



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
Dottorato di Ricerca in “Scienze Biomediche Applicate” (XXIV Ciclo)  
Coordinatore: *Prof. Agostino Palmeri*

---

**DOTT. DARIO FURNARI**

**Ruolo del peptide beta-amiloide nei fenomeni di  
plasticità sinaptica e memoria nell'ippocampo di topo**

**TESI DI DOTTORATO**

**Relatore:** *Chiar.ma Prof. Daniela Puzzo*

---

A.A. 2011-2012

## Indice generale

Cap. 1 - APPRENDIMENTO E MEMORIA.....	3
1.1 Introduzione.....	3
1.2 Tipologie di apprendimento.....	6
1.2.1 Apprendimento non associativo.....	7
1.2.2 Apprendimento associativo.....	7
1.2.3 Condizionamento Pavloviano .....	8
1.2.4 Condizionamento strumentale.....	12
1.2.5 Apprendimento motorio.....	14
1.2.6 Apprendimento relazionale .....	15
1.3 Meccanismi responsabili dell'apprendimento.....	16
Cap. 2 – MEMORIA E PLASTICITA' SINAPTICA.....	17
2.1 Introduzione.....	17
2.2 La memoria.....	18
2.3 Tipologie di memoria.....	20
2.3.1 Classificazione in base a un criterio temporale.....	20
2.3.2 Classificazione in base ad un criterio qualitativo.....	22
Cap. 3 - STRUTTURE ANATOMICHE.....	26
3.1 Corteccia frontale.....	26
3.1.1 Corteccia prefrontale.....	27
3.1.2 Corteccia motoria.....	28
3.2 Corteccia visiva.....	29
3.3 Lobo temporale mediale.....	30
3.3.1 Ippocampo.....	30
3.3.2 Morris Water Maze .....	38
3.3.3 Place cells.....	42
3.3.4 Amigdala.....	43
3.4 Diencefalo.....	47
3.5 Gangli della base.....	48
3.6 Cervelletto .....	49
Cap. 4 – IL PEPTIDE BETA-AMILOIDE.....	50
4.1 Ruolo del peptide amiloide nella Malattia di Alzheimer.....	50
4.1.1 Clivaggio dell'APP.....	52
4.1.2 Le varie forme di A $\beta$ .....	55
4.2 Ruolo ormetico del peptide beta-amiloide .....	56
4.2.1 Riassunto.....	56
4.2.2 Introduzione.....	57
4.2.3 Metodi .....	60
4.2.4 Risultati.....	63
4.2.5 Discussione.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	76

# Cap. 1 - APPRENDIMENTO E MEMORIA

## 1.1 Introduzione

*Bisogna cominciare a perdere la memoria, anche solo ogni tanto, per comprendere che la memoria è ciò che riempie la nostra vita. La vita senza memoria non è vita. La nostra memoria è la nostra coerenza, la nostra ragione, il nostro sentimento, persino la nostra azione. Senza di lei non siamo niente.*

**Luis Bunuel**



La memoria è un meccanismo meraviglioso, un mezzo per trasportarci indietro nel tempo. Possiamo tornare indietro di un momento, o di gran parte della vita. A volte non perfetta, a volte non autentica, a volte con dettagli sfumati, la memoria è comunque il sistema che ci permette di richiamare alla mente le informazioni che abbiamo immagazzinato e appreso dall'ambiente sia esterno che interno. È l'esperienza che ci cambia, il contatto con l'ambiente che modifica il nostro comportamento mediante una serie di cambiamenti sia strutturali che funzionali del nostro sistema nervoso. L'ultima sfida delle neuroscienze è proprio quella di comprendere

meglio la complessità di questi meccanismi e di come si possano verificare fenomeni complessi quali l'apprendimento e la memoria.

Sebbene i cambiamenti che avvengono all'interno delle singole cellule del cervello possano essere relativamente semplici, considerato che il cervello è formato da molti miliardi di neuroni, il fenomeno complessivo è sicuramente molto complesso e rende l'isolamento e l'identificazione dei cambiamenti specifici responsabili di un determinato ricordo veramente difficile. Analogamente, sebbene gli elementi di uno specifico compito d'apprendimento possano essere semplici, le sue implicazioni per l'organismo possono risultare molto complesse (Carlson, 2002).

Dal punto di vista neurobiologico, apprendimento e memoria sono adattamenti all'ambiente dei circuiti cerebrali che ci permettono di rispondere in modo appropriato a situazioni di cui abbiamo avuto precedentemente esperienza. Quindi, l'apprendimento (processo attraverso il quale il sistema nervoso acquisisce nuove informazioni ed esperienze) e la memoria (facoltà di trattenere, conservare e rievocare tali informazioni) rappresentano i meccanismi principali attraverso cui gli eventi ambientali plasmano il comportamento. Le esperienze non sono semplicemente "accumulate" nel cervello, bensì sono in grado di provocare modificazioni plastiche nel nostro sistema nervoso e di alterare i circuiti coinvolti nelle nostre funzioni più sofisticate; in questo modo esse cambiano il nostro modo di agire, pensare, percepire, pianificare.

Benché apprendimento e memoria siano due funzioni strettamente correlate, esse hanno alla base sequenze temporali e meccanismi nervosi che non sempre coincidono. Dal punto di viste neurofisiologico, infatti, il processo di apprendimento è essenzialmente funzionale, affidato cioè a dei circuiti riverberanti e a modificazioni morfologiche non stabili, mentre il processo della memoria è strutturale e presuppone modificazioni morfologiche stabili. Tali cambiamenti sono accompagnati da un aumento della sintesi proteica e consistono in un aumento del numero e del volume delle spine dendritiche (Gasbarri e Tomaz, 2005).

L'importanza di capire i meccanismi che stanno alla base del processo della memoria, e la speranza di poter intervenire quando questi sono danneggiati, è pertanto facilmente intuibile: da essi dipendono la qualità della vita e la sopravvivenza stessa dell'individuo. Questo tipo di considerazioni contribuisce a rendere particolarmente attivo il campo della ricerca sui meccanismi sottesi alla memoria. Molti di questi studi vengono effettuati su modelli animali, ma ci si domanda quanto tali studi siano predittivi della realtà umana sia in termini di neurobiologia della memoria (si pensi ad esempio al differente e più esteso sviluppo della corteccia nell'uomo), sia riguardo l'effetto di farmaci di potenziale impiego terapeutico nei disturbi della memoria. Alcuni tipi di memoria, comunque, hanno caratteristiche comuni nell'animale e nell'uomo, e i modelli animali rendono più agevole lo studio di forme semplici di apprendimento e memoria - come ad esempio il riflesso di ammiccamento condizionato - che nell'uomo sono del tutto

simili a quelle studiate in piccoli mammiferi. Inoltre, lo studio preliminare sull'animale consente molto spesso di salvaguardare migliaia di vite umane ed evitare, ad esempio, la sperimentazione di farmaci sull'uomo *ex abrupto*.

## **1.2 Tipologie di apprendimento**

L'apprendimento è il processo mediante il quale le esperienze modificano il nostro sistema nervoso e quindi il nostro comportamento. La funzione primaria della capacità di apprendere è quella di sviluppare comportamenti adatti ad un ambiente in continuo mutamento. Le esperienze sono in grado di modificare il modo con cui percepiamo, agiamo, pensiamo e pianifichiamo. La capacità del nostro sistema nervoso di modificarsi in relazione all'esperienza è detta plasticità sinaptica e consiste in un cambiamento sia strutturale che funzionale delle strutture nervose che si riflette in modificazioni dei processi di percezione, memoria, pensiero, pianificazione ed azione.

I fenomeni di apprendimento possono essere distinti in:

*Apprendimento non associativo:* abitudine e sensibilizzazione

*Apprendimento associativo:* apprendimento percettivo, apprendimento stimolo risposta (condizionamento classico/Pavloviano), condizionamento strumentale/operante per prova ed errori, apprendimento motorio, apprendimento relazionale.

### **1.2.1 Apprendimento non associativo**

L'apprendimento non associativo si ottiene quando l'organismo viene esposto ad un unico tipo di stimolo. Le forme più comuni di apprendimento non associativo sono: l'abitudine, la disabitudine, la sensibilizzazione.

*L'abitudine* consiste nella riduzione di una risposta in seguito alla presentazione ripetuta di uno stimolo considerato non nocivo; *la disabitudine* è il ripristino o il recupero di una data risposta dopo la presentazione di un altro stimolo più o meno intenso; *la sensibilizzazione* è l'aumento della risposta conseguente alla presentazione di uno stimolo intenso e doloroso; la sensibilizzazione fa scomparire gli effetti dell'abitudine.

### **1.2.2 Apprendimento associativo**

Questo tipo di apprendimento implica lo stabilirsi di rapporti tra più eventi, tra due o più stimoli, tra stimolo e risposta o tra risposta ed evento successivo. Esso, come detto precedentemente, consta di diversi sottotipi di apprendimento: apprendimento percettivo, apprendimento stimolo-risposta (condizionamento classico, strumentale ed apprendimento motorio), apprendimento relazionale.

*L'apprendimento percettivo* è la capacità di imparare a riconoscere stimoli che non stati percepiti in precedenza e dipende dallo stabilirsi di cambiamenti all'interno dei sistemi sensoriali del cervello. Questo tipo di apprendimento dipende dai nostri sistemi sensoriali che ci fanno riconoscere

oggetti dall'aspetto, dal suono che producono, da come si percepiscono al tatto o dall'odore che emanano. L'apprendimento percettivo coinvolge le *corteccie associative sensoriale, visiva, uditiva*, ed ha come principale funzione quella di permetterci di identificare, categorizzare, riconoscere oggetti, animali, esseri umani e situazioni in modo da imparare come comportarci nei loro confronti, visto che il trarre profitto dall'esperienza è lo scopo principale dell'apprendimento. Un altro aspetto di questo tipo di apprendimento è imparare che stimoli particolari sono presenti solo in determinate situazioni o contesti.

*L'apprendimento stimolo-risposta* consiste nella capacità di imparare a mettere in atto un determinato comportamento in presenza di uno specifico stimolo. Esso richiede il consolidamento di connessioni tra circuiti coinvolti nella percezione e circuiti implicati nel movimento. Il comportamento può consistere in una risposta automatica o in una complicata sequenza di movimenti già appresi. Dell'apprendimento stimolo-risposta fanno parte il condizionamento classico o Pavloviano; il condizionamento strumentale, operante o per prove ed errori; l'apprendimento motorio; l'apprendimento relazionale.

### **1.2.3 Condizionamento Pavloviano**

Il *condizionamento classico o Pavloviano* è una forma di apprendimento in cui uno stimolo neutro acquisisce le proprietà di uno stimolo rilevante; esso implica l'associazione tra due stimoli, di cui quello neutro, quindi con effetto

trascurabile in precedenza, diventa in grado di provocare/evocare un comportamento specie-specifico di tipo riflesso. Fu il fisiologo Ivan Petrovich Pavlov ad introdurre il condizionamento classico nello studio del comportamento. Egli formulò l'ipotesi che l'apprendimento avviene per associazione e per verificare ciò, eseguì una serie di esperimenti nel corso dei quali, cambiando gli stimoli, il tempo della loro applicazione, il loro numero, mise a punto una procedura sperimentale da cui era possibile ottenere una serie di inferenze razionali circa i rapporti che intercorrono tra ambiente e modificazioni del comportamento.

In sostanza, l'essenza di questo tipo di condizionamento risiede nell'accoppiamento di due stimoli: lo stimolo incondizionato (SI) e quello condizionato (SC). Lo *stimolo incondizionato*, come ad esempio il cibo, determina di una risposta come la salivazione detta *risposta incondizionata* in quanto è innata e si manifesta senza alcun tipo di apprendimento. Lo *stimolo condizionato*, come ad esempio un suono, non evoca fisiologicamente la medesima risposta e quindi necessità di allenamento.

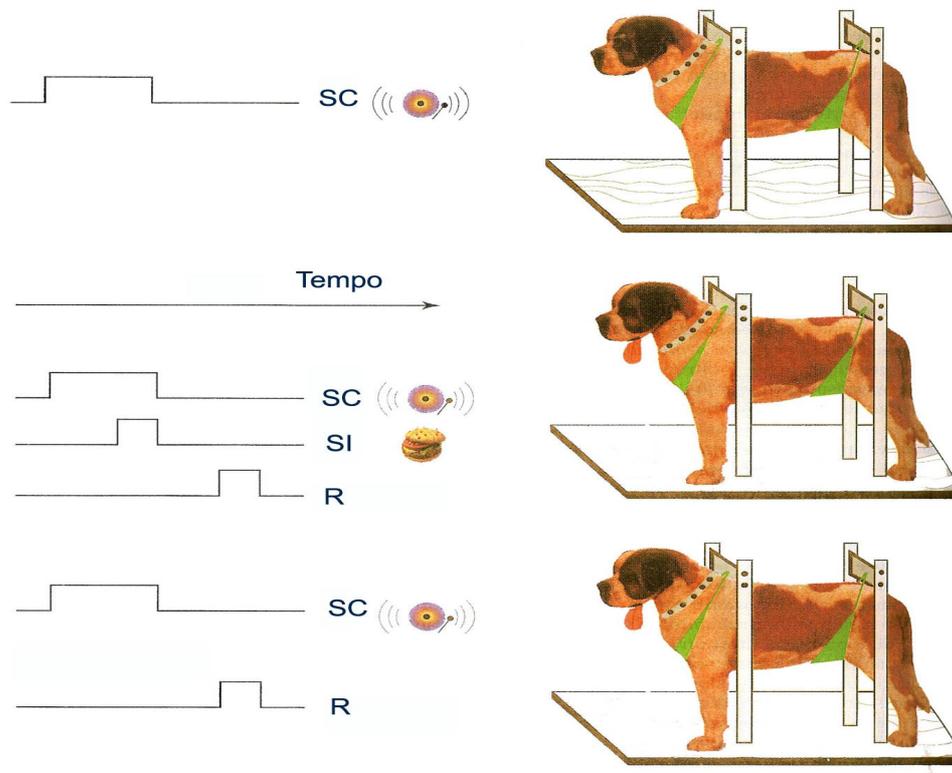
Se per diverse volte lo SI viene presentato subito dopo lo SC, l'appaiamento ripetuto dei due stimoli evoca la cosiddetta *risposta condizionata*, così denominata perché appresa in relazione allo stimolo condizionato. Dopo una serie di prove in cui lo stimolo condizionato viene accoppiato in maniera costante a quello incondizionato, lo stimolo condizionato assume il significato di segnale anticipatorio, che fa prevedere la comparsa dello stimolo incondizionato. Per esempio, se il suono di un campanello viene

ripetutamente fatto seguire dalla presentazione di un piatto di carne, il solo stimolo uditivo provocherà abbondante secrezione salivare (Gasbarri e Tomaz, 2005). Le variabili importanti per l'instaurarsi del condizionamento classico sono: l'ordine temporale, in quanto lo stimolo SC deve precedere lo SI, l'intervallo di tempo tra l'inizio di SC e SI e la contiguità di SC e SI. Se lo stimolo condizionato viene presentato ripetutamente in assenza dello stimolo incondizionato, le risposte condizionate diminuiscono di intensità o hanno una minore probabilità di manifestarsi. Ad esempio, se uno stimolo uditivo (suono), che è stato accoppiato con uno gustativo (cibo), viene presentato ripetutamente senza che venga più offerto il cibo, gradualmente smetterà di indurre secrezione salivare. Tale processo, chiamato *estinzione*, è un importante meccanismo adattivo, in quanto la continua risposta a stimoli ambientali che non hanno più significato non suscita più interesse per gli animali; quindi l'estinzione non è un processo passivo ma è l'apprendimento di nuove informazioni, in quanto l'animale non solo apprende che stimolo condizionato non precede più quello incondizionato, ma anche che la presentazione dello stimolo condizionato contiene l'informazione che quello incondizionato non comparirà.

Nel 1968, ulteriori studi ad opera di Leon kamin, Robert Rescorla e Alan Wagner, posero l'enfasi sul fatto che, oltre a dipendere dalla contiguità temporale, il condizionamento classico si sviluppa meglio quando è presente anche un nesso di causalità fra lo SC e lo SI; quindi non più la semplice contiguità tra i due stimoli ma l'informazione che si scambiano i due stimoli.

Il condizionamento viene detto *appetitivo*, se lo stimolo incondizionato è costituito da una ricompensa, come il cibo; al contrario si parla di *condizionamento avversivo/difensivo/da paura*, se lo stimolo è nocivo.

Il condizionamento classico alla paura consiste nell'accoppiamento ripetuto di uno stimolo emotivamente neutro con un evento avversivo che evoca risposte fisiologiche comportamentali le quali, dopo numerose prove di condizionamento, saranno evocate dallo stimolo condizionato stesso. Tale tipo di condizionamento è alla base del cosiddetto *fear conditioning*, test comportamentale che consente di testare la memoria contestuale ed emotiva nei modelli animali: all'animale viene presentato un suono seguito da una debole scossa elettrica. Dopo ripetuti accoppiamenti tono-scossa, il tono acquista proprietà avversive ed inizia ad evocare una serie di risposte fisiologiche caratteristiche della paura, come l'immobilità (*freezing*), risposte autonome come l'aumento della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna, risposte endocrine come il rilascio di ormoni dello stress.



**Figura 1 - Condizionamento classico pavloviano.** Nella procedura introdotta da Pavlov, la produzione di saliva è continuamente controllata. La salivazione è indotta dalla presentazione di carne in polvere, ma inizialmente non da una presentazione di uno stimolo neutro come una campanella. Accoppiando ripetutamente la campanella alla carne in polvere, l'animale apprende che la campanella annuncia il cibo ed inizia a salivare in risposta alla presentazione del solo suono della campanella (da Zigmond et al., 2002).

### 1.2.4 Condizionamento strumentale

Il *condizionamento strumentale, operante o per prove ed errori* è una forma di apprendimento associativo che richiede la formazione di un rapporto di previsione fra uno stimolo ed una risposta. È un'altra forma di apprendimento associativo studiata a fondo da B. E. Skinner, intorno alla metà del '900. Mentre nel condizionamento classico vi è una relazione di consequenzialità tra due stimoli, il condizionamento operante richiede la

formazione di un rapporto di previsione fra uno stimolo ed una risposta; cioè il soggetto o l'animale può controllare il verificarsi dello SI regolando il proprio comportamento sulla base delle conseguenze che ne derivano, così da trarne vantaggio in modo di ottenere una ricompensa o sfuggire ad una punizione. Pertanto, quando ad un determinato comportamento (*operante*), seguono conseguenze favorevoli (*rinforzo*) come una ricompensa o l'allontanamento da uno stimolo nocivo, quel comportamento tende ad essere messo in atto più frequentemente; al contrario se le conseguenze non sono favorevoli si ha una punizione e quindi quel comportamento non verrà tanto attivato. Questo è quello che gli studiosi chiamano *legge degli effetti*, ed è alla base dei comportamenti volontari.

Un esempio tipico di condizionamento operante si ha introducendo un ratto affamato in una gabbia dove vi è collocata una leva; se premendo quest'ultima l'animale riceverà cibo, la frequenza successiva con cui premerà la leva stessa tenderà ad aumentare rispetto ad una frequenza spontanea. L'animale ha quindi appreso che un certo tipo di azione, fra le tante che potrebbe fare, è seguita da una somministrazione di cibo (ricompensa). Questo rinforzo rende più forte la connessione tra circuiti neurali implicati nella percezione (la visione della leva) e quelli coinvolti nel movimento (l'atto di premere la leva).

I due condizionamenti, classico e operante, possono sembrare diversi ma in realtà si esplicano con meccanismi nervosi simili; infatti i rapporti di previsione hanno uguale importanza. Mentre nel condizionamento classico



motori. Cioè, questa forma di apprendimento, come l'apprendimento di un gesto sportivo, non può avvenire in assenza di una guida sensoriale dall'ambiente e quindi necessita di un controllo a feedback da parte di muscoli, articolazioni, apparato vestibolare, etc.

### **1.2.6 Apprendimento relazionale**

Questo tipo di apprendimento implica l'apprendimento delle relazioni tra singoli stimoli e richiede diverse connessioni tra diverse aree della corteccia associativa; ad esempio se sentiamo un gatto miagolare, possiamo immaginare le caratteristiche fisiche e le sensazioni tattili che proveremo nell'accarezzarlo, quindi vi è un'interconnessione tra i circuiti nervosi della corteccia associativa uditiva e quelli della corteccia associativa visiva e somato-sensoriale. Altre forme di apprendimento relazionale sono: l'apprendimento spaziale, cioè la percezione della localizzazione spaziale; l'apprendimento di eventi/episodi, cioè episodi che abbiamo vissuto che implicano non soltanto l'apprendimento di singoli stimoli, ma anche in quale ordine si presentano; l'apprendimento per imitazione, cioè la relazione tra i nostri movimenti e quelli di altre persone.

### ***1.3 Meccanismi responsabili dell'apprendimento***

Anche se la comprensione dei meccanismi responsabili dell'apprendimento e di altre modificazioni plastiche che hanno luogo nell'encefalo dell'adulto attualmente rimane oggetto di dibattito, esiste ampio consenso sul concetto che alla base di questi fenomeni vi siano modificazioni finemente regolate dalla forza delle sinapsi (Madison et al., 1991).

Mentre nello sviluppo, le modificazioni si basano sulla riorganizzazione dei collegamenti già esistenti tra le cellule, la forza delle sinapsi può modificarsi anche in età adulta. I meccanismi cellulari alla base di questi cambiamenti sono costituiti da modificazioni transitorie dei processi di neurotrasmissione sinaptica, mentre nel caso di modificazioni più durature sono costituiti da cambiamenti dei processi di espressione dei geni. Nemmeno a sviluppo ultimato la capacità di modificare l'organizzazione dei circuiti nervosi della corteccia viene perduta completamente, ma questa capacità diminuisce notevolmente (Bliss e Collingridge, 1993).

## **Cap. 2 – MEMORIA E PLASTICITA' SINAPTICA**

### ***2.1 Introduzione***

La memoria e la plasticità sinaptica sono studiate a fondo dai neuroscienziati che possono contare oggi sull'uso di diverse metodologie e tecnologie che spaziano dagli studi comportamentali all'indagine dell'espressione genica. Così la comprensione delle modificazioni dell'efficacia sinaptica rappresenta il campo di indagine più ferrato ad oggi, anche se la memoria non è solo un susseguirsi di eventi sinaptici. In una visione più olistica del processo il ricordo è determinato dall'integrazione di più segnali ed attività che investono la sfera encefalica (attenzione, intenzione, interesse, emotività), ma anche ciò che coinvolge lo stato emotivo del soggetto (assetto ormonale, stress fisico, ecc.).

Dati recenti, ottenuti grazie allo sviluppo delle tecniche morfometriche, sottolineano come l'esperienza sia in grado di provocare anche modificazioni della morfologia del neurone ed in particolare della sinapsi.

Sono stati scelti tre esempi significativi di alterazioni morfo-funzionali qui riportati.

Un primo esempio costituito dalla dimostrazione che un ambiente ricco di stimoli visivi, uditivi, tattili, ecc, induce nel ratto, modificazioni a livello di corteccia visiva quantizzabili come aumento di: a) peso e spessore della corteccia; b) grandezza dei corpi cellulari dei neuroni; c) lunghezza e numero dei dendriti; d) diametro delle sinapsi e delle spine dendritiche;

e) numero di contatti sinaptici dei neuroni corticali. Queste modificazioni possono essere indotte sia negli animali giovani che in quelli di mezza età o vecchi suggerendo che la plasticità neuronale, molto accentuata in età evolutiva, si mantiene durante tutta la vita (Turner e Greenhough, 1985).

Un secondo esempio è rappresentato dalle modificazioni della zona CA1 dell'ippocampo, sia del numero di neuroni fra sinapsi e dendriti che della forma stessa delle spine dendritiche dopo induzione di potenziamento sinaptico a lungo termine (LTP) (Chang e Greenhough, 1984).

Il terzo esempio di alterazione morfo-funzionale è fornito dall'aumento e dalla diminuzione di marker pre-sinaptici nei neuroni (Bailey and Chen, 1983).

Queste diverse osservazioni sperimentali indicano chiaramente come i processi di memorizzazione siano correlati anche a modificazioni morfologiche a livello sinaptico come anticipato dalle intuizioni di Hebb (1949) il quale propose che se due neuroni sono attivi nello stesso momento l'efficienza della sinapsi è rafforzata.

## **2.2 La memoria**

La memoria è un meraviglioso artificio del nostro sistema nervoso centrale, in grado di riconnetterci con il nostro passato. Ci permette di tornare indietro di un momento, o di molto tempo. Ma quello che noi sappiamo (o ricordiamo) non è perfetto, è una ricostruzione di fatti e di esperienze in base a come noi li abbiamo precedentemente acquisiti, e non come ci

servirebbero nel momento in cui le richiamiamo. È una ricostruzione del cervello che differisce da quella formata dalla memoria. Qualche volta i dettagli si perdono ma l'essenza resta sempre.

La memoria è quindi l'abilità di ricordare consapevolmente cose accadute precedentemente. Le informazioni sono disponibili al richiamo consapevole e possono essere verbalizzate e dichiarate.

È un tipo di memoria estremamente flessibile che permette, ad esempio, la visualizzazione dello scontro tra due veicoli semplicemente avendo udito il “crash” dell'urto, attraverso il richiamo di un'esperienza che il nostro cervello ha fatto nel passato, ma che ha lasciato traccia.

Si tratta di un meccanismo comune a tutte le specie animali e all'uomo, che permette di fissare, conservare e rievocare esperienze ed informazioni acquisite dall'ambiente interno ed esterno, derivate anche dal pensiero e dalle emozioni.

Attraverso la memoria l'uomo è in grado di ricostruire la propria storia, di auto-organizzarsi e di proiettarsi nel futuro. La memoria crea la nostra identità sia come individui che come popolo essendo alla base della storia e della cultura.

Secondo le nuove teorie neurofisiologiche, il segreto del “divenire” risiede nella “comunicazione”. Comunicazione tra uomini, tramite la parola o i messaggi non verbali e comunicazione tra neuroni, tramite le connessioni sinaptiche che intersecandosi e modificandosi riescono ad adattarsi alle nuove situazioni permettendo il cambiamento, fulcro dell'evoluzione.

## **2.3 Tipologie di memoria**

Nonostante un tempo si considerasse la come un'entità unitaria, recenti scoperte hanno dimostrato l'esistenza di sistemi di memoria multipli. Infatti, una lesione selettiva del cervello può causare un grave danno ad una determinata forma di memoria, lasciando inalterate altre forme mnemoniche o di apprendimento (Gasbarri e Tomaz, 2005). La memoria si classifica in base a due criteri: uno *temporale*, che tiene conto del tempo in cui il ricordo delle informazioni resta efficace, ed uno *qualitativo*, che tiene conto delle diverse categorie di memoria, distinguibili in base alla natura delle informazioni ricordate.

### **2.3.1 Classificazione in base a un criterio temporale**

In base alla durata del ricordo, possiamo distinguere:

- la *memoria iconica*, più breve, è una memoria sensoriale molto labile consistente in un'immagine visiva fedele dello stimolo;
- la *memoria ecoica*, sempre breve, si verifica quando uno stimolo acustico di brevissima durata continua ad essere percepito anche quando non è più presente;
- la *memoria a breve termine (Short Term Memory)*, forma di memoria con durata che va da alcuni secondi a qualche minuto in cui l'informazione viene presto dimenticata (ad esempio un numero telefonico) se non viene trasferita nella memoria a lungo termine, dove rimane per tutta la vita. La traccia di memoria che si forma

viene chiamata *engramma* e rappresenta l'informazione immagazzinata nel sistema nervoso centrale tramite l'esercizio ripetuto nel tempo cioè tramite l'apprendimento.

- la *memoria a medio termine (Intermediate Term Memory)*, una forma di memoria con caratteristiche intermedie;
- la *memoria a lungo termine (Long Term Memory)*, un tipo di memoria dove le informazioni possono durare anche tutta la vita ed è per questo che viene chiamata anche memoria permanente.

Il passaggio dell'informazione dalla memoria a breve termine a quello a lungo termine viene chiamato *consolidamento della memoria*. La memoria a lungo termine differisce anche dalle altre forme di memoria per quanto riguarda la mole di informazioni che essa può contenere; c'è da precisare che, benché la capacità di questa memoria sia enorme, le esperienze acquisite possono essere dimenticate e i ricordi possono essere imprecisi. Questo perché gli engrammi contenuti nella memoria a lungo termine possono affievolirsi a causa dell'interferenza di informazioni apprese prima (*inibizione proattiva*) o dopo la loro formazione (*inibizione retroattiva*). Inoltre, ulteriori studi hanno dimostrato non solo che la traccia di memoria attivata più volte si allontana sempre di più dalla sua forma originaria, ma che le nuove informazioni disponibili al momento del richiamo possono aggiungere nuovi particolari alla traccia mnemonica, per cui vi saranno tracce più recenti e tracce più vecchie che sovrapponendosi renderanno i ricordi falsi e distorti.

### **2.3.2 Classificazione in base ad un criterio qualitativo**

In base a questo tipo di classificazione distinguiamo la memoria in memoria non dichiarativa o implicita o procedurale e memoria dichiarativa o esplicita.

La *memoria non dichiarativa, o implicita o procedurale* è la cosiddetta memoria del “come”, tipica nei processi mnemonici dell'animale ed in alcuni importanti aspetti della memoria nell'uomo. Essa è un gran “contenitore” in cui sono compresi sia movimenti appresi, come i gesti atletici di un qualsiasi sport, e sia i movimenti comuni della nostra vita quotidiana, come ad esempio correre o andare in bicicletta. Il termine memoria non dichiarativa può includere anche il fenomeno di quello che gli psicologi chiamano “priming”, cioè “suggerimento”, termine con cui si indica una facilitazione nell'identificare o nell'usare uno stimolo che era stato già presentato in precedenza.

La memoria non dichiarativa è caratterizzata da influenze inconsce di esperienze passate, che si manifestano con modificazioni nella velocità o nei modi con i quali uno stesso compito viene svolto. Essa include: il sistema di rappresentazione percettiva (perceptual representation system - PRS), la memoria procedurale, la memoria di lavoro.

Il *PRS* gioca un ruolo importante nell'identificazione di parole e oggetti sulla base della loro forma e struttura. Esso si classifica in tre sottosistemi, che sono: un sottosistema visivo della forma della parola, che controlla le informazioni relative alle caratteristiche fisiche e ortografiche; un

sottosistema uditivo della forma della parola, che controlla l'informazione fonologica e acustica; un sottosistema descrittivo-strutturale, che controlla l'informazione sulle relazioni fra le parti di un oggetto indicative della sua forma e strutture globale.

La *memoria procedurale* è l'acquisizione di abilità e abitudini attraverso l'esercizio ripetuto.

La *memoria di lavoro*, definita da A. Baddley nel 1992, è il sistema di memoria a cui è affidato il compito di manipolare temporaneamente l'informazione; essa è usata per mantenere disponibile l'informazione relativa a quelle attività cognitive di base come la comprensione, il ragionamento e la soluzione di problemi. Essa quindi è adatta a conservare una quantità di materiale limitato e accessibile; infatti ha una capacità di immagazzinamento di  $7 \pm 2$  elementi, richiede alcune centinaia di millisecondi per poter codificare un nuovo elemento, perde le informazioni nel giro di pochi secondi, necessita di circa 50-100 ms per recuperare ogni elemento (Miller, 1956).

Benché la memoria di lavoro a tutt'oggi da molti ricercatori viene considerata come tipo di memoria a breve termine, è stata ipotizzata l'esistenza della memoria di lavoro a lungo termine che interverrebbe in processi cognitivi complessi, come l'esecuzione di compiti complicati. Diversi studi hanno evidenziato che non esiste un solo tipo di working memory indipendentemente dai contenuti che devono essere conservati in memoria; infatti studi sulla corteccia prefrontale dorsolaterale di scimmie

hanno mostrato che alcuni neuroni rispondono esclusivamente quando l'informazione che deve essere immagazzinata è di tipo spaziale, mentre altri neuroni rispondono soltanto se le informazioni visive devono essere conservate per un periodo limitato. Inoltre, studi con la PET ( tomografia ad emissione di positroni) sull'uomo, che permette di misurare l'attività metabolica del cervello, hanno evidenziato pattern diversi di attivazione a seconda della natura del tipo di materiale.

La working memory, inoltre, possiede degli indicatori temporali che consentono di ordinare le informazioni ed ha un ruolo importante nella comunicazione e nel calcolo mentale.

Con il termine *memoria dichiarativa o esplicita* si fa riferimento ad un insieme di ricordi di cui si è consapevoli e che possono essere espressi a parole, cioè dichiarati; è definita anche memoria del “che cosa”, cioè le esperienze precedenti proprie del soggetto, il riconoscimento di oggetti o scene familiari. Essa, secondo E. Tulving nel 1972, si divide in memoria episodica e memoria semantica o di riferimento.

La *memoria episodica* indica il richiamo a specifici eventi personali caratterizzati da “calore ed intimità”, così come li descrisse nel 1890 William James. Una forma di memoria episodica è quella autobiografica, nella quale gli eventi vengono rievocati e messi in relazione al momento della vita dell'individuo in cui si sono verificati.

La *memoria semantica o di riferimento* è una sorta di dizionario mentale, cioè una conoscenza generale di fatti o concetti non legati a nessun tempo o luogo particolari.

Un'ultima forma di memoria è quella *filogenetica o filetica o memoria della specie*, che riguarda i ricordi che derivano dall'esperienza che le specie acquisiscono durante l'evoluzione col proprio ambiente. Essa ha sede nelle aree corticali sensitive e motorie ed è importante in quanto determina se un individuo riuscirà a sopravvivere e a riprodursi.

## **Cap. 3 - STRUTTURE ANATOMICHE**

Apprendimento e memoria non sono funzioni confinate in una singola area cerebrale o in un numero limitato di cellule, ma in diverse aree cerebrali come già dimostrato da studi su ratti con lesioni cerebrali effettuati dallo psicologo americano Karl Lashley, nella prima metà del '900, e dal suo allievo, Donald Hebb (1949). Le ipotesi di quest'ultimo stimolarono lo sviluppo di modelli informatici di reti neurali; le sue assunzioni hanno contribuito allo studio della memoria, dimostrando che tali informazioni non sono conservate nelle strutture ippocampali e nelle strutture diencefaliche connesse e che la corteccia cerebrale può essere la sede principale di deposito a lungo termine dei diversi aspetti della memoria.

Poiché diverse aree corticali presiedono a diverse funzioni cognitive, non sorprende che in queste regioni sono immagazzinate informazioni relative alla specifica funzione cognitiva della corrispondente area corticale (Gasbarri e Tomaz, 2005).

### ***3.1 Corteccia frontale***

La corteccia frontale fa parte della neocorteccia, che ricopre la maggior parte della superficie degli emisferi cerebrali ed è chiamata così perché si è sviluppata in un periodo evolutivo recente. Essa si divide in corteccia prefrontale e corteccia motoria, distinta a sua volta in corteccia premotoria, area motrice supplementare e corteccia motoria primaria. Oltre al

coinvolgimento in alcuni aspetti della memoria, la corteccia frontale svolge anche funzioni esecutive che riguardano l'organizzazione del comportamento.

### **3.1.1 Corteccia prefrontale**

La corteccia prefrontale è considerata responsabile di diverse funzioni, come l'autocoscienza e la capacità di pianificare e risolvere problemi complessi. Le afferenze a regioni specifiche della corteccia prefrontale hanno origine dalla corteccia prestriata visiva, dalla corteccia associativa temporale uditiva e visiva e dalla corteccia parietale posteriore. L'interconnessione della corteccia prefrontale con aree del lobo temporale mediale e diencefaliche ha portato i ricercatori ad ipotizzare che tale area fosse implicata nell'apprendimento e nella memoria. La corteccia prefrontale sembra intervenire nella memoria dell'ordine temporale di eventi; infatti studi su scimmie con lesione di questa non presentavano deficit nel compito di discriminazione ritardata non familiare, ma manifestavano disturbi nell'eseguire compiti di discriminazione ritardata familiare e compiti di risposta ritardata alternata. Molti studi hanno evidenziato che quando l'uomo sta eseguendo un compito di risposta ritardata, i neuroni della corteccia prefrontale nella porzione dorso-laterale mantengono un elevato livello di attività durante l'intervallo, perché stano immagazzinando un ricordo, questo ci indica che quest'aria è anche la sede della memoria di lavoro. Inoltre,

quest'area è coinvolta nei compiti di memoria di lavoro per tutte le modalità sensoriali. Una lesione di questa regione interferisce con le prestazioni in un'ampia varietà di compiti di discriminazione ritardata, che utilizzano stimoli visivi, tattili e uditivi. L'implicazione della corteccia prefrontale nella memoria di lavoro visiva è dimostrata dal fatto che essa contiene molti neuroni che rispondono selettivamente a stimoli visivi specifici e che presentano una certa attività durante gli intervalli nei compiti di discriminazione ritardata. Oltre la memoria di lavoro, la corteccia prefrontale è coinvolta nella distinzione tra memorie reali e memorie immaginarie e nella risoluzione di problemi e pianificazione di lavoro.

### **3.1.2 Corteccia motoria**

Come già accennato, sia la corteccia prefrontale dorso-laterale che la corteccia associativa sensoriale sono implicate nel ricordo di stimoli che sono stati percepiti in precedenza e nel tipo di risposta che deve essere attuata. Molte delle afferenze dei gangli della base si dirigono alla corteccia premotoria ed all'area motrice supplementare, passando per il talamo; essendo che queste ultime sono coinvolte nella pianificazione e nell'esecuzione del movimento, esse hanno una loro implicazione anche nell'apprendimento di tipo motorio. Un danno all'area motrice supplementare interferisce con le risposte iniziate autonomamente o con sequenze di risposte nel cui ambito l'attuazione di una risposta funge da segnale per la messa in atto di quella successiva. Studi effettuati su scimmie

con lesioni dell'area motrice supplementare hanno evidenziato che il problema non consisteva nell'incapacità di apprendere una risposta condizionata di tipo strumentale, ma nell'incapacità di imparare un movimento iniziato in modo indipendente. Anche studi effettuati sull'uomo, tramite la PET hanno dimostrato che durante la fase di apprendimento si attivava l'area supplementare motrice anteriore, mentre durante l'esecuzione si attivava quella posteriore perché queste ultime sono connesse direttamente con la corteccia motoria primaria.

### **3.2 Corteccia visiva**

L'apprendimento percettivo coinvolge regioni specifiche della corteccia sensoriale associativa. Grazie alla corteccia associativa visiva siamo in grado di riconoscere un particolare oggetto mediante la vista. La corteccia visiva comprende: la corteccia visiva primaria e le aree extra-striate, che includono la corteccia extra-striata del lobo occipitale, la corteccia visiva associativa di ordine superiore del lobo parietale e la corteccia temporale inferiore.

Intorno alla metà del 1900, W. Penfield eseguì, su soggetti umani viventi, studi sul coinvolgimento della neocorteccia dei lobi temporali nell'immagazzinamento delle tracce di memoria dichiarativa. Egli stimolava elettricamente diverse aree cerebrali prima della loro asportazione. Alcuni di questi pazienti descrissero sensazioni simili ad allucinazioni o a ricordi di esperienze passate: la stimolazione elettrica aveva evocato dei ricordi o questi erano immagazzinati nella neocorteccia

del lobo temporale? Un'ipotesi è che queste sensazioni siano ricordi di esperienze pregresse ottenute soltanto stimolando il lobo temporale; questo suggerisce che quest'ultimo abbia un ruolo importante nell'immagazzinamento della memoria. Le aree extra-striate sarebbero implicate anche nel codificare i ricordi a breve termine, mentre la corteccia inferotemporale avrebbe la duplice funzione di area visiva ed area di immagazzinamento di memoria. La corteccia intraparietale laterale sarebbe coinvolta nel guidare i movimenti oculari in un tipo di memoria di lavoro, come si può osservare nel movimento rapido ed improvviso dell'occhio durante l'esame accurato di una scena visiva.

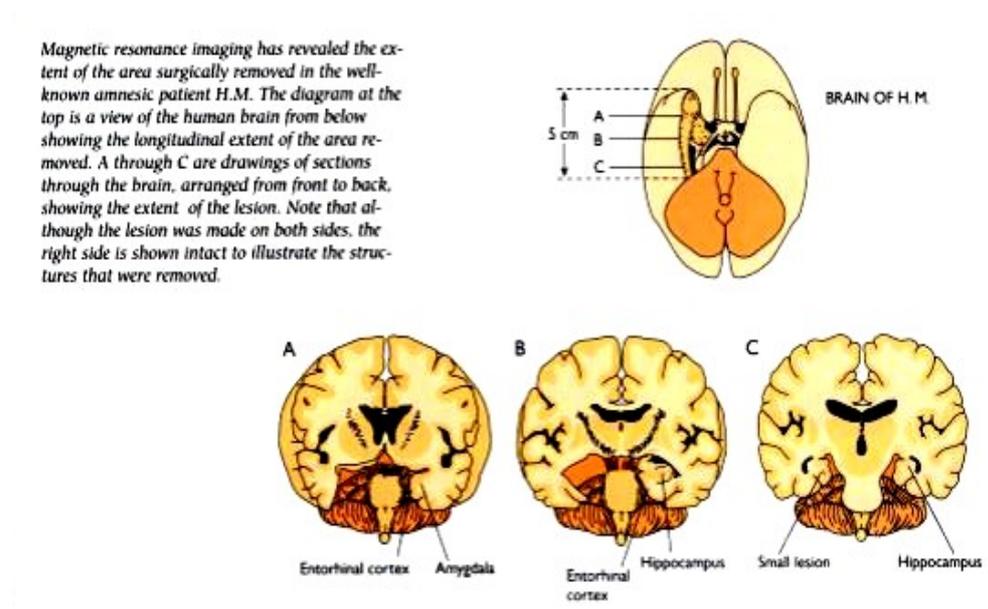
### ***3.3 Lobo temporale mediale***

Il lobo temporale è importante per la registrazione di eventi passati e contiene due aree importanti nei processi della memoria dichiarativa, l'ippocampo e l'amigdala, localizzati nella parte mediale del lobo temporale.

#### **3.3.1 Ippocampo**

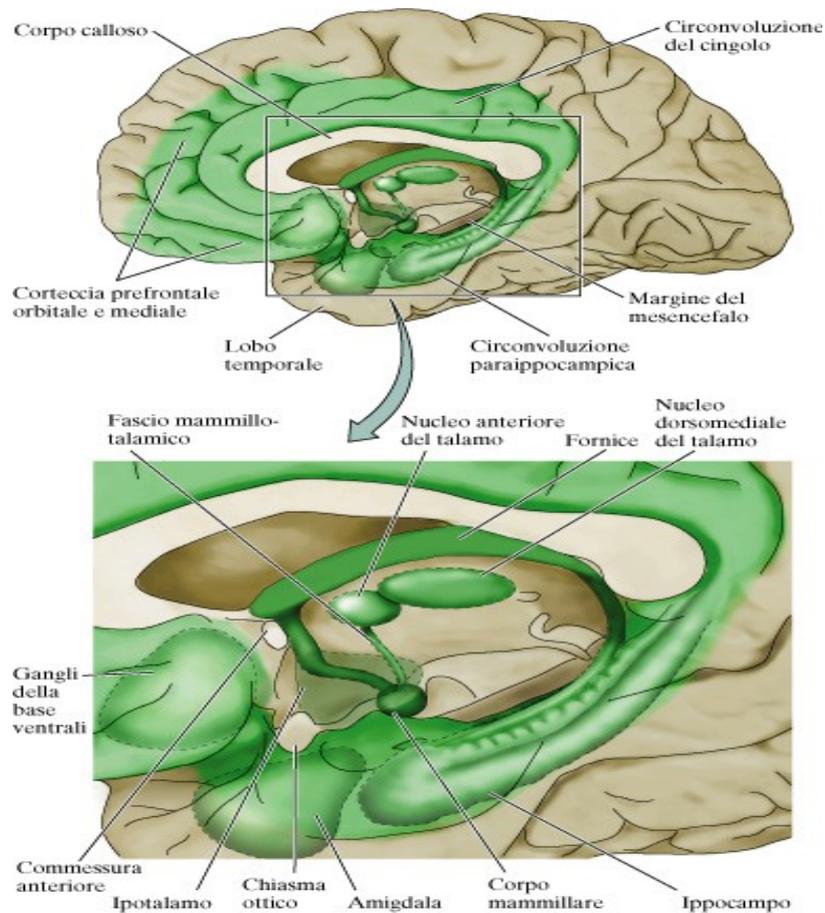
Nonostante diverse aree del cervello giocano un ruolo nella consolidazione di diverse forme di apprendimento e memoria, all'ippocampo è stato riconosciuto un ruolo vitale in particolare nella formazione della memoria dichiarativa, come memoria semantica ed episodica. Nel 1957, Scoville e Milner osservarono che la rimozione bilaterale dell'ippocampo, come trattamento dell'epilessia nel paziente H.M., provocava amnesia

anterograda. Da allora diversi studi vennero condotti e venne così esplicitamente identificato lo specifico ruolo dell'ippocampo e dei lobi temporali nella formazione della memoria.



**Figura 3 - Risultati dell'analisi del cervello del paziente HM**

La formazione ippocampale, la cui forma ricorda un cavallo marino, è una regione specializzata della corteccia limbica, situata nella regione temporale, ripiegata e ricurva ad assumere una complessa forma tridimensionale. La sua corteccia presenta solo tre strati invece che sei, si tratta quindi di *archicortex*. È formato da: uncus, giro dentato, corpo calloso, fornice, fasciola dentata, solco ippocampale, giro ippocampale e solco collaterale. La corteccia entorinale canalizza la maggior parte delle afferenze ed efferenze neo-corticali alla formazione ippocampale grazie a neuroni che ritrasmettono le informazioni in entrata alle cellule granulari del *giro dentato* mediante un fascio di assoni, noto come la “via perforante”.



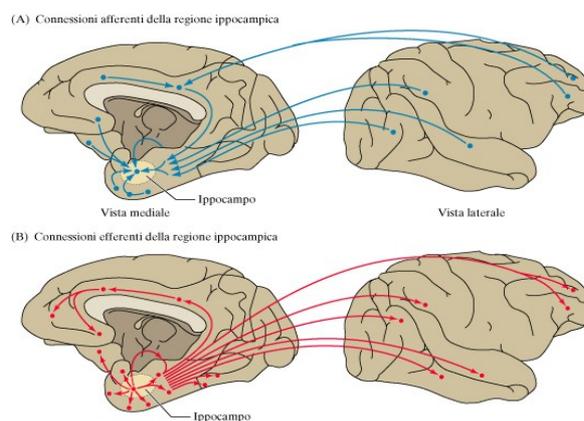
**Figura 4 – Sistema limbico**

Successivamente questi neuroni inviano assoni nel campo CA3 dello stesso ippocampo. Le terminazioni delle fibre provenienti dal giro dentato formano sinapsi con le spine dendritiche delle cellule piramidali del campo CA3: un assone si dirige verso il basso, fuori dalla base della piramide, mentre un tronco lungo e spesso si dirige all'esterno verso l'alto. Questo dendrite e le sue ramificazioni sono costellate da 30.000 spine dendritiche. Tali spine sono il sito di cambiamenti strutturali e biochimici responsabili dei

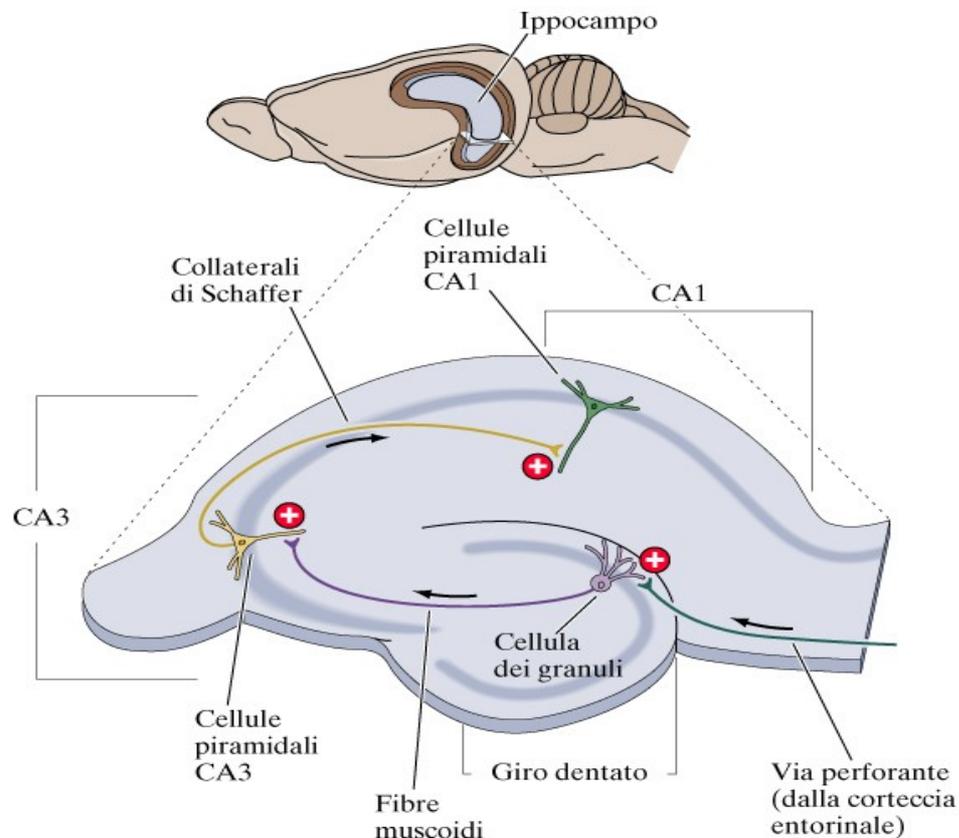
fenomeni di plasticità sinaptica noti come potenziamento a lungo termine o long-term potentiation (LTP).

Gli assoni delle cellule piramidali CA3 si diramano in due direzioni. Un ramo termina nell'adiacente campo CA1, dove forma sinapsi con spine dendritiche di altre cellule, l'altro ramo viaggia lungo il fornice per raggiungere strutture del mesencefalo basale, compreso il setto e i corpi mammillari. Un altro sistema di assoni connette le cellule piramidali CA1 con il loro corrispettivo sul lato opposto del cervello.

Le cellule piramidali CA1 forniscono le efferenze primarie dell'ippocampo: inviano assoni ai neuroni nel complesso subicolare, i cui assoni proiettano successivamente fuori della formazione ippocampale, alla corteccia entorinale e, attraverso la fimbria, al mesencefalo basale.



**Figura 5 – Connessioni ippocampali afferenti ed efferenti**



**Figura 6 - Circuiti sinaptici ippocampali.** Esistono tre vie eccitatorie che vanno dalla corteccia entorinale all'area CA1 ippocampale: la via perforante, la via delle fibre muscoidi, le collaterali di Schaffer. La via perforante decorre dalla corteccia entorinale alle cellule granulari dell'ilo del giro dentato. Gli assoni dei granuli formano la via delle fibre muscoidi che raggiungono le cellule piramidali del campo CA3. Queste ultime inviano collaterali eccitatorie o di Schaffer alle cellule piramidali del campo CA1.

Recenti ricerche hanno confermato che l'immagine mentale relativa a ciascun ricordo è costituita da un insieme di componenti, ognuna delle quali è immagazzinata in aree cerebrali specifiche. L'ippocampo è un deposito solo temporaneo delle tracce mnestiche ed è responsabile dell'organizzazione iniziale della memoria, mentre la corteccia cerebrale è la sede permanente dei ricordi. Si suppone che l'ippocampo e le strutture del lobo temporale, almeno in un primo momento, colleghino tra loro tutte

queste aree cerebrali e le relative componenti ricordo, grazie ad un processo graduale di riorganizzazione e stabilizzazione delle tracce mnemoniche, detto *consolidamento*. Trascorso questo tempo, l'ippocampo non è più necessario e quel ricordo dichiarativo resta, a lungo termine, completamente archiviato nella neocorteccia (Ghirardi e Casadio, 2002). Il ruolo chiave dell'ippocampo consiste nella configurazione spaziale dei punti di riferimento, che è governato, almeno in qualche modo, da eventi temporali (Teng e Squire, 1999). Il subiculum riceve informazioni di posizione, direzione, sensoriali e di contesto. È stato dimostrato che le lesioni di quest'area provocano deficit in alcune forme di apprendimento (Schenk e Morris, 1985). Oltre alle proiezioni al subiculum, i neuroni di CA1 proiettano alle corteccie perinale, post-riale ed entorinale, e diversi studi hanno suggerito che questi sistemi giocano un ruolo in varie forme di apprendimento e memoria (O'Mara et al., 2000). Questi studi riportano che le informazioni di posizione dipendono da interazioni tra ippocampo e subiculum; le informazioni direzionali dipendono da interazioni tra post-subiculum e subiculum; le informazioni sensoriali dipendono da interazioni tra la corteccia entorinale e il subiculum.

La *working memory* dipende non solo dall'ippocampo ma anche dalla corteccia prefrontale. La corteccia frontale gioca un ruolo significativo nell'ordinamento temporale di eventi spaziali e non spaziali, e nella pianificazione di risposte. Per esempio, l'acquisizione di comportamenti motori, le abitudini e la memoria associata al comportamento, si basano

sull'integrità dello striato e del cervelletto, mentre per la memoria emozionale, da molti anni, è stato riconosciuto il ruolo dell'amigdala.

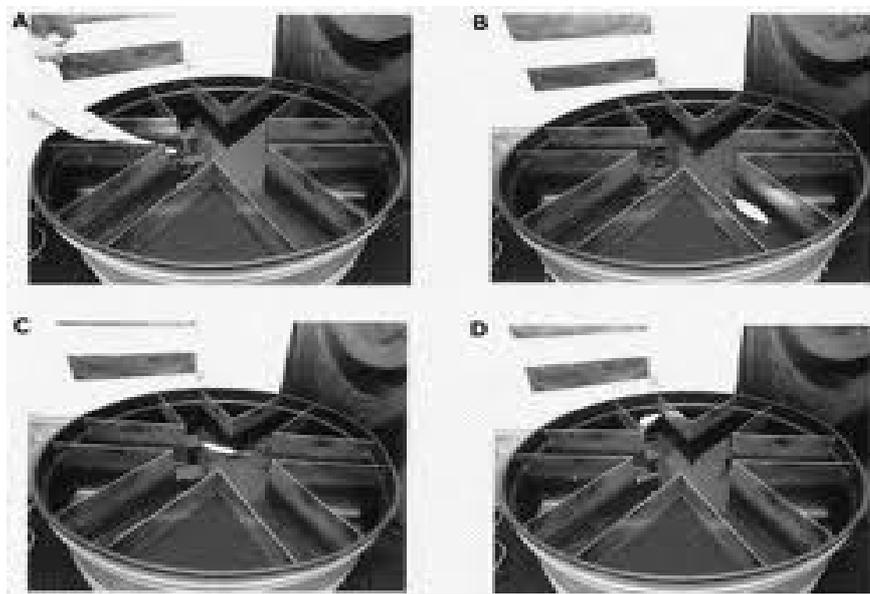
Le connessioni tra ippocampo e neocorteccia sono state studiate con grande interesse. Alcuni autori hanno proposto che, nonostante l'ippocampo sia largamente responsabile del richiamo di memorie recenti, la neocorteccia è primariamente coinvolta nel richiamo di più memorie remote. Quindi, l'ippocampo permetterebbe l'apprendimento rapido consentendo poi alla neocorteccia di subire i cambiamenti sinaptici richiesti per l'apprendimento lento.

Lo sviluppo di tecniche di *neuroimaging* ha permesso di ricavare ulteriori informazioni sul ruolo del complesso ippocampale nella ripresa di memorie distanti ed evidenza che l'attivazione di circuiti ippocampali accade anche quando si richiamano memorie remote (Nadel et al., 2000).

L'ippocampo è inoltre implicato nell'apprendimento spaziale.

Per studiare il funzionamento dell'ippocampo su modelli animali si può utilizzare il test comportamentale del *labirinto a braccia radiali (radial arm maze)* in cui l'animale deve trovare il cibo posto all'estremità di uno degli otto bracci distribuiti a raggiera intorno ad una piattaforma centrale. Tale labirinto valuta l'abilità spaziale dei roditori a muoversi nel nuovo ambiente e ad apprendere e ricordare in quali luoghi può trovare il cibo per la propria sopravvivenza; inoltre deve tenere a mente quei luoghi visitati di recente per evitare di ritornarvi troppo presto. Poiché i bracci sono tutti uguali, il ratto

dovrà orientarsi attraverso dei punti di riferimento spaziali presenti nella stanza del test (*cues*). Infatti, la loro prestazione può essere compromessa ruotando il labirinto o cambiando la disposizione degli oggetti nella stanza. Quindi, l'animale percorre più di una volta lo stesso braccio utilizzando la memoria di lavoro spaziale, che gli permette di ricordare per breve tempo l'informazione necessaria a guidare il comportamento in atto.



**Figura 7 – Radial arm maze**

I ratti su cui viene provocata una lesione dell'ippocampo prima dell'addestramento si comporteranno in modo diverso rispetto ai ratti normali in quanto sono capaci di imparare il compito, cioè percorrono i bracci alla ricerca del cibo, ma non sono in grado di ricordare quali bracci hanno visitato. Una variante di questo esperimento consiste nel cibo che viene collocato soltanto in alcuni bracci e non in tutti. Con un po' di

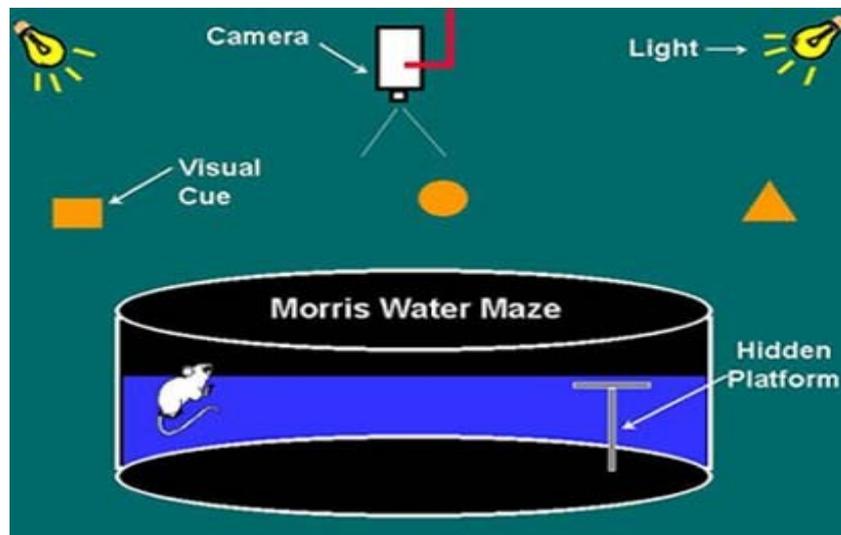
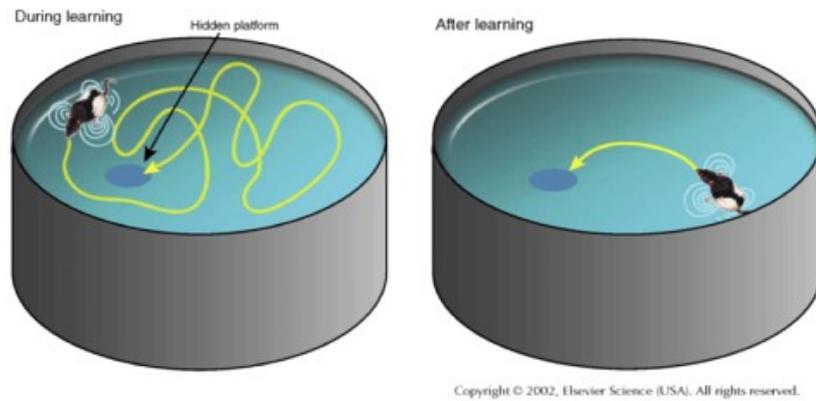
addestramento, un ratto normale apprende sia ad evitare i bracci privi di cibo, sia ritornare più volte nei bracci che lo contengono. La lesione ippocampale compromette la capacità di apprendere la localizzazione dei bracci già visitati che cambiano da una prova all'altra (memoria di lavoro), ma non impedisce all'animale di memorizzare le informazioni, nei bracci non contenenti cibo, che non variano da una prova a quella successiva (memoria di riferimento).

### **3.3.2 Morris Water Maze**

Richard Morris sviluppò questo test al fine di valutare l'orientamento spaziale nei ratti (Morris et al., 1986). Tale modello è sensibile a lesioni all'ippocampo, il cui ruolo nella memoria spaziale sembra essere fondamentale.

Il modello classico del Morris Water Maze (MWM) prevede l'utilizzo di una vasca circolare riempita di acqua, in cui viene immerso l'animale che deve trovare una piattaforma di plastica nascosta sotto la superficie dell'acqua e posizionata sempre nella stessa posizione durante i test di apprendimento. L'animale impara a orientarsi per trovare la piattaforma utilizzando i segnali visivi localizzati intorno alla vasca, che possono variare per grandezza, forma o luminosità. Viene così misurato il tempo che l'animale impiega a raggiungere la piattaforma (latenza).

## The Water Maze Quantifies Cognition in Rats



**Figura 8 – Morris water maze**

LA MWM è basata sul fatto che per i roditori l'acqua costituisce un ambiente estraneo dal quale sono fortemente motivati a fuggire cercando un approdo, la piattaforma, che costituisce un rinforzo positivo. Questo aspetto rappresenta uno dei punti di forza del test, poiché non richiede l'utilizzo di cibo o acqua come rinforzi positivi o l'evitamento di uno stimolo negativo,

come lo shock elettrico. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di esaminare diversi aspetti della performance dei ratti: quante prove il ratto deve eseguire prima di riuscire a rintracciare la piattaforma? Cosa accade se i segnali di riferimento vengono rimossi o spostati?

Questo modello, inoltre, risulta sensibile a trattamenti farmacologici o lesioni e può rivelare alterazioni del sistema sensoriale e motorio, modificazioni nell'apprendimento, deficit nei processi di acquisizione e ritenzione di vari tipi di memoria, tra cui la working memory. Sono, infatti, state sviluppati diverse versioni del water maze (Morris et al., 1986) per lo studio della memoria di lavoro: una di queste prevede, per esempio, ogni giorno la variazione della posizione della piattaforma (Morris et al., 1986); un'altra versione, invece, proposta da Buresova et al. (1985), consiste nell'introdurre un radial maze all'interno della vasca circolare ed il compito dell'animale consiste nel trovare la piattaforma alla fine di ogni braccio del radial maze. In tali modelli il task diventa più complesso ed evidenzia la necessità di un recupero temporaneo delle informazioni spaziali precedentemente acquisite per riuscire a trovare la piattaforma.

Tuttavia i modelli sviluppati finora per la spatial working memory sono pochi e richiedono tempi di apprendimento piuttosto lunghi (alcune settimane). Inoltre, tale metodica è particolarmente sensibile all'età degli animale.

Morris ha dimostrato che bloccando i recettori NMDA dell'ippocampo, mediante l'iniezione di un antagonista, l'animale riesce a raggiungere la

piattaforma visibile, ma fallisce il compito quando la piattaforma è sommersa. Questi esperimenti hanno suggerito che nell'apprendimento che richiede elementi spaziali sia necessario l'intervento di un meccanismo che interessa i recettori NMDA ippocampali.

Generalmente il test consiste di 3 fasi: *pretraining*, *training* e *probe*.

- *Pretraining*: è la fase in cui l'animale viene posto sulla piattaforma che è emersa, dove viene lasciato per qualche secondo in modo da avere la possibilità di osservare la stanza sperimentale e familiarizzare con la piattaforma.

- *Training (fase di acquisizione o apprendimento)*: costituita da più prove, è la fase in cui l'animale viene introdotto nel labirinto, lungo il bordo della piscina, in posizioni casuali differenti per ogni prova. Ogni prova ha termine quando l'animale nuotando liberamente localizza la piattaforma nascosta e vi sale sopra oppure allo scadere del tempo prestabilito (uguale per ogni prova, per es. 60 secondi). Se nella prima prova di acquisizione l'animale ha trovato la piattaforma, nelle prove successive, qualunque sia il punto in cui venga introdotto nel labirinto, esso di norma ritrova la piattaforma orientandosi grazie ai punti di riferimento esterni (cartelli colorati appesi alle pareti della stanza sperimentale e più in generale l'intero assetto di questa), migliorando le sue prestazioni con l'aumentare del numero delle prove. La traiettoria percorsa dagli animali per raggiungere la piattaforma, a partire dal punto di rilascio nella vasca, si fa più diretta come conseguenza dell'apprendimento del compito; ciò si riflette in corrispondenti diminuzioni

delle latenze e delle distanze percorse dai roditori per raggiungere la piattaforma.

- *Probe (prova di memoria)*: in questa fase l'animale viene introdotto nel labirinto in assenza della piattaforma. In questo caso si valuta la memoria spaziale dell'animale attraverso il tempo che esso trascorre nel quadrante della piscina in cui era situata la piattaforma durante l'acquisizione (quadrante *target*), che deve essere superiore rispetto a quello trascorso nelle altre zone della piscina se l'animale ha imparato il compito. Molti altri parametri comportamentali rilevabili nel quadrante *target* possono dare indicazioni sul grado di ritenzione del compito: il numero di attraversamenti, la velocità esibita, la distanza percorsa.

Nel *training* possiamo misurare: la lunghezza della traccia percorsa, la tigmotassi (comportamento per cui l'animale si muove lungo il perimetro della vasca), velocità e latenza di raggiungimento della piattaforma.

Nel *probe* possiamo misurare: tempo trascorso nei vari quadranti, con particolare riferimento al quadrante *target*, *crossings* (cioè attraversamenti dell'area del quadrante *target*) e lunghezza del percorso nel quadrante.

### **3.3.3 Place cells**

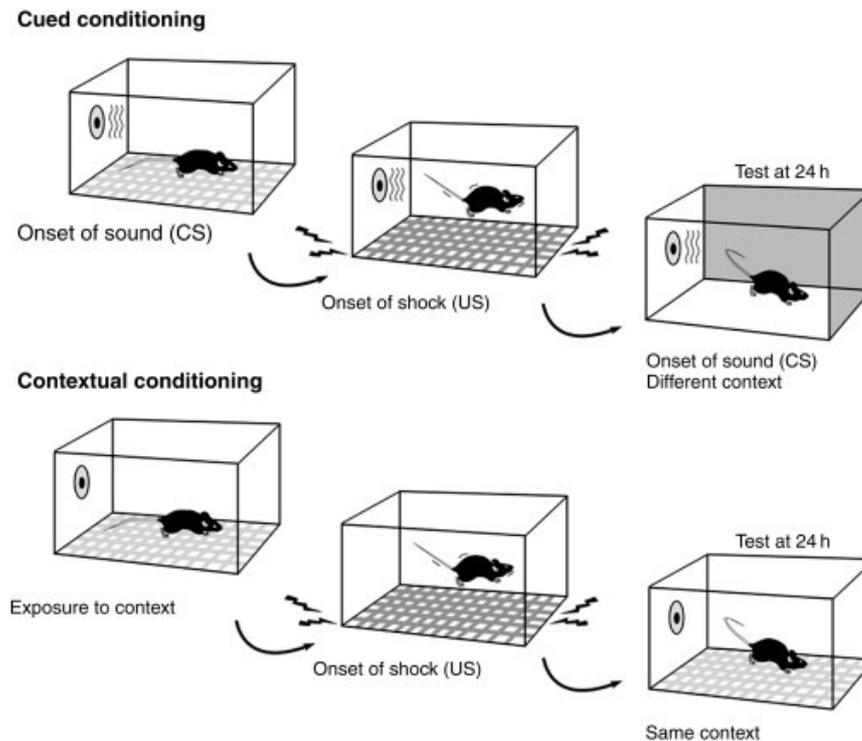
Alcuni neuroni dell'ippocampo che codificano la posizione spaziale sono stati chiamati *cellule di posizione ("place cells")*, poiché in essi si hanno potenziali di azione soprattutto quando l'animale si trova in una specifica posizione spaziale o si muove verso un determinato posto; infatti l'animale

memorizza la propria posizione basandosi sugli stimoli visivi e uditivi dell'ambiente, e cambiando tali punti la scarica delle cellule di posizione viene influenzata e quindi anche la sua capacità di orientamento. I ricercatori ritengono che quando i roditori incontrano nuovi ambienti, apprendano la loro configurazione e formano nel loro ippocampo delle mappe spaziali attraverso il rafforzamento sinaptico, cioè l'LTP. Anche la formazione ippocampale delle scimmie contiene neuroni che rispondono alla posizione che però codificano l'informazione relativa alla parte dell'ambiente che l'animale sta guardando, piuttosto che quella relativa alla propria posizione; questi neuroni sono stati chiamati *cellule visive spaziali*. Diversi esperimenti hanno elaborato la *teoria della memoria relazionale*, secondo la quale la funzione dell'ippocampo e di altre strutture del lobo temporale mediale è correlata con la memoria relazionale; cioè le informazioni sensoriali giungono all'ippocampo e alla corteccia circostante e, tramite ulteriori elaborazioni, i ricordi vengono conservati in modo tale che tutti gli eventi, avvenuti nel momento in cui un determinato ricordo è stato immagazzinato, siano posti in relazione tra di loro.

### **3.3.4 Amigdala**

L'amigdala svolge una funzione determinante nelle reazioni fisiologiche e comportamentali nei confronti di stimoli o situazioni con un significato biologico, come quelli correlati al dolore o alla presenza di cibo; quindi emotivamente rilevanti. I neuroni del nucleo centrale dell'amigdala

proiettano alle regioni cerebrali che sovrintendono all'espressione delle diverse componenti delle risposte emozionali; in particolare nell'apprendimento emotivo legato a situazioni avversive. Quindi l'amigdala è una struttura cerebrale essenziale per l'acquisizione e l'espressione della paura condizionata. A tal proposito sono stati effettuati diversi studi comportamentali con il *Fear Conditioning*. Come già accennato, quest'ultimo è un test che consiste nell'applicare una breve scossa elettrica subito dopo uno stimolo acustico. La scossa elettrica susciterà una risposta emozionale incondizionata di paura con alterata frequenza cardiaca e pressione sanguigna. Dopo un breve periodo di training, solo nell'udire il suono, i ratti mostrano lo stesso tipo di risposte fisiologiche evocate dalla scossa elettrica; essi mostrano anche un comportamento definito *freezing* (congelamento), cioè una risposta difensiva specie-specifica consistente in un'arresto del comportamento (l'animale resta immobile).



**Figura 9 – Fear conditioning**

Oltre alle risposte emozionali di tipo condizionato, l'amigdala è implicata anche nel rinforzo condizionato; infatti la distruzione di essa sulle scimmie non influenza la capacità di riconoscere stimoli visivi per mezzo della vista, ma le rende incapaci di riconoscere quali di essi è associata al cibo. Le modificazioni sinaptiche responsabili di quest'apprendimento possono avvenire in due regioni ben distinte: la porzione mediale del corpo genicolato laterale, che è una parte del talamo, e il nucleo baso-laterale dell'amigdala (BLA), dove ha luogo l'LTP.

Un danno selettivo all'amigdala porta nell'uomo a deficit nel riconoscimento di espressioni facciali di paura; quindi l'amigdala ricopre un ruolo centrale

nella regolazione dei meccanismi della paura e quindi nei disturbi d'ansia. Diversi esperimenti hanno evidenziato che l'amigdala ha la caratteristica di modulare la formazione di tracce di memoria nelle aree cerebrali a cui proietta, ma non è indispensabile per il richiamo dell'informazione una volta che è stata immagazzinata; un ruolo cruciale nel regolare il consolidamento della memoria è il BLA, che non è la sede di deposito a lungo termine dei ricordi, ma è in grado di modulare il consolidamento di tracce di memoria nelle aree coinvolte nella memoria. All'interno del BLA vi sono numerose interazioni tra diversi sistemi di neurotrasmissione che influenzano il consolidamento della memoria, neurotrasmettitori come: adrenalina, peptidi oppioidi e GABA, che convergono nel regolare il rilascio, all'interno dell'amigdala, di noradrenalina che è di vitale importanza per i processi modulatori della memoria. La stimolazione diretta dell'amigdala può avere effetti di modulazione sulla memoria, che dipendono dall'integrità delle ghiandole surrenali; infatti vi sono studi che indicano che lesioni su quest'area o sulla stria terminale, che è un'importante via di afferenza-efferenza dell'amigdala, bloccano gli effetti di molti ormoni e farmaci che hanno lo scopo di migliorare o peggiorare la memoria. Tali lesioni bloccano l'inibizione della memoria anche in seguito ad adrenalectomia; inoltre, gli effetti di modulazione sulla memoria esercitati da molti farmaci, compresi quelli che influenzano i sistemi adrenergici, GABAergici e dei peptidi oppioidi, vengono bloccati dall'iniezione di un antagonista beta-drenergico, il propanololo. Sebbene le infusioni intra-amigdala di naloxone, un

antagonista degli oppiacei, potenzino la memoria, tale miglioramento dipende dall'integrità della funzione noradrenergica. Questi risultati ci indicano che sia i farmaci che gli ormoni somministrati per via sistemica influenzano il processo di immagazzinamento della memoria, attraverso effetti che coinvolgono meccanismi noradrenergici all'interno dell'amigdala. Gli effetti modulatori sulla memoria da parte dei glucocorticoidi dipendono dall'integrità del BLA, mentre il miglioramento della memoria indotto dai glucocorticoidi viene influenzato da lesioni del nucleo centrale; quindi somministrando farmaci nel BLA abbiamo una modulazione della memoria.

### **3.4 Diencefalo**

Il diencefalo contiene tre aree implicate nell'elaborazione della memoria di riconoscimento: i nuclei anteriore e dorsomediale del talamo e dei corpi mammillari dell'ipotalamo. La maggior parte degli assoni del fornice, la principale efferenza della formazione ippocampale, proietta ai corpi mammillari, i cui neuroni a loro volta proiettano al nucleo anteriore del talamo. Il circuito che dall'ippocampo va all'ipotalamo, al nucleo anteriore del talamo e al giro del cingolo, costituisce parte del circuito di Papez, implicato nelle emozioni. Il nucleo dorsomediale del talamo riceve anche afferenze da regioni del lobo temporale, tra cui amigdala e neocorteccia inferotemporale, e proietta alla corteccia frontale; infatti lesioni nel nucleo dorsomediale determinano deficit in compiti di discriminazione ritardata sia nelle scimmie che nei ratti.

### **3.5 Gangli della base**

Questi nuclei sono importanti nel controllo del movimento volontario e comprendono cinque nuclei sottocorticali interconnessi tra di loro: *il nucleo caudato e il putamen*, che costituiscono il *neostriato*, *il globus pallidus*, *il nucleo subtalamico e la substantia nigra*, distinta in *pars compacta* (caratterizzata dalla presenza di neuroni dopaminergici) ed in *pars reticolata*. I gangli della base non intervengono durante le prime fasi dell'apprendimento, ma quando i comportamenti diventano quasi automatici. Nel condizionamento operante si verifica un rafforzamento sinaptico tra i circuiti che rilevano uno stimolo e di circuiti che producono una risposta. Le vie nervose responsabili del condizionamento operante hanno origine in regioni diverse della corteccia associativa sensoriale, dove ha luogo la percezione, e terminano nella corteccia associativa motoria del lobo frontale, che controlla il movimento; queste cortecce sono connesse tramite due vie principali, una diretta ed una indiretta, in quanto passa attraverso i gangli della base e il talamo. La via diretta è coinvolta nei processi di memoria a breve termine e, insieme all'ippocampo, nell'acquisizione di memorie episodiche.

### **3.6 Cervelletto**

Il cervelletto è necessario per l'apprendimento, la memoria e l'espressione del condizionamento classico della risposta di ammiccamento. Diversi studi indicano che l'apprendimento avviene nel nucleo interposito laterale e che il cervelletto è una delle regioni dove si formano e vengono immagazzinate le tracce di memoria a lungo termine; inoltre in quest'area vengono appresi e immagazzinati movimenti complessi. Ulteriori studi suggeriscono che il cervelletto riveste in altre forme di apprendimento e memoria, come il condizionamento cardiovascolare, l'apprendimento di una risposta strumentale di evitamento, l'apprendimento di compiti che utilizzano un labirinto, l'apprendimento della memoria spaziale e l'adattamento temporale.

## **Cap. 4 – IL PEPTIDE BETA-AMILOIDE**

### ***4.1 Ruolo del peptide amiloide nella Malattia di***

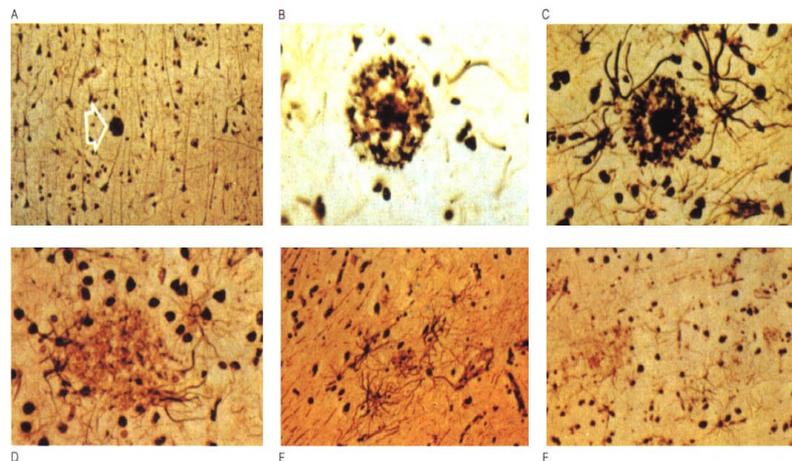
#### ***Alzheimer***

Alcune capacità legate ad apprendimento e memoria si deteriorano con l'età, anche quando non vi è un danno del sistema nervoso; infatti la funzione dell'encefalo diminuisce progressivamente dopo i 20 anni e negli anziani si assiste a una vera e propria perdita delle connessioni sinaptiche che causa atrofia di varie zone del cervello, tra cui l'ippocampo. Diversi studi hanno comprovato che la perdita di memoria nell'anziano possa essere dovuta ad una riduzione volumetrica dell'ippocampo.

La Malattia di Alzheimer è caratterizzata da deterioramento delle abilità intellettive, e quindi memoria, attenzione, facoltà linguistiche, orientamento spaziale e visivo, disturbo di personalità. Essa colpisce il 7% della popolazione di età superiore ai 65 anni e il 40% di persone con età superiore agli 80 anni. Esistono anche forme ereditarie della patologia (FAD: Familiar Alzheimer's Disease) che si manifestano in meno dell'1% dei pazienti. Considerato che i soggetti affetti da sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21) sviluppano quasi sempre una demenza simil-Alzheimer, i ricercatori hanno esaminato il cromosoma 21 dove è stato identificato il gene mutante legato a molti casi di Alzheimer precoce (gene per l'amyloid precursor protein - APP).

Il cervello dei pazienti affetti dalla Malattia di Alzheimer presenta diverse caratteristiche:

- presenza di grovigli *neurofibrillari intracellulari*, strutture filamentose citoscheletriche formate da una forma iperfosforilata di *proteina TAU*;
- presenza di placche senili formate da depositi di proteina *beta-amiloide* ( $A\beta$ );
- perdita di neuroni;
- alterazioni di neocorteccia, sistema limbico (ippocampo, amigdala e cortecce associate), nuclei sottocorticali;
- atrofia delle aree frontali, temporali e parietali;
- riduzione dell'attività colinergica (acetilcolina, colinacetiltransferasi, acetilcolinestererasi) dovuta a degenerazioni dei neuroni del proencefalo basale (nucleo basale di Meynert, banda diagonale di Broca, nucleo basale del setto).

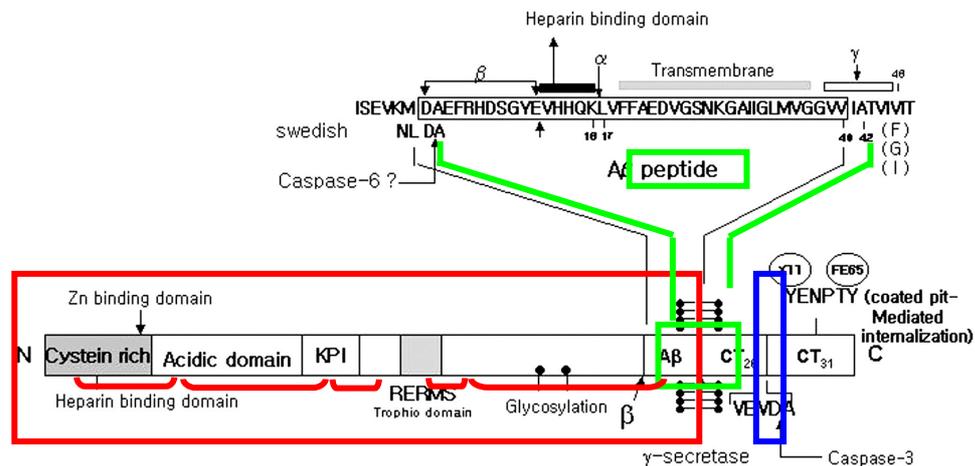


**Figura 10 – Placche senili su cervello di soggetto affetto da Malattia di Alzheimer**

#### **4.1.1 Clivaggio dell'APP**

L'A $\beta$  è un peptide di 40 a 42-aminoacidi considerato il principale fattore patogenetico nella Malattia di Alzheimer. L'A $\beta$  si forma ad opera di specifiche proteasi a partire dal precursore APP (Haass et al., 1992), glicoproteina integrale tipo I transmembrana che possiede un largo dominio extracellulare e un piccolo dominio intracellulare. Il gene dell'APP è localizzato sul cromosoma 21 (21q21.2-3). L'APP, a distribuzione pressoché ubiquitaria (neuroni, glia, endotelio, fibroblasti), sembra avere una funzione fisiologica importante soprattutto per quanto riguarda i fenomeni di neuroplasticità (Mattson, 1997). Infatti, l'espressione di una sua subunità ( $\beta$ -APP) aumenta nei processi di differenziazione e crescita neuronale (Salbaum e Ruddle, 1994), suggerendo un suo ruolo nello sviluppo del sistema nervoso, confermato tra l'altro da diversi studi comportamentali e sulla plasticità sinaptica (Qiu et al., 1995). L'APP potrebbe anche essere coinvolto in alcuni meccanismi mnemonici e nell'LTP (Huber et al., 1993; Ishida et al., 1997). Dall'APP derivano diversi frammenti con funzioni sia fisiologiche che fisiopatologiche (Mattson, 1997). Ad esempio, il rilascio del frammento NH<sub>2</sub> sembra essere coinvolto nei fenomeni elettrici di membrana (Nitsch et al., 1993), mentre il frammento COOH e l'A $\beta$  intervengono nei processi apoptotici e di morte neuronale (Loo et al., 1993), avendo un ruolo predominante in alcune patologie neurodegenerative quali la Malattia di Alzheimer (Selkoe, 2002). Alcune forme rare di Malattia di Alzheimer familiare sarebbero correlate a mutazioni sia dell'APP che delle  $\gamma$ -secretasi

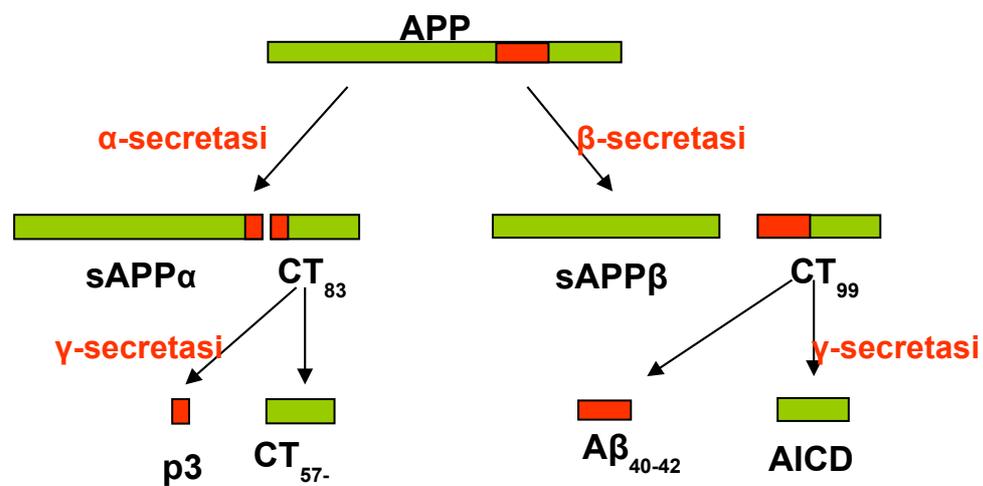
(preseniline, PS) (Berezovska et al., 2005; Citron et al., 1992; Finckh et al., 2005; Renbaum e Levy-Lahad, 1998; Rossor et al., 1993; St George-Hyslop, 2000; Tanzi et al., 1996) e diversi modelli animali di Malattia di Alzheimer manifestano un'iperpressione di  $\beta$ -APP e PS (Spires e Hyman, 2005). La quasi totalità degli studi ha focalizzato l'attenzione sull'effetto citotossico dell'A $\beta$  i cui meccanismi d'azione sarebbero molteplici: stress ossidativo, stimolazione dei meccanismi flogistici, alterazioni recettoriali, alterazioni dei canali del calcio e del potassio.



**Figura 11 - Struttura dell'APP.** L'APP contiene un grande dominio extracellulare, un dominio idrofilico transmembrana e un corto dominio intracellulare COOH (rispettivamente indicati in rosse, verde e blu). In alto, la sequenza aminoacidica dell'A $\beta$  e i siti di clivaggio per le  $\alpha$ -  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi. Le  $\alpha$ - e  $\beta$ -secretasi agiscono a livello del dominio extracellulare; le  $\gamma$ -secretasi agiscono sul dominio transmembrana su due siti che portano alla formazione dell'A $\beta$ -40 e -42, rispettivamente.

L'APP è sensibile a fenomeni proteolitici di clivaggio tramite un complesso processamento che porta alla secrezione di frammenti più o meno grandi con funzioni caratteristiche. Partendo dall'NH<sub>2</sub>, si riconoscono due siti di clivaggio nella porzione extracellulare (detti  $\alpha$ ,  $\beta$ ) ed un sito ( $\gamma$ ) nel dominio

transmembrana. Inizialmente l'APP sarà tagliato a livello dei siti  $\alpha$  o  $\beta$ , dando origine a due grandi domini extracellulari solubili che differiscono solo per 17AA al COOH. Questi sono detti sAPP $\alpha$  ed sAPP $\beta$ , rispettivamente, e possiedono diverse funzioni.



59  
Figura 12 - Clivaggio dell'APP e formazione dei vari frammenti

La restante porzione dell'APP, detta CTF (frammento carbossi-terminale), conterrà 83AA (C83) se ha agito la  $\alpha$ -secretasi o 99AA (C99) se il clivaggio è avvenuto ad opera delle  $\beta$ -secretasi. Il clivaggio transmembrana sarà poi catalizzato dalle  $\gamma$ -secretasi. Dal frammento C83 derivano un frammento detto p3 e un frammento C-term di 57-59AA. Dal frammento C99 derivano l'A $\beta$ 40 o 42 e un frammento C-term detto AICD (APP intracellular domain). Quindi, l'A $\beta$  potrà formarsi soltanto se hanno agito le  $\beta$ -proteasi.

#### 4.1.2 Le varie forme di A $\beta$

Da quando è stato scoperto che l'A $\beta$  svolge un ruolo determinante nella patogenesi dell'AD, sono stati effettuati diversi studi per comprendere le caratteristiche chimiche e morfologiche del peptide. Sono state identificate diverse forme di A $\beta$ , ognuna con funzioni e proprietà peculiari (Saido et al., 1995; He e Barrow, 1999; Russo et al., 2002). L'A $\beta$  solubile, cioè quella appena prodotta dalle cellule o la frazione di A $\beta$  tissutale o sintetica contenuta in un mezzo acquoso, è stata identificata nel 1994 da frazioni solubili prelevate dalla corteccia cerebrale di pazienti affetti da AD (Tabaton et al., 1994). Questa forma di A $\beta$  sembra essere la prima forma di accumulo del peptide.

In relazione alla struttura, l'A $\beta$  è distinta in “monomerica” ed “oligomerica”, considerando la presenza di assemblati a bassa stechiometria quali i monomeri, i dimeri, e i trimeri, mentre le “protofibrille” rappresentano strutture di ordine intermedio tra gli aggregati menzionati e le fibrille presenti nelle caratteristiche placche senili (Gandy, 2005). Gli oligomeri solubili di A $\beta$  sono stati isolati dal cervello, dal plasma, dal liquido cefalorachidiano (Kuo et al., 1996; Roher et al., 1996), da cellule transfettate (Podlisny et al., 1998), da cellule derivate dal cervello umano (Walsh et al., 2000; 2002). Gli oligomeri e le protofibrille sembrano essere gli stati di assemblaggio con la maggiore tossicità, specialmente nei modelli di culture cellulari neuronali. *In vitro*, l'A $\beta$  oligomerica esercita una forte azione inibitoria sull'LTP (Puzzo et al., 2005).

Il processo di aggregazione del peptide dipende da vari fattori, tra cui il tempo e la concentrazione. Per quanto riguarda il tempo, è interessante sottolineare l'esistenza di una cosiddetta *lag phase* in cui non c'è aggregazione (Fezoui e Teplow, 2002). Dopo questa fase l'aggregazione avviene molto rapidamente. Sono state trovate similitudini tra aggregazione dell'A $\beta$  e delle proteine prioniche implicate nella Malattia di Creutzfeldt-Jacob e nell'encefalite spongiforme. Pare che in entrambi i casi sia fondamentale l'alterazione strutturale delle proteine dalla forma ad alfa elica alla forma beta-sheet (Pan et al., 1993).

Le principali forme di A $\beta$  presenti nel sistema nervoso centrale sono l'A $\beta$ 1-40 e 1-42. L'A $\beta$ 1-42 è predominante nelle placche senili, probabilmente per la sua spiccata tendenza all'aggregazione (Cullen et al., 1997). Infatti, è proprio questa forma ad essere la responsabile dell'iniziale formazione degli oligomeri, delle fibrille e quindi delle placche.

## **4.2 Ruolo ormetico del peptide beta-amiloide**

### **4.2.1 Riassunto**

Negli ultimi decenni diversi studi sulla Malattia di Alzheimer si sono incentrati sulla cosiddetta "ipotesi amiloide", postulando che l'aumento e la deposizione di A $\beta$  sia il fattore patogenetico principale. Tuttavia, le terapie basate sulla rimozione di tale sostanza sono state finora un fallimento e, cosa più importante, sempre più evidenze scientifiche suggeriscono che l'A $\beta$

ha importanti funzioni fisiologiche. Studi precedentemente effettuati dal gruppo di ricerca dei Proff. Palmeri e Puzzo presso il Dip. di Scienze Biomediche – Sezione di Fisiologia dell'Università di Catania in collaborazione con il Prof. Arancio del Taub Institute della Columbia University di New York, hanno dimostrato che basse concentrazioni di A $\beta$  migliorano sia la plasticità sinaptica che la memoria, mentre alte concentrazioni inducono alterazioni dei fenomeni cognitivi. Il peptide, quindi, ha un effetto dose-risposta bifasico che può essere evidenziato sia studiando il fenomeno dell'LTP a livello ippocampale che studiando la memoria spaziale tramite il test della MWM. Questo fenomeno, caratterizzato da stimolazione a basse dosi e inibizioni ad alte dosi, e rappresentato da una curva a forma di U o di U rovesciata ha le caratteristiche dell'ormesi.

#### **4.2.2 Introduzione**

Il termine ormesi si riferisce ad un fenomeno dose-risposta bifasico caratterizzato dal fatto che una sostanza a basse dosi stimola ma ad alte dosi inibisce un processo. È rappresentato da una curva a campana, a forma di J, U o U invertita, in funzione del parametro misurato (Calabrese e Baldwin, 2001; 2002). Questo fenomeno è stato dimostrato per la prima volta da Hugo Schultz, più di un secolo fa (Kendig et al., 2010), che ha notato come alcune sostanze chimiche stimolavano e inibivano la crescita di lieviti a seconda delle dosi applicate. Il concetto generale di stimolazione a basse

dosi vs inibizione ad alte dosi venne inizialmente conosciuta come la legge di Arndt-Schulz, ma, data la scarsa conoscenza delle sue basi scientifiche, la fama crescente di tossicologia classica, e l'associazione con l'omeopatia, il termine ormesi cadde in disuso (Calabrese, 2009). Recentemente, tuttavia, l'ormesi ha ottenuto un rinnovato successo come dimostrato dai numerosi studi pubblicati (Calabrese, 2008a; 2008b; 2010). La definizione di ormesi però non è limitata al carattere bifasico della risposta, ma implica uno specifico effetto adattativo biologico ad una sostanza tramite un meccanismo caratterizzato da specifiche caratteristiche qualitative e quantitative (Calabrese e Baldwin, 2002). Infatti, secondo i principi dell'ormesi, i sistemi biologici sono danneggiati da alte dosi di un fattore di stress, mentre la stessa sostanza, a basse dosi, è in grado di stimolare positivamente diverse funzioni fisiologiche cellulari. Diverse, se non tutte, le molecole fisiologiche possono presentare un effetto ormetico, esibendo effetti opposti a concentrazioni alte o basse. Alcuni esempi sono: i) il glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio che stimola la plasticità sinaptica e la memoria a basse dosi fisiologiche (Rezvani, 2006), mentre a dosi più elevate diventa tossico ed è coinvolto in patologie come l'ictus (Wieloch, 1985; Choi, 1988) e la Malattia di Alzheimer (Mattson, 2004; 2008a); ii) i glucocorticoidi, il cui effetto sulla memoria potrebbe essere descritto come una curva a forma di U rovesciata (Lupien, 2005); iii) il monossido d'azoto che può esplicare effetti neurotossici o neuroprotettivi (Lowenstein et al

1994; Calabrese, 2001b; Duncan e Heales 2005; Puzzo et al., 2006; Mattson 2008b), etc. (Calabrese e Baldwin, 1998).

In questa linea di ricerca abbiamo studiato il ruolo bifasico dell'A $\beta$ . Come già detto, l'A $\beta$  deriva dal suo precursore APP che subisce un complesso processo proteolitico tramite gli enzimi  $\alpha$ - $\beta$ -e  $\gamma$ -secretasi che portano alla formazione di diversi frammenti (Mattson, 1997; Chow et al., 2010). La funzione fisiologica dell'APP rimane poco conosciuta, anche se alcuni frammenti potrebbero avere proprietà fisiologiche (Chow et al., 2010; Randall et al., 2010), mentre l'A $\beta$  è considerata un frammento tossico (Hardy e Selkoe, 2002) che causa la disfunzione sinaptica e la compromissione della memoria (Selkoe, 2002). Tuttavia, il peptide viene normalmente prodotto nel cervello sano e crescenti evidenze indicano che potrebbe avere una funzione fisiologica. Infatti, APP,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi sono coinvolti nella plasticità sinaptica e nella memoria (Dawson et al., 1999; Phinney et al., 1999; Seabrook et al., 1999; Saura et al., 2004; Laird et al., 2005; Ma et al., 2007; Wang et al., 2008) e l'A $\beta$  stessa, a concentrazioni picomolari, sembra svolgere un ruolo neuroprotettivo e neurotrofico (Yankner et al., 1990; Plant et al., 2003; Lopez-Toledano e Shelanski, 2004; Giuffrida et al., 2010). Cirrito et al. (2008) hanno dimostrato che la trasmissione sinaptica induce un aumento della produzione e il rilascio di A $\beta$ , mentre Kamenetz et al. (2003) hanno dimostrato che l'A $\beta$  endogena potrebbe regolare la plasticità sinaptica con un meccanismo di feedback

negativo. Recentemente, è stato dimostrato che quantità picomolari di A $\beta$ 42 esogena migliorano la plasticità sinaptica in vitro e la memoria in vivo (Puzzo et al., 2008) e che l'A $\beta$  murina endogena è necessaria per la plasticità sinaptica e la memoria (Puzzo et al., 2011). Qui, dimostriamo che le curve dose-risposta per gli effetti dell'A $\beta$  sulla plasticità sinaptica ippocampale e sulla memoria riproducono le caratteristiche tipiche dell'ormesi.

### **4.2.3 Metodi**

#### Animali

Abbiamo usato topi WT (C57BL/6) di 3-4-mesi di età. Gli animali sono stati mantenuti con un ciclo luce/buio di 12 ore (luce alle 6:00) a temperatura e umidità controllate, e cibo e acqua disponibili ad libitum.

#### Preparazione dell'A $\beta$

L'A $\beta$ 42 è stata preparata come precedentemente descritto (Puzzo et al., 2008). Il peptide (American Peptide, Sunnyvale, CA) è stato sospeso in in 1,1,1,3,3,3-esafluoro-2-propanolo (HFIP, Sigma, St. Louis, MO) per ottenere un film. È stato aggiunto dimetilsolfossido (DMSO, Sigma) e il composto è stato sonicato per 10 minuti, suddiviso in aliquote e conservato a -20° C. Ventiquattro ore prima dell'esperimento, a un'aliquota di DMSO-A $\beta$  è stato aggiunto PBS (5mM), e dopo agitazione per 30 secondi con vortex, il composto è stato incubato a 4° C. La caratterizzazione mediante

analisi Western blot ha dimostrato la presenza di monomeri e oligomeri. Le varie dosi di A $\beta$  sono state preparate in liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) subito prima della somministrazione: 2 pM, 20 pM, 200 pM, 2 nM, 20 nM, 200 nM, 2  $\mu$ M e 20  $\mu$ m.

### Elettrofisiologia

Registrazioni elettrofisiologiche sono state eseguite come precedentemente descritto (Puzzo et al., 2008). Fettine trasversali di ippocampo (400  $\mu$ m) sono state tagliate e mantenute in una camera di registrazione a 29° C, e perfuse con una miscela il 95% di O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> e con una soluzione di composta da NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, glucosio. Potenziali post-sinaptici eccitatori extracellulari (fEPSP) sono stati registrati ponendo l'elettrodo stimolante a livello delle fibre Schaffer e l'elettrodo di registrazione nello strato radiatum di CA1. La trasmissione sinaptica basale (BST) è stata testata come stimolo versus pendenza degli fEPSP. Per gli esperimenti di LTP, dopo aver registrato una risposta di base per 15 min a un'intensità che evochi una risposta pari al 35% della risposta massima evocata, l'LTP è stata indotta con una stimolazione  $\theta$ -burst. Le risposte sono state registrate per due ore dopo il tetano e calcolate come pendenza degli fEPSP espressa come percentuale del valore basale. È stata analizzata la media degli ultimi cinque punti di registrazione.

### Tecniche di infusione intraippocampale

Ai topi sono state impiantate cannule guida nella parte dorsale dell'ippocampo (coordinate: P = 2,46 mm, L = 1,50 mm a una profondità di 1,30 mm) (Paxinos, 1998). Le cannule sono state fissate al cranio con cemento dentale acrilico (3M ESPE AG, Seefeld, Germania). Dopo 6-8 giorni dall'impianto, i topi sono stati trattati una volta al giorno per 3 giorni, venti minuti prima di ogni prova comportamentale con diverse dosi di A $\beta$ 42 o veicolo attraverso cannule di infusione collegate a una microsiringa da un tubo di polietilene. Durante l'infusione, gli animali sono stati trattati con delicatezza per ridurre al minimo lo stress. Dopo l'infusione, l'ago è stato lasciato in sede per un altro minuto per permettere la diffusione. Una soluzione di blu di metilene 4% è stato infuso per la localizzazione istologica al termine della sessione comportamentale.

### Morris Water Maze

Gli esperimenti di MWM sono stati eseguiti come precedentemente descritto (Trinchese et al., 2004; Puzzo et al., 2008). I topi sono stati addestrati in 2 sessioni al giorno (a 4 ore di distanza), ognuna composta da 3 prove di 1 minuto ciascuna per 3 giorni, in modo il topo potesse utilizzare la memoria a lungo termine per ricordare la posizione della piattaforma nei giorni precedenti. Abbiamo registrato il tempo necessario per raggiungere la piattaforma nascosta (latenza). Dopo 3 giorni di training in cui l'animale ha

memorizzato la posizione della piattaforma, questa è stata rimossa ed è stato eseguito un altro test per valutare la ritenzione della memoria spaziale. L'animale ha effettuato 4 prove, ognuna di 1 minuto, in cui è stato lasciato libero di nuotare nella vasca. È stata poi analizzata la percentuale di tempo che l'animale ha trascorso nelle varie zone della vasca: TQ = quadrante target, quadrante dove la piattaforma era posizionata nei giorni del training; AL = adjacent left, a sinistra del TQ; AR = adjacent right, a destra del TQ; OQ = opposite quadrant, opposto al TQ].

### Statistica

Gli esperimenti sono stati effettuati in cieco per il trattamento e i dati espressi come media  $\pm$  errore standard. L'analisi statistica è stata effettuata tramite i test di ANOVA a due vie (con misure ripetute) per l'LTP e tramite il test t di Student per gli esperimenti comportamentali. Il livello di significatività è stato fissato per valori di  $p < 0.05$ .

## **4.2.4 Risultati**

### Effetto ormetico dell'A $\beta$ sulla plasticità sinaptica

Abbiamo precedentemente dimostrato che l'A $\beta$  esercita effetti opposti sull'LTP a seconda della sua concentrazione (Puzzo et al., 2008).

Qui, per capire meglio se gli effetti dell'A $\beta$  sulla plasticità sinaptica e la memoria abbiano caratteristiche ormetiche, abbiamo effettuato curve dose-

risposta e analizzato alcune caratteristiche quantitative e qualitative del fenomeno (Calabrese e Baldwin, 2002), quali: i) doppio effetto stimolatorio e inibitorio, visto entrambi i parametri devono essere presenti e con un continuum temporale per definire ormetica una curva dose-risposta; ii) risposta massima stimolatoria, che è generalmente non superiore al 130-160% del controllo; iii) ampiezza della risposta di stimolazione; iv) livello al quale non si osservano effetti avversi (NOAEL), che, mentre secondo il modello classico di soglia, rappresenta il livello di esposizione ad una sostanza a cui non ci sono effetti biologici (questo parametro viene utilizzato per calcolare la concentrazione "sicura" di agenti di rischio o di farmaci in modo da individuare la dose per cui non inducono effetti negativi rispetto al controllo), secondo il modello ormetico, il NOAEL rappresenta la transizione tra adattamento e tossicità, nella misura in cui l'effetto stimolatorio è presente per dosi inferiori al NOAEL; v) distanza tra NOAEL e risposta stimolatoria massima.

Per studiare le caratteristiche ormetiche, abbiamo perfuso le fettine ippocampali con concentrazioni di A $\beta$ 42 crescenti, da 2pM a 20  $\mu$ M. La BST non si è modificato dopo perfusione con le diverse dosi (n = 5 fette da 5 topi per ciascuna concentrazione,  $F_{(7,32)} = 0.148$ ,  $p > 0.5$ ; Figura 13).

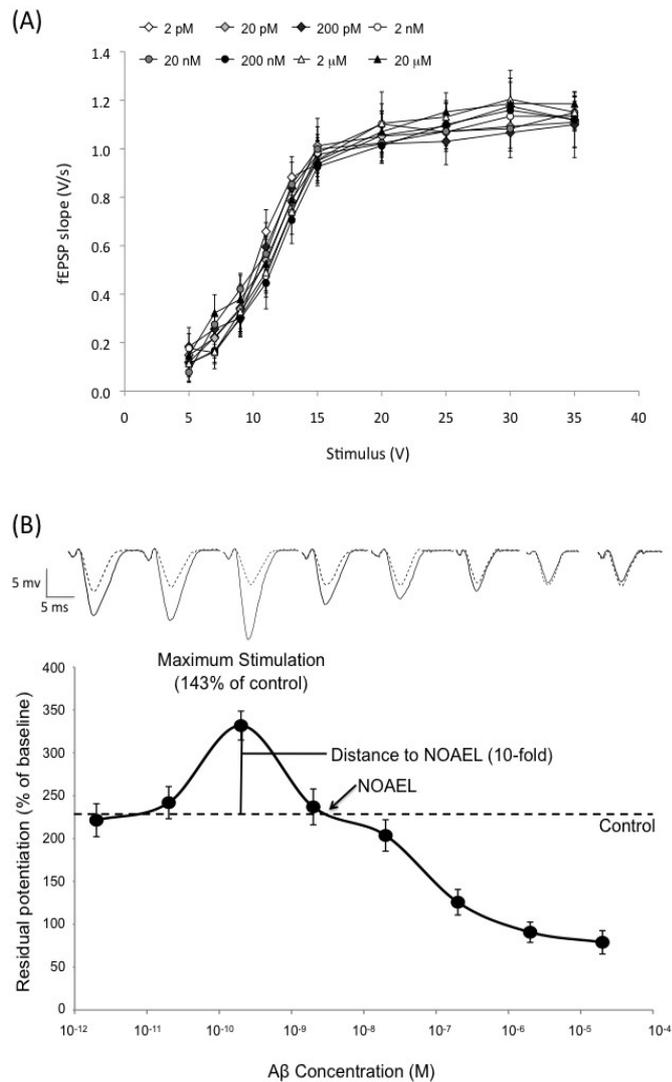
L'LTP è stata registrata nelle sinapsi tra le fibre collaterali di Schaffer e i neuroni CA1 per 120 minuti dopo il tetano ed è stato calcolato il

potenziamento residuo facendo la media degli ultimi 5 punti di registrazione (n = 6 fette da 6 topi per ciascuna concentrazione A $\beta$ 42 vs n = 9 fette da 9 topi trattati con il veicolo intercalate con gli esperimenti dose-risposta). L'area di stimolazione ormetica è stata evidenziata sotto il NOAEL (nel punto di intersezione tra la curva ormetica e i livelli di controllo) e va da 2 pM a 2nM (ampiezza = 100), mentre l'effetto negativo inizia al di sopra del NOAEL e raggiunge il massimo a 20 pM (Figura 13). La risposta stimolatoria massima è pari al 142.47% del controllo ed è stata registrata dopo perfusione con A $\beta$  200 pM. La distanza tra la risposta stimolatoria massima e il NOAEL era di 10 volte. Complessivamente, i topi trattati con concentrazione di A $\beta$  sotto il NOAEL hanno mostrato un miglioramento della plasticità sinaptica rispetto ai topi trattati con concentrazioni di A $\beta$  sopra il NOAEL ( $F_{(1,10)} = 75.358$ ,  $p < 0.0001$ ). I risultati del potenziamento in seguito alla somministrazione delle diverse dosi di A $\beta$  è riassunto nella tabella sotto:

A $\beta$ dose <sup>1</sup>	Potentiation $\pm$ SEM <sup>2</sup>	Statistics <sup>3</sup>
20 fM	229.61 $\pm$ 11.81	$F_{(4, 13)} = 0.033$ ; P = 0.858
200 fM	227.86 $\pm$ 13.44	$F_{(4, 13)} = 0.074$ ; P = 0.790
2 pM	221.41 $\pm$ 19.20	$F_{(4, 13)} = 0.299$ ; P = 0.594
20 pM	241.89 $\pm$ 18.75	$F_{(4, 13)} = 0.190$ ; P = 0.670
200 pM	331.76 $\pm$ 16.89	$F_{(4, 13)} = 23.066$ ; P < 0.0001
2 nM	236.94 $\pm$ 20.92	$F_{(4, 13)} = 1.872$ ; P = 0.194
20 nM	203.61 $\pm$ 18.33	$F_{(4, 13)} = 3.102$ ; P = 0.102
200 nM	125.74 $\pm$ 14.93	$F_{(4, 13)} = 29.861$ ; P < 0.0001
2 $\mu$ M	90.72 $\pm$ 11.89	$F_{(4, 13)} = 60.858$ ; P < 0.0001
20 $\mu$ M	78.97 $\pm$ 13.62	$F_{(4, 13)} = 65.740$ ; P < 0.0001
200 $\mu$ M	75.41 $\pm$ 11.69	$F_{(4, 13)} = 75.379$ ; P < 0.0001
2 mM	79.30 $\pm$ 10.46	$F_{(4, 13)} = 75.713$ ; P < 0.0001

<sup>1</sup> 20 minutes perfusion of hippocampal slices; <sup>2</sup> Residual potentiation expressed as fEPSP (% of baseline)  $\pm$  Standard Error Mean (n=6 slices for condition); <sup>3</sup> F and P calculated by two-way ANOVA for repeated measures, comparing A $\beta$  concentrations with control

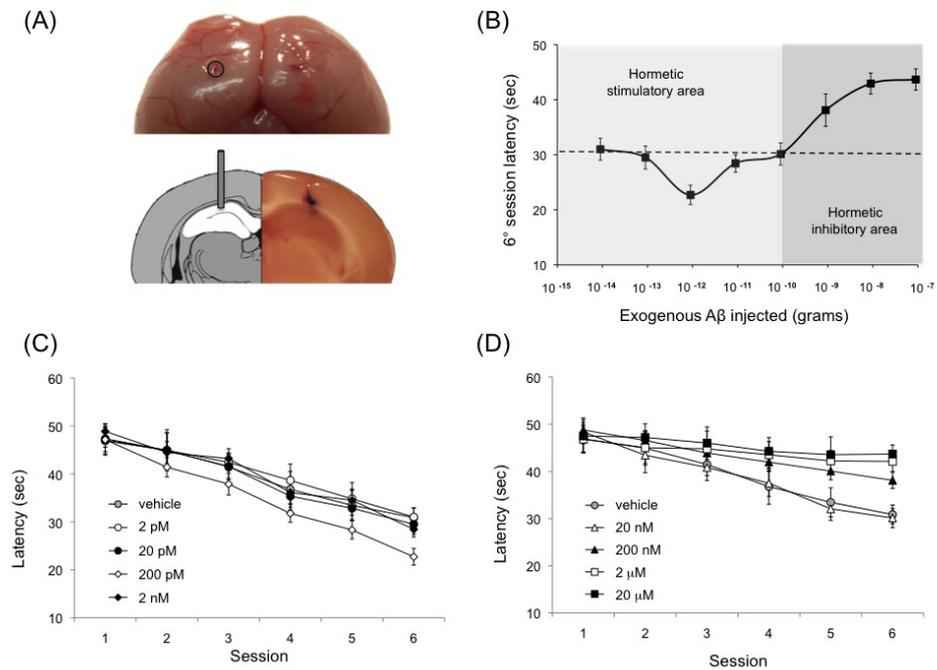
Gli animali sono stati trattati con diverse concentrazioni di A $\beta$ 42 (da 2pM a 20  $\mu$ M) o veicolo somministrate tramite le cannule intraippocampali, e dopo 20 min sono stati effettuati i test per la memoria di riferimento con la MWM (Schenk e Morris, 1985). Durante il training abbiamo registrato la latenza, cioè il tempo impiegato per raggiungere la piattaforma nascosta, e riportando i risultati come latenza rispetto alla concentrazione di A $\beta$  utilizzata, è stata ottenuta una curva ormetica (Figura 14).



**Figura 13. La curva dose-risposta indica che l'Aβ42 ha un effetto ormetico sull'LTP ippocampale.** (A) La BST non si modifica dopo il trattamento con diverse concentrazioni di Aβ, mentre (B) l'LTP segue una distribuzione ormetica, con un'area di stimolazione compresa tra 20pM e 2nM, una risposta stimolatoria massima a 200pM uguale al 142,46% del controllo e un NOAEL = 10 volte. Nella parte superiore, tracce di LTP prima (linea tratteggiata) e dopo il tetano. La linea tratteggiata orizzontale corrisponde al trattamento con il peptide o il veicolo.

I topi trattati con dosi inferiori al NOAEL (area di stimolazione ormetica  $2\text{pM} < A\beta < 2\text{nM}$ ) necessitavano di meno tempo per trovare la piattaforma rispetto ai topi trattati con concentrazioni più elevate (area di inibizione ormetica  $A\beta \geq 20\text{nM}$ ) (Figura 14). In particolare, l'analisi statistica ha rivelato una differenza significativa tra le dosi alte e basse del peptide nel rendimento complessivo (latenza:  $31.73 \pm 1.67$  secondi vs  $38.50 \pm 1.88$  secondi,  $t_{(18)} = 3.636$ ,  $p = 0.002$ ), nella quinta (latenza =  $38.05 \pm 0.67$  secondi vs  $42.28 \pm 1.02$  secondi,  $t_{(18)} = 2.724$ ,  $p = 0.014$ ) e nella sesta sessione di training (latenza =  $27.13 \pm 1.47$  secondi vs  $37.53 \pm 1.48$  secondi,  $t_{(18)} = 5.488$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 14). Il miglioramento della memoria si è verificato dopo il trattamento con  $200 \text{ pM } A\beta_{42}$ , visto che i topi avevano bisogno di meno tempo per trovare la piattaforma ( $n = 10/10$  topi, latenza complessiva =  $34.86 \pm 0.94$  secondi vs  $39.05 \pm 0.94$  secondi,  $t_{(18)} = 2.682$ ,  $p = 0.015$ ; latenza sesta sessione =  $22.70 \pm 1.74$  secondi vs  $30.86 \pm 1.98$  secondi,  $t_{(18)} = 3.097$ ,  $p = 0.006$  rispetto al veicolo; Figura 14), mentre l'infusione con concentrazioni più basse ( $2\text{pM}$ ,  $n = 9$ , latenza complessiva =  $39.84 \pm 0.88$  secondi,  $t_{(17)} = 0.497$ ,  $p = 0.625$ ; latenza sesta sessione =  $31.00 \pm 1.98$  secondi,  $t_{(17)} = 0.048$ ,  $p = 0.962$ ;  $20\text{pM}$ ,  $n = 10$ , latenza complessiva =  $38.53 \pm 1.15$  secondi,  $t_{(18)} = 0.310$ ,  $p = 0.760$ ; latenza sesta sessione =  $29.50 \pm 2.07$  secondi,  $t_{(18)} = 0.476$ ,  $p = 0.640$ ; Figura 14) o il trattamento con  $2 \text{ nM}$  e  $20 \text{ nM}$  non ha prodotto variazioni rispetto al veicolo, Figura 14). Una diminuzione della memoria ha iniziato a verificarsi dopo la somministrazione di  $200 \text{ nM}$  ( $n = 10$ , latenza complessiva =  $43.22 \pm 1.76$

secondi,  $t_{(18)} = 1.978$ ,  $p = 0.063$ ; latenza sesta sessione =  $38.10 \pm 2.94$  secondi,  $t_{(18)} = 2.036$ ,  $p = 0.057$ ; Figura 14) ed è peggiorata con dosi più alte.



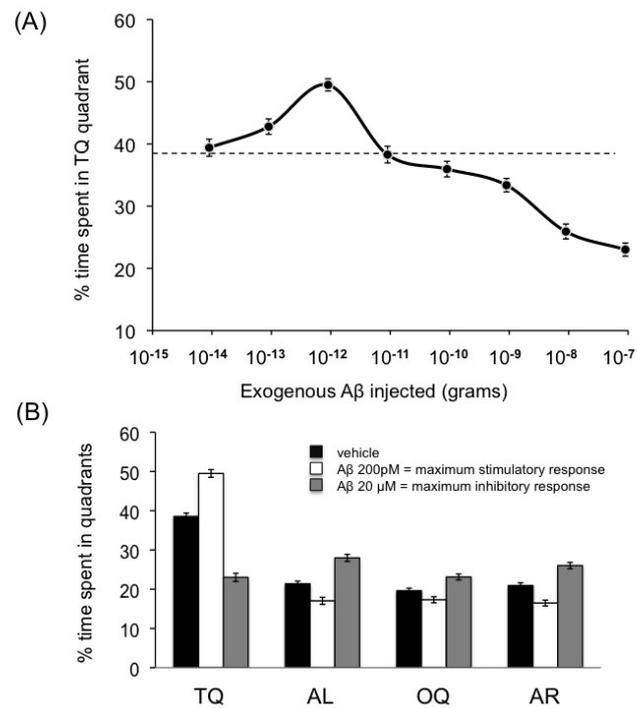
**Figura 14. L'Aβ42 ha un effetto ormetico sull'apprendimento spaziale testato tramite la MWM.** (A) Schema dell'impianto delle cannule intraippocampali secondo l'atlante Paxinos e la posizione e verifica attraverso iniezioni di blu di metilene (in basso). (B) La latenza registrata alla sesta sessione mostra una curva ormetica dove è possibile distinguere le due aree di stimolazione e di inibizione della memoria. (C) Il trattamento con Aβ 200 pM per 20 minuti prima dell'allenamento provoca una diminuzione del tempo necessario per raggiungere la piattaforma nascosta alla sesta sessione. (D) Elevate concentrazioni di Aβ inducono in aumento di latenza, che indica una diminuzione della memoria, nelle sessioni quinta e sesta.

Dopo la sesta sessione di apprendimento, abbiamo valutato la memoria spaziale di riferimento con il probe test (Schenk e Morris, 1985). Il miglioramento della memoria si è verificato nei topi trattati con basse dosi di A $\beta$ , come dimostrato dal fatto che hanno trascorso più tempo nel TQ rispetto ai topi trattati con alte dosi ( $41.78 \pm 2.28\%$  del tempo vs  $31.19 \pm 3.65\%$  di tempo;  $t_{(18)} = 2.455$ ,  $p = 0.025$ ; Figura 15). In particolare, la risposta stimolatoria massima è stata raggiunta a 200 pM ed è stata pari al 124% del controllo (TQ =  $47.70 \pm 4.77\%$  del tempo vs  $38.54 \pm 2.37\%$  del tempo,  $t_{(18)} = 2.829$ ,  $p = 0.011$  rispetto al veicolo e  $t_{(18)} = 5.940$ ,  $p < 0.0001$  rispetto agli altri quadranti; Figura 15). La risposta inibitoria massima è stata raggiunta a 20  $\mu$ M (TQ =  $25.92 \pm 4.77\%$  del tempo,  $t_{(16)} = 3.527$ ,  $p = 0.003$  rispetto al veicolo e  $t_{(14)} = 0.132$ ,  $p = 0.897$  rispetto ad altri quadranti; Figura 15).

#### **4.2.5 Discussione**

Il presente studio dimostra che il peptide A $\beta$  esercita un effetto ormetico sui fenomeni di plasticità sinaptica e memoria ippocampale. Ciò è in linea con i dati precedenti che dimostravano un doppio ruolo dell'A $\beta$  con concentrazioni basse che migliorano la plasticità sinaptica e la memoria, e livelli elevati che inducono il noto effetto negativo (Puzzo et al., 2008); ma anche con vari esperimenti che dimostrano l'effetto sia neurotossico che neurotrofico dell'A $\beta$ , a seconda della concentrazione utilizzata (Yankner et

al., 1990; Plant et al., 2003; Lopez-Toledano et al., 2004; Giuffrida et al., 2010; Calabrese, 2001a).



**Figura 15. L'Aβ42 ha un effetto ormetico sulla memoria di riferimento testata con la MWM.** (A) La memoria di riferimento ippocampale aumenta in seguito alla somministrazione di basse dosi di Aβ42, mentre alte dosi inducono disturbi della memoria, come mostrato dal tempo più o meno lungo trascorso nel TQ. (B) Il tempo trascorso nei vari quadranti si modifica in relazione alla concentrazione Aβ, con 200 pM che evoca la risposta stimolatoria massima e 20 pM che evoca la risposta inibitoria massima.

L'LTP e la memoria spaziale ippocampali sono state analizzate dopo il trattamento con differenti dosi di Aβ e ne è risultata una curva dose-risposta

a U invertita o meno in funzione del parametro misurato. È stato possibile distinguere una zona stimolatoria per valori al di sotto del livello di controllo, ed una zona di effetto negativo al di sopra. La risposta stimolante massima era di circa il 140% del controllo per l'effetto dell'A $\beta$  sull'LTP, e del 124% del controllo per la memoria di riferimento, coerentemente con la maggior parte degli studi che dimostrano che l'ampiezza dell'effetto ormetico è di solito non superiore al 130%-160% del controllo (Calabrese et al., 1999; Calabrese e Baldwin, 2002; 2003a). La larghezza della zona stimolatoria era contigua con il NOAEL, e c'era una distanza di 10 volte tra NOAEL ed effetto stimolatorio massimo (Calabrese e Baldwin, 2003a).

Quindi, la curva dose-risposta per l'A $\beta$  è bifasica ed ormetica, come per molti altri peptidi (Kastin e Weihong, 2008; Calabrese e Baldwin, 2003b). Queste osservazioni hanno implicazioni importanti nello studio dei meccanismi fisiologici della formazione della memoria e, d'altro canto, contribuiscono a comprendere la patogenesi e la terapia di malattie caratterizzate da un aumento di A $\beta$ , come la Malattia di Alzheimer. In effetti, dal momento che la risposta ormetica potrebbe rappresentare una risposta di adattamento conseguente a una perturbazione dell'omeostasi, la Malattia di Alzheimer potrebbe essere la conseguenza di uno squilibrio omeostatico del meccanismo di feedback fisiologico esercitato dalla stessa A $\beta$  sull'attività sinaptica.

Il target recettoriale su cui agisce l'A $\beta$  potrebbe essere rappresentato dai recettori dell'acetilcolina (AChRs), in quanto è stato ampiamente dimostrato che i recettori AChRs centrali, nicotinici (nAChR) e muscarinici (mAChRs), sono fondamentali per l'apprendimento e la memoria sia in condizioni fisiologiche e patologiche (Levey, 1996; Levin, 2002; Albuquerque et al., 2009). La perdita di neuroni colinergici o AChRs è stata riportata nei pazienti con Malattia di Alzheimer e, di conseguenza, l'aumento della trasmissione di Ach mediante l'uso di inibitori della colinesterasi è utilizzata come strategia terapeutica per migliorare la memoria in tali pazienti (Clader e Wang, 2005; Oddo e La Ferla, 2006), anche l'effetto di tali farmaci è modesto ed hanno diversi effetti collaterali. Sia i mAChR che i nAChR sono coinvolti nella Malattia di Alzheimer. L'ippocampo è un obiettivo importante per le influenze dei nAChR sulla memoria, e indirizzare la terapia sugli  $\alpha$ 7-nAChR potrebbe ridurre i sintomi AD (Ondrejcek et al., 2010). Inoltre, in modelli transgenici di topi con Malattia di Alzheimer è stata dimostrata una diminuzione degli  $\alpha$ 7-nAChR (Oddo e La Ferla, 2006) e recentemente è stata trovata una correlazione tra varianti genetiche degli  $\alpha$ 7-nAChR e diverse forme di demenza, tra cui la Malattia di Alzheimer (Fehér et al., 2009). Abbiamo recentemente dimostrato che l'A $\beta$  endogena è necessaria per la plasticità sinaptica e la memoria (Puzzo et al., 2011). Inoltre, sia l'effetto positivo esplicito dalla somministrazione del peptide a basse dosi, che la sua funzione endogena sono mediate dagli  $\alpha$ 7-nAChR (Puzzo et al., 2008; 2011). Il legame tra A $\beta$  e  $\alpha$ 7-nAChR è stato anche

evidenziato in studi che dimostrano che l'A $\beta$  può legarsi agli  $\alpha$ 7-nAChR (Wang et al., 2000) o potrebbe regolare la funzione attraverso il legame con i lipidi di membrana. Per di più, l'A $\beta$  potrebbe agire sia come agonista (Fodero et al., 2004) che antagonista degli  $\alpha$ 7-nAChR (Grassi et al., 2003), in relazione alla concentrazione utilizzata (Dineley et al., 2001; 2002).

Resta da chiarire se questo doppio effetto positivo-negativo possa essere dovuto a cambiamenti della struttura della proteina, poiché concentrazioni maggiori favorirebbero la formazione di oligomeri. Bisogna però sottolineare che, nonostante per i nostri esperimenti sia stato utilizzato un composto contenente sia monomeri che oligomeri, è estremamente difficile conoscere l'esatta composizione delle soluzioni di A $\beta$ , di conseguenza, la specie e la molarità cui sono esposti gli ippocampi, sia in vitro che in vivo. Infatti: i) l'A $\beta$  cambia facilmente la sua conformazione dal momento in cui raggiunge il tessuto cerebrale dopo la sua preparazione iniziale; ii) la dose iniettata in vivo viene diluita dal liquido cefalorachidiano ma si aggiunge anche ai livelli basali di A $\beta$  endogena murina e può aumentarne le concentrazioni; iii) anche se i nostri esperimenti sono sempre stati eseguiti utilizzando materiali di polipropilene ritenuti affidabili per eseguire accurate misurazioni di A $\beta$ , una piccola quantità del peptide potrebbe restare nei tubi, modificando la concentrazione reale. Tuttavia, in un precedente articolo (Puzzo et al., 2011) abbiamo dimostrato che basse concentrazioni di A $\beta$  monomeriche non influenzano l'LTP.

Resta da stabilire se questi effetti siano mediati da un'interazione fisica diretta del peptide con gli nAChR, e se una singola specie di A $\beta$  possa essere responsabile di questi effetti.

Concludendo, possiamo affermare che il ruolo fisiopatologico dell'A $\beta$  è di fondamentale importanza per comprendere meglio la patogenesi della malattia e per migliorare le strategie terapeutiche. Infatti, nonostante siano in corso diverse sperimentazioni al fine di ridurre la quantità di A $\beta$  (Dominguez e De Strooper, 2002), questo approccio è risultato fallimentare. Di recente, gli studi multicentrici per valutare l'efficacia dell'inibitore delle  $\gamma$ -secretasi (Semagacestat, Eli Lilly) volto a inibire la produzione di A $\beta$  è stato bloccato perchè, oltre ai diversi effetti collaterali, i pazienti trattati hanno mostrato una riduzione dei fenomeni cognitivi (Cummings, 2010).

Il *primum movens* eziologico della Malattia di Alzheimer è ancora sconosciuto, probabilmente a causa del fatto che è una patologia multifattoriale che coinvolge sia aspetti genetici che ambientali. Sebbene la conoscenza dell'effetto ormetico dell'A $\beta$  indichi che dosi molto basse del peptide potrebbero servire a migliorare la memoria, è necessario effettuare diversi altri studi per poter utilizzare il peptide nei pazienti malati. I nostri studi comunque suggeriscono di avere cautela nell'utilizzare terapie anti-A $\beta$ , specialmente sui soggetti sani, considerata l'importante funzione fisiologica del peptide.

## BIBLIOGRAFIA

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.

Bailey CH, Chen M. 1983. Morphological basic of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220:91-93.

Berezovska O, Lleo A, Herl LD, et al. 2005. Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J Neurosci* 25:3009-17.

Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Calabrese EJ. 2001a. Amyloid  $\beta$ -Peptide: Biphasic Dose Responses. *Crit Rev Toxicol* 31:605-606.

Calabrese EJ. 2001b. Nitric Oxide: Biphasic Dose Responses. *Crit Rev Toxicol* 31:489-501.

Calabrese EJ. 2008a. Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol* 66:594-617.

Calabrese EJ. 2008b. Neuroscience and hormesis: overview and general findings. *Crit Rev Toxicol* 38:49-52.

Calabrese EJ. 2009. Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Arch Toxicol* 83:227-47.

Calabrese EJ. 2010. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum Exp Toxicol* 29:249-61.

Calabrese EJ, Baldwin LA. 1998. A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Hum Exp Toxic* 17:353-364.

Calabrese EJ, Baldwin LA. 2001. U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. *Annu Rev Public Health* 22:15-33.

Calabrese EJ, Baldwin LA. 2002. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21:91-97.

- Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003a. Hormesis: the dose-response devolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:175-97.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003b. Peptides and Hormesis. *Crit Rev Toxicol* 33:355-405.
- Calabrese EJ, Baldwin LA, Holland CD. 1999. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Anal* 19:261-81.
- Carlson NR. 2002. *Fisiologia del comportamento*. Piccin ed, Padova.
- Chang FF and Greenhough WT. 1984. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 309:35-46.
- Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. 2010. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromol Med* 12:1-12.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. 2008. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58:42-51.
- Citron M. 2004. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci* 25:92-7.
- Clader JW, Wang Y. 2005 Muscarinic receptor agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 11:3353-61.
- Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, et al. 1997. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport* 8:3213-17.
- Cummings J. 2010. What can be inferred from the interruption of the semagacestat trial for treatment of Alzheimer's disease? *Biol Psych* 68:876-8.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, et al. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90:1-13.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, et al. 2001. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125-33.

- Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. 2002. Beta-amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 277:25056-25061.
- Dominguez DI, De Strooper B. 2002. Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 23:324-30.
- Duncan AJ, Heales SJ. 2005. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 26:67-96.
- Fehér A, Juhász A, Rimanóczy A, et al. 2009. Association between a genetic variant of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor subunit and four types of dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:56-62.
- Fezoui Y, Teplow DB. 2002. Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization. *J Biol Chem* 277:36948-54.
- Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, et al. 2005. Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics* 6:85-9.
- Fodero LR, Mok SS, Losic D, et al. 2004. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors mediate an Aβ(1-42)-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones. *J Neurochem* 88:1186-1193.
- Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115:1121-29.
- Gasbarri A, Tomaz C. 2005. *La Memoria*. Aspetti Neurofisiologici, Ed. Edises, Milano.
- Ghirardi M, Casadio A. 2002. Le basi molecolari neuronali e molecolari della memoria. *Le Scienze* (dossier "La memoria")14:4-11.
- Giuffrida ML, Caraci F, De Bona P, et al. 2010. The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev Neurosci* 21:83-93.
- Grassi F, Palma E, Tonini R, et al. 2003. Amyloid beta(1-42) peptide alters the gating of human and mouse alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J Physiol* 547:147-157.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359:322-5.

- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-6.
- He W, Barrow CJ. 1999. The A beta 3-pyroglutanyl and 11-pyroglutanyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*, 38:10871-77.
- Hebb DO.1949. *The organization of Behaviour: A neuropsychological theory*. Wiley, New York.
- Huber G, Martin JR, Loffler J, Moreau JL. 1993. Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. *Brain Res*, 603:348-52.
- Ishida A, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP. 1997. Secreted form of  $\beta$ -amyloid precursor protein shifts the frequency dependence for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*, 8: 2133-2137.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kastin, A.J., Pan, W., 2008. Peptides and Hormesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 629-631.
- Kendig, E.L., Le, H.H., Belcher, S.M., 2010. Defining hormesis: evaluation of a complex concentration response phenomenon. *Int. J. Toxicol.* 29, 235-46.
- Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, et al. 1996. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem*, 271:4077-81.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, et al. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.
- Levey AI. 1996. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13541-6.
- Levin ED. 2002. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53:633-40.

- Lopez-Toledano MA, Shelanski, ML. 2004. Neurogenic effect of  $\beta$ -amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* 24:5439-5444.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, et al. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7951-5.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227–37.
- Lupien SJ. 2005. Hormetic Influence of Glucocorticoids on Human Memory. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* 3:23–56.
- Ma H, Lesné S, Kotilinek L, et al. 2007. Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8167-8172.
- Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA. 1991. Mechanism underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annu Rev Neurosci* 14:1379-1397.
- Mattson MP. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-1132.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631–639.
- Mattson MP. 2008a. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144:97-112.
- Mattson MP. 2008b. Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Hum Exp Toxicol* 27:155–162.
- Miller GA. 1956. The magical number seven, plus or minus two: Some limits on our capacity for processing information. *Psychological Review* 63:81-97.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, et al. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, et al. 2000: Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus* 10:352-368.
- Nitsch RM, Farber SA, Growdon JH, et al. 1993. Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5191-3.

- O'Mara SM, Commins S, Anderson M. 2000. Synaptic plasticity of the hippocampal area CA1-subiculum projection: implications for theories of memory. *Hippocampus* 10:447-456.
- Oddo S, La Ferla FM. 2006. The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Physiol (Paris)* 99:172-179.
- Ondrejcek T, Klyubin I, Hu NW, et al. 2010. Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -protein and synaptic function. *Neuromol Med* 12:13-26.
- Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, et al. 1993. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-66.
- Paxinos G. 1998. *Mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York.
- Plant LD, Boyl JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. 2003. The production of amyloid- $\beta$  peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23:5531-5535.
- Podlisny MB, Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39:10831-39.
- Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, et al. 2005. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 25:6887-97.
- Puzzo D, Palmeri A, Arancio O. 2006. Involvement of the nitric oxide pathway in synaptic dysfunction following amyloid elevation in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 17:497-523.
- Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, et al. 2011. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819-30.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, et al. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537-14545.
- Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, et al. 1995. Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* 3:2157-67.

- Randall AD, Witton J, Booth C, et al. 2010. The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59:243-67.
- Renbaum P, Levy-Lahad E. 1998. Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci* 54:910-9.
- Rezvani AH: Involvement of the NMDA System in Learning and Memory, in: Levin ED, Buccafusco JJ. 2006, (Eds.), *Animal Models of Cognitive Impairment*. CRC Press, Boca Raton (FL), chapter 4.
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, et al. 1996. Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:20631-35.
- Rossor MN, Newman S, Frackowiak RS, et al. 1993. Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann NY Acad Sci USA* 695:198-202.
- Russo C, Dolcini V, Salis S, et al. 2002. Signal transduction through tyrosine-phosphorylated Cterminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277: 35282-88.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, et al. 1995. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14:457-66.
- Salbaum JM, Ruddle FH. 1994. Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *Exp Zool* 269:116-27.
- Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V. 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 42:23-36.
- Schenk F, Morris RG. 1985. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res* 58:11-28.
- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, et al. 1999. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38:349-359.
- Selkoe DJ. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.

- Spires TL, Hyman BT. 2005. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* 2:423-37.
- St George-Hyslop PH. 2000. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 47:183-99.
- Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, et al. 1994. Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1598-603.
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, et al. 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 3:159-68.
- Teng E, Squire LR. 1999. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400:675-677.
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O. 2004. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55:801-814.
- Turner AM and Greenhough WT. 1985. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res*, 329:195-203.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39:10831–39.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, et al. 2000. Beta-amyloid(1–42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275:5626-5632.
- Wang H, Song L, Laird F, et al. 2008. BACE1 knock-outs display deficits in activity-dependent potentiation of synaptic transmission at mossy fiber to CA3 synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 28:8677-8681.
- Wieloch T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, et al. 2002. *Neuroscienze*. Casa ed. Edises, Napoli.



## RINGRAZIAMENTI

Alla mia famiglia che in questi anni di dottorato mi è stata accanto e ha lasciato che io seguissi la ricerca, anche se diversa dal mio percorso di studi, supportandomi con amore e comprensione.

Alla mia ragazza Alessandra che mi ha sopportato e aiutato nella stesura di questa tesi ed è stata la mia luce nei miei attimi di “buio”.

Al Prof. Agostino Palmeri, mio tutor e mentore, studioso e gentiluomo, uomo di grande sapienza che mi ha insegnato ad amare la scienza, e che è stato come un secondo “padre”. Lo ringrazio per la fiducia che ha riposto in me e per l'opportunità che mi ha dato nell'introdurmi nel mondo universitario.

Alla Prof.ssa Daniela Puzzo, mia seconda tutor, mente brillante e geniale che ha saputo coniugare l'espressione artistica con la scienza. Grande ed estimatissima ricercatrice, sempre presente e disponibile, un esempio per tutti coloro che credono nella ricerca.

Alla Dott.ssa Lucy Privitera, ricercatrice, collega ed amica che mi è stata vicina nei momenti di sconforto e che, con grande pazienza e professionalità, mi ha introdotto nel mondo della scienza facendomi amare.

Al mio collega ed amico Dott. Daniele Alabiso con il quale ho condiviso ed ho “respirato” la vita di laboratorio. Compagno di “viaggio” unico e incredibile che mi ha impreziosito con i suoi saggi consigli.

Alla mia grande amica e trainer degli stabulari Dott.ssa Maria Grazia D'Antona che mi ha introdotto nel mondo della sperimentazione e sul benessere degli animali da laboratorio.

Agli amici, Dott. Gaetano Parisi, Dott. Marco Abate, e a tutti quelli che mi hanno sopportato in questi anni di dottorato.