

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROBIOLOGIA
SEDE CONSORZIATA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA,
“Sapienza”

XXIV ciclo

**DETERMINANTI MOLECOLARI
DELLE PATOLOGIE DELLO
SPETTRO AUTISTICO E DEL
DISTURBO DEPRESSIVO
MAGGIORE**
**(versione provvisoria perchè il lavoro è
sotto revisione per una rivista
internazionale)**

Dott.ssa Carla Nasca

Tutor:
Prof. Ferdinando Nicoletti

Coordinatore:
Prof. Roberto Avola

ANNO ACCADEMICO 2008-2012

Il disturbo dello spettro autistico nel Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ¹ funge da prototipo dei disturbi pervasivi dello sviluppo che includono quadri sindromici, quali, ad esempio, la sindrome dell'X Fragile, la sindrome di Rett, la sindrome di Angelman e sindromi neurocutanee, come la sclerosi tuberosa che esprimono comorbidità con la patologia autistica in senso stretto.

Tale comorbidità, accompagnata dalla costellazione sintomatologia dei disturbi dello spettro autistico, pone l'accento sulla radice neurobiologica dell'autismo, la cui ereditarietà è pari allo 0,9% ² e, nell'ambito della neurologia comportamentale, trova una possibile giustificazione nella disfunzione generalizzata della neocorteccia associativa con relativa preservazione della corteccia e della sostanza bianca di pertinenza delle aree motorie e sensitive primarie e l'assenza di segni clinici di lesioni cerebrali focali, presenti invece in infanti con storia di episodio lesionale di natura ipossico-ischemica, come disordini della sfera visuo-spaziale o paralisi cerebrale, delinea la strada verso una distribuita ed anomala connettività neurale.

I pathways Ras/ERK e PI3K/mTOR collegano l'attività sinaptica ai macchinari di traduzione e giocano un ruolo importante nella sintesi di proteine dipendente da LTP ³ e LTD ed, oggi, numerosi studi indicano che un'anomala regolazione dei processi di sintesi proteica potrebbe essere un possibile meccanismo alla base dei fenotipi autistici. Una possibile ipotesi unificante si basa sulla possibilità che i geni associati con l'autismo codifichino proteine che alterano le funzioni neuronali tramite cambiamenti nella trascrizione genica e nella traduzione di mRNA che, in ultima analisi, portano ad un'alterata plasticità sinaptica ^{4/5} in funzione di un aumento o un

collasso dei neuriti, dei dendriti e della rigenerazione degli assoni. Un ruolo critico nella sintesi di tali proteine è svolto dai recettori del glutammato (mGluRs), sui quali si sono focalizzati i nostri studi e perché implicati in processi di regolazione della traduzione a livello delle spine dendritiche⁶ e perché coinvolti nella proliferazione, differenziazione, sopravvivenza neuronale e plasticità sinaptica sia durante lo sviluppo che nella vita adulta.

Nonostante il ruolo critico che i recettori del glutammato giocano nelle funzioni cognitive umane, si conosce ancora poco riguardo il contributo di tali recettori verso la comprensione della patofisiologia dei disturbi dello spettro autistico e, sorprendentemente, i suddetti recettori non sono mai stati studiati in topi mutanti che portano mutazioni associate con ADSs.

Pertanto, partendo da queste informazioni, abbiamo voluto studiare l'espressione, la funzione ed i pathways intracellulari dei recettori del glutammato ed il loro ruolo nella plasticità sinaptica nel sistema nervoso centrale di un buon modello animale da esperimento dell'autismo monogenico: i topi knockout per il gene Ube3A che rappresentano un modello della sindrome di Angelman^{7/8}. Ube3A è un membro della famiglia di enzimi ubiquitina ligasi E3 che catalizza l'aggiunta di monomeri di ubiquitina al substrato target, che, in genere, viene degradato in seguito all'ubiquitinazione. Studi genetici indicano che l'attività di Ube3A è necessaria per le normali funzioni cognitive dell'uomo e che un danno a carico del gene Ube3A^{9/10/11} porta alla sindrome di Angelman, un disturbo del neurosviluppo caratterizzato da disfunzione motoria, atassia, forte ritardo mentale e difficoltà nel linguaggio.

I recettori metabotropi del glutammato, ed in particolare i recettori del gruppo I, sono recettori accoppiati a proteine G che, a livello delle sinapsi eccitatorie del cervello agiscono regolando la neurotrasmissione glutamatergica tramite l'attivazione del pathway MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) e della fosfolipasi C con conseguente mobilizzazione del calcio intracellulare. Pertanto, durante gli anni di studio del percorso di Dottorato in Neurobiologia, l'attività di Ricerca si è incentrata sullo studio dei recettori metabotropici del glutammato di gruppo I (recettori mGlu1 e mGlu5) in un modello murino di sindrome di Angelman, una forma di autismo monogenico causata dall'assenza della proteina Ube3A del complesso ubiquitina proteasoma.

Inoltre, durante gli anni del percorso di studio del Dottorato in Neurobiologia, vista la crescente problematica della depressione maggiore ed un sempre maggiore coinvolgimento nella patofisiologia del disturbo depressivo maggiore dei recettori del glutammato, che sono stati oggetto di studio delle mie ricerche sui determinanti molecolari delle patologie dello spettro autistico, con il Professor Nicoletti abbiamo voluto espandere la linea di ricerca ai determinanti molecolari di tale patologia, nota anche la crescente ipotesi dell'autismo come possibile disturbo di origine psichiatrica infantile.

Nella fase iniziale della ricerca si è valutata la capacità dei recettori mGlu di modulare l'espressione della proteina Ube3A in colture miste di cellule ippocampali murine (neuroni piastrati su un monostrato di astrociti confluenti). La stimolazione dei recettori mGlu di gruppo I realizzata mediante applicazione dell'agonista 3,5-

diidrossifenilglicina (DHPG) alle colture miste corticali ha determinato un aumento significativo dell'espressione della proteina Ube3A e del trascritto di Ube3A. La Figura 1 riporta i dati di immunoblotting relativi all'espressione della proteina Ube3A mentre la Figura 2 riporta i dati di mRNA ottenuti mediante la tecnica della PCR real time. Si è quindi esaminato se la capacità dei recettori mGlu di gruppo I di attivare l'idrolisi dei polifosfoinositidi (il meccanismo di trasduzione canonico dei recettori mGlu di gruppo I) fosse influenzato dall'inibizione farmacologica del proteasoma (una condizione che riproduce sperimentalmente il difetto presentato dagli animali mutanti di Ube3A). Abbiamo utilizzato fettine corticali preparate da topi wild-type a 10 giorni di vita postnatale, una fase di sviluppo in cui i recettori mGlu di gruppo I mostrano i più alti livelli di espressione funzionale. In una prima serie di esperimenti abbiamo esaminato l'accumulo di inositol monofosfato radioattivo (^3H -InsP) in presenza di litio in fettine stimulate da DHPG o, a scopo comparativo, da DOI (un agonista dei recettori 5-HT_{2a} della serotonina) e da noradrenalina (che attiva i recettori alfa-1 accoppiati a proteina Gq) in assenza e presenza del composto MG132, che inibisce il sistema ubiquitina proteasoma. I risultati, presentati in Figura 3, dimostrano che l'inibizione farmacologica del proteasoma riduce la stimolazione dell'idrolisi dei polifosfoinositidi mediata dai recettori mGlu di gruppo I ma non quella mediata dai recettori per la serotonina o della noradrenalina. Tali dati sono stati confermati in una seconda serie di esperimenti in cui le fettine sono state trattate con DHPG in presenza di MG132 o di lattocistina (un altro inibitore del proteasoma). Entrambi gli inibitori si sono rivelati in grado di ridurre la stimolazione dell'idrolisi

dei polifosfoinositidi indotta da DHPG (cioè mediata dai recettori mGlu del gruppo I) (Fig. 4).

Abbiamo dunque esteso la ricerca ai topi eterozigoti del gene che codifica per Ube3A (in cui l'espressione della proteina è ridotta come risultato di aploinsufficienza). Per valutare se l'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I fosse difettiva in questi animali abbiamo eseguito una tecnica in vivo che permette di misurare l'attivazione dell'idrolisi dei polifosfoinositidi mediata dai recettori dopo iniezione intracerebroventricolare di inositolo radioattivo, pretrattamento con litio (per inibire l'attività dell'enzima inositolmonofosfatofosfoidrolasi) e trattamento intracerebroventricolare con DHPG. Tale metodica permette la contemporanea valutazione della funzione recettoriale in diverse aree cerebrali. Abbiamo dovuto utilizzare inizialmente topi di 4 mesi d'età per la ridotta disponibilità di animali. In questi animali la stimolazione dell'idrolisi dei polifosfoinositidi mediata dai recettori mGlu del gruppo I non mostrava differenze tra wild-type ed eterozigoti nell'ippocampo, corteccia cerebrale, bulbo olfattivo e cervelletto (Fig. 5). Utilizzando gli stessi animali abbiamo dunque deciso di estendere lo studio ad un'altra via di trasduzione attivata dai recettori mGlu di gruppo I, e cioè alla via della MAP chinasi. L'attivazione è stata valutata esaminando i livelli di ERK fosforilata in animali trattati con DHPG per via intracerebroventricolare. Come si osserva in Fig. 6, la stimolazione dell'attività della MAPK da parte del DHPG è completamente abrogata in mutanti eterozigoti di Ube3A. Tali dati offrono la prima dimostrazione che i recettori mGlu di gruppo I sono difettivi in modelli murini di sindrome di Angelman.

A tal proposito, in futuro sarebbe interessante estendere lo studio durante lo sviluppo degli animali wt e ko Ube3A.

Secondo l'antica concezione di Ippocrate, l'umore dipende dall'equilibrio di una miscela di quattro umori elementari: sangue, flegma, bile gialla e bile nera e la depressione, considerata un'alterazione dell'umore, era considerata un eccesso di quest'ultima. Nel greco antico, infatti, il termine per designare la depressione è melanconia, che significa appunto bile nera.

Tuttavia, secondo S. Freud “anche dal punto di vista della psicologia descrittiva la definizione di melancolia è vaga; essa comprende forme cliniche diverse che non sembrano potersi ridurre ad una forma unitaria” e soltanto in questi ultimi due decenni sono stati messi a punto criteri relativamente precisi per diagnosticare le alterazioni degli stati d'animo in parallelo alle facoltà cognitive.

La sindrome depressiva rappresenta la patologia psichiatrica più diffusa nella popolazione generale, con una frequenza stimata tra il 3 e il 5 % dall'OMS e in evidente aumento. Si calcola che circa il 17% della popolazione vada in contro, nel corso della vita, ad almeno un episodio depressivo. L'incidenza (nuovi casi per anno) è stimata intorno a 1\100 per quanto riguarda il sesso maschile e 3\100 per il sesso femminile. L'età media di esordio è intorno ai 25 anni, con due picchi: uno tra i 15 e i 19 anni e l'altro tra i 25 e i 29 anni. Il sesso femminile presenta un maggior rischio di depressione unipolare con un rapporto di 2:1 rispetto al sesso maschile. Questa maggiore vulnerabilità del sesso femminile è da ricondurre sia a variabili di tipo

psicosociale che al ruolo svolto da fattori biologici legati a variazioni fisiologiche dell'equilibrio ormonale o ad assunzione di anticoncezionali.

Vi è inoltre una componente legata alla familiarità che fa sì che il disturbo depressivo maggiore sia 1,5-3 volte più frequente tra i familiari di primo grado di soggetti depressi che nella popolazione generale.

Uno studio dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sulle proiezioni per l'anno 2020 di mortalità e disabilità riporta la depressione maggiore come seconda causa di morte tra le cause di DALY - Disability-Adjusted Life Year - (ossia degli anni di vita sana persi, sia a causa di morte prematura che per disabilità); seconda soltanto alla coronaropatia ischemica.

Le forme depressive gravi hanno spesso profonde conseguenze debilitanti . Sebbene alcuni pazienti vadano in contro a un solo episodio depressivo, la malattia è generalmente ricorrente. Circa il 70% dei soggetti che ha avuto un episodio di depressione grave ne avrà almeno un secondo.

Le manifestazioni cliniche della depressione sono caratterizzate da una serie di sintomi a carico dell'umore, della psicomotricità, della sfera cognitiva e somato-vegetativa.

Il *Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali* (DSM-IV-TR, 2001) indica come criteri diagnostici per il Disturbo Depressivo Maggiore:

1. Umore depresso per la maggior parte del giorno, quasi ogni giorno.
2. Marcata diminuzione di interesse o piacere per tutte, o quasi tutte, le attività per la maggior parte del giorno, quasi ogni giorno (anedonia).

3. Significativa perdita di peso, in assenza di una dieta, o significativo aumento di peso, oppure diminuzione o aumento dell'appetito quasi ogni giorno.
4. Insonnia o ipersonnia quasi ogni giorno.
5. Agitazione o rallentamento psicomotorio quasi ogni giorno.
6. Affaticabilità o mancanza di energia quasi ogni giorno.
7. Sentimenti di autosvalutazione oppure sentimenti eccessivi o inappropriati di colpa quasi ogni giorno.
8. Diminuzione della capacità di pensare o concentrarsi, o difficoltà a prendere decisioni, quasi ogni giorno.
9. Ricorrenti pensieri di morte, ricorrente ideazione suicida senza elaborazione di piani specifici, oppure un tentativo di suicidio o l'elaborazione di un piano specifico per commettere suicidio.

Cinque (o più) dei seguenti sintomi sono contemporaneamente presenti durante un periodo di 2 settimane nei soggetti affetti da Depressione Maggiore.

In base al numero dei criteri soddisfatti, della gravità dei sintomi e al grado di disabilità funzionale e di disagio provocati, il disturbo depressivo maggiore è classificato come lieve, moderato o grave.

Le cause che portano alla depressione sono ancora oggi poco chiare. Inizialmente vi erano due correnti opposte di pensiero, una che attribuiva maggiore importanza alle cause biologiche, l'altra a quelle psicologiche. Oggi i dati disponibili suggeriscono che la depressione sia una combinazione di fattori genetici, ambientali e psicologici.

Recenti osservazioni suggeriscono che i neurotrasmettitori monoaminergici (serotonina, noradrenalina e dopamina) sono i principali fattori coinvolti sia nella fisiopatologia che nel trattamento della depressione. La base comune del meccanismo d'azione di questi farmaci è l'aumento del tono monoaminergico centrale, con maggiore disponibilità a livello sinaptico di neurotrasmettitori.

Per meglio comprendere l'eziopatologia della depressione sono state sviluppate diverse ipotesi:

- *IPOTESI MONOAMINERGICA*. Venne formulata per la prima volta negli anni sessanta sulle basi della psicofarmacologia clinica. Essa ipotizzava un deficit neuroaminergico (in particolare di noradrenalina e serotonina) nei soggetti con disturbi dell'umore; si era visto, infatti, che la reserpina (farmaco che deplete questi trasmettitori) determinava, nella maggior parte dei casi, una sindrome depressiva, mentre gli antidepressivi, quali TCA e IMAO, incrementando questi trasmettitori, miglioravano la sintomatologia del paziente.

Il deficit di serotonina si associa a un corteo sintomatologico caratterizzato da umore depresso, ansia, disturbo di panico e fobia.

Il deficit di noradrenalina comporta un rallentamento psicomotorio e alterazioni cognitive.

Il ruolo della dopamina nella depressione è ancora oggi non molto definito anche se una sua disregolazione è stata dimostrata nei sottogruppi maniacali e psicotici dei pazienti depressi.

Grazie a diversi studi, soprattutto recenti, cresce sempre di più la convinzione che l'eziologia biologica del disturbo dell'umore dipende dalla disregolazione di più sistemi intercorrelati morfofunzionalmente tra loro. Tra questi, in particolare, possiamo riconoscere:

- *Gaba*. Gli studi condotti hanno permesso di ipotizzare che le alterazioni del sistema gabaergico si possono riflettere sul funzionamento del sistema catecolaminergico. Infatti, sembra che la stimolazione dei recettori GABA-B determini una diminuzione dell'influenza della proteina G sull'adenilciclasi, con successivo aumento della risposta del secondo messaggero, cAMP, durante l'esposizione ad altri neurotrasmettitori come l'adrenalina.

Si è visto, inoltre, che il livello di GABA nel liquor e nel plasma è più basso nei pazienti depressi rispetto a quelli sani. Studi effettuati su tessuto cerebrale di pazienti depressi hanno dimostrato che la concentrazione di GABA è inversamente proporzionale al grado di gravità del quadro sintomatologico. È risultato anche che le concentrazioni plasmatiche di GABA sono più basse in soggetti sani con parenti di primo grado affetti da depressione che nei soggetti sani senza familiarità.

- *Glutammato*. Si è rilevato che sia lo stress che i glucocorticoidi aumentano la concentrazione di glutammato a livello dell'ippocampo (Sapolsky, 1996). Nei pazienti suicidi si è osservata una desensibilizzazione dei recettori NMDA nella corteccia prefrontale, a evidenza che il trasporto del glutammato può risultare alterato nella depressione. Inoltre, grazie al test di nuoto forzato svolto su animali di laboratorio, si è dimostrato che gli antagonisti del recettore NMDA hanno un effetto sinergico con i

farmaci antidepressivi. È stato, quindi, proposto che mutazioni o polimorfismi del gene che codifica il recettore NMDA, potrebbero alterare la suscettibilità allo sviluppo di depressione.

- *IPOSTESI NEUROENDOCRINA*. Vari studi hanno messo in luce l'importanza delle alterazioni del sistema neuroendocrino nei pazienti depressi. Queste alterazioni sono interpretate come il risultato di un funzionamento patologico di un determinato sistema neurotrasmettitoriale del SNC. È emerso, infatti, che neurotrasmettitori quali la serotonina, l'acetilcolina e la noradrenalina controllano la secrezione di ormoni ipotalamici che, a loro volta, svolgono un'azione trofica sull'ipofisi che controlla la secrezione degli organi periferici.

- *IPOSTESI GENETICHE*. I dati ottenuti dagli studi effettuati nel corso di questi anni su famiglie, su bambini adottivi e su gemelli indicano che la trasmissione genetica è di grande importanza eziologica nella patogenesi dei disturbi dell'umore.

Studi su famiglie hanno trovato che parenti di primo grado di un soggetto con disturbo depressivo maggiore presentano una probabilità di avere un disturbo dell'umore da 2 a 3 volte più alta rispetto a soggetti sani.

Interessanti sono gli studi su bambini adottivi, nei quali si è riscontrato che i figli biologici di genitori colpiti presentano comunque un rischio maggiore di sviluppare disturbi dell'umore, anche se sono ospiti in famiglie adottive non affette.

Durante gli ultimi 2 decenni, la ricerca dei geni coinvolti nei disturbi dell'umore ha contribuito enormemente alla migliore conoscenza del ruolo complesso che la genetica ha in questi disturbi.

Le regioni di DNA che sembrano più interessate nella fisiopatologia dei disturbi dell'umore sono localizzate sui cromosomi 4, 5, 11, 12, 18, 21 e X.

In particolare è stata attentamente studiata da un punto di vista genico la neurotrasmissione serotoninergica, dato il coinvolgimento di tale sistema nella patogenesi della depressione. Varie ricerche su questo tema postulano che la presenza di variazioni a livello di geni implicati in questo sistema possano essere correlate con la risposta clinica. Tra questi geni i più importanti sono il gene codificante per il trasportatore della serotonina (SERT) e il gene per la triptofano idrossilasi.

Per quanto riguarda il SERT, si sono riscontrati tutta una serie di polimorfismi, ma quelli più importanti vengono chiamati 5HTTLRP e sono polimorfismi di una regione del promotore dove si trovano delle sequenze ripetute: possono essere *short* ("S"), in numero di 14, oppure *long* ("L"), in numero di 16.

La presenza di mutazioni a livello del promotore di un gene determina una maggiore o minore espressione della proteina. Quindi, soggetti che sono omozigoti per la configurazione "S" (SS) avranno una maggiore espressione del SERT e sono, quindi, maggiormente soggetti a sviluppare la depressione, il disturbo post-traumatico da stress e sono, in generale, meno responsivi agli SSRI.

- IPOTESI PSICOLOGICHE.

- FATTORI DI RISCHIO PSICOSOCIALE. Lo stress psicosociale ha una stretta correlazione con l'insorgenza della depressione maggiore. I dati più significativi relativi ad eventi vitali stressanti affermano che la perdita di un genitore prima degli

undici anni di età sembra essere frequentemente associato allo sviluppo della depressione.

Comunque, bisogna tenere presente la notevole variabilità individuale della vulnerabilità agli stress psicosociali, attribuibile sia ad una predisposizione genetica che ad antecedenti sociopsicologici, cioè eventi precoci di vita quali la perdita o la separazione da figure genitoriali nell'infanzia e nell'adolescenza e la presenza di un ambiente familiare disturbato.

Invece, gli eventi della vita legati ad esperienze di perdita (morte del coniuge, separazione o divorzio, perdita del posto di lavoro, insuccessi lavorativi, etc e la mancanza di un adeguato supporto sociale sembrano avere una forte influenza soprattutto all'esordio del disturbo, in associazione a un substrato di vulnerabilità individuale; oggigiorno oggetto di numerose ricerche.

Esistono attualmente trattamenti efficaci sia per le forme depressive unipolari che per quelle maniaco-depressive. Gli obiettivi principali della terapia dei disturbi depressivi sono la risposta al trattamento, la remissione della sintomatologia, la ripresa funzionale del soggetto, la riduzione del rischio di ricadute, il miglioramento della qualità di vita.

Quattro sono le terapie per la cura della depressione:

- l'elettroconvulsiva, che è stata sperimentata per 50 anni, è molto efficace anche se le sostanze antidepressive rappresentano il trattamento di scelta nelle forme depressive più gravi;

- i sali di litio, introdotti nel trattamento psichiatrico delle forme maniaco-depressive da John Cade nel 1949, sono efficaci nel porre termine agli episodi maniacali e vengono usati come stabilizzatori dell'umore;
- sostanze anticonvulsivanti (come il valproato sodico e la carbamazepina) che sono efficaci per ridurre i sintomi psicotici nelle crisi maniacali acute o nelle depressioni gravi;
- la terapia farmacologica, nell'ambito della quale esistono diverse classi di farmaci, è attualmente la più utilizzata. La base comune del meccanismo d'azione di questi farmaci è l'aumento del tono monoaminergico centrale, con maggiore disponibilità di neurotrasmettitori a livello sinaptico.

Questi farmaci, suddivisi in classi, sono:

- TCA, antidepressivi triciclici (Desipramina, Amitriptilina, Nortriptilina, Imipramina, Clomipramina, Amoxapina, ecc,), che agiscono inibendo la ricaptazione della noradrenalina e della serotonina e bloccando in particolare i NAT e i SERT.
- IMAO, inibitori delle monoamminossidasi (Fenelzina, Tranilcipromina, Isocarbossazide), che sono stati i primi farmaci messi in commercio per curare la depressione.

La loro funzione consiste nella regolazione del contenuto monoaminico all'interno del SNC, attraverso il blocco delle MAO che sono i principali enzimi che metabolizzano le monoamine, sia noradrenalina che serotonina. L'efficacia di questa classe di farmaci, nel trattamento delle varie forme di depressione nonché in altri disturbi di natura psichiatrica, è comprovata da numerosi studi. Purtroppo, però, gli effetti

collaterali sono molto più numerosi e gravi rispetto a quelli dati dalle altre classi farmacologiche. I più frequenti sono: vertigini, cefalea, insonnia, stipsi, disturbi della memoria, visione offuscata, edemi periferici, eloquio confuso, ipostenia, scosse miocloniche e disfunzioni sessuali.

- SSRI, inibitori selettivi del reuptake della serotonina (Fluoxetina, Sertralina, Paroxetina, Fluvoxamina, Citalopram, Escitalopram, ecc.).

Questa classe di farmaci rappresenta oggi il trattamento di elezione per i disturbi depressivi, grazie alla buona efficacia e alla minor comparsa di effetti collaterali. Il loro meccanismo d'azione si esplica attraverso il blocco del trasportatore della serotonina (SERT). Non hanno azione né sul trasportatore della noradrenalina né su quello della dopamina; hanno, quindi, pochissime azioni recettoriali e, per questo, anche minori effetti collaterali. I più frequenti sono insonnia, disfunzioni sessuali, cefalea, agitazione, aumento dell'ansia, soprattutto nelle fasi iniziali del trattamento.

- SNRI, inibitori del reuptake della serotonina e della noradrenalina (Venlafaxina, Duloxetina, Nefazodone).

Hanno un meccanismo d'azione simile ai TCA, ma con minori effetti collaterali. Questa classe di farmaci si è mostrata molto utile nei casi resistenti o gravi di depressione e nei casi in cui la depressione si accompagna a sintomi d'ansia.

- NARI, inibitori selettivi del reuptake della noradrenalina (Reboxetina, Atomoxetina).

L'azione selettiva sulla NA rende questa classe di farmaci molto utile nei casi di depressione in cui prevale rallentamento psicomotorio e compromissione cognitiva (depressione inibita).

- NASSA, antidepressivi serotoninergici e noradrenergici (Mirtazapina).

Questo farmaco determina il blocco specifico dei recettori 5-HT_{2A} e 5HT₃; è anche un potente antagonista dei recettori α ₂-adrenergici (sono recettori presinaptici che controllano negativamente il rilascio di serotonina e noradrenalina). Non presenta i tipici effetti collaterali ansiogeni, sessuali e gastrointestinali dei farmaci serotoninergici. A basse dosi può essere molto sedativo e causare aumento di peso; ad alte dosi, invece, diventa attivante perché prevale l'effetto noradrenergico su quello istaminergico.

- NDRI, inibitori della ricaptazione della noradrenalina e dopamina.

Attualmente soltanto un farmaco di questa classe è stato approvato per il trattamento della depressione: il Bupropione che ha proprietà stimolanti ed è particolarmente utile nelle depressioni inibite. Può esacerbare l'ansia e l'agitazione. Effetti collaterali riscontrati sono: cefalea, nausea, insonnia, stipsi, sudorazione profusa, agitazione e tremori.

Tutti i farmaci antidepressivi, in relazione alla loro struttura chimica, alle loro proprietà farmacocinetiche e alla loro azione su bersagli molecolari e cellulari cerebrali, necessitano di essere somministrati per molte settimane prima che avvenga un significativo miglioramento della sintomatologia. Questo periodo è quello che viene chiamato "tempo di latenza clinica". In tale periodo – durante il quale, appunto, si

apprezzano (o non) risposte cliniche significative o se si verificano sono effimere – i processi di neuroplasticità propri del SNC portano (o non) quelle soluzioni neuroadattative cui corrispondono, sul piano fenomenico, la risoluzione totale o parziale della sintomatologia della malattia.

I farmaci antidepressivi possono essere considerati gli interruttori o gli elementi che mettono in moto o accentuano i processi già insiti nel funzionamento “normale” del SNC.

La maggior parte degli antidepressivi agisce modulando i componenti presinaptici della trasmissione monoaminergica: serotonina, noradrenalina e dopamina.

Un punto molto interessante – che ci fa comprendere perché, nonostante l'immediatezza dell'azione molecolare dei farmaci, l'azione clinica è ritardata nel tempo – è fornito dall'osservazione che questi farmaci aumentano la quantità di serotonina e noradrenalina a livello sinaptico ma, allo stesso tempo, sopprimono il firing neuronale. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che il nucleo del rafe dorsale e il locus coeruleus hanno un'alta densità di autorecettori 5-HT_{1a} e alfa 2, rispettivamente. Questi recettori inibitori, accoppiati a proteina G inibitoria, sono localizzati sul soma e sui dendriti dei neuroni noradrenergici e la loro attivazione porta ad una riduzione del firing neuronale e del rilascio di neurotrasmettitore. Quindi, l'aumento di serotonina prodotta e rilasciata a livello somatodendritico attiva i recettori 5HT_{1a} inibitori e produce una riduzione dell'attività serotoninergica a livello delle regioni cerebrali innervate da tali fibre: la corteccia prefrontale, lo striato e l'ippocampo che è il maggiore ricevente di fibre serotoninergiche dal rafe.

L'attivazione degli autorecettori terminali 5HT_{1d} o alfa₂ limita anche l'incremento prodotto dal blocco locale della ricaptazione. Di conseguenza, finché la riserva recettoriale non si è esaurita, ovvero fino a quando non si è verificata la desensibilizzazione di questi autorecettori inibitori, non avviene nessun miglioramento della sintomatologia.

Per quanto riguarda la neurobiologia della Depressione, svelarne la fisiopatologia è una sfida ardua, in quanto è impossibile da riprodurre in modelli animali le medesime condizioni dell'uomo (Nestler 2008). Ciò nonostante molti sintomi sono stati accuratamente riprodotti e questi, insieme ai dati clinici, ci permettono di approfondire la neurobiologia della depressione.

Recenti studi, basati su tecniche comportamentali, molecolari ed elettrofisiologiche, rivelano che alcune caratteristiche della depressione sono determinate da cambiamenti neuroplastici di disadattamento indotti da stress in specifici circuiti neurali. Mostrano che la comprensione dei meccanismi di resistenza allo stress offre una nuova dimensione per lo sviluppo di nuovi trattamenti antidepressivi.

Nonostante la diffusione della depressione e il suo notevole impatto sulla società, la conoscenza sulla fisiopatologia è ancora rudimentale se paragonata a quella di altre comuni malattie croniche.

È possibile dare una spiegazione di questa diversità.

In primo luogo, studiare i cambiamenti patologici del cervello rimane decisamente più difficile che per tutti gli altri organi.

Tecniche disponibili per documentare la funzione aberrante di circuiti cerebrali dipendono da studi post-mortem, che hanno numerosi limiti, o da tecniche di neuroimaging che si basano sulla rilevazione dei cambiamenti nell'attività neuronale.

Anche se questi approcci hanno fornito un'importante conoscenza sui meccanismi di funzionamento di regioni del cervello, un semplice incremento o decremento nella loro attività è probabilmente insufficiente a spiegare la complessa serie di sintomi causati dalla depressione.

In secondo luogo, la depressione maggiore si verifica idiopaticamente e la limitata comprensione della sua eziologia si manifesta come un elenco di fattori di rischio, quali eventi di vita stressanti, alterazioni endocrine (ipotiroidismo e ipercortisolismo), tumori (come adenocarcinoma pancreatico e tumori al seno) ed effetti collaterali di farmaci.

Regioni cerebrali diverse e circuiti quali quelli dell'emozione, della ricompensa e della funzione esecutiva, e gli anomali cambiamenti all'interno di questi, altamente interconnessi con le regioni 'limbiche', sono stati implicati nella depressione e nell'azione degli antidepressivi (Fig.1).

Una grande quantità di studi post-mortem e di neuroimaging, condotti su pazienti depressi, hanno riportato una riduzione del volume della sostanza grigia nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo, regioni che hanno la funzione di mediare gli aspetti cognitivi della depressione, come il senso di inutilità e di colpa.

In contrasto con gli studi strutturali, gli esperimenti di valutazione della funzione del cervello, come la risonanza magnetica funzionale (fMRI) o tomografia a emissione di

positroni (PET), mostrano che l'attività all'interno dell'amigdala e della corteccia cingolata subgenuale (Cg25, una sub-regione di corteccia prefrontale) è fortemente correlata con le emozioni disforiche (Drevets, Price et al. 1997). Gli indici di attività neuronale all'interno di queste regioni sono aumentati da una transitoria tristezza nei volontari sani e sono cronicamente aumentati negli individui depressi, tornando a livelli normali con trattamenti di successo.

A seguito di questi risultati, è stato dimostrato che la deep brain stimulation applicata a tratti di sostanza bianca che circonda Cg25 produce una remissione dei sintomi depressivi in parte dei pazienti resistenti alla terapia, cioè pazienti che non hanno risposto a diversi trattamenti standard.

La deep brain stimulation, ottenuta attraverso il posizionamento chirurgico dello stereotassico, ha anche fornito un effetto migliorativo quando applicata al nucleo accumbens (NAc), una sottoregione striatale importante per la ricompensa e per i deficit edonici nella depressione.

Queste reti proencefaliche sono significativamente modulate da proiezioni monoaminergiche che partono da nuclei del mesencefalo e del tronco cerebrale: la dopamina dalla area ventrale tegmentale (VTA), la serotonina dal rafe dorsale situato nella zona grigia periacqueduttale e la noradrenalina dal locus coeruleus.

Studi più recenti hanno indagato sul ruolo di specifici nuclei ipotalamici nel mediare i segni neurovegetativi della depressione.

Tuttavia, è opportuna una nota di cautela perché, anche se i sintomi depressivi sono probabilmente mediati dalla disfunzione della rete neurale, è stato sempre usato un

approccio semplicistico, quale quello della “localizzazione della funzione”, per esaminare substrati limbici. L’ipotesi monoaminergica della depressione, che postula che la sindrome è causata da diminuzione della funzionalità delle monoamine nel cervello, è originata dalle prime osservazioni cliniche. Due composti strutturalmente non correlati, sviluppati per condizioni non psichiatriche (iproniazide e imipramina), avevano potenti effetti antidepressivi negli esseri umani e sono stati successivamente in grado di aumentare la trasmissione serotoninergica e noradrenergica centrale.

La reserpina, invece, un vecchio agente antipertensivo che deplete la riserva di monoamine, produce sintomi depressivi in un sottogruppo di pazienti.

Agenti antidepressivi oggi offrono un miglior indice terapeutico e una minore incidenza di effetti collaterali per la maggior parte dei pazienti, ma sono ancora progettati per aumentare la trasmissione delle monoamine e per inibire la ricaptazione neuronale (per esempio: gli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRIs), come la fluoxetina) o per inibire la degradazione (per esempio: gli inibitori delle monoaminossidasi, come la tranilcipromina).

Sebbene questi agenti basati sulle monoamine siano potenti antidepressivi e le alterazioni della funzione centrale monoaminergica potrebbero contribuire marginalmente alla vulnerabilità genetica, la causa della depressione è ben lungi dall'essere una semplice carenza delle monoamine centrali.

Inibitori delle monoaminossidasi e SSRI producono un aumento immediato nella trasmissione delle monoamine, mentre le loro proprietà di innalzare il tono dell’umore richiedono settimane di trattamento.

Teorie biologiche sull'eziologia della depressione si sono tradizionalmente concentrate sull'interazione tra rischi genetici e rischi ambientali/sociali, per spiegare come la vulnerabilità genetica, relativamente debole, in combinazione con giusti stimoli ambientali, potrebbe portare a miglioramenti psichiatrici significativi (Nestler and Hyman 2010).

Recenti evidenze sottolineano il ruolo delle modificazioni epigenetiche nella patofisiologia della Depressione Maggiore e di altri disturbi psichiatrici (1). Studi su modelli animali murini sottoposti a stress cronico in modo da sviluppare stati depressivi ha evidenziato una downregulation lunga e duratura del BDNF (brain-derived neurotrophic factor) nella regione ippocampale che risulta da una ridotta metilazione dell'istone H3. Il trattamento cronico con antidepressivi aumenta l'espressione del BDNF in questi topi tramite un aumento dell'acetilazione degli istoni, mentre rimane inalterata l'ipermetilazione dell'istone H3 (2). Gli inibitori degli istoni deacetilasi (HDACs) causano effetti antidepressivi nei modelli di stress cronico ed al test del nuoto forzato (3) ed un'overespressione dell' HDAC5 nell'ippocampo reverte gli effetti terapeutici degli antidepressivi (4). Inoltre, l'inibizione farmacologica degli HDACs corregge l'ipermetilazione del gene per il recettore dei glucocorticoidi e migliora le risposte allo stress nei ratti che hanno ricevuto una carenza nelle cure materne (5). Ciò suggerisce che le droghe che aumentano lo stato di acetilazione degli istoni o dei fattori di trascrizione potrebbero correggere il programma epigenetico patologico associato alla depressione ed all'ansia e potrebbero quindi essere sviluppati nuovi farmaci antidepressivi ad azione epigenetica.

Oggi giorno, sono disponibili numerosi inibitori degli HDAC per il trattamento di diversi tipi di cancro, incluse forme farmaco-resistenti come la leucemia ed i linfomi (6). Tuttavia, un uso prolungato di queste droghe in pazienti depressi potrebbe avere numerosi effetti collaterali, incluse neutropenia e trombocitopenia (7). Le droghe che direttamente promuovono i processi di acetilazione rappresentano una potenziale alternativa all'uso degli inibitori degli HDAC nei disordini umani. Recenti evidenze suggeriscono che L-acetilcarnitina (LAC), una droga attualmente impiegata per il trattamento del dolore neuropatico (8), causa analgesia tramite un meccanismo epigenetico condiviso dagli inibitori degli HDAC. Entrambe le classi di farmaci aumentano l'acetilazione della proteina p65, una subunità della famiglia dei fattori di trascrizione NFκB, probabilmente aumentando l'espressione del recettore mGlu2 nelle corna dorsali del midollo spinale (9,10).

Sulla base di queste conoscenze, la mia attività di Ricerca svolta durante il terzo anno del Dottorato in Neurobiologia si è incentrata sull'analisi dell'effetto antidepressivo della LAC in due modelli animali: i topi CD1 sottoposti a stress cronico ed imprevedibile che rappresentano un modello animale di depressione indotta da stress ambientale ed a tal fine ho seguito il seguente protocollo sperimentale: l'animale viene esposto due volte al giorno con un intervallo di 6 ore e per una durata di 4 settimane ad una varietà di fattori di stress imprevedibili, quali alterazioni della gabbia (segatura umida, la sostituzione di segatura con 100 ml di acqua a 21 °C), isolamento (3 ore), overcrowding (10 animali per gabbia, 3 ore), gabbia (45 °C per 12 ore), esposizione al freddo (4°C per 45 minuti), stress da contenzione (3 ore) (Willner 1997).

Il secondo modello animale è rappresentato dai ratti flinders sensitive line, considerato in letteratura un buon modello genetico di depressione.

I ratti FSL (Flinders Sensitive Line) e FRL (Flinders Resistent Line), i loro controlli sperimentali, sono due linee appartenenti alla famiglia degli Sprague-Dawley, selezionati per la particolare sensibilità alla diisopropilfluorofosfato (DFP), un inibitore delle colinesterasi.

I ratti FSL sono selettivamente selezionati per la sensibilità ai farmaci colinergici, la ridotta attività psicomotoria, il ridotto appetito, le alterazioni del sonno (↑sonno REM), le alterazioni del sistema immunitario (↓attività linfociti T killer), le alterazioni dell'asse HPA, l'esagerato tempo di immobilità nel test del nuoto forzato (forced swimming test) che è normalizzato solo dal trattamento cronico (21gg) con antidepressivi TCA o SSRI e che porta gli FSL ad assumere un atteggiamento del tutto simile ai controlli (Overstreet 1993).

Per tali motivi, sono considerati modelli animali genetici di depressione maggiore e sono largamente utilizzati nello studio delle basi molecolari della depressione (Overstreet, Friedman et al. 2005).

Diversi studi hanno dimostrato un'espressione deficitaria dei recettori metabotropici del glutammato del gruppo II (mGluR2\3) nell'ippocampo dei ratti FSL e hanno evidenziato il ruolo cruciale svolto da questo particolare gruppo recettoriale nella fisiopatologia della malattia.

Somministrazioni, inoltre, di agonisti di mGluR2\3 (LY379268) hanno messo in luce come un loro utilizzo contestuale a somministrazioni di Clorimipramina, determini una

marcata riduzione dell'immobilità al test di Porsolt già dopo 14 giorni. Questo è indice di un'importante riduzione del tempo di latenza clinica associato al farmaco (Matrisciano et al. 2008).

I topi CD1 esposti ad episodi ripetuti di stress imprevedibile mostravano un fenotipo depressivo al test del nuoto forzato ed al test di preferenza al saccarosio. Entrambi i test hanno "pharmacological validity" poichè rispondono ai trattamenti con gli antidepressivi.

Il trattamento sistemico con LAC (100mg/kg, i.p., una volta al giorno per 21 giorni) ha significativamente ridotto il tempo di immobilità al forced swimming test dopo una settimana di trattamento, quando un convenzionale antidepressivo, quale la clorimipramina, risultava inattivo. Sorprendentemente anche il trattamento sub cronico con LAC (3 giorni di somministrazioni) riduceva l'immobilità al test di Porsolt. L'attività antidepressivo-simile della LAC è stata mantenuta per tre settimane. Un classico antidepressivo, quale la clorimipramina (10mg/kg i.p.) risultava efficace dopo almeno tre settimane di trattamento ed il suo effetto veniva perso una settimana dopo l'interruzione del trattamento (Fig.4).

Nuovamente al test di preferenza al saccarosio, il trattamento con LAC era già efficace dopo i primi tre giorni di somministrazioni e persisteva per almeno due settimane dall'interruzione del trattamento (Fig.5). Ciò inaspettatamente ci porta ad affermare che la LAC agisce come un antidepressivo ad azione rapida e duratura in due modelli animali di depression maggiore. Il trattamento con LAC si è dimostrato altamente efficace nel correggere le anomalie cellulari e neurochimiche associate al fenotipo

depressivo dei ratti FSL. Numerosi studi indicano che un aumento della neurogenesi nel giro dentate dell'ippocampo media alcuni, ma non tutti, gli effetti terapeutici delle droghe antidepressive negli animali da esperimento e nell'uomo. Il trattamento con LAC causa un forte incremento nel numero di neuro-progenitori proliferanti nell'ippocampo dei ratti FSL ed a solo un lieve effetto negli animali di controllo. Un increment pari a 5 volte il numero di cellule progenitrici è stato osservato nell'ippocampo dei ratti FSL dopo solo 10 giorni di trattamento, un effetto che potrebbe contribuire a spiegare la breve latenza dell'effetto antidepressivo di questa droga (Fig.6). Il trattamento con LAC ripristina anche i livelli di BDNF nell'ippocampo e corregge il deficit nel rilascio di glutammato osservato nei sinaptosomi ippocampali dei ratti FSL (Fig.7). A questo punto, abbiamo voluto studiare un possibile meccanismo alla base del rapido e duraturo effetto antidepressivo della LAC concentrandoci sui recettori metabotropici mGlu2. I ratti FSL come dimostrato in letteratura, mostrano una riduzione di base dell'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale e l'attivazione farmacologica con l'agonista ortosterico dei recettori mGlu2/3 (LY379268) riduce la latenza temporale della clomipramina come mostrato dalla ridotta immobilità al test del nuoto forzato. In questo studio, abbiamo dimostrato che l'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale era pienamente revertita dal trattamento cronico con LAC (Fig.8). Questo effetto è "disease-dependent" poichè la LAC non mostra alcuna variazione nell'espressione del recettore mGlu2 negli animali di controllo. In modo simile a quanto osservato nel dolore cronico, il trattamento con

LAC aumentava il livello di acetilazione della proteina NF-kB/p65 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale. Ciò potrebbe essere correlato alla riduzione del recettore mGlu2 che nella regione del suo promotore genico ha diversi elementi di risposta all'NF-kB. Inoltre, abbiamo voluto vedere se vi potesse essere un possibile link tra depressione maggiore e fattori epigenetici e, interessante, il trattamento con LAC aumento l'acetilazione dell'istone H3 a livello del promotore del gene mGlu2 sebbene questo effetto sia più evidente nella corteccia che nell'ippocampo (Fig.9). Per esaminare se l'induzione del recettore mGlu2 possa essere correlate all'effetto antidepressivo della LAC, i ratti FSL trattati per 21 giorni con LAC hanno ricevuto una singola somministrazione dell'antagonista del recettore mGlu2/3, LY341495 (1mg/kg i.p.) o salina e sono stati testati al test del nuoto forzato 45 minuti dopo. Una singola somministrazione di LY341495 era sufficient nel ridurre ampiamente l'effetto antidepressivo della LAC (Fig.10). LY341495 non mostrava alcun effetto negli animali FSL che non erano stati trattati con LAC e non induceva cambiamenti nell'attività locomotoria.

I risultati mettono in evidenza il ruolo della LAC come possibile farmaco antidepressivo ad azione rapida e duratura, contrariamente alla latenza clinica degli antidepressivi convenzionali. Il forte effetto sulla proliferazione neuronale potrebbe spiegare la breve latenza clinica del farmaco, aumentandone o accelerandone in qualche modo la risposta antidepressiva. Inoltre, la LAC ha un forte impatto epigenetico ed un possibile meccanismo d'azione del farmaco si potrebbe basare in parte sull'induzione del recettore mGlu2.

A questo punto, abbiamo voluto studiare un possibile meccanismo alla base del rapido e duraturo effetto antidepressivo della LAC concentrandoci sui recettori metabotropici mGlu2. I ratti FSL come dimostrato in letteratura, mostrano una riduzione di base dell'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale e l'attivazione farmacologica con l'agonista ortosterico dei recettori mGlu2/3 (LY379268) riduce la latenza temporale della clomipramina come mostrato dalla ridotta immobilità al test del nuoto forzato. In questo studio, abbiamo dimostrato che l'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale era pienamente revertita dal trattamento cronico con LAC (Fig.5). Questo effetto è "disease-dependent" poichè la LAC non mostra alcuna variazione nell'espressione del recettore mGlu2 negli animali di controllo. In modo simile a quanto osservato nel dolore cronico, il trattamento con LAC aumentava il livello di acetilazione della proteina NF-kB/p65 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale. Ciò potrebbe essere correlato alla riduzione del recettore mGlu2 che nella regione del suo promotore genico ha diversi elementi di risposta all'NF-kB. Inoltre, abbiamo voluto vedere se vi potesse essere un possibile link tra depressione maggiore e fattori epigenetici e, interessantiemente, il trattamento con LAC aumento l'acetilazione dell'istone H3 a livello del promotore del gene mGlu2 sebbene questo effetto sia più evidente nella corteccia che nell'ippocampo (Fig.6). Per esaminare se l'induzione del recettore mGlu2 possa essere correlate all'effetto antidepressivo della LAC, i ratti FSL trattati per 21 giorni con LAC hanno ricevuto una singola somministrazione dell'antagonista del recettore mGlu2/3, LY341495 (1mg/kg i.p.) o salina e sono stati testati al test del

nuoto forzato 45 minuti dopo. Una singola somministrazione di LY341495 era sufficiente nel ridurre ampiamente l'effetto antidepressivo della LAC (Fig.7). LY341495 non mostrava alcun effetto negli animali FSL che non erano stati trattati con LAC e non induceva cambiamenti nell'attività locomotoria.

A questo punto, nota la rapidità della risposta antidepressiva che si manifestava già nel trattamento subcronico dopo soli tre giorni di somministrazione, abbiamo valutato tramite western blot una possibile rapida induzione del recettore mGlu2, la cui espressione sorprendentemente mostrava un rapido incremento parallelo al tempo di insorgenza della risposta antidepressiva (Fig.8), spingendoci ad ipotizzare un sempre maggiore coinvolgimento del sottotipo recettoriale nella risposta antidepressiva del farmaco. Per approfondire ciò, per confermare la rilevanza del recettore mGlu2 nell'effetto antidepressivo del farmaco, abbiamo fatto ricorso ad un modello murino mancante del recettore mGlu2 (mGlu2^{-/-}). Inizialmente, abbiamo sottoposto i topi mGlu2^{-/-} al paradigma dell' unpredictable chronic stress, osservando una più rapida insorgenza del fenotipo depressivo in questi animali rispetto al ceppo wild-type e, successivamente, in seguito a 14 giorni di somministrazioni del farmaco, i topi mGlu2^{-/-} non mostravano alcuna riduzione del tempo di immobilità al Forced Swim Test contrariamente al ceppo wild-type (Fig.9). Quest'importante evidenza sperimentale ci porta ad affermare un chiaro e netto coinvolgimento dei recettori mGlu2 nell'azione antidepressiva del farmaco.

A nostro parere, una così tale rapida azione antidepressiva della LAC, può essere dovuta ad una azione epigenetica del farmaco come evidenziato dai risultati ottenuti

durante il precedente anno sui livelli di acetilazione dell'istone H3K27 legato al promotore del recettore mGlu2 e per approfondire questo link “Epigenetica-depressione” abbiamo utilizzato l'MS275, un inibitore degli enzimi HDAC di classe prima, responsabili dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche. In modo analogo alla LAC, l'MS275 induce un incremento nell'espressione del recettore mGlu2 nella corteccia, ma non nell'ippocampo (Fig.10). Inoltre, abbiamo voluto valutare anche i livelli di acetilazione dell'istone H3K27 legato al promotore del gene per il BDNF, i quali mostravano una riduzione sia nell'ippocampo che nella corteccia e tale riduzione veniva ripristinata dal trattamento con il farmaco antidepressivo, sottolineando il forte potere acetilante della LAC (Fig.11).

Tali risultati mettono in evidenza il ruolo della LAC come possibile farmaco antidepressivo ad azione rapida e duratura, contrariamente alla latenza clinica degli antidepressivi convenzionali. Il forte effetto sulla proliferazione neuronale potrebbe spiegare la breve latenza clinica del farmaco, aumentandone o accelerandone in qualche modo la risposta antidepressiva. Inoltre, la LAC ha un forte impatto epigenetico ed un possibile meccanismo d'azione del farmaco si può basare in parte sull'induzione del recettore mGlu2. Un ulteriore meccanismo d'azione del farmaco vede il coinvolgimento dell' NFkB, il cui principale membro, la proteina p65 risulta essere fortemente acetilata sia nell'ippocampo che nella corteccia prefrontale dei ratti con FSL, ma non negli FRL, in seguito al trattamento con il farmaco; suggerendo un parziale coinvolgimento dell'NFkB nell'induzione del recettore mGlu2 dato che tale sottotipo recettoriale, contrariamente al recettore cognato mGlu3 ospita nella regione

del promotore numerosi elementi di risposta all'NFkB. Per approfondire tale ipotesi, ovvero se l'aumentata acetilazione della p65/NFkB potesse essere in parte responsabile dell'induzione del recettore mGlu2 in seguito al trattamento con il farmaco, abbiamo trattato i ratti FSL ed i loro controlli FRL con il salicato di sodio, un inibitore dell'NFkB (Fig.12). Tale trattamento preveniva l'incremento nell'espressione del recettore mGlu2 dovuta al trattamento con la LAC nella corteccia e nell'ippocampo dei ratti FSL.

Tuttociò apre nuove vie verso lo sviluppo di farmaci antidepressivi ad azione rapida e duratura e sottolinea l'importanza e la necessità di esaminare l'ipotesi epigenetica del disturbo depressivo maggiore nell'uomo.

A questo punto, abbiamo voluto studiare un possibile meccanismo alla base del rapido e duraturo effetto antidepressivo della LAC concentrandoci sui recettori metabotropici mGlu2. I ratti FSL come dimostrato in letteratura, mostrano una riduzione di base dell'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale e l'attivazione farmacologica con l'agonista ortosterico dei recettori mGlu2/3 (LY379268) riduce la latenza temporale della clomipramina come mostrato dalla ridotta immobilità al test del nuoto forzato. In questo studio, abbiamo dimostrato che l'espressione del recettore mGlu2 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale era pienamente revertita dal trattamento cronico con LAC (Fig.5). Questo effetto è "disease-dependent" poichè la LAC non mostra alcuna variazione nell'espressione del recettore mGlu2 negli animali di controllo. In modo simile a quanto osservato nel dolore cronico, il trattamento con LAC aumentava il livello di acetilazione della

proteina NF-kB/p65 nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale. Ciò potrebbe essere correlato alla riduzione del recettore mGlu2 che nella regione del suo promotore genico ha diversi elementi di risposta all'NF-kB. Inoltre, abbiamo voluto vedere se vi potesse essere un possibile link tra depressione maggiore e fattori epigenetici e, interessante, il trattamento con LAC aumento l'acetilazione dell'istone H3 a livello del promotore del gene mGlu2 sebbene questo effetto sia più evidente nella corteccia che nell'ippocampo (Fig.6). Per esaminare se l'induzione del recettore mGlu2 possa essere correlate all'effetto antidepressivo della LAC, i ratti FSL trattati per 21 giorni con LAC hanno ricevuto una singola somministrazione dell'antagonista del recettore mGlu2/3, LY341495 (1mg/kg i.p.) o salina e sono stati testati al test del nuoto forzato 45 minuti dopo. Una singola somministrazione di LY341495 era sufficient nel ridurre ampiamente l'effetto antidepressivo della LAC (Fig.7). LY341495 non mostrava alcun effetto negli animali FSL che non erano stati trattati con LAC e non induceva cambiamenti nell'attività locomotoria.

A questo punto, nota la rapidità della risposta antidepressiva che si manifestava già nel trattamento subcronico dopo soli tre giorni di somministrazione, abbiamo valutato tramite western blot una possibile rapida induzione del recettore mGlu2, la cui espressione sorprendentemente mostrava un rapido incremento parallelo al tempo di insorgenza della risposta antidepressiva (Fig.8), spingendoci ad ipotizzare un sempre maggiore coinvolgimento del sottotipo recettoriale nella risposta antidepressiva del farmaco. Per approfondire ciò, per confermare la rilevanza del recettore mGlu2 nell'effetto antidepressivo del farmaco, abbiamo fatto ricorso ad un modello murino

mancante del recettore mGlu2 (mGlu2^{-/-}). Inizialmente, abbiamo sottoposto i topi mGlu^{-/-} al paradigma dell' unpredictable chronic stress, osservando una più rapida insorgenza del fenotipo depressivo in questi animali rispetto al ceppo wild-type e, successivamente, in seguito a 14 giorni di somministrazioni del farmaco, i topi mGlu2^{-/-} non mostravano alcuna riduzione del tempo di immobilità al Forced Swim Test contrariamente al ceppo wild-type (Fig.9). Quest'importante evidenza sperimentale ci porta ad affermare un chiaro e netto coinvolgimento dei recettori mGlu2 nell'azione antidepressiva del farmaco.

A nostro parere, una così tale rapida azione antidepressiva della LAC, può essere dovuta ad una azione epigenetica del farmaco come evidenziato dai risultati ottenuti durante il precedente anno sui livelli di acetilazione dell'istone H3K27 legato al promotore del recettore mGlu2 e per approfondire questo link "Epigenetica-depressione" abbiamo utilizzato l'MS275, un inibitore degli enzimi HDAC di classe prima, responsabili dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche. In modo analogo alla LAC, l'MS275 induce un incremento nell'espressione del recettore mGlu2 nella corteccia, ma non nell'ippocampo (Fig.10). Inoltre, abbiamo voluto valutare anche i livelli di acetilazione dell'istone H3K27 legato al promotore del gene per il BDNF, i quali mostravano una riduzione sia nell'ippocampo che nella corteccia e tale riduzione veniva ripristinata dal trattamento con il farmaco antidepressivo, sottolineando il forte potere acetilante della LAC (Fig.11).

Tali risultati mettono in evidenza il ruolo della LAC come possibile farmaco antidepressivo ad azione rapida e duratura, contrariamente alla latenza clinica degli

antidepressivi convenzionali. Il forte effetto sulla proliferazione neuronale potrebbe spiegare la breve latenza clinica del farmaco, aumentandone o accelerandone in qualche modo la risposta antidepressiva. Inoltre, la LAC ha un forte impatto epigenetico ed un possibile meccanismo d'azione del farmaco si può basare in parte sull'induzione del recettore mGlu2. Un ulteriore meccanismo d'azione del farmaco vede il coinvolgimento dell' NFkB, il cui principale membro, la proteina p65 risulta essere fortemente acetilata sia nell'ippocampo che nella corteccia prefrontale dei ratti con FSL, ma non negli FRL, in seguito al trattamento con il farmaco; suggerendo un parziale coinvolgimento dell'NFkB nell'induzione del recettore mGlu2 dato che tale sottotipo recettoriale, contrariamente al recettore cognato mGlu3 ospita nella regione del promotore numerosi elementi di risposta all'NFkB. Per approfondire tale ipotesi, ovvero se l'aumentata acetilazione della p65/NFkB potesse essere in parte responsabile dell'induzione del recettore mGlu2 in seguito al trattamento con il farmaco, abbiamo trattato i ratti FSL ed i loro controlli FRL con il salicato di sodio, un inibitore dell'NFkB (Fig.12). Tale trattamento preveniva l'incremento nell'espressione del recettore mGlu2 dovuta al trattamento con la LAC nella corteccia e nell'ippocampo dei ratti FSL.

Tuttociò apre nuove vie verso lo sviluppo di farmaci antidepressivi ad azione rapida e duratura e sottolinea l'importanza e la necessità di esaminare l'ipotesi epigenetica del disturbo depressivo maggiore nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
2. Folstein S. Twin and adoption studies in child and adolescent psychiatric disorders. *Curr Opin Pediatr* 1996;8(4):339–347. [PubMed: 8954264]
3. Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E. Dynamic translational and proteosomal regulation o fragile X mental retardation protein controls mGluR–dependent long–term depression. *Neuron*, 2006; 51(4):441–54
4. Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol*. 2007; 64(7):945-950
5. Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *PNAS USA*, 2002; 99:7746–7750
6. Huber KM, Kayser MS, Bear MF. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR–dependent LTD. *Science*, 2000; :1254–1257
7. Chamberlain SJ, Lalande M. Angelman syndrome, a genomic imprinting disorder of the brain. *J Neurosci* 2010; Jul 28;30(30):9958-63
8. Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010 Aug 15;154C(3):365-76
9. Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting

disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 27

10. Jiang YH, Pan Y, Zhu L, Landa L, Yoo J, Spencer C, Lorenzo I, Brilliant M, Noebels J, Beaudet AL. Altered ultrasonic vocalization and impaired learning and memory in Angelman syndrome mouse model with a large maternal deletion from Ube3a to Gabrb3. PLoS One. 2010 Aug 20;5(8)
11. Sharp AJ, Migliavacca E, Dupre Y, Stathaki E, Sailani MR, Baumer A, Schinzel A, Mackay DJ, Robinson DO, Cobellis G, Cobellis L, Brunner HG, Steiner B, Antonarakis SE. Methylation profiling in individuals with uniparental disomy identifies novel differentially methylated regions on chromosome 15. Genome Res. 2010 Sep;20(9):1271-8. Epub 2010 Jul 14
12. Bajkowska, M., P. Branski, et al. (1999). "Effect of chronic antidepressant or electroconvulsive shock treatment on mGluR1a immunoreactivity expression in the rat hippocampus." Pol J Pharmacol 51(6): 539-541.
13. Bondi, C. O., G. Rodriguez, et al. (2008). "Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment." Neuropsychopharmacology 33(2): 320-331.
14. Chiechio, S., A. Caricasole, et al. (2002). "L-Acetylcarnitine induces analgesia by selectively up-regulating mGlu2 metabotropic glutamate receptors." Mol Pharmacol 61(5): 989-996.

15. Chiechio, S., A. Copani, et al. (2010). "Transcriptional regulation of type-2 metabotropic glutamate receptors: an epigenetic path to novel treatments for chronic pain." *Trends Pharmacol Sci* 31(4): 153-160.
16. Chiechio, S., M. Zammataro, et al. (2009). "Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain." *Mol Pharmacol* 75(5): 1014-1020.
17. Chopra (2011). "Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences" *Psychopharmacology* 214: 819-828.
18. Copani, A., G. Casabona, et al. (1998). "The metabotropic glutamate receptor mGlu5 controls the onset of developmental apoptosis in cultured cerebellar neurons." *Eur J Neurosci* 10(6): 2173-2184.
19. Covington, H. E., 3rd, I. Maze, et al. (2009). "Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors." *J Neurosci* 29(37): 11451-11460.
20. De Simone, R., M. T. Ramacci, et al. (1991). "Effect of acetyl-L-carnitine on forebrain cholinergic neurons of developing rats." *Int J Dev Neurosci* 9(1): 39-46.
21. Drevets, W. C., J. L. Price, et al. (1997). "Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders." *Nature* 386(6627): 824-827.
22. Gerber, G., J. Zhong, et al. (2000). "Group II and group III metabotropic glutamate receptor agonists depress synaptic transmission in the rat spinal cord dorsal horn." *Neuroscience* 100(2): 393-406.

- 23.Grayson, D. R., M. Kundakovic, et al. (2010). "Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders?" *Mol Pharmacol* 77(2): 126-135.
- 24.Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, et al. (2009). "Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress." *Behav Brain Res* 202(2): 245-251.
- 25.Imperato, A., M. T. Ramacci, et al. (1989). "Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats." *Neurosci Lett* 107(1-3): 251-255.
- 26.Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(24): 9104-9110.
- 27.Matrisciano, F., A. Caruso, et al. (2008). "Defective group-II metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of spontaneously depressed rats." *Neuropharmacology* 55(4): 525-531.
- 28.McEwen, B. S. (1999). "Stress and hippocampal plasticity." *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122.
- 29.Nestler, E. J. (2008). "The molecular neurobiology of depression." *Nature* 455: 894-902.
- 30.Nestler, E. J. and S. E. Hyman (2010). "Animal models of neuropsychiatric disorders." *Nat Neurosci* 13(10): 1161-1169.

31. Nicoletti, F., J. L. Meek, et al. (1986). "Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus." *J Neurochem* 46(1): 40-46.
32. Overstreet, D. H. (1993). "The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression." *Neurosci Biobehav Rev* 17(1): 51-68.
33. Overstreet, D. H., E. Friedman, et al. (2005). "The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression." *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 739-759.
34. Pittaluga, A., L. Barbeito, et al. (1988). "Depolarization-evoked release of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate from rat brain synaptosomes." *Eur J Pharmacol* 158(3): 263-266.
35. Porsolt, R. D., A. Bertin, et al. (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229(2): 327-336.
36. Sanacora, G., R. M. Berman, et al. (2004). "Addition of the alpha2-antagonist yohimbine to fluoxetine: effects on rate of antidepressant response." *Neuropsychopharmacology* 29(6): 1166-1171.
37. Schoepp, D. D., D. E. Jane, et al. (1999). "Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors." *Neuropharmacology* 38(10): 1431-1476.
38. Shinozaki, H. and M. Ishida (1992). "A metabotropic L-glutamate receptor agonist: pharmacological difference between rat central neurones and crayfish neuromuscular junctions." *Comp Biochem Physiol C* 103(1): 13-17.

39. Surget, A., M. Saxe, et al. (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biol Psychiatry* 64(4): 293-301.
40. Tagliamonte, G., D. Navarra, et al. (1994). "Acetyl-L-carnitine treatment increases nerve growth factor levels and choline acetyltransferase activity in the central nervous system of aged rats." *Exp Gerontol* 29(1): 55-66.
41. Tanabe, Y., M. Masu, et al. (1992). "A family of metabotropic glutamate receptors." *Neuron* 8(1): 169-179.
42. Tsankova, N., W. Renthal, et al. (2007). "Epigenetic regulation in psychiatric disorders." *Nat Rev Neurosci* 8(5): 355-367.
43. Walker, K., M. Bowes, et al. (2001). "Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain." *Neuropharmacology* 40(1): 1-9.
44. Willner, P. (1997). "Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation." *Psychopharmacology (Berl)* 134(4): 319-329.
45. Zanardi, R. and E. Smeraldi (2006). "A double-blind, randomised, controlled clinical trial of acetyl-L-carnitine vs. amisulpride in the treatment of dysthymia." *Eur Neuropsychopharmacol* 16(4): 281-287.
46. Zanelli, S. A., N. J. Solenski, et al. (2005). "Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine." *Ann N Y Acad Sci* 1053: 153-161.

