



Università degli Studi di Genova

Corso di Dottorato di Medicina Sperimentale

Curriculum di Farmacologia e Tossicologia

XXX CICLO

***Effetto dell'Ambiente Arricchito in un modello animale di
Encefalomielite Autoimmune Sperimentale e
nell'invecchiamento***

Candidato: Tommaso Bonfiglio

RELATRICE: Prof. Anna Maria Pittaluga

PARTE I

INTRODUZIONE

1. RISERVA CEREBRALE E COGNITIVA	1
1.1 TEORIA DELLA RISERVA CEREBRALE	3
1.2 TEORIA DELLA RISERVA COGNITIVA	6
1.3 RISERVA COGNITIVA E AMBIENTE ARRICCHITO	12
2. SCLEROSI MULTIPLA	16
2.1 PATOGENESI	17
2.2 EZIOLOGIA	19
2.3 SINTOMATOLOGIA	21
2.4 DIAGNOSI	23
2.5 VARIANTI CLINICHE	24
2.5.1 BENIGNA	
2.5.2 FORMA RECIDIVANTE-REMITTENTE (SM-RR)	
2.5.3 FORMA PROGRESSIVA SECONDARIA (SM-SP)	
2.5.4 FORMA PROGRESSIVA PRIMARIA (SM-PP)	
2.5.5 FORMA PROGRESSIVA RECIDIVANTE (SM-RP)	
2.6 MODELLI ANIMALI DI SCLEROSI MULTIPLA	26
2.6.1 MODELLO VIRALE	27
2.6.2 MODELLO INDOTTO DA TOSSINE	28
2.6.3 ENCEFALOMIELITE AUTOIMMUNE SPERIMENTALE (EAE)	29
3. AMBIENTE ARRICCHITO E SCLEROSI MULTIPLA	31

RISULTATI

4.1 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUI SINTOMI CLINICI E SUL PESO IN TOPI EAE.	35
4.2 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUL COMPORTAMENTO ANSIOSO E SULL'ATTIVITÀ MOTORIA DI TOPI EAE	38
4.3 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUI PROCESSI DI DEMIELINIZZAZIONE ED INFIAMMAZIONE NELLA CORTECCIA DI TOPO EAE	42
4.4 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUL RILASCIO DI GLUTAMMATO ENDOGENO DA TERMINALI NERVOSI DI TOPI CONTROLLO E EAE	44
4.5 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SULLA PRODUZIONE ENDOGENA DI cAMP IN TERMINAZIONI NERVOSE CORTICALI DA TOPI CONTROLLO E EAE	46
4.6 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SULL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DEL COMPLESSO SNARE IN TERMINAZIONI CORTICALI DA TOPI CONTROLLI ED EAE	48

DISCUSSIONE	51
--------------------	----

PARTE II

INTRODUZIONE

5. INVECCHIAMENTO	
5. ASPETTI GENERALI	56
5.1 INVECCHIAMENTO E TRASMISSIONE CHIMICA NEL CERVELLO	58
5.2 RISERVA COGNITIVA E INVECCHIAMENTO	61

RISULTATI

6.1 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUL PESO NELL'INVECCHIAMENTO	65
6.2 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SUL COMPORTAMENTO E SULL'ATTIVITÀ FISICA IN TOPI GIOVANI E ANZIANI	67
6.3 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SULLA TRASMISSIONE GLUTAMMATERGICA NEL SNC DI TOPI GIOVANI E ANZIANI	69
6.4 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SULLA TRASMISSIONE GABAERGICA NEL SNC DI TOPI GIOVANI E ANZIANI	71
6.5 EFFETTO DELL'AMBIENTE ARRICCHITO SULLA TRASMISSIONE NORADRENERGICA NEL SNC DI TOPI GIOVANI E ANZIANI	73

DISCUSSIONE	75
--------------------	----

MATERIALI E METODI

7.1 ANIMALI E ARRICCHIMENTO AMBIENTALE	83
7.2 EAE E CLINICAL SCORE	86
7.3 TEST COMPORTAMENTALI	87
7.3.1 OPEN FIELD TEST	
7.3.2 LIGHT-DARK TEST	
7.3.3 HOLE BOARD TEST	
7.4 PREPARAZIONE DEI SINAPTOSOMI	88
7.5 ESPERIMENTO DI RILASCIO	89
7.6 DETERMINAZIONE DI AMMINOACIDI ENDOGENI	90
7.7 QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI ENDOGENI SINAPTOSOMIALI DI cAMP	91
7.8 COLORAZIONI ISTOLOGICHE	92
7.8.1 LUXOL FAST BLUE	
7.8.2 EMATOSSILINA E EOSINA	
7.9 WESTERN BLOT	93
7.10 CALCOLI ED ANALISI STATISTICHE	94

BIBLIOGRAFIA	95
ABBREVIAZIONI	117
ADDENDUM	120
RINGRAZIAMENTI	122

INTRODUZIONE

1. Riserva cerebrale e cognitiva

Negli ultimi decenni sono stati fatti notevoli progressi nel comprendere come fattori genetici ed eventi molecolari e/o cellulari siano alla base di un largo numero di patologie del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Contemporaneamente, evidenze epidemiologiche e numerosi studi condotti in modelli animali suggeriscono come gran parte delle patologie neurodegenerative possano essere modulate positivamente da fattori ambientali, dall'attività fisica, culturale e dalle interazioni sociali. Questi stimoli garantirebbero una maggiore resistenza ad eventi dannosi coinvolti nell'insorgenza e nello sviluppo di molte delle patologie neurodegenerative.

Ad esempio, diversi studi hanno dimostrato come, in pazienti affetti da malattia di Alzheimer (dall'inglese *Alzheimer disease*, AD), le alterazioni patologico-funzionali a carico del SNC non sempre siano accompagnate dall'insorgenza di manifestazione cliniche. Al contrario, in alcuni di questi pazienti si osservano, nonostante il danno cerebrale conclamato, deficit cognitivi di minore gravità.

Nel tentativo di dare un razionale a questa discrepanza è stato ipotizzato che l'incongruenza tra la severità del danno a carico del SNC e la sua espressione clinica sia determinata da eventi molecolari e/o cellulari in grado di rafforzare i meccanismi di resilienza del SNC. Per definire un meccanismo cellulare responsabile dell'insorgenza di questa resistenza si è proposto il concetto del fenomeno della "*riserva cerebrale e/o cognitiva*".

Con il termine di “riserva cerebrale” ci si riferisce ad un processo passivo, su base genetica in grado di assicurare la capacità di resistenza ad una condizione dannosa. Questa capacità di resistenza viene quantificata indirettamente, valutando quanto sia elevata la gravità del danno necessario al raggiungimento di una condizione in cui i sintomi clinici tipici di una patologia neurodegenerativa diventino palesi.

Con il termine “riserva cognitiva”, invece, ci si riferisce a processi attivi, acquisibili in vita e non ereditari, in grado di determinare una risposta protettiva basata sul migliore utilizzo possibile delle reti neuronali per contrastare o compensare una alterazione sinaptica centrale responsabile dell’insorgenza della sintomatologia clinica stessa.

1.1 Teoria della riserva cerebrale

Il concetto di “riserva cerebrale” fu introdotto per la prima volta da Katzman e collaboratori nel 1989.

Gli autori avevano eseguito analisi autoptiche sul SNC di 137 persone con un'età media di 85 anni, che presentavano quadri sintomatologici riconducibili ad una condizione di demenza. Questi pazienti erano stati seguiti per almeno 5 anni dai ricercatori, che, in quel periodo, avevano avuto modo di valutare con test attitudinali e di apprendimento / memoria la capacità cognitiva di ogni singolo individuo. Il 78% di questi pazienti presentava una sintomatologia tipica di un quadro patologico di demenza senile, di questi il 55% era affetto da AD. L'osservazione inaspettata ed interessante fu che 10 tra questi pazienti, pur presentando alla loro morte caratteristiche anatomico-patologiche autoptiche tipiche di un quadro conclamato di AD, avevano mantenuto nei test cognitivi prestazioni paragonabili e/o superiori a quelle ottenute mediamente da soggetti sani, di pari età, non affetti da patologie neurodegenerative.

Nel tentativo di dare un razionale all'incongruenza tra il quadro anatomico-patologico (obiettivamente grave) e la mancanza di una sintomatologia di demenza conclamata, i ricercatori proposero per la prima volta la teoria della “*riserva cerebrale*”.

Essi ipotizzarono cioè che quei dieci pazienti avessero una maggiore capacità di resistenza all'insorgenza dei deficit centrali, grazie ad una predisposizione genica che favoriva le funzioni cerebrali. Questa capacità di resistenza al danno era accompagnata da segni anatomici ricorrenti quali ad esempio un volume cerebrale maggiore rispetto alla norma. Questa caratteristica fu discussa come predittiva di un aumentato numero di neuroni e di connessioni sinaptiche a disposizione dell'individuo.

La teoria della “Riserva cerebrale” ipotizza che l'uomo ha in dotazione un patrimonio genetico che favorisce lo sviluppo ed il mantenimento della rete neuronale, condizione che fornisce una sorta di ‘resistenza’ all'insorgenza del danno centrale e quindi possa ritardare / tamponare il decadimento senile.

A partire da questa prima osservazione seguirono altri studi che confermarono i risultati e l'ipotesi di Katzman. Nel 1999 Davis e collaboratori, sulla base di riscontri autoptici, dimostrarono come una buona parte di 59 persone anziane che erano state seguite longitudinalmente, per 8 anni, pur presentando a livello cerebrale una quantità abbondante di placche senili e/o grovigli neurofibrillari, non avevano sviluppato in vita deficit cognitivi. Queste osservazioni confermarono l'ipotesi di Katzman, ma portarono anche ad un ulteriore sviluppo della teoria della "riserva cerebrale" ed in particolare alla proposta dell'esistenza di una "soglia" di resistenza al danno, oltre la quale si osserva il manifestarsi dei sintomi clinici.

Partendo da questa definizione, Satz (1993) introdusse il concetto di *differenze interindividuali*.

Satz notò infatti che una condizione dannosa a livello cerebrale può produrre un disturbo clinico-funzionale e/o un sintomo palese in un paziente non provvisto della "riserva cerebrale". Ciò avviene quando questo insulto determina un danno che oltrepassa la cosiddetta "soglia critica" di resistenza. Lo stesso stimolo, però, può non essere in grado di indurre un sintomo clinico in un paziente con una maggiore capacità di resistenza e quindi provvisto di una soglia critica più elevata, non facilmente superabile. Queste condizioni permetterebbero il mantenimento delle capacità cerebrali nel secondo paziente e non nel primo.

Basandoci su queste informazioni e su altre osservazioni in letteratura si può quindi concludere che con il termine "riserva cerebrale" ci si riferisce di fatto ad un complesso di eventi/azioni passive, non inducibili, bensì ereditarie, che difendono l'individuo da eventi patologici. Questo complesso di eventi determina il livello della soglia critica oltre il quale ciascun individuo manifesta inevitabilmente i sintomi patologici.

Nel tentativo di proporre un metodo per evidenziare e possibilmente quantificare nel soggetto la presenza di riserva cerebrale, vennero proposti parametri anatomici di facile quantificazione, come ad esempio la circonferenza cranica (Mortimer et al., 2003), il volume cerebrale (Fotinos et al., 2008) o la densità sinaptica (Bigio et al., 2002). Effettivamente si riscontrò come pazienti con valori elevati per questi parametri manifestassero più tardi i deficit cognitivi associati ai processi degenerativi rispetto ad individui normodotati, suggerendo quindi indirettamente come queste caratteristiche anatomo-funzionali potessero essere considerate predittive di una “resilienza” al danno cerebrale.

1.2 Teoria della riserva cognitiva

L'enunciazione della teoria della "riserva cerebrale" pose la questione se fosse possibile indurre un aumento della "soglia critica" della resistenza al danno cerebrale in pazienti che non avevano caratteristiche genetiche tali da sviluppare spontaneamente questa capacità.

Questa ipotesi portò all'enunciazione del concetto di "riserva cognitiva".

Con questo termine ci si riferisce ad una resistenza cerebrale attiva, cioè inducibile, in grado di determinare le differenze qualitative e quantitative della capacità degli individui di gestire le proprie capacità cerebrali.

La "riserva cognitiva" non presuppone l'esistenza di una soglia critica comune a tutti gli individui, ma ipotizza che i meccanismi con cui il cervello fronteggia l'insorgenza di un danno in risposta ad un insulto siano modulabili e possano variare in efficienza ed intensità in maniera strettamente individuale.

Questi meccanismi determinano l'insorgenza di processi compensatori (Stern, 2002) di diversa efficienza ed intensità, che permettono agli individui di sostenere il danno cerebrale e di mantenere adeguatamente la funzionalità del SNC.

In pratica, sulla base della teoria della "riserva cognitiva", è possibile ipotizzare che due pazienti che presentano lo stesso livello di "riserva cerebrale", ma un differente grado di "riserva cognitiva" possano sopportare in maniera diversa il danno indotto da una lesione cerebrale di pari intensità.

Come anticipato, il modello della "riserva cognitiva" si basa su un modello di acquisizione attiva della resistenza al danno. Si ipotizza che l'esperienza del soggetto nel corso della vita (includendo il livello di scolarità, l'occupazione, le attività nel tempo libero, ma anche lo status socio-economico e la tipologia di istruzione seguita) favorisca l'insorgenza e l'entità di questa resistenza cerebrale (Manly et al., 2005).

Il livello della "riserva cognitiva" è quindi variabile nel corso della vita ed è il risultato di una combinazione di fattori protettivi a cui ogni individuo può essere esposto.

La relazione che lega la “riserva cognitiva” alla AD si fonda sulla progressione con cui questa forma di demenza si manifesta. Si ipotizza che la riserva cognitiva ritardi l’insorgenza dei deficit clinici ed in particolare, rallentando la progressione della demenza e riducendone l’incidenza e la gravità.

Uno dei primi studi epidemiologici che tentò di confermare l’ipotesi della inducibilità della “riserva cognitiva” fu lo studio condotto da Stern e collaboratori (1994). Questi autori seguirono per 4 anni un gruppo di 592 anziani sopra i 60 anni, nel tentativo di definire i fattori ambientali che influivano maggiormente sullo sviluppo della demenza.

I soggetti con basso livello d’istruzione dimostrarono un rischio relativo di insorgenza del quadro patologico 2.2 volte superiore rispetto a quello di coloro che possedevano una scolarità superiore agli 8 anni. Valutando invece le attività svolte quotidianamente dagli anziani (attività che quindi avevano un’ influenza relativamente recente nella loro vita e nella formazione della loro memoria), si riscontrò che svago (come leggere, praticare giochi da tavola) ed attività sociali (andare in visita agli amici) permettevano a coloro che le effettuavano di beneficiare di una riduzione del 38% della probabilità di sviluppare demenza.

La metanalisi di diversi lavori epidemiologici descritta da Valenzuela e Sachedev (2009) sull’effetto dell’istruzione, del lavoro e dell’attività lavorativa nello sviluppo di demenza ha confermato il contributo di ciascuno di queste attività nel definire la “riserva cognitiva”. In particolari alcuni studi hanno dimostrato come l’istruzione abbia un ruolo protettivo. Inoltre, quasi tutti gli studi considerati concordavano sull’effetto benefico delle attività di svago. Le due attività sono in grado di determinare una riduzione del 46% dell’incidenza delle patologie dementigene in soggetti con alta riserva cognitiva.

L’analisi degli studi epidemiologici a disposizione ha però portato ad evidenziare un effetto apparentemente paradossale. Infatti è stato dimostrato come, una volta emersi i sintomi di AD, coloro che posseggono una maggiore riserva cognitiva vanno incontro ad un decorso più rapido, caratterizzato da una sintomatologia più grave rispetto agli altri pazienti (Stern et al., 1995). L’osservazione suggerisce che quando si manifestano i sintomi clinici in pazienti con scolarità maggiore e migliore riuscita lavorativa, si osserva un declino cognitivo più rapido rispetto alle controparti con valori più bassi di “riserva cognitiva”, sia che essi presentino un livello minimo di danno cognitivo, sia che essi soffrano di una diffusa AD (Scarmeas et al., 2006; Helzner et al., 2007). Apparentemente, anche le attività di svago

praticate predisponavano ad un declino più rapido in pazienti che manifestavano i sintomi clinici dell' AD (Helzner et al., 2007).

La spiegazione di questi osservazioni paradossale (Stern, 2009) si basa proprio sulla capacità della riserva cognitiva di consentire al paziente di tollerare un maggior grado di danno dovuto all'insorgere della patologia, ritardando l'insorgenza dei sintomi clinici. Quando però tali deficit divengono evidenti, la gravità del quadro anatomo-patologico e la progressione dei disturbi sono talmente avanzate rispetto agli altri pazienti, che i processi di resistenza vengono meno facendo accelerare il decorso della patologia.

Nello stesso anno Stern introdusse due nuovi concetti: il concetto della *riserva neurale*, per dare un razionale alle differenze inter-individuali nei pazienti sani, e il concetto della *compensazione neurale*, concetto che si riferisce alle alterazioni dei processi cognitivi che si verificano in presenza di una patologia cerebrale.

La riserva neurale si riferisce alle differenze individuali, in termini di efficienza, capacità o flessibilità, che regolano l'uso delle reti di connessioni funzionali e dei processi cognitivi in soggetti sani. Un individuo, le cui reti di connessione sono più efficienti o più flessibili, ha una maggiore capacità di utilizzo di tali reti e può essere in grado di reagire meglio qualora si presenti un evento dannoso.

La compensazione neurale si riferisce, invece, alle differenze individuali nell'uso di reti di connessione funzionali e di processi cognitivi alternativi, normalmente non utilizzati in condizioni fisiologiche. La compensazione neuronale, intesa come abilità di compensare le alterazioni patologiche delle reti di connessione permetterebbe di mantenere e/o di migliorare la prestazione comportamentale.

Se la riserva cognitiva è un evento non su base genetica, ereditabile, bensì inducibile, si pone il problema se e come sia possibile favorirne l'espressione.

Per definire come si costruisce la riserva cognitiva ed eventualmente come essa può aiutare a fronteggiare le malattie neurodegenerative, è fondamentale studiare i meccanismi di induzione della *riserva neurale* e della *compensazione neurale* nei soggetti sani.

A tal proposito sono stati pubblicati 4 differenti articoli che dimostrano come la riserva cognitiva possa modulare e modificare le connessioni cerebrali.

Il primo studio fu pubblicato nel 2006 da Eleanor Maguire.

Soggetti dello studio furono i tassisti londinesi, in quanto individui sottoposti ad una attività mnemonica importante. Per ottenere la licenza infatti, i tassisti di Londra devono imparare a memoria la complessa struttura delle circa 25000 strade comprese entro un raggio di 6 miglia dalla stazione ferroviaria di Charing Cross. Devono inoltre superare un test chiamato "*The Knowledge*", la cui preparazione richiede dai tre ai quattro anni. I primi studi hanno rilevato che i tassisti londinesi che si erano sottoposti alla preparazione per il test possedevano un maggior volume di materia grigia nella regione posteriore dell'ippocampo e un volume minore nella regione anteriore rispetto a soggetti guidatori, non tassisti, non preparati per il test, presi come controllo. La variazione della conformazione ippocampale diventava più marcata nei tassisti con più anni lavorativi alle spalle, suggerendo che l'adattamento cerebrale indotto dalla guida tra le strade di Londra e dall'esercizio mentale potesse essere cumulativo nel tempo.

Per escludere la possibilità che le differenze strutturali potessero essere precedenti alla selezione, rendendo quindi alcuni soggetti maggiormente predisposti a diventare dei guidatori di taxi, gli autori condussero un'ulteriore ricerca su un campione di 79 aspiranti tassisti, confrontando le scansioni dei loro cervelli prima e dopo il periodo di preparazione. All'inizio dello studio tutti i candidati presentavano ippocampi di dimensioni confrontabili ed avevano ottenuto nei test mnemonici dei risultati simili a quelli dei soggetti di controllo. Quattro anni dopo, l'analisi in risonanza magnetica nucleare rivelò che gli ippocampi dei candidati che avevano superato la selezione presentavano volumi maggiori nella regione posteriore. Nessun cambiamento anatomico significativo si osservò nei cervelli dei respinti.

Secondo gli autori, questi risultati potrebbero essere una conferma di come certi esercizi cognitivi e l'apprendimento intensivo possano modificare la morfologia stessa del cervello.

Due studi legati al cambiamento della morfologia del cervello furono effettuati da Bogdan Dragansky; il primo effettuato nel 2004 prendeva in esame i giocolieri, il secondo, pubblicato nel 2006, aveva come soggetti presi in esame degli studenti di medicina.

Nel primo studio, l'autore dimostrò come tra due gruppi di persone, di cui un gruppo allenato per giochi di giocoleria e uno non allenato, quelli che avevano ricevuto un allenamento presentavano dei miglioramenti a livello dei processi di memorizzazione delle informazioni spazio-temporali e dei processi di anticipazione del movimento degli oggetti. Le analisi del cervello con tecnica di risonanza magnetica confermarono che tali modifiche erano determinate da un incremento dei volumi della corteccia occipitale, area cerebrale preposta al governo dei movimenti oculari, movimenti che sono sollecitati dall'attività di giocoleria.

Il secondo lavoro dimostrò come lo studio intensivo di studenti in vista di un esame di medicina induca modificazioni strutturali a livello della sostanza grigia della corteccia parietale e dell'ippocampo. Questo aumento non solo compare durante il periodo dello studio, ma si mantiene a tre mesi di distanza, con effetto duraturo nel tempo.

Ma uno degli studi più eclatanti che conferma l'ipotesi di come sia possibile indurre la riserva cognitiva è il cosiddetto *Nun Study* (studio delle suore) effettuato da Snowdon nel 1986.

Lo studio vide la partecipazione di 678 suore, tutte oltre i 75 anni, alcune già con i sintomi dell'AD, osservate per le loro capacità cognitive sia alla loro veneranda età sia in età giovanile. Bisogna considerare lo stile di vita delle suore nella loro scelta di vita conventuale, le suore accettano di adottare uno stile di vita ben definito, ripetitivo nel tempo, da cui molti fattori induttori possono essere esclusi, fornendo la sicurezza di una esposizione ad una stimolazione ambientale ripetitiva e costante. Nel corso dei decenni, le suore furono sottoposte a test cognitivi, e test fisico attitudinali. I ricercatori poterono analizzare i resoconti scritti dalle suore sulla loro vita nonché avere accesso alle valutazioni attitudinali e mentali ottenute al loro ingresso in Congregazione e conservate negli Archivi.

Le analisi effettuate su questi parametri permisero di quantificare sia la capacità ideativa che la complessità grammaticale, e quindi di definire il livello intellettuale e linguistico delle giovani suore.

Snowdon scoprì che le suore che avevano scritto saggi personali più complessi in gioventù, tendevano a non sviluppare demenze. Chi invece aveva scarse capacità linguistiche da giovane, manifestava questi sintomi da anziana. Il dato più eclatante fu che l'esame autoptico dei cervelli delle monache permise di stabilire una relazione diretta tra la gravità del quadro di AD nelle suore e la loro scarsa abilità linguistica in età giovanile.

Sulla base di queste osservazioni si sta quindi cercando di dimostrare come sia l'esercizio motorio che l'esercizio cognitivo siano in grado di modificare la struttura cerebrale a livello della sostanza grigia e, secondo studi più recenti, della sostanza bianca, proteggendo quindi l'individuo dai meccanismi neurodegenerativi.

Nonostante la riserva cerebrale e la riserva cognitiva siano state concepite come due modelli indipendenti, varie evidenze indicano che esse sono interdipendenti e tra loro connesse. Entrambi i tipi di riserva infatti condividono un aspetto fondamentale e cioè il fatto che le risorse accumulate durante la vita permettono all'individuo di mantenere un comportamento adeguato dal punto di vista funzionale.

Tali risorse sono il risultato della capacità del cervello di cambiare ed adattarsi, strutturalmente e funzionalmente, grazie all'interazione dinamica continua biologica (riserva cerebrale) ed ambientale (riserva cognitiva).

1.3 Riserva cognitiva ed ambiente arricchito.

Negli ultimi 50 anni, diverse pubblicazioni hanno dimostrato gli effetti positivi della stimolazione ambientale e dell'arricchimento sul cervello e sulle sue funzioni.

Tali effetti positivi sono dovuti alla capacità del cervello di modificarsi nel tempo grazie alla messa in opera di processi di plasticità neuronale che sono alla base di un potenziamento ed un consolidamento della rete neuronale.

Il concetto della plasticità neuronale fu formulato per primo da Hebb, il quale nel 1949 postulò che

“ Quando l'assone di una cellula A è abbastanza vicino alla cellula B da contribuire ripetutamente e in maniera duratura alla sua eccitazione, allora ha luogo in entrambi i neuroni un processo di crescita o di cambiamento metabolico tale per cui l'efficacia di A nell'eccitare B viene accresciuta”

ovvero

“due cellule o sistemi di cellule che sono ripetutamente attivati nello stesso tempo tenderanno a diventare «associate», così che l'attività in una facilita l'attività dell'altra” [Hebb 1949 p70].

In pratica Hebb ipotizzò l'esistenza di una plasticità cerebrale dipendente dall'uso: un cervello è in grado di modificarsi, con conseguente modificazione della funzione proporzionalmente all'attività cerebrale svolta.

La teoria di Hebb da allora è stata estesa ed include oggi diversi concetti di meccanismi plastici che possono svilupparsi in molti substrati anatomici ben definibili, quali sinapsi o interi neuroni.

Lo stesso Hebb fu il primo a descrivere gli effetti di un ambiente arricchito (in inglese *Enriched environment*, EE) osservando le variazioni comportamentali in un gruppo di ratti cresciuti come animali domestici e liberi quindi di muoversi nella sua casa rispetto a quelli stabulati in laboratorio.

Il primo neuroscienziato a proporre l'EE come stimolazione sperimentale capace di indurre la riserva cognitiva in roditori fu Rosenzweig (1978) il quale definì l'ambiente arricchito come *una combinazione di stimoli sociali e ambientali*.

Per EE si intende una condizione abitativa che facilita una maggiore stimolazione sensoriale, cognitiva e motoria rispetto alle abituali condizioni standard di stabulazione.

Generalmente il protocollo sperimentale dell'EE prevede l'utilizzo di gabbie più grandi di quelle usate in condizioni standard, che consentono l'alloggiamento di un numero maggiore di animali e l'inserimento di svariati oggetti, differenti in forma, dimensioni e di strutture quali tunnel, labirinti. Tutti questi oggetti vengono cambiati frequentemente (in media ogni due giorni) per rinnovare continuamente l'ambiente e quindi stimolare la curiosità e l'esplorazione. Si aggiungono inoltre ruote per stimolare l'esercizio fisico volontario.

Diamond et al. (1966, 1967), Krech et al. (1960) e successivamente Rosenzweig e Bennett (1996) condussero una serie di esperimenti per indagare gli effetti di un ambiente arricchito sullo sviluppo del cervello e sulle abilità cognitive. Questi autori dimostrarono che la stimolazione ambientale provoca risposte plastiche nel cervello adulto, che a loro volta determinano la variazione di parametri biochimici, fino alla modificazione dell'arborizzazione dendritica, della gliogenesi e della neurogenesi ed un miglioramento della capacità di apprendimento. In pratica gli autori evidenziarono la comparsa di significativi cambiamenti nell'anatomia del cervello che potevano essere associati ad un miglioramento dell'apprendimento.

Secondo la definizione di Rosenzweig e colleghi ciascun componente presente nella gabbia contribuisce sostanzialmente a determinare la complessità dell'ambiente. Sono stati fatti diversi studi in cui si è cercato di separare i contributi delle varie diverse componenti al manifestarsi degli effetti di EE sulle strutture cerebrali e sul comportamento, e l'opinione corrente è che nessuna variabile presa singolarmente possa determinare gli effetti dati dal EE in toto, in cui le diverse componenti possono agire contemporaneamente.

Partendo dal presupposto che dati in letteratura dimostravano come in ippocampo e nel giro dentato si verifici un aumento della neurogenesi correlabile all'esposizione dell'animale ad EE (Kempermann, 2002), Van Praag e collaboratori, nel 2011, hanno studiato gli effetti indotti singolarmente da alcune delle stimolazioni a cui viene esposto

l'animale in ambiente arricchito (stabulazione con più animali, cambio degli oggetti, introduzione di nidi, scale, tubi oppure di una ruota).

Si osservò un aumento della neurogenesi negli animali esposti ad ambiente arricchito oppure in animali che erano stati esposti a condizioni che favorivano l'esercizio fisico spontaneo. La conclusione fu che l'esercizio fisico volontario è sufficiente per migliorare la neurogenesi nel giro dentato del topo adulto. Questo effetto si pensa sia dovuto al fatto che la prolungata attività motoria spontanea induce un'attività di sincronizzazione cerebrale rilevabile con l'elettroencefalogramma, che a sua volta può alterare la neurochimica ippocampale modificando la LTP e la neurogenesi nel giro dentato. Tuttavia analizzando le conseguenze dell'esposizione ad un EE e del movimento sulle capacità di apprendimento ippocampali, è stato evidenziato come le performance nel labirinto a T di topi cresciuti in EE fossero superiori a quelle di animali costretti ad una attività motoria forzata

Gli effetti dell'EE e del movimento sono stati osservati non solo in prossimità del trattamento, ma anche a distanza dell'esposizione ai due diversi training, andando a valutare la sopravvivenza cellulare dopo un mese. È emerso che la sopravvivenza cellulare era inferiore in soggetti allenati con la ruota (56%) rispetto a soggetti arricchiti (85%), suggerendo quindi che i due diversi training hanno un effetto a lungo termine diverso.

Uno studio effettuato nel 1990 da Black e collaboratori ha mostrato come la dimensione e il numero di sinapsi cerebellari nelle cellule di Purkinje in animali sottoposti ad esercizio siano simili ai valori osservati nei topi controlli, sia che l'esercizio sia stato volontario (utilizzo di ruote) o forzato (uso di tapis roulant).

Studi più recenti hanno dimostrato come i cambiamenti strutturali e comportamentali dopo l'arricchimento siano associati a cambiamenti nella neurochimica e nella fisiologia del cervello. Infatti a livello ippocampale in topi cresciuti in ambiente arricchito, sono state osservate modifiche funzionali quali ad es. un aumento del potenziamento a lungo termine (LTP), un'aumentata crescita delle spine dendritiche, una aumentata espressione di mRNA per neurotrofina, per MAPK ed una aumentata espressione di CREB (il fattore di trascrizione in risposta al cAMP) (Mellott et al., 2004) (Artola et al., 2006; Duffy et al., 2001; Foster e Dumas, 2001; Foster et al., 1996).

Inoltre, l'arricchimento ambientale aumenta sia l'espressione della sinaptofisina, una proteina presente a livello delle terminazioni nervose, sia di PSD-95, una proteina squisitamente postsinaptica, a suggerire un miglioramento dei contatti sinaptici (Frick e Fernandez, 2003; Nithianantharajah et al., 2004; Lambert et al., 2005).

Anche a livello neocorticale, l'arricchimento induce una chiara alterazione neuronale. Si osserva infatti un aumento dello spessore corticale, una aumentata ramificazione dendritica, un numero maggiore di vescicole presinaptiche ed elevati livelli di sinaptofisina (Diamond et al., 1976; Faherty et al., 2003; Frick e Fernadez, 2003; Greenough et al., 1973; Lambert et al., 2005; Leggio et al., 2005; Nithianantharajah et al., 2004; Rampon et al., 2000; Turner et al., 2003; Venable et al., 1989). L'esposizione ad ambienti complessi rafforza la neurotrasmissione sinaptica e la plasticità (Kempermann et al., 1997; Van Praag et al., 2000), aumentando la sopravvivenza neuronale e diminuendone l'apoptosi (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al. 1999; Van Dellen et al., 2000; Young et al., 1999) , favorendo anche l'espressione di molecole coinvolte nel signalling neuronale (Fischer et al., 2007; Ickes et al., 2000; Malm et al., 2006).

Altri esperimenti sono stati condotti per valutare gli effetti indotti dall'EE su stimoli sensoriali. Beaulieu e Cynader nel 1990 studiarono l'effetto dell'arricchimento ambientale sui gatti, cioè su animali provvisti di un sistema visivo molto sviluppato. Cresciuti in condizioni arricchiti, in questi animali si osservò un rafforzamento della funzione visiva.

I topi ed i ratti, invece, hanno sistemi visivi abbastanza rudimentali e limitati, dovuto al fatto che sono animali notturni. Tuttavia, topi sottoposti ad un ambiente arricchito fin dalla nascita hanno uno sviluppo del sistema visivo più rapido (Cancedda et al., 2004; Sale et al., 2004) e ciò influenza la maturazione della retina.

Contrariamente al sistema visivo, i sistemi olfattivi e sensoriali nei roditori sono altamente evoluti e presentano caratteristiche peculiari. Recenti studi hanno dimostrato che la complessità ambientale è in grado, oltre a stimolare il sistema somatosensoriale (Coq e Xerri, 1998; Megevand et al., 2009), di modificare e potenziare anche il sistema olfattivo stimolando la neurogenesi (Veyrac et al., 2009) nella corteccia piriforme (Mandairon et al., 2008).

2. La Sclerosi Multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune infiammatoria del SNC che colpisce soggetti di giovane età tra i 30 e 40 anni prevalentemente di sesso femminile con un'incidenza 2:1 rispetto al sesso maschile.

L'eziopatogenesi della malattia non è stata completamente chiarita, ma numerose evidenze suggeriscono che la SM debba essere considerata una malattia complessa, multifattoriale, nella quale una predisposizione genetica, in presenza di fattori scatenati, per esempio infezioni virali, può innescare una risposta autoimmune verso antigeni del SNC.

La SM risulta essere, per frequenza, la seconda malattia neurologica e la prima di tipo infiammatorio cronico che affligge i giovani adulti.

Studi epidemiologici stimano che in Italia la prevalenza della SM vari da 80 ad oltre 120 casi/100.000 abitanti, con una punta di massima prevalenza in Sardegna, una delle aree europee - assieme alla Scozia e ad alcune province scandinave - dove si stimano più di 150 casi/100.000 abitanti.

Sebbene nei pazienti affetti da SM l'aspettativa di vita sia solo lievemente ridotta, la malattia determina nelle persone colpite una disabilità variabile, spesso molto grave, espressione di deficit motori, sensitivi e cognitivi.

2.1 Patogenesi

Dal punto di vista patogenetico, sulla base di studi preclinici e clinici, si ipotizza che alla base del processo infiammatorio, vi sia un attacco autoimmunitario, prevalentemente mediato da linfociti T, contro antigeni della mielina. Tra questi i più studiati sono MBP (proteina basica della mielina), PLP (proteina proteolipidica) e MOG (glicoproteina associata alla mielina oligodendrocitaria).

Tuttavia diverse pubblicazioni dimostrano che i bersagli della risposta autoimmune possono essere anche altri antigeni mielinici e neuronali (proteine neuronali, glicolipidi, sfingolipidi) o proteine codificate da DNA esogeni presenti nelle guaine mieliniche.

Gli aspetti più caratteristici del danno infiammatorio osservato nelle lesioni cerebrali nella SM sono dati dalla presenza di infiltrati infiammatori perivenulari, aree di demielinizzazione, astrogliosi reattiva, perdita assonale.

L'attacco contro la guaina mielinica, che avvolge i neuroni, è mediata da linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ autoreattivi che, attivati in periferia, riescono a superare la barriera emato-encefalica (BEE), entrando nel parenchima cerebrale dove innescano una cascata di eventi che culmina nel danno mielinico e neuronale dando origine a cicatrici o placche, da cui, la definizione classica di "sclerosi a placche".

Questo danno mielinico (demyelinizzazione) compromette la fisiologica ricezione e trasmissione degli impulsi nervosi, determinando la comparsa dei sintomi clinici la cui natura dipende dalla localizzazione dei focolai infiammatori.

Con l'attivazione di un processo autoimmune, in cui vengono coinvolti macrofagi, cellule T e microglia, si osserva la produzione di citochine pro-infiammatorie da cellule T e macrofagi principalmente, ma anche di altri fattori come prostaglandine, fattori vasoattivi (Frohman et al., 2006) e le chemochine, tra cui CCL2-3-4-5 e CXCL10-12-13.

A questo si deve aggiungere che il danno neuronale in SM può essere anche indotto da canalopatie neuronali acquisite, accumulo di calcio intracellulare, modificazione dello scambiatore sodio/calcio e ad eccitotossicità (Waxman et al., 2006).

Proprio sul glutammato si sono concentrati recenti studi nati dall'osservazione di un coinvolgimento di recettori glutammatergici ionotropi nel causare neurotossicità (Pitt et al., 2000; Smith et al., 2000) e da accumuli di glutammato nelle placche durante la fase attiva

della malattia, confermati poi da studi recenti in modelli animali (Marte et al., 2010; Sulkowski et al., 2009; Cetonze et al., 2009; Di Prisco et al., 2013; 2014a; 2014b; 2016a; 2016b; Bonfiglio et al., 2017).

Sulla base di queste osservazioni, oggi la SM viene considerata anche una sinaptopatia.

2.2 Eziologia

Sebbene l'eziologia della malattia neurodegenerativa risulti essere ancora sconosciuta, molti studi hanno portato ad ipotizzare che la predisposizione genetica e le infezioni virale possano essere le cause scatenanti la SM.

Il primo studio importante che mette in relazione la componente genetica e la SM venne realizzato nel 1986 da Ebers G.C. e pubblicato in "The New England Journal of Medicine". Tale relazione si basava sui risultati ottenuti su gemelli omozigoti. I dati dimostravano che circa il 26% dei gemelli omozigoti può sviluppare la SM se uno dei due gemelli è affetto, mentre nei gemelli eterozigoti la probabilità diminuisce al 2.3%.

Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo di diversi geni nello sviluppo della patologia, soprattutto per quello che riguarda le alterazioni leucocitarie.

Ad esempio si è osservato una presenza maggiore nei malati di SM di alcuni genotipi quali HLA-A3 (Human Leucocyte Antigen) e HLA-B7, ma soprattutto HLA-DW2 nei malati di SM.

Negli anni '70 l'attenzione è stata rivolta sull'associazione di alcuni aplotipi del Complesso di Istocompatibilità Maggiore (MHC)/Antigene Leucocitario Umano (HLA), nella regione 6q31, con l'insorgenza della SM (Jersild,1972), ma ancor oggi rimangono da chiarire gli effetti primari delle varianti genetiche che contribuiscono al rischio ereditato. La regione HLA/MHC rappresenta ad oggi il locus che esercita il maggiore effetto di rischio genetico della SM. E' nota ad esempio il ruolo predisponente alla malattia dell'aplotipo, DRB1*1501-DQB1*0602 (anche definito sierologicamente, aplotipo DR2, DQw1), che risulta essere costantemente associato all'insorgenza della SM (Barcellos et al., 2003; Goris et al., 2008).

Negli ultimi anni con l'avvento di tecniche sempre più efficaci nel campo della genomica si è dimostrato come una parte importante della variabilità tra individui sia da attribuirsi a polimorfismi con variazioni di un singolo nucleotide (SNP). Questi possono essere utilizzati come predittori in studi di mappatura genica della probabilità di sviluppo della patologia.

A partire dal 2006, sono stati pubblicati nove studi che identificano 57 loci che contribuiscono alla biologia della SM, dimostrando che nel complesso queste varianti giocano un ruolo chiave nella suscettibilità alla malattia.

Uno studio pubblicato su Nature dal Consorzio Internazionale della Sclerosi Multipla (IMSC) nel 2011 ha confermato alcuni loci già noti e descritto altri 5 nuovi loci con forte evidenza di associazione. Molti di questi codificano per molecole che possiedono una particolare rilevanza immunologica quali: citochine (CXCR5, IL7, IL7R ed altre), molecole co-stimolatorie (CD37, CD40, CD58) e molecole implicate nella trasduzione del segnale (MALT1, RGS1, STAT3). Inoltre, il 30% delle varianti di suscettibilità alla malattia sono localizzate in geni che codificano per componenti del sistema immunitario, soprattutto geni coinvolti nel percorso di differenziazione delle cellule T helper, confermando il carattere autoimmune della Sclerosi Multipla.

Attualmente i ricercatori stanno cercando di dimostrare l'ipotesi che le cause scatenanti la demielinizzazione siano da attribuire anche all'esposizione ad infezioni virali (Janisch et al., 1990).

Già nel 1962 Adam e Imagawa, studiando la frequenza degli anticorpi contro il morbillo nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da SM, evidenziarono titoli anticorpali significativi per diversi virus: morbillo, parotite, rosolia, vaiolo, coronavirus, adenovirus, virus di Epstein Barr e virus della leucemia a cellule T tipo I (HTLV-1) (Hebener, 2001).

Al di là di questi studi, bisogna però ammettere che ad oggi non esiste nessuna conferma dell'ipotesi che l'infezione con un particolare virus sia la causa della SM. Inoltre non è stata neanche evidenziata una corrispondenza tra infezione e sintomatologia o decorso clinico della patologia, anche se alcune infezioni virali potrebbero avere un ruolo significativo. Nondimeno molti studiosi suggeriscono l'idea che tali infezioni potrebbero indurre un eccesso di risposta immunitaria, cosa che porterebbe a una disregolazione di questo sistema con conseguente predisposizione del soggetto.

2.3 Sintomatologia

Definita da Hebener “malattia dalle mille facce”, la SM si manifesta in vari modi e non presenta praticamente manifestazioni sintomatiche proprie, in quanto tutte possono essere ricondotte ad altre espressioni patologiche del SNC. Inoltre la sintomatologia è dipendente dalla zona soggetta a demielinizzazione e infiammazione (Compston et al., 2008), e può portare ad alterazione della funzione in tempi non spesso immediati.

Nel 20-30% dei soggetti, tra i primi disturbi si evidenzia il danno al nervo ottico che nella quasi totalità dei casi interessa uno dei due occhi e solo in un secondo tempo porta alla degenerazione di entrambi le due vie di innervazione.

Dall'altra parte, nella maggioranza dei casi, la malattia diviene sintomatica almeno dieci anni dopo la comparsa di questo sintomo. In generale in poco tempo il campo visivo si restringe, la vista diventa meno acuta e peggiora fino a scomparire del tutto.

Un altro sintomo comune, (osservato circa nel 50% dei casi) è un disturbo della sensibilità con problemi di tatto sempre più profondi e dislocati, a mano a mano che la patologia progredisce. Risulta alterata, inoltre, anche la sensazione di caldo e freddo.

Altro disturbo rilevato nelle prime fasi della malattia è un'insolita fatica e debolezza (prevalentemente se l'esordio è tardivo) che viene percepita anche come difficoltà a svolgere le attività quotidiane, anche le più banali, in cui è coinvolto uno sforzo muscolare.

È da notare che queste manifestazioni possono avvenire insieme o singolarmente, senza un criterio prestabilito. Nelle prime fasi, inoltre, si può accusare difficoltà nella gestione e coordinazione dei movimenti (atassia) con tremori e formicolii e problemi dell'equilibrio. Ciò probabilmente è dovuto ad un interessamento del processo di demielinizzazione del nervo vestibolare, del cervelletto e dei cordoni posteriori del midollo spinale.

Parallelamente si osservano disturbi di carattere vegetativo a carico della vescica osservabile già nelle fasi iniziali. Ciò può portare a un mancato controllo della minzione, cosa che crea enorme disagio nell'individuo. La situazione si evolve comportando spesso un mal funzionamento dei processi di svuotamento e ritenzione della vescica e del retto (costipazione e incontinenza) che possono anche causare infezioni a carico dei due organi.

Altri disturbi si osservano a livello motorio e nel linguaggio. Nelle prime fasi solo un terzo dei pazienti affetti da SM sviluppano problemi nel controllo motorio, ma la percentuale aumenta all'80% in funzione della progressione della patologia. Nella fase conclusiva i muscoli non funzionano più, si ha paralisi totale con la comparsa di crisi spastiche.

La demielinizzazione del tronco encefalico porta ad un malfunzionamento della muscolatura cranica con la manifestazioni di tremori che condizionano l' affabulazione. In alcuni casi l'articolazione delle parole diventa disturbata nella ritmica (disartria).

2.4 Diagnosi

Attualmente non esistono test in grado di confermare in modo certo la diagnosi di SM. Questa viene formulata dal neurologo sulla base di un'attenta analisi di tre fattori: i sintomi riferiti dal paziente, l'esame neurologico e il risultato degli esami strumentali e biologici (sangue e liquido cerebro-spinale).

Il neurologo di norma fa una valutazione approfondita di forza e coordinazione dei movimenti, equilibrio, vista e sensibilità di tutti i distretti corporei. Vengono inoltre esaminate le principali funzioni cognitive: orientamento, memoria, attenzione e linguaggio, oltre allo stato psicologico del paziente.

Di estrema utilità è la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN), che permette di evidenziare le lesioni da demielinizzazione.

Tra gli altri test che possono essere effettuati vi sono l'analisi del liquor che permette al medico di valutare i marker a sostegno della diagnosi di SM, e l'esame dei potenziali evocati, un test che consente di registrare la risposta del sistema nervoso agli stimoli.

2.5 Varianti cliniche

La SM è una malattia molto variabile ed i sintomi dipendono dalle aree del sistema nervoso che sono colpite. Le sue manifestazioni interessano più frequentemente il chiasma ed il nervo ottico, il tronco encefalico, il cervelletto ed il midollo spinale, soprattutto le vie cortico-spinali. A seconda della sede e dell'area di infiammazione e della perdita di mielina, i sintomi possono essere diversi sia per caratteristiche che per intensità e durata. La manifestazione dei sintomi, che porta il paziente a consultare un neurologo, viene definita attacco o "poussée".

Occorre comunque precisare che risulta alquanto difficile, alla prima manifestazione sintomatologica o alla prima "recidiva", classificarla in una forma piuttosto che in un'altra o capire come essa evolverà nel tempo. È risaputo che il decorso clinico della sclerosi multipla sia un fenomeno soggettivo e può mutare nel corso del tempo. Si registrano infatti in alcuni soggetti gravi disabilità già dopo il primo attacco, in altri, dopo la prima "remissione", ma possono trascorrere diversi anni senza che si manifesti alcun sintomo.

È interessante notare che si possono distinguere diverse tipologie o decorsi di sclerosi multipla.

2.5.1 Benigna

Questa forma è caratterizzata da una o più recidive con remissione totale. Dal punto di vista diagnostico si può determinare solo dopo 10-15 anni dall'esordio dei primi sintomi. La forma benigna ha solitamente un esordio di tipo sensoriale, solo parzialmente invalidante e non in tutti i casi, anche se esiste la possibilità di evoluzione in una forma progressiva. Questa forma interessa circa il 5-10% dei casi.

2.5.2 Forma Recidivante-Remittente (SM-RR)

La forma SM-RR presenta segni e i sintomi legati all'attacco che tendono a scomparire, soprattutto nei primi anni dall'esordio per poi ripresentarsi. La comparsa dei sintomi viene definita "recidiva" o "poussées", indicando una fase attiva della SM; essa è caratterizzata dalla comparsa di nuovi sintomi o dall'aggravarsi di quelli preesistenti.

La scomparsa completa o incompleta dei sintomi viene indicata con il termine di "remissione". Solitamente a una recidiva segue un periodo di remissione. L'intervallo di

tempo che intercorre di norma tra due ricadute non è costante, essendosi registrati eventi dopo periodi che vanno da alcune settimane ad alcuni anni. Inizialmente le ricadute sono seguite da una completa ripresa capacità che va perdendosi nella progressione della patologia. La forma recidivante-remittente è caratterizzata da assenza di progressione tra una ricaduta e l'altra. Alcuni dati indicano che in media dopo 5-10 anni dal suo esordio e nell'85% dei casi, la forma recidivante-remittente può evolvere in una forma progressiva secondaria.

2.5.3 Forma Progressiva Secondaria (SM-SP)

La forma secondaria progressiva ha un andamento iniziale di tipo recidivante-remittente a cui segue una forma secondariamente progressiva; quest'ultima si presenta con o senza recidive e con possibili fasi di relativa remissione e stabilizzazione. Le ricadute sono gravi e i recuperi sono incompleti con una progressione dei deficit anche nei periodi che intercorrono tra una ricaduta e l'altra. Casisticamente la SM-SP riguarda circa il 30% dei pazienti affetti da sclerosi multipla.

2.5.4 Forma Progressiva Primaria (SM-PP)

Affligge il 10% dei malati ed è forse la forma più grave. Le persone colpite peggiorano costantemente e sono prive di miglioramento, con un quadro che evolve rapidamente verso l'invalidità.

2.5.5 Forma Progressivo Recidivante (SM-RP)

La SM-RP è caratterizzata da progressione fin dall'esordio, con recidive seguite o meno da recupero. Gli intervalli tra una ricaduta e l'altra sono caratterizzati da una continua progressione della malattia, a differenza della forma recidivante-remittente dove l'intervallo che intercorre tra due ricadute è privo di progressione.

2.6 Modelli animali di Sclerosi Multipla

Nel corso degli ultimi decenni, sono stati sviluppati un certo numero di modelli sperimentali per studiare i vari aspetti della Sclerosi Multipla Umana.

I modelli sperimentali usati per studiare la patologia sono differenti e si suddividono in:

- Modelli virali;
- Modelli indotti da tossine;
- Encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE).

2.6.1 Modello virale

La SM condivide diversi aspetti anatomico-patologici con molte infezioni virali che colpiscono il SNC. Da qui l'opportunità di usare modelli virali tra cui il più noto è quello indotto dal virus TMEV (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus). Questo modello nasce dalle osservazioni di Theiler che determinò nel 1934 che l'infezione da virus TMEV produceva nei topi lo sviluppo di una forma di paralisi flaccida da encefalomyelite. Questa è una patologia che può essere monofasica o bifasica. La forma monofasica produce a partire dall'insorgenza meningo-encefalomyelite transitoria con remissione graduale in circa tre settimane. La forma bifasica presenta un picco di malattia con neurodegenerazione a cui segue una fase di remissione e successivamente una fase di cronicizzazione con comparsa di lesioni demielinizzanti localizzate a livello del midollo spinale (Tsunoda e Fujinami, 2010). Chi causa queste lesioni? Kipp e colleghi hanno dimostrato che la demielinizzazione osservata nel midollo spinale è dovuta alla persistenza del virus negli oligodendrociti e nei macrofagi spinali (Kipp et al., 2012).

Altri modelli basati sul virus dell'epatite murina e sul virus delle foreste Semliki (SFV) sono utilizzati per mimare il decorso della SM (Mix et al., 2010). In particolare il virus dell'epatite murina (MHV) induce la formazione di encefalite acuta mediata da linfociti T CD8⁺ (Kipp et al., 2012). È stato dimostrato che l'inoculazione intracranica di ceppi neurotrofici del virus MHV possa determinare lo sviluppo di un modello di Neurite Ottica RetroBulbare frequentemente associata a SM (Shindler et al., 2008).

L'infezione da SFV provoca un'encefalite letale o a decorso iperacuto che non ha caratteristiche generalizzate nelle forme di SM, ma risulta utile per lo studio delle interazioni cellulari che sono alla base dei processi di demielinizzazione come l'espressione di antigeni nel SNC che determinano la lisi degli oligodendrociti mediata da linfociti T CD8⁺ (Kipp et al., 2012; Fragkoudis et al., 2009).

2.6.2 Modello indotto da tossine

La demielinizzazione a livello del SNC può essere causata anche da alcune sostanze come l'etidio bromuro, l'endotossina batterica, lisofosfatidilcolina (LPC), cuprizone ed alcuni autoanticorpi specifici contro le proteine della mielina; alcune di queste sostanze hanno dei limiti pratici come la via di somministrazione che ne ha ridotto l'uso (Kipp et al., 2009).

Curiosamente LPC è un attivatore della fosfolipasi A2 che causa demielinizzazione focale se iniettata nel midollo spinale a causa dell'azione tossica di LPC sugli oligodendrociti e sulla guaina mielinica. Il modello così venerato è un modello acuto di SM con recupero in 5 settimane (Denic et al., 2011).

Il cuprizone è un chelante del rame che se assunto oralmente riproduce demielinizzazione in diverse regioni cerebrali. Dopo 5-6 settimane di trattamento si osserva il corpo calloso completamente demielinizzato con un fenomeno di "demyelinizzazione acuta", riparabile durante la sospensione (Denic et al., 2011). Se si prolunga per 3 mesi il trattamento si determina un danno cronico simile alla SM (Kipp et al., 2012).

2.6.3 Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE)

L'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) rappresenta il modello di SM più utilizzato in laboratorio (Mix et al., 2010). Questo protocollo sperimentale riproduce infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione a livello del SNC.

L'origine del modello si fa risalire al 1885 quando Louis Pasteur accidentalmente provocò l'encefalomielite sperimentale durante gli studi per la produzione del vaccino antirabbico (Kipp et al., 2012). L'iniezione ripetuta di tale vaccino, provocò in alcuni casi paralisi e morte. Se analizzati i corpi di questi soggetti presentavano infiammazione e demielinizzazione a livello di encefalo e midollo spinale. Rivers e colleghi dimostrarono nel 1933 che la paralisi indotta immunizzando alcune scimmie Rhesus con un preparato di encefalo di coniglio era caratterizzata da infiltrati infiammatori perivascolari e da demielinizzazione centrale (Rivers et al., 1933).

Seguirono tentativi di potenziamento e di riduzione delle somministrazioni attraverso l'adiuvante di Freund, un prodotto in grado di garantire un rilascio controllato e prolungato dell'emulsione encefalitogenica in singola dose oltre a possedere esso stesso un'azione proinfiammatoria (Kabat et al., 1947). Successivamente, l'associazione tra adiuvante di Freund e *Mycobacterium tuberculosis*, consentì di ottenere un decorso sintomatologico caratterizzato dall'alternanza di ricadute e fasi di remissione.

L'EAE può essere indotta in maniera attiva o in maniera passiva e gli effetti variano in base alla specie utilizzata. Il modello di EAE attiva si induce tramite la somministrazione di un omogenato di midollo spinale o di proteine mieliniche (i.e. MOG, MBP o PLP) associato all'adiuvante di Freund. Alcuni ceppi murini e di ratto necessitano per un'aumentata efficienza dell'iniezione di *Mycobacterium tuberculosis* inattivato (Mix et al., 2010) e di tossina della *Bordetella pertussis* che è in grado di attivare le cellule T e determinare cambiamenti vascolari nel SNC (Levine and Sowinsky, 1973; Richard et al. 2011).

Nel 1981 si produsse per la prima volta nel 1981 attraverso il trasferimento di linfociti T CD4+ isolati da organi linfoidi secondari di animali a loro volta affetti da EAE attivamente indotta. Questi linfociti vengono sottoposti a riattivazione in vitro e successivamente vengono re-infusi in un animale sano (Ben Nun et al., 1981). Attraverso questa procedura apparve evidente la natura autoimmune della patologia.

Nei topi C57BL/6J l'immunizzazione è indotta con un epitopo di un frammento peptidico della MOG (MOG₃₅₋₅₅) in associazione all'adiuvante incompleto di Freund (IFA). Questo modello rappresenta un ottimo modello di studio della SM consentendo di studiare la difficoltà nella risoluzione dell'attività flogistica o la rimielinizzazione dopo che la malattia ha raggiunto il suo picco massimo. I topi infatti presentano una forma monofasica o cronica della patologia, caratterizzata da aree multifocali ed infiltrato infiammatorio mononucleare costituito prevalentemente da macrofagi e cellule T CD4⁺ e demielinizzazione a livello della materia bianca periferica del midollo spinale. Un'altra caratteristica è l'infiammazione delle meningi e degli "anelli" perivascolari della materia bianca e del tronco encefalo.

Anche i topi SJL/J possono essere immunizzati attraverso PLP₁₃₉₋₁₅₁ che porta alla comparsa di una malattia di tipo Recidivante-Remittente. Le aree maggiormente colpite sono il nervo ottico, il tronco encefalico, il midollo spinale, il cervelletto e la corteccia cerebrale.

L'EAE può essere indotta anche nei ratti, principalmente del ceppo Lewis, mediante la somministrazione dell'antigene encefalitogenico MBP o con uno dei suoi peptidi encefalitogenici emulsionati in adiuvante di Freund completo (Swanborg et al., 2001). La patologia che ne deriva è una forma acuta di EAE in cui si raggiunge un picco seguito dalla remissione permanente in assenza di demielinizzazione. Anche i ratti Dark Agouti possono essere immunizzati e sviluppare EAE cronica caratterizzata dall'alternanza tra fasi di remissione e ricadute (Lorentzen et al., 1995).

3. Ambiente arricchito e Sclerosi Multipla

Come già detto all'inizio, recentemente, la Sclerosi Multipla è stata descritta anche come sinaptopatia, volendo sottolineare come le alterazioni funzionali dei neuroni abbiano un ruolo fondamentale nella eziopatologia della malattia (Centonze et al., 2016; Di Filippo et al., 2015; Musella et al., 2016).

Con il termine sinaptopatia ci si riferisce a quelle patologie centrali dove le funzioni neuronali a livello sinaptico subiscono importanti modifiche durante il progredire della malattia. Il malfunzionamento sinaptico viene visto come la conseguenza di maladattività indotte dall'alterazione morfologica-funzionale del network neuronale. I neuroni e gli astrociti ed i contatti che li mettono in comunicazione sono soggetti a modificazioni dinamiche nella morfologia e nella interazione (Amtul e Atta-Ur, 2015) con conseguenze sia strutturali che funzionali che possono indurre alterazioni persistenti alla trasmissione nervosa. Effettivamente un impoverimento delle spine dendritiche e dei contatti assonali a livello ippocampale ed una semplificazione dei contatti sinaptici corticali sono stati descritti in animali EAE (Centonze et al., 2009,; Chanaday et al.2016).

Stimoli mirati al rafforzamento sinaptico possono proteggere o impedire queste alterazioni. Questa ipotesi è alla base della teoria della "riserva cognitiva", enunciata all'inizio di questa tesi ed è basata sull'osservazione che persone che nel corso della loro vita abbiano sperimentato attività fisica e culturale, relazioni sociali ed un lavoro soddisfacente sono più resistenti al danno cerebrale (Katzman et al., 1988; Sumowski e Leavitt, 2013). In pratica, si ipotizza che esporre l'individuo durante la vita a stimoli che favoriscono la plasticità sinaptica migliori la capacità rigenerativa nel SNC, favorendo la resistenza al danno. La classificazione della SM come sinaptopatia, quindi, indirettamente, implica che interventi mirati al miglioramento dell'efficienza sinaptica possano rallentare il decorso di questa patologia, migliorando la qualità di vita del paziente. L'ipotesi è avvalorata da dati clinici che dimostrano come il potenziamento della "riserva cognitiva" indotto ad esempio da una "riabilitazione cognitiva" del paziente affetto da SM abbia un significato terapeutico di prevenzione e riduzione dei sintomi neuropsichiatrici e delle comorbilità centrali che si sviluppano nel corso della patologia (Wendebourg et al., 2016; Motl et al., 2016,; Luerding et al. , 2016; Tur, 2016).

Sulla base di tutte queste osservazioni, la riserva cognitiva viene quindi proposta come approccio terapeutico aggiuntivo alla terapia farmacologica per la cura della SM.

Il potenziamento della riserva cognitiva, osservato attraverso l'esposizione degli animali ad ambiente arricchito, ha dimostrato che questo trattamento ha un'azione neuroprotettiva in diverse neuropatologie, incluse le conseguenze del danno ischemico, (Nithianantharajah e Hannan, 2006), l'epilessia (Zhang et al., 2015), il dolore neuropatico cronico (Vachon et al. 2013), la AD e il morbo di Parkinson.

Tuttavia, ad oggi pochi sono gli studi preclinici che hanno cercato di analizzare l'impatto della stimolazione ambientale in topi sofferenti di encefalomielite autoimmune sperimentale.

L'ipotesi di un effetto positivo dell'EE nella patologia demielinizzante è stato però suggerito da recenti osservazioni che dimostrano come la somministrazione orale dell'antidepressivo desipramina (DMI), sia in grado di indurre un miglioramento dei sintomi clinici, una riduzione dei livelli centrali di chemochine proinfiammatorie ed una protezione a livello corticale in topi EAE nella fase precoce della patologia, all'insorgenza delle prime alterazioni sinaptiche (Di Prisco et al., 2014). La desipramina viene anche classificata come farmaco "ambiente mimetico" (environmimetic) ad indicare la sua capacità di indurre le risposte funzionali (quali ad esempio una aumentata produzione di BDNF) che vengono causate dall'esposizione ad un ambiente arricchito.

L'unico lavoro disponibile in letteratura che abbia affrontato l'effetto della EE in topi EAE ha dimostrato come, se cresciuti in questo ambiente a partire dal giorno dell'immunizzazione, i topi EAE sviluppino una patologia con una gravità clinica significativamente inferiore a quella osservata in topi EAE cresciuti in ambiente standard (Magalon et al., 2007). Negli stessi animali, è stata evidenziata un aumentato differenziamento delle cellule staminali originanti dalla zona subventricolare in oligodendrociti.

Gli eventi molecolari alla base degli effetti positivi sono per ora in gran parte sconosciuti, ma la stimolazione ambientale potrebbe a lungo termine indurre degli adattamenti sia a livello del SNC che del sistema immunitario.

La prima parte del lavoro della mia tesi di dottorato è stata dedicata a valutare l'impatto dell'esposizione all'ambiente arricchito in topi EAE in termini di:

- 1. recupero della gravità dei sintomi clinici*
- 2. miglioramento delle funzioni presinaptiche glutammatergiche in particolari aree cerebrali quali ad esempio la corteccia.*

I risultati ottenuti sembrano supportare da un punto di vista preclinico l'utilizzo delle terapie riabilitative come terapie "add-on" alle classiche terapie farmacologiche per la cura della sclerosi multipla.

RISULTATI

4.1 Effetto dell'ambiente arricchito sui sintomi clinici dei topi EAE e sul peso in topi EAE

I sintomi clinici in topi affetti da Encefalomyelite Autoimmune Sperimentale (EAE) cominciano ad essere evidenti dal 12° giorno dopo l'immunizzazione (12 d.p.i., day post immunization), aumentano drasticamente a 15 giorni e raggiungono un valore massimale a 21 d.p.i per rimanere poi costante nel tempo.

Allo stesso modo, nei topi EAE cresciuti in ambiente arricchito, i sintomi clinici si osservano al 12 d.p.i., ma la gravità massima dei sintomi è osservata al 15 d.p.i..

Tale gravità, tuttavia, risulta essere significativamente inferiore a quella osservata in topi EAE (Fig.1).

La variazione ponderale è un parametro che viene utilizzato per monitorare l'aggravarsi di una condizione patologica. In particolare, è noto che in topi affetti da malattia demielinizzanti vi sia un calo del peso corporeo, che viene però recuperato in animali EAE trattati con terapie che riducono la gravità della sintomatologia.

Abbiamo quindi valutato la variazione ponderale sia in topi EAE controllo che in topi EAE cresciuti in ambiente arricchito (EAE EE). Questo parametro è stato valutato nei rispettivi animali controllo. Per tutti e quattro i gruppi di animali il peso è stato controllato ai giorni 7, 14, 21 d.p.i.(Fig. 2).

In generale, si osserva un aumento del peso in tutti i gruppi ad eccezione dei topi EAE cresciuti in ambiente standard. In questi animali si osserva una diminuzione del peso a 7 d.p.i. (fase asintomatica della patologia) che aumenta a 14 e 21 d.p.i. e che è significativamente diversa da quanto osservato in topi controllo.

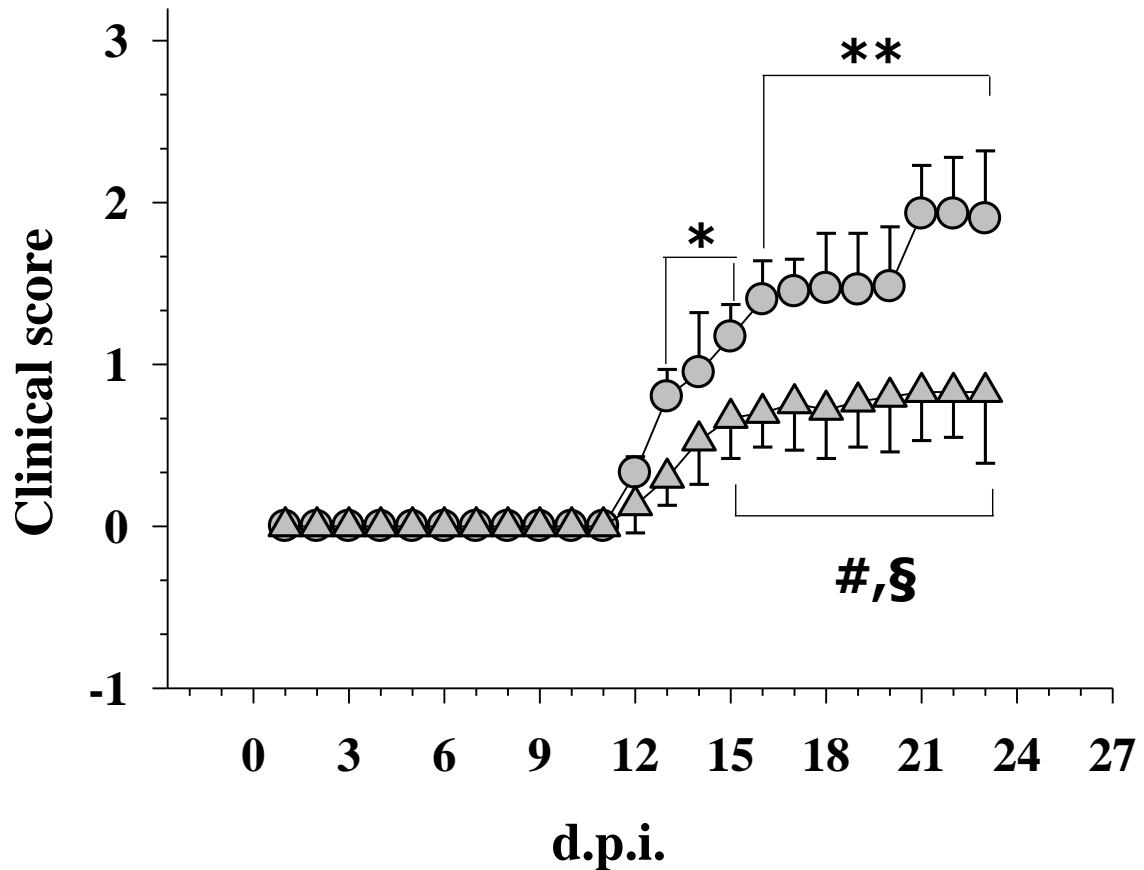


Figura 1. Il grafico rappresenta l'andamento nel tempo della gravità dei sintomi clinici in animali EAE cresciuti in ambiente standard (cerchi grigi) e in topi EAE che hanno avuto stimolazioni ambientali (triangoli grigi). I parametri di clinical score presi in considerazione sono valori che vanno da 0 a 5 (0= asintomatico; 1= coda flaccida; 2= atassia e/o paralisi degli arti posteriori; 3= paralisi degli arti posteriori e/o degli arti anteriori; 4= tetraparalisi; 5= morte). I risultati sono espressi come media \pm SEM di dati ottenuti da 16 animali per gruppo.

* $p < 0.05$ verso 1 d.p.i. in topi EAE; ** $p < 0.01$ verso 1 d.p.i. in topi EAE; # $p < 0.05$ verso 1 d.p.i. in EE EAE; § $p < 0.05$ verso il clinical score allo stesso d.p.i. in topi EAE.

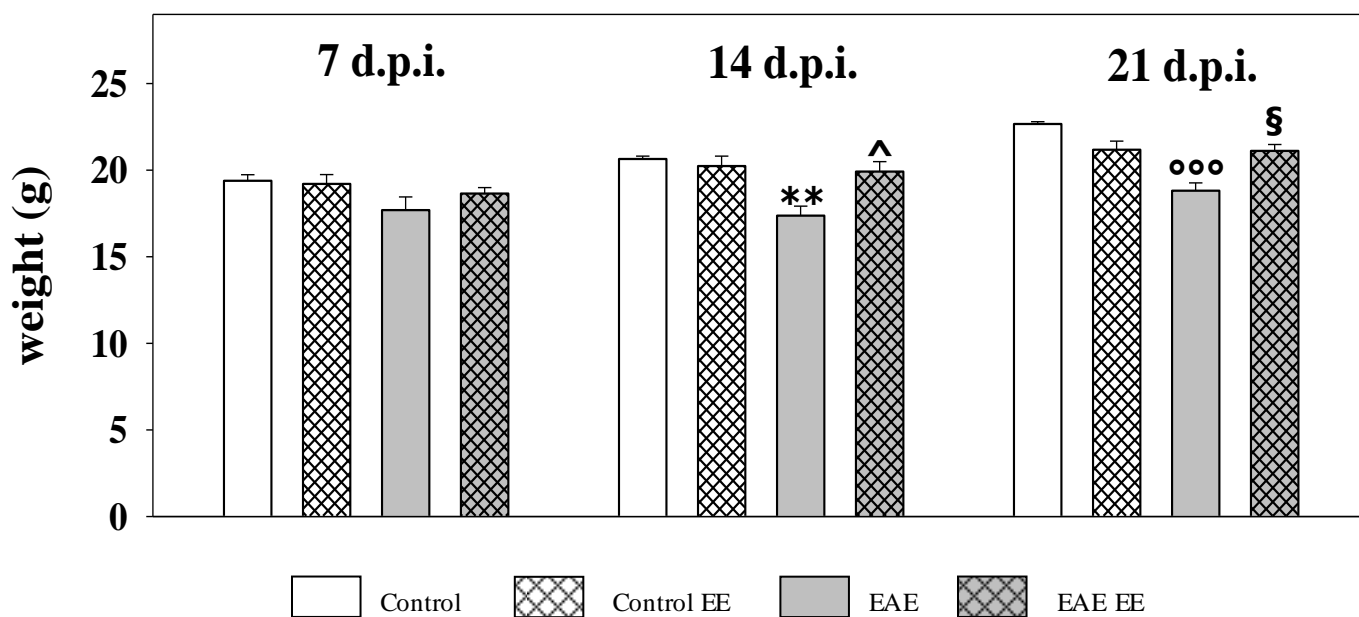


Figura 2. Il grafico rappresenta il peso espresso in grammi di topi appartenenti ai seguenti gruppi: topi controllo vissuti in ambiente standard (barre bianche), topi controllo vissuti in ambiente arricchito (barre bianche righe incrociate), topi EAE vissuti in ambiente standard (barre grigie), topi EAE vissuti in EE (barre grigie righe incrociate) ai giorni 7, 14 e 21 d.p.i. I risultati sono espressi come media \pm SEM di dati ottenuti da 16 animali per gruppo.

** $p < 0.01$ verso topi controllo cresciuti in ambiente standard a 14 d.p.i.; ^ $p < 0.05$ verso topi controllo cresciuti in ambiente standard a 14 d.p.i.; °°° $p < 0.001$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard a 21 d.p.i.; § $p < 0.05$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard a 21 d.p.i.

4.2 Effetto dell'ambiente arricchito sul comportamento ansioso e sull'attività motoria di topi EAE

Sono stati condotti test comportamentali per quantificare gli effetti dell'ambiente arricchito sull'attività locomotoria spontanea e sullo stato ansioso-depressivo di topi EAE.

Gli animali sono stati sottoposti ai test comportamentali al 20 d.p.i., cioè in un momento del corso della patologia in cui nell'animale EAE si osserva lo sviluppo di una gravità di sintomi sub-massimale ma significativa. I test sono stati effettuati solo una volta per evitare fenomeni di adattamento comportamentale.

L'attività locomotoria spontanea è stata quantificata nel test chiamato *open field* prendendo in considerazione il numero di volte in cui il topo oltrepassa i quadranti disegnati sul pavimento della gabbia (*crossing*). Come già osservato (Di Prisco et al., 2014), il numero di attraversamenti è risultato significativamente ridotto quando si è studiato il comportamento dei topi EAE rispetto a quanto osservato con i topi controllo cresciuti in ambiente standard (Fig. 3A). L'arricchimento ambientale non ha influenzato questo parametro comportamentale in topi di controllo, ma lo ha significativamente aumentato in topi EAE.

La curiosità e l'esplorazione sono due parametri che si correlano positivamente con l'attività locomotoria spontanea, ma negativamente con l'ansia.

I due parametri sono stati quantificati nel test *Hole Board* e nel *Light Dark test*.

Nel primo test, si prende in considerazione il numero delle volte in cui il topo introduce il naso all'interno dei fori presenti lungo l'arena (*nose-poke*).

Questo parametro risulta essere ridotto significativamente nei topi affetti da EAE.

Diversamente, il numero di *nose-poke* eseguiti dai topi EAE vissuti in ambiente arricchito era paragonabile a quella osservata nei rispettivi controlli. Indirettamente, questo valore suggerisce che i topi EAE cresciuti in EE abbiano un miglioramento dello stato d'ansia e dell'attività motoria spontanea rispetto agli animali immunizzati cresciuti in ambiente standard.

La curiosità è stata analizzata anche monitorando il numero di transizioni dal compartimento illuminato a quello oscuro del labirinto, nonché quantificando il tempo trascorso nel vano illuminato (Di Prisco et al., 2014a; Bonfiglio et al., 2017). L'EE aumenta, anche se non significativamente, il numero di transizioni effettuate dai topi di controllo (Fig. 3C). Questo parametro risulta significativamente ridotto nei topi EAE rispetto ai controlli,

ma viene recuperato nei topi EAE cresciuti in ambiente arricchito, suggerendo che l'esposizione ad ambiente arricchito favorisce la curiosità nel topo EAE e ne diminuisce lo stato d'ansia.

Complementare a questa osservazione è la quantificazione del tempo che il topo passa nel compartimento luminoso.

Il tempo trascorso dal topo nel lato illuminato dell'arena non è stato influenzato dall'ambiente arricchito nei topi di controllo. L'EE non ha influenzato in modo significativo questo dato nei topi EAE (Fig. 3D). Tuttavia, questo parametro è significativamente ridotto nei topi EAE rispetto ai relativi controlli.

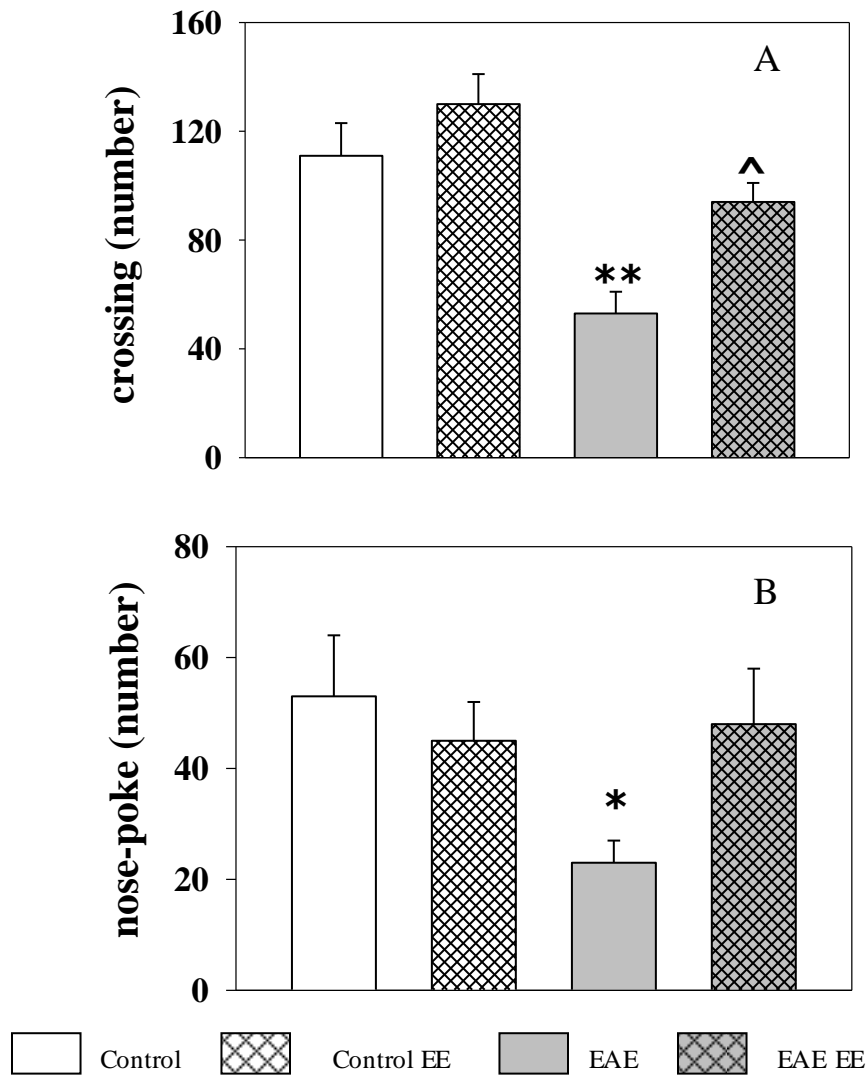


Figura 3. Effetti dell'arricchimento ambientale sull'attività motoria spontanea e sulla curiosità nei topi controllo vissuti in ambiente standard (barre bianche), nei topi controllo vissuti in ambiente arricchito (barre bianche righe incrociate), nei topi EAE vissuti in ambiente standard (barre grigie), nei topi EAE vissuti in EE (barre grigie righe incrociate). L'attività locomotoria spontanea è stata quantificata come numero di volte in cui un topo attraversa i quadrati presenti nell'open field (A). La curiosità è stata definita come numero di volte in cui il topo introduceva il naso nei buchi presenti nell'Hole Board (B). I risultati sono espressi come media \pm SEM di dati ottenuti da 10 topi per gruppo.

* $p < 0.05$ verso controllo vissuto in ambiente standard; ** $p < 0.01$ verso controllo vissuto in ambiente standard; ^ $p < 0.05$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard.

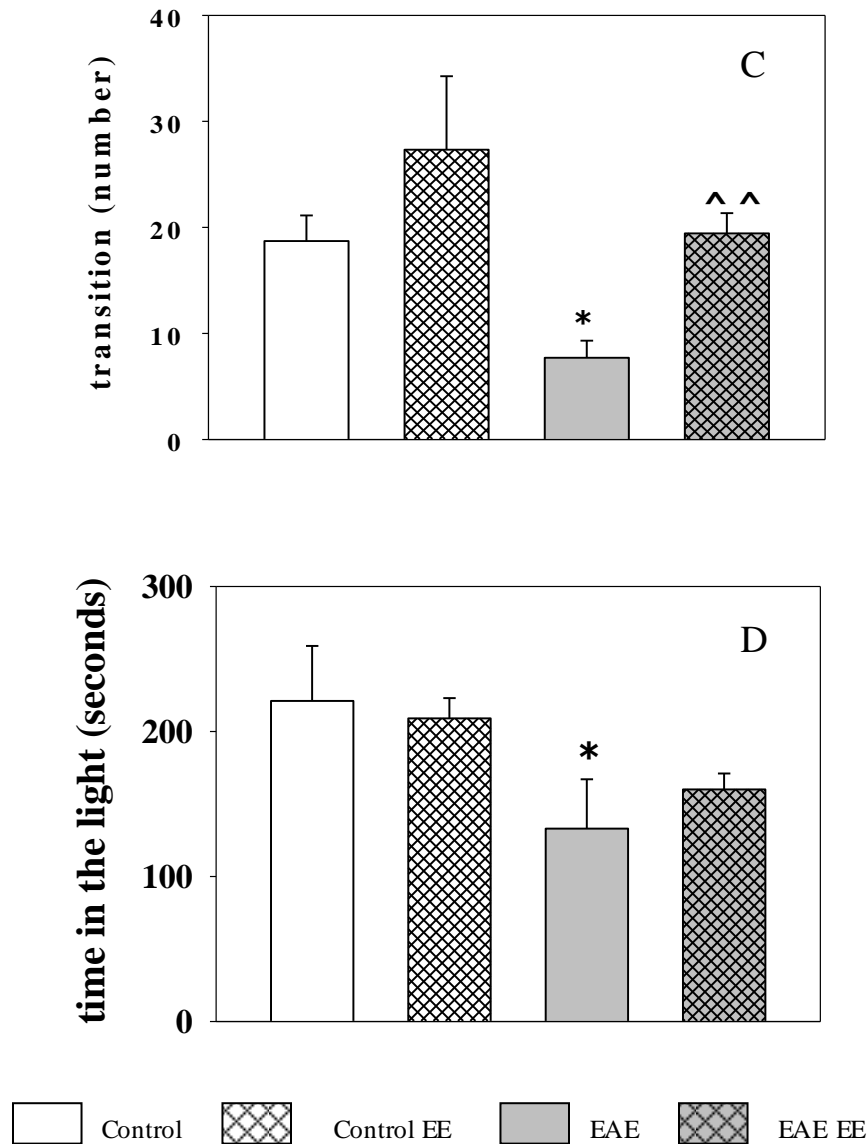


Figura 3. Effetti dell'arricchimento ambientale sull'attività esplorativa nei topi controllo vissuti in ambiente standard (barre bianche), nei topi controllo vissuti in ambiente arricchito (barre bianche righe incrociate), nei topi EAE vissuti in ambiente standard (barre grigie), nei topi EAE vissuti in EE (barre grigie righe incrociate). Questo parametro è stato quantificato come numero di transizioni (C) e il tempo trascorso nel compartimento illuminato del light dark box. I risultati sono espressi come $media \pm SEM$ di dati ottenuti da 10 topi per gruppo.

* $p < 0.05$ verso controllo vissuto in ambiente standard; ^^ $p < 0.01$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard.

4.3 Effetto dell'arricchimento ambientale sui processi di demielinizzazione ed infiammazione nella corteccia di topo EAE

Analisi istologiche mirate ad evidenziare processi di demielinizzazione attraverso colorazione Luxol Fast Blu evidenziano che nei quattro gruppi sperimentali non si osservano a 21 d.p.i. delle notevoli differenze di danno mielinico sia a livello del corpo calloso e della zona sub ventricolare (SVZ) (Fig.4A).

Tuttavia dall'analisi effettuata con Eosina/Ematossilina (H&E), al fine di evidenziare la presenza di infiltrati e di infiammazione, si evince una aumentata densità cellulare, specialmente in prossimità di vasi, nei topi EAE. Da precedenti studi, gli infiltrati cellulari erano formati per lo più da accumuli di cellule linfocitarie (Mangiardi et al., 2011).

La presenza di infiltrati cellulari è significativamente più bassa nei topi EAE esposti fin dallo svezzamento all'EE (Fig.4 C).

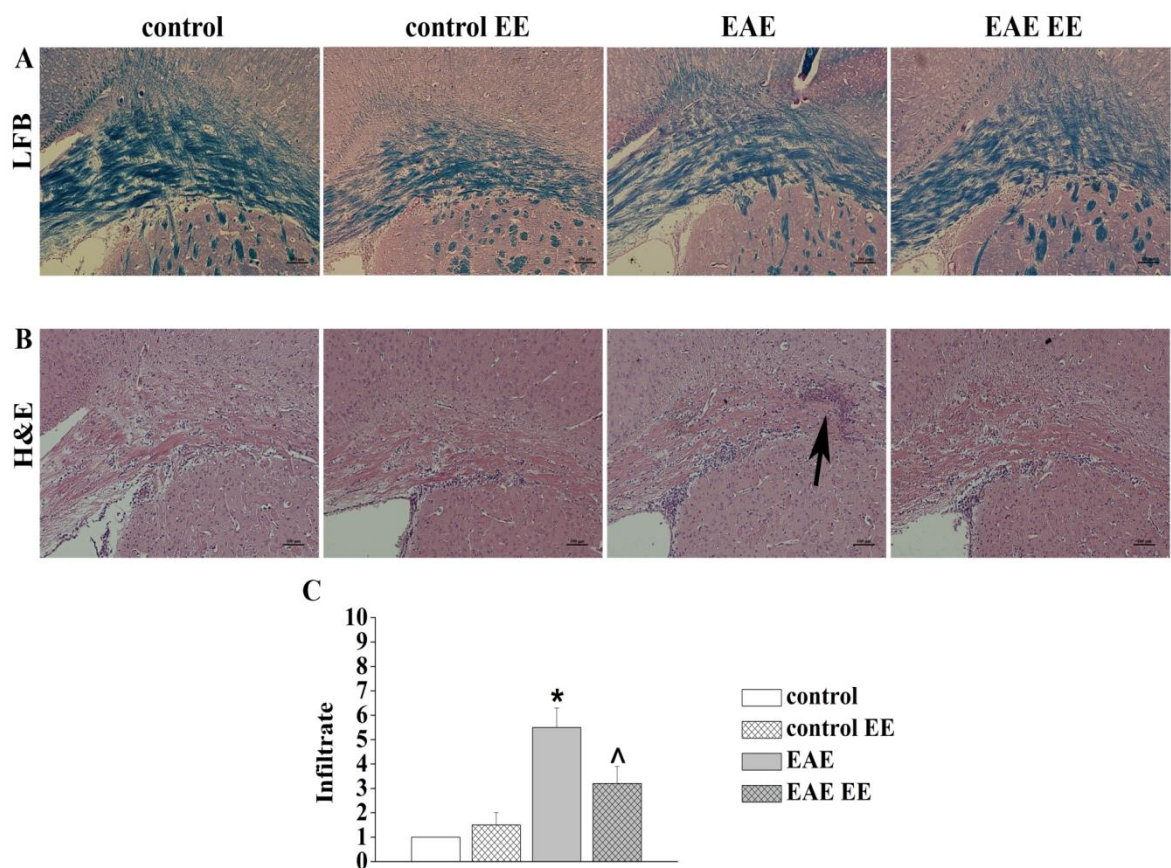


Figura 4. Effetti dell'arricchimento ambientale su demielinizzazione ed infiammazione nella corteccia di topi controllo vissuti in ambiente standard (control) e in EE (control EE) e di topi EAE cresciuti in condizioni standard (EAE) e in EE (EAE EE) nello stadio acuto della patologia. Il Luxol Fast Blue (LFB) ha colorato la mielina in blu. Vengono mostrate immagini rappresentative delle aree del corpo calloso e SVZ di ogni gruppo (A). L'ematoxilina ed eosina (H&E) marca la presenza di infiltrati infiammatori (B). Sono riportate immagini che rappresentano le aree del corpo calloso e SVZ (B). Valutazione quantitativa delle infiltrazioni infiammatorie nelle aree del corpo calloso e della SVZ di topi controllo vissuti in ambiente standard (barre bianche), di topi controllo vissuti in ambiente arricchito (barre bianche righe incrociate), di topi EAE vissuti in ambiente standard (barre grigie), di topi EAE vissuti in EE (barre grigie righe incrociate). (C) * $p < 0.05$ verso topi controllo cresciuti in ambiente standard; ^ $p < 0.05$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard. Scala Bar: 100 μ m.

4.4. Effetto dell'ambiente arricchito sul rilascio di glutammato endogeno da terminali nervosi di topi controllo e di topi EAE

Le terminazioni nervose (sinaptosomi) sono state isolate dalla corteccia dei topi appartenenti ai quattro differenti gruppi. I sinaptosomi sono stati esposti in superfusione ad una stimolo depolarizzante (soluzione 12 Mm KCl) al fine di determinare l'esocitosi del glutammato.

Precedenti studi avevano dimostrato come in topi EAE alla fase acuta della malattia si instaurino delle alterazioni di trasmissione sinaptica in aree cerebrali quali la corteccia, l'ippocampo e il midollo spinale (Di Prisco et al., 2014,a, b, 2016a, Bonfiglio et al. 2017). In particolare, a livello corticale è stata dimostrata una diminuzione dell'efficienza della liberazione di glutammato da terminali nervosi di topi EAE rispetto ai controlli.

L'EE non modifica di per se il rilascio di glutammato indotto da stimolo depolarizzante in topi controllo, ma recupera l'alterazione presinaptica in topi immunizzati (Fig.5).

Infatti, l'esocitosi dell'amminoacido da terminazioni nervose corticali di topi EAE cresciuti in ambiente stimolante è significativamente più alto di quello osservato da terminazioni corticali di topi EAE e il rilascio è paragonabile a quello osservato in sinaptosomi corticali isolati da topi controllo, sia vissuti in ambiente standard sia cresciuti in EE.

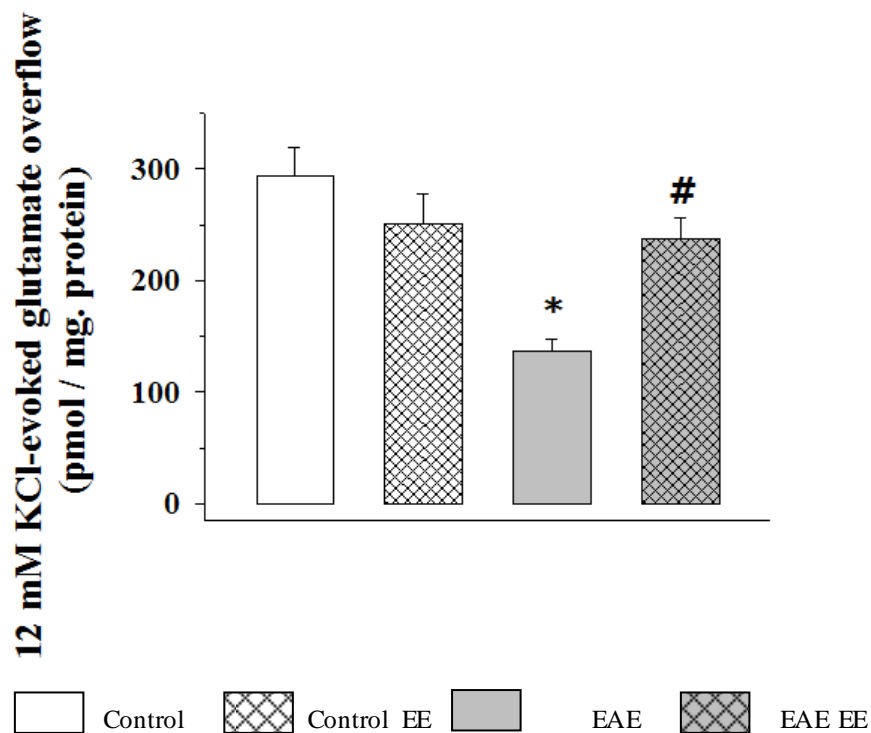


Figura 5. Effetti dell'arricchimento ambientale sull'esocitosi indotta da depolarizzazione di glutammato endogeno dalle terminazioni nervose isolate dalla corteccia di topi controllo ed EAE. I topi controllo vissuti in ambiente standard (barra bianca), i topi controllo cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), i topi EAE vissuti in ambiente standard (barra grigia) ed EAE arricchiti (barra grigia righe incrociate) sono stati sacrificati a 21 ± 1 d.p.i. I sinaptosomi corticali sono stati isolati per monitorare l'esocitosi di glutammato endogeno indotta da uno stimolo depolarizzante (12 mM KCl). I risultati sono stati espressi come flusso indotto da KCl; i dati sono stati espressi come pmol / mg di proteine e rappresentano la media \pm SEM di otto esperimenti svolti in triplicato (tre camere di superfusione per ogni condizione sperimentale)

* $p < 0.05$ verso topi controllo cresciuti in ambiente standard; # $p < 0.05$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard.

4.5. Effetto dell'ambiente arricchito sulla produzione endogena di cAMP in terminazioni nervose corticali da topi controllo e EAE

Dati in letteratura hanno dimostrato come la ridotta efficienza nella liberazione di glutammato endogeno da terminazioni nervose corticali isolate da topi EAE possa essere accompagnata da una ridotta efficienza nella produzione endogena del secondo messaggero AMP ciclico. È noto che l'esocitosi di acido glutammico dipende in parte da processi metabolici dipendenti da fosforilazioni mediate dal cAMP (Grilli et al., 2003).

Dati precedentemente ottenuti hanno dimostrato come la ridotta efficienza di liberazione del glutammato endogeno osservata in terminazioni nervose isolate dalla corteccia di topi EAE sia accompagnata da una ridotta produzione di cAMP endogeno in questi sinaptosomi (Di Prisco et al., 2013).

È stata quindi valutata la produzione endogena di cAMP indotta da stimolo depolarizzante in sinaptosomi corticali di topi controllo e di topi EAE cresciuti in ambiente standard e/o in ambiente arricchito.

Anche in questo caso l'EE non modifica la produzione del secondo messaggero in topi non immunizzati, tuttavia in topi EAE, stimolati da un ambiente arricchito, la quantità di cAMP risulta essere paragonabile ai controlli a differenza di quelli cresciuti in ambiente standard in cui è possibile osservare diminuzione significativa (Fig.6).

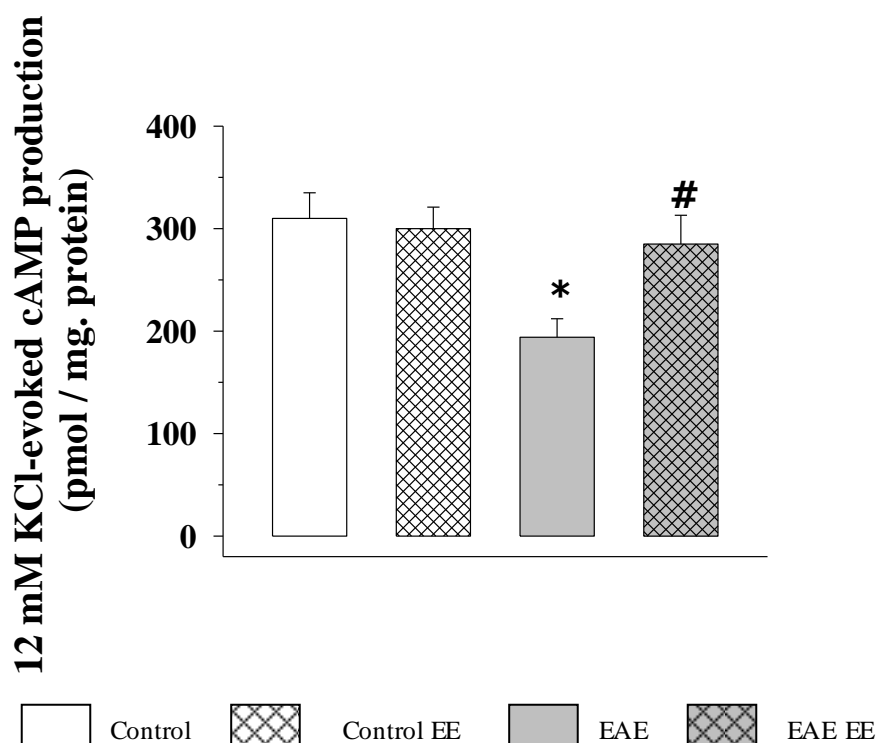


Figura 6. Effetti dell'arricchimento ambientale sulla produzione di cAMP indotta dalla depolarizzazione nelle terminazioni nervose isolate dalla corteccia di topi controllo ed EAE. I topi controllo vissuti in ambiente standard (barra bianca), i topi controllo cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), i topi EAE vissuti in ambiente standard (barra grigia) ed EAE arricchiti (barra grigia righe incrociate) sono stati sacrificati a 21 ± 1 d.p.i. I sinaptosomi corticali sono stati preparati per quantificare la produzione di secondo messaggero indotta da 12 mM di K⁺. I risultati sono stati espressi come produzione di cAMP provocata da KCl; i dati sono stati espressi come pmol / mg di proteine e rappresentano la media \pm SEM di sei esperimenti svolti in triplicato (tre determinazioni per ogni condizione sperimentale).

* $p < 0.05$ verso topi controllo cresciuti in ambiente standard; # $p < 0.05$ verso topi EAE cresciuti in ambiente standard.

4.6 Effetto dell' ambiente arricchito sull'espressione delle proteine del complesso SNARE in terminazioni corticali da topi controlli ed EAE

Lo SNARE (*solubile NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion) attachment protein receptor*) è un complesso multiproteico costituito da proteine presenti nel terminale presinaptico.

E' costituito da due componenti proteiche, una componente presente a livello vescicolare e una componente presente a livello della membrana plasmatica. Nel primo gruppo di proteine troviamo la sinaptobrevina, nel secondo gruppo la syntaxina e la SNAP25. Questo complesso è essenziale per il *docking* (ancoraggio) e per il *priming* (fusione) delle vescicole con la membrana sinaptica.

Il secondo complesso proteico è formato da Munc18/UNC-18 (*mammalian uncoordinated 18/uncoordinated-18*), Munc13/UNC-13 e sinaptotagmina (syt), che interagiscono con il complesso SNARE e regolano il processo d'esocitosi delle vescicole.

Analisi proteiche svolte in sinaptosomi corticali isolati da topi dei quattro gruppi in studio dimostrano che l'EE non modifica l'espressione di syntaxina 1 (Fig. 7A).

Diversamente da quanto osservato, SNAP 25 risulta alterata (Fig. 7B). Pur non essendoci grosse variazioni tra i controlli esposti in EE, e non, e topi EAE, questa proteina risulta significativamente aumentata nei sinaptosomi corticali di topi EAE cresciuti in ambiente arricchito rispetto agli altri gruppi.

Variazioni significative sono state evidenziate anche analizzando il quantitativo proteico di MUNC-18 nei sinaptosomi corticali isolati da topi controllo ed EAE vissuti in ambiente standard e da topi controllo ed immunizzati cresciuti in EE. Come si può osservare nella figura 7C, i livelli di MUNC-18 sono significativamente ridotti sia in topi controllo vissuti in ambiente arricchito sia in quelli immunizzati rispetto ai topi controllo in ambiente standard. Tuttavia, l'EE in animali immunizzati recupera tale alterazione, riportando MUNC-18 a livelli paragonabili al controllo non trattato. Inoltre, risulta essere significativamente maggiore rispetto sia a topi EAE sia a topi controllo EE.

Infine non si assistono variazioni significative di Sinaptotagmina (Fig. 7D) su terminazioni nervose isolati da cortecce dei quattro differenti gruppi in esame.

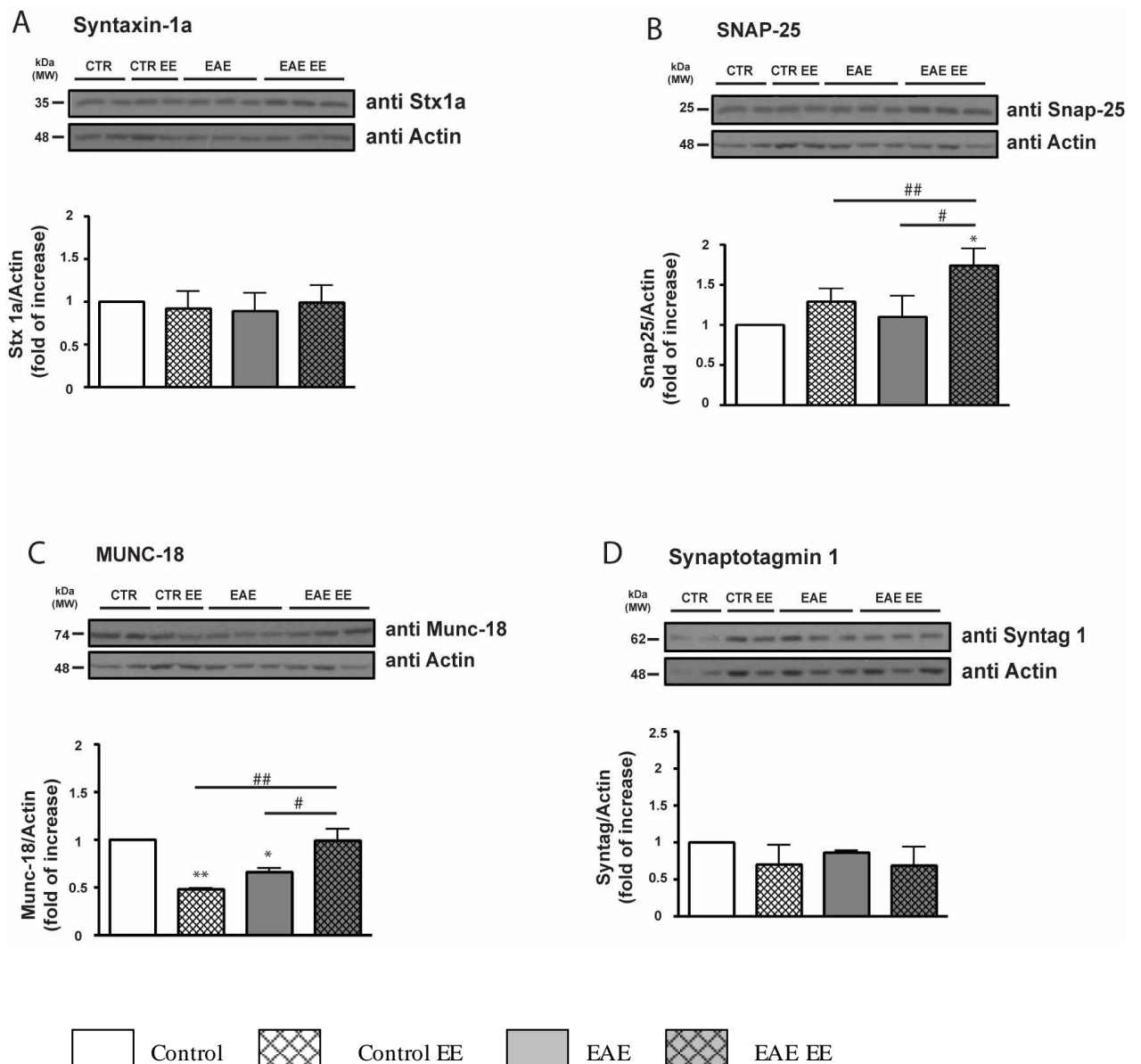


Figura 7. Effetti dell'arricchimento ambientale sull'espressione di proteina citosoliche implicate nell'esocitosi dei trasmettitori nelle terminazioni nervose corticali isolate da topi controllo ed EAE. I topi controllo vissuti in ambiente standard (barra bianca), i topi controllo cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), i topi EAE vissuti in ambiente standard (barra grigia) ed EAE arricchiti (barra grigia righe incrociata) sono stati sacrificati a 21 ± 1 d.p.i. I sinaptosomi corticali sono stati lisati per quantificare i livelli di syntaxina-1A (A), SNAP25 (B), Munc-18 (C) e sinaptotagmina 1 (D). La massa delle proteine è stata espressa in kDa. La quantità di esse è stata valutata con analisi densitometriche ed è stata normalizzata tramite il contenuto di actina nei lisati sinaptosomiali. La figura mostra i blot per ogni proteina sopra menzionata che sono rappresentativi di 5 analisi su 6 condotte in diversi giorni con differenti lisati sinaptosomiali.

I risultati sono stati espressi come aumento rispetto all'espressione di proteine nei sinaptosomi corticali di topi controllo vissuti in ambiente standard.

$p < 0.05$ verso i topi controllo cresciuti in ambiente standard; ## $p < 0.01$ verso i topi controllo cresciuti in ambiente standard.

DISCUSSIONE

I programmi riabilitativi volti a rafforzare la “riserva cognitiva” sono in grado di ridurre la fatica, influenzano i disturbi dell'umore e migliorano i processi di apprendimento e memoria in pazienti affetti da SM, migliorando la loro qualità di vita (Luerding et al., 2016; Motl et al., 2016).

Tuttavia, anche se l'interesse per la “riserva cognitiva” sta crescendo, c'è una necessità di sostenere l'efficacia dell'esposizione ad un ambiente stimolante con studi preclinici finalizzati a individuare i meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti negli effetti benefici che questo approccio esercita sulla progressione della patologia.

La prima osservazione del nostro studio è che la stimolazione ambientale è in grado di ridurre i segni clinici e comportamenti in topi EAE.

Nei topi EAE si osserva una costante perdita di peso, a partire dalla fase iniziale della malattia che persiste e peggiora nel corso della patologia.

Quando i segni clinici e il calo ponderale risultano essere marcati, parallelamente, si assiste ad una compromissione dell'attività motoria spontanea, una riduzione della curiosità e un aumento dei comportamenti ansiogeni (Peruga et al., 2011; Rodrigues et al., 2011; Di Prisco et al., 2014; Gentile et al., 2016; Bonfiglio et al., 2017). Nei topi EAE cresciuti in EE, la sintomatologia clinica è meno pronunciata rispetto a quella osservata nei topi controllo, coerentemente con i risultati descritti da Magalon e coll. (2007).

Contemporaneamente, è stato rilevato un aumento di peso continuo, a suggerire un miglioramento generale delle condizioni fisiche. Infine, è risultato evidente un incremento significativo dell'attività motoria spontanea e della curiosità (un parametro inversamente correlato all'ansia) allo stadio acuto della malattia, miglioramento coerente con l'aumentato benessere degli animali.

Il glutammato è il principale amminoacido eccitatorio nel SNC, dove controlla la forza e la plasticità delle sinapsi chimiche. Negli animali EAE si osserva una riduzione dell'efficienza di rilascio del glutammato (Vilcaes et al., 2009; Cid et al., 2011; Di Prisco et al., 2013, 2014a, b, 2016a; Bonfiglio et al., 2017). Questo deficit raggiunge il livello massimo nella fase acuta della malattia, e rimane poi costante. Alterazioni del rilascio di tale neurotrasmettitore hanno un ruolo fondamentale nell'insorgenza dei sintomi neuropsichiatrici, nella compromissione delle attività motorie (Lindenbach et al., 2016) così

come nell'insorgenza di comportamenti ansiogenici (Chiba et al., 2012), sintomi tipici dei malati di SM.

Dati in letteratura dimostrano l'esistenza di una stretta correlazione tra efficienza nel rilascio di glutammato a livello di terminazioni glutammatergiche corticali e l'insorgenza dei sintomi clinici in topi EE. Non a caso, la somministrazione di farmaci modificanti la SM in topi affetti da EAE ha la capacità di ripristinare la normale trasmissione glutammatergica e contemporaneamente ridurre la gravità dei sintomi clinici (De Lago et al., 2012; Rossi et al., 2012; Ruffini et al., 2013; Bonfiglio et al., 2017).

In maniera analoga, i nostri risultati dimostrano che anche l'esposizione ad un ambiente arricchito può recuperare le alterazioni nervose centrali in animali EAE. In particolare i nostri dati mostrano come, in topi EAE cresciuti in ambiente stimolato, l'esocitosi glutammatergica sia paragonabile a quella osservata in topi controllo, ma significativamente più alta rispetto a quella osservata in topi EAE; questo primo dato dimostra come una stimolazione ambientale possa preservare le terminazioni glutammatergiche dalle alterazioni funzionali osservate durante la fase acuta della malattia.

Dati in letteratura dimostrano che, alla base dei difetti glutammatergici osservati a livello corticale in topi affetti da EAE, vi possono essere due importanti eventi scatenanti, uno di natura presinaptica e un altro di natura neuroinfiammatoria. (Rossi et al., 2012; Bonfiglio et al., 2017).

Il primo evento suggerisce che disfunzioni dei meccanismi di esocitosi di glutammato possano essere determinati dall'alterazione dei meccanismi enzimatici che controllano l'efficacia di rilascio in questi terminali nervosi (Di Prisco et al., 2013 e 2014b; Chanaday et al., 2015).

E' noto infatti che la liberazione esocitotica di glutammato da terminali corticali dipende dall'attivazione di una cascata di eventi citosolici scatenata e mantenuta da processi cAMP dipendenti (Grilli et al., 2004). Dati precedenti ottenuti dal gruppo di ricerca in cui ho lavorato hanno dimostrato come in terminazioni corticali di topi EAE si osservi una disregolazione della via di produzione del cAMP che si manifesta contemporaneamente alla riduzione della capacità di esocitosi di questi terminali (Di Prisco et al., 2013, 2014b; Chanaday et al., 2015).

Eventi associati alla cascata enzimatica che porta alla produzione di AMP ciclico e fosforilazione della Proteina Chinasi A (PKA) giocano un ruolo fondamentale nel rilascio del neurotrasmettitore.

Il cAMP controlla l'espressione e la corretta formazione delle proteine del complesso SNARE (Paco et al., 2009), mentre la PKA modula il suo assemblaggio (Chavez-Noreiga, 1994; Menegon et al., 2006) attraverso diversi meccanismi. In primis, promuove il distacco della vescicola sinaptica dal legame con il filamento di actina fosforilando la Sinapsina 1-A. Questa fosforilazione libera le vescicole, indirizzandole verso la zona attiva nel neurone presinaptico, aumentando l'esocitosi indotta da stimolo (Menegon et al., 2006).

Altri due meccanismi che vedono coinvolta la PKA sono il controllo della fosforilazione di SNAP25, proteina che modula positivamente la disponibilità e la quantità di neurotrasmettitore rilasciato (Hirling e Scheller, 1996; Park et al., 2014) e la partecipazione della sinaptotagmina nella formazione del complesso SNARE (Maximov et al., 2007).

I topi immunizzati presentano dei livelli di syntaxina 1 A, SNAP 25 e sinaptotagmina invariati rispetto ai topi controllo, mentre i livelli di MUNC-18 sono significativamente ridotti, coerente con una riduzione del rilascio di glutammato e nella produzione di AMP ciclico osservato negli stessi.

Nei topi EAE cresciuti in ambiente arricchito, la produzione di cAMP in terminazioni corticali è paragonabile a quella osservata negli stessi terminali isolati da corteccia di topi controlli e significativamente più elevata di quella osservata in terminazioni corticali isolate da topi EAE.

L'effetto della stimolazione ambientale sull'espressione di proteine del complesso SNARE a livello delle terminazioni nervose corticali in topi EAE, suggerisce che questi eventi, possano favorire il ripristino delle funzioni esocitotiche nelle terminazioni glutamatergiche di topi immunizzati.

In pratica, i dati funzionali e non funzionali descritti suggeriscono che la stimolazione ambientale possa proteggere i terminali presinaptici dai danni causati dalla patologia autoimmune, mantenendo la loro capacità di rilascio durante la progressione della patologia.

Alternativa a questa ipotesi di recupero diretto delle funzioni presinaptiche è la possibilità che fattori proinfiammatori solubili, liberati nella biofase nel corso dell'infiammazione (Musante et al., 2009; Di Prisco et al., 2012, 2016), possano controllare l'esocitosi di glutammato da terminali nervosi.

In linea con queste ipotesi, dati in letteratura dimostrano che l'EE può migliorare la funzionalità del sistema immunitario a livello cerebrale (Williamson et al., 2012), attenuando la neuroinfiammazione nel SNC (Jurgens e Johnson, 2012) e promuovendo la mielinizzazione assonale (Pusic et al., 2016).

Lesioni infiammatorie nella corteccia di topi EAE si osservano solo dopo la fase acuta della patologia, allo stadio conclamato (intorno al 40 d.p.i., Mangiardi et al., 2011; Magalon et al., 2007), e preferibilmente queste lesioni si sviluppano nelle zone corticali, adiacente al corpo calloso (CC).

I risultati descritti in questa tesi dimostrano che anche se nei topi EAE a 21 d.p.i. l'infiammazione e le lesioni demielinizzanti a livello corticale non sono marcate, se non in prossimità del CC, queste alterazioni tessutali non si manifestano in topi immunizzati e cresciuti in EE, a controprova di un effetto benefico dell'EE su questi eventi.

Sebbene ulteriori studi siano necessari per affrontare meglio questo aspetto, i nostri risultati confermano l'esistenza di un cross-talk patologico tra il sistema immunitario e il SNC.

Tutte queste osservazioni suggeriscono che una stimolazione ambientale precoce, ovvero ancor prima dell'esordio patologico, promuove il recupero dei difetti neuronali proteggendo le terminazioni glutamatergiche da alterazioni funzionali, ma anche riducendo il danno infiammatorio che controlla negativamente l'attività sinaptica.

Prima di concludere, alcuni risultati della nostra ricerca richiedono ulteriori discussioni.

In letteratura sono presenti dati controversi riguardanti l'impatto dell'EE sugli eventi sinaptici in animali sani (Petrosini et al., 2009; Arai e Feig, 2011).

In particolare, a livello presinaptico, è stato dimostrato come l'esposizione ad un ambiente arricchito di animali adulti sani non determini di per se delle modifiche significative nel rilascio di neurotrasmettitori nel SNC, ma causi delle modificazioni persistenti e significative nella espressione e funzione di recettori ionotropi glutamatergici di tipo NMDA e AMPA (Grilli et al., 2009; Musante et al. 2011).

In questo studio, non abbiamo potuto osservare, cambiamenti significativi in animali cresciuti in EE né analizzando parametri fisici (peso), né analizzando i dati comportamentali (attività motoria spontanea e curiosità) e neppure negli eventi funzionali presinaptici [rilascio di glutammato (vedi anche Summa et al., 2011), produzione cAMP, espressione proteine SNARE, ad eccezione di MUNC-18] rispetto agli animali cresciuti in ambiente standard, nonostante ci si aspetti che in questi animali l'EE abbia causato un rafforzamento della "riserva cognitiva" attiva (cioè quella basata sull'efficienza dei circuiti neuronali).

È però opportuno ricordare che, sebbene l'EE possa migliorare i meccanismi cellulari e l'apprendimento, i suoi effetti sono in genere evidenziati come inversione di difetti sinaptici e / o nel recupero dei sintomi associati a condizioni neuropatologiche in corso,

quali sono quelli osservati nei topi EAE (Grilli et al., 2009; Petrosini et al., 2009; Musante et al., 2011; Buschler e Manahan-Vaughan, 2017)

L'Invecchiamento

5 Aspetti generali

Un rapporto effettuato nel 2015 dall'OMS, Organizzazione Mondiale della Sanità, rivela che l'Italia risulta essere lo stato più «vecchio» d'Europa con il 21,5% dei cittadini over 65 e il 6,4% over 80, secondo al mondo dopo il Giappone.

Si pensa che questo andamento sia determinato da una diminuzione delle nascite, dal progresso nel campo della medicina e dal miglioramento del tenore di vita. Infatti oggi, grazie alla riduzione dei livelli di mortalità, una quota sempre più consistente di persone raggiunge l'età più avanzata della vita.

Studiare i meccanismi che comportano alterazioni associate all'invecchiamento, sia per quanto riguarda l'aspetto anatomico che quello fisiologico, è fondamentale per l'identificazione di nuovi approcci terapeutici e per lo sviluppo di nuove strategie multimodali per la cura della popolazione anziana.

L'invecchiamento è un processo graduale durante il quale eventi patologici sia molecolari che cellulari si sviluppano progressivamente, favorendo l'insorgenza di alterazioni irreversibili quali i disordini vascolari e metabolici e il declino cognitivo.

L'accumulo di danni molecolari e cellulari che si hanno durante il corso della vita conduce ad una condizione patologica caratterizzata da disordini vascolari, sarcopenia, l'osteoporosi e declino cognitivo. La perdita di proteine e di tessuto osseo e il concomitante aumento della massa grassa sono alcuni effetti che si hanno con l'invecchiamento: questo porta ad un aumento dell'incidenza di patologie infiammatorie, dislipidemia, aterosclerosi, obesità, diabete insulino-resistente e diabete mellito di tipo 2. Inoltre, alcuni di questi fattori come la dislipidemia sono associati ad un'augmentata incidenza di patologie neurodegenerative caratterizzate da un deterioramento dei neuroni e delle cellule gliali del SNC che, frequentemente, portano ad un declino cognitivo e alla demenza senile.

L'invecchiamento è un processo fisiologico inevitabile che riduce la complessità e la plasticità dei contatti sinaptici nel SNC, portando a una irrefrenabile semplificazione delle reti neuronali. Questi eventi comportano un progressivo declino delle funzioni motorie e cognitive, spesso associate ad una maggiore ansia e alterazioni dell'umore (Deak, 2014; Castro-Chavir et al.,2015; Schättin et al., 2016).

Il declino inizia presto, ma diventa evidente quando i meccanismi di recupero e / o compensazione sono insufficienti per far fronte ai difetti sinaptici centrali (Breunig et al., 2013). Contemporaneamente, eventi maladattivi innescati da componenti patologici (cioè citochine proinfiammatorie, beta amiloidi e proteine tau) disturbano le connessioni neurali, accelerando i danni nel SNC (Mather et al., 2016).

5.1 Invecchiamento e trasmissione chimica nel cervello

L'età è un fattore di rischio per la maggior parte delle patologie neurodegenerative. Molti studi suggeriscono che il processo di invecchiamento sia associato a diverse modifiche strutturali, chimiche, e funzionali del cervello che diventano evidenti come alterazioni neurocognitive. In particolare, il declino cognitivo, i disturbi di umore e le disfunzioni motorie sono sintomi clinici associati all'invecchiamento che frequentemente sono accompagnati da alterazioni della trasmissione chimica nel SNC.

Alcuni recenti studi hanno dimostrato, con analisi di risonanza magnetica, delle variazioni volumetriche nelle dimensioni di alcuni tessuti cerebrali con l'aumentare delle età. Con l'invecchiamento si osserva un'espansione dei ventricoli che porta alla comparsa di ventricolomegalia (Apostolova et al.,2012). mentre si osserva contemporaneamente una diminuzione del tessuto sia ippocampale (Frisoni et al.,2008) che corticale.

Queste due aree risultano essere più vulnerabili all'invecchiamento rispetto ad altre. Si pensa che il declino cognitivo relativo all'invecchiamento sia dovuto non solo alla morte dei neuroni ma soprattutto ad alterazioni sinaptiche. Questa ipotesi è supportata da studi condotti su animali che hanno suggerito che il declino cognitivo sia dovuto a cambiamenti funzionali e biochimici come l'attività enzimatica, i messaggeri chimici o l'espressione genica nei circuiti corticali (Hof e Morrison, 2004) e ippocampali. A confermare queste alterazioni, alcuni lavori hanno mostrato che le arborizzazioni e le spine dendritiche di neuroni piramidali diminuiscono sia in numero che in struttura come risultato dell'invecchiamento (Duan et al., 2003; Hof e Morrison, 2004).

Oltre ai cambiamenti strutturali a cui può andare incontro il sistema nervoso durante l'invecchiamento, si possono avere anche dei cambiamenti biochimici. Nello specifico, diversi studi hanno evidenziato in differenti regioni cerebrali una marcata alterazione nella sintesi e liberazione di diversi neurotrasmettitori e una alterazione dell'espressione dei rispettivi recettori. Queste alterazioni sono state proposte essere parte integrante di un processo di invecchiamento che colpisce l'intero corpo umano.

Un primo esempio è dato dal sistema dopaminergico. La sintesi della dopamina diminuisce nel SNC nell'invecchiamento (Hof e Mobbs, 2009), e questa diminuzione è accompagnata da una riduzione significativa dell'espressione dei recettori D1, D2 e D3 (Kaasinen et al., 2000; Wang et al., 1998; Iyo et al., 1993; Juha Rinne et al., 1989; Wong et al., 1984). Negli anziani, l'innervazione dopaminergica dei gangli della base e della

corteccia è notevolmente ridotta e questa potrebbe favorire l'insorgere di disabilità motorie e alterazioni nella memoria di lavoro (Collier et al., 2017).

Inoltre, a livello della corteccia prefrontale in animali anziani si osserva una significativa diminuzione di neuroni colinergici e dei processi neuronali. Questa diminuzione determina la comparsa di alterazioni cognitive e di risposta allo stress associata all'invecchiamento.

Anche i recettori e trasportatori della serotonina, 5-HT, risultano diminuiti con l'invecchiamento.

A partire dagli inizi del '90, molti studi si concentrarono sulla trasmissione glutammatergica e quindi sul glutammato e i suoi recettori, principalmente a causa del ruolo di questo trasmettitore nei meccanismi cellulari alla base della plasticità sinaptica, l'apprendimento e la memoria.

Negli animali anziani è stata dimostrata un'alterazione a livello ippocampale sia di LTP (potenziamento a lungo termine, Barnes et al., 2000) che di LTD (depressione a lungo termine, Rozycka et al., 2017). È stato proposto che queste alterazioni siano dovute ad una riorganizzazione sinaptica anomala e / o a cambiamenti patologici nell'espressione delle proteine / recettori presinaptici causati da una ridotta trasmissione eccitatoria a questi livelli (Liguz-Lecznar et al., 2015). Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che la biodisponibilità di glutammato diminuisce con l'invecchiamento (Chang et al., 2009; Salasuta et al., 2008; Kaiser et al., 2005) in particolare nella corteccia. Ad oggi però non è stata dimostrata una alterazione della capacità di rilascio di glutammato da terminazioni nervose. Si è quindi ipotizzato che le alterazioni indotte dall'invecchiamento non fossero a carico dei terminali glutammatergici bensì delle terminazioni GABAergiche, che essendo in stretto contatto con le terminazioni glutammatergiche ne controllano la funzione. Quindi, l'ipotesi più accreditata oggi è che l'invecchiamento influenzi più severamente la trasmissione GABAergica rispetto alla trasmissione glutammatergica.

L' "ipotesi glutammatergica" dell'invecchiamento cerebrale è stata quindi superata dall' "ipotesi GABAergica", che sottolinea l'importanza del danneggiamento della trasmissione del GABA nel SNC durante l'invecchiamento. In sintesi, si ipotizza che il disequilibrio del rapporto inibizione/eccitazione in particolari regioni cerebrali (inclusa la corteccia), renda il sistema nervoso maggiormente vulnerabile al declino e alle sinaptopatie. (Rozycka et al., 2017). Quest'ipotesi è avvalorata da studi che hanno dimostrato come nella corteccia visiva di gatti anziani, seppure il numero di neuroni totali sia costante rispetto a quanto osservato in gatti giovani, la quantità dei neuroni GABAergici era diminuita. Anche

in ratti anziani, a livello ippocampale, gli interneuroni GABAergici inibitori diventano meno efficienti nel controllare la trasmissione del segnale eccitatorio, favorendo quindi l'alterazione della trasmissione sinaptica e la conseguente insorgenza di risposte maladattive (Rozycka et al., 2017; Mora et al., 2007).

Oltre al GABA, recentemente l'interesse dei ricercatori si è focalizzato sulla noradrenalina. Le innervazioni noradrenergiche originano da neuroni posti nel Locus Coeruleus (LC) e proiettano in particolari regioni del SNC. Le proiezioni noradrenergiche, in particolare quelle che innervano la corteccia frontale, sono largamente ridotte in topi vecchi e la conseguente perdita di funzioni di questi neuroni è associata a cambiamenti relativi alla potenza e all'efficienza dei recettori noradrenergici, portando a meccanismi di compensazione che caratterizzano i processi dell'invecchiamento (Francis et al., 2012; Raskind et al., 1999). Nonostante i fattori cerebrali dell'invecchiamento quali la perdita di cellule nervose e relative sinapsi si ripercuotono negativamente sull'assetto cognitivo di un individuo, anche i fattori psicologici quali l'abbassamento del tono dell'umore e la scarsità delle relazioni interpersonali sono strettamente correlati con il deficit cognitivo.

5.2 “Riserva cognitiva” e invecchiamento

Come già anticipato nella prima parte di questa tesi, negli ultimi anni molte ricerche si sono focalizzate sugli interventi che, potenziando la riserva cognitiva, possono essere messi in atto per rallentare le alterazioni funzionali, chimiche e strutturali tipiche dell'invecchiamento.

L'obiettivo è quello di rallentare il peggioramento fisio-patologico indotto dal normale invecchiamento cellulare, migliorandone le prestazioni cognitive (memoria, ragionamento, linguaggio ecc...) e riducendo l'insorgenza di depressione, ansia e disturbi comportamentali.

Attualmente non sono chiari quali siano i meccanismi molecolari che permettono un “sano invecchiamento” a causa della grande variabilità interindividuale. Tuttavia è stato dimostrato che lo stile di vita è fondamentale per diminuire il rischio di demenza (Verghese et al., 2003).

Studi svolti su roditori, hanno dimostrato come l'esposizione ad un ambiente arricchito (EE), inteso come un luogo con più stimoli e maggiori interazioni sociali, possa migliorare l'apprendimento, la memoria, incrementare la neurogenesi ippocampale in ratti (Van Praag et al., 2000) e aumentare le connessioni sinaptiche permettendo di migliorare la memoria a lungo termine dopo un periodo di atrofia corticale (Fisher et al., 2007). Anche in topi transgenici che sviluppano una patologia tipo AD l'esposizione ad un ambiente arricchito può migliorare l'apprendimento, la memoria, soprattutto la “memoria di lavoro (Arendash et al., 2004).

Inoltre, si osserva una diminuzione dei livelli di β amiloide (Adlard et al., 2005; Ambrée et al., 2006), una diminuzione dei disturbi neurovascolari (Herring et al., 2008), dell'ansia e un miglioramento delle “performance cognitive” (Adlard, et al., 2005; Costa et al., 2007; Goertz et al., 2008).

Effetti benefici indotti da EE si sono osservati anche in modelli di topo che sviluppano un invecchiamento precoce (SAMP-8, Prone-8 Accelerated Senescence Mouse) ed in topi geneticamente modificati che mostrano una compromissione della memoria; in entrambi i casi l'EE ha migliorato la loro funzionalità di apprendimento (Griñan-Ferré et al., 2016).

La strategia di potenziare la “riserva cognitiva” attraverso l'esposizione ad EE è risultata avere effetti benefici sia in roditori anziani che nei giovani determinando una azione protettiva verso stress e stimoli neuropatologici (Whalley et al., 2004; Redolat et al., 2012).

La maggior parte degli studi condotti fino ad ora però si è concentrata sugli effetti protettivi di una stimolazione ambientale “preventiva” e prolungata nel tempo prima dello sviluppo dei primi segni di invecchiamento (ad esempio, esponendo gli animali ad EE durante l'età adulta, a partire dalla separazione dalla madre) (Rozyska et al., 2017; Arai and Feig, 2011; Fuchs et al., 2016), ma solo pochi studi ad oggi si sono focalizzati sull'influenza di una stimolazione cognitiva di tipo “terapeutica” in roditori anziani (ad esempio l'allevamento in ambiente arricchito di animali a partire da 18-20 mesi di vita per almeno 8-10 settimane (Baraldi et al., 2013; Kumar et al., 2012).

In particolare, Kumar e collaboratori hanno dimostrato come sia l'esposizione “terapeutica” che l'esercizio fisico migliorino i processi ippocampali neuronali in topi di 20 mesi che sono stati esposti ad ambienti stimolanti per i tre mesi precedenti agli esperimenti. Queste osservazioni hanno dimostrato come un “*arricchimento cognitivo*” effettuato a tarda età possa ripristinare funzioni fisiologiche promuovendo un “sano invecchiamento del cervello”.

La potenzialità dell'esposizione ad un ambiente arricchito è stata osservata in esperimenti condotti in topi anziani e cognitivamente compromessi. In particolare, in topi di sesso femminile di 27 mesi e trattati in EE per 23 giorni sono stati osservati dei miglioramenti nella acquisizione della memoria spaziale ed un ripristino dei livelli della sinaptofisina, proteina marker pre-sinaptica (Frick e Fernandez, 2003). Risultati simili sono stati ottenuti in topi maschi, in ratti maschi e in cani invecchiati (Studzinski, 2008).

L'esposizione tardiva all'ambiente arricchito, peraltro, è il protocollo sperimentale che meglio di ogni altro riflette il modello di training per la “formazione cognitiva” proposto agli anziani come terapia aggiuntiva per migliorare la loro qualità di vita.

Lo scopo di questa seconda parte della mia tesi di dottorato è stato quello di:

1. valutare i cambiamenti del rilascio di neurotrasmettitori in corteccia di topi anziani associati all'invecchiamento

2. Valutare se e come un potenziamento cognitivo di tipo "terapeutico" possa compensare i cambiamenti funzionali osservati in questi topi.

RISULTATI

6.1. Effetto dell'ambiente arricchito sul peso in invecchiamento

Il primo parametro che è stato preso in considerazione è il cambiamento di peso dei topi giovani e anziani vissuti per 3 mesi in ambiente arricchito e dei rispettivi controlli. L'invecchiamento causa di per se una riduzione del peso nei piccoli roditori (Figura 8).

Come si può osservare nella stessa, l'esposizione ad EE causa un significativo aumento del peso nei topi giovani rispetto ai loro controlli. Al contrario dopo 3 mesi di esposizione ad ambiente arricchito il peso degli anziani non varia rispetto ai topi della stessa età vissuti in ambiente standard.

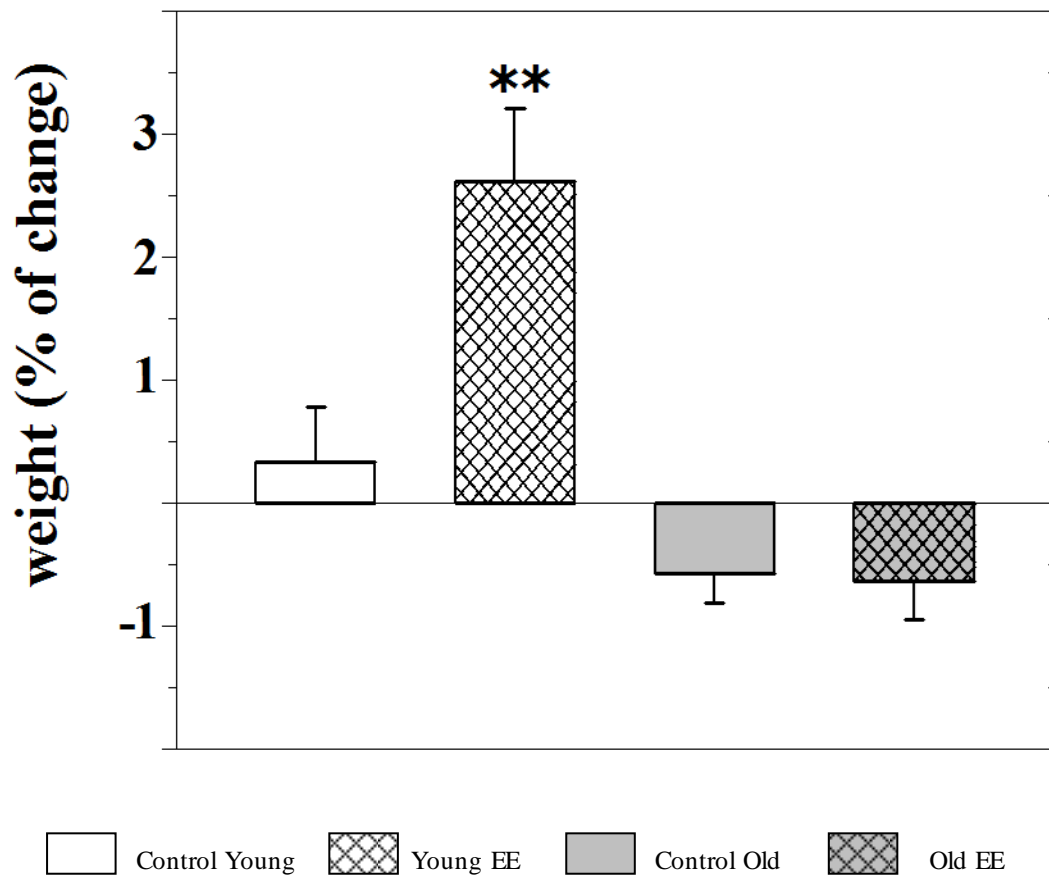


Figura 8. Il grafico rappresenta la variazione di peso di topi giovani (3 mesi) vissuti in ambiente standard (barra bianca), di topi giovani cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), di topi anziani (20 mesi) vissuti in ambiente standard (barra grigia) e di topi anziani vissuti in ambiente arricchito (barra grigia righe incrociate) espressa in percentuale dopo 3 mesi di EE. I dati rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo

** $p < 0.01$ verso i topi giovani vissuti in ambiente standard.

6.2 Effetto dell'ambiente arricchito sul comportamento e sull'attività fisica in topi giovani e anziani

I test comportamentali sono stati condotti per valutare gli effetti dell'esposizione ad un ambiente arricchito sulla curiosità, stato emotivo inversamente correlato all'ansia. La curiosità è stata analizzata utilizzando il test del "light/dark box test" considerando come parametri il numero di transizioni effettuate dagli animali dalla zona luminosa alla zona buia, e il tempo trascorso nella zona illuminata del box (Di Prisco et al., 2014; Bonfiglio et al., 2017).

L'EE non influenza significativamente il tempo trascorso nella parte luminosa dai topi giovani rispetto ai controlli, mentre si assiste un aumento significativo di questo parametro in topi anziani esposti per tre mesi ad EE rispetto agli animali della stessa età vissuti in condizioni standard. Inoltre dai nostri dati si evince come l'invecchiamento di per se causi un aumento dell'ansia. Infatti, se si considera il tempo trascorso alla luce dei topi anziani vissuti in ambiente standard rispetto ai topi giovani alloggiati nelle stesse condizioni abitative, risulta significativamente marcata la riduzione di tale parametro negli animali vecchi rispetto ai giovani (Figura 9 B.)

Risultati simili sono stati ottenuti monitorando il numero di transizioni degli animali appartenenti ai quattro differenti gruppi. Infatti, anche in questo caso, il training ambientale non ha influenzato il numero di transizioni effettuate dai topi giovani (Figura 9 A). Questo parametro risultava, però, significativamente ridotto in topi vecchi alloggiati in ambiente standard, quando confrontato con il valore ottenuto da animali giovani vissuti nella medesima condizione. Questo valore, tuttavia aumentava notevolmente in topi vecchi sottoposti a training cognitivo, se comparati a topi anziani vissuti in ambiente standard.

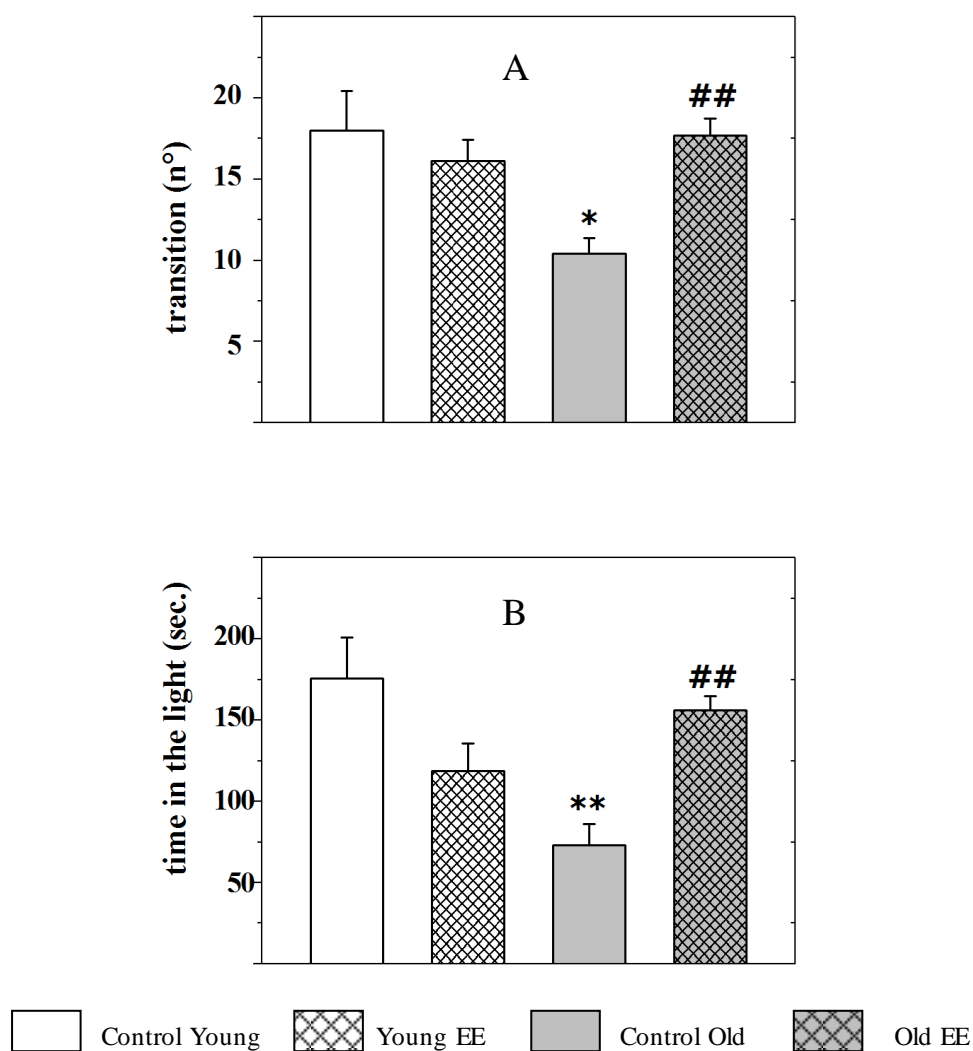


Figura 9. Effetti dell'invecchiamento e dell'arricchimento ambientale sull'attività esplorativa nei topi giovani (3 mesi) vissuti in ambiente standard (barra bianca), di topi giovani cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), di topi anziani (20 mesi) vissuti in ambiente standard (barra grigia) e di topi anziani vissuti in ambiente arricchito (barra grigia righe incrociate). Questo parametro è stato quantificato come numero di transizioni (A) e il tempo trascorso nel compartimento illuminato del light dark box (B). I parametri sono stati analizzati per ogni animale alla fine del periodo dei 3 mesi di EE. I dati sono espressi come media \pm SEM di 12 animali per ogni gruppo.

* $p < 0.05$ verso i topi giovani vissuti in ambiente standard; ** $p < 0.01$ verso i topi giovani vissuti in ambiente standard; ## $p < 0.01$ verso i topi anziani cresciuti in ambiente standard.

6.3 Effetto dell'ambiente arricchito sulla trasmissione glutammatergica nel SNC di topi giovani e anziani.

Alla fine dei 3 mesi di trattamento sono state isolate le terminazioni nervose di corteccia provenienti dai 4 gruppi sperimentali, rispettivamente topi anziani (20 mesi) e giovani (6 mesi) vissuti in condizioni standard e topi anziani e giovani vissuti in ambiente arricchito per tre mesi prima del sacrificio (esposizione non profilattica ma terapeutica) e in questi terminali è stato quantificato il rilascio spontaneo (basale) (Figura 10A) e il rilascio evocato da stimolo depolarizzante di glutammato endogeno (Figura 10B).

I risultati ottenuti mostrano che il rilascio basale di glutammato endogeno da sinaptosomi corticali di topi anziani vissuti in ambiente standard non veniva modificato dall'invecchiamento essendo perfettamente comparabile a quello osservato in terminazioni corticali isolate dalla corteccia di topi giovani. Inoltre i nostri dati dimostrano come l'esposizione ad ambiente arricchito non modifichi tale parametro sia in topi anziani che giovani (Figura 10A).

L'esocitosi di glutammato indotta da uno stimolo depolarizzante in sinaptosomi corticali di topi anziani risulta diminuita, sebbene non significativamente rispetto a quanto osservato in sinaptosomi corticali di animali giovani. Anche in questo caso l'EE non modifica il rilascio dell'amminoacido nei topi a diversa età (Figura 10B).

Ciò è coerente con l'idea che i meccanismi di rilascio responsabili dell'esocitosi di glutammato non siano sostanzialmente modificati durante l'invecchiamento ne tantomeno che l'esposizione ad EE possa determinare delle modifiche adattative in questi terminali in termini di capacità ed efficienza di rilascio di glutammato (Mora et al., 2007; Musante et al., 2012).

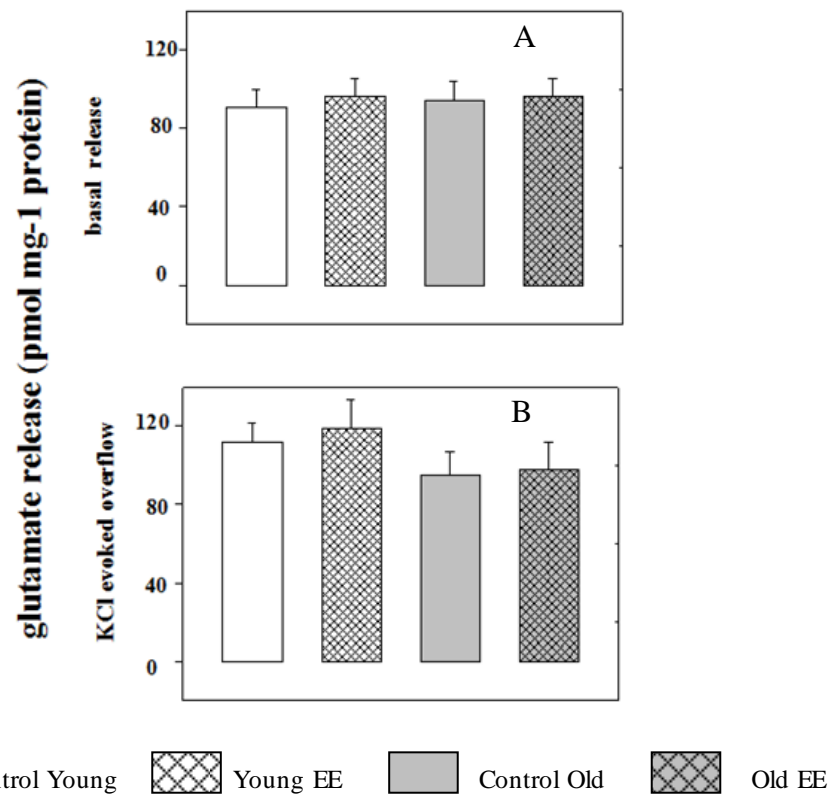


Figura 10. I grafici rappresentano il rilascio basale (A) e quello evocato dal KCl 12 mM (B) di glutammato endogeno da sinaptosomi corticali isolati da topi giovani (3 mesi) vissuti in ambiente standard (barra bianca), da topi giovani cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), da topi anziani (20 mesi) vissuti in ambiente standard (barra grigia) e da topi anziani vissuti in ambiente arricchito (barra grigia righe incrociate). I risultati sono espressi in pmoli x mg-1 di glutammato rilasciato spontaneamente (A) e indotto da stimolo depolarizzante (B). I dati sono la media di \pm SEM di 8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre determinazioni per ogni condizione sperimentale).

6.4 Effetto dell'ambiente arricchito sulla trasmissione GABAergica nel SNC di topi giovani e anziani

Le terminazioni nervose sono state isolate dalla corteccia dei topi appartenenti ai quattro differenti gruppi in esame per quantificare il rilascio spontaneo e quello indotto da stimolo depolarizzante (KCl 12Mm) di GABA endogeno.

Il rilascio basale di GABA da sinaptosomi corticali di topi anziani e giovani cresciuti in ambiente standard o esposti ad un ambiente arricchito non mostravano differenze significative. (Figura 11A).

Al contrario, l'esocitosi di GABA evocato da uno stimolo depolarizzante da terminazione corticali di topi anziani cresciuti in ambiente standard risultava essere significativamente ridotta rispetto al rilascio dell'aminoacido inibitorio da terminazioni corticali isolate da topi giovani cresciuti nelle stesse condizioni abitative.(Figura 11B)

L'esposizione ad ambiente arricchito modula il rilascio di GABA in topi giovani; infatti, si osserva una significativa diminuzione dell'esocitosi del neurotrasmettitore inibitorio in topi giovani esposti per 3 mesi ad EE rispetto a topi della stessa età ma vissuti in ambiente standard (Figura 11B). Tuttavia questo adattamento non si osserva quando si analizza il rilascio di GABA da sinaptosomi corticali di topi anziani esposti ad ambiente arricchito.

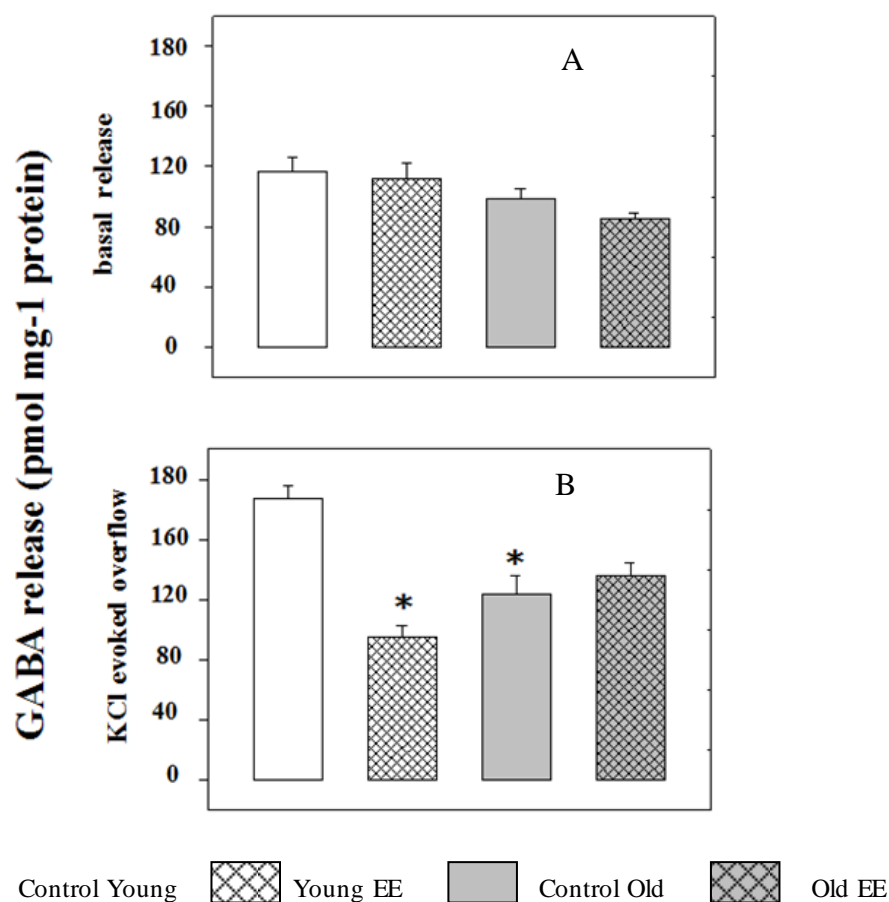


Figura 11. I grafici rappresentano il rilascio basale (A) e quello evocato dal KCl 12 mM (B) di GABA endogeno da sinaptosomi corticali isolati da topi giovani (3 mesi) vissuti in ambiente standard (barra bianca), da topi giovani cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), da topi anziani (20 mesi) vissuti in ambiente standard (barra grigia) e da topi anziani vissuti in ambiente arricchito (barra grigia righe incrociate). I risultati sono espressi in pmoli x mg⁻¹ di GABA rilasciato spontaneamente (A) e indotto da stimolo depolarizzante (B). I dati sono la media di \pm SEM di 8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre determinazioni per ogni condizione sperimentale).

* $p < 0.05$ verso i topi giovani vissuti in ambiente standard durante i 3 mesi.

6.5 Effetto dell'ambiente arricchito sulla trasmissione noradrenergica nel SNC di topi giovani e anziani

Per indagare gli effetti dell'EE sulla trasmissione noradrenergica, sono stati isolati le terminazioni nervose corticali di topi giovani e anziani esposti per tre mesi ad un ambiente cognitivamente stimolante e i suoi controlli, giovani e anziani, alloggiati in un ambiente standard.

Anche in questo caso è stato indagato sia il rilascio spontaneo che quello evocato da uno stimolo depolarizzante (12 mM KCl) di noradrenalina da sinaptosomi corticali dei quattro gruppi sperimentali.

I dati riportanti in Figura 12A dimostrano come il rilascio spontaneo di noradrenalina risulta essere inalterato nei quattro gruppi. Infatti si evince che l'invecchiamento non determina un differente rilascio basale dell'ammina, quando confrontato con questo parametro osservato nei topi giovani. Inoltre l'esposizione ad ambiente arricchito non modificava in maniera significativa anche il rilascio basale di noradrenalina sia nei topi giovani che in quelli anziani.

Un andamento completamente diverso si è osservato quando si è studiato l'effetto dell'invecchiamento e dell'esposizione ad ambiente arricchito sulla liberazione di noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante (Figura 12B).

Nel dettaglio, il rilascio di noradrenalina indotto da stimolo iperpotassico da terminali di corteccia di topi anziani cresciuti in condizioni standard è significativamente inferiore rispetto alla liberazione di ammina da terminazioni corticali isolate da topi giovani cresciuti nelle stesse condizioni. L'esposizione ad un ambiente arricchito ha determinato un aumento significativo della quantità di [3H]noradrenalina liberata in seguito ad esposizione a stimolo depolarizzante da terminazioni corticali isolate sia da topo giovane che da topo anziano (Figura 12B).

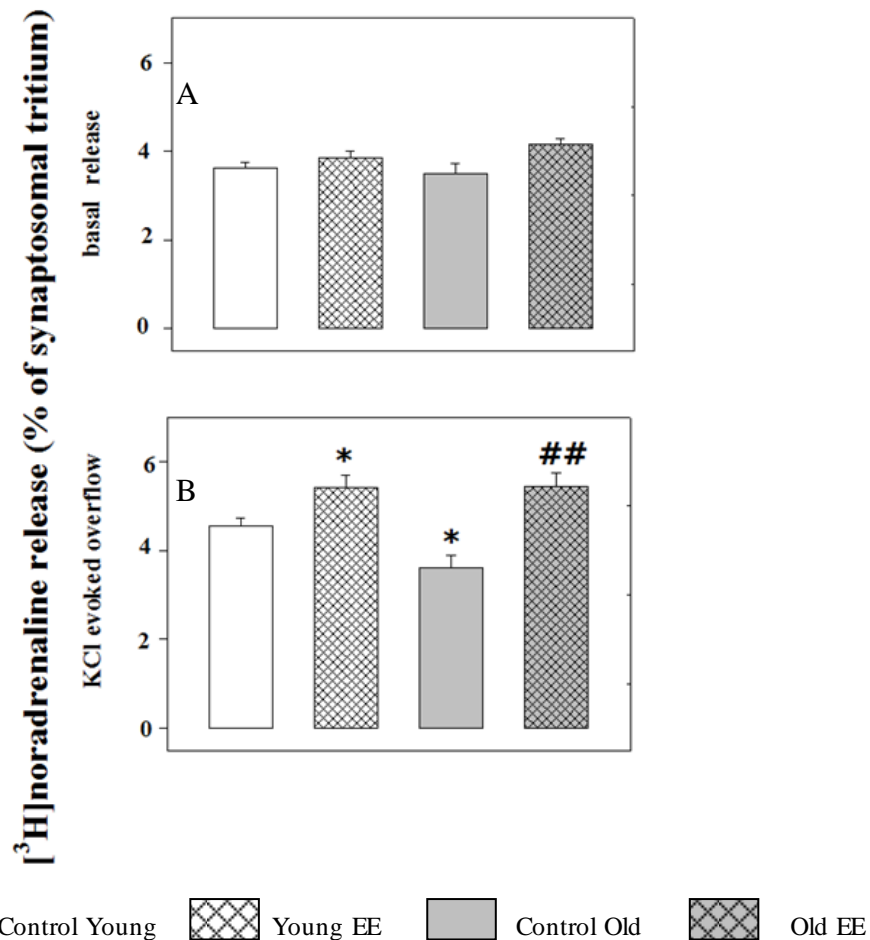


Figura 12. I grafici rappresentano il rilascio spontaneo di noradrenalina (basale, pannello superiore, espresso come percentuale del trizio totale nella prima frazione raccolta) e quello indotto da uno stimolo depolarizzante KCl 12 mM (pannello inferiore, espresso come percentuale del contenuto di trizio totale rilasciato oltre il basale) da sinaptosomi corticali isolati da topi giovani (3 mesi) vissuti in ambiente standard (barra bianca), da topi giovani cresciuti in ambiente arricchito (barra bianca righe incrociate), da topi anziani (20 mesi) vissuti in ambiente standard (barra grigia) e da topi anziani vissuti in ambiente arricchito (barra grigia righe incrociate). I risultati sono espressi come percentuale di contenuto totale di trizio. I dati sono la media di \pm SEM di 8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre determinazioni per ogni condizione sperimentale).

* $p < 0.05$ verso i topi giovani vissuti in ambiente standard; ## $p < 0.01$ verso i topi anziani cresciuti in ambiente standard.

DISCUSSIONE

L'invecchiamento è un processo fisiologico durante il quale si osserva una semplificazione delle interconnessioni sinaptiche in particolari regioni del SNC.

Uno dei trasmettitori maggiormente interessato nei processi di plasticità sinaptica è il glutammato; in tal senso, la trasmissione glutammatergica potrebbe essere considerata come uno dei principali bersagli dell'invecchiamento. In particolare, la diminuzione della trasmissione glutammatergica a livello delle sinapsi asimmetriche centrali potrebbe essere ben compatibile con l'impoverimento neuronale osservato in invecchiamento. A supporto di questa ipotesi è l'osservazione che:

- i) i livelli di glutammato nella corteccia di topi anziani sono significativamente diminuiti se vengono confrontati con quelli di topi giovani (Liguz-Lecznar et al., 2015), in linea con la riduzione di potenziali postsinaptici eccitatori spontanei (EPSPs) osservati in particolari regioni del SNC di animali anziani (Luebke et al., 2004).
- ii) Inoltre, in concomitanza alla riduzione dell'intensità degli EPSPs viene osservata una riduzione significativa dell'espressione dei trasportatori vescicolari per il glutammato di tipo 2 (Vglut2), ma non di quelli di tipo 1 (Vglut1), coerente con lo sviluppo di danni sinaptici nelle sinapsi asimmetriche.
- iii) Infine, in ratti anziani, è stata riportata una ridotta efficienza con controllo del rilascio di neurotrasmettitori mediato dai recettori presinaptici NMDA presenti sulle terminazioni nervose rispetto agli stessi recettori in animali giovani (Pittaluga et al., 1993).

Dal momento che l'inserimento di questi recettori nella membrana è strettamente dipendente dalla stimolazione glutammatergica da terminazioni nervose (Pittaluga et al., 2007; Grilli et al., 2009; Salamone et al., 2014; Zappettini et al., 2014), la riduzione dell'attività di rilascio alterata mediata da NMDA potrebbe supportare indirettamente l'ipotesi di una ridotta biodisponibilità del glutammato in prossimità di terminazioni nervose che esprimono i recettori ionotropi del glutammato.

I dati mostrati in figura 10 mostrano che in topi anziani e giovani il rilascio da terminali corticali del neurotrasmettitore, sia spontaneo che indotto da stimolo

depolarizzante, non viene modificato, a suggerire che i meccanismi di rilascio responsabili dell'esocitosi di glutammato non siano sostanzialmente modificati durante l'invecchiamento (Mora et al., 2007).

È stato ipotizzato che gli animali allevati in un ambiente arricchito (EE) abbiano un'alterazione della normale neurotrasmissione nel SNC, soprattutto per quanto riguarda la trasmissione eccitatoria. Effettivamente in letteratura esistono dati che supportano tale ipotesi; essi descrivono i cambiamenti nei diversi sistemi di neurotrasmettitori nel cervello di giovani animali esposti precocemente ad un allenamento ambientale (Summa et al., 2011; Grilli et al., 2009; Bredy et al., 2004; Naka et al., 2005; Wood et al., 2005).

Sebbene il sistema glutammatergico sia interessato dall'evento, i pochi studi che si concentrano in maniera specifica su questo trasmettitore non sono stati in grado di dimostrare un significativo cambiamento nell'efficacia del rilascio di glutammato. (Summa et al., 2011; Grilli et al., 2009). In linea con questi lavori, i nostri dati mostrano che l'esocitosi di glutammato dalle terminazioni sinaptiche corticali ottenute da topi giovani è immodificata in seguito ad esposizione ad un ambiente arricchito (Musante et al., 2012).

Considerando che, nelle stesse preparazioni sinaptosomiali, è stata dimostrata una iperattivazione dei recettori dell'AMPA, recettori ionotropici del glutammato, a causa di un'alterazione del meccanismo di "trafficking" vescicolare nelle membrane sinaptiche (Summa et al., 2011; Grilli et al., 2009; Salomone et al., 2014; Zappettini et al., 2014; Pittaluga et al., 2006) possiamo concludere che le modifiche di tipo adattative indotte da una prolungata esposizione ad un EE, determinino non tanto delle alterazioni nei meccanismi intraterminali responsabile dell'esocitosi di glutammato, quanto piuttosto dei cambiamenti nei movimenti intra ed extramembrana dei recettori per il neurotrasmettitore in questione.

Il rilascio di glutammato dai sinaptosomi corticali di topi anziani esposti "terapeuticamente" ad un ambiente arricchito sia nelle condizioni basali che depolarizzanti era confrontabile alla quantità di aminoacido endogeno rilasciato dai sinaptosomi corticali di quelli anziani vissuti in condizioni standard. Questo dato fa ipotizzare che l'efficienza del rilascio di glutammato dalle terminazioni sinaptiche sia largamente preservata durante l'invecchiamento e che non subisca modificazioni adattive in animali anziani allenati in un ambiente arricchito.

È risaputo che i neuroni e le terminazioni nervose non rappresentano l'unica fonte di glutammato nel SNC, ma che un rilascio attivo di questo neurotrasmettitore avviene anche dagli astrociti e, in misura minore, dalle cellule della microglia. Basandosi su queste osservazioni, Mora e il suo gruppo di ricerca propose nel 2007 che i cambiamenti che

avvengono nella trasmissione e nella biodisponibilità del glutammato in particolari regioni cerebrali durante l'invecchiamento fossero a carico di cellule non neuronali, quali ad esempio gli astrociti. Questa ipotesi è supportata da dati che mostrano una significativa astrocitosi nel cervello durante l'invecchiamento (Segovia et al., 2001), fenomeno che è significativamente modificato in animali esposti ad ambiente arricchito (Sofflè et al., 1999).

Prendendo in considerazione i dati in letteratura riguardanti il destino della trasmissione GABAergica nell'invecchiamento emergono risultati discordanti tra loro.

Con l'avanzamento dell'età, si assiste sia ad una riduzione che ad un aumento del rilascio del neurotrasmettitore inibitorio in diverse regioni del SNC (Potier et al., 2006; Stanley et al., 2012; Bories et al., 2013). Queste differenze sono accompagnate da un'alterata espressione della GAD (acido glutammico decarbossilasi), enzima che catalizza la sintesi di acido gamma-aminobutirrico (GABA) a partire dall'acido glutammico nel SNC (Liguz-Lecznar et al., 2015; Gold et al., 2014; Ling et al. 2005; Burianova et al., 2009), dai trasportatori del GABA (GAT), cioè quelle proteine che si occupano, insieme agli enzimi che catalizzano la sintesi, di controllare la biodisponibilità del GABA nello spazio sinaptico, e del trasportatore vescicolare del GABA, il VGAT-1. Tutte queste proteine sono ridotte nell'animale anziano rispetto a quello giovane (Liguz-Lecznar et al., 2015; Banuelos et al., 2014).

I dati descritti in questa tesi dimostrano che, pur non essendoci differenze nel rilascio basale da terminazioni corticali di topi anziani e giovani, tuttavia l'esocitosi di GABA endogeno indotta dalla soluzione KCl 12mM dai sinaptosomi corticali di topi anziani è quantitativamente inferiore a quella osservata nei topi giovani.

Dati in letteratura dimostrano che il GABA, rilasciato nello spazio sinaptico, controlla il suo stesso rilascio da terminazioni nervose grazie all'attivazione degli autorecettori presinaptici GABA_B (Pittaluga et al., 1987; Bonanno et al., 1993) e contemporaneamente ha la capacità di modulare l'esocitosi di glutammato attraverso l'azione di eterorecettori GABA_B localizzati a livello delle terminazioni glutammatergiche presinaptiche (Raiteri et al., 1992).

La diminuzione del rilascio di GABA osservata nei topi anziani potrebbe portare ad un ridotto controllo presinaptico inibitorio mediato, appunto, dal recettore GABA_B sull'esocitosi del glutammato, favorendo la trasmissione nelle sinapsi chimiche asimmetriche (Peinemann et al., 2001; Pellicciari et al., 2009; Majdi et al., 2007). Considerando che la variazione osservata in invecchiamento permane e non è reversibile in

animali cresciuti in ambiente standard, è possibile ipotizzare che questo possa a lungo termine favorire l'eccitotossità glutammatergica.

Per quanto riguarda l'effetto dell'ambiente arricchito sulla trasmissione GABAergica, dati in letteratura hanno dimostrato l'insorgenza di cambiamenti nella biodisponibilità di GABA in animali vissuti in ambiente arricchito (Mora et al., 2007). Questi cambiamenti si sviluppano nel SNC in modo regione-dipendente. In particolare, è stata osservata a livello ippocampale una aumentata concentrazione di GABA in ratti anziani cresciuti in EE rispetto ai controlli (Segovia et al., 2009), mentre a livello corticale, il contenuto di GABA endogeno in animali giovani cresciuti in EE risultava essere invariato rispetto agli animali controllo. Inoltre, i markers GABAergici, quali l'isoforma 67 della GABA decarbossilasi (GAD67) e la VGAT, erano iperespressi nella corteccia sia di animali giovani che anziani esposti a un ambiente stimolante (Liguz-Lecznar et al., 2015).

I nostri dati dimostrano che i topi giovani allevati in un ambiente arricchito presentano una marcata riduzione dell'esocitosi del GABA evocata dal KCl dalle terminazioni corticali. La ridotta disponibilità del GABA nello spazio sinaptico a causa dell'esocitosi alterata di tale neurotrasmettitore potrebbe favorire un aumento dell'esocitosi di glutammato dalle sinapsi glutammatergiche a causa della ridotta attivazione degli eterorecettori inibitori presinaptici GABA_B a livello delle terminazioni nervose glutammatergiche. Se fosse davvero così, i nostri dati svelerebbero un apparente paradosso: infatti sia nei topi giovani esposti in EE che in quelli vecchi non allenati, verrebbe osservata una significativa diminuzione dell'efficienza di esocitosi del GABA, che in entrambi i casi potrebbe favorire indirettamente l'esocitosi del glutammato.

È quindi interessante domandarsi se e in che misura questo effetto comune alle due popolazioni di animali possa avere differenti conseguenze, tenendo presente il contesto in cui si manifesta l'alterazione della normale regolazione del GABA. Bisogna infatti considerare che la diminuzione del rilascio di GABA in topi giovani si osserva ed è intimamente legata alla stimolazione ambientale, e che probabilmente è un evento transitorio che recede dopo l'interruzione della stimolazione ambientale. In questo caso, potrebbe determinare una variazione transiente della liberazione di glutammato, favorendola, e quindi migliorando i meccanismi di apprendimento e memoria. Al contrario, la diminuzione della liberazione di GABA osservata in topi anziani è probabilmente un fenomeno irreversibile, legato all'invecchiamento e quindi potenzialmente neurotossico perché determina una facilitazione persistente e duratura dell'esocitosi di glutammato dovuta alla

ridotta inibizione presinaptica GABAergica sui terminali glutammatergici. Questa condizione favorisce come già anticipato i meccanismi di eccitotossicità.

Come ultimo punto, non meno importante, è necessario evidenziare che il rilascio di GABA evocato da un blando stimolo depolarizzante da sinaptosomi isolati dalla corteccia di topi anziani (23 mesi) allevati in un ambiente arricchito non differisca significativamente da quello osservato in animali vecchi e non allenati (Figura 11). Una possibile spiegazione potrebbe essere che gli eventi molecolari responsabili della riduzione dell'esocitosi di GABA indotta dall'arricchimento ambientale osservata in animali giovani risultino non essere più attivi in topi anziani e non possano permettere quindi una riorganizzazione funzionale del rapporto tra glutammato e GABA nelle regioni del SNC. Questa osservazione suggerisce indirettamente che la modulazione dell'esocitosi del GABA indotta dall'EE in animali giovani si basi su eventi molecolari che non sono presenti nei terminali isolati dalla corteccia di topi anziani. Inoltre questi dati suggeriscono come vi sia una stretta correlazione tra l'età e gli eventi molecolari preposti al controllo del rilascio di GABA.

Data la stretta correlazione tra la noradrenalina e le funzioni cognitive, si ritiene che anche il sistema noradrenergico centrale vada incontro a severi cambiamenti durante l'invecchiamento (Mather et al., 2016). Dal momento che tale sistema risulta essere attivato da stimoli nuovi, sociali, fisici e culturali (Ebrahimi et al., 2010; Segal et al., 2012), sembra logica l'implicazione di una stimolazione dell'innervazione noradrenergica sulla riserva cognitiva.

Per quanto riguarda l'adattamento di tale sistema durante l'invecchiamento, i dati in letteratura sembrano essere apparentemente controversi. La concentrazione di noradrenalina e dei suoi metaboliti nel fluido cerebrospinale di pazienti e topi anziani risulta essere aumentata se viene comparata a quello dei soggetti controllo giovani (Elrod et al., 1997; Raskind et al., 1988) inoltre essa tende ad aumentare ulteriormente in pazienti affetti da AD. Per questo motivo i livelli di ammine nel CSF vengono considerati come marker affidabili dello squilibrio centrale associato alla perdita di memoria e alla demenza nei pazienti. Questa osservazione è in qualche modo inaspettata, poiché la perdita di neuroni noradrenergici nel LC osservata in pazienti anziani sembra essere incompatibile con la loro proposta aumentata funzionalità (Lohr et al., 1988; Vijayashankar et al., 1979; Bondareff et al., 1982).

Per spiegare questa incongruenza, è stato proposto che l'aumentata biodisponibilità della noradrenalina in CSF possa rappresentare un meccanismo compensatorio causato da un potenziamento della attività dei neuroni noradrenergici rimanenti nel LC o, in alternativa, ad

una diminuita clearance dell'ammina endogena nel fluido extrasinaptico (Raskind et al., 1999). Shores e collaboratori nel 1999 hanno proposto che una diminuzione dell'espressione del trasportatore di noradrenalina durante l'invecchiamento nei neuroni del LC, e contemporaneamente un aumento l'RNA messaggero codificante la tirosina idrossilasi, potrebbero essere eventi responsabili di questo paradosso.

È stato evidenziato come l'esocitosi di noradrenalina in sinaptosomi del cervello di ratto sia gradualmente diminuita a partire dai 2 agli 11 mesi, mentre risulta essere stabile durante l'invecchiamento (Cerrito et al., 1993). Inoltre, è stata osservata una significativa riduzione dell'esocitosi di noradrenalina determinata dall'attivazione dei recettori presinaptici NMDA e AMPA nelle terminazioni nervose ippocampali. Questo fenomeno risulta essere massimo in topi anziani di 20 mesi, e ciò è coerente con la ridotta efficacia di rilascio delle amine. Queste osservazioni sono in linea con i dati descritti nel presente studio (Figura 12B), che dimostrano una riduzione significativa del rilascio di [3H]noradrenalina evocato dal KCl 12 mM in sinaptosomi corticali di topi anziani (23 mesi) confrontati con quanto rilasciato da terminazioni corticali ottenute da topi giovani (6 mesi). Il rilascio spontaneo di [3H]noradrenalina risulta essere inalterato sia negli animali giovani che in quelli vecchi (Figura 12A).

E' importante sottolineare che nel SNC le terminazioni noradrenergiche non fanno contatto sinaptico, ma il segnale si sviluppa principalmente attraverso "meccanismi di diffusione non sinaptica"(Vizi et al., 2004).

Nel sistema nervoso di topi anziani, la ridotta quantità di noradrenalina che diffonde nella biofase potrebbe essere insufficiente per assicurare la corretta trasmissione del segnale, causando di conseguenza un indebolimento della trasmissione "non sinaptica". Questo evento deleterio potrebbe contemporaneamente interessare anche la trasmissione glutammatergica. Infatti il rilascio di glutammato è controllato presinapticamente dai recettori noradrenergici β_2 , la cui attivazione potenzia l'esocitosi glutammatergica (Ferrero et al., 2013) e determina effetti benefici in stati emotivi quali l'ansia e la depressione, ma anche per l'apprendimento e la memoria (Cartford et al., 2004; Pittaluga et al., 2007). I recettori α_2 e β_2 sono presenti anche sugli astrociti e sulle cellule della microglia, dove la loro attivazione ostacola la produzione patologica e il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie (O'Sullivan et al., 2010; Di Prisco et al., 2014). La diffusione alterata di noradrenalina potrebbe quindi amplificare gli eventi molecolari responsabili della perdita di memoria e di disturbi dell'umore ma, contemporaneamente potrebbe avere un impatto

deleterio sullo stato di salute del sistema nervoso, favorendo la neuro-infiammazione e i danni neuronali.

Tuttavia, il sistema noradrenergico è altamente sensibile alla stimolazione ambientale come anche all'esercizio (Lohr et al., 1988; Vijayashankar et al., 1979; Bondareff et al., 1982), e ciò è compatibile con il suo principale ruolo nel sostenere la riserva cognitiva.

Studiando l'impatto del training ambientale "terapeutico" sull'esocitosi noradrenergica dalle terminazioni nervose della corteccia di topi giovani e vecchi, si denota un significativo aumento dell'efficienza di rilascio in entrambi i gruppi, senza osservare dei cambiamenti significativi sul rilascio basale delle amine.

Queste osservazioni ci hanno portato a concludere che i meccanismi responsabili per l'esocitosi di noradrenalina indotti dalla stimolazione ambientale non sono esauriti in topi anziani, se comparati con i rispettivi controlli giovani. Indirettamente, questa osservazione implica che le vie responsabili degli effetti indotti dall'EE siano strettamente dipendenti dal neurotrasmettitore interessato e che alla loro base vi siano meccanismi di rilascio differenti durante l'invecchiamento.

A causa dell'impatto della noradrenalina nel SNC, l'aumentata diffusione in tali tessuti dovrebbe favorire l'apprendimento e la memoria e mitigare lo stress e l'ansia. Inoltre, l'aumentata biodisponibilità di ammina può ripercuotersi positivamente sulla microglia e sugli astrociti, riducendo l'eccessiva produzione endogena di citochine proinfiammatorie e di conseguenza avere un'azione antinfiammatoria centrale, peraltro già osservata in seguito a training ambientale (Chabry et al., 2015).

Per concludere, il primo dato del nostro studio è che il training cognitivo "terapeutico" durante l'invecchiamento (training proposto in terapia ai pazienti anziani per rinforzare le funzioni cognitive) potenzia in maniera significativa e molto selettiva l'esocitosi di noradrenalina a livello delle terminazioni nervose corticali in animali anziani, ma non quella GABAergica.

Differentemente da quanto osservato nelle terminazioni noradrenergiche e GABAergiche, l'efficienza del rilascio di glutammato dai sinaptosomi glutamatergici corticali risulta inalterata in topi anziani se confrontati con quelli giovani.

Inoltre, il rilascio "ex vivo, in vitro" di glutammato di animali sia giovani che anziani vissuti in EE non risulta significativamente modificato paragonati ai rispettivi controlli. Ciò suggerisce che queste terminazioni non sono il bersaglio del "training cognitivo in vivo".

Non dobbiamo ovviamente escludere che la trasmissione glutammatergica in altre aree possa essere alterata durante l'invecchiamento o che l'EE possa modificare questo parametro. Al contrario, proponiamo che si possano verificare modifiche funzionali età-dipendenti sensibili all'arricchimento ambientale in altri tipi cellulari che rilasciano glutammato (inclusi astrociti e le cellule della microglia).

Dimostrare che il rilascio di noradrenalina viene favorito dalla stimolazione ambientale sia in topi giovani che vecchi è particolarmente rilevante se si considera il ruolo pleiotropico della noradrenalina nel SNC.

Negli ultimi anni, dati in letteratura hanno supportato l'idea che l'innervazione noradrenergica sia legata all'invecchiamento e alla demenza, proponendo inoltre che essa sia importante per il rinforzo della riserva cognitiva.

In generale queste considerazioni si basano sull'ipotesi che stimoli nuovi, culturali e sociali e che l'attività fisica possano implementare la biodisponibilità di noradrenalina, che a sua volta può svolgere un ruolo protettivo nei confronti di stimoli stressori tipici dell'invecchiamento quali l'infiammazione e la produzione di proteine considerate patologiche, come la proteina tau e la proteina beta amiloide.

Le nostre osservazioni rivelano che il training cognitivo favorisce il meccanismo di "volume diffusion" della noradrenalina nel SNC sia in animali giovani che anziani, aumentando l'efficienza di rilascio delle catecolamine in quelle regioni cerebrali (nel nostro caso, la corteccia) che sono innervate dalle proiezioni noradrenergiche. Ciò fornisce un razionale per "l'ipotesi noradrenergica" proposta nell'ambito della riserva cognitiva (Roberson, 2013).

Le nostre osservazioni migliorano la conoscenza degli eventi cellulari che determinano effetti benefici del training ambientale nel SNC, e forniscono informazioni precliniche riguardo gli eventi cellulari che determinano l'aumentata resilienza per il deterioramento sinaptico centrale nel SNC dell'anziano.

MATERIALI E METODI

7.1 Animali ed arricchimento ambientale

Per lo svolgimento dell'attività di ricerca nel periodo del dottorato sono stati utilizzati topi C57BL/6J di diversa età e sesso, allevati e stabulati presso il DIFAR, Sezione di Farmacologia e Tossicologia (autorizzazione n° 484, 8 Giugno 2004). I topi sono stati mantenuti a temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) ed umidità relativa (50%) costanti, con intervalli di luce/buio regolari (luce dalle 7 del mattino alle 7 di sera).

In generale, sono stati utilizzati topi femmine e maschi giovani (entro i 5 mesi dalla nascita) e topi maschi anziani (circa 20 mesi).

I topi maschi (sia giovani che anziani) sono stati utilizzati per valutare l'impatto dell'arricchimento ambientale su parametri comportamentali, funzionali e strutturali come verrà di seguito descritto.

I topi di sesso femminile sono stati utilizzati per valutare l'impatto dell'arricchimento ambientale sull'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE), un modello sperimentale animale di Sclerosi Multipla che si sviluppa preferibilmente in animali femmine.

Per poter indurre la patologia nei topi femmine, di un'età compresa tra le 6 e le 8 settimane di età, è obbligatorio un progetto, ovvero un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico che prevede il ricorso a una o più procedure. Con il termine procedura si intende qualsiasi uso di un animale ai fine sperimentali che possa causare allo stesso un livello di dolore, sofferenza equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago.

I criteri di stabulazione di tutti gli animali risultano essere conformi con il DdL del 4 Marzo 2014, considerando il numero di topi alloggiati nelle gabbie, nella tipologia del materiale utilizzato nelle gabbie e nel nutrimento degli animali. E' opportuno distinguere il concetto di "arricchimento" espresso nell'Allegato III del DdL con il concetto di "arricchimento ambientale" sperimentale. Nel primo caso con il termine arricchimento si intende l'utilizzo di uno spazio sufficiente tale da consentire l'espressione di comportamenti normali e ridurre al minimo quelli indotti da stress, in tal senso il nostro stabulario dispone in ogni alloggiamento di un tunnel di cartone utilizzato come protezione e dormitorio dagli animali.

L'arricchimento ambientale sperimentale, focus della tesi, si inserisce invece nell'ottica di un potenziamento cognitivo, sensoriale e motorio indotto dall'inserimento nelle gabbie di diversi oggetti, cambiati ogni 2 giorni.

Sono stati definiti due protocolli sperimentali per la valutazione degli effetti dell'arricchimento ambientale nel modello sperimentale EAE (1) e nell'invecchiamento(2) :

1) Topi di sesso femminile sono stati separati dopo svezzamento (4 settimane) e divisi in due gruppi . Il primo gruppo è stato fatto crescere in condizioni arricchite, cioè in gabbie grandi (dimensioni gabbia: larghezza 45 cm, altezza 35 cm, lunghezza 60 cm) , contenenti una varietà di oggetti come tunnel, palline, ruote, nidi, giochi in legno ed in plastica. Gli oggetti sono stati cambiati ogni due giorni.

Il secondo gruppo è costituito da animali cresciuti in ambiente standard, cioè in gabbie più piccole (larghezza 30 cm, per altezza, 28 cm per lunghezza 45 cm) contenenti semplicemente un nido.

Dopo 3 settimane dallo svezzamento, i due gruppi di topi, sono stati ulteriormente divisi in due sottogruppi, animali immunizzati e non immunizzati. Gli esperimenti sono stati quindi condotti complessivamente su 4 gruppi di topi:

- Topi controllo cresciuti in ambiente standard;
- Topi controllo cresciuti in ambiente arricchito;
- Topi EAE cresciuti in ambiente standard;
- Topi EAE cresciuti in ambiente arricchito.

Al 7, 14, 21 d.p.i. tutti i topi appartenenti ai 4 gruppi sperimentali sono stati pesati.

Dopo 21 giorni dall'immunizzazione (21 ± 1 d.p.i., day post immunization), tutti i topi appartenenti ai 4 differenti gruppi sono stati sacrificati mediante dislocazione e decapitazione.

2) Topi di sesso maschile sono stati allevati fino all'età di 20 mesi nello stabulario. A partire dal ventesimo mese, i topi sono stati divisi in 2 gruppi. Un gruppo ha continuato per 3 mesi a vivere in condizioni ambientali standard (topi anziani controllo), l'altro gruppo è stato inserito in gabbie più grandi e sottoposto ad ambiente arricchito (topi anziani arricchiti). Contemporaneamente topi di 3 mesi sono stati divisi in 2 gruppi e allevati per tre mesi in condizioni standard o di arricchimento (topi giovani controllo e topi giovani arricchiti). Ricapitolando i 4 gruppi di topi sono:

- Topi giovani che hanno vissuto in ambiente standard;
- Topi giovani che hanno vissuto in ambiente arricchito;
- Topi anziani che hanno vissuto in ambiente standard;

- Topi anziani che hanno vissuto in ambiente arricchito.

Dal tempo 0'(inizio) al giorno del sacrificio è stato monitorato il peso di tutti gli animali.

Dopo 3 mesi tutti gli animali venivano sacrificati.

Le procedure sperimentali sono in accordo con il U.K. Animals Act (Procedure Scientifiche) del 1986 e con le linee guida associate, con la Legislazione Europea (Direttiva 2010/63/EU per esperimenti sugli animali) e con le linee guida ARRIVE e sono state approvate dall'Organismo Preposto al Benessere Animale dell'Università di Genova e dal Ministero della Salute Italiano (DDL 26/2014 e legislazione precedente; protocollo n. 50/2011-B e 612/2015-PR).

7.2 EAE e Clinical Score

Per l'induzione dell'EAE, topi femmine di 6-8 settimane, allevati in condizioni standard o in ambiente arricchito sono stati immunizzati seguendo un protocollo standard (Zappia et al. 2005), a cui sono state apportati lievi modifiche. Agli animali sono state effettuate tre iniezioni sottocutanee a livello dei due arti posteriori ed una in prossimità della coda con adiuvante incompleto di Freund contenente 4 mg/ml di *Mycobacterium tuberculosis* (di tipo H37Ra) e 200 µg di proteina mielinica oligodendrocitaria 35-55 (MOG)₃₅₋₅₅, seguite da somministrazione intraperitoneale di 400 ng di tossina della Pertosse (PTX) il giorno 0 e dopo 48 ore.

Gli score clinici (0= asintomatico; 1= coda flaccida; 2= atassia e/o paralisi degli arti posteriori; 3= paralisi degli arti posteriori e/o degli arti anteriori; 4= tetraparalisi; 5= morte) sono stati registrati quotidianamente fino al giorno del sacrificio (21 d.p.i.). I topi controllo hanno subito la stessa procedura, ma in questo caso l'emulsione è priva del peptide MOG₃₅₋₅₅. È stato compiuto il massimo sforzo per minimizzare la sofferenza degli animali e per utilizzare il minor numero di animali necessari ad ottenere risultati affidabili.

7.3 Test comportamentali

7.3.1 Open Field Test

Il topo è stato posto in un piano quadrato (34 x 34 con un muro di 24 cm) diviso attraverso delle linee bianche in 9 quadrati più piccoli. Il test è stato effettuato in un ambiente calmo e tranquillo, mediante ripresa con telecamera, ed ha avuto durata 10 minuti. Il parametro valutato attraverso questo test è l'attività motoria spontanea prendendo in considerazione il numero di volte in cui l'animale attraversa i quadrati. Questo test è stato condotto sugli animali EAE vissuti in ambiente arricchito e in condizione standard e sui rispettivi controlli.

7.3.2 Light/Dark Test

Il topo è stato inserito in una gabbia costituita da due compartimenti (35 cm x 35cm x 21 cm). I due compartimenti sono comunicanti solo per mezzo di una piccola apertura. Il test è stato effettuato in un ambiente calmo e tranquillo, l'operatore dopo aver posizionato il topo al centro della parte luminosa della scatola lascia la stanza. Il test viene eseguito mediante registrazione con telecamera per 10 min. I parametri presi in considerazione sono: le volte in cui l'animale attraversa la porta ed il tempo in cui l'animale rimane nella parte luminosa della scatola. Entrambi i parametri sono informativi sullo stato di ansia dei topi. Questo test è stato valutato sia su animali EAE vissuti in ambiente arricchito e in condizione standard e sui rispettivi controlli, sia su animali giovani e anziani vissuti in ambiente arricchito e in condizioni standard.

7.3.3 Hole Board Test

Il topo è stato messo in un piano quadrato (34 x 34 con un muro di 24 cm) che presenta sulla base 9 fori equidistanti tra loro. Il test è stato effettuato in un ambiente calmo e tranquillo, mediante ripresa con telecamera, ed ha avuto durata 10 minuti. Il parametro preso in considerazione è il numero di volte che il topo inserisce il muso all'interno del buco, indice della curiosità dell'animale, che è inversamente proporzionale allo stato d'ansia dell'animale. Questo test è stato valutato su animali EAE vissuti in ambiente arricchito e in condizione standard e sui rispettivi controlli.

7.4 Preparazione dei sinaptosomi

Gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, la corteccia di tutti gli animali è stata rapidamente rimossa e in pochi minuti sono stati preparati i sinaptosomi (terminazioni nervose isolate).

I sinaptosomi rappresentano una delle preparazioni più versatili per lo studio della liberazione dei neurotrasmettitori da parte dei recettori presinaptici. Il processo che porta alla loro formazione prevede la frammentazione, tramite omogeneizzazione, del tessuto cerebrale, di tutti i corpi cellulari presenti e la formazione di sinaptosomi in virtù delle proprietà plastiche della membrana. Infatti, le terminazioni nervose si staccano dall'assone e le membrane cellulari si racchiudono a formare delle particelle rotondeggianti: tali particelle, che rappresentano appunto i sinaptosomi, hanno diametro variabile compreso tra 1 e 1.5 μm e contengono, al loro interno e sulla loro membrana, tutti i sistemi enzimatici e le strutture anatomiche che caratterizzano il bottone sinaptico integro.

Tali strutture possono essere utilizzate in esperimenti di superfusione in cui viene studiato il rilascio di neurotrasmettitori. Infatti, i sinaptosomi rimangono perfettamente vitali per alcune ore: i neurotrasmettitori possono essere internalizzati, sintetizzati a partire da precursori, immagazzinati nelle vescicole sinaptiche e, infine, possono essere liberati mediante meccanismo esocitotico.

I sinaptosomi purificati vengono preparati secondo il procedimento descritto da Dunkley (1986). Una volta prelevato, il tessuto viene messo in un omogenizzatore (vetro-teflon; clearance 0.25 mm) contenente una soluzione di saccarosio 0.32 M tamponato a pH 7.4 con tampone Tris-HCl (concentrazione finale 0.01 M). L'omogenato ottenuto viene trasferito in provette da centrifuga e sottoposto ad una prima centrifugazione a 1000 g per 5 minuti per rimuovere detriti cellulari e nuclei, che sedimentano sul fondo della provetta. Il sovranatante viene stratificato su un gradiente di Percoll® in saccarosio TRIS. Si effettua una centrifugata a 33500 g per 6 minuti e viene raccolta la frazione sinaptosomiale stratificata all'interfaccia tra le bande al 10 e 20% di Percoll® e sottoposta ad un lavaggio per centrifugazione in un medium fisiologico avente la seguente composizione (mM): NaCl, 140; KCl, 3; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 1.2; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 5; HEPES, 10; glucosio, 10; pH 7.2-7.4 e infine 50 μM di acido ammino-ossiacetico (AOAA) per evitare il metabolismo del GABA. Il precipitato così ottenuto viene risospeso in un volume di medium fisiologico.

7.5 *Esperimento di rilascio*

I sinaptosomi corticali ottenuti sono stati incubati a 37°C per 15 minuti, in un bagnetto termostato dotato di piastra basculante in assenza (nel caso di esperimenti di rilascio di glutammato endogeno e GABA endogeno) o in presenza di [3H]-Noradrenalina (nel caso degli esperimenti svolti per osservare gli effetti dell'EE sul SNC di topi giovani e anziani). In quest'ultimo caso, al medium di incubazione sono stati aggiunti 0.1 µM di 6-nitroquipazina e 0.1 µM GBR12909, per evitare la ricaptazione del tracciante radioattivo da parte delle terminazioni serotoninergiche e dopaminergiche, rispettivamente.

Al termine dell'incubazione, la sospensione sinaptosomiale è stata diluita con medium fisiologico, precedentemente riscaldato, e poi suddivisa in aliquote identiche (2 ml), che vengono stratificate su filtri aventi porosità pari a 0.65 µm, posti alla base di setti di vetro che costituiscono il fondo delle camere del sistema di perfusione. Ciascuna camera è termostata in modo da mantenere il medium fisiologico ad una temperatura costante di 37°C (Raiteri et al. 1974, Raiteri e Raiteri 2000). Subito dopo la stratificazione, i sinaptosomi, sono stati superfusi alla velocità di 0.5 ml/min. I primi 36 minuti di superfusione sono necessari per riequilibrare il sistema e per raggiungere un livello costante di liberazione basale (spontanea) di neurotrasmettitore.

Al 39° minuto di perfusione i sinaptosomi sono stati esposti per 90 secondi ad un medium fisiologico iperpotassico (12 mM KCl). È noto, infatti, come l'esposizione a soluzioni saline arricchite in ioni K⁺ (in cui quantità equimolari di NaCl vengono sostituite da KCl) possa causare una depolarizzazione della membrana sinaptosomiale, inducendo la liberazione dei neurotrasmettitori in maniera esocitotica Ca²⁺- dipendente. Le frazioni sono state raccolte in base al seguente schema: due frazioni da tre minuti ciascuna (rilascio basale), una prima (t = 36-39 min) e una dopo (t = 45-48 min) una frazione di sei minuti (t = 39-45 min; rilascio indotto). Le frazioni raccolte sono state analizzate per il loro contenuto di glutammato e GABA endogeno. Il contenuto di proteine sinaptosomiali è stato determinato mediante BCA kit. La quantità di amminoacidi endogeni dai sinaptosomi in ogni frazione è stata espressa come picomoli per milligrammo di proteine (pmol/mg proteine). L'overflow di glutammato endogeno dai sinaptosomi indotto dal K⁺ è stato valutato sottraendo il contenuto di neurotrasmettitore nella prima e terza frazione raccolte (rilascio basale, b1 e b3) da quello nella frazione da 6 minuti raccolta durante e dopo lo stimolo depolarizzante (picco di rilascio, b2).

Il rilascio di [3H]NA nelle tre frazioni raccolte e nei sinaptosomi rimasti sul filtro alla fine dell'esperimento di superfusione è stato quantificato con la tecnica della scintillazione in fase liquida. La quantità di radioattività nelle frazioni è stata espressa come percentuale della radioattività totale. Il rilascio di neurotrasmettitori indotto dal KCl è stato stimato sottraendo la quantità di neurotrasmettitori presenti nelle prime e nelle terze frazioni raccolte (rilascio basale, b1 e b3) da quello della frazione di sei minuti, raccolte durante e dopo la depolarizzazione (rilascio evocato, b2).

7.6 Determinazione di amminoacidi endogeni

Il glutammato endogeno e il GABA endogeno è stato quantificato mediante analisi HPLC dopo derivatizzazione precolonna con o-ftalaldeide e separazione su una colonna cromatografica C18 a fase inversa (10 x 4.6 mm, 3 µm a 30°C), associata ad una determinazione fluorimetrica (lunghezza d'onda di eccitazione: 350 nm; lunghezza d'onda di emissione: 450 nm). L'omoserina è stata usata come standard interno.

7.7 Quantificazione dei livelli endogeni sinaptosomiali di cAMP

Sinaptosomi corticali di topi controllo vissuti in ambiente arricchito e in condizioni standard e sinaptosomi corticali di topi EAE vissuti in ambiente arricchito e in condizioni standard sono stati isolati a 21 d.p.i., per quantificare i livelli di AMP ciclico.

I sinaptosomi sono stati incubati in medium standard per 5 min a 37°C al fine di equilibrare il sistema e poi per 6 min in presenza di K⁺ (c.f. 12 mM). Essi sono stati quindi lisati con acqua a 4°C. La sospensione è stata centrifugata per rimuovere le membrane e il sovranatante congelato a -80°C. Il contenuto endogeno di cAMP è stato quantificato in ciascun sovrinatante mediante l'utilizzo di uno specifico kit commerciale (R&D Systems, Minneapolis MN, USA, Musante et al., 2010, Giribaldi et al. 2013). I risultati sono stati espressi come pmol o nmol per mg proteine.

7.8 Colorazioni Istologiche

7.8.1 Luxol Fast Blue

A 21 d.p.i. i topi EAE, cresciuti in arricchimento ambientale e non, e topi controllo cresciuti in condizioni standard e in ambiente arricchito, sono stati sacrificati. Il cervello è stato prelevato e fissato in una soluzione di paraformaldeide al 4%. Secondo metodi standard di inclusioni in paraffina, sono state ottenute sezioni di tessuto dello spessore di 7 μm . Seguendo le procedure di disidratazione e reidratazione standard, le sezioni tissutali sono state immerse per tutta la notte in una soluzione allo 0.1% di LBF (Solvente Blue 38, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 56-60 °C. Passata la notte, esse sono state risciacquate con acqua deionizzata e immerse in una soluzione acquosa di carbonato di litio allo 0.05% per 15 secondi e lavate con etanolo al 70% per la differenziazione fino a quando non si riescono a distinguere la sostanza bianca e quella grigia dai nuclei decolorati. Dopo lavaggi in acqua distillata, le sezioni sono state immerse in una soluzione di acido Periodico 0.8% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) per 10 minuti e risciacquate nuovamente in acqua distillata. Le sezioni sono state incubate con il Reagente di Shiff (Bio-optica, Milano, Italia) per 20 minuti e risciacquate con acqua distillata per 15 minuti. Infine, sono state disidratate con etanolo al 50 e 100%. Tali sezioni sono state esaminate utilizzando un microscopio Olympus BX40 (Olympus, Milano, Italia) e fotografate usando una macchina digitale Olympus DP50 (Olympus, Milano, Italia).

7.8.2 Ematossilina e Eosina

A 21 d.p.i. i topi EAE, cresciuti in arricchimento ambientale e non, e topi controllo cresciuti in condizioni standard e in condizioni arricchite, sono stati sacrificati e prelevato il cervello, fissato in PFA (paraformaldeide) al 4%. Secondo metodi standard di inclusioni in paraffina, sono state ottenute sezioni di tessuto dello spessore di 7 μm . Seguendo le procedure di disidratazione e reidratazione standard, le sezioni tissutali sono state immerse in una soluzione di eosina (Bio-optica, Milano, Italia) per tre minuti. Dopo 5-6 minuti sotto l'acqua corrente, le sezioni sono state immerse in una soluzione di ematossilina (Bio-optica, Milano, Italia) per 3 minuti. Dopo 5-6 minuti sotto l'acqua corrente, sono state disidratate. Le sezioni sono state esaminate usando un microscopio Olympus BX40 (Olympus, Milano, Italia) e fotografate utilizzando una macchina digitale Olympus DP50 (Olympus, Milano, Italia).

7.9 Western Blot

I pellets sinaptosomiali corticali sono stati lisati in 100 μ L di soluzione di Lysis Buffer (LB) contenente Triton X-100 all'1%, inibitori delle proteasi ed i seguenti componenti (mM): (TRIS acetato 20; saccarosio 0.27; EDTA 1; Na ortovanadato 1; NaF 50; Na pirofosfato 5; Na- β -glicerofosfato 10; DTT 1).

La concentrazione delle proteine nei campioni è stata calcolata mediante il test di Bradford. Successivamente i campioni sono stati risospesi in Laemmli buffer e poi trattati per gli esperimenti di immunoblotting. 20 μ g di proteine sono stati caricati in gel di SDS-poliacrilammide al 10% e trasferiti su membrane PVDF. Tali membrane sono state bloccate per un'ora a temperatura ambiente in tampone Tris-Tween (t-TBS) (mM): Tris 2; NaCl 150; Tween 20, 0.1%) contenente il 5% di latte scremato in polvere. Le membrane sono state incubate con specifici anticorpi per 12 ore a 4 °C con una moderata agitazione.

Gli anticorpi primari utilizzati per le analisi di western blot sono anti-sintaxina 1a anti-sinapsina 1, anti-sinaptotagmina 1, anti-mammalian uncoordinated-18 (Munc-18), anti-proteina 25 associata ai sinaptosomi (SNAP25) e anti- β -actina.

Le membrane sono poi state lavate tre volte con t-TBS ed incubate per un'ora a temperatura ambiente con gli appropriati anticorpi secondari leganti le perossidasi. Dopo un ulteriore lavaggio con t-TBS, l'immunoreattività delle proteine è stata rilevata attraverso una reazione di chemiluminescenza. I western blot sono stati quantificati mediante analisi densitometriche usando il software ImageJ.

7.10 Calcoli ed analisi statistiche

L'analisi della varianza è stata effettuata mediante ANOVA seguita dal test di Dunnett o da quello di Newman Keuls o dal Tukey per l'analisi dei confronti multipli; i confronti diretti sono stati eseguiti tramite test t Student. I dati sono stati considerati significativi per almeno $p < 0.05$.

BIBLIOGRAFIA

- Adlard P. A., Perreau V. M., Pop V., Cotman C. W. *Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease*. 2005. *J Neurosci*, 25, 4217-21.
- Aharoni R., Sasson E., Blumenfeld-Katzir T., Eilam R., Sela M., Assaf Y., Arnon R.. *Magnetic resonance imaging characterization of different experimental autoimmune encephalomyelitis models and the therapeutic effect of glatiramer acetate*. 2013, *Exp. Neurol.* 240 130-144.
- Ambrée O., Leimer U., Herring A., Gortz N., Sachser N., Heneka M. T., Paulus W., Keyvani K.. *Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways*. 2006 *Am. J. Pathol*, 169, 544-552
- Amtul Z., Atta-Ur-R.. *Neural plasticity and memory: molecular mechanism*. 2015, *Rev Neurosci*.;26(3):253-68.
- Apostolova L.G., Green A.E., Babakchanian S., Hwang K.S., Chou Y.Y., Toga A.W., Thompson P.M.. *Hippocampal atrophy and ventricular enlargement in normal aging, mild cognitive impairment (MCI), and Alzheimer Disease*. 2012 Jan-Mar *Alzheimer Dis Assoc Disord*.;26(1):17-27.
- Arai J.A., Feig L. A.. *Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation*. 2011, *Brain Res. Bulletin* 85,30-35.
- Arendash G. W., Garcia M. F., Costa D. A., Cracchiolo J. R., Wefes I. M., Potter H.. *Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable β -amyloid deposition*. 2004 *Ageing*, 15, 1751-1754.
- Artola A., Von Frijtag J.C., Fermont P.C., Gispen W.H., Schrama L.H., Kamal, A., Spruijt, B.M.,. *Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment*. 2006, *Eur. J. Neurosci*. 23, 261–272.
- Bañuelos C., Beas B.S., McQuail J.A., Gilbert R.J., Frazier C.J., Setlow B., Bizon, J.L.. *Prefrontal cortical GABAergic dysfunction contributes to age-related working memory impairment*. 2014, *J Neurosci*, , 34(10), 3457-3466.

- Baraldi T., Schöwe N.M., Balthazar J., Monteiro-Silva K.C., Albuquerque M.S., Buck H.S., Viel, T.A.. *Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice.* 2013, *Exp Gerontol.*, 48(8), 831-838.
- Barcellos L.F., Thomson G.. *Genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans.* 2003, Oct, *J Neuroimmunol.*;143(1-2):1-6
- Barnes C.A., Rao G., Houston F.P.. *LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse.* 2000 *Neurobiol Aging.*, 21 (5), 613-620.
- Beaulieu C, Cynader M.. *Effect of the richness of the environment on neurons in cat visual cortex. II. Spatial and temporal frequency characteristics.* 1990, *Brain Res Dev Brain Res.* Apr 1;53(1):82-8.
- Bennett E.L., Diamond M.C., Krech D., Rosenzweig M.R.. *Chemical and anatomical plasticity of brain.* 1996, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, , 8 (4), 459-470.
- Ben-Nun A., Cohen I.R.. *Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line.* 1981 Nov, *Eur J Immunol.*;11(11):949-52.
- Bigio E.H., Hynan L.S., Sontag E., Satumtira S., White C.L. *Synapse loss is greater in presenile than senile onset AD disease: implications for the cognitive reserve hypothesis.* 2002, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28, 218–227.
- Black J.E., Isaacs K.R., Anderson B.J., Alcantara A.A., Greenough W.T. *Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul; 87(14): 5568–5572.
- Bonanno G., Raiteri M.. *Multiple GABAB receptors.* 1993, *Trends Pharmacol Sci.*, 14(7), 259-261.
- Bondareff W., Mountjoy C.Q., Roth, M.. *Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia.* 1982, *Neurology*, 32(2), 164-168.
- Bonfiglio T., Olivero G., Merega E., Di Prisco S., Padolecchia C., Grilli M., Milanese M., Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Bonanno G., Marchi M., Pittaluga A.. *Prophylactic versus Therapeutic Fingolimod: Restoration of Presynaptic Defects in Mice Suffering from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.* 2017, *PLoS One.* 12, e0170825.

- Bories C., Husson, Z., Guitton M.J., De Koninck Y.. *Differential balance of prefrontal synaptic activity in successful versus unsuccessful cognitive aging*. 2013, *J Neurosci*, 33(4), 1344-1356.
- Bredy T.W., Zhang T.Y., Grant R.J., Diorio J., Meaney M.J.. *Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression*. 2004, *Eur J Neurosci*, 20(5), 1355-1362.
- Breunig J.J., Guillot-Sestier M.V., Town T.. *Brain injury, neuroinflammation and Alzheimer's disease*. 2013, *Front Aging Neurosci*, 5, 26
- Bryck R.L., Fisher P.A. *Training the brain: practical applications of neural plasticity from the intersection of cognitiveneuroscience, developmental psychology, and prevention science*. 2012, *Am Psychol*, 67(2), 87-100.
- Burianova J., Ouda L., Profant O., Syka J. *Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat*. 2009, *Exp Gerontol*, 44(3), 161-169.
- Buschler A., Manahan-Vaughan D., *Metabotropic glutamate receptor, mGlu5, mediates enhancements of hippocampal long-term potentiation after environmental enrichment in young and old mice*. 2017, *Neuropharmacology* 115, 42-50.
- Cancedda L., Putignano E., Sale A., Viegi A., Berardi N., Maffei L.. *Acceleration of visual system development by environmental enrichment*. 2004, May, *J Neurosci*;24(20):4840-8.
- Cartford M.C., Gould T., Bickford P.C. *A central role for norepinephrine in the modulation of cerebellar learning tasks*. 2004, *Behav Cogn Neurosci Rev*3(2), 131-138.
- Cassarino M., Setti A. *Environment as 'Brain Training': A review of geographical and physical environmental influences on cognitive ageing*. 2015, *Ageing Res Rev*, 23(Pt B), ,167-182.
- Castro-Chavira S.A., Fernandez T., Nicolini H., Diaz-Cintra S., Prado-Alcala R.A. *Genetic markers in biological fluids for aging-related major neurocognitive disorder*. 2015, *Curr Alzheimer Res*, 12 (3), 200-209.
- Centonze D., Muzio L., Rossi S., Cavasinni F., De Chiara V., Bergami A., Musella A., D'Amelio M., Cavallucci V., Martorana A., Bergamaschi A., Cencioni M.T., Diamantini A., Butti E., Comi G., Bernardi G., Cecconi F., Battistini L., Furlan R., Martino G..*Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis*. 2009, *J. Neurosci*. 29, 3442–3452.

- Cerrito F., Aloisi G., Arminio P.. *Age-related changes in rat brain monoamines release: peculiarity of dopamine release.* 1993, *J Neurosci Res.*, 34(3), 364-370.
- Chabry J., Nicolas S., Cazareth J., Murriss E., Guyon A., Glaichenhaus N., Heurteaux C., Petit-Paitel A.. *Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior.* 2015, *Brain Behav Immun.*, 50, 275-287.
- Chanaday N.L., Roth G.A. *Microglia and astrocyte activation in the frontal cortex of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.* 2016 Feb 9, *Neuroscience.*;314:160-9.
- Chanaday N.L., Vilcaes A.A., de Paul A.L., Torres A.I., Degano A.L., Roth G.A.. *Glutamate release machinery is altered in the frontal cortex of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.* 2015, *Mol. Neurobiol.* 51, 1353-1367.
- Chang L., Jiang C.S., Ernst T.. *Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites.* 2009 *Magnetic Resonance Imaging.* 27; 142-145.
- Chavez-Noriega L.E., Stevens C.F., *Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices.* 1994. *J. Neurosci.* 14,310-317.
- Chavis P., Mollard P., Bockaert J., Manzoni O.. *Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells.* 1998, *Neuron* 20, 773-781.
- Chiba S., Numakawa T., Ninomiya M., Richards M.C., Wakabayashi C., Kunugi H.. *Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex.* 2012, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 112-119.
- Cid M.P., Vilcaes A.A., Rupil L.L., Salvatierra N.A., Roth G.A., *Participation of the GABAergic system on the glutamate release of frontal cortex synaptosomes from Wistar rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.* 2011. *Neuroscience* 189, 337-344.
- Collier T.J., Kanaan N.M., Kordower J.H. *Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin?* 2017, *Mov Disord.*, 32 (7), 983-990.
- Compston A., Coles A. *Multiple sclerosis,* 2008, *Lancet* 372: 1502-1517
- Coq J.O., Xerri C.. *Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats.* 1998 Jul, *Exp Brain Res.*;121(2):191-204

- Costa D. A., Cracchiolo J. R., Bachstetter A. D., Hughes T. F., Bales K. R., Paul S. M. Potter H.. *Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms*. 2007 *Neurobiol. Aging*, 28, 831-844.
- Darna M., Beckmann J.S., Gipson C.D., Bardo M.T., Dwoskin L.P., *Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex*. 2015, *Brain Res.* 1599, 115-125.
- Davis D.G., Schmitt F.A., Wekstein D.R., Markesbery W.R.. *Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects*. 1999 Apr., *J Neuropathol Exp Neurol*;58(4):376-88.
- de Lago E., Moreno-Martet M., Cabranes A., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J. *Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CBI receptor-mediated anti-inflammatory effects*. 2012, *Neuropharmacology* 62, 2299-2308.
- Deák F. *Neuronal vesicular trafficking and release in age-related cognitive impairment*. 2014, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 (11), 1325-1330.
- Denic A., Johnson A.J., Bieber A.J., Warrington A.E., Rodriguez M., Pirko I., *The relevance of animal models in multiple sclerosis research*. 2011. *Pathophysiology*. 18:21-29.
- Di Prisco S., Merega E., Bonfiglio T., Olivero G., Cervetto C., Grilli M., Usai C., Marchi M., Pittaluga A.. *Presynaptic, release-regulating mGlu2-preferring and mGlu3-preferring autoreceptors in CNS: pharmacological profiles and functional roles in demyelinating disease*. 2016a., *Br. J. Pharmacol.* 173, 1465-1477.
- Di Prisco S., Merega E., Lanfranco M., Casazza S., Uccelli A., Pittaluga A., *Acute desipramine restores presynaptic cortical defects in murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing central CCL5 overproduction*. 2014a, *Br. J. Pharmacol.* 171, 2457-2467.
- Di Prisco S., Merega E., Milanese M., Summa M., Casazza S., Raffaghello L., Pistoia V., Uccelli A., Pittaluga A., *CCL5-Glutamate interaction in central nervous system: early and acute presynaptic defects in EAE mice*. 2013, *Neuropharmacology* 75, 337-346.
- Di Prisco S., Merega E., Pittaluga A. *Functional adaptation of presynaptic chemokine receptors in EAE mouse central nervous system*. 2014b. *Synapse* 68, 529-35.

- Di Prisco S., Olivero G., Merega E., Bonfiglio T., Marchi M., Pittaluga A.. *CXCR4 and NMDA receptors are functionally coupled in rat hippocampal noradrenergic and glutamatergic nerve endings*. 2016b, *J. Neuroimm. Pharmacol.* 11, 645-656.
- Di Prisco S., Summa M., Chellakudam V., Rossi P.I.A. Pittaluga, A.. *RANTES-mediated control of excitatory amino acid release in mouse spinal cord*. 2012, *J. Neurochem.* 121, 428-437.
- Diamond M.C., Ingham C.A., Johnson R.E., Bennett E.L., Rosenzweig M.R., *Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus*. 1976, *J. Neurobiol.* 7, 75–85.
- Diamond M.C., Law F., Rhodes H., Lindner B., Rosenzweig M.R., Krech D., Bennett E.L.. *Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment*. 1966, *J. Comp. Neurol.* 128, 117–126.
- Diamond M.C., Lindner B., Raymond A., *Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats*. 1967, *J. Comp. Neurol.* 131, 357–364.
- Draganski B., Gaser C., Busch V., Schuierer G., Bogdahn U., May A., *Neuroplasticity: Changes in grey matter induced by training*. 2004, *Nature* 427, 311-312
- Draganski B., Gaser C., Kempermann G., Kuhn H. G., Winkler J., Buchel C., May A..*Temporal and Spatial Dynamics of Brain Structure Changes during Extensive Learning*. June 7, 2006, *The Journal of Neuroscience*, 26(23):6314–6317.
- Duan H. et al. *Age-related morphologic alterations in dendrites and spine densities of corticocortically projecting neurons in macaque monkeys*. 2003 *Cereb. Cortex* 13, 950–961
- Duffy S.N., Craddock K.J., Nguyen P.V.. *Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory*. 2001, *Learn. Mem.* 8, 26–34
- Ebers G.C., Bulman D.E., Sadovnick A.D., Paty D.W., Warren S., Hader W., Murray T.J., Seland T.P., Duquette P., Grey T., et al. *A population-based study of multiple sclerosis in twins*. 1986 Dec 25, *N Engl J Med.*:315(26):1638-42.
- Ebrahimi S., Rashidy-Pour A., Vafaei A.A., Akhavan M.M.. *Central beta-adrenergic receptors play an important role in the enhancing effect of voluntary exercise on learning and memory in rat*. 2010, *Behav Brain Res*, 208(1), 189-193.

- Elrod R., Peskind E.R., Di Giacomo L., Brodtkin K.I., Veith R.C., Raskind M.A.. *Effects of Alzheimer's disease severity on cerebrospinal fluid norepinephrine concentration.* 1997, Am J Psychiatry, 154(1), 25-30.
- Faherty C.J., Kerley D., Smeyne R.J., *A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment.* 2003, Brain Res. Dev. 141, 55–61.
- Ferrero J.J., Alvarez A.M., Ramírez-Franco J., Godino M.C., Bartolomé-Martín D., Aguado C., Torres M., Luján R., Ciruela F., Sánchez-Prieto J.. *β -Adrenergic receptors activate exchange protein directly activated by cAMP (Epac), translocate Munc13-1, and enhance the Rab3A-RIM1 α interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals.* 2013, J Biol Chem., 288(43), 31370-31385.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H., *Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling.* 2007, Nature 447, 178–182
- Foster T.C., Dumas T.C. *Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience.* 2001, J. Neurophysiol. 85, 1377–1383.
- Foster T.C., Gagne J., Massicotte G., *Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation.* 1996, Brain Res. 736, 243–250.
- Fotinos A.F., Mintun M.A., Snyder A.Z., Morris J.C., Buckner R.L.. *Brain volume decline in aging: evidence for a relation between socioeconomic status, preclinical Alzheimer disease, and reserve.* 2008 Jan., Arch Neurol.;65(1):113-20.
- Fragkoudis R., Tamberg N., Siu R., Kiiver K., Kohl A., Merits A., Fazakerley J.K., *Neurons and oligodendrocytes in the mouse brain differ in their ability to replicate Semliki Forest virus.* 2009, J. Neurovirol. 15:57-70.
- Francis B.M., Yang J., Hajderi E., Brown M.E., Michalski B., McLaurin J., Fahnestock M., Mount H.T.. *Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease.* 2012, Neuropsychopharmacol. 37(8):1934-1944.
- Frick K.M., Fernandez S.M., *Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice.* 2003, Neurobiol. Aging 24, 615–626
- Frisoni G.B., Ganzola R., Canu E., Rüb U., Pizzini F.B., Alessandrini F., Zoccatelli G., Beltramello A., Caltagirone C., Thompson P.M.. *Mapping local hippocampal changes in Alzheimer's disease and normal ageing with MRI at 3 Tesla.* 2008 Dec, Brain.;131(Pt 12):3266-76.

- Frohman E.M., Racke M.F., Raine C.S.. *Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis*. 2006, N. Engl. J. Med. 354, 942-655.
- Fuchs F., Cosquer B., Penazzi L., Mathis C., Kelche C., Majchrzak M., Barbelivien A.. *Exposure to an enriched environment up to middle age allows preservation of spatial memory capabilities in old age*. 2016, Behav Brain Res., , 299, 1-5.
- Gentile A., Musella A., Bullitta S., Fresegha D., De Vito F., Fantozzi R., Piras E., Gargano F., Borsellino G., Battistini L., Schubart A., Mandolesi G., Centonze D.. *Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis*. 2016, J.Neuroinflammation 13, 207.
- Goertz N., Lewejohann L., Tomm M., Ambrée O., Keyvani K., Paulus W., Sachser N.. *Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 2008 Alzheimer mice*. Behav. Brain Res. 191, 43-48.
- Gold J.R., Bajo V.M.. *Insult-induced adaptive plasticity of the auditory system*. 2014, Front Neurosci, 8, 110.
- Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. *A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele*. 2008 Oct., Tissue Antigens.;72(4):401-3.
- Greenough W.T., Volkmar F.R., Juraska J., *Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat*. 1973, Exp. Neurol. 41, 371–378.
- Grilli M., Raiteri L., Pittaluga A., *Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst2 receptor linked to the adenylyl cyclaseprotein kinase A pathway*. 2004, Neuropharmacology 46, 388-396.
- Grilli M., Zappettini S., Zanardi A., Lagomarsino F., Pittaluga A., Zoli M., Marchi M.. *Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the presynaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus*. 2009, J. Neurochem. 110, 1598-1606.
- Griñan-Ferré C., Pérez-Cáceres D., Gutiérrez-Zetina S.M., Camins A., Palomera-Avalos V., Ortuño-Sahagún D., Rodrigo M.T., Pallàs M.. *Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8)* 2016 May Mol Neurobiol.;53(4):2435-50

- Haji N., Mandolesi G., Gentile A., Sacchetti L., Fresegna D., Rossi S., Musella A., Sepman H., Motta C., Studer V., De Chiara V., Bernardi G., Strata P., Centonze D., *TNF- α -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis*. 2012, *Exp. Neurol.* 237, 296-303.
- Hannan A.J., *Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity*. 2014, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 13-25.
- Hebb D. O. *The organization of behavior*. 1949, New York: Wiley;
- Hebener O., *Fondamenti di speranza : teoria e terapia della sclerosi multipla, Tecniche nuove*, 2001, Milano, p. 135 –136.
- Helzner E.P., Scarmeas N., Cosentino S., Portet F., Stern Y.. *Leisure activity and cognitive decline in incident Alzheimer disease*. 2007 Dec, *Arch Neurol*;64(12):1749-54.
- Herring A., Yasin H., Ambrée O., Sachser N., Paulus W., Keyvani K..*Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice*. 2008.*Brain Pathol.*, 18, 32-39
- Hirata K., Kuge Y., Yokota C., Harada A., Kokame K., Inoue H., Kawashima H., Hanzawa H., Shono Y., Saji H., Minematsu K., Tamaki N.. *Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model*. 2011, *Neurosci. Lett.* 495, 210-215.
- Hirling H., Scheller R.H., *Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex*. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11945-11949.
- Hof P. R., Mobbs C. V.. *Handbook of the neuroscience of aging*. 2009 London, UK: Elsevier Inc.
- Hof P.R., Morrison J.H.. *The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits*. 2004 Oct, *Trends Neurosci.*;27(10):607-13. Review.
- Hosseiny S., Pietri M., Petit-Paitel A., Zarif H., Heurteaux C., Chabry J., Guyon A., *Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development*. 2015, *Brain Struct. Funct.* 220, 3435-3448.
- Icke B.R., Pham T.M., Sanders L.A., Albeck D.S., Mohammed A.H., Granholm A.C., *Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat*. 2000, *Brain. Exp. Neurol.* 64, 45–52.

- Iyo M., Yamasaki T. *The detection of age-related decrease of dopamine, D1, D2 and serotonin 5-HT2 receptors in living human brain.* 1993. Prog. Neuro-Psycopharmacol & Biol. Psychiat. 17; 415-421.
- Jänisch W.. *Entmarkungskrankheiten unbekannter Ätiologie, in Neuropathologie* 1990, Pathomorphologie und Pathogenese neurologischer Krankheiten, Fischer, Stoccarda, p. 182 – 191
- Jersild C., Svejgaard A., Fog T. *HL-A antigens and multiple sclerosis.* 1972 Jun, Lancet. 3;1(7762):1240-1
- Jurgens H.A., Johnson R.W., *Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection.* 2012, Brain Behav. Immun. 26, 1006-1016.
- Kaasinen V., Vilkinen H., Hietala J., Nägren K., Helenius H., Olsson H., Farde L., Rinne J.O. *Age-related dopamine D2/D3 receptor loss in extrastriatal regions of the human brain.* 2000.Neurobiology of Aging. 21; 683– 688.
- Kabat E.A, Wolf A., Bezer A.E.. *The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants.* 1947, J. Exp. Med. 85:117-1130.
- Kaiser L.G., Schuff N., Cashdollar N., Weiner M.W.. *Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T.* 2005 Neurobiology of aging. 26; 665-672.
- Katzman R., Terry R., DeTeresa R., Brown T., Davies P., Fuld P., Renbing X., Peck A., *Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques.* 1988, Ann. Neurol. 23, 138–144.
- Kempermann G., Gast D., Gage F.H., *Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment.* 2002 Aug., Ann Neurol.;52(2):135-43.
- Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.* 1997,Nature 386, 493–495.
- Kipp M., Clarner T., Dang J., Copray S., Beyer C.. *The cuprizone animal model: new insights into an old story.* 2009, Neuropathol. 118:723-736.

- Kipp M., Van Der Star B., Vogel D.Y.S., Puentes F., Van Der Valk P., Baker D., Amor S., *Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond*. 2012, *Mult. Scler. Relat. Disord.* 1:15-28.
- Kobilo T., Liu Q., Gandhi K., Mughal M., Shaham Y., Van Praag H.. *Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment*. 2011 Sep *Learn Mem.*; 18(9): 605–609.
- Kraft E. *Cognitive function, physical activity, and aging: possible biological links and implications for multimodal interventions*. 2012, *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn.*, 19(1-2), 248-263.
- Krech D., Rosenzweig M.R., Bennett E.L., *Effects of environmental complexity and training on brain chemistry*. 1960, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 53, 509–519
- Kumar A., Rani A., Tchigranova O., Lee W.H., Foster T.C. *Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology*. 2012, *Neurobiol Aging.*, 33(4), 828.e1-17.
- Lambert T.J., Fernandez S.M., Frick K.M.. *Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice*. 2005, *Neurobiol. Learn. Mem.* 83, 206–216
- Leggio M.G., Mandolesi L., Federico F., Spirito F., Ricci B., Gelfo F., Petrosini L., *Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat*. 2005, *Behav. Brain Res.* 163, 78–90.
- Levine S, Sowinski R. *Hyperacute allergic encephalomyelitis. A localized form produced by passive transfer and pertussis vaccine*. 1973 Oct, *Am J Pathol.*;73(1):247-60
- Liguz-Leczna M., Lehner M., Kaliszewska A., Zakrzewska R., Sobolewska A., Kossut M.. *Altered glutamate/GABA equilibrium in aged mice cortex influences cortical plasticity*. 2015, *Brain Struct Funct.* 220(3), 1681-1693.
- Lindenbach D., Conti M.M., Ostock C.Y., George J.A., Goldenberg A.A., Melikhov-Sosin M., Nuss E.E., Bishop C., *The role of primary motor cortex (M1) glutamate and GABA signaling in l-DOPA-induced dyskinesia in Parkinsonian rats*. 2016, *J. Neurosci.* 36, 9873- 9887.
- Ling L.L., Hughes L.F., Caspary D.M. *Age-related loss of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase in rat primary auditory cortex*. 2005, *Neuroscience*, 132(4), 1103-1113.

- Lohr J.B., Jeste D.V. *Locus ceruleus morphometry in aging and schizophrenia*. 1988, Acta Psychiatr Scand., 77(6), 689-697.
- Lorentzen J.C., Issazadeh S., Storch M., Mustafa M.I., Lassman H., Linington C., Klareskog L., Olsson T. *Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant*. 1995 Dec 31, J Neuroimmunol.;63(2):193-205.
- Luccini E., Musante V., Neri E., Brambilla-Bas M., Severi P., Raiteri M., Pittaluga A. *Functional interactions between presynaptic NMDA receptors and metabotropic glutamate receptors co-expressed on rat and human noradrenergic terminals*. 2007, Br J Pharmacol, 151, 1087-1094.
- Luccini E., Musante V., Neri E., Raiteri M., Pittaluga A. *N-methyl-D-aspartate autoreceptors respond to low and high agonist concentrations by facilitating, respectively, exocytosis and carrier-mediated release of glutamate in rat hippocampus*. 2007, J Neurosci Res, 85, 3657-3665.
- Luebke J.I., Chang Y.M., Moore T.L., Rosene D.L. *Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex*. 2004, Neuroscience, 125(1), 277-288
- Luerding R., Gebel S., Gebel E.M., Schwab-Malek S., Weissert R. *Influence of Formal Education on Cognitive Reserve in Patients with Multiple Sclerosis*. 2016 Mar 29, Front Neurol.;7:46.
- Magalon K., Cantarella C., Monti G., Cayre M., Durbec P. *Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models*. 2007 Eur. J. Neurosci. 25, 761-771.
- Maguire E.A., Woollett K., and Spiers H. J.. *London Taxi Drivers and Bus Drivers: A Structural MRI and Neuropsychological Analysis*, 2006, HIPPOCAMPUS 16:1091–1101
- Majdi M., Ribeiro-da-Silva A., Cuello A.C. *Cognitive impairment and transmitter-specific pre- and postsynaptic changes in the rat cerebral cortex during ageing*. 2007, Eur J Neurosci., 26(12), 3583-3596.
- Malm T., Ort M., Tahtivaara L., Jukarainen N., Goldsteins G., Puolivali J., Nurmi A., Pussinen R., Ahtoniemi T., Miettinen T.K., Kanninen K., Leskinen S., Vartiainen N., Yrjänheikki J., Laatikainen R., Harris-White M.E., Koistinaho M., Frautschy S.A., Bures J., Koistinaho J., *Beta-amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits*

without role of inflammation or beta-amyloid deposits. 2006. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 8852–8857.

•Mandaïron N, Didier A, Linster C. *Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception.* 2008 Jul, Neurobiol Learn Mem.;90(1):178-84.

•Mandolesi G., Gentile A., Musella A., Freseigna D., De Vito F., Sepman H., Marfia G.A., Centonze D. *Synaptopathy connects inflammations and neurodegeneration in multiple sclerosis* 2015 Nature Rev. Neurol. 11, 711-724.

•Mangiardi M., Crawford D.K., Xia X., Du S., Simon-Freeman R., Voskuhl R.R., Tiwari-Woodruff S.K., *An animal model of cortical and callosal pathology in multiple sclerosis.* 2011 Brain Pathol. 21, 263-278.

•Manly J.J., Schupf N., Tang M.X., Stern Y.J. *Cognitive decline and literacy among ethnically diverse elders* 2005 Dec Geriatr Psychiatry Neurol.;18(4):213-7.

•Marte A, Cavallero A, Morando S, Uccelli A, Raiteri M, Fedele E *Alterations of glutamate release in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.* 2010 J Neurochem 115 : 343-352

•Mather M., Harley C.W. *The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain.* 2016, Trends Cogn Sci., 20 (3), 214-226.

•Maximov A., Shin O.H., Liu X., Südhof T.C., *Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release.* 2007. J. Cell Biol. 176, 113-124.

•Mégevand P., Troncoso E., Quairiaux C., Muller D., Michel C.M., Kiss J.Z.. *Long-term plasticity in mouse sensorimotor circuits after rhythmic whisker stimulation.* 2009 Apr 22, J Neurosci.;29(16):5326-35.

•Mellott T.J., Williams C.L., Meck W.H., Blusztajn J.K., *Prenatal choline supplementation advances hippocampal development and enhances MAPK and CREB activation.* 2004, FASEB. J. 18, 545–547

•Menegon A., Bonanomi D., Albertinazzi C., Lotti F., Ferrari G., Kao H.T., Benfenati F., Baldelli P., Valtorta F. *Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca²⁺-dependent synaptic activity.* 2006, J. Neurosci. 26, 11670-11681.

•Mix E., Meyer-Rienecker H., Hartung H.P., Zettl U.K. *Animal model of multiple sclerosis-potentials and limitations.* 2010 Prog. Neurobiol. 92:386-404.

- Mora F., Segovia G., del Arco A. *Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain.* 2007 *Brain Res Rev.*, 55(1), 78-88.
- Mortimer J.A., Snowdon D.A., Markesbery W.R.. *Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study.* 2003, *J Clin Exp Neuropsychol.*;25:671–679
- Motl R.W., Sandroff B.M., DeLuca J., *Exercise training and cognitive rehabilitation: a symbiotic approach for rehabilitating walking and cognitive functions in Multiple Sclerosis?* 2016. *Neurorehabil. Neural Repair* 30, 499-511.
- Motl R.W., Sandroff B.M., Pilutti L.A., Klaren R.E., Baynard T., Fernhall B. *Physical activity, sedentary behavior, and aerobic capacity in persons with multiple sclerosis.* 2017 Jan, *J Neurol Sci.* 15;372:342-346.
- Musante V., Longordo F., Neri E., Pedrazzi M., Kalfas F., Severi P., Raiteri M., Pittaluga A. *RANTES modulates the release of glutamate in human neocortex.* 2008. *J. Neurosci.* 28,12231-12240.
- Musante V., Summa M., Cunha R.A., Raiteri M., Pittaluga A., *Presynaptic glycine GlyT1 transporter – NMDA receptor interaction: relevance to NMDA autoreceptor activation in the presence of Mg²⁺ ions.* 2011. *J. Neurochem.* 117, 516-527.
- Musante V., Summa M., Neri E., Puliti A., Godowicz T.T., Severi P., Battaglia G., Raiteri M., Pittaluga A., *The HIV-1 viral protein Tat increases glutamate and decreases GABA exocytosis from human and mouse neocortical nerve endings.* 2010. *Cereb. Cortex* 20, 1974-1984.
- Musella A., Mandolesi G., Mori F., Gentile A., Centonze D. *Linking synaptopathy and gray matter damage in multiple sclerosis.* 2016 Feb, *Mult Scler.*;22(2):146-9.
- Naka F., Narita N., Okado N., Narita M.. *Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment.* 2005 *Brain Dev.*, 27(4), 275-278.
- Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O., Eriksson P.S., *Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory.* 1999. *J. Neurobiol.* 39, 569–578.
- Nithianantharajah J., Hannan A.J. *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.* 2006, *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697-709.

- Nithianantharajah J., Levis H., Murphy M.,. *Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins.* 2004 *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 200–210.
- O’Sullivan J.B., Ryan K.M., Harkin A., Connor T.J. *Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-10 and RANTES and cell adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge.* 2010 *J Neuroimmunol.* , 220, 34-42.
- Paco S., Margelí M.A., Olkkonen V.M., Imai A., Blasi J., Fischer-Colbrie R., Aguado F.,. *Regulation of exocytotic protein expression and Ca²⁺-dependent peptide secretion in astrocytes.* 2009 *J. Neurochem.* 110, 143-156.
- Park A.J., Havekes R., Choi J.H., Luczak V., Nie T., Huang T., Abel T., *A presynaptic role for PKA in synaptic tagging and memory.* 2014. *Neurobiol. Learn Mem.* 114, 101-112.
- Park D.C., Bischof G.N.. *The aging mind: neuroplasticity in response to cognitive training.* 2013, *Dialogues Clin Neurosci.*, 15 (1), 109-119.
- Peinemann A., Lehner C., Conrad B., Siebner H.R.. *Age-related decrease in paired-pulse intracortical inhibition in the human primary motor cortex.* 2001 *Neurosci Lett.* , 313(1-2), 33-36.
- Pellicciari M.C., Miniussi C., Rossini P.M., De Gennaro L.. *Increased cortical plasticity in the elderly: changes in the somatosensory cortex after paired associative stimulation.* 2009 *Neuroscience.* , 163(1), 266-276.
- Peruga I., Hartwig S., Thöne J., Hovemann B., Gold R., Juckel G., Linker R.A.. *Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis.* 2011 *Behav. Brain Res.* 220, 20-29.
- Petrosini L., De Bartolo P., Foti F., Gelfo F., Cutuli D., Leggio M.G., Mandolesi L.. *On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves.* 2009. *Brain Res. Rev.* 61, 221-239.
- Pitt D., Werner P., Raine C.S. *Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis.* 2000, *Nature medicine* 6 : 67-70
- Pittaluga A. *Presynaptic release-regulating mGlu1 receptors in Central Nervous System.* 2016, *Front Pharmacol.*, 7, 295-

- Pittaluga A., Asaro D., Pellegrini G., Raiteri M. *Studies on 3H-GABA and endogenous GABA release in rat cerebral cortex suggest the presence of autoreceptors of the GABAB type.* 1987, Eur. J. Pharmacol., 144, 45-52.
- Pittaluga A., Fedele E., Risiglione C., Raiteri M.. *Age-related decrease of the NMDA receptor-mediated noradrenaline release in rat hippocampus and partial restoration by D-cycloserine.* 1993 Eur. J. Pharmacol., 231, 129-134.
- Pittaluga A., Feligioni M., Longordo F., Luccini E., Raiteri M.. *Trafficking of presynaptic AMPA receptors mediating neurotransmitter release: neuronal selectivity and relationships with sensitivity to cyclothiazide.* 2006, Neuropharmacology, 50, 286-296.
- Pittaluga A., Raiteri L., Longordo F., Luccini E., Barbiero V.S., Racagni, G., Popoli M., Raiteri M.. *Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus* Neuropharmacology, 2007, 53, 27-36.
- Potier B., Jouvenceau A., Epelbaum J., Dutar P. *Age-related alterations of GABAergic input to CA1 pyramidal neurons and its control by nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampus.* 2006, Neuroscience, 142(1), 187-201.
- Pusic K.M., Pusic A.D., Kraig R.P.. *Environmental enrichment stimulates immune cell secretion of exosomes that promote CNS myelination and may regulate inflammation.* 2016. Cell. Mol. Neurobiol. 36, 313-325.
- Raiteri M., Bonanno G., Gemignani A., Pende M., Vallebuona F., Lanza M.. *Pharmacologically distinct GABAB receptor subtypes modulate neurotransmitter release in the rat brain cortex.* 1992, Adv Biochem Psychopharmacol. 47, 205-216.
- Rampon C., Tang Y.P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M., Tsien, J.Z. *Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice.* 2000, Nature Neurosci. 3, 238–244.
- Raskind M.A., Peskind E.R., Holmes C., Goldstein D.S.. *Patterns of cerebrospinal fluid catechols support increased central noradrenergic responsiveness in aging and Alzheimer's disease.* 1999 Biol Psychiatry, 46(6), 756-765.
- Raskind M.A., Peskind E.R., Veith R.C., Beard J.C., Gumbrecht G., Halter J.B.. *Increased plasma and cerebrospinal fluid norepinephrine in older men: differential suppression by clonidine.* 1988, J Clin Endocrinol Metab. 66(2), 438-443.
- Redolat R., Mesa-Gresa P. *Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline.* 2012, Curr Top Behav Neurosci., 10, 293-316.

- Richard J.F., Roy M., Audoy-Rémus J., Tremblay P., Vallières L. *Crawling phagocytes recruited in the brain vasculature after pertussis toxin exposure through IL6, ICAM1 and ITGaM*. 2011 Nov, *Brain Pathol.*;21(6):661-71.
- Riley K.P., Snowdon D.A., Desrosiers M.F., Markesbery W.R *Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: Findings from the Nun Study* 2005, *Neurobiology of Aging* 26(3):341-347,.
- Rinne J.O., Lonnberg P., Marjamaaki P. *Age-dependent decline in human brain dopamine D1 and D2 receptors*. 1989. *Brain Research*. 508; 349-352.
- Rodrigues D.H., de Carvalho Vilela M., Lacerda-Queiroz N., de Miranda A.S., Sousa L.F., Reis H.J, Teixeira A.L. *Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. 2011, *Arq. Neuropsiquiatr.* 69, 938-942.
- Rosenzweig M.R. *Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments*. 1978 *Brain Res.* 153, 563–576
- Rosenzweig M.R., Bennett E.L.. *Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behaviour*. 1996 *Behav. Brain Res.* 78, 57–65.
- Rossi S., Lo Giudice T., De Chiara V., Musella A., Studer V., Motta C., Bernardi G., Martino G., Furlan R., Martorana A., Centonze D. *Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis*. 2012. *Br. J. Pharmacol.* 165, 861-869.
- Rozycka A.; Liguz-Leczna M.. *The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse*. 2017, *Aging Cell*, 16 (4), 634-643.
- Ruffini F., Rossi S., Bergamaschi A., Brambilla E., Finardi A., Motta C., Studer V., Barbieri F., De Chiara V., Hayardeny L., Comi G., Centonze D., Martino G.. *Laquinimod prevents inflammation-induced synaptic alterations occurring in experimental autoimmune encephalomyelitis*. 2013. *Mult. Scler.* 19, 1084-1094.
- Salamone A., Zappettini S., Grilli M., Olivero G., Agostinho P., Tomé, A.R., Chen J., Pittaluga A., Cunha R.A., Marchi M.. *Prolonged nicotine exposure down-regulates presynaptic NMDA receptors in dopaminergic terminals of the rat nucleus accumbens*. 2014 *Neuropharmacology*, 79, 488-497.
- Sale A., Putignano E., Cancedda L., Landi S., Cirulli F., Berardi N., Maffei L. *Enriched environment and acceleration of visual system development*. 2004 Oct., *Neuropharmacology*.;47(5):649-60.

- Saliasuta N., Chang L., Ernst T. *Regional variations and the effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites*. 2008. *Magnetic Resonance Imaging*. 26; 667-675
- Satz P.. *Brain reserve capacity on symptom onset after brain injury: a formulation and review of evidence for threshold theory*. 1993 *Neuropsychology*. 7, 273–295.
- Scarmeas N., Albert S.M., Manly J.J., Stern Y.. *Education and rates of cognitive decline in incident Alzheimer's disease*. 2006 Mar, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.;77(3):308-16.
- Schättin A., Baur K., Stutz J., Wolf P., de Bruin E.D.. *Effects of Physical Exercise Combined with Nutritional Supplements on Aging Brain Related Structures and Functions: A Systematic Review*. 2016, *Front Aging Neurosci.*, 8, 161.
- Segal S.K., Cotman C.W., Cahill L.F.. *Exercise-induced noradrenergic activation enhances memory consolidation in both normal aging and patients with amnesic mild cognitive impairment*. 2012, *J Alzheimers Dis.*, 32(4):1011-1018.
- Segovia G., del Arco A., Mora F. *Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain*. 2009, *J Neural Transm.*,16 (8), 1007-1016.
- Segovia G., Del Arco A., Prieto L., Mora, F.. *Glutamate-glutamine cycle and aging in striatum of the awake rat: effects of a glutamate transporter blocker*. 2001 *Neurochem Res.*, 26(1), 37-41.
- Shindler K.S., Kenyon L.C., Dutt M., Hingley S.T., Das Sarma J.,. *Experimental optic neuritis induced by a demyelinating strain of mouse hepatitis virus*. 2008 *J. Virol*. 82:8882-8886.
- Shores M.M., White S.S., Veith R.C., Szot P.. *Tyrosine hydroxylase mRNA is increased in old age and norepinephrine uptake transporter mRNA is decreased in middle age in locus coeruleus of Brown-Norway rats*. 1999, *Brain Res.* 826(1), 143-147.
- Smith C.M., Hale L.A., Mulligan H.F., Treharne G.J. *Participant perceptions of a novel physiotherapy approach('Blue prescription') for increasing levels of physical activity in people with multiple sclerosis: a qualitative study following intervention*. 2013, *Disabil Rehabil* 35:1174-81
- Soffié M., Hahn K., Terao E., Eclancher F.. *Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment*. 1999, *Behav Brain Res.*, 101(1), 37-49.
- Stanley E.M., Fadel J.R., Mott D.D.. *Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats*. 2012 *Neurobiol Aging*, , 33(2), 431.e1-13.

- Steffener J., Stern Y.. *Exploring the neural basis of cognitive reserve in aging*. 2012, *Biochim Biophys Acta.*, 1822 (3), 467-473.
- Stern Y., 2009. *Cognitive reserve*. *Neuropsychologia* 47, 2015–2028
- Stern Y., Alexander G.E., Prohovnik I., Stricks L., Link B., Lennon M.C., Mayeux R.. *Relationship between lifetime occupation and parietal flow: Implications for a reserve against Alzheimer's disease pathology*. 1995, *Neurology*, 45, 55– 60.
- Stern Y., Gurland B., Tatemichi T.K., Tang M.X., Wilder D., Mayeux R.. *Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease*. 1994 *JAMA* 271, 1004–1010.
- Stern Y.. *What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept*. 2002, *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 8, 448–460.
- Studzinski C. M., Christie L. A., Araujo J. A., Burnham W. M., Head E., Cotman C. W., Milgram N. W.. *Visuospatial function in the beagle dog: An early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia*. 2006 *Neurobiol Learn Mem.*, 86, 197-204.
- Sulkowski G., Dabrowska-Bouta B., Kwiatkowska-Patzer B., Struzyńska L.. *Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis*. 2009 *Folia Neuropathol.*;47(4):329-37.
- Summa M., Di Prisco S., Grilli M., Marchi M., Pittaluga A.. *Hippocampal AMPA autoreceptors positively coupled to NMDA autoreceptors traffic in a constitutive manner and undergo adaptative changes following enriched environment training*. 2011, *Neuropharmacology* 61, 1282-1290.
- Summa M., Di Prisco S., Grilli M., Marchi M., Pittaluga A.. *Hippocampal AMPA autoreceptors positively coupled to NMDA autoreceptors traffic in a constitutive manner and undergo adaptative changes following enriched environment training*. 2011, *Neuropharmacology*, 61, 1282-1290.
- Summa M., Di Prisco S., Grilli M., Usai C., Marchi M., Pittaluga A.. *Presynaptic mGlu7 receptors control GABA release in mouse hippocampus*. 2012, *Neuropharmacology*. 66, 215-224
- Sumowski J.F., Leavitt V.M.. *Cognitive reserve in multiple sclerosis*. 2013 *Aug, Mult Scler.*;19(9):1122-7.
- Swanborg R.H., Stepaniak J.A.. *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat*. 2001 May, *Curr Protoc Immunol.*;Chapter 15:Unit 15.2.

- Tsunoda I., Fujinami R.S., *Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis*. 2010. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 5:355-369.
- Tur C.. *Fatigue Management in Multiple Sclerosis*. 2016 *Curr Treat Options Neurol.* Jun;18(6):26.
- Turner C.A., Lewis M.H., King M.A.. *Environmental enrichment: effect on stereotyped behavior and dendritic morphology*. 2003. *Dev. Psychobiol.* 43, 20–27
- Tyas S.L., Snowdon D.A., Desrosiers M. F., Riley K.P., Markesbery W.R.. *Healthy ageing in the Nun Study: Definition and neuropathologic correlates*. 2007 *Age and Ageing*, 36(6), 650-655.
- Vachon P., Millecamps M., Low L., Thompsosn S.J., Pailleux F., Beaudry F., Bushnell C.M., Stone L.S. *Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain*. 2013 Jun, *Behav Brain Funct.* 7:9:22.
- Vachon P., Millecamps M., Low L., Thompsosn S.J., Pailleux F., Beaudry F., Bushnell C.M., Stone L.S.. *Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain*. 2013, *Behav. Brain Funct.* 9, 22.
- Valenzuela M., Sachdev P. *Can cognitive exercise prevent the onset of dementia? Systematic review of randomized clinical trials with longitudinal follow-up*. 2009. *American Journal of Geriatric Psych*, 17(3), 179-187.
- Van Dellen A., Blakemore C., Deacon R., York D., Hannan A.J.. *Delaying the onset of Huntington's in mice*. 2000. *Nature* 404, 721–722.
- Van Hoomissen J.D., Holmes P.V., Zellner A.S., Poudevigne A., Dishman R.K.. *Effects of beta-adrenoreceptor blockade during chronic exercise on contextual fear conditioning and mRNA for galanin and brain-derived neurotrophic factor*. 2004, *Behav Neurosci.*, 118(6), 1378-1390.
- Van Praag H., Kempermann G., Gage F.H.. *Neural consequences of environmental enrichment*. 2000, *Nature Rev. Neurosci.* 1, 191–198.
- Venable N., Pinto-Hamuy T., Arraztoa J.A., Contador M.T., Chellew A., Perán C., Valenzuela X.. *Greater efficacy of preweaning than postweaning environmental enrichment on maze learning in adult rats*. 1988 *Behav. Brain Res.* 31, 89–92

- Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A. *Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms.* 2009 Feb., *Neuropsychopharmacology*.;34(3):786-95.
- Vijayashankar N., Brody H.. *A quantitative study of the pigmented neurons in the nuclei locus coeruleus and subcoeruleus in man as related to aging.* 1979, *J Neuropathol Exp Neurol.*, 38(5), 490-497.
- Vilcaes A.A., Furlan G., Roth G.A.. *Inhibition of Ca²⁺-dependent glutamate release from cerebral cortex synaptosomes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.* 2009. *J. Neurochem.* 108, 881-890.
- Vizi E.S., Kiss, J.P., Lendvai B.. *Nonsynaptic communication in the central nervous system.* 2004, *Neurochem Int.*, 45(4), 443-451.
- Wang Y., Chan G.L.Y., Holden J.E., Dobko T., Mak E., Schulzer M., Huser J.M., Snow B.J., Ruth T.J. *Age-Dependent Decline of Dopamine D1 Receptors in Human Brain: A PET Study.* 1998.*Science.* 30; 56-61.
- Waxman S.G.. *Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels.* 2006, *Nat Rev Neurosci*;7: 932-941
- Wendebourg M.J., Feddersen L.K., Lau S., Köpke S., Moss-Morris R., Heesen C., Pöttgen J. *Development and Feasibility of an Evidence-Based Patient Education Program for Managing Fatigue in Multiple Sclerosis: The "Fatigue Management in MS" Program (FatiMa).* 2016, *Int J MS Care.* May-Jun;18(3):129-37
- Whalley L.J., Deary I.J., Appleton C.L., Starr J.M. *Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging.* 2004, *Ageing Res Rev.*, 3(4), 369-382.
- Williamson L.L., Chao A., Bilbo S.D.. *Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus.* 2012, *Brain Behav. Immun.* 26, 500-510.
- Wong D.F., Wanger H.N., Dannals R.F., Links J.M., Frost J.J., Ravery H.T., Wilson A.A., Rosenbaum A.E., Gjedde A., Douglass K.H., Petronis J.D., Folstein M.F., Toung J.K.T., Burns H.D., Kuhnar M.J. *Effects of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain.* 1984. *Science.* 266; 1393-1396.
- Wood D.A., Buse J.E., Wellman C.L., Rebec G.V.. *Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell.* 2005, *Brain Res.*, 1042(2), 176-183.

- Xu W., Yu J.T., Tan M.S., Tan L.. *Cognitive reserve and Alzheimer's disease*. 2015, Mol Neurobiol., 51 (1), 187-208.
- Young D., Lawlor P.A., Leone P., Dragunow M., During M.J... *Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis prevents seizures and is neuroprotective*. 1999, Nature Med. 5, 448–453.
- Zappettini S., Grilli, M., Olivero G., Chen J., Padolecchia C., Pittaluga A., Tomé A.R., Cunha R.A., Marchi, M.. *Nicotinic $\alpha 7$ receptor activation selectively potentiates the function of NMDA receptors in glutamatergic terminals of the nucleus accumbens*. 2014, Front Cell Neurosci., 8, 332.
- Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A.. *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. 2005. Blood 106, 1755-1761.
- Zhang X., Liu T., Zhou Z., Mu X., Song C., Xiao T., Zhao M., Zhao C., *Enriched environment altered aberrant hippocampal neurogenesis and improved long-term consequences after temporal lobe epilepsy in adult rats*. 2015, J. Mol. Neurosci. 56, 409-421.
- Zucchini S., Pittaluga A., Summa M., Brocca-Cofano E., Fabris M., De Michele R., Bonaccorsi A., Buratto G., Barbanti-Brodano G., Altavilla G., Verlengia G., Cifelli P., Caputo A., Simonato M.. *Seizure susceptibility in tat-transgenic mice: implications for the role of tat in human immunodeficiency virus type 1 associated encephalopathy*. 2013, Neurobiol Dis , 62, 354-349.

ABBREVIAZIONI

[3H]-NA: [3H]-Noradrenalina

5-HT: Serotonina

AD: Malattia di Alzheimer

AMPA: Acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AOAA: Acido amminoossacetico

BEE: Barriera emato-encefalica

cAMP: Adenosina monofosfato ciclico

CC: Corpo Calloso

CD: Cluster di differenziazione

CFA: Adjuvante Completo di Freund

CREB: Proteina attivata da cAMP

CSF: Liquido Cerebrospinale

d.p.i.: Giorno dall'immunizzazione, dall'inglese Day post immunization

DA: Dark Argouti

DMI: Desipramina

DNA: Acido desossiribonucleico

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EE: Arricchimento Ambientale dall'inglese Enriched Environment

EPSPs: Potenziale eccitatorio post sinaptico

GABA: Acido Gamma-amminobutirrico

GAD: Decarbossilasi dell'acido Glutammico

GAT: Trasportatore del GABA

GBR12909: 1-(2-[bis(4-Fluorofenil)metossi]etil)-4-(3-enilpropil)piperazin diidrocloreto

H/E: Eosina-Ematossilina

HLA: Antigene Leucocitario Umano

HTLV-1: Virus della leucemia a cellule T tipo I

IFA: Adjuvante Incompleto di Freund

IL: Interleuchina

IMSC: Consorzio Internazionale della Sclerosi Multipla

LC: Locus Coeruleus

LFB: Luxol Fast Blue

LPC: Lisofosfatidilcolina

LTD: Depressione a lungo-termine

LTP: Potenziale a lungo-termine

MAPK: Proteina chinasi attivata da mitogeni

MBP: Proteina Basica della Mielina

MHC: Complesso Maggiore d'Istocompatibilità

MOG: Glicoproteina Associata alla Mielina Oligodendrocitaria

MUNC18: Mammalian uncoordinated 18

NMDA: Acido N-metil D-aspartato

NORB: Neurite Ottica RetroBulbare

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità

PKA: Proteina Chinasi A

PLP: Proteina Proteolipidica

PTX: Tossina della Pertosse

RGS1: Regolatore del segnale della proteina G

RMN: Risonanza Magnetica Nucleare

RNA: Acido RiboNucleico

SAMP-8: Prone-8 Accelerated Senescence Mouse

SFV: Virus della foresta Semliki

SM: Sclerosi Multipla

SNAP25: Proteina 25 associata ai sinaptosomi

SNARE: Complesso recettoriale di proteine solubili al NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion)

SNC: Sistema Nervoso Centrale

SNP: Polimorfismo a Singolo Nucleotide

STAT3: Segnale di trasduzione ed attivatore trascrizione 3

SVZ: Zona Sub Ventricolare

TMEV: Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus

vGAT: Trasportatore Vescicolare del GABA

vGLUT: Trasportatore Vescicolare del glutammato

ADDENDUM

• Bossi S., Musante I., **Bonfiglio T.**, Bonifacino T., Emionite L., Cerminara M., Cervetto C., Marcoli M., Bonanno G., Ravazzolo R., Pittaluga A., Puliti A. *Genetic inactivation of mGlu5 receptor improves motor coordination in the Grm1crv4 mouse model of SCAR13 ataxia.* 2017 Oct 2 Neurobiol Dis.;109(Pt A):44-53.

• Olivero G., **Bonfiglio T.**, Vergassola M., Usai C., Riozzi B., Battaglia G., Nicoletti F., Pittaluga A. *Immuno-pharmacological characterization of group II metabotropic glutamate receptors controlling glutamate exocytosis in mouse cortex and spinal cord.* 2017 Oct 1, Br J Pharmacol.

• **Bonfiglio T.**, Olivero G., Merega E., Di Prisco S., Padolecchia C., Grilli M., Milanese M., Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Bonanno G., Marchi M., Pittaluga A. *Prophylactic versus Therapeutic Fingolimod: Restoration of Presynaptic Defects in Mice Suffering from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.* 2017 Jan 26 PLoS One.;12(1):e0170825.

• Di Prisco S., Olivero G., Merega E., **Bonfiglio T.**, Marchi M., Pittaluga A. *CXCR4 and NMDA Receptors Are Functionally Coupled in Rat Hippocampal Noradrenergic and Glutamatergic Nerve Endings* 2016 Dec J Neuroimmune Pharmacol.;11(4):645-656.

• Brindisi M., Maramai S., Gemma S., Brogi S., Grillo A., Di Cesare Mannelli L., Gabellieri E., Lamponi S., Saponara S., Gorelli B., Tedesco D., **Bonfiglio T.**, Landry C., Jung K.M., Armirotti A., Luongo L., Ligresti A., Piscitelli F., Bertucci C., Dehouck M.P., Campiani G., Maione S., Ghelardini C., Pittaluga A., Piomelli D., Di Marzo V., Butini S. *Development and Pharmacological Characterization of Selective Blockers of 2-Arachidonoyl Glycerol Degradation with Efficacy in Rodent Models of Multiple Sclerosis and Pain.* 2016 Mar 24 J Med Chem.;59(6):2612-32.

• Di Prisco S., Merega E., **Bonfiglio T.**, Olivero G., Cervetto C., Grilli M., Usai C., Marchi M., Pittaluga A. *Presynaptic, release-regulating mGlu2 -preferring and mGlu3 -preferring autoreceptors in CNS: pharmacological profiles and functional roles in demyelinating disease.* 2016 May, Br J Pharmacol.;173(9):1465-77.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Professoressa Gheraldini Carla e il Dottor Di Cesare Mannelli Lorenzo per le immagini inerenti i dati immunohistologici (Fig.4).

Inoltre ringrazio il Dottor Feligioni Marco per l'immagine dei Western Blot (Fig.7).