

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÁ DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
SECONDA FACOLTÁ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN INGEGNERIA
BIOMEDICA**

**CARATTERIZZAZIONE NEUROFISIOLOGICA E ANALISI DEL
SEGNALE NEURONALE DOPAMINERGICO IN UN MODELLO
ANIMALE DI SCHIZOFRENIA**

Tesi in

Sistemi Intelligenti Naturali e Artificiali Bs

Relatore
Prof. Mauro Ursino

Presentata da
Berardi Giuseppe

Correlatore
Prof. Marco Pistis

Sessione II

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. ELEMENTI DI NEUROSCIENZE	5
1.1. Il neurone	5
1.2. Il Sistema Dopaminergico	11
1.3. Sostanze psicoattive e Dipendenza	13
1.4. Cannabis	16
1.5. Schizofrenia	18
2. PROGETTO	21
3. METODI SPERIMENTALI ED ELABORAZIONE DATI	25
3.1. Trattamenti e cura degli animali	25
3.2. Elettrofisiologia in vivo	28
3.3. Trasferimento del segnale in Matlab	33
3.4. Analisi parametri	33
3.4.1. Parametri Tradizionali	33
3.4.2. Parametri Burst	34
3.4.3. Parametri di confronto Tradizionali e Burst	34
3.4.4. Ritmicità della cellula	35
3.4.5. Relazione tra SO e Burst	43
4. RISULTATI	45
4.1. Risultati parametri Tradizionali	46
4.2. Risultati parametri e studio del Burst	47
4.3. Risultati confronto parametri Tradizionali e Burst	52
4.4. Analisi ritmicità del firing della cellula	57
4.5. Parametri relazione tra SO e Burst	60
5. DISCUSSIONE RISULTATI E CONCLUSIONI	65
5.1. Commento risultati	65
5.2. Conclusioni finali	71
6. SVILUPPI FUTURI	73
BIBLIOGRAFIA	77
RINGRAZIAMENTI	83

INTRODUZIONE

Obiettivo generale del progetto, svolto a partire da Maggio 2012 presso il Dipartimento di Neuroscienze “Bernard B. Brodie” dell’Università di Cagliari, unico “Centro di Eccellenza” in Italia per la ricerca sulla Neurobiologia delle Tossicodipendenze, in collaborazione con l’Istituto di Neuroscienze del C.N.R., è stata la caratterizzazione neurofisiologica e l’analisi del segnale neuronale dopaminergico in un modello animale di schizofrenia.

I neuroni DAergici della Ventral Tegmental Area VTA rappresentano una delle popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale (SNC) maggiormente implicate in alcuni processi fisiologici, quali la codifica delle risposte agli stimoli gratificanti, la motivazione e la regolazione del tono dell’umore. In aggiunta, parallelamente al loro ruolo nelle suddette funzioni, gli stessi neuroni DAergici giocano un ruolo basilare nella fisiopatologia di determinati disturbi, tra cui la dipendenza da sostanze e le psicosi.

Queste ultime condizioni patologiche includono una larga gamma di disturbi gravi e ben caratterizzati dal punto di vista nosografico che vanno dall’*autismo* fino alle varie sotto-forme di *schizofrenia*. La ricerca degli ultimi decenni, mossa dalle esigenze messe in luce da dati epidemiologici allarmanti sull’incidenza di detti disturbi nelle società evolute, si sta muovendo verso lo studio delle cause e/o delle concause che possono favorire l’insorgenza di stati patologici pervasivi come quelli psicotici.

A tal riguardo sia studi di natura preclinica (mediante utilizzo di modelli animali) che di natura clinica (sull’uomo) si stanno accordando sul fatto che l’insorgenza di psicosi (in particolare della schizofrenia e dell’autismo) possa essere dovuta, almeno in parte, a fattori prenatali che agiscono direttamente sul neurosviluppo del feto. Ad esempio, numerosi studi sui modelli animali hanno sottolineato che l’esposizione alle citochine pro-infiammatorie materne nel corso di periodi critici della gravidanza possa intaccare il corretto sviluppo di aree cerebrali del feto altamente implicate nella patogenesi delle psicosi. In linea con tali evidenze, una mole di lavori ha riportato, ad esempio, che la somministrazione di un composto detto acido poliriboinosilico-poliribocitidilico

(poli I:C) nei roditori, dai 2/3 della gravidanza, mimando una risposta immunitaria aspecifica ad agenti patogeni, possa indurre una degenerazione nella corretta neurogenesi di circuiti temporolimbici e corticali nel feto.

L'effetto di tale malfunzionamento di circuiti implicati nelle funzioni adattive dell'animale potrebbe, dunque, essere responsabile della comparsa di comportamenti aberranti nelle fasi di vita postnatale del nascituro, inducendo dei comportamenti simil-psicotici nello stesso.

Nel contempo, altri studi, prevalentemente concentrati su aspetti delle psicosi adulte hanno riscontrato un'elevata incidenza di patologie con sintomi psicosimili in pazienti che in età adolescenziale abusavano di derivati della cannabis.

Queste ultime evidenze sono state supportate anche da studi sui modelli animali che hanno riportato l'insorgenza di sintomi simil-schizofrenici in animali trattati cronicamente con dosi crescenti del principio attivo della cannabis, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC).

Tuttavia, malgrado entrambe le cause (quelle prenatali e quelle postnatali) pare ricoprano un ruolo importante nell'insorgenza di disturbi psicotici, la loro possibile interazione nello sviluppo di detti disturbi è stata ancora poco esplorata dalla letteratura. Inoltre, nessuno studio in bibliografia ha ancora messo in evidenza se l'effetto aberrante di tali fattori di rischio (da soli o ancor di più in interazione) possa causare conseguenze nella fisiologia e nell'attività dei neuroni DAergici della VTA.

Per questo motivo, obiettivo generale del progetto è stato quello di caratterizzare dal punto di vista elettrofisiologico l'attività e la funzionalità dei neuroni dopaminergici (DAergici) dell'area ventrale del tegmento (VTA) in un modello animale (nello specifico di ratto) di esposizione adolescenziale ai cannabinoidi e contemporaneamente sottoposto in fase prenatale ai prodotti immunitari materni.

Come detto, infatti, entrambe le suddette cause ambientali sono state associate sia nell'uomo, che nell'animale all'insorgenza di sintomi psicotici in età adulta. Tuttavia, sebbene evidenze di varia natura nei modelli animali abbiano preso in

considerazione l'effetto singolo delle cause descritte (es. *Boksa, 2010; Brain Behav Immun 24(6):881-97; Rubino et al., 2012; J Psychopharmacol 26(1):177-88*) nessuno studio, ai tempi della strutturazione del progetto, aveva ancora messo in luce se l'interazione delle concause pre- e post-natali potesse ulteriormente favorire, o addirittura peggiorare, l'entità delle aberrazioni psicosimili riportate in seguito all'esposizione o ai prodotti immunitari materni o ai cannabinoidi in adolescenza.

In aggiunta, malgrado fosse assodato l'interessamento dei neuroni DAergici della VTA nella patogenesi delle psicosi, nessuno studio si era ancora mosso verso la caratterizzazione della funzionalità dei detti neuroni nei modelli pre- e post-natali descritti sopra.

Nel corso della realizzazione del progetto ci si è concentrati sulla valutazione di attività e funzionalità dei neuroni DAergici della VTA in un modello derivato dalla congiunzione delle concause prenatali e postnatali suddette. Per raggiungere tale obiettivo generale ci siamo avvalsi di tecniche di registrazione elettrofisiologica in vivo su singola cellula (single unit recording), e di tecniche di sviluppo di un software specifico in grado di analizzare parametri di analisi tradizionali e innovativi.

In particolare, inizialmente si è caratterizzata l'attività elettrofisiologica in vivo della funzionalità dei neuroni DAergici della VTA in un modello murino di alterazione del neurosviluppo da esposizione ai prodotti immunitari materni.

Infine si è passati alla caratterizzazione elettrofisiologica in vivo dell'attività, della funzionalità e della risposta alle sostanze d'abuso, sempre nei neuroni DAergici della VTA, in un modello murino di alterazione del neurosviluppo da esposizione ai prodotti immunitari materni e sottoposto, lungo l'adolescenza, ai cannabinoidi.

A tale scopo ho partecipato e osservato, imparato le tecniche e realizzato esperimenti e operazioni in vivo su animale (prima parte del progetto), per poi sviluppare un software che, dall'acquisizione delle registrazioni extracellulari dell'attività elettrica dei neuroni, mi ha permesso di studiare i valori assunti da

parametri funzionali tradizionali e parametri nuovi reperiti in letteratura, utilizzati in prove sperimentali dello stesso ambito di ricerca.

In aggiunta a ciò, ho approfondito e introdotto un più innovativo, e ancora in fase di ufficiale definizione, studio dell'analisi spettrale del segnale elettrico del neurone DAergico della VTA, che potrebbe portare al superamento di alcuni limiti emersi durante l'analisi con i criteri classici utilizzati negli ultimi anni (seconda parte del progetto).

Durante l'ultima parte del progetto, dopo aver acquisito i dati, si è passati ad un'analisi statistica degli stessi, allo studio e al confronto dei valori dei parametri per le diverse popolazioni di neuroni considerate, e a una discussione finale sul significato neurofisiologico dei risultati e delle loro variazioni per le diverse famiglie di cellule, servendoci anche di grafici e tabelle appositamente realizzati.

1 ELEMENTI DI NEUROSCIENZE

1.1 Il Neurone

L'unità fondamentale del sistema nervoso è la cellula nervosa, il neurone.

I neuroni sono cellule altamente differenziate sia morfologicamente che funzionalmente, e sono integrati anatomicamente, biochimicamente e fisiologicamente per consentire la normale funzionalità del tessuto cerebrale.

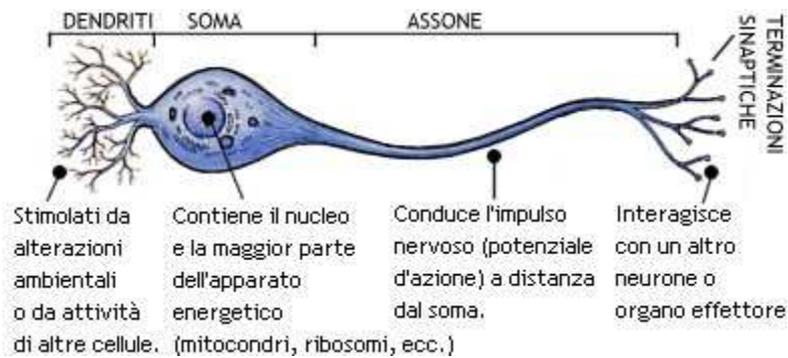


Figura 1.1

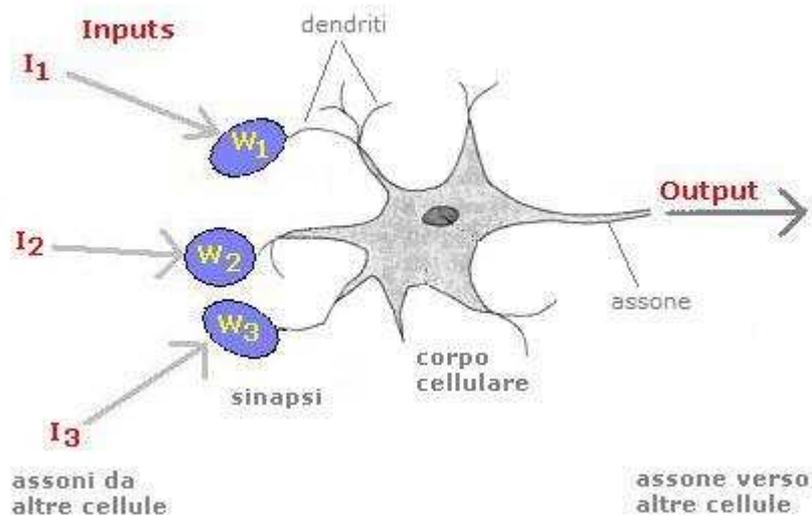


Figura 1.2

La loro caratteristica fondamentale è la capacità di captare informazioni dall'ambiente esterno o da altri neuroni, elaborarle in funzione di altre informazioni in arrivo su di essi, e produrre a loro volta un'informazione, cioè un impulso nervoso che è trasmesso a cellule bersaglio, rappresentate da altri neuroni o da cellule effettrici (figura 1.1, figura 1.2).

Il flusso di informazione che percorre il neurone segue un percorso unidirezionale: l'informazione arriva in specifiche regioni della cellula, i dendriti, estensioni ramificate del neurone, che rappresentano le strutture di ricezione dei segnali nervosi, è elaborata dal corpo cellulare, o soma, e, se in possesso di alcune caratteristiche elettro-chimiche specifiche, è grado di determinare la produzione di un impulso nervoso, chiamato "Potenziale d'Azione" (PdA), come mostrato in figura 1.3.

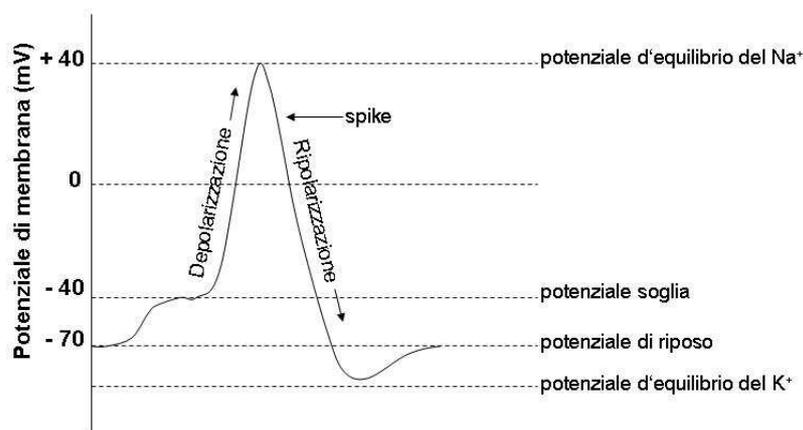


Figura 1.3

L'informazione trasportata dalle cellule nervose si basa sulla caratteristica dei neuroni di generare impulsi di corrente, dovuti a modificazioni del potenziale elettrico di riposo caratteristico della cellula stessa, a seguito dall'apertura o chiusura di canali ionici.

I segnali elettrici così generati possono essere di due tipi: si parlerà di Potenziali Graduati, generati se la variazione di potenziale di riposo della cellula a seguito di uno stimolo è di debole intensità (inferiore ad un certo valore chiamato soglia di depolarizzazione), Inoltre possono essere modulati in ampiezza, ma agiscono a breve distanza, perché subiscono decremento man mano che si allontanano dal punto dove sono stati generati.

Si parlerà, invece, di Potenziale d'Azione se lo stimolo ricevuto dal neurone depolarizza la membrana cellulare a tal punto da far superare, al potenziale di riposo della cellula, la soglia di depolarizzazione. Si tratta di un fenomeno di breve durata, non graduabile in ampiezza, ma modulabile in frequenza, infatti l'informazione che esso trasporta dipende dalla frequenza con cui è generato dal neurone; inoltre, si propaga a distanza senza decremento.

La depolarizzazione richiede l'attivazione e l'inattivazione coordinata di diverse famiglie di canali ionici voltaggio-dipendenti.

Si osserva, perciò, una fase iniziale di depolarizzazione, a seguito di uno stimolo, quindi di diminuzione della negatività intracellulare, a cui segue una iperpolarizzazione, cioè un aumento della negatività intracellulare, e infine una ripolarizzazione, con ripristino del potenziale di riposo del neurone. E' un fenomeno autorigenerativo in grado di propagarsi lungo le fibre nervose senza attenuazione.

Il Potenziale d'Azione così generato si propaga lungo l'assone, una singola sottile estensione senza interruzioni che ha funzione di struttura di conduzione dell'impulso fino all'estremità finale del neurone, percorrendolo completamente fino alle sue terminazioni, di solito ramificate (figura 1.1).

Giunta alle terminazioni assoniche, l'informazione, come detto sotto forma di impulso elettrico, è trasmessa a una o più cellule bersaglio attraverso le strutture sinaptiche.

Le sinapsi sono i punti di contatto tra due cellule nervose e servono per propagare gli impulsi nervosi. Nel corso dell'evoluzione si sono prodotti due tipi di sinapsi: sinapsi elettrica e sinapsi chimica.

Sinapsi elettriche sono presenti in diversi tipi di cellule di differenti tessuti, come ad esempio le fibre muscolari cardiache e lisce, le cellule gliali, le cellule di diversi epiteli e quelle ghiandolari. A differenza delle sinapsi chimiche, quelle elettriche sono bidirezionali, infatti le strutture sinaptiche sono strutturalmente equivalenti. Le sinapsi elettriche hanno un basso grado di plasticità e modulabilità, contrariamente alle sinapsi chimiche, quindi non possono essere alla base delle complesse funzioni cognitive che ci caratterizzano, come ad esempio l'apprendimento.

La sinapsi chimica è la tipica giunzione delle cellule nervose, con la caratteristica di essere monodirezionale nella trasmissione del segnale (figura 1.4).

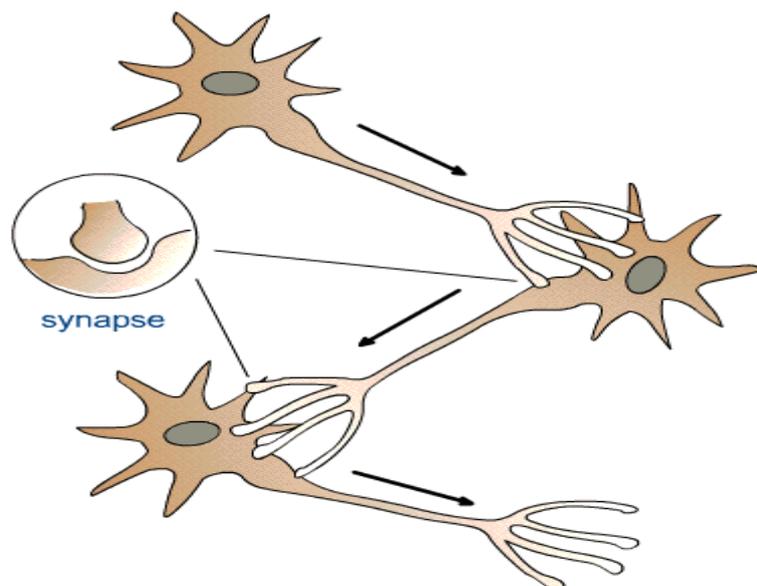


Figura 1.4

La trasmissione dell'informazione attraverso tale giunzione cellulare si basa sul rilascio da parte della cellula presinaptica di mediatori chimici (neurotrasmettitori), i quali si legano a recettori posti sulla membrana della cellula postsinaptica e li attivano, generando in questa cellula, nel caso di stimolo con le caratteristiche elettro-chimiche spiegate in precedenza, il PdA. Quando l'impulso arriva in questa area, e poiché, come visto, l'impulso nervoso ha natura elettrica, la sua trasmissione diretta da un neurone all'altro è impedita dalla mancata continuità fra le cellule. In particolare, l'arrivo del potenziale d'azione al terminale presinaptico è trasformato nel rilascio, di neurotrasmettitore che è contenuto in vescicole nelle quali lo stesso neurotrasmettitore è immagazzinato (figura 1.5).

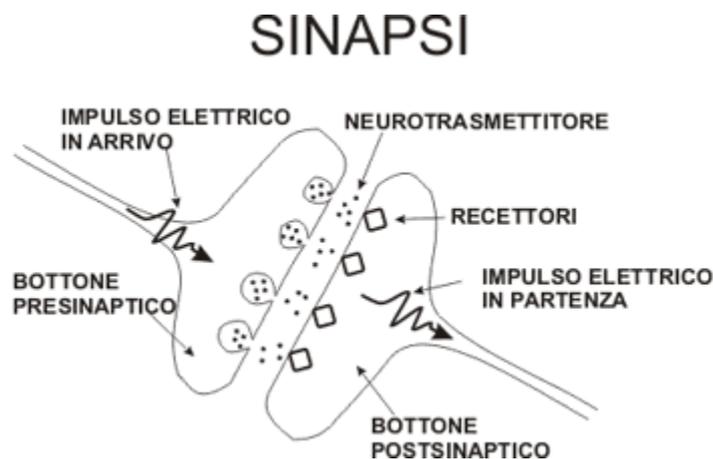


Figura 1.5

Durante questo processo, pacchetti di vescicole si fondono con la membrana presinaptica riversando il loro contenuto nella fessura sinaptica.

La fessura è riempita di liquido extracellulare, nel quale le molecole di neurotrasmettitore diffondono con grande velocità fino a raggiungere la membrana postsinaptica e sui recettori che sono posti su di essa.

Il legame del neurotrasmettitore con il suo recettore produce una risposta allo stimolo nervoso da parte della cellula postsinaptica, che dipende dal tipo di neurotrasmettitore, dal tipo di recettore e dal tipo di cellula postsinaptica.

Infine, poiché i neurotrasmettitori sono molecole a vita brevissima, devono essere recapitati a ridosso della cellula. Perciò ogni assone, che parte dal corpo cellulare del neurone cui appartiene, è allungato verso specifici bersagli cellulari, anche molto lontani, ai quali l'informazione deve essere portata. I neurotrasmettitori sono quindi rilasciati dalla terminazioni assoniche, nelle strette vicinanze delle cellule bersaglio, agendo quindi a brevissima distanza.

Le sinapsi che portano informazioni a un neurone sono dette afferenti, mentre quelle poste nelle terminazioni assoniche che inviano informazioni ad altre cellule sono dette efferenti.

Un neurone può avere migliaia di sinapsi afferenti e per questo motivo la sua attività può essere controllata da informazioni provenienti da un numero molto elevato di neuroni diversi.

Le informazioni in arrivo su un neurone possono essere di tipo eccitatorio o inibitorio: le prime hanno la capacità di indurre l'attività nervosa del neurone, le seconde la inibiscono.

I neurotrasmettitori sono sintetizzati continuamente da enzimi presenti nelle terminazioni assoniche

e quindi sempre disponibili per la trasmissione sinaptica,

Si suddividono in:

- famiglia delle amine, che comprende, tra gli altri:
l'acetilcolina, le catecolamine dopamina, adrenalina e noradrenalina; la serotonina;
- la famiglia degli aminoacidi neurotrasmettitori, comprendenti: il glutamato, l'acido gamma-aminobutirrico (GABA), la glicina;
- i neuropeptidi.

Recentemente sono stati identificati altri tipi di neurotrasmettitori, non convenzionali, i quali hanno natura gassosa (ossido nitrico NO, monossido di carbonio CO) o lipidica (cannabinoidi).

Il sistema nervoso influisce sul nostro comportamento (e sulle sue anomalie) grazie al funzionamento e all'attività dei sistemi neurotrasmettitoriali. I neurotrasmettitori sono responsabili di ogni attività nervosa, e la corretta

regolazione dei processi che li caratterizzano, sintesi, rilascio, azione a livello recettoriale e inattivazione è fondamentale per conferire “normalità” al nostro comportamento. Processi che alterano la neurotrasmissione modificano l’equilibrio comunicativo neuronale e possono essere la causa di patologie nervose o disordini comportamentali.

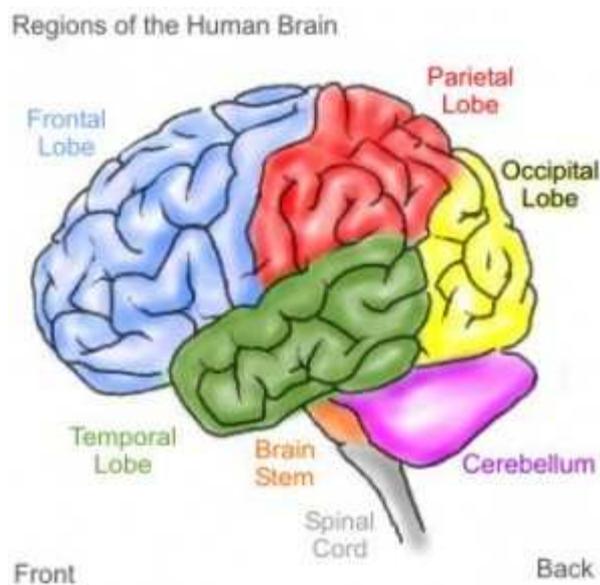


Figura 1.6

1.2 Il Sistema Dopaminergico

Il sistema dopaminergico è coinvolto nel controllo di funzioni fondamentali per il comportamento

emozionale, quali l’attenzione, l’apprendimento e la gratificazione, ma anche i movimenti volontari e la loro pianificazione, regola la ricerca, l’aspettativa di nutrimento, facilita l’attività locomotoria, la motivazione di tipo incentivo-ricompensa, il comportamento di esplorazione, quello aggressivo, le strategie comportamentali, l’avvicinamento e l’evitamento attivo. L’attività dopaminergica media l’attivazione di un comportamento emotivo-motivazionale per il perseguimento di un obiettivo attraverso il cosiddetto “Reward Circuit”, o sistema della “ricompensa”.

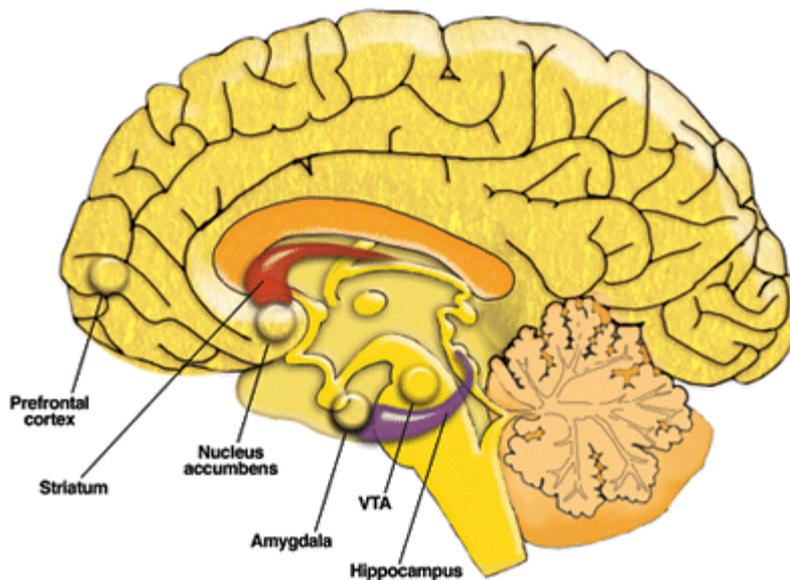


Figura 1.8

I principali circuiti dopaminergici identificati nel nostro encefalo, come mostrato in figura 1.8, originano dalla substantia nigra e nell'area tegmentale ventrale (VTA) del mesencefalo. I neuroni dopaminergici della substantia nigra proiettano allo striato, nella base del telencefalo, in un sistema di controllo della coordinazione dei movimenti volontari (sistema nigrostriatale).

Proiezioni dopaminergiche sono state identificate nelle due direzioni fra lo striato e la corteccia frontale (sistema frontostriatale).

Questi circuiti completano il controllo della motricità e sono coinvolti nella regolazione di funzioni

cognitive e motivazionali. I neuroni dell'area tegmentale ventrale VTA proiettano invece a diverse strutture del sistema limbico, che comprendono il nucleo accumbens, l'amigdala e l'ippocampo (sistema mesolimbico).

Il nucleo accumbens ha un ruolo fondamentale nei processi di gratificazione e piacere associati a stimoli appetitivi, rappresentati sia da determinati comportamenti che dall'assunzione di sostanze, comprese quelle d'abuso. La

presentazione di tali stimoli produce un aumento del tono dopaminergico nell'accumens e ciò costituisce l'effetto di rinforzo degli stimoli stessi.

Un terzo circuito dopaminergico proietta dall'area tegmentale ventrale alla corteccia frontale (sistema mesocorticale) controllando funzioni quali la memoria a breve termine e la pianificazione dei movimenti.

Stati psicotici che vanno dalla mania alla depressione agitata, fino alla schizofrenia, sono stati collegati ad iperattività dei sistemi dopaminergici. La degenerazione dei neuroni dopaminergici che connettono la substantia nigra con lo striato costituisce la base patogenetica del morbo di Parkinson

Il sistema dopaminergico sembra svolgere un ruolo importante anche nel disturbo ossessivo-compulsivo

1.3 Sostanze psicoattive e Dipendenza

Le sostanze psicoattive hanno potenti effetti di rinforzo appetitivo (ricompensa), che inducono facilmente il consumatore ad abusarne e/o a sviluppare la dipendenza.

L'induzione della dipendenza da parte di una sostanza è subordinata alla capacità della stessa di causare, dal punto di vista psicologico, un rinforzo.

Il rinforzo positivo si verifica quando, in una certa situazione, il comportamento è seguito da stimoli

appetitivi, cosicché nella stessa situazione quel comportamento diventa più frequente.

Il rinforzo è un fenomeno conservato tra le specie, dipendente dall'apprendimento di comportamenti motivati, che sono legati alla sopravvivenza. Tali comportamenti comprendono le attività parentali e nutritive e l'attività sessuale/riproduttiva, ed hanno come ricompensa naturale o gratificazione il piacere psicofisico che risulta dalla loro messa in atto.

Le sostanze d'abuso possono essere considerate come surrogati degli stimoli gratificanti naturali.

Queste sostanze hanno proprietà incentivanti e motivazionali, attivando comportamenti compulsivi di tipo appetitivo.

Tutti gli stimoli naturali di rinforzo causano l'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico, e al suo interno del nucleo accumbens. Il nucleo accumbens è una piccola regione ricca in dopamina, situata nel proencefalo basale. Fa funzionalmente parte del sistema limbico, conosciuto per il suo ruolo fondamentale nel comportamento emotivo, nel dolore e nel piacere.

Il rilascio di dopamina in tale struttura determina uno stato di attivazione e di benessere a livello psicofisico che produce il rinforzo dei comportamenti utili alla soddisfazione dei bisogni organici e induce in tal modo l'individuo a ripeterli.

Si definisce dipendenza il fenomeno per il quale si instaura il bisogno, da parte del consumatore, di assumere frequentemente una sostanza sia per il benessere che essa induce (dipendenza psichica) che per una serie di disturbi a livello somatico determinati dalla brusca interruzione della sua assunzione dopo un periodo di uso continuativo (dipendenza fisica).

La dipendenza fisica caratterizza la maggior parte delle sostanze d'abuso, con l'unica eccezione degli allucinogeni (LSD, Cannabis).

Tale dipendenza dipende dallo sviluppo di uno stato di adattamento dell'organismo alle condizioni determinate dalla presenza di una specifica sostanza, con conseguente produzione di sintomi di natura opposta rispetto ai suoi effetti immediati, quando si verifica la carenza di questa sostanza. Tale forma di dipendenza scompare dopo un periodo di interruzione dell'abuso della sostanza.

La dipendenza psichica sembra essere attribuibile a tutte le sostanze d'abuso. Tale dipendenza si basa sull'insorgenza di una forte motivazione all'assunzione periodica o continuativa della sostanza allo scopo di ottenerne gli effetti piacevoli o di sfuggire, grazie alla loro azione, le sensazioni di malessere che hanno spinto all'uso della sostanza stessa.

La dipendenza psichica è da riferirsi a condizionamenti che coinvolgono sia gli aspetti biologici che quelli a carattere psicosociale e in genere dura molto più a lungo della prima. Molte ricadute che possono verificarsi anche anni dopo una disintossicazione sono dovute alla persistenza della dipendenza psichica.

Le sostanze che causano dipendenza, comprese l'eroina e gli altri oppiacei, la cocaina, le anfetamine, la nicotina, l'alcol, i derivati della cannabis, inducono il rilascio di dopamina nell'accumbens e ne aumentano il tono dopaminergico come gli stimoli naturali (in figura 1.9) sono mostrate le vie di comunicazione tra aree del cervello appartenenti alle regioni del piacere, che sono regolate dalla modulazione di tre diversi neurotrasmettitori, tra i quali vi è la dopamina, in questo caso da riferirsi all'assunzione di nicotina).

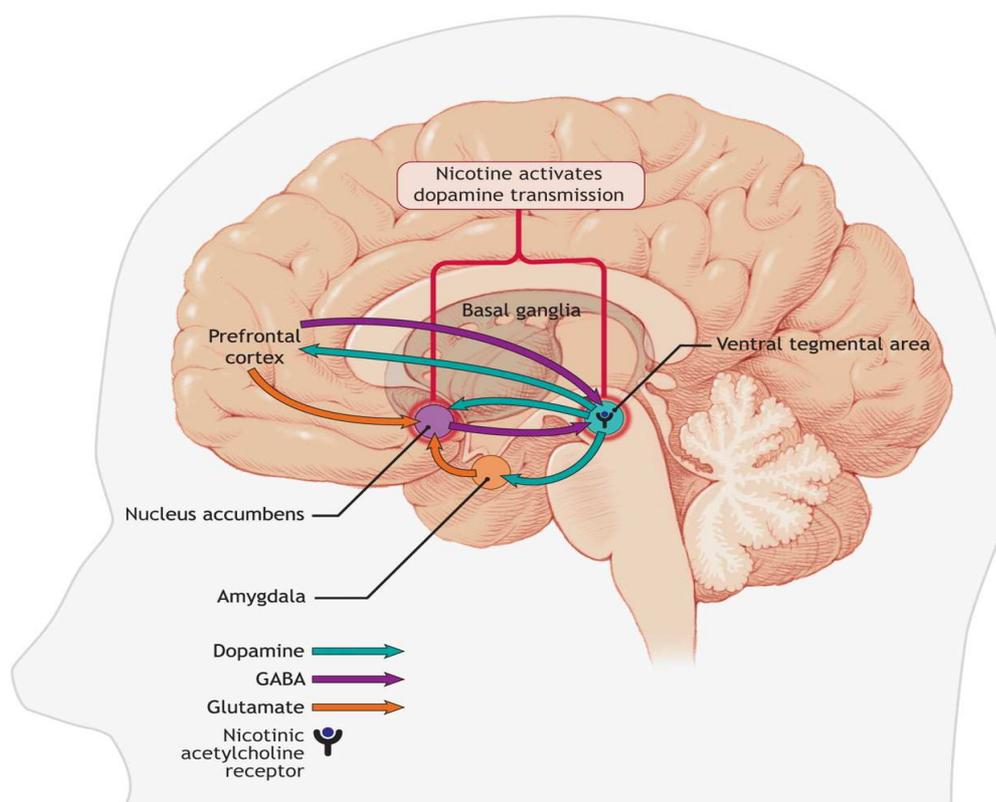


Figura 1.9

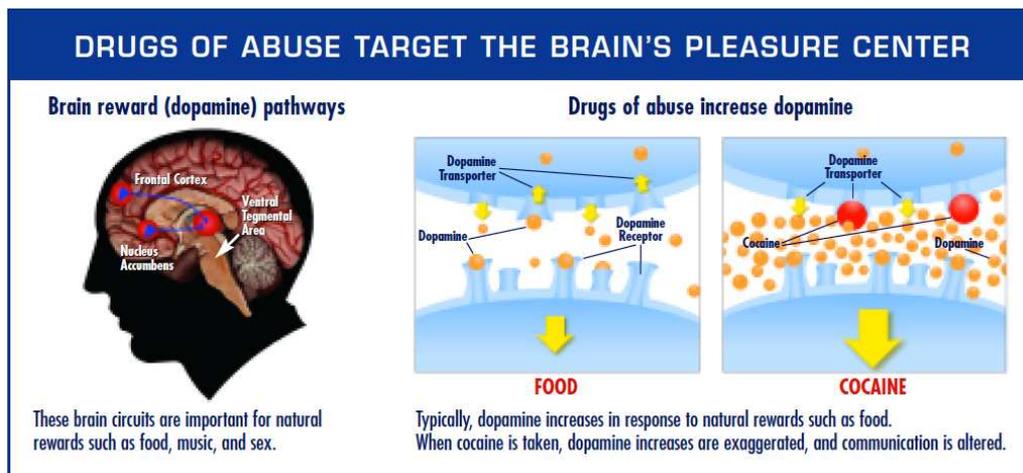


Figura 1.10

Le influenze genetiche sulla propensione all'assunzione e alla dipendenza da alcolismo o nicotina o abuso di cocaina e cannabis, spesso in associazione con particolari tratti di personalità, sono studiate da alcuni anni (la figura 1.10 mostra le vie di comunicazione del sistema dopaminergico, e l'azione della cocaina nei processi di riassorbimento della dopamina nelle sinapsi tra neuroni DAergici).

Oggi è accertato che esistono tratti genetici che predispongono all'avvicinamento alle sostanze d'abuso e allo sviluppo della tossicodipendenza.

1.4 Cannabis

L'uso della canapa indiana (*Cannabis sativa*) era già diffuso come medicamento nell'antichità. Nel corso dei secoli fu utilizzata per ridurre i dolori mestruali, favorire le contrazioni uterine prima del parto, e poi per il trattamento dell'epilessia e l'induzione dell'ipnosi. Nel '900 fu messa al bando per i suoi effetti psicotropi.

Le preparazioni della canapa comprendono la marijuana e l'hashish, che contengono una quantità enorme di composti differenti, comprese 60 molecole

definite cannabinoidi. Gli effetti della droga, assunta attraverso il fumo, sono percepiti entro pochi minuti e si prolungano per 2-3 ore.

Il cannabinoide dotato della maggiore attività psicotropa è il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC).

Si prospetta da tempo la possibilità di un uso terapeutico del THC e dei suoi derivati per: dolore, glaucoma, inappetenza, sclerosi multipla, e gli altri mostrati nella figura 1.11 qui sotto.

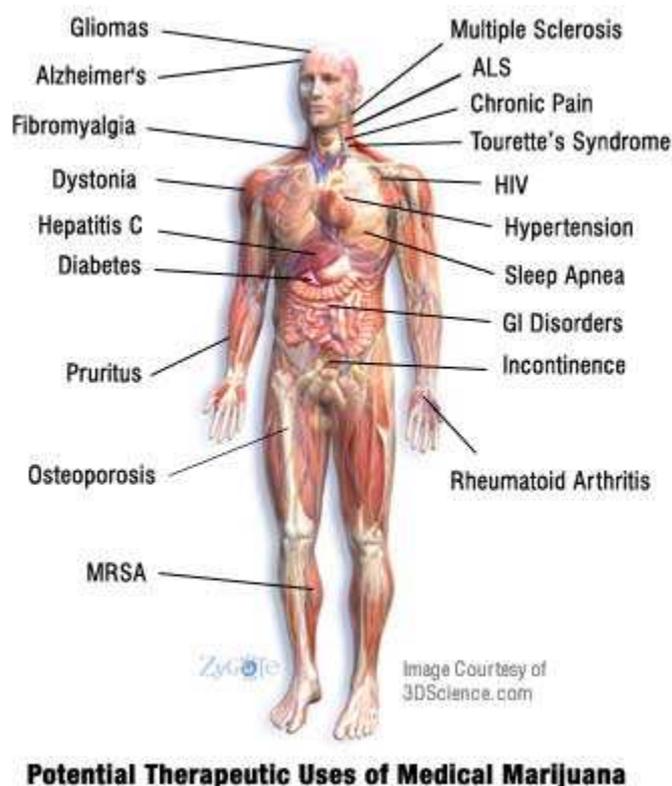


Figura 1.11

Gli effetti comportamentali derivanti dall'assunzione di cannabis dipendono dalla dose assunta,

dall'aspettativa di chi l'assume e dal tipo di preparazione usata (manifestazioni di tipo motorio, cognitivo, psichedelico, analgesico).

Gli effetti cognitivi consistono nella perdita delle motivazioni e difficoltà di concentrazione, caduta della performance a carico della memoria, nei tempi di

reazione e nell'apprendimento. Altri effetti caratteristici sono un'alterata percezione del tempo, dissociazione di idee, difficoltà di pensiero astratto e distorsioni della percezione uditiva e visiva. L'uso cronico della cannabis può avere un effetto di sindrome amotivazionale, che rende il consumatore distratto, lento e scarsamente motivato.

La dipendenza da cannabis è soprattutto di tipo psicologico.

1.5 Schizofrenia

I principali circuiti del sistema dopaminergico, come detto, sono coinvolti nei processi cerebrali di filtrazione degli stimoli sensoriali, di motivazione dei comportamenti e di gratificazione da atti istintivi. L'incontrollata stimolazione di queste vie è probabilmente alla base di malattie psichiatriche come la schizofrenia, oltre ad essere sicuramente coinvolti nelle psicosi causate da sostanze d'abuso quali la cocaina, le anfetamine e altre sostanze psicostimolanti.

La schizofrenia è una forma di malattia psichiatrica caratterizzata dalla presenza di sintomi quali alterazione del pensiero, del comportamento e dell'affettività, allucinazioni uditive, deliri paranoidi e disordine nel pensiero e nel linguaggio che causano un significativo deficit nella vita sociale e professionale, la sciatteria nel vestire e nell'igiene personale, la perdita di motivazione e di giudizio sono tutti elementi comuni nella schizofrenia. Si osservano spesso difficoltà emotive, come la mancanza di reattività, difficoltà nel lavoro, nella memoria a lungo termine, nell'attenzione e nella velocità di elaborazione anche delle pratiche comuni. Sono altresì frequenti i casi di abuso di sostanze (riscontrabile in quasi il 50% dei casi); in figura 1.12 sono mostrati i diversi sintomi della malattia.

Poiché, come sottolineato, le cause si pensa debbano essere ricercate in uno squilibrio nelle complesse reazioni chimiche del cervello che coinvolgono

neurotrasmettitori come la dopamina, la base del trattamento è la somministrazione di un farmaco che sopprime principalmente l'attività del recettore della dopamina.

Una combinazione di fattori genetici, fattori ambientali precoci e processi psicologici e sociali sembrano essere importanti fattori che contribuiscono al suo sviluppo. L'assunzione di alcune droghe o farmaci sembra causare o peggiorare i sintomi.

Fattori relativi allo sviluppo si ipotizza, e si è dimostrato nel corso degli ultimi anni, possano essere eventi quali infezioni, ipossia, stress e malnutrizione nella madre durante lo sviluppo fetale, e possono causare un aumento del rischio di sviluppare schizofrenia nel nascituro nel corso della sua vita.

I fattori ambientali associati con lo sviluppo della schizofrenia possono comprendere l'ambiente in cui si vive e l'uso di droghe. L'assunzione di un certo numero di farmaci è stato associato con lo sviluppo della schizofrenia, compresa la cannabis, la cocaina e le anfetamine. Circa la metà di coloro che presentano una diagnosi di schizofrenia fa un uso eccessivo di droghe o alcool. Il ruolo della cannabis potrebbe essere causale, ma altri potrebbe essere utilizzata per affrontare la depressione, l'ansia, la noia, la solitudine.

Sintomi positivi

Allucinazioni

Sentire, vedere o provare qualcosa che non esiste nella realtà. Le allucinazioni possono interessare tutti e cinque i sensi: udito, vista, tatto, gusto e olfatto.⁵

Sentire voci è l'allucinazione più comune nella schizofrenia.⁵

Deliri

Convinzioni false e irrazionali sostenute fortemente a causa dell'incapacità di distinguere le esperienze reali da quelle irreali.⁵

Pensiero disorganizzato

Fare associazioni sconnesse. Giungere a conclusioni che non sono basate sulla realtà. Mancanza di ragionamento logico.⁵

Agitazione

Stato sgradevole di tensione e irritabilità accentuate.⁵

Sintomi negativi

Mancanza di stimoli o iniziativa

Trascorrere molto tempo a letto senza aver voglia di fare niente.⁵

Isolamento sociale/depressione

La persona che ne è affetta dà l'impressione di preferire la solitudine e non vuole vedere altre persone.⁵

Apatia

Provare una sensazione di vuoto. Essere incapaci di portare a termine i propri piani.⁵

Mancanza di risposta emotiva

Mancanza di normali segni di emozione, non sentirsi né felici né tristi, ad es. espressione facciale ridotta.⁵

Figura 1.12

2. PROGETTO

Il progetto a cui ho preso parte ha, come obiettivo generale, la caratterizzazione dell'attività elettrica dei neuroni dopaminergici (DA) dell'area ventrale del tegmento (VTA), e degli stessi in un modello animale di schizofrenia da alterazione del neurosviluppo.

Lo stato dell'arte attuale sui modelli animali di schizofrenia da alterazione del neurosviluppo ha messo in luce una relazione ben definita tra esposizione ai prodotti immunitari materni in fase gestazionale e sviluppo di alterazioni comportamentali, con sintomi simil-psicotici, nella progenie adulta. A tal proposito è stato osservato che l'inoculazione di diversi agenti virali in età gestazionale porta, nei roditori, allo sviluppo di anomalie comportamentali e anatomiche correlabili alla schizofrenia in età adulta.

Queste anomalie nel neurosviluppo, responsabili del quadro simil-psicotico nel ratto adulto, in realtà, si è dimostrato essere principalmente dovute all'esposizione ai prodotti immunitari materni aspecifici più che al contatto diretto con l'antigene

In particolare, è stato dimostrato che un'iniezione di una dose di un induttore del rilascio di citochine proinfiammatorie, acido poliribonucleotidico-policitidilico (Poli I:C), lungo i 2/3 della gravidanza di un ratto, quindi in una finestra temporale che va dal 15° al 17° giorno di gravidanza, mimando una risposta immunitaria aspecifica ad agenti patogeni, è capace di indurre alterazioni nel feto in un periodo critico per la generazione dei neuroni cortico-limbici, altamente implicati nella patogenesi della schizofrenia

Numerose evidenze sui ratti hanno infatti dimostrato che una singola somministrazione di Poli I:C nella finestra gestazionale che va dal 14° al 18° giorno (2/3 della gravidanza del ratto) altera le risposte comportamentali della prole in test quali quello dell'inibizione latente e l'aumento locomotorio indotto da amfetamina e MK801 (Zuckerman *et al.*, 2003, *Neuropsychopharmacology* 28:1778-89). Inoltre sono stati riportati deficit nella *pre-pulse inhibition* (un test

che valuta sintomi simil-psicotici nei modelli animali) in ratti e topi esposti al poli I:C in fase prenatale (Wolff e Bilkey 2008, *Behav Brain Res* 190:156-9; Meyer et al., 2009, *Neurosci Biobehav Rev*, 33:1061-79).

I neuroni DA della VTA rappresentano il punto di partenza di numerose vie DA che proiettano a loro volta a diverse aree corticali e subcorticali (NAc e striato dorsale) altamente implicate nella patogenesi della schizofrenia. Gli stessi neuroni sono, infatti, coinvolti nella modulazione di diverse attività cognitive, emotive e motivazionali, e per questo sono stati, a più riprese, coinvolti nelle aberrazioni comportamentali osservabili nei pazienti schizofrenici.

A tal riguardo, dunque, data anche la mancanza di evidenze elettrofisiologiche che abbiano analizzato minuziosamente il comportamento elettrico dei neuroni DA della VTA in modelli animali di schizofrenia come quello Poli I:C, l'obiettivo fondamentale del progetto è stato quello di fare chiarezza sul ruolo e sulla funzionalità di questi neuroni nei ratti adulti nati da madri sottoposte nel corso della gravidanza al Poli I:C

Pertanto, la minuziosa caratterizzazione dell'attività elettrica e della funzionalità dei neuroni DA della VTA ci ha permesso di avere un'idea globale del funzionamento anormale dei ratti Poli I:C in modo tale da concentrare la nostra attenzione sulla valutazione del trattamento adolescenziale con cannabinoidi nei modelli animali sopramenzionati.

Dal momento che i neuroni della VTA, oltre ad essere implicati nella patogenesi della schizofrenia, gestiscono le risposte primarie alle sostanze d'abuso e, data la correlazione, riportata in letteratura, tra abuso di derivati della *cannabis* in adolescenza e sviluppo di psicosi in età adulta nell'uomo, ulteriore obiettivo specifico del progetto è anche quello di caratterizzare neurofisiologicamente la funzionalità dei neuroni DA in animali modello di schizofrenia sottoposti a trattamento adolescenziale con Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC).

Infatti, il progetto si concentra anche sul ruolo dell'abuso di cannabis in età adolescenziale come fattore ambientale che possa, in soggetti predisposti, favorire la comparsa di un quadro psicotico in età adulta. Su questa base, lo

studio del trattamento adolescenziale con THC nei ratti esposti in fase gestazionale al Poli I:C rappresenta un modello preclinico capace di offrire numerose informazioni in merito.

Tale ipotesi viene supportata dal fatto che l'intossicazione acuta con Cannabis può portare ad uno stato psicotico chiamato "psicosi cannabinoide", con sintomi riconducibili a quelli propri della schizofrenia, quali allucinazioni, deficit mnemonico e cognitivo, alterato giudizio, deliri. Inoltre, il consumo cronico di cannabinoidi può causare sintomi psicotici in soggetti precedentemente non psicotici, specialmente in quelli vulnerabili alle psicosi, mentre in pazienti schizofrenici può peggiorare i sintomi psicotici.

Poiché si è osservata una correlazione fra l'elevato consumo di Cannabis in pazienti schizofrenici, e i frequenti episodi di psicosi nei consumatori abituali di Cannabis, si è ipotizzato che i disturbi schizofrenici potrebbero essere correlati ad una disfunzione del sistema cannabinoide endogeno.

Le regioni cerebrali coinvolte nella schizofrenia sono strettamente collegate e fortemente sensibili ai cannabinoidi, in quanto contengono specifici recettori a queste sostanze. L'uso precoce di cannabis da parte di adolescenti determina un'alta probabilità di soffrire di disturbi psicotici e di allucinazioni in età adulta.

La cannabis rappresenta la sostanza psicoattiva più utilizzata nella popolazione generale di molti paesi e, dall'analisi sistematica della letteratura scientifica, emerge una significativa prevalenza d'uso da parte di persone che soffrono di schizofrenia, manifestando tale malattia dopo un uso in età adolescenziale. I cannabinoidi esogeni che si trovano nella cannabis e contengono il principio attivo Δ -9-tetraidrocannabinolo interagiscono pesantemente con specifici recettori (CB1) presenti nelle regioni cerebrali coinvolte nella schizofrenia. È stata infatti verificata una maggiore densità di tali recettori in aree cerebrali coinvolte nella schizofrenia, tra cui la corteccia prefrontale dorso laterale e la corteccia cingolata anteriore.

Quindi, entrambe le suddette cause ambientali sono state associate, sia nell'uomo che nell'animale, all'insorgenza di sintomi psicotici in età adulta. Tuttavia, sebbene evidenze di varia natura nei modelli animali abbiano preso in considerazione l'effetto singolo delle cause descritte, nessuno studio, ai tempi

della strutturazione del progetto, aveva ancora messo in luce se l'interazione delle concause pre- e postnatali potesse ulteriormente favorire, o addirittura peggiorare, l'entità dei deficit di funzionalità neuronale riportati in seguito all'esposizione o ai prodotti immunitari materni o ai cannabinoidi in adolescenza.

L'area di riferimento del progetto si ricollega al particolare tema della prevenzione delle patologie, dove l'acquisizione di conoscenze sulle cause che possono far insorgere disordini gravi gioca un ruolo essenziale sia nella cura che nell'informazione relativa ai fattori predisponenti di una data malattia.

Il lavoro intrapreso ci ha permesso di caratterizzare dal punto di vista elettrofisiologico il modello di ratti esposti a cause pre-natali di fattori ambientali scatenanti degenerazioni psicotiche. I risultati ottenuti ci permettono di apportare nuove evidenze relative agli squilibri del sistema DA, altamente implicato nella patogenesi della schizofrenia, osservato nei modelli animali. Le patologie psichiatriche, tra le quali la schizofrenia, sono disordini attualmente poco conosciuti per quanto riguarda la loro eziologia e il loro sviluppo. Per questo motivo i nostri studi preclinici possono, in primo luogo, rafforzare il bagaglio conoscitivo del personale sanitario addetto alla cura e al trattamento di pazienti psichiatrici e allo stesso tempo possono aprire le porte allo studio e alla caratterizzazione, dal punto di vista elettrofisiologico, dell'attività e della funzionalità dei neuroni dopaminergici (DAergici) dell'area ventrale del tegmento (VTA), degli stessi in un modello murino sottoposto in fase prenatale ai prodotti immunitari materni, e a alla descrizione, sempre dal punto di vista neurofisiologico, della funzionalità dei suddetti neuroni in un modello animale da esposizione adolescenziale ai cannabinoidi e contemporaneamente in fase prenatale ai prodotti immunitari materni.

3. METODI

3.1 Trattamenti e cura degli animali

Primo modulo:

Considero e definisco le prime due famiglie di ratti sottoposti ad analisi sperimentale secondo la seguente definizione:

- **Ratti Poly ic** - ratti sottoposti alle citochine materne (mediante iniezione alla madre, durante la gravidanza, dell'acido poliriboinosilico-poliribocitidilico - poli I:C)
- **Ratti Controllo Ctrl** - ratti sottoposti a veicolo prenatale (mediante iniezione alla madre, durante la gravidanza, di soluzione fisiologica)

Una singola dose di poli I:C - acido poliriboinosilico-poliribocitidilico - (4 mg/kg) o di soluzione fisiologica sterile libera da endotossine, è stata somministrata alle madri *Sprague Dawley* – ceppo di ratto albino utilizzato nella ricerca biomedica, figura 3.1 - (Harlan, Italia) del peso di 250-300 g, attraverso iniezione nella vena laterale della coda al 14° giorno di gestazione - quindi dai 2/3 della gestazione di un ratto, che è di 22 giorni circa - (Zuckerman et al., 2003, *Neuropsychopharmacology* 28:1778-89).



Figura 3.1

Per svolgere l'operazione, al fine di non arrecare *stress* nella madre (con il conseguente rischio di aborto o di variabili di disturbo) abbiamo praticato la somministrazione previa anestesia volatile (inalato dal ratto) con isoflurano.

Al fine di garantire gli *standard* di stabulazione e di cura degli animali da laboratorio (legge 609/1986) lo stato di salute delle gestanti è stato scrupolosamente monitorato dal personale addetto nei giorni seguenti alla somministrazione dell'anestetico. L'iniezione del poli I:C o del veicolo è avvenuta per tutte le madri alla stessa ora del giorno (11-13) per non influenzarne i cicli di sonno veglia.

Dalla nascita della prole è partito il conto dei giorni postnatali e, dopo una fase di 7 giorni di svezzamento, gli animali sono stati identificati in relazione al sesso (maschi e femmine) ed adeguatamente separati e stabulati in gabbie da 6 animali, sottoposti a condizioni standard del ciclo luce-buio (12 ore di luce, 8.00-20.00 e 12 di buio: 20.00-8.00) con disponibilità di acqua e cibo *ad libitum*.

Secondo modulo:

- Ratti veicolo pre-natale + THC post-natale (Ratti **Thc**)
- Ratti Poli I:C prenatale + THC post-natale (Ratti **Poly ic/Thc**)
- Ratti veicolo prenatale + veicolo post-natale (Ratti **Ctrl**)
- Ratti Poli I:C pre-natale + veicolo post-natale (Ratti **Poly ic**)

Le procedure utilizzate per lo svolgimento del secondo modulo sono state analoghe a quelle del primo per quanto riguarda l'iniezione di poli I:C o veicolo alle madri.

Tuttavia, i ratti nati dalle madri appartenenti ai due gruppi all'età postnatale di 45 giorni - fase adolescenziale del ratto - sono stati, a loro volta, suddivisi internamente in quattro gruppi sperimentali esponendone:

- ✓ due al trattamento cronico con dosi crescenti di THC per 11 giorni (ratti veicolo prenatale+THC postnatale e ratti poli I:C prenatale+THC postnatale)
- ✓ due con volumi crescenti di veicolo (soluzione salina più tween80) (ratti veicolo prenatale+veicolo postnatale e ratti poli I:C prenatale+veicolo postnatale).

I risultati ottenuti hanno evidenziato, come prevedibile, che i ratti trattati con veicolo pre-natale e con veicolo post-natale mostrano caratteristiche elettrofisiologiche del tutto simili ai ratti trattati con solo veicolo pre-natale durante il primo modulo, ed è per questo motivo che entrambe le famiglie di ratti sono state raggruppate in un'unica famiglia, denominata CTRL.

Stesso discorso per i ratti POLY IC del primo modulo e i ratti POLY IC + veicolo post.natale: per entrambi, d'ora in avanti, si parlerà come di ratti POLY IC.

Dosi e tempi di somministrazione del THC sono riportati in tabella 1.1 e sono stati acquisiti dalla letteratura (*Zamberletti et al., 2011, Neuroscience, in press*).

TABELLA TRATTAMENTI CON THC IN ADOLESCENZA

[45-55 giorno postnatale (PND)]

Days 45-47 - pnd	2.5 mg/kg (x2 volte/die)
Days 48-51 - pnd	5 mg/kg (x2 volte/die)
Days 52-55 - pnd	10 mg/kg (x2 volte/die)

Tabella 1.1

3.2 Elettrofisiologia in vivo

Per entrambi i moduli, tra il 75° e l'85° giorno di vita postnatale una parte animali trattati con poli I:C e quelli di controllo sono stati assegnati alle procedure sperimentali di elettrofisiologia.

I ratti sono stati, in primo luogo, anestetizzati con uretano (1.3 g/kg intraperitoneale i.p. - via di somministrazione di farmaci all'interno del liquido peritoneale, cioè del liquido che umidifica la superficie di gran parte degli organi contenuti nell'addome e anche di parte degli organi pelvici) e sono stati sottoposti ad una procedura chirurgica per l'applicazione di una cannula nella vena femorale, al fine di garantire eventuali richiami di anestetico lungo l'esperimento e per somministrare le sostanze d'abuso studiate.

In seguito, gli animali sono stati posizionati su apparecchiatura stereotassica (Figura 3.2) - tecnica neurochirurgica che consente di raggiungere formazioni situate nella profondità del cervello, risparmiando le strutture soprastanti e riducendo al minimo la lesione cranica, è stata praticata un'incisione sullo scalpo e sono state prese le coordinate per l'identificazione dell'area di inserzione dell'elettrodo registrante.

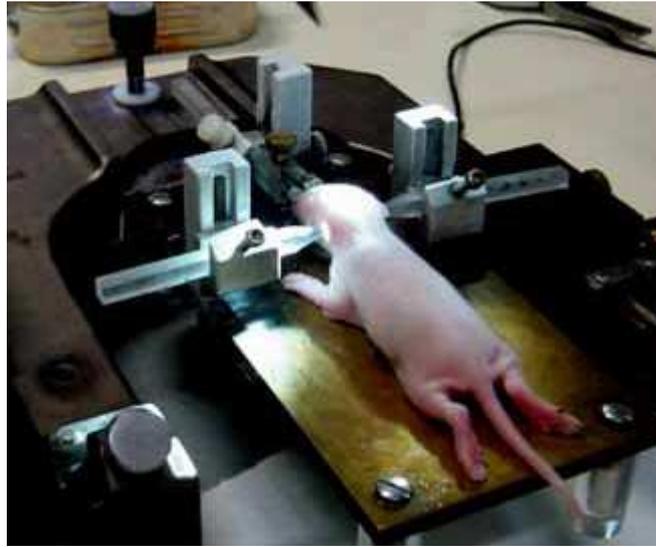


Figura 3.2

I riferimenti stereotassici per la VTA sono stati presi basandoci sull'atlante stereotassico di *Paxinos e Watson (2007)* (+1.8/2.2 mm dal Lambda; 0.4/0.6 mm dall'incrocio delle suture sagittali e -7.5/-8.5 mm dalla superficie corticale).

Una volta prese le misure in prossimità delle coordinate riportate per la VTA è stato applicato l'elettrodo registrante, inserito in una micropipetta di vetro dal diametro di 1.5 μm impregnata con una soluzione salina di Acetato di Sodio (con impedenza stimata tra i 5-10 M Ω) NaAc 0.5 M con 2% di *pontamine sky blue*.

La temperatura dei ratti è stata mantenuta costante a $37\pm 1^\circ\text{C}$ tramite l'ausilio di un tappetino riscaldante.

Per gli studi di caratterizzazione dell'attività dei neuroni DAergici ci siamo avvalsi di una mappatura dell'intera area mediante nove affondate perpendicolari a coordinate fisse.

Per la selezione dei neuroni DAergici della VTA ci siamo avvalsi dei criteri precedentemente descritti in letteratura (es. Grace e Bunney, 1983, *Neuroscience* 10:301-15; 1984, *J Neurosci* 4:2866-76; 1984, *J Neurosci* 4:2877-

90) – forma d’onda del potenziale d’azione del neurone dopaminergico, tipico “suono” caratteristico, frequenza basale di firing, posizionamento dell’elettrodo nella giusta area indicata dalle coordinate dell’atlante stereotassico di ratto.

L’attività è stata filtrata (passa banda: 500-5000 Hz), amplificata (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK) e visualizzata su oscilloscopio digitale (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK).

L’acquisizione dell’attività elettrica del neurone isolato è stata effettuata mediante convertitore analogico-digitale CED1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) collegato a piattaforma computerizzata con installato programma Spike2.

Il segnale così ottenuto è stato successivamente campionato, col programma Spike2, con un intervallo di campionamento pari a 10ms, in modo da ottenere un treno di impulsi come successione di 1, spike, e 0, nessuno spike, (dopo aver effettuato un’analisi empirica dell’intervallo minimo di tempo che intercorre tra uno spike e l’altro, si è evinto che all’interno di tale intervallo non occorrono mai più di 2 spikes).

Al fine di rendere l’analisi elettrofisiologica del segnale del neurone dopaminergico più completa, ho preferito trasferire tale segnale in Matlab, così da sviluppare un software più completo e più facilmente modificabile e ampliabile dal sottoscritto con nuovi parametri di analisi.

Per questo motivo, il treno di spike è stato trasferito in un file txt, e successivamente importato in Matlab tramite Import Wizard.

Negli studi di mappaggio il protocollo di registrazione è stato effettuato mediante acquisizione dell’attività basale della cellula isolata per 120-180 secondi (in media, per alcune cellule fino a 300 sec).

E’ stato riportato in letteratura che i neuroni DAergici della VTA, per gestire il rilascio di neurotrasmettitori e per modulare le attività suddette, manifestano il loro comportamento elettrico in tre modalità distinte, con risvolti funzionali differenti (Hyland *et al.*, 2002, *Neuroscience* 114:475-92). Essi possono

trasdurre il segnale elettrico in modalità regolare (figura 3.3, cellula A1), dove i potenziali d'azione si susseguono a frequenze moderate alla stessa distanza l'uno dall'altro; irregolare (figura 3.3, cellula B1), dove la successione dei potenziali d'azione non segue un criterio preciso in termini temporali (in entrambi i casi si parla di *single spiking*) e in treni di potenziale d'azione (*burst*) (figura 3.3, cellula C1; figura 3.4), dove il neurone spontaneamente produce potenziali d'azione estremamente ravvicinati che assumono la forma di un treno di eventi compatto e distanziato dal successivo. Il terzo pattern riportato è assai importante perché è stato correlato con un aumento massiccio del rilascio di DA nelle aree terminali (Chergui et al., 1996, *Neuroscience* 72:141-56; 1997, *Eur J Neurosci* 9:2370-82).

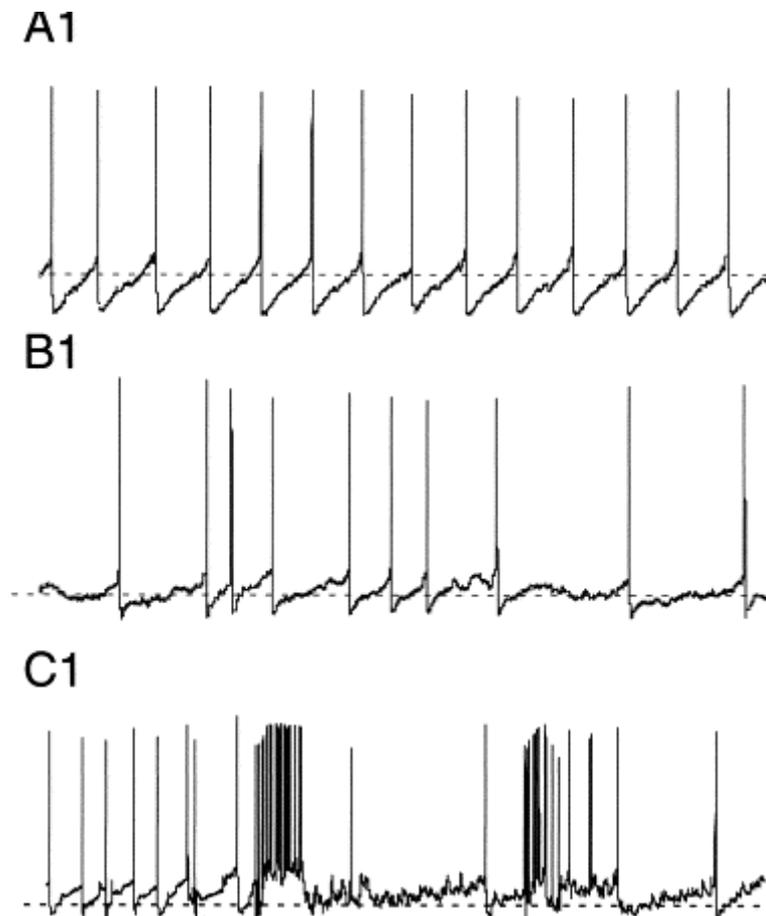


Figura 3.3

Per bursting si intende quel fenomeno generale che indica un determinato grado di attivazione del neurone nel Sistema Nervoso Centrale SNC, in cui a periodi di rapido spiking seguono periodi silenti e quiescenti.

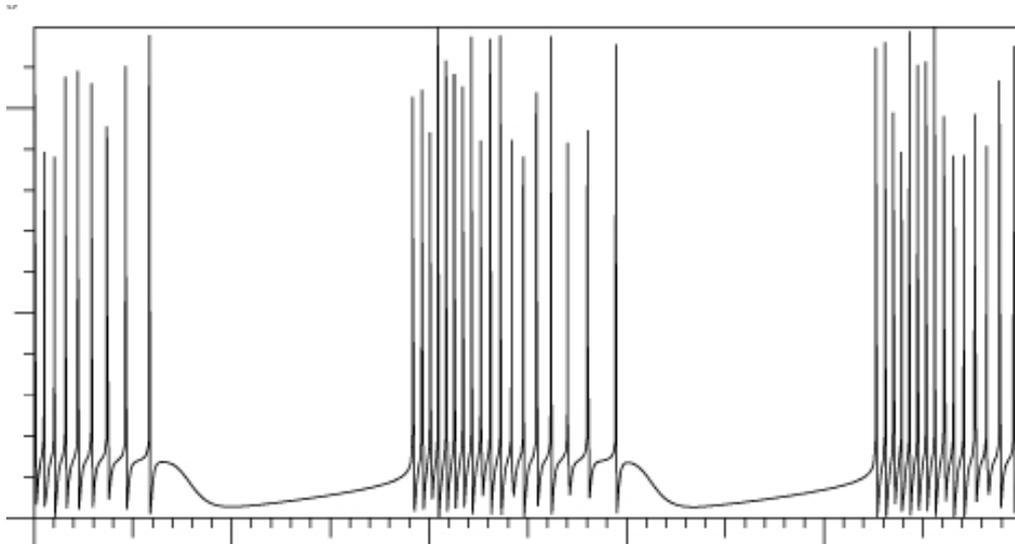


Figura 3.4

Il livello di bursting varia considerevolmente da cellula a cellula. Esso, inoltre, varia in risposta a stimoli sensoriali e droghe o farmaci secondo una serie di diversi meccanismi.

Queste osservazioni suggeriscono che il passaggio dalla modalità di firing del “single spiking” al “bursting” rappresenta una tra le più importanti caratteristiche di variazione dell’influenza di un neurone dopaminergico sul neurone post-sinaptico (Freeman and Bunney, 1987).

In accordo con la precedente affermazione, una stimolazione di neuroni dopaminergici che aumenti il bursting della cellula stessa determina un maggior rilascio di dopamina rispetto alla modalità single spiking (Gonon, 1988).

3.3 Trasferimento del segnale in Matlab

Per l'analisi del segnale elettrico da singola cellula (neurone dopaminergico), in questo studio ho sviluppato un software in grado di analizzare numerosi parametri.

Sono partito dal tracciato del segnale registrato ed evidenziato dal software Spike2. Ho campionato, quindi, il segnale con un tempo di campionamento $T_s = 10$ ms, in modo da esser sicuro di ridurre tale segnale in una successione di 1 (PdA) e 0 (nessun PdA), dopo aver osservato che in un intervallo di tempo di 10 ms non occorrono mai più di due spike.

In seguito ho tradotto questa successione dal formato caratteristico del software Spike2 a un file .txt, in modo da poterlo rendere leggibile anche da altri software, previa opportuna conversione, come ho effettivamente fatto per poterlo processare in Matlab. Quest'ultimo passaggio l'ho ottenuto importando il file con "Import Wizard".

3.4 Analisi parametri

3.4.1 Parametri Tradizionali

A tal riguardo, per entrambi i moduli, e quindi per tutte e quattro le famiglie di ratto analizzate, si sono valutati i seguenti parametri:

- Numero di **spike totali** nell'intervallo di tempo di osservazione, utile per calcoli successivi, vista la variabilità dell'intervallo di osservazione
- **Frequenza di scarica** della cellula, che rappresenta l'informazione fondamentale trasmessa dal segnale PdA
- Coefficiente di variazione percentuale **CV%**, inteso come rapporto tra la deviazione standard degli ISI (InterSpike Interval, intervallo temporale tra PdA), e la media degli stessi. Rappresenta un indice della regolarità del firing del neurone: a

valori bassi di CV% corrisponde una maggior regolarità di scarica

3.4.2 Parametri Burst

Anch'essi utilizzati per valutare cellule appartenenti alle quattro famiglie di ratti:

- Numero di spike appartenenti ai burst, cioè **numero di spike per burst**
- **% spike per burst**, cioè percentuale di PdA che appartengono ai burst rispetto al totale di PdA del segnale
- **Numero medio di spike per burst**, MSB, Mean Spikes per Burst, da un minimo di due spike: più lungo risulta essere il burst, cioè di più spike esso è composto, maggiore sarà il rilascio di dopamina nelle terminazioni post-sinaptiche
- Frequenza di occorrenza dei burst lungo il tracciato, **frequenza burst**
- **Durata media del burst** (ms), MBD, Mean Burst Duration
- **Frequenza media intraburst**, MIBF, Mean IntraBurst Frequency, che calcola la frequenza con cui vengono generati i PdA all'interno del burst

3.4.3 Parametri confronto Tradizionali e Burst

- **rA**, dato dal rapporto tra % spike per burst e CV%, e indica un'eventuale correlazione tra percentuale di spike appartenenti ai burst rispetto al totale di burst del segnale elettrico del neurone, e regolarità del firing della cellula. Per valori vicini ad 1 c'è correlazione.

- **rB**, rapporto tra frequenza con cui avvengono i burst nel segnale e frequenza di scarica della cellula. Per valori simili, quindi per alta correlazione, si avranno valori vicini all'unità.
- Si è cercato, inoltre, una utile suddivisione del comportamento della cellula in quattro sotto-gruppi, discriminati in base al confronto tra i valori di % spike per burst e frequenza di scarica del neurone. (Mameli Engvall et al., 2006, *Neuron* 50:911-21). Si è, in tal modo, potuto distinguere il comportamento dei neuroni DAergici della VTA nelle seguenti sottoclassi:
 - *bassa frequenza/bassa percentuale di burst (LFLB)*
 - *bassa frequenza/alta percentuale di burst (LFHB)*
 - *alta frequenza/bassa percentuale di burst (HFLB)*
 - *alta frequenza/alta percentuale di burst (HFHB)*

3.4.4 Ritmicità della cellula

Come visto, i neuroni dopaminergici ricevono input da diverse aree cerebrali. Le informazioni ricevute da queste aree sono integrate nel soma e trasmesse sotto forma di treni di impulsi, alle terminazioni post-sinaptiche. L'informazione è trasportata sotto forma sia di frequenza di scarica, che di precisi e distinguibili firing pattern.

Questi ultimi sono riconoscibili sotto forma di single spiking o di bursting, come detto precedentemente.

Il burst è riconosciuto dagli attuali software secondo il criterio tradizionale '80/160' ms, cioè si è dinanzi a un burst se il treno di impulsi ha i primi due spike che intercorrono in un intervallo di tempo inferiore agli 80 ms (inizio burst: $ISI < 80ms$), e tra l'ultimo spike del burst e il successivo vi siano almeno 160 ms (fine burst: $ISI > 160ms$).

Un'analisi spettrale del segnale evidenzia che l'eccitazione del neurone avviene non solo con l'aumento della frequenza di scarica e con la frequenza dei burst, ma anche con un aumento del numero di cellule che

presentano un'oscillazione alle basse frequenze (Slow Oscillation, SO, tipicamente tra gli intervalli 0-3 Hz o 3-6 Hz).

In realtà, però, solo alcuni di questi eventi ritmici e periodici, del tutto riconducibili al pattern di burst, hanno le caratteristiche per essere considerati effettivamente burst secondo il tradizionale criterio '80/160'. Dall'osservazione di numerosi tracciati, molti treni di spike non verrebbero considerati burst a causa di una delle seguenti ragioni (vedi figura 3.5, dove si è indicato il burst con un trattino al di sopra degli spike che lo compongono, individuati secondo il criterio tradizionale '80/160'):

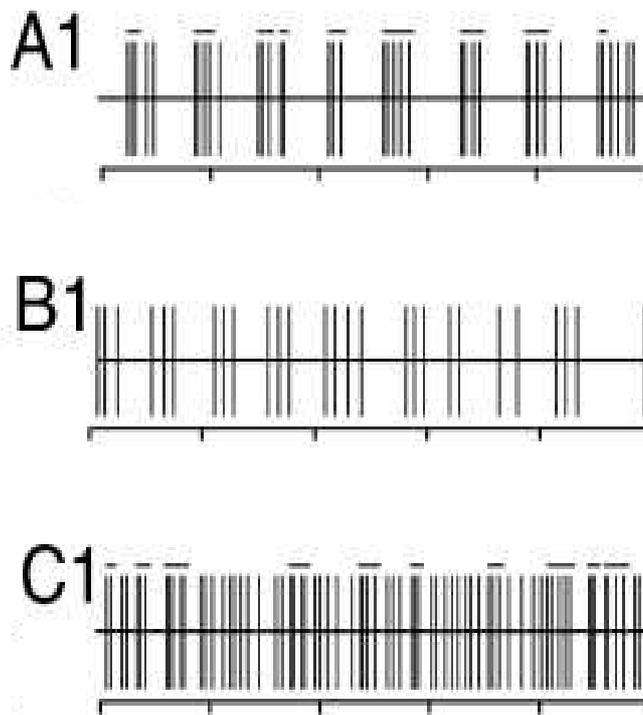


Figura 3.5

- Tutti gli ISI dei cluster sono > 80 ms (cellula B1)
- Il cluster consiste in più d'un burst individuato secondo i criteri tradizionali (cellula A1)
- I cluster contengono sia singoli spike che burst individuati con la tecnica tradizionale (cellula A1 e in parte cellula C1)

Risulta evidente, perciò, che il criterio tradizionale '80/160' in molti casi potrebbe risultare inappropriato per descrivere l'attività elettrica di un neurone dopaminergico con firing ritmico e periodico.

Secondo la definizione, quindi, la cellula B1 risulta essere una cellula non-bursting, mentre la cellula A1, che ha grosso modo le stesse caratteristiche, un neurone in SO, mentre sono definite cellule burst la A1 e la C1, di cui quest'ultima, in realtà, non mostra alcuna periodicità nel firing, però è considerata burst come la A1, pur avendo caratteristiche come frequenza di scarica e caratterizzazione del cluster di spike completamente differente.

Dall'osservazione dei tre tracciati risulta, perciò, che A1 ha un comportamento simile a C1 (falso), mentre B1 è considerata diversa da A1 (falso) e diversa anche da C1 (vero).

Il criterio '80/160' commette 2 errori di distinzione su 3 casi, mentre col criterio della SO la cellula A1 sarebbe giustamente accostata alla cellula B1, che a loro volta differiscono evidentemente dalla cellula C1, suggerendo che sarebbe di maggior ausilio l'utilizzo della tecnica di riconoscimento della ritmicità del firing del neurone per individuare cluster riconducibili ai burst, piuttosto che la tradizionale metodologia.

Quello che ho provato ad eseguire è stato un algoritmo in grado di evidenziare:

- la presenza di una SO nei neuroni dopaminergici
- che relazione intercorre tra SO e burst individuati, questi ultimi, con la tecnica tradizionale

- se la SO, rispetto alle condizioni basali, tende ad aumentare con la somministrazione di sostanze d'abuso (Thc), e a diminuire in popolazioni di cellule con anomalie (in soggetti con sintomi simil-psicotici da schizofrenia).

Il mio algoritmo mi ha permesso di individuare, per tutte e quattro le famiglie di ratti:

- Il **numero di neuroni in SO**, per tutte e quattro le famiglie di ratti.
- **% cellule in SO** rispetto al totale di cellule analizzate
- **Numero di neuroni nonSO**
- **% cellule nonSO**

Successivamente, il segnale elettrico del neurone, campionato e con le caratteristiche riportate in precedenza, è stato sottoposto ad un'analisi spettrale utilizzando la funzione PWELCH in Matlab:

Funzione Matlab : pwelch.m

$[Pxx, n] = pwelch(x, Nwin, Noverlap, Nfft, ns)$

Valuta la densità spettrale di potenza Pxx del vettore x usando il metodo di Welch.

Il vettore è suddiviso in segmenti di lunghezza $Nwin$,

con sovrapposizione $Noverlap$;

ogni segmento è moltiplicato per una finestra di Hamming;

La FFT di ogni segmento è valutata usando un numero di punti $Nfft$;

ns è la frequenza di campionamento usata per costruire il vettore frequenza n

Ho svolto un'analisi preventiva per definire le migliori condizioni di analisi.

Ho valutato, perciò, la variazione dei seguenti tre parametri, considerando un segnale della lunghezza media di 160 secondi:

- Finestratura, casi $w = 500 \text{ ms}$ / $w = 1000 \text{ ms}$ / $w = 2000 \text{ ms}$
- Numero di campioni della fft, casi $nfft = 500$ / $nfft = 1000$ / $nfft = 2000$
- Sovrapposizione della finestra, casi overlapping del 10% / 50% / 90%

I risultati migliori, come si evince dalla figura 3.6, in cui mostro prima tutte le possibili combinazioni di parametri (per ogni sotto-grafico c'è la sovrapposizione dei tre segnali corrispondenti ai tre casi di percentuale di sovrapposizione, tra le finestre, considerati: 10%,50%,90%), si ottengono con i seguenti valori

$w = 1000 \text{ ms}$;

$nfft = 1000$ campioni;

overlapping del 50%.

Le figure 3.7 e 3.8 mostrano due casi utili ($w = 1000$, $nfft = 1000$; $w = 500$, $nfft = 1000$, con overlapping del 50%), mentre le figure 3.9 e 3.10 due casi poco utili ($w = 1000$, $nfft = 2000$; $w = 500$, $nfft = 2000$, anch'essi col 50% di overlapping).

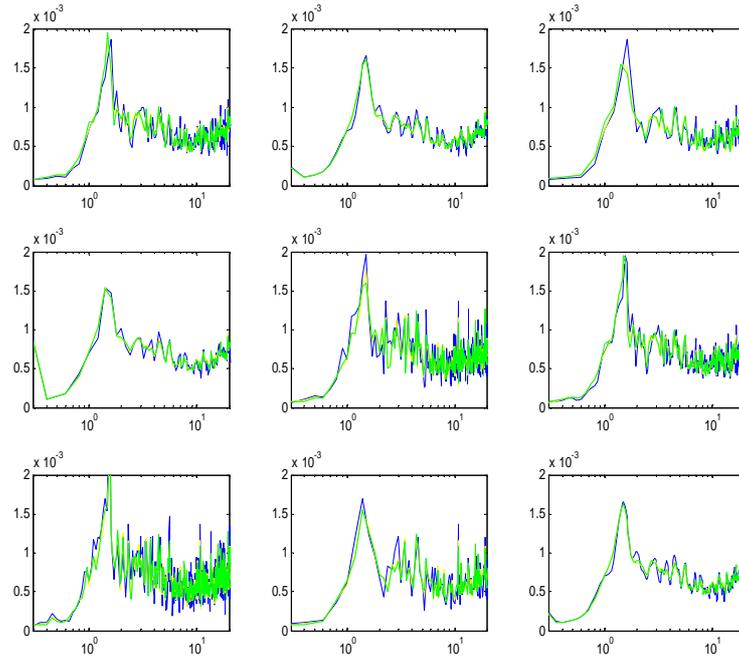


Figura 3.6

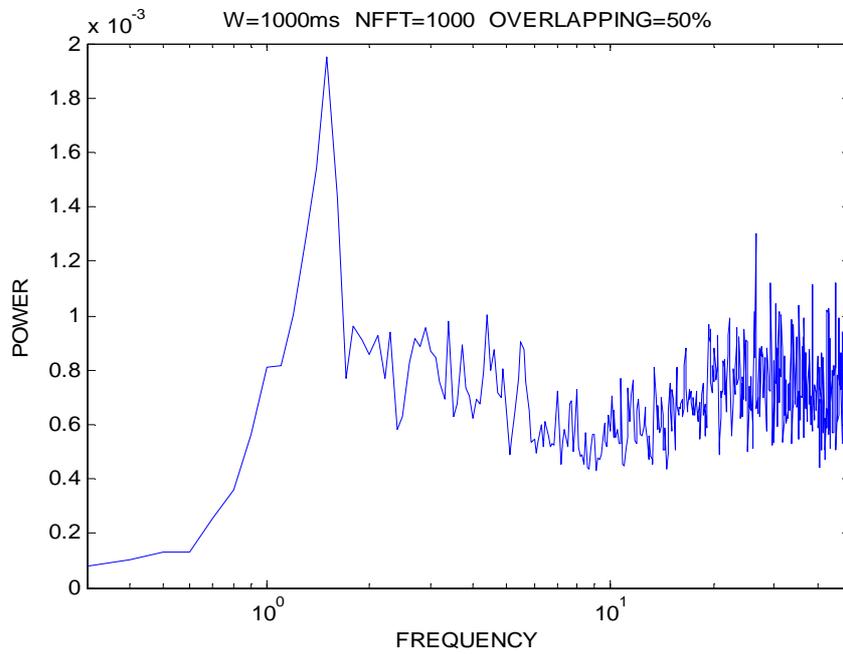


Figura 3.7

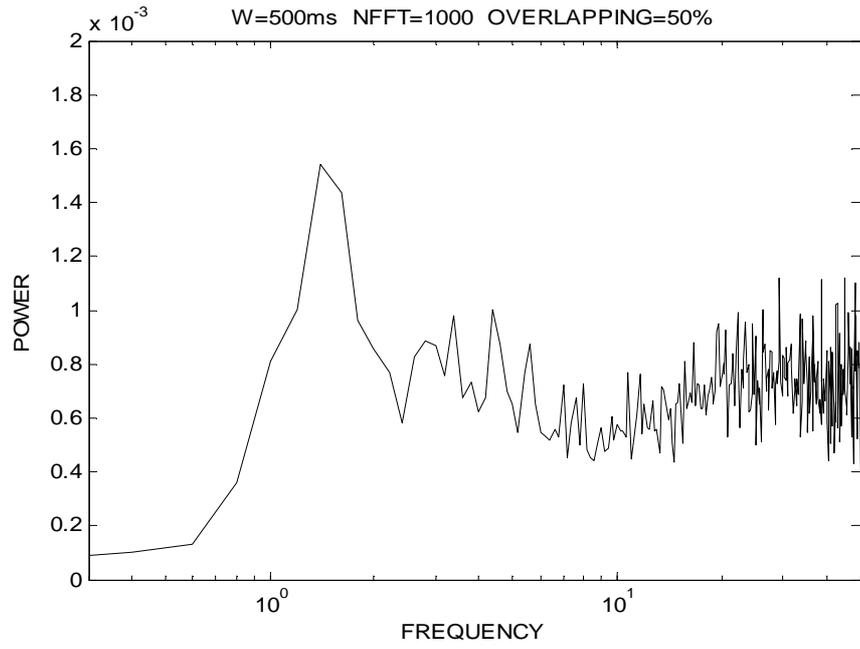


Figura 3.8

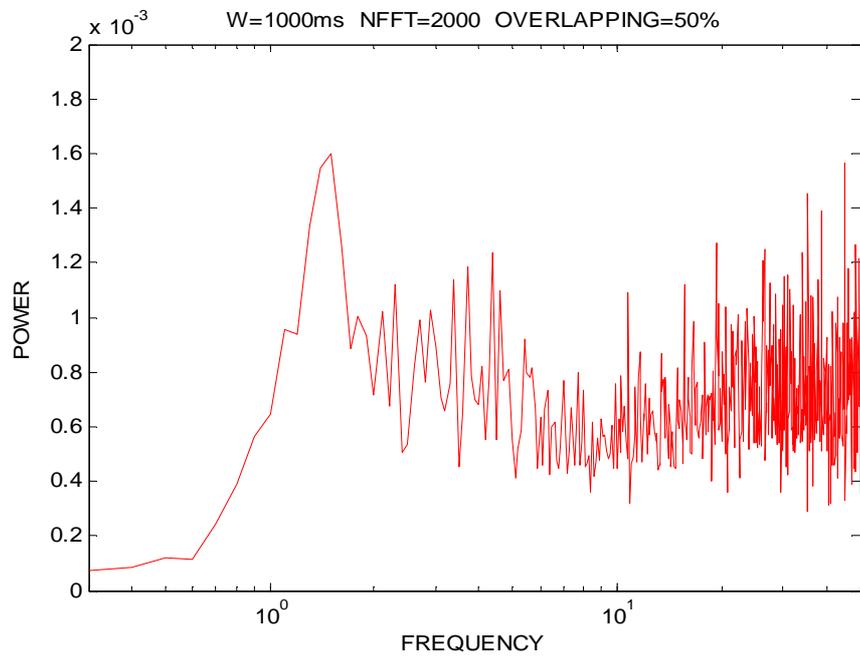


Figura 3.9

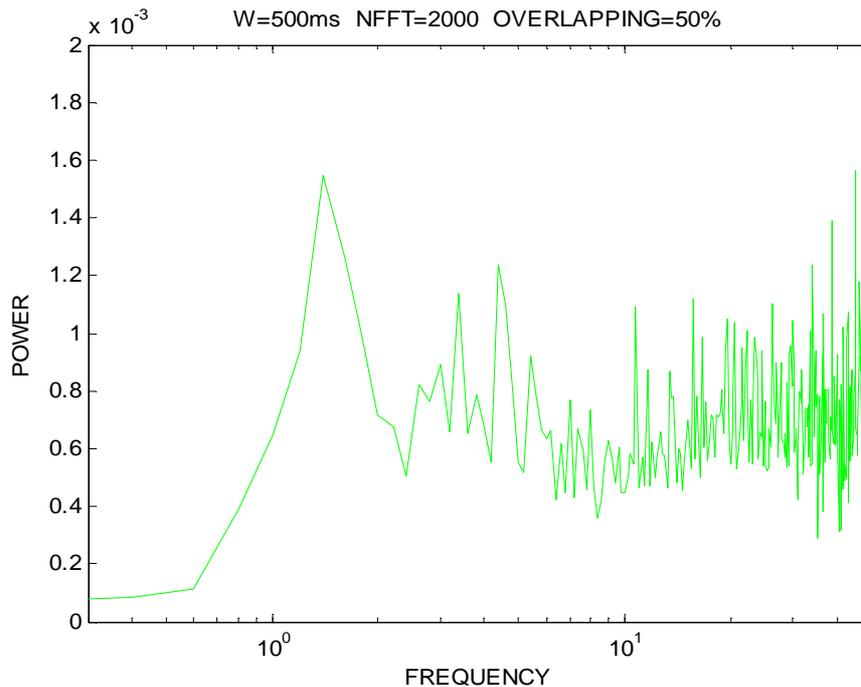


Figura 3.10

Dall'osservazione dei grafici ottenuti dai vettori restituiti dalla funzione pwelch, ho contato il numero di cellule che presentano ritmicità nel firing, per tutte e quattro le famiglie di ratti.

L'individuazione ha seguito precisi criteri:

- Picco principale di potenza ben evidente e del valore minimo di 0.5×10^{-3}
- Separazione evidente tra il picco principale e il primo dei laterali
- Rumore alle alte frequenze non eccessivo, con picchi non superiori al picco principale

I parametri che ho successivamente valutato sono stati:

- **Ppicco**, come picco massimo di potenza
- **Fpicco**, cioè la frequenza del picco principale di potenza nelle cellule SO

- Dopo aver suddiviso l'asse delle frequenze nell'intervallo 0-12 Hz in quattro **sotto-intervalli di frequenze 0-3 Hz / 3-6 Hz / 6-9 Hz / 9-12 Hz**, il software ha individuato il sotto-intervallo con il maggior numero di cellule si SO.

3.4.5 Relazione tra SO e Burst

A tal riguardo, ho introdotto i seguenti parametri:

- **% spike per burst totali**, cioè la percentuale di spike appartenenti ai burst, rispetto al totale degli spike di un segnale, per tutte le cellule di ogni famiglia di ratto
- **% spike per burst SO**, ma riferito alle sole cellule in SO
- **% spike per burst nonSO**, per le cellule nonSO

Inoltre, per valutare la percentuale di cellule di SO (o di nonSO) che hanno % spike per burst maggiore del valore di % spike per burst del totale delle cellule, ho introdotto i seguenti parametri:

- **Percentuale cell SO > media tot**
- **Percentuale cell nonSO > media tot**

Infine, ho considerato i seguenti parametri per le cellule in SO, con valori vicini all'unità che indicano correlazione, presi dalla letteratura:

- **ra**, rapporto tra frequenza burst e frequenza SO del picco di potenza, che indica che ogni ciclo di oscillazione può contenere 0, 1 o più burst
- **rb**, rapporto tra ra e ampiezza picco di potenza, serve a stabilire se vi è una correlazione tra il rapporto precedente e l'ampiezza del picco di potenza nelle cellule SO, suggerendo se il picco, se ampio abbastanza, possa contenere burst
- **rc**, dato dal rapporto tra la % spike per burst delle cellule SO e l'ampiezza del picco di potenza

- **rd**, frequenza burst relazionata all'ampiezza del picco di potenza delle cellule SO

Tutti i parametri fin qui analizzati sono stati applicati a tutte e quattro le famiglie di cellule, Ctrl (n, numero di cellule considerate = 90), Poly ic (n = 80), Thc (n = 70), Poly ic/ Thc (n = 70), per un totale di 310 cellule analizzate.

Ottenuti i dati relativi ai parametri citati, ho sviluppato delle funzioni in grado di calcolare i valori medi e deviazioni standard per ogni variabile, per ogni famiglia di cellule, e tutti i relativi grafici.

Quest'ultimo passaggio, medie e deviazioni standard, così come l'analisi statistica effettuata con test Anova (analisi della varianza) su quattro livelli, in futuro saranno eseguite con appositi software in dotazione nel laboratorio in cui sono stati eseguiti gli esperimenti.

4. RISULTATI

Al fine di poter caratterizzare l'attività elettrica dei neuroni DAergici nei ratti esposti ai prodotti immunitari materni e alla somministrazione adolescenziale di THC, il primo passo che abbiamo affrontato è stato quello di valutare il comportamento elettrico dei neuroni DAergici della VTA nei ratti sottoposti in fase prenatale ad una singola dose di poli I:C iniettata nella vena laterale della coda della madre (ratti *Poly ic*).

Un totale di 170 cellule DAergiche situate nel nucleo parabrachiale della VTA sono state registrate dai ratti utilizzati nella prima parte del disegno sperimentale. Di queste 80 sono state registrate da ratti poli I:C, mentre 90 sono state acquisite da ratti di controllo ctrl.

Per ogni cellula selezionata sono stati valutati i principali criteri elettrofisiologici riportati in letteratura per i neuroni mesencefalici DAergici (es. *Grace e Bunney, 1983, Neuroscience 10:301-15; 1984, J Neurosci 4:2866-76; 1984, J Neurosci 4:2877-90*).

Inoltre, per valutare la risposta dei neuroni DAergici della VTA nei ratti poli I:C esposti al THC in adolescenza, gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali:

poli I:C+veicolo in adolescenza (Poly ic);

veicolo+veicolo in adolescenza (Ctrl);

poli I:C+THC in adolescenza (Poly ic/Thc);

veicolo+THC in adolescenza (Thc).

I ratti del primo e del secondo gruppo non presentavano differenze rispetto ai dati precedentemente ottenuti in tutti i parametri analizzati, quindi d'ora in avanti si considereranno come due uniche e distinte famiglie, ratti Poly ic e ratti Ctrl. Inoltre, il numero di cellule analizzate, relativamente ai gruppi Poly ic/Thc e Thc, sono rispettivamente 70 e 70, per un totale di 310 cellule registrate dai

ratti, suddivisi nei quattro gruppi sperimentali sopracitati, la cui significatività dei risultati è stata valutata con test ANOVA con $\alpha = 0.05$.

4.1 Risultati parametri Tradizionali

I primi parametri analizzati sono stati la *frequenza di scarica* del neurone e il *coefficiente di variazione percentuale CV%*.

Il primo mostra una frequenza di firing della cellula decisamente inferiore nei ratti Poly ic (2.71 Hz) rispetto ai ratti di controllo Ctrl (3.59 Hz), che suggerisce una minore efficacia delle cellule dopaminergiche con trattamento pre-natale rispetto ai controlli.

La frequenza di firing, però, aumenta drasticamente con la somministrazione di Thc ai controlli (4.29 Hz) ; inoltre, essa aumenta anche nei ratti Poly ic trattati con Thc - Poly ic / Thc(3.31 Hz), stimolando il neurone con trattamento pre-natale a sparare con frequenze più alte e più simili ai valori di frequenza dei Ctrl. Vedremo che questo parametro risulta, dai dati, correlato ad un aumento del numero di cellule che sparano con una certa ritmicità, e inoltre tali variazioni risultano significative (figura 4.1).

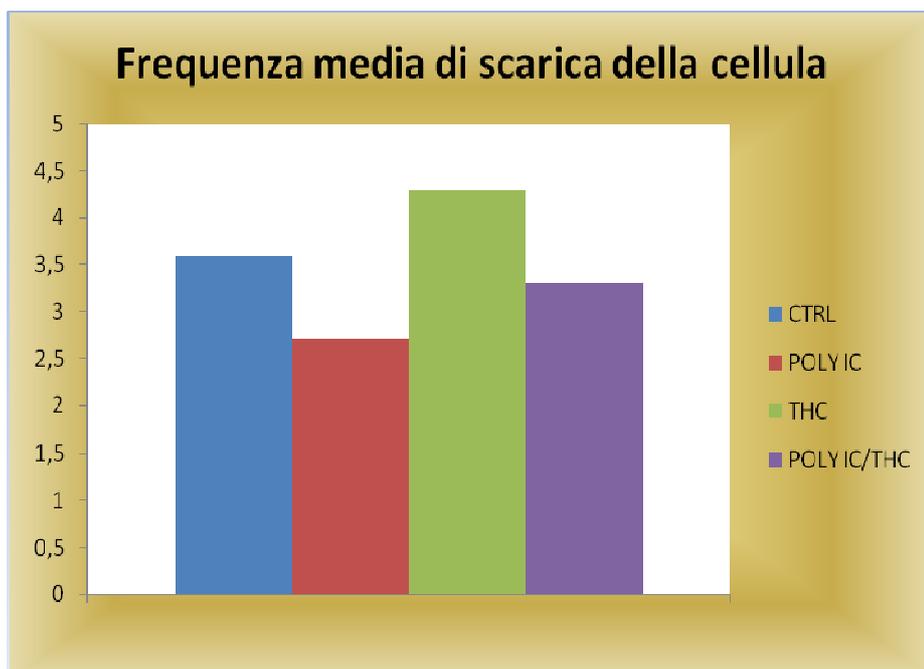


Figura 4.1

Il parametro CV%, che è un indice di regolarità del firing della cellula, mostra una maggior regolarità nei ratti Poly ic / Thc (65.5%) e nei Poly ic (69.86%) , con valori simili nei Ctrl (63.92%) , ma decisamente inferiori nei Thc (46.27%) (variazioni significative), come mostrato in figura 4.2.

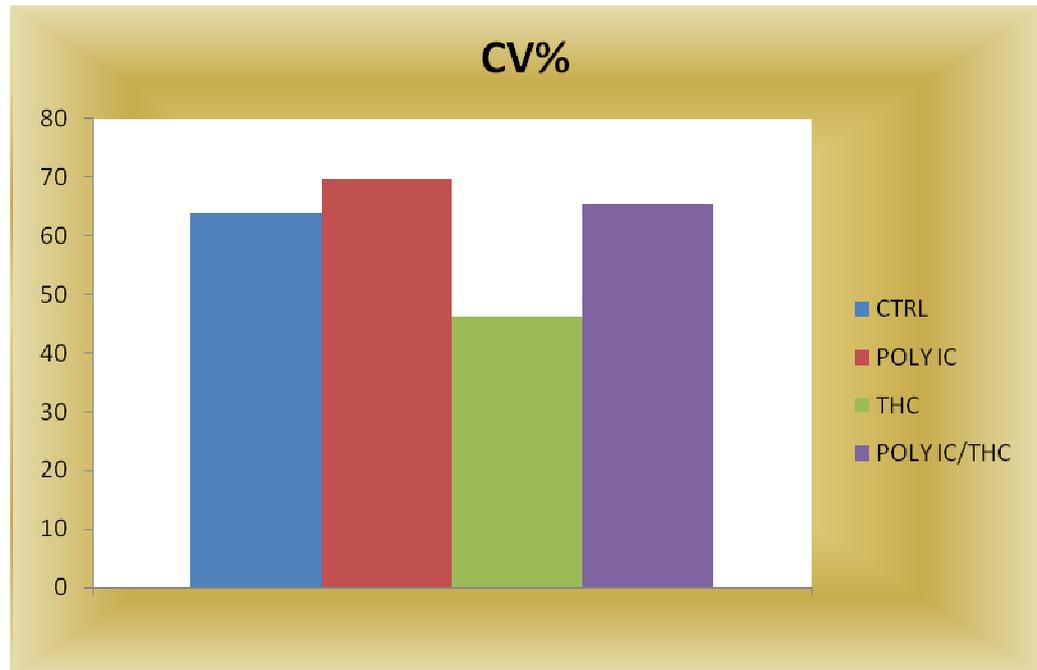


Figura 4.2

4.2 Risultati parametri e studio del Burst

Analizziamo, ora, le caratteristiche del burst, per ogni famiglia di ratti. Consideriamo il parametro riferito alla percentuale di scarica in burst, cioè *% spike per burst*, che indica qual è la percentuale degli spike totali che appartengono ai burst, la cui variazione risulta significativa dall'analisi della varianza..

La percentuale di spike appartenenti ai burst maggiore risulta appartenere ai Ctrl (22.7%), mentre si osservano valori (inferiori rispetto ai Ctrl) simili tra famiglie di ratti Poly ic (14.58%) e ratti Poly ic/Thc (16.8%).

Una diminuzione della percentuale la si riscontra nei ratti Thc (11.25%), contrariamente a quanto ci si aspetterebbe e a quanto sarà evidenziato dall'analisi successiva della ritmicità di firing della cellula, infatti tale percentuale risulta dimezzata rispetto ai neuroni Ctrl (figura 4.3).

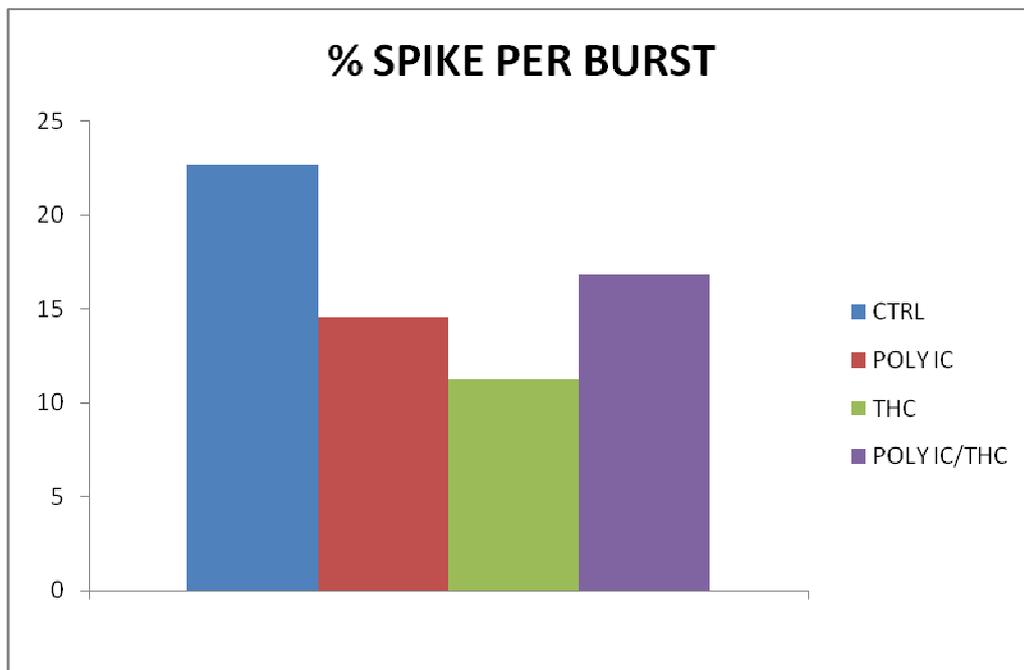


Figura 4.3

Per ogni burst, inoltre, è stato analizzato di quanti spike risulta composto, il **numero medio di spike appartenenti al burst** – Mean Spike per Burst MSB. I Ctrl ne mostrano mediamente (2.85), numero vicino ai Poly ic/Thc (2.76), leggermente inferiore nei Thc (2.64), e significativamente inferiore nei Poly ic (2.40) , soprattutto se confrontati coi dati riferiti ai Ctrl (figura 4.4).

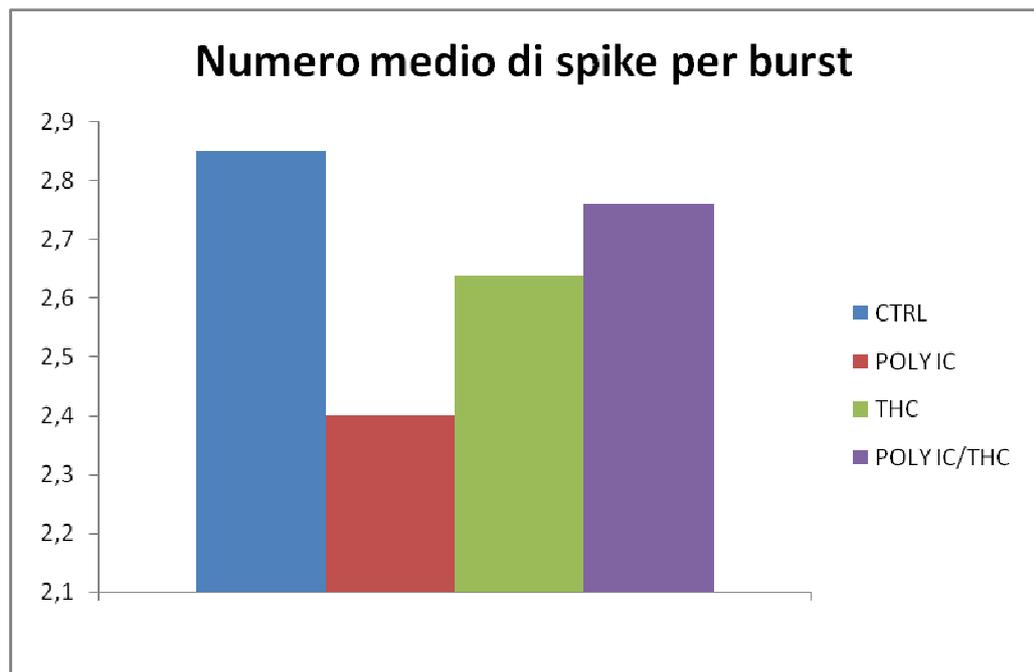


Figura 4.4

Ulteriori parametri che possano caratterizzare il burst sono la **durata media del burst** (figura 4.5a) e la **frequenza intraburst media** (figura 4.5b), rispettivamente Mean Burst Duration MBD e Mean IntraBurst Frequency MIBF, con quest'ultimo dipendente sia dalla durata media del burst che dal numero medio di spike per burst (entrambi significativi).

Un singolo burst dura, mediamente, di più nei Thc (143.73 ms), con frequenza media intraburst più bassa (28.44 Hz).

Durata simile tra Poly ic/Thc (131.87 ms) e Ctrl (137.28 ms), e simile frequenza intraburst (36.49 Hz) (34.47 Hz) .

Durata inferiore, invece, la si osserva nei ratti Poly ic (96.85 ms), e con frequenza intraburst maggiore che negli altri casi (45.42 Hz), nonostante un numero inferiore di spike per burst rispetto agli altri 3 gruppi di neuroni.

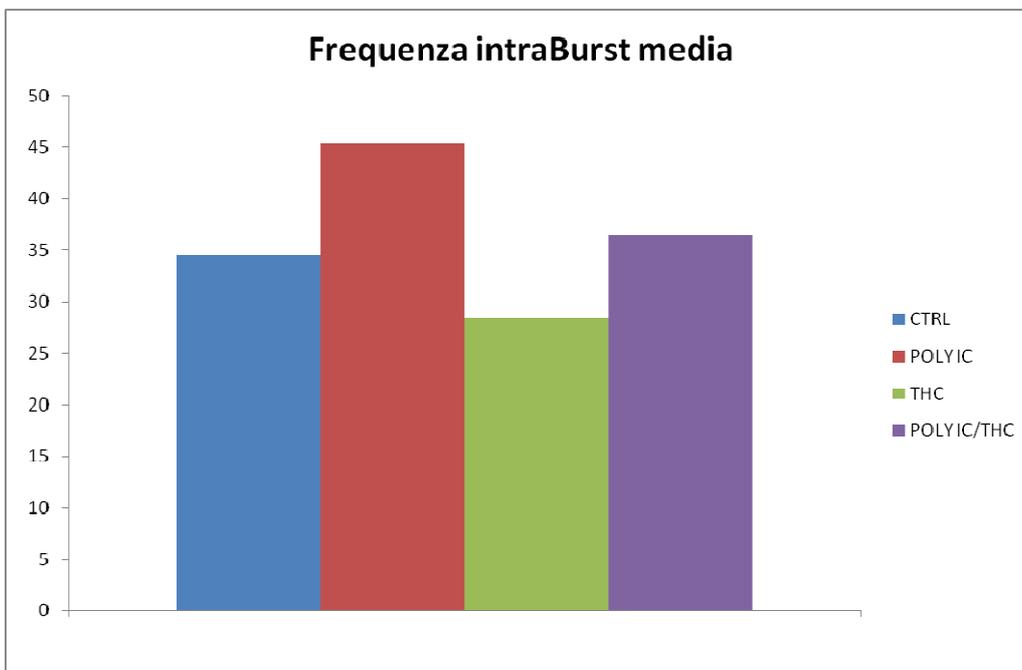
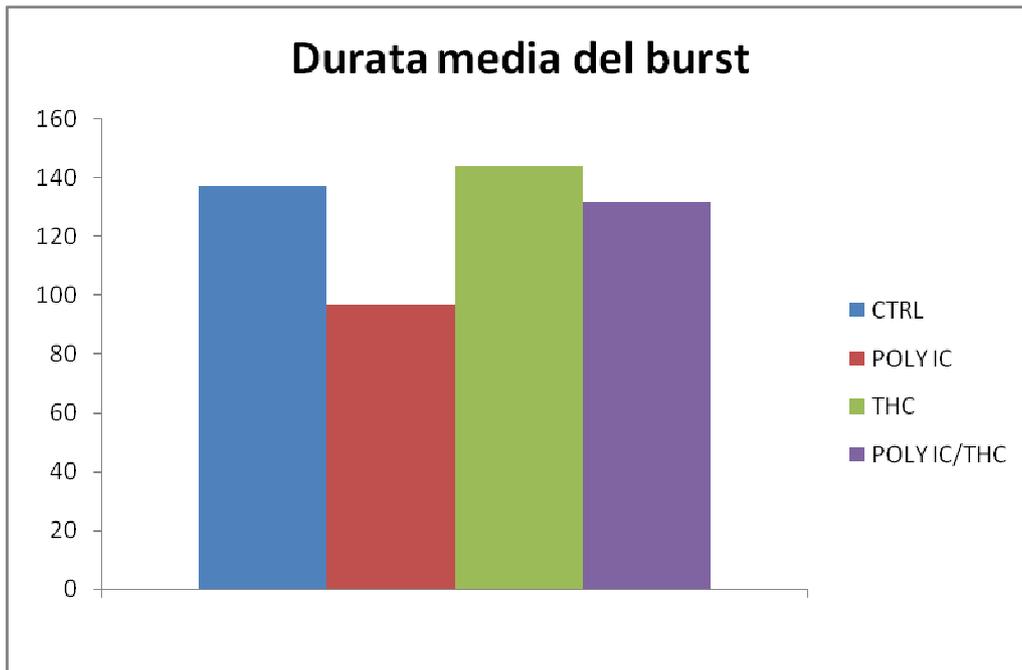


Figura 4.5a e Figura 4.5b

La frequenza di occorrenza del burst, lungo tutta l'osservazione del segnale, è evidenziata dal parametro *frequenza burst* (figura 4.6).

Questi ultimi hanno una frequenza maggiore nei Ctrl (0.22 Hz), e vicina anche ai casi Thc (0.16 Hz) e Poly ic/Thc (0.17 Hz), ma più bassa nei Poly ic (0.11 Hz), in stretta relazione con quanto mostrato dalla successiva

analisi della ritmicità di firing del neurone, e anche con il parametro frequenza di scarica .

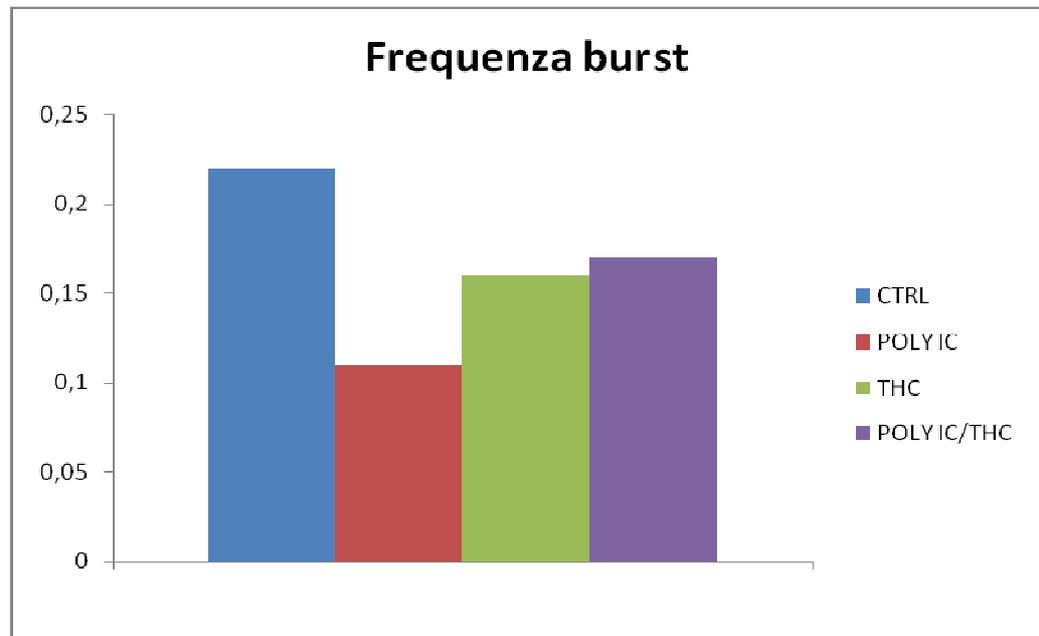


Figura 4.6

In definitiva, i dati (significativi) mostrano che i burst dei Poly ic, rispetto ai controlli Ctrl, sono caratterizzati da un numero inferiore di PdA, hanno una frequenza inferiore, durano meno e hanno una frequenza di spike intraburst maggiore.

Inoltre, i ratti Thc mostrano, al contrario, un numero simile ai Ctrl di spike per burst, ma minore frequenza di occorrenza del burst, una durata media leggermente superiore, e una frequenza intraburst leggermente inferiore.

In ultima analisi, i ratti Poly ic/Thc, sono caratterizzati da un numero di spike per burst maggiore dei neuroni Poly ic, ma più vicino al valore medio dei ratti Ctrl, così come per la durata del burst e la sua frequenza intraburst. La frequenza con cui avvengono i burst risulta essere diversa dai due casi Ctrl e Poly ic, ma comunque, ancora vicina e più simile ai Ctrl piuttosto che ai Poly.

4.3 Risultati confronto tra parametri Tradizionali e parametri Burst

Consideriamo i due rapporti rA ed rB , dati, rispettivamente, dal confronto tra percentuale di spike per burst e coefficiente di variazione percentuale, e dal rapporto tra frequenza con cui avvengono i burst e frequenza di scarica del neurone, non significativi ma comunque utili per una più completa caratterizzazione del problema.

In tutti e quattro i casi, Poly ic, Ctrl, Thc e Poly ic/Thc, non sono state riscontrate particolari correlazioni, infatti i valori dei due parametri riferiti alle quattro famiglie sono risultati essere abbastanza modesti, con valori generalmente inferiori soprattutto, in relazione risultati dei dati sin qui analizzati, al caso Poly ic, nello specifico al parametro rB .

Interessante suddivisione in quattro sotto-categorie di neuroni è stata quella permessa dallo studio di due parametri precedentemente introdotti ed analizzati: percentuale di scarica in burst e frequenza di scarica della cellula: siamo stati in grado di dividere le cellule registrate in 4 sotto-gruppi detti “*alta frequenza/alta percentuale di burst*” (HFHB); “*alta frequenza/bassa percentuale di burst*” (HFLB); “*bassa frequenza/alta percentuale di burst*” (LFHB) e “*bassa frequenza/bassa percentuale di burst*” (LFLB).

Il caso Ctrl (figura 4.7 e 4.8) indica una maggior percentuale di cellule LFLB (37.04%). Caratteristica, questa, ancor più accentuata nei ratti Poly ic (45%) - figura 4.9 e 4.10 - e nei Poly ic/Thc (46.87%), vedi figura 4.13 e 4.14, mentre nei Thc (figura 4.11 e 4.12) si osserva una maggior percentuale di cellule HFLB (42.11%), contrariamente a quanto ci si aspettava, e contrariamente anche a quanto evidenziato dall'analisi sulla ritmicità di firing del neurone dopaminergico effettuata alla fine.

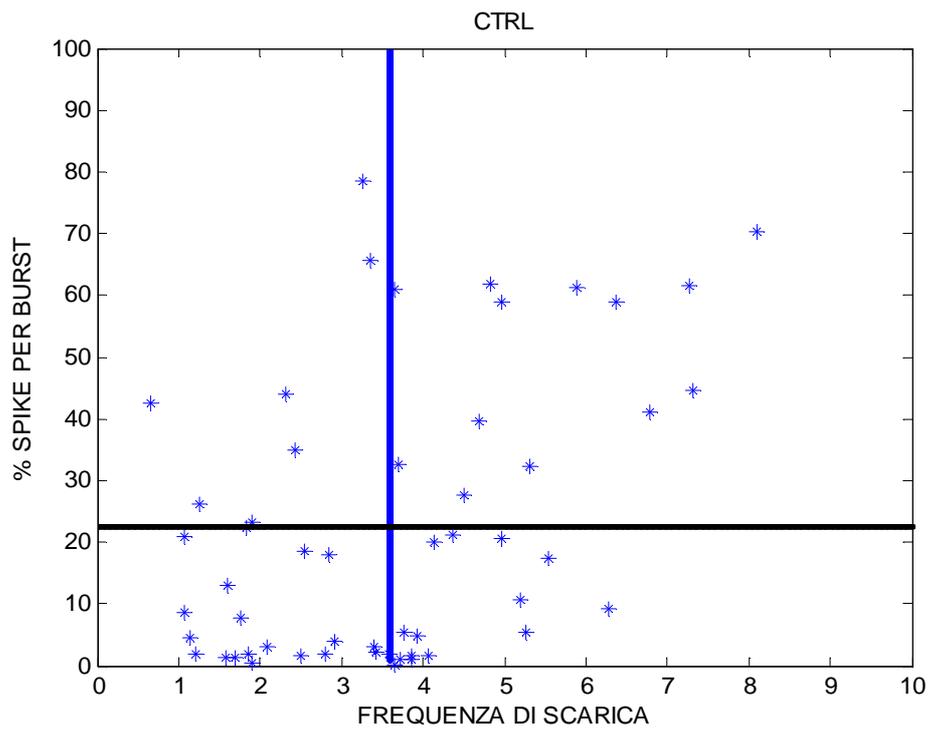


Figura 4.7

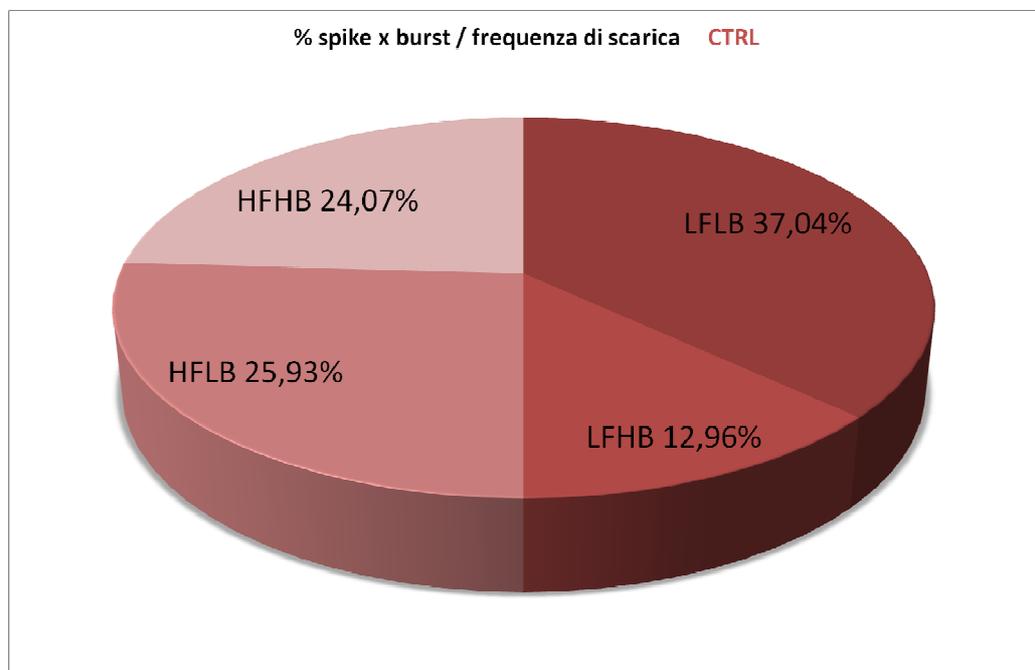


Figura 4.8

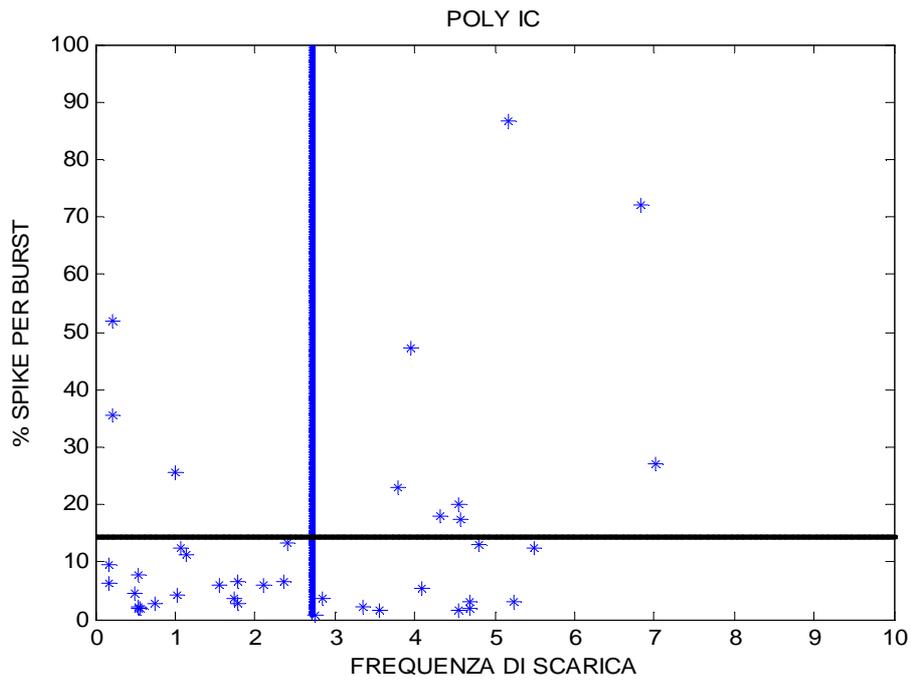


Figura 4.9

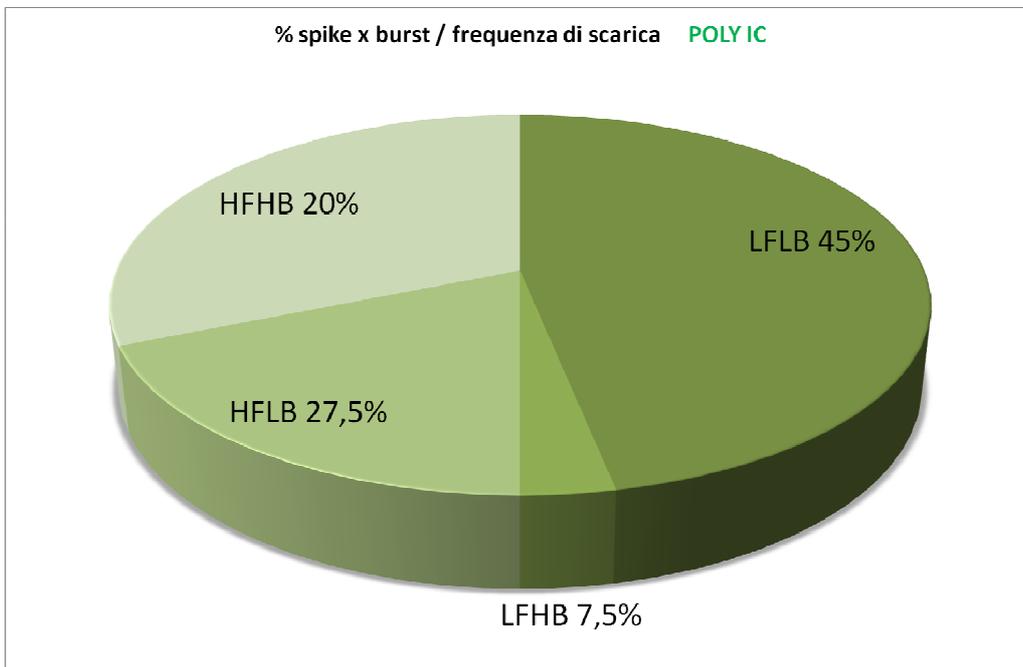


Figura 4.10

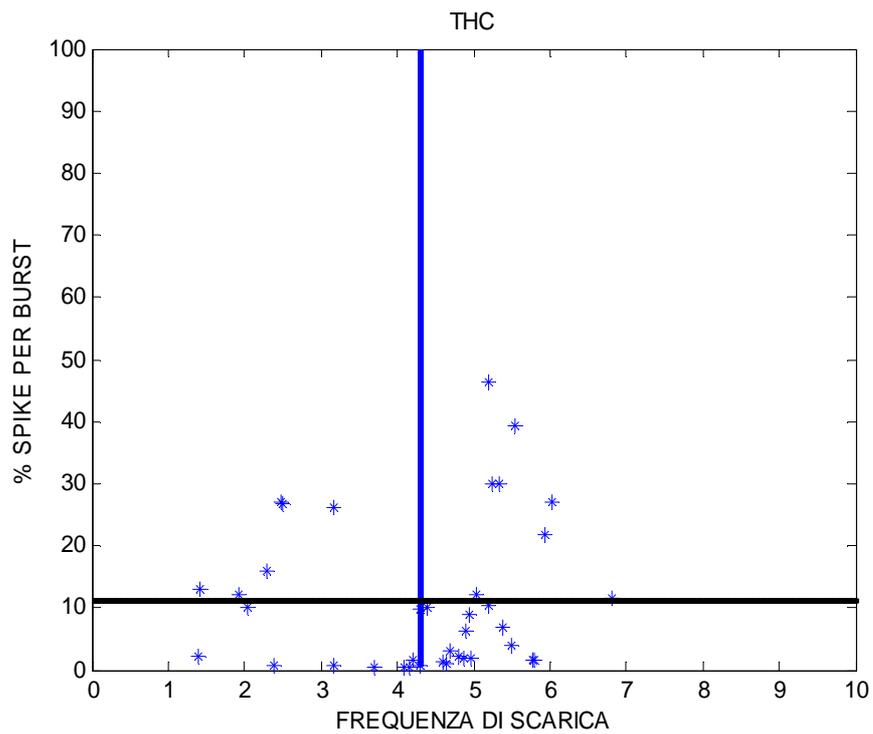


Figura 4.11

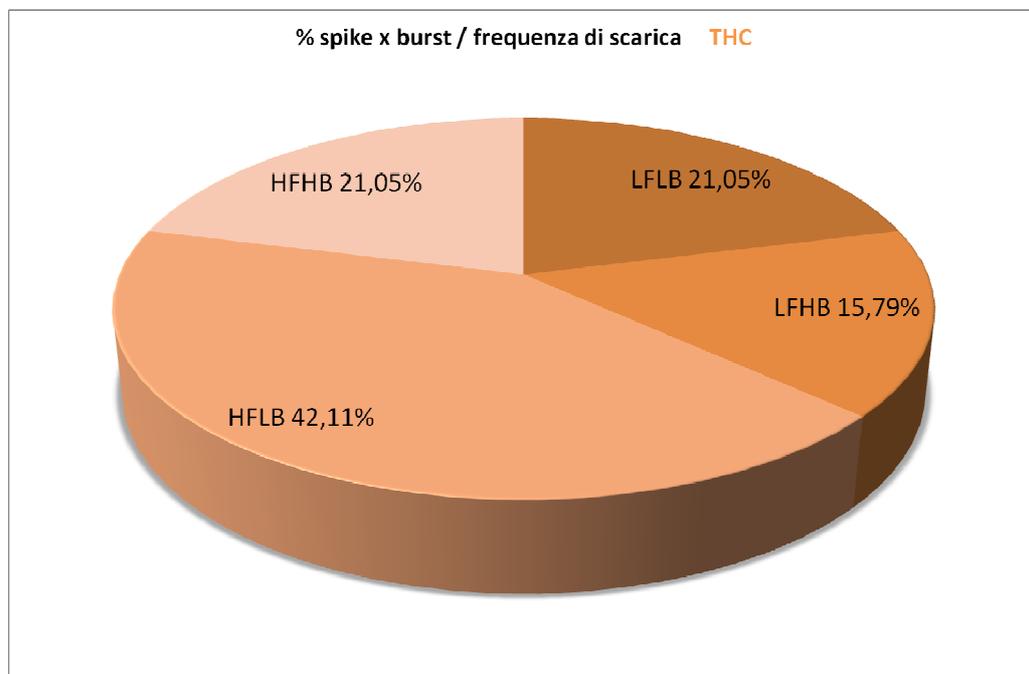


Figura 4.12

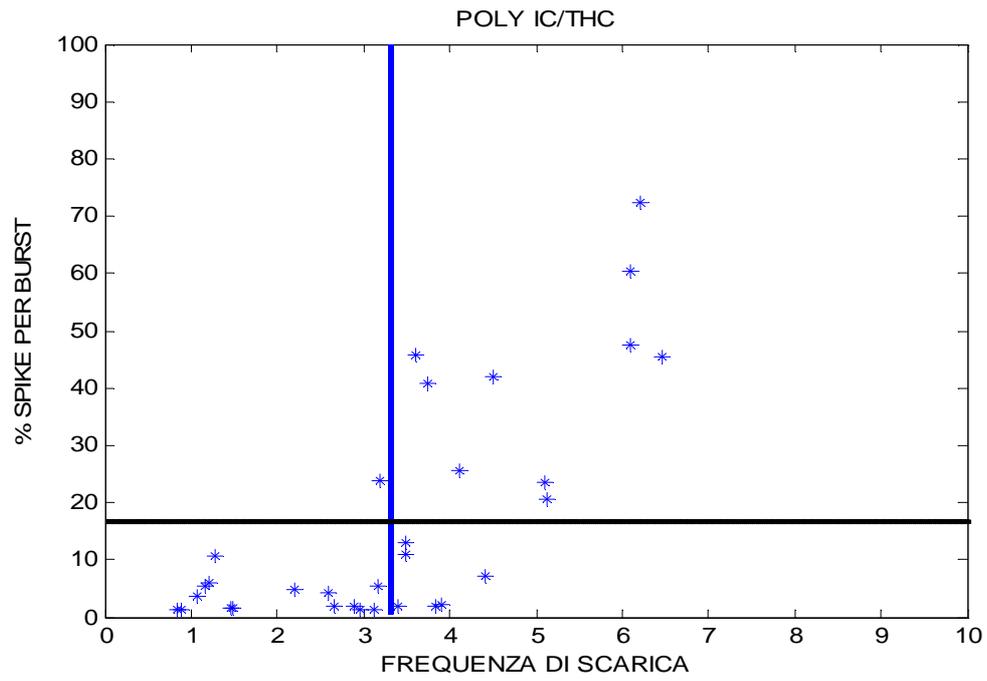


Figura 4.13

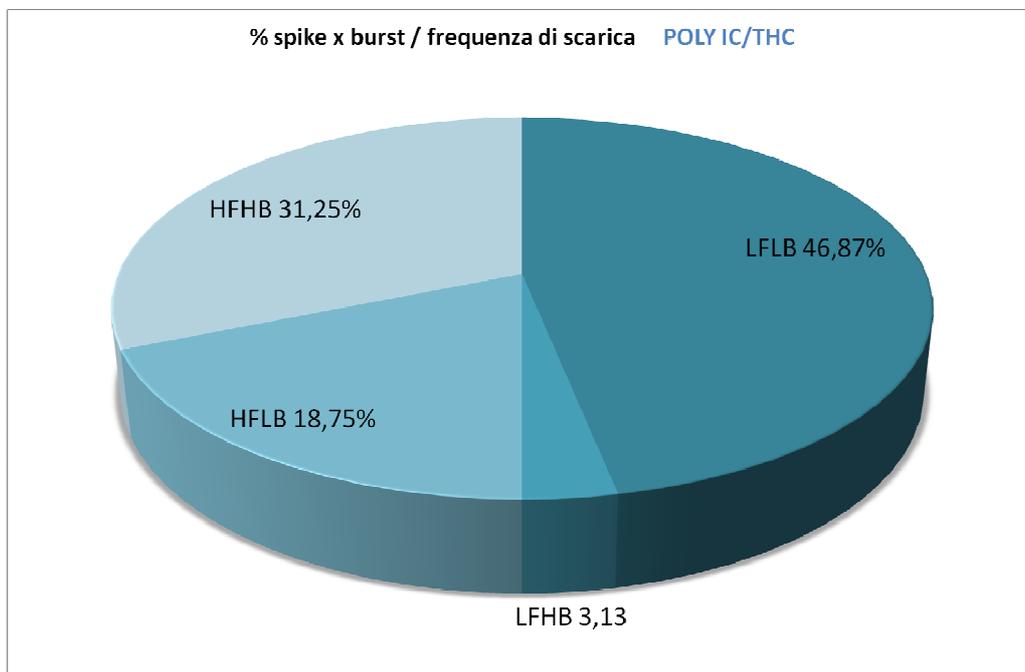


Figura 4.14

4.4 Analisi ritmicità del firing della cellula

Al variare della famiglia analizzata, varia il numero di cellule che presentano una ritmicità nel firing e, si osserverà, tale oscillazione si assesta, per tutti e quattro i gruppi, attorno alle basse frequenze, e per questo motivo si parlerà, d'ora in avanti, di cellule con Short Oscillation SO, e si considereranno solo intervalli di frequenza analizzati compresi tra gli 0 e i 12 Hz, suddividendo questo intervallo in 4 sottointervalli, uno ogni 3 Hz, per comprendere qual è il sottointervallo caratteristico di ogni cellula in SO, per ogni famiglia di neuroni. Una caratteristica densità spettrale di potenza, per cellule SO, è mostrata in figura 4.15.

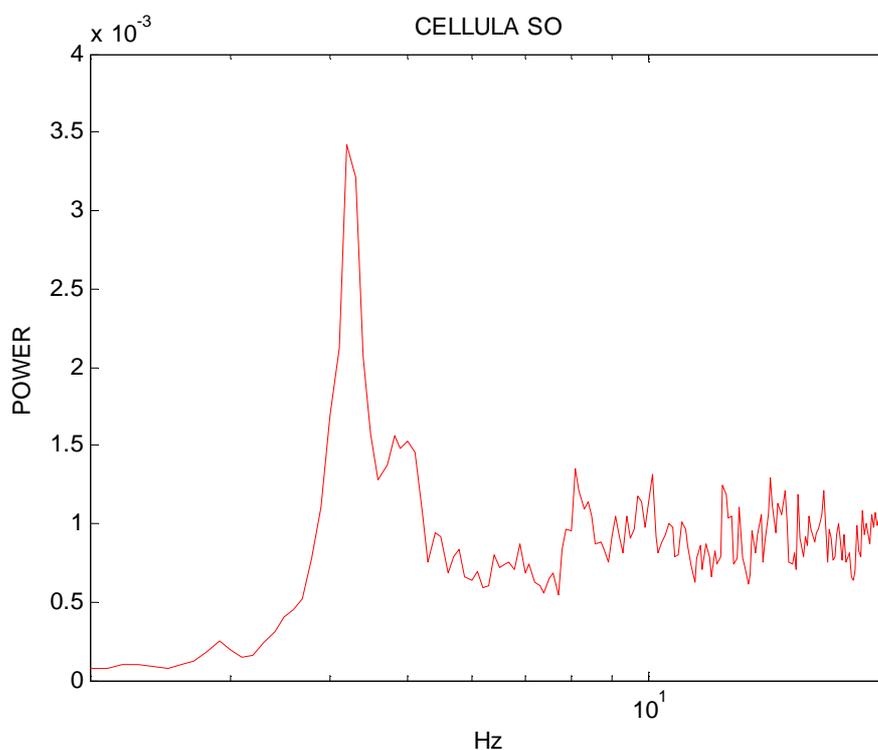


Figura 4.15

Dopo aver contato il numero di cellule che presentano una Short Oscillation SO nel firing, per tutte e quattro le famiglie analizzate, i dati mostrano che il numero di neuroni Ctrl che sparano con una SO sono, in percentuale - %SO

- (39%) , simile alla percentuale mostrata dai Poly ic/Thc (38%) - ancora una similitudine tra queste due famiglie (figura 4.16).

Come si ipotizzava all'inizio dello studio, la famiglia di cellule Poly ic mostrano una oscillazione, sotto forma di percentuale di cellule con firing ritmico, inferiore a tutte le altre famiglie (31%), mentre i ratti Thc una decisamente maggiore percentuale di cellule ritmiche (63%) , maggiore a tutti gli altri casi, suggerendo una stretta relazione con la frequenza di scarica della cellula (maggior attivazione e/o stimolazione cellula, quindi maggior frequenza di scarica della cellula - con conseguente maggior rilascio post-sinaptico di dopamina - , maggior numero di cellule che presentano una SO nel firing), ma non rispetto alla percentuale di spike appartenente ai burst sul totale di spike della cellula.

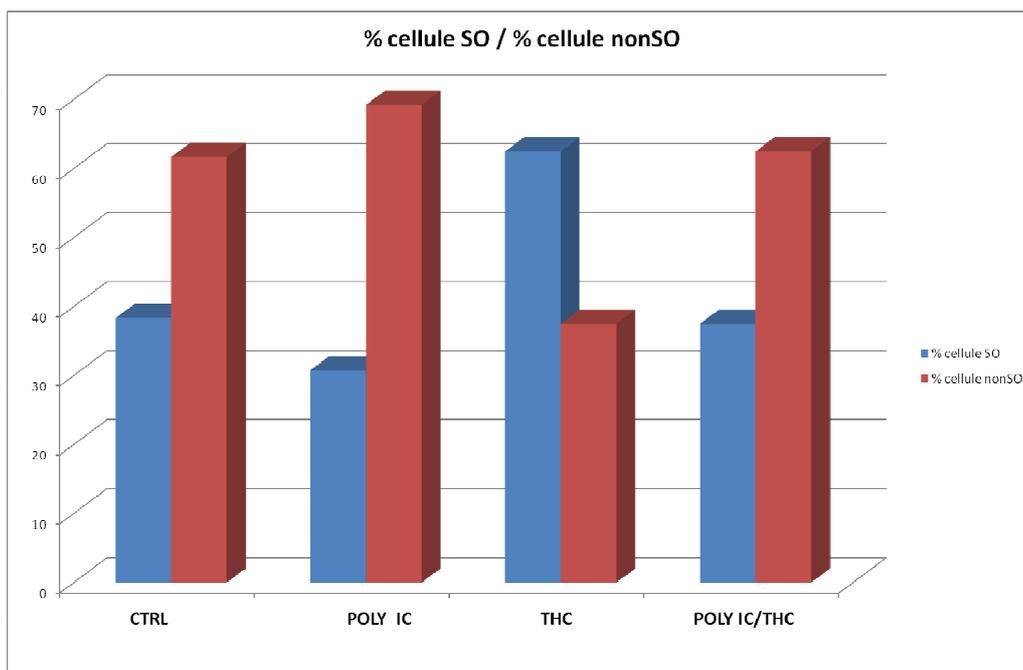


Figura 4.16

I valori di picco della potenza, **Ppicco**, e della loro relativa frequenza, **Fpicco**, sempre riferendoci alle cellule con SO, si assestano, per tutte e quattro le famiglie e riferendoci al primo parametro, significativamente

attorno a valori simili - Ctrl (2.45), Poly ic (2.27), Thc (2.2) , Poly ic/Thc (2.2), come mostrato in figura 4.17.

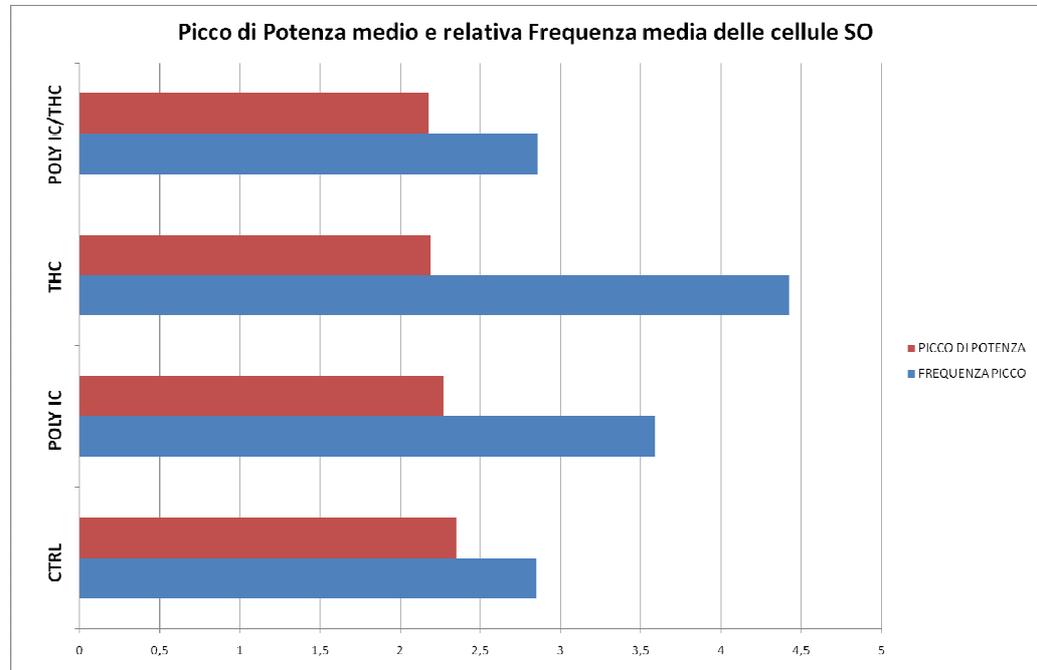


Figura 4.17

Variazioni significative le osservo, invece, nel secondo parametro, e nei relativi intervalli di frequenza a cui occorrono tali osservazioni: Poly ic (3.59 Hz, 62.5% tra 3-6 Hz) e Thc (4.43 Hz, 60% tra 3-6 Hz) , mentre Ctrl (2.85 Hz, 60.87% tra 0-3 Hz) e Poly ic/Thc (2.86 Hz, 58% tra 0-3 Hz) – ulteriore similitudine tra queste due famiglie- che mostrano come vi siano vicinanza di caratteristiche per i due casi non fisiologici (Poly ic e Thc) e ancora vicinanza tra caso fisiologico (Ctrl) e caso patologico trattato (Poly ic/Thc) in merito all'intervallo di frequenze di oscillazione (figura 4.18).

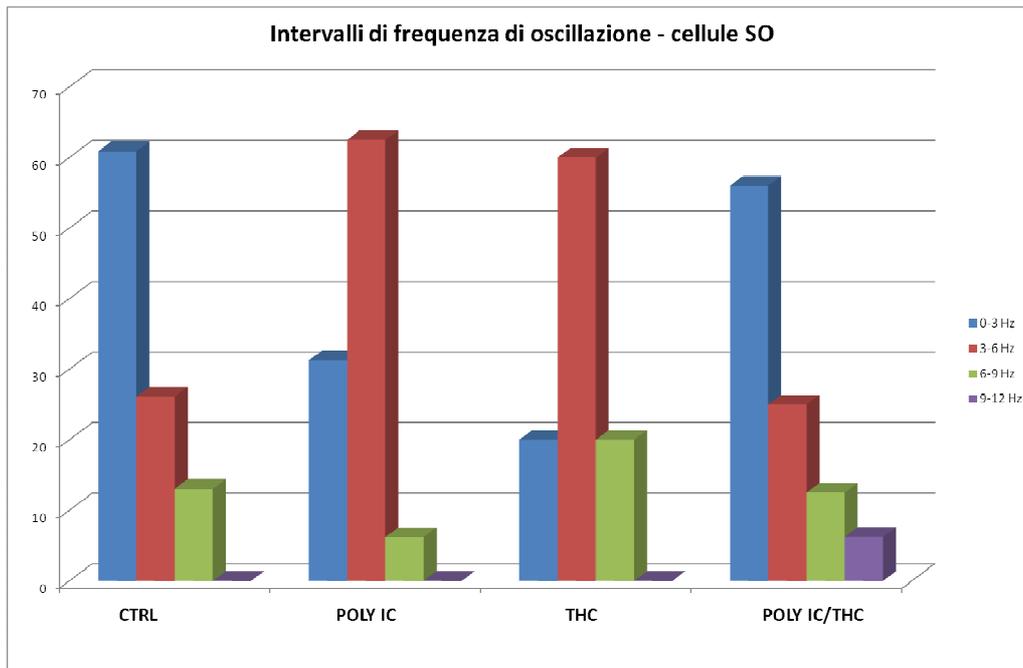


Figura 4.18

4.5 Parametri relazione tra SO e burst

% spike per burst SO e % spike per burst nonSO : dall'analisi di questi valori percentuali, sia per le cellule in SO che per quelle non in SO, e riferendo questi valori al caso analizzato precedentemente di % spike per burst sul totale delle cellule, senza distinzione tra SO e nonSO, risultano valori decisamente e significativamente maggiori in tutti i casi tranne nel Thc per gli SO rispetto al totale delle cellule: (7.2% - 11.25%) vs (Ctrl 36.85% - 22.7% , Poly ic 22% - 14.58% , Poly ic/Thc 24.25% - 16.8%), e allo stesso modo per le cellule nonSO si avrà : Thc = 18.19%, vs Ctrl = 14.38%, Poly ic = 10.58% , Poly ic/Thc = 9.36% (figura 4.19) .

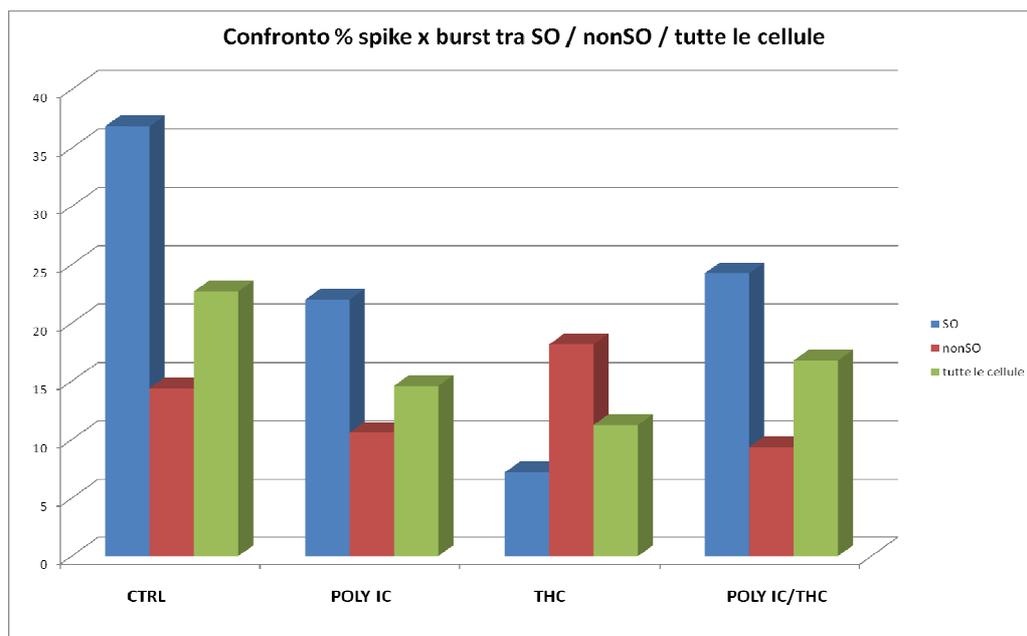


Figura 4.19

Allo stesso modo, avrò una percentuale di cellule SO con valori di % spike per burst maggiore del valore di spike per burst totale più alta nei tre casi Ctrl-Poly ic-Poly ic/Thc (65% - 42.86% - 50%) , che nei Thc (20.83%) , rispetto alle cellule nonSO (20.59% - 19.23% - 18.75 vs 64.29%) – vedi figura 4.20.

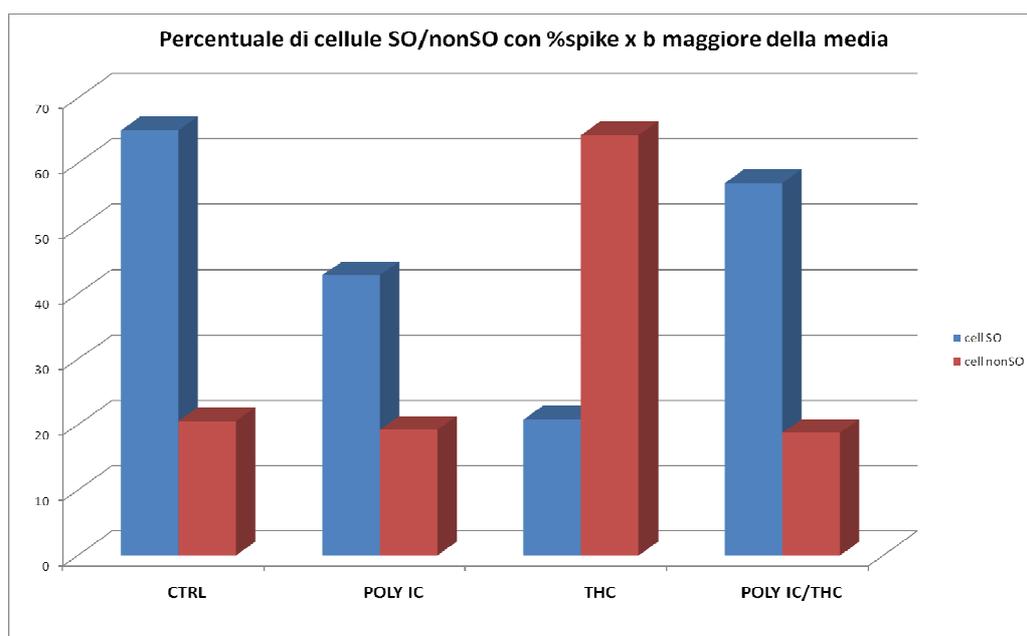


Figura 4.20

I parametri *ra rb rc rd* esprimono, rispettivamente, eventuali correlazioni tra frequenza burst (individuati col tradizionale criterio '80/160') e frequenza di SO, frequenza burst/frequenza SO rispetto a frequenza del picco di potenza nelle cellule con SO, % spike per burst e ampiezza del picco di potenza, frequenza burst e frequenza picco di potenza.

Tutti mostrano modeste correlazioni, non significative con l'analisi della varianza, e sorprende che, nel caso *rb* non vi sia una correlazione, come dovrebbe risultare dalle analisi precedenti, e che contribuirebbe a spiegare come il tradizionale criterio '80/160' sia limitativo.

In generale, avremo valori modesti ma leggermente più alti nei Ctrl e nei Poly ic/Thc, ancora una volta simili, inferiori nei Poly ic, e decisamente più bassi nei Thc, ad indicare ancora una volta una discrepanza tra dati SO e criterio '80/160'.

In tabella 4.1 sono riportati tutti i valori di ogni parametro analizzato, per ogni famiglia di neurone considerata.

	CTRL	POLY IC	THC	POLY IC/THC
Frequenza di scarica	3,59	2,71	4,29	3,31
Cv %	63,92 %	69,86 %	46,27 %	65,50 %
% spike x burst	22,70 %	14,58 %	11,25 %	16,80 %
Numero spike x burst	2,85	2,40	2,64	2,76
Frequenza burst	0,22	0,11	0,16	0,17
Durata burst	137,28	96,85	143,73	131,87
Frequenza intraburst	34,47	45,42	28,44	36,49
rA	0,26	0,14	0,21	0,17
rB	0,06	0,04	0,04	0,04
LFLB	37,04 %	45,00 %	21,05 %	46,87 %
LFHB	12,96 %	7,50 %	15,79 %	3,13 %
HFLB	25,93 %	27,50 %	42,11 %	18,75 %
HFHB	24,07 %	20,00 %	21,05 %	31,25 %
% SO	38,33 %	30,77 %	62,50 %	37,50 %
% non SO	61,67 %	69,23 %	37,50 %	62,50 %
Picco potenza	2,35	2,27	2,19	2,18
Freq. picco potenza	2,85	3,59	4,43	2,86
Δf	(0-3) 60,87 %	(3-6) 62,50 %	(3-6) 60,00 %	(0-3) 58,00 %
TOT % sp x b	22,70 %	14,58 %	11,25 %	16,80 %
SO % sp x b	36,85 %	21,99 %	7,20 %	24,25 %
nonSO % sp x b	14,38 %	10,58 %	18,19 %	9,36 %
cell SO > media TOT	65,00 %	42,86 %	20,83 %	50,00 %
cellnonSO>mediaTOT	20,59 %	19,23 %	64,29 %	18,75 %
ra	0,37	0,24	0,07	0,38
rb	0,23	0,12	0,06	0,18
rc	0,25	0,11	0,06	0,13
rd	0,23	0,13	0,07	0,16

Tabella 4.1

5. DISCUSSIONE RISULTATI E CONCLUSIONI

5.1 Commento risultati

Con questo studio abbiamo fornito le prime evidenze elettrofisiologiche in vivo di un'alterata regolazione del sistema DAergico in un modello di psicosi da alterazione del neurosviluppo. Inoltre abbiamo riscontrato alcune variazioni nella funzionalità e nell'attività dei neuroni DAergici date dall'interazione tra poli I:C e THC, unitamente ad alcuni effetti dati dal THC per sé.

I risultati ci hanno permesso di evidenziare una ridotta funzionalità dei neuroni suddetti in seguito ad esposizione prenatale alle citochine materne. Tuttavia, sebbene la letteratura precedente avesse indirettamente offerto evidenze sulla possibile iperfunzionalità dei neuroni mesencefalici nei ratti poli I:C, nessuno studio aveva affrontato la caratterizzazione elettrofisiologica degli stessi neuroni prima d'ora. Le uniche evidenze sull'iperdopaminergia nei poli I:C provengono da studi comportamentali e molecolari dove variazioni di alcuni parametri possono essere indice di una possibile aumentata funzionalità del sistema DAergico (es. *Meyer et al., 2008, Neuroscience, 159: 701-9* ; *Winter et al., 2008 Int J Neuropsychopharmacol 12:513-24*).

Inoltre è stato dimostrato che gli stessi animali presentavano aumentati livelli di DA e dei suoi metaboliti nella corteccia prefrontale e nel globo pallido (aree implicate nelle psicosi anch'esse) (*Meyer et al., 2008, Neuroscience, 159: 701-9*). Tuttavia solo pochi di questi risultati si riferiscono a studi postnatali. Il sistema DAergico, così come tutti gli altri sistemi, va incontro a fasi di maturazione nel corso dello sviluppo pre e postnatale, pertanto un aumento dell'attività DAergica prenatale non esclude la possibilità che le stesse cellule possano perdere la propria funzionalità fin dalle fasi precoci dell'età postnatale.

I nostri dati in vivo sembrano essere confermati da investigazioni in vitro su ratti giovani dove abbiamo dimostrato che anche sin dalle prime fasi di vita la frequenza di scarica dei neuroni DAergici è ridotta, piuttosto che aumentata, nei ratti poli I:C rispetto ai controlli.

Infine, la ridotta funzionalità delle burst (riduzione di MSB e MDB con aumento del numero di neuroni LFLB) corrobora ancor di più la nostra idea di ipodopaminergia, dal momento che in letteratura l'attività in burst è stata correlata alla probabilità di rilascio di DA nelle aree terminali (*Chergui et al., 1996, Neuroscience 72:141-56; 1997, Eur J Neurosci 9:2370-82*).

Tra i meccanismi che potrebbero essere coinvolti negli effetti da noi evidenziati, una possibile disregolazione corticale negli animali poli I:C giustificherebbe un'alterata attività e funzionalità dei neuroni studiati (es *Grace et al., 2007, Trends Neurosci 30:220-7*). E' noto che parte delle manifestazioni comportamentali abnormi dei pazienti psicotici e dei modelli animali di psicosi chiamino in causa un malfunzionamento delle aree corticali superiori (es *Arnsten 2011, Int J Dev Neurosci 29:215-23*). Inoltre, studi recenti hanno dimostrato un'abnorme sviluppo della corteccia cerebrale nel topo sottoposto al poli I:C in fase prenatale (*Soumiya et al., 2011a, J Neurosci Res 89:1342-50; 2011b 89:1575-85*) e un malfunzionamento della corteccia prefrontale dato da alterata funzionalità degli interneuroni GABAergici negli stessi animali (*Oh Nishi et al., Sfn 2011*). Per questo motivo, è quantomeno probabile che un malfunzionamento corticale si traduca in un minor rilascio di glutammato nei neuroni DAergici, alterando l'equilibrio tra afferenze eccitatorie ed inibitorie che gestiscono l'attività e l'efficienza dei neuroni mesencefalici.

Infine abbiamo fornito evidenze sull'attività elettrica dei neuroni DAergici della VTA in un modello animale che tenesse conto dell'insieme di concause che contribuiscono, come fattori di rischio, allo sviluppo di psicosi. Allo stesso tempo abbiamo ottenuto preziosi risultati sull'effetto del solo THC nella rimodulazione della funzionalità dei neuroni DAergici della VTA. Anche in questo caso il nostro lavoro è tra i primi ad identificare alterazioni nella fisiologia dei neuroni mesencefalici alla somministrazione

cronica di THC. E' interessante notare che le modificazioni indotte da THC sono speculari rispetto a quelle indotte dal poli I:C. Infatti, se il secondo influenza la frequenza di scarica, il primo ha effetto principalmente su percentuale di burst e CV. Questo dato ci suggerisce che fattori ambientali differenti, agiscono diversamente sulla fisiologia di circuiti deputati alle risposte alla base di comportamenti adattivi, favorendo in maniera diversa l'evoluzione fisiopatologica delle psicosi. In questo senso, tra le possibili spiegazioni sull'effetto del THC, potrebbe essere plausibile chiamare in causa uno squilibrio a carico della trasmissione endocannabinoidergica cerebrale. In particolare, dal momento che gli eCb modulano le funzioni fisiologiche alla base di processi emotivi e motivazionali, e data la forte necessità di rimodulazione di tali funzioni in adolescenza (*Realini et al., 2009 Pharmacol Res 60:132-8*) è plausibile che riadattamenti a carico dei recettori (CB1) sulle terminazioni che proiettano ai neuroni DAergici siano responsabili delle aberrazioni funzionali riscontrate nel nostro modello.

I risultati relativi al modello combinato tra poli I:C e THC lasciano pensare che l'esposizione a entrambe le concause generi un quadro meno severo rispetto alle modificazioni indotte dai due fattori separatamente. Infatti, combinando poli I:C e THC il comportamento delle burst, deficitario nei poli I:C, sembra essere riportato ai livelli di controllo. Tuttavia, dal momento che l'attività elettrica DAergica non sempre rappresenta un diretto correlato del comportamento, specialmente in condizioni di registrazioni in animali anestetizzati, ulteriori studi con tecniche combinate (elettrofisiologia associata a comportamento) potrebbero far luce su eventuali aberrazioni che non possono essere evidenziate con la sola elettrofisiologia.

Questo studio mostra, inoltre, una ritmicità nel firing della cellula, alle basse frequenze (Short Oscillation SO), presente nei neuroni dopaminergici della Ventral Tegmental Area VTA, e rappresenta un nuovo modo di definire una modalità di firing della cellula neuronale diversa dalla tecnica '80/160' usata precedentemente per definire il bursting del neurone.

Infatti, basandosi su un alto numero di cellule analizzate, in passato si è considerato come criterio ufficiale per l'identificazione del bursting di un neurone dopaminergico la seguente strategia: i primi due spike di un burst devono avere ISI (InterSpike Interval, intervallo temporale tra due spike) < 80 ms. I successivi spike sono considerati appartenenti al burst fintantoché un ISI > 180 ms non intercorre tra uno spike e il successivo. Di questi due, il primo appartiene ancora al burst, l'ultimo no.

Nelle passate due decenni, questo criterio - burst a '80/160' - è stata largamente utilizzata per caratterizzare il firing dei neuroni dopaminergici.

Il mio studio suggerisce, in accordo con quanto mostrato dai risultati ottenuti e con pochi ma innovativi studi precedenti in letteratura (Shi, 2004; Shi, 2005), che questo criterio, se preso come unica definizione di burst, risulta insufficiente per una completa descrizione di differenti modalità di firing osservata nel neurone dopaminergico, e mostra che l'attività del suddetto neurone possa essere anche caratterizzata basandoci sulle sue proprietà oscillatorie.

Infatti, come i neuroni della maggior parte delle aree esaminate nella ricerca neuro-scientifica, anche i neuroni dopaminergici della VTA mostrano una buona percentuale di attività oscillatoria, poco sotto il 50% nei controlli, inferiore nei neuroni con alterazioni, superiore nei neuroni stimolati, alle basse frequenze, tipicamente tra gli 0 e i 12 Hz, ma con evidenti e frequenti picchi, a seconda dei casi, negli intervalli 0-3 Hz e 3-6 Hz.

Dall'analisi dei parametri, escludendo il caso dei ratti The di cui discuterò i risultati nel seguito, l'individuazione di una SO in un buon numero di cellule mostra risultati in evidente accordo coi dati ricavati utilizzando come criterio di individuazione del bursting la definizione '80/160' ms.

In accordo con quanto emerso dalla mia analisi, i controlli Ctrl sono caratterizzati da una modesta ma significativa frequenza di scarica, frequenza di burst e durata e composizione del burst stesso rispetto ad un numero modesto ma significativo di cellule che mostrano una SO.

Vi è, inoltre, una similitudine tra dati del caso Ctrl appena esposto e dati riferiti al caso Poly ic / Thc, sia con parametri da riferirsi alla tradizionale definizione, sia con la tecnica della ricerca del firing ritmico, suggerendo le stesse conclusioni espresse precedentemente in questo paragrafo.

Ancora, si evince una riduzione dell'entità dei valori degli stessi parametri, appena citati, nel caso dei ratti Poly ic, sia col criterio tradizionale '80/160' che con la tecnica SO, con relative spiegazioni avanzate all'inizio del paragrafo.

Le discrepanze maggiori si sono rivelate nel caso dei ratti sani trattati con Thc. Infatti, ad un prevedibile aumento della frequenza di scarica della cellula, non è seguito un altrettanto prevedibile aumento di alcuni parametri fondamentali, con la tecnica tradizionale, come la percentuale di spike per burst, il numero di spike per burst, la durata dello stesso, la frequenza intraburst, un aumento del numero di cellule con alta frequenza di scarica e alta percentuale di spike appartenenti ai burst. Seguendo il trend osservato nei tre casi precedenti, ci si sarebbe atteso un aumento dell'attività della cellula (maggiore frequenza di scarica) a seguito di una stimolazione esterna (Thc).

Seguendo il criterio della ricerca della ritmicità del firing del neurone, ad una maggior attività della cellula è seguito un aumento della percentuale delle cellule in SO. Di conseguenza, si potrebbe avanzare l'ipotesi che, dopo una stimolazione del neurone (con, ad esempio, Thc), aumenti la frequenza di firing della cellula, quindi una maggior attività del neurone, che si potrebbe esprimere anche come maggior probabilità che esso presenti un firing oscillatorio (e quindi una maggior regolarità di scarico - si vedano i valori del parametro CV%).

Osservando alcuni grafici caratteristici, come ad esempio il tracciato riferito alle cellule A1 e B1 mostrate in figura, ad ogni oscillazione corrisponde un treno di impulsi che può essere riconosciuto come burst - treno compatto di PdA ben evidente temporalmente rispetto ai precedenti e successivi spike - , cosa che in numerosi casi non avverrebbe utilizzando il criterio tradizionale del bursting a '80/160' ms, ma evidenziando, al tempo stesso, dall'analisi

spettrale, una maggior densità di potenza in corrispondenza di specifiche frequenze (A2 e B2), suggerendo l'ipotesi che in molti casi, la SO sia più utile dell'80/160', anche per molti dei neuroni più attivi (figura 5.1).

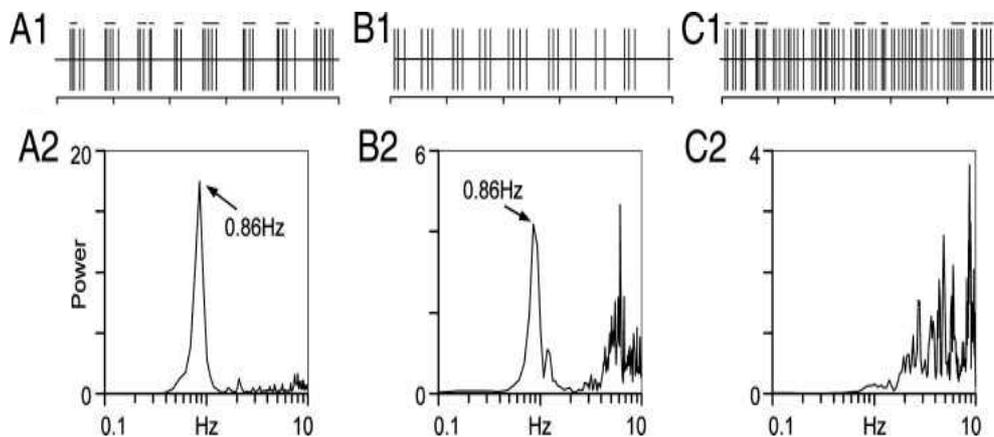


Figura 5.1

Quando rilasciata in modo ritmico e periodico, la dopamina potrebbe modulare gli input del neurone. Il firing oscillatorio potrebbe anche determinare un aumento del rilascio del neurotrasmettitore, come ipotizzato nelle precedenti righe. Come mostrato da alcune ricerche fatte in passato, se una cellula spara secondo la modalità bursting, e contemporaneamente questi burst avvengono con una certa periodicità, si avrà un maggior rilascio di dopamina nelle terminazioni post-sinaptiche del neurone, rispetto al caso del single spiking.

Inoltre, come osservato pochi anni fa (Buzsaki e Draguhn, 2004), una SO del neurone potrebbe servire da selezione degli input, facilitando la plasticità sinaptica, e promuovendo un sincronismo tra neuroni correlati dal punto di vista funzionale.

Infine, come suggerito in precedenza, il potenziale significato della corretta interpretazione della SO nel firing neuronale potrebbe dare una nuova strategia di analisi degli effetti che le sostanze da abuso hanno sui neuroni.

5.2 Conclusioni finali

Il software sviluppato, dopo aver elaborato ed analizzato i dati ricavati durante una prima fase sperimentale in vivo, ha permesso di caratterizzare quattro famiglie di neuroni dopaminergici.

In primo luogo, i risultati ottenuti studiando i controlli sono del tutto riconducibili a quelli mostrati in letteratura, confermando l'affidabilità del software.

Inoltre, stabilita la robustezza del programma implementato, una delle novità di questo lavoro è stata quella di caratterizzare, dal punto di vista elettrofisiologico con uno studio postnatale, l'attività del neurone DAergico in condizioni di alterazione del neuro sviluppo, una delle cause ambientali alla base dell'insorgenza di malattie psicotiche quale la schizofrenia.

I risultati ottenuti hanno confermato le ipotesi iniziali di "ipo dopaminergia" della cellula, cioè di una attenuata e ridotta funzionalità dei neuroni in esame rispetto ai controlli.

Altro aspetto è stato quello di cercare una eventuale correlazione tra la causa ambientale precoce di insorgenza della psicosi, di cui appena discusso, e un fattore scatenante legato allo sviluppo, come l'utilizzo di sostanze d'abuso (The) in età adolescenziale.

Esso, evidenziano i risultati, contribuisce significativamente alla rimodulazione delle funzionalità delle cellule, inducendo stavolta "iper dopaminergia".

I dati riferiti a questi ultimi due casi ci suggeriscono che fattori ambientali differenti agiscono diversamente sulla fisiologia dei circuiti DAergici, favorendo in maniera diversa e pressochè speculare l'evoluzione della psicosi.

I risultati relativi al modello combinato tra poli I:C e THC, unico esperimento del genere finora effettuato, lasciano pensare che l'esposizione a entrambe le concause generi un quadro meno severo rispetto alle

modificazioni indotte dai due fattori separatamente. Infatti, combinando poli I:C e THC, la frequenza di scarica e il comportamento delle burst, deficitario nei poli I:C, sembra essere riportato ai livelli di controllo.

Le possibili applicazioni future del Thc in farmacologia potrebbero partire, quindi, dall'analisi preclinica e postclinica di questi risultati.

Ulteriore novità, introdotta in questo lavoro, è stata quella di aggiungere, oltre ai tradizionali criteri di valutazione, un differente approccio allo studio delle modalità di scarica della cellula nervosa.

Tale modalità, che permette di discriminare i neuroni in burst rispetto ai neuroni in single spiking, si basa sull'osservazione secondo cui numerose cellule presentano la caratteristica di un firing di tipo oscillatorio che si traduce, nel tracciato del segnale elettrico, in una successione di cluster ben distanziati tra loro, e con una certa periodicità di occorrenza.

Il software sviluppato dal sottoscritto, grazie all'analisi spettrale del segnale elettrico del neurone DAergico, ha permesso di confermare quanto mostrato dai parametri tradizionali, e ha dato la possibilità di superare alcuni limiti insiti nel criterio fin qui utilizzato per la caratterizzazione della funzionalità della cellula, al fine di permettere uno studio più completo ed esauriente.

6. SVILUPPI FUTURI

Considerando il ruolo dei neuroni DAergici della VTA nella risposta gratificante alle sostanze d'abuso (*Di Chiara e Imperato, 1988 Procl Natl Acad Sci USA 85:5274-8*) e data l'associazione presente in letteratura tra psicosi e uso di sostanze additive nei pazienti (es. *Dervaux e Laqueille, 2008 Encephale 34:299-305*), scopo del progetto è stato anche quello di studiare se il modello animale suddetto presentasse delle anomalie nelle risposte alla somministrazione acuta di **cocaina** e **nicotina**.

Infatti, come ulteriore obiettivo del progetto, si è cercato di valutare se gli animali sottoposti alle concause ambientali pre- e post-natali (e nel contempo anche quelli sottoposti ad una delle due singolarmente) presentassero alterazioni della risposta dei neuroni DAergici della VTA ad alcune tra le principali droghe.

Come detto, una netta correlazione tra psicosi e abuso di droghe è stata riscontrata tra i pazienti. Tra le sostanze coinvolte la nicotina, per via dell'alta incidenza di fumatori tra i pazienti schizofrenici (circa il 90%), e la cocaina, per via delle capacità riportate di presentare caratteristiche simili a quelle di uno stato psicotico, sono state tra le più studiate.

Alla luce di quanto realizzato, dei nuovi parametri di indagine introdotti e della nuova tecnica di analisi proposta, sarebbe interessante valutare la funzionalità dei neuroni DAergici delle diverse famiglie considerate col nuovo software, così da ampliare il campo di visione e magari anche migliorare lo studio della funzionalità elettrofisiologica della cellula.

Ancor più interessante sarebbe confrontare i risultati, ottenuti grazie a questo studio, con i risultati emersi da esperimenti mediante tecniche elettrofisiologiche **in vitro**, condotti parallelamente nello stesso centro di ricerca e facenti parte dello stesso progetto di studi preclinici, al fine di meglio

caratterizzare la funzionalità dei neuroni DAergici della VTA nei poli I:C, anche trattati con sostanze d'abuso.

In particolare, data la marcata ipodopaminergia riscontrata nei ratti adulti ci si è chiesti se tali modificazioni apparissero nelle fasi tardive dello sviluppo o già in fasi precoci. In letteratura è stato riportato che parte delle aberrazioni comportamentali dei poli I:C compaiono nella fase post-adolescenziale (Zuckerman *et al.*, 2003 *Neuropsychopharmacology* 28:1778-89), essendo le stesse assenti nei ratti giovani. Oltre a ciò, si potrebbe considerare l'eventualità di introdurre nuove metodologie computazionali di indagine.

Lo studio delle caratteristiche elettrofisiologiche di una popolazione di neuroni in un modello complesso come quello dei poli I:C ha, fin da subito, portato a voler esaminare più da vicino il fenomeno oggetto di studio, spingendoci a osservare altri aspetti di indubbio interesse e pertinenti all'argomento. Per questo, mediante adeguate collaborazioni con il laboratorio di *farmacologia comportamentale* sono stati valutati alcuni aspetti legati al comportamento degli animali poli I:C esaminati tramite *novel object recognition* (NOR) e la *social interaction* (SI).

Studi sul comportamento sono stati, quindi, effettuati su animali sottoposti ai poli I:C in età gestazionale. Nello specifico, è stata misurata l'attività esplorativa, la risposta agli stimoli ambientali e le interazioni sociali degli animali mediante paradigmi assodati. Per questo motivo i ratti poli I:C sono stati sottoposti a sessioni di *social interaction SI* e *novel object recognition NOR*: i parametri analizzati sono stati il numero e il tempo dei contatti sociali intrapresi dall'animale in test di interazione sociale SI (ridotta nel nostro caso) e il tempo di esplorazione di un oggetto nuovo rispetto all'oggetto familiare (ridotto tempo speso esplorando l'oggetto nuovo avvalorato da un maggiore tempo speso nell'esplorazione dell'oggetto conosciuto) nel test NOR. La prosecuzione di questi studi, associati a nuove tecniche di valutazione comportamentale, potranno così essere confrontati con i risultati ottenuti dal sottoscritto e, oltre ai parametri analizzati in questo studio, si potranno affiancare i dati in futuro ottenuti dall'analisi del comportamento elettrico delle

stesse cellule a cui sono state somministrate le sostanze d'abuso appena definite (cocaina e nicotina).

Ulteriore miglioramento dello studio sarà sicuramente l'ampliamento dell'insieme di **parametri** da considerare ai fini dello studio (presente e anche a successivi progetti di ricerca), da reperire in letteratura, e il perfezionamento della tecnica di **analisi spettrale** del segnale elettrofisiologico in vivo, considerando, ad esempio, tecniche di finestrazione del segnale differenti o l'uso delle wavelets.

Infine, il potenziale sfruttamento dei dati ottenuti nella ricerca appena conclusa chiama in causa una serie di fattori che sono di pertinenza di numerose aree tematiche. La spendibilità principale della detta ricerca si focalizza sulle applicazioni dei dati in ambito **epidemiologico-preventivo**. Tuttavia, alla luce dei risultati ottenuti altre forme di **studio di tipo preclinico** potrebbero ulteriormente arricchire lo stato dell'arte sul modello di vulnerabilità ai sintomi psicotici studiato.

Nello specifico, sul versante della spendibilità a breve termine applicazioni in ambito preclinico potrebbero aggiungere evidenze importanti alla comprensione più dettagliata del modello studiato. Nello specifico, data la mole di risultati ottenuti e la complessa esplicazione degli stessi, ulteriori studi per mezzo di tecniche assodate o avanguardistiche (es. **microdialisi cerebrale, dissezioni ottiche in vivo e in vitro** delle aree di interesse etc...) potrebbero far luce su eventuali modificazioni implicate nelle aberrazioni riscontrate nel nostro modello, specialmente per quanto riguarda i dati relativi alla seconda parte del progetto.

Inoltre, sebbene sia i risultati con il modello poli I:C che quelli con i soli cannabinoidi in adolescenza abbiano evidenziato delle modificazioni consistenti dell'attività e funzionalità dei neuroni DAergici, al momento ancora non è chiaro perché, dal punto di vista **neurobiologico, fisiologico e comportamentale** la combinazione dei due modelli avvicini il comportamento neuronale più a condizioni di controllo che di aberrazione psicosimile.

Tuttavia, modificazioni come quelle riportate nel modello di interazione non necessariamente rappresentano un recupero del modello stesso e applicazioni a breve termine come le suddette potrebbero mettere in luce se vi siano ulteriori danni a carico di altri sistemi. Da ciò deriverebbero nuove informazioni per diffondere a livello della comunità culturale il potere dannoso dell'abuso di cannabinodi nei pazienti psicotici. Ciò è plausibile dal momento che i nostri dati sperimentali ci indicano che la semplice somministrazione adolescenziale di THC è capace di modificare in forma peculiare la funzionalità dei neuroni DAergici della VTA.

BIBLIOGRAFIA

- Brain Behav Immun. 2010 Aug;24(6):881-97
Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models.
Boksa P.
- Mol Psychiatry. 2012 Nov 20. doi: 10.1038/mp.2012.157
Common variant at 16p11.2 conferring risk of psychosis.
Steinberg S et al
- Am J Geriatr Psychiatry. 2011 Aug;19(8):704-11.
Trends in substance abuse treatment 1998-2008: increasing older adult first-time admissions for illicit drugs.
Arndt S, Clayton R, Schultz SK.
- Neuron. 2011 Feb 24;69(4):650-63.
Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling.
Lüscher C, Malenka RC.
- Trends Pharmacol Sci. 2011 Sep;32(9):507-13.
Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia.
Lodge DJ, Grace AA.
- Neuropsychopharmacology. 2011 Aug;36(9):1903-11. doi: 10.1038/npp.2011.76
A novel α 5GABA(A)R-positive allosteric modulator reverses hyperactivation of the dopamine system in the MAM model of schizophrenia.
Gill KM, Lodge DJ, Cook JM, Aras S, Grace AA.
- J Comp Neurol. 1990 Nov 15;301(3):365-81.
Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods.
Altman J, Bayer SA.
- Brain Behav Immun. 2010 Aug;24(6):881-97.
Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models.
Boksa P.
- Neuropsychopharmacology. 2003 Oct;28(10):1778-89.
Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia.
Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I.

Behav Brain Res. 2008 Jun 26;190(1):156-9

Immune activation during mid-gestation disrupts sensorimotor gating in rat offspring.

Wolff AR, Bilkey DK.

Neurosci Biobehav Rev. 2009 Jul;33(7):1061-79.

In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders.

Meyer U, Feldon J, Fatemi SH.

An overview of systematic reviews on cannabis and psychosis : discussing apparently conflicting results

Minozzi, Davoli, Bargagli, Amato, Vecchi, Perucci

BMJ. 2002 Nov 23;325(7374):1212-3.

Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study.

Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE.

Lancet. 2007 Jul 28;370(9584):319-28.

Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review.

Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G.

J Psychopharmacol. 2012 Jan;26(1):177-88.

Adolescent exposure to cannabis as a risk factor for psychiatric disorders.

Rubino T, Zamberletti E, Parolaro D.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5274-8.

Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.

Di Chiara G, Imperato A.

Encephale. 2008 Jun;34(3):299-305

Smoking and schizophrenia: epidemiological and clinical features.

Dervaux A, Laqueille X.

Neuropsychopharmacology. 2003 Oct;28(10):1778-89.

Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia.

Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I.

Neuroscience. 2012 Mar 1;204:245-57.

Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats.

Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, Rubino T.

Neuroscience. 1983 Oct;10(2):301-15.

Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization.

Grace AA, Bunney BS.

- J Neurosci. 1984 Nov;4(11):2866-76.
The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing.
Grace AA, Bunney BS.
- J Neurosci. 1984 Nov;4(11):2877-90.
The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing.
Grace AA, Bunney BS.
- Neuroscience. 2002;114(2):475-92.
Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat.
Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG, Miller R.
- Neuroscience. 1996 May;72(1):141-56.
Burst stimulation of the medial forebrain bundle selectively increase Fos-like immunoreactivity in the limbic forebrain of the rat.
Chergui K, Nomikos GG, Mathé JM, Gonon F, Svensson TH.
- Eur J Neurosci. 1997 Nov;9(11):2370-82.
Increased expression of NGFI-A mRNA in the rat striatum following burst stimulation of the medial forebrain bundle.
Chergui K, Svenningsson P, Nomikos GG, Gonon F, Fredholm BB, Svensson TH.
- Neuron. 2006 Jun 15;50(6):911-21.
Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors.
Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, Changeux JP, Faure P.
- Neurosci Lett. 2010 Sep 27;482(2):117-22.
Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study.
Fabricius K, Helboe L, Fink-Jensen A, Wörtwein G, Steiniger-Brach B, Sotty F.
- Neurobiol Dis. 2006 Oct;24(1):15-27.
Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons.
Melis M, Pillolla G, Bisogno T, Minassi A, Petrosino S, Perra S, Muntoni AL, Lutz B, Gessa GL, Marsicano G, Di Marzo V, Pistis M.
- Neuropsychopharmacology. 2012 Apr;37(5):1164-76. doi: 10.1038/npp.2011.302.
Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse.
Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M.
- Neuropsychopharmacology. 2003 Oct;28(10):1778-89.
Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia.
Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I.

Neuroscience. 2008 Jun 23;154(2):701-9.

Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy.

Meyer U, Engler A, Weber L, Schedlowski M, Feldon J.

Int J Neuropsychopharmacol. 2009 May;12(4):513-24.

Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia.

Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U.

Trends Neurosci. 2007 May;30(5):220-7.

Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors.

Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ.

Int J Dev Neurosci. 2011 May;29(3):215-23.

Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia.

Arnsten AF.

J Neurosci Res. 2011 Oct;89(10):1575-85. doi: 10.1002/jnr.22704.

Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex.

Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S.

J Neurosci Res. 2011 Sep;89(9):1342-50. doi: 10.1002/jnr.22636.

Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex.

Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S.

Neurosci Res. 2012 Mar;72(3):275-8

Preparation of acute living hippocampal slice from common marmoset (*Callithrix jacchus*) for synaptic function analysis.

Oh-Nishi A, Obayashi S, Minamimoto T, Nagai Y, Hori Y, Suhara T.

Pharmacol Res. 2009 Aug;60(2):132-8

Neurobiological alterations at adult age triggered by adolescent exposure to cannabinoids.

Realini N, Rubino T, Parolaro D.

Brain Res Mol Brain Res. 1997 Jun;46(1-2):100-8.

Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions.

Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 13;108 Suppl 3:15647-54. doi: 10.1073/pnas.1014269108.

Understanding dopamine and reinforcement learning: the dopamine reward prediction error hypothesis.

Glimcher PW.

Nat Neurosci. 2011 Feb;14(2):133-8.

Multiple models to capture the variability in biological neurons and networks.

Marder E, Taylor AL.

J Neurophysiol. 2005 Nov;94(5):3516-22.

Slow oscillatory firing: a major firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area.

Shi WX.

Neuropsychopharmacology. 2004 Dec;29(12):2160-7.

Psychostimulants induce low-frequency oscillations in the firing activity of dopamine neurons.

Shi WX, Pun CL, Zhou Y.

J Neurosci Methods. 2012 Oct 15;211(1):145-58. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.013.

Detection of bursts and pauses in spike trains.

Ko D, Wilson CJ, Lobb CJ, Paladini CA.

J Neurosci. 2004 Nov 3;24(44):9953-61.

Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling.

Azad SC, Monory K, Marsicano G, Cravatt BF, Lutz B, Zieglgänsberger W, Rammes G.

Il Nucleo Rostromediale del Tegmento: caratterizzazione elettrofisiologica e ruolo nella neurobiologia delle sostanze d'abuso

Salvatore Lecca (tesi di dottorato)

Fatty acid ethanolamides pinpoint nicotinic receptors and modulate neuronal excitability through nuclear receptors PPAR α

Miriam Melis (tesi di dottorato)

Rhythms of the Brain

Gyorgy Buzsaki - Oxford University Press

Introduction to Electrophysiological Methods and Instrumentation

Franklin Bretschneider and Jan R. de Weille - 2006 Elsevier B.V.

Spiking Neuron Models

Wolfram Gerstner and Werner Kistler – 2002 Cambridge University Press

Springer Computational Neuroscience

W. Chaovalitwongse, P.M. Pardalos, P. Xanthopoulos – Springer

Springer Neuroscience A Mathematical Primer

A. Scott – Springer

Theoretical Neuroscience Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems

Peter.Dayan, L.F.Abbott

Elementi di Neuroscienze e Dipendenze

Giovanni Serpelloni , Francesco Bricolo, Marco Mozzoni
(Manuale per operatori dei Dipartimenti delle Dipendenze)

Principi di neuroscienze

Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell - CEA

Neuroscience, Third Edition

Purves, Augustine, Fitzpatrick Hall, Lamantia, McNamara - Sinauer
2004

Neuroscienze ..per iniziare

Università degli Studi di Trieste - Centro B.R.A.I.N per le Neuroscienze

Neuroscienze Cognitive

Michael S Gazzaniga, Richard B Ivry, George R Mangun – Zanichelli

Neuroscienze Esplorando il Cervello

Bear, Connors, Paradiso - 2° Ed Masson

Electrophysiological Recording Techniques (Neuromethods)

Robert P. Vertes and Robert W. Stackman Jr. – Springer

The Synaptic Organization of the Brain - Fifth Edition

Gordon M. Shepherd

Neuroscienze

Zigmond - Edises

Matlab 6

W. Palm III - McGraw-Hill

RINGRAZIAMENTI

Il ringraziamento principale e più importante va ai miei genitori, mio padre Rocco, mia madre Patrizia, e ai miei splendidi famigliari Anna, Patrizio e Giuseppino, ai miei cari nonni, e agli zii e cugini.

Grazie al loro sostegno sono stato in grado di raggiungere questo prestigioso obiettivo della seconda laurea, con la speranza che possa essere affiancata da numerosi altri traguardi.

Ringrazio anche tutti i miei amici, dai ragazzi “pugliesi”, alle nuove conoscenze romagnole fatte durante le mie numerose attività cesenati; i miei colleghi di università più stretti, e tutti i coinquilini con cui ho condiviso spazi e vita universitaria; i professori della facoltà di ingegneria, in particolar modo il professor Ursino, competente, carismatico, disponibile e preciso; i professori e i colleghi di laboratorio e gli amici di cagliaritani e californiani; i colleghi dei numerosi lavori che ho svolto parallelamente agli studi.

Infine, un augurio al sottoscritto, da parte del sottoscritto.

Ad maiora!

