecinska M, Thoresen M, Silver IA (2003) Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:513-530

- Fishman P, Bar-Yehuda S, Liang BT, Jacobson KA (2011) Pharmacological and therapeutic effects of A(3) adenosine receptor agonists. *Drug Discov Today*
- Fosgerau K, Weber UJ, Gotfredsen JW, Jayatissa M, Buus C, Kristensen NB, Vestergaard M, Teschendorf P, Schneider A, Hansen P, Raunso J, Kober L, Torp-Pedersen C, Videbaek C (2010) Drug-induced mild therapeutic hypothermia obtained by administration of a transient receptor potential vanilloid type 1 agonist. *BMC Cardiovasc Disord* 10:51
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552
- Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP (1997) The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17:8178-8186
- Gavva NR (2008a) Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci* 29:550-557
- Gavva NR (2008b) Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci* 29:550-557
- Gavva NR, Bannon AW, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, Davis J, Ernst N, Hever G, Kuang R, Shi L, Tamir R, Wang J, Wang W, Zajic G, Zhu D, Norman MH, Louis JC, Magal E, Treanor JJ (2007a) Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 323:128-137
- Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Gore

A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, Kuang R, Le A, Tamir R, Wang J, Youngblood B, Zhu D, Norman MH, Magal E, Treanor JJ, Louis JC (2007b) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 27:3366-3374

Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365:663-670

Green DR, Reed JC (1998a) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312

Green DR, Reed JC (1998b) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312

Gribkoff VK, Bauman LA (1992) Endogenous adenosine contributes to hypoxic synaptic depression in hippocampus from young and aged rats. *J Neurophysiol* 68:620-628

Han HS, Karabiyikoglu M, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA (2003) Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:589-598

Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA (2002) Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci* 22:3921-3928

Hansen AJ (1985) Effects of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101-148

Hemmen TM, Lyden PD (2007) Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke* 38:794-799

Hori T (1984a) Capsaicin and central control of thermoregulation.

Pharmacol Ther 26:389-416

Hori T (1984b) Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmacol Ther* 26:389-416

Hori T, Shibata M, Kiyohara T, Nakashima T, Asami A (1988) Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to locally applied capsaicin. *Neuropharmacology* 27:135-142

Huang PL (2003) Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 5:473-480

Huber-Ruano I, Pastor-Anglada M (2009) Transport of nucleoside analogs across the plasma membrane: a clue to understanding drug-induced cytotoxicity. *Curr Drug Metab* 10:347-358

Iadecola C, Salkowski CA, Zhang F, Aber T, Nagayama M, Vogel SN, Ross ME (1999) The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med* 189:719-727

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993a) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-3985

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993b) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-3985

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257

Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK (2005) Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J*

- Kondo Y, Yamanouchi K (1997) Potentiation of ejaculatory activity by median raphe nucleus lesions in male rats: effect of p-chlorophenylalanine. *Endocr J* 44:873-879
- Krieger DW, Yenari MA (2004) Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35:1482-1489
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199-217
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347
- Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA (2005) Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg* 103:289-297
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399:A7-14
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481-1486
- Li J, McCullough LD (2010) Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:480-492
- Liu L, Yenari MA (2007) Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci* 12:816-825
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and

opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415

Loddick SA, Rothwell NJ (1996) Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:932-940

Lovatt D, Xu Q, Liu W, Takano T, Smith NA, Schnermann J, Tieu K, Nedergaard M (2012) Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6265-6270

Lyden PD, Allgren RL, Ng K, Akins P, Meyer B, Al-Sanani F, Lutsep H, Dobak J, Matsubara BS, Zivin J (2005) Intravascular Cooling in the Treatment of Stroke (ICTuS): early clinical experience. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 14:107-114

Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK (2002) Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 11:28-42

Marshall HW, Stoner HB (1979) Catecholaminergic alpha-receptors and shivering in the rat. *J Physiol* 292:27-34

Meli E, Picca R, Attucci S, Cozzi A, Peruginelli F, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE (2002) Activation of mGlu1 but not mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes to postischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 73:439-446

Meloni BP, Campbell K, Zhu H, Knuckey NW (2009) In search of clinical neuroprotection after brain ischemia: the case for mild hypothermia (35 degrees C) and magnesium. *Stroke* 40:2236-2240

Menigoz A, Boudes M (2011) The Expression Pattern of TRPV1 in Brain. *J Neurosci* 31:13025-13027

- Morrison SF, Nakamura K (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 16:74-104
- Muzzi M, Blasi F, Masi A, Coppi E, Traini C, Felici R, Pittelli M, Cavone L, Pugliese AM, Moroni F, Chiarugi A (2012) Neurological basis of AMP-dependent thermoregulation and its relevance to central and peripheral hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab*
- Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K (2005) Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* 26:233-238
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, . (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306
- Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E (1986) The activation of inositol phospholipid hydrolysis as a signal transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 6:1905-1911
- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258
- Ohta H, Terao Y, Shintani Y, Kiyota Y (2007) Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 57:424-433
- Olney JW (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders.

- Parrott AC (2012) MDMA and temperature: A review of the thermal effects of 'Ecstasy' in humans. *Drug Alcohol Depend* 121:1-9
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F (1990) Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041
- Pellegrini-Giampietro DE, Cozzi A, Peruginelli F, Leonardi P, Meli E, Pellicciari R, Moroni F (1999a) 1-Amino-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3'-carboxybicyclo[1.1.1]pentyl)-glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia. *Eur J Neurosci* 11:3637-3647
- Pellegrini-Giampietro DE, Peruginelli F, Meli E, Cozzi A, Albani Torregrossa S, Pellicciari R, Moroni F (1999b) Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacology* 38:1607-1619
- Planas AM, Soriano MA, Berrueto M, Justicia C, Estrada A, Pitarch S, Ferrer I (1996) Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 8:2612-2618
- Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T (2005) Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 52:749-758
- Poulsen SA, Quinn RJ (1998) Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem* 6:619-641
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492

- Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, Jin J, Janzen WP, Frye SV, Zylka MJ (2012a) AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J Biol Chem* 287:5301-5309
- Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, Jin J, Janzen WP, Frye SV, Zylka MJ (2012b) AMP Is an Adenosine A1 Receptor Agonist. *J Biol Chem* 287:5301-5309
- Romanovsky AA, Almeida MC, Garami A, Steiner AA, Norman MH, Morrison SF, Nakamura K, Burmeister JJ, Nucci TB (2009) The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* 61:228-261
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U (1998) Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254:117-120
- Schwab S, Georgiadis D, Berrouschot J, Schellinger PD, Graffagnino C, Mayer SA (2001) Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. *Stroke* 32:2033-2035
- Sessler DI (2009) Defeating normal thermoregulatory defenses: induction of therapeutic hypothermia. *Stroke* 40:e614-e621
- Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH (2005) Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 353:1574-1584
- Shirakawa H, Yamaoka T, Sanpei K, Sasaoka H, Nakagawa T, Kaneko S (2008) TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 377:1211-1215
- Siesjo (2001) Acid-base changes during complete brain ischemia. *Stroke*

- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77:337-354
- Sladeczek F, Pin J-P, Récasens M, Bockaert J, Weiss S (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317:717-719
- Steller H (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449
- Sugiyama H, Ito I, Hirono C (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325:531-533
- Swartz KJ, During MJ, Freese A, Beal MF (1990) Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J Neurosci* 10:2965-2973
- Szabo C (1996) DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 21:855-869
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462
- Toth DM, Szoke E, Bolcskei K, Kvell K, Bender B, Bosze Z, Szolcsanyi J, Sandor Z (2011) Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice. *Cell Mol Life Sci* 68:2589-2601
- Tse SY, Wei ET (1986) Inhibition of the shake response in rats by adenosine and 2-chloroadenosine. *Psychopharmacology (Berl)*

90:322-326

van der Worp HB, Macleod MR, Kollmar R (2010a) Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1079-1093

van der Worp HB, Macleod MR, Kollmar R (2010b) Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1079-1093

Virag L, Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429

Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P (2003) Stroke. *Lancet* 362:1211-1224

Wetherington JP, Lambert NA (2002) Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *J Neurosci* 22:1248-1255

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306

Yamada I, Kuroiwa T, Endo S, Miyasaka N (2003) Temporal evolution of apparent diffusion coefficient and T2 value following transient focal cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neurochir Suppl* 86:147-151

Yenari MA, Han HS (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 13:267-278

Yenari MA, Hemmen TM (2010a) Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke* 41:S72-S74

Yenari MA, Hemmen TM (2010b) Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke* 41:S72-S74

Yenari MA, Hemmen TM (2010c) Therapeutic hypothermia for brain

ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke* 41:S72-S74

Yoon YS, Kim JW, Kang KW, Kim YS, Choi KH, Joe CO (1996) poly(ADP-ribose)ylation of histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis. *J Biol Chem* 271:9129-9134

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263

Zhang D, Xiong W, Albensi BC, Parkinson FE (2011) Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions. *J Neurochem* 118:4-11

Zhang F, Wang S, Luo Y, Ji X, Nemoto EM, Chen J (2009a) When hypothermia meets hypotension and hyperglycemia: the diverse effects of adenosine 5'-monophosphate on cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1022-1034

Zhang F, Wang S, Luo Y, Ji X, Nemoto EM, Chen J (2009b) When hypothermia meets hypotension and hyperglycemia: the diverse effects of adenosine 5'-monophosphate on cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1022-1034

Zhang J, Kaasik K, Blackburn MR, Lee CC (2006) Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature* 439:340-343

Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, Sun G, Schaal DW, Sapolsky RM, Steinberg GK (2005) Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25:9794-9806

Zylka MJ (2011) Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med* 17:188-196

7.PRODUZIONE SCIENTIFICA

- 1) Cavone L, **Muzzi M**, Mencucci R, Sparatore B, Pedrazzi M, Moroni F, Chiarugi A
18 β -Glycyrrhetic Acid Inhibits Immune Activation Triggered by HMGB1, a Pro-inflammatory Protein Found in the Tear Fluid during Conjunctivitis and Blepharitis.
Ocul Immunol Inflamm. 2011 June;19(3):180-5.

- 2) **Muzzi M**, Felici R, Cavone L, Gerace E, Minassi A, Appendino G, Moroni F, Chiarugi A. *Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia.* J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Jun;32(6):978-82.

- 3) **Muzzi M**, Blasi F, Masi A, Coppi E, Traini C, Felici R, Pittelli M, Cavone L, Pugliese A.M, Moroni F, Chiarugi A. *Neurological basis of AMP-dependent thermoregulation and its relevance to central and peripheral hyperthermia.* J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Oct 24. doi: 10.1038/jcbfm.2012.157.

- 4) **Muzzi M**, Blasi F, Chiarugi A. *AMP-dependent hypothermia affords protection from ischemic brain injury.* J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Dec 5. doi: 10.1038/jcbfm.2012.181