



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXIII

TITOLO TESI

EFFETTI FARMACOLOGICI E NEUROTOSSICI SULLA
TRASMISSIONE DOPAMINERGICA E NORADRENERGICA IN
MODELLI ANIMALI DI ADHD E PARKINSON

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO14

Presentata da:	Dott Ibba Marcello.
Coordinatore Dottorato	Prof. Gaetano DiChiara
Relatore	Prof. Carboni Ezio

Esame finale anno accademico 2009 – 2010

PREFAZIONE

L'attività di ricerca svolta durante questo corso di studio a cui questo elaborato e le pubblicazioni allegate si riferiscono ha avuto come oggetto l'effetto di farmaci sulla trasmissione dopaminergica e noradrenergica nel cervello di ratto e di topo. I risultati dell'attività di ricerca sono il frutto di tre linee di ricerca.

La prima ha riguardato gli effetti dello stress prenatale, valutati mediante la modificazione della trasmissione dopaminergica e noradrenergica basale e stimolata nella corteccia prefrontale di ratti nati da madri esposte a immobilizzazione nell'ultima settimana di gravidanza. In particolare è stata studiata la modificazione della risposta all'amfetamina e alla nicotina sulla trasmissione catecolaminergica nella corteccia prefrontale di ratti adolescenti e adulti allo scopo di valutare se lo stress prenatale possa essere considerato un fattore di rischio per lo sviluppo di disturbi mentali quali depressione e schizofrenia o per lo sviluppo di una maggiore vulnerabilità alle sostanze d'abuso. Questo studio effettuato nei nostri laboratori con la collaborazione della ricercatrice Virginia Barros del gruppo della prof. Antonelli dell'Università di Buenos Aires è stato recentemente pubblicato (Carboni et al. 2010) e viene allegato a questo elaborato.

La seconda linea di ricerca ha riguardato la valutazione degli effetti di farmaci utilizzati nella terapia del deficit d'attenzione con iperattività (ADHD) nel ratto allo scopo di mettere in evidenza modificazioni della trasmissione dopaminergica e noradrenergica nella corteccia prefrontale indotte dal trattamento acuto e cronico con il metilfenidato e l'atomoxetina, i due farmaci più utilizzati nella terapia dell'ADHD. Questi risultati possono fornire utili informazioni alla comprensione dei rischi a lungo termine a cui possono andare incontro i bambini affetti da ADHD che seguono una terapia con i suddetti farmaci. Tali rischi sono difficili da valutare in quanto l'intervento terapeutico si inserisce in un periodo particolarmente delicato per la

maturazione del cervello del bambino e per lo sviluppo della personalità. In particolare l'emersione della personalità è il frutto di processi predeterminati geneticamente, su cui però gli stimoli ambientali hanno un ruolo determinante ma non meno importante in questo processo potrebbe essere l'effetto dei farmaci assunti nell'infanzia. Visto il ruolo che la corteccia prefrontale riveste nell'assunzione della personalità adulta e visto l'importante ruolo che la trasmissione dopaminergica e noradrenergica rivestono nelle funzioni della corteccia prefrontale, questa ricerca ha voluto affrontare lo studio dell'effetto dei farmaci utilizzati nella terapia dell'ADHD proprio perché essi agiscono sulla trasmissione dopaminergica e noradrenergica e vengono assunti nel periodo preadolescenziale.

Questa ricerca ha portato a investigare gli effetti del trattamento acuto e cronico con metilfenidato e atomoxetina sul comportamento e sui livelli extracellulari di dopamina e noradrenalina utilizzando due modelli animali di ADHD, i ratti SHR (Spontaneous Hypertensive Rats) e quelli NHE (Naples High Excitability). I risultati ottenuti dagli studi sui ratti NHE, effettuati in collaborazione con il Prof. Sadile dell'Università di Napoli sono stati recentemente pubblicati in un lavoro che viene allegato al presente elaborato (Ruocco et al., 2010). Sui ratti SHR è stato inoltre studiato l'effetto sulla modificazione dell'espressione del BDNF in diverse aree cerebrali in collaborazione con il gruppo del Prof. Riva dell'Università di Milano e i risultati sono stati pubblicati in un recente lavoro che viene allegato al presente elaborato (Fumagalli et al., 2010). Lo scopo della ricerca e i dati presentati in questo elaborato si riferiscono a risultati non ancora pubblicati, fatta eccezione per quelli pubblicati preliminarmente come "proceedings" e allegati al presente elaborato (Ibba and Carboni, 2010; Ibba et al., 2010).

La terza linea di ricerca, attuata in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Carta, è stata incentrata sullo studio delle capacità neuro-protettive del rosiglitazone, un agonista dei recettori PPAR- γ , in un modello animale di Parkinson's disease, ottenuto mediante la somministrazione cronica di 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) nel topo. I risultati ottenuti possono

contribuire a sostenere una sperimentazione clinica per verificare la capacità neuro-protettiva in pazienti affetti da Parkinson's disease. Questi risultati sono raccolti in due lavori pubblicati nel 2009 allegati al presente elaborato: Schintu et al. 2009a e Schintu et al. 2009 b.

In questo elaborato verranno riassunte in modo sintetico le caratteristiche anatomiche e funzionali della trasmissione dopaminergica e noradrenergica nella corteccia prefrontale e le modificazioni a cui vanno incontro durante la maturazione pre-adolescenziale e adolescenziale. Verranno inoltre riassunte alcune conoscenze basilari sull'ADHD, sui farmaci utilizzati nella terapia di questo disturbo, sulla malattia di Parkinson e sul modello animale utilizzato. Infine la presentazione e discussione dei risultati sarà preceduta dalla descrizione dei metodi utilizzati.

Indice

1. Introduzione	
1. Introduzione	
1.1 Trasmissione Catecolaminergica	<i>pag 8</i>
a. Sistema Noradrenergico	<i>pag 12</i>
b. Sistema Dopaminergico	<i>pag 14</i>
c. Funzioni della Corteccia Prefrontale e del nucleo accumbens	<i>pag 17</i>
1.2 Disturbo da deficit di attenzione e iperattività	<i>pag 21</i>
Farmaci	
a. Amfetamina	<i>pag 25</i>
b. Metilfenidato	<i>pag 28</i>
c. Atomoxetina	<i>pag 32</i>
1.3 Sistema dopaminergico nella malattia di Parkinson, e modelli animali.	
Sostanze neurotossiche: MPTP	<i>Pag 33</i>
2. Modelli animali	<i>pag. 36</i>
2.1 SHR (<i>spontaneously hypertensive rats</i>)	<i>pag36</i>
2.2 SD (<i>Sprague-Dawley</i>)	<i>pag 36</i>
2.3 NHE (Naples high-excitability)	<i>pag 38</i>
3. Materiali e metodi	<i>pag 40</i>
3.1 Microdialisi cerebrale	<i>pag 41</i>
3.2 Motilità	<i>pag 46</i>
3.3 Analisi dei neurotrasmettitori tramite HPLC	<i>pag 48</i>
4. Scopo della ricerca	<i>pag 49</i>

5. Grafici e legende	<i>pag 54</i>
6. Discussione e conclusioni	<i>pag 67</i>
7. Bibliografia	<i>pag 80</i>

9. Pubblicazioni

- 9.1 Schintu N, Frau L, **Ibba M**, Caboni P, Garau A, Carboni E, Carta AR (2009). PPAR γ -MEDIATED NEUROPROTECTION IN A CHRONIC MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE. *European Journal of Neuroscience* 2009, Vol. 29 (5) pp 954-963.
- 9.2 Schintu N, Frau L, **Ibba M**, Garau A, Carboni E, Carta AR (2009). PROGRESSIVE DOPAMINERGIC DEGENERATION IN THE CHRONIC MPTPP MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE. *Neurotoxicity Research*. 2009 Aug; Vol. 16(2), pp: 127-39.
- 9.3 Ruocco LA, Carnevale UA, Treno C, Sadile AG, Melisi D, Arra C, **Ibba M**, Schirru C, Carboni E.(2010). PREPUBERAL SUBCHRONIC METHYLPHENIDATE AND ATOMOXETINE INDUCE DIFFERENT LONG-TERM EFFECTS ON ADULT BEHAVIOUR AND FOREBRAIN DOPAMINE, NOREPINEPHRINE AND SEROTONIN IN NAPLES HIGH-EXCITABILITY RATS.. *Behavioral Brain Research*. Vol 210, pp. 99-106, 2010 Feb 12.
- 9.4 Carboni E, Barros VG, **Ibba M**, Silvagni A, Mura C, Antonelli MC (2010). PRENATAL RESTRAINT STRESS: AN IN VIVO MICRODIALYSIS STUDY ON CATECHOLAMINE RELEASE IN THE RAT PREFRONTAL CORTEX. *Neuroscience*. Vol. 168 pp 156-166. ISBN 0306-4522/10
- 9.5 Fumagalli F, Cattaneo A, Caffino L, **Ibba M**, Racagni G, Carboni E, Gennarelli M, Riva MA (2010) SUB-CHRONIC EXPOSURE TO ATOMOXETINE UP-REGULATES BDNF EXPRESSION AND SIGNALLING IN THE BRAIN OF ADOLESCENT SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS: COMPARISON WITH METHYLPHENIDATE. *Pharmacol Res*. 2010 Aug 5. Vol. 62, pp.523-529
- 9.6 **Ibba Marcello** and Carboni Ezio. (2010)
EFFECTS OF SUB-CHRONIC METHYLPHENIDATE AND ATOMOXETINE ON NORADRENALINE AND DOPAMINE TRANSMISSION IN THE PREFRONTAL CORTEX OF ADOLESCENT SH RATS, AN ANIMAL MODEL OF ADHD. *Monitoring Molecules in Neuroscience*, Westerink B, Clinckers R, Smolders I, Sarre S, Michotte Y Eds, Vrije Universiteit Press, Brussel Belgium pp 108-110. ISBN/EAN 978-90-90255672-2
- 9.6 **Ibba Marcello**, Simola Nicola, Cosseddu Susanna, Carboni Ezio (2010)
GENDER SPECIFIC REDUCTION OF HYPERMOTILITY BY SUB-CHRONIC METHYLPHENIDATE OR ATOMOXETINE IN SH RATS, AN ANIMAL MODEL OF ADHD. *Monitoring Molecules in Neuroscience*, Westerink B, Clinckers R, Smolders I, Sarre S, Michotte Y Eds, Vrije Universiteit Press, Brussel Belgium pp 498-500. ISBN/EAN 978-90-90255672-2

INTRODUZIONE

SISTEMA CATECOLAMINERGICO

L'encefalo presenta numerosi sistemi neuronali separati anatomicamente, con ruoli funzionali distinti all'interno delle rispettive zone di innervazione, che utilizzano tre diverse catecolamine: la Dopamina, la Noradrenalina e l'Adrenalina.

La sintesi delle catecolamine segue una via enzimatica comune che vede la Tirosina come capostipite che attraverso la Tirosina-idrossilasi viene metabolizzata in L-DOPA. Quest'ultima viene rapidamente convertita in Dopamina attraverso una decarbossilazione che vede implicato il piridossal-fosfato. La catecolamina così sintetizzata viene trasportata nelle vescicole di immagazzinamento attraverso il VMAT-2.

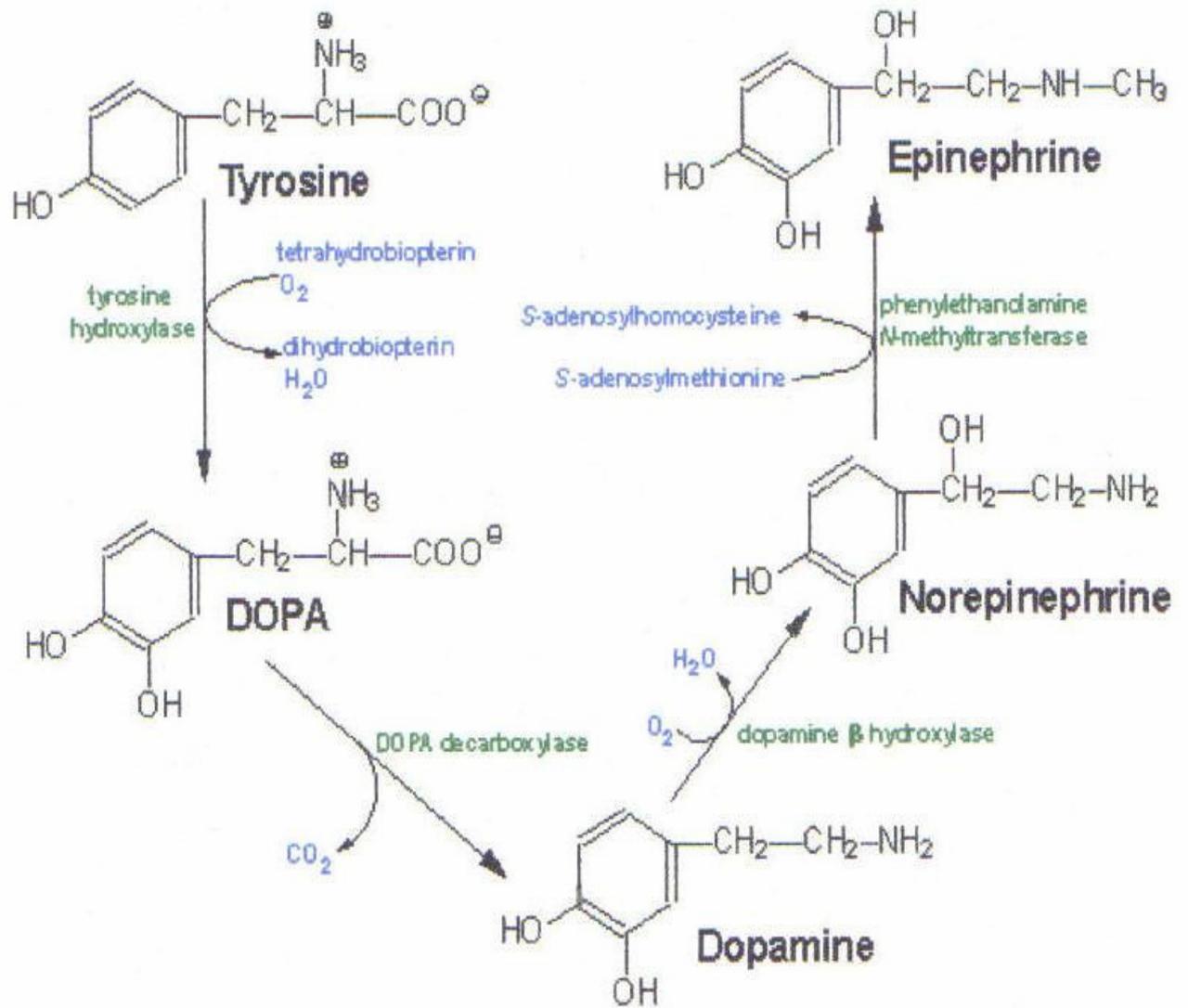
Ad opera di una β -idrossilasi, la dopamina nel neurone Noradrenergico viene metabolizzata in Noradrenalina attraverso una idrossilazione in posizione β e di seguito rimane immagazzinata nelle vescicole sino a liberazione isocitotica a seguito di un potenziale d'azione. Nella midollare del surrene la Noradrenalina attraverso una N-metil transferasi viene metabolizzata ad Adrenalina.

Il potenziale d'azione generato da uno stimolo, determina una depolarizzazione della membrana con conseguente rilascio di Ca^{2+} e liberazione dei neurotrasmettitori dalle vescicole mediante la fusione delle stesse con la membrana assonale. A questo punto i neurotrasmettitori agiscono a livello post-sinaptico legandosi a recettori specifici che mediano la risposta biologica. Quest'ultima cessa attraverso la ricaptazione ad opera delle terminazioni presinaptiche mediante dei trasportatori di membrana; attraverso la

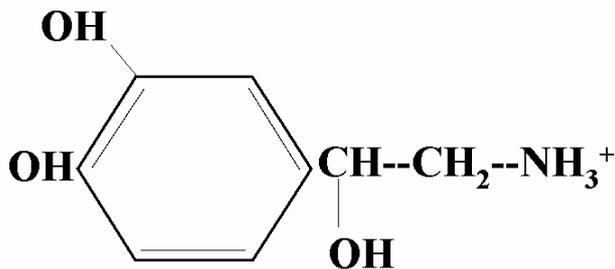
metabolizzazione delle catecolamine oppure mediante la diluizione per diffusione verso le zone extragiuugionali e eventuale ricaptazione in questi siti.

La ricaptazione avviene tramite dei trasportatori di membrana specifici per il proprio neurotrasmettitore; il DAT per la dopamina ed il NET per la noradrenalina. Tuttavia bisogna specificare che il NET presenta un'affinità per la dopamina quattro volte superiore rispetto alla noradrenalina, fatto questo che determina nella corteccia prefrontale un aumento della concentrazione extracellulare della dopamina in animali da esperimento che sono trattati con farmaci che selettivamente bloccano il NET (Carboni et al., 1990).

La trasformazione metabolica è mediata da due principali famiglie di enzimi: le MAO (monoamino ossidasi) e le COMT (catecol-o-metil transferasi). Queste ultime agiscono a livello post-sinaptico mentre le MAO possono a loro volta essere distinte in due sottogruppi quali MAO-A ubiquitarie e le MAO-B prevalentemente neuronali; entrambe svolgono la loro azione all'interno del neurone, nella superficie esterna dei mitocondri. Le catecolamine vengono ossidate attraverso le MAO in 3,4-di-idrossifenil-glicolaldeide (DOPGAL), ridotte successivamente a 3,4-di-idrossifeniletilenglicole (DOPEG) o ossidate ad acido 3,4-di-idrossimandelico (DOMA). Alternativamente possono essere inizialmente mutilate ad opera delle COMT a normetanefrina e metanefrina. I prodotti di reazione sono metabolizzati da altri enzimi a formare il 3-metossi-4-idrossifeniletilenglicole (MHPG) e l'acido 4-idrossimandelico (VMA).



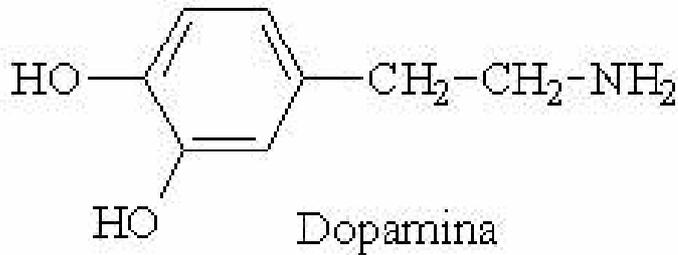
SISTEMA NORADRENERGICO



La sintesi della Noradrenalina avviene ad opera di una β -idrossilasi che idrossila la dopamina in posizione β . La noradrenalina è il principale neurotrasmettitore della sezione ortosimpatica del Sistema Nervoso Autonomo. In seguito ad una stimolazione nervosa il neurotrasmettitore viene liberato nello spazio sinaptico dove a livello post-sinaptico agisce su specifici recettori α e β ; i quali si suddividono in recettori α_1 e α_2 e in recettori β_1 , β_2 e β_3 . I primi sono recettori prevalentemente postsinaptici a carattere eccitatorio, mentre quelli di tipo α_2 sono auto recettori quindi localizzati a livello presinaptico e sono prevalentemente di tipo inibitorio. I recettori β invece si trovano prevalentemente a livello periferico e come per i recettori α sono accoppiati a proteina G di tipo eccitatorio mediando l'attivazione dell'adenilato ciclasi. Superata la fase liberatoria e d'azione della catecolamina sui recettori affini, essa viene ricaptata da trasportatori specifici di membrana quali il NET o degradata da specifici enzimi MAO e COMT. La noradrenalina è distribuita in aree specifiche del cervello: *Locus coeruleus*, costituito da neuroni che proiettano nella Corteccia, nel talamo, nell'ippocampo, nel tronco encefalico, nel cervelletto e nel sistema spinale; *Sistema*

tegmentale laterale, i cui neuroni del nucleo del tratto solitario, del segmentale laterale e del dorsale del vago innervano l'amigdala, il bulbo olfattorio e il midollo spinale.

SISTEMA DOPAMINERGICO



La dopamina è un neurotrasmettitore il cui precursore, la Tirosina, viene idrossilata da una Tirosina idrossilasi a L-Dopa. Quest'ultima viene a sua volta, mediante una decarbossilasi, metabolizzata a Dopamina. Il sistema dopaminergico svolge le sue funzioni attraverso l'interazione con specifici recettori dopaminergici che possono essere divisi in 2 famiglie principali: recettori D_1 e D_5 e recettori D_2 , D_3 e D_4 . I primi sono recettori associati a proteina G di tipo stimolatorio, determinando la stimolazione dell'AMP ciclico con formazione di secondi messaggeri e sono localizzati prevalentemente nel Caudato-Putamen, nel nucleo Accumbens e nel Tubercolo Olfattorio mentre presentano una ridotta espressione a livello della corteccia cerebrale. Inoltre si distinguono in recettori presinaptici e postsinaptici; i primi localizzati su terminazioni non dopaminergiche provenienti dal caudato che terminano nella sostanza nera; e i secondi localizzati in aree in cui proiettano le terminazioni dopaminergiche e modulano negativamente il potenziale d'azione. I recettori D_5 sono anch'essi accoppiati a proteina G e sono localizzati a livello dei nuclei mammillari laterali, nei nuclei del talamo e dell'ippocampo. Per quanto riguarda i recettori D_2 , D_3 e

D₄ sono recettori accoppiati a proteina di tipo G inibitorio. I primi sono localizzati nello Striato (regolando la via diretta), nella pars compacta della sostanza nigra, nel nucleo accumbens e nell'area ventrotegmentale. Anche per questa famiglia si possono distinguere recettori di tipo presinaptico che possono essere sia auto recettori che etero recettori, infatti il legame della dopamina con tali recettori determinano inibizione con meccanismo a feed back negativo del rilascio di neurotrasmettitore e recettori somato-dendritici. I recettori D₂ sono presenti a livello dell'ipofisi, dove mediano un'azione inibente sul rilascio di prolattina e nell'arena CTZ dove mediano un'azione emetica. I recettori D₃ sono principalmente localizzati principalmente a livello del nucleo accumbens e nel bed nucleus, mentre i recettori D₄ sono localizzati a livello della corteccia prefrontale.

A livello del sistema nervoso centrale possiamo distinguere due principali sistemi dopaminergici: *sistema dopaminergico a lunghezza intermedio o di proiezione* che a sua volta si divide in tre sistemi: *sistema mesocorticale* i cui neuroni originano dall'area ventrotegmentale o A10 e dalla A9 e proiettano nell'amigdala, nell'ippocampo, nella corteccia prefrontale e nel nucleo laterale del setto; *sistema mesolimbico* i cui neuroni si localizzano nell'area A10 e terminano nell'amigdala, nella corteccia olfattoria e nella shell dell'accumbens; *sistema nigrostriatale* che ha origine nell'area A9 e termina al corpo striato. Infine il *sistema dopaminergico a breve trasmissione* principalmente costituito dal sistema tuber ipofisario e tuber infundibolare, i cui neuroni sono situati a livello ipotalamico, nei nuclei arcuato e periarcuato che proiettano nell'ipofisi posteriore e nell'eminenza mediana.

FUNZIONI DELLE AREE INTERESSATE

NUCLEO ACCUMBENS

Il nucleo accumbens appartiene allo striato ventrale e riceve importanti informazioni limbiche che sono elaborate e convertite nella elaborazione delle attività motivate, grazie alle connessioni con il sistema extrapiramidale motorio. Il nucleo accumbens è infatti a metà strada tra il sistema extrapiramidale e il sistema limbico. Non si presenta omogeneo, ma costituito da due aree a carattere anatomico e funzionale differente, la *shell* e il *core*. La *shell*, che occupa una posizione ventromediale, può essere considerata una struttura a carattere limbico, costituendo assieme al nucleo del letto della stria terminalis e al nucleo dell'amigdala la cosiddetta *amigdala estesa*. In particolare la *shell* sarebbe l'area direttamente coinvolta nei meccanismi di gratificazione naturale e di quelli stimolati artificialmente mediante la somministrazione di sostanze d'abuso. Il *core* occupa una posizione dorsolaterale e può essere considerato come continuazione del caudato dorsale, intimamente connesso allo striato dorsale e ai circuiti motori neuronali e quindi coinvolto in funzione motorie extrapiramidali. (Bear, Connors, Paradiso : Neuroscienze, Masson 2001; Goodman and Gilman : Le basi Farmacologiche della terapia 11ed McGraw-Hill; Kendel R, Schwartz M., Jessel M., Mc Craw-Hill; Paoletti R.,Nicosia S.,Clementi F., Fumagalli G., Neurofarmacologia UTET).

Le differenti funzioni svolte dalle due subregioni del nucleo accumbens possono essere correlate alla diversità nelle connessioni afferenti e efferenti. Il nucleo accumbens riceve afferenze da strutture del cervello anteriore (tra cui la corteccia prefrontale, l'amigdala, l'ippocampo ed il talamo), come pure dall'area mesopontina (tra cui il VTA, il raphe dorsale e la formazione reticolare mesopontina). In particolare modo le aree subcorticali afferenti al *core* includono il nucleo talamico mediano ed intralaminare, l'amigdala basolaterale, il globo pallido (rosto mediale e ventrale), il nucleo subtalamico e i gruppi di cellule mesencefaliche. La *shell* riceve afferenze dalle stesse aree citate per il *core* (con l'eccezione del nucleo subtalamico e del globo pallido) ed inoltre da estesi gruppi di cellule subcorticali facenti parte del nucleo del letto della stria terminalis, dell'area preottica, della substantia innominata, dell'ipotalamo laterale, del nucleo mediale dell'amigdala, della formazione reticolare, della regione peribrachiale, della sostanza grigia periacqueduttale, del nucleo del tratto solitario e del midollo spinale. (Bear, Connors, Paradiso : Neuroscienze, Masson 2001; Goodman and Gilman : Le basi Farmacologiche della terapia 11ed McGraw-Hill; Kendel R, Schwartz M., Jessel M., McGraw-Hill; Paoletti R., Nicosia S., Clementi F., Fumagalli G., Neurofarmacologia UTET).

La *shell* manda proiezioni efferenti alla parte ventromediale del pallido ventrale, all'amigdala estesa (includente il nucleo basale della stria terminalis, il nucleo amigdaloido centrale, interconnessioni all'area sublenticolare), all'area preottica laterale, all'ipotalamo laterale, al nucleo entopeduncolare, alla parte laterale del VTA, alla substantia nigra mediodorsale (pars compacta), alla formazione reticolare

mesopontina e alla via periacqueduttale. Il *core* manda fundamentalmente proiezioni efferenti alla parte dorsolaterale del pallido ventrale, al nucleo entopeduncolare, alla parte laterale del VTA e alla substantia nigra. (Bear, Connors, Paradiso : Neuroscienze, Masson 2001; Goodman and Gilman : Le basi Farmacologiche della terapia 11ed McGraw-Hill; Kendel R, Schwartz M., Jessel M., Mc Craw-Hill; Paoletti R.,Nicosia S.,Clementi F., Fumagalli G., Neurofarmacologia UTET).

Questa eterogeneità del nucleo accumbens è particolarmente importante nel meccanismo d'azione dei farmaci d'abuso. La *shell* sarebbe quindi coinvolta nell'integrazione e nell'espressione delle emozioni, in virtù delle estese connessioni con il nucleo amigdaloido, l'ipotalamo laterale e la sostanza grigia periacqueduttale, mentre il *core*, date le estese analogie con il corpo striato, avrebbe una maggiore importanza per le funzioni somatomotorie. (Bear, Connors, Paradiso : Neuroscienze, Masson 2001; Goodman and Gilman : Le basi Farmacologiche della terapia 11ed McGraw-Hill; Kendel R, Schwartz M., Jessel M., Mc Craw-Hill; Paoletti R.,Nicosia S.,Clementi F., Fumagalli G., Neurofarmacologia UTET).

LA CORTECCIA PREFRONTALE

Il telencefalo è costituito da due emisferi cerebrali, la cui superficie a sua volta è costituita dalla corteccia cerebrale. La corteccia Prefrontale è un'area associativa, che occupa tutta la parte anteriore della faccia laterale e mediale del lobo frontale, collegata con le restanti parti dell'emisfero il cui compito è legato a funzioni intellettive

complesse ed elevate. La corteccia prefrontale riceve numerose afferenze tra cui fibre dal nucleo dorso-mediale del talamo che invia impulsi di origine viscerale e somatici che determinano un “tono affettivo” che porta l’individuo allo sviluppo di comportamenti sociali quali ottimismo/pessimismo, felicità/ tristezza. Inoltre la corteccia prefrontale guida i comportamenti e l’attenzione attraverso la memoria di lavoro. Questi processi sono alla base delle funzioni esecutive che includono: controllo dell’attenzione, pianificazione, controllo degli impulsi, flessibilità mentale, iniziazione e monitoraggio delle azioni. Le lesioni a tale livello determinano alterazioni quali distrazione, impulsività, disorganizzazione; mentre lesioni a carico della porzione ventromediale della corteccia prefrontale possono causare indebolimento della regolazione delle emozioni e può oltremodo determinare comportamenti inappropriati come aggressività. Lesioni a carico della porzione dorso laterale indeboliscono la capacità attentiva su obiettivi diversi. Inoltre la corteccia prefrontale è un’area importante nella regolazione del comportamento e in particolare dei comportamenti che sono finalizzati tramite l’attività motoria. A tal riguardo è interessante notare che l’iperattività osservata nei pazienti con ADHD potrebbe essere ricondotta a disfunzioni a livello della Corteccia Prefrontale. (Bear, Connors, Paradiso : Neuroscienze, Masson 2001; Goodman and Gilman : Le basi Farmacologiche della terapia 11ed McGraw-Hill; Kendel R, Schwartz M., Jessel M., Mc Craw-Hill; Paoletti R.,Nicosia S.,Clementi F., Fumagalli G., Neurofarmacologia UTET).

DISTURBO DA DEFICIT D'ATTENZIONE E IPERATTIVITA'

L'ADHD è un disturbo comportamentale dell'infanzia (Barkley, 1998) i cui sintomi comprendono: disturbi dell'attenzione e concentrazione, impulsività e iperattività (Oades, 1998). E' un disturbo diagnosticato in entrambi i sessi, con prevalenza sul sesso maschile. Questo disturbo ha un impatto sociale ed economico elevato con ricadute in particolare per le famiglie e per le strutture scolastiche. Nel bambino questo disturbo può determinare una limitata autostima, problemi emotivi e di relazione con i coetanei e in particolare il rendimento scolastico potrebbe essere seriamente pregiudicato. La loro impulsività può essere causa di incidenti e disturbi di integrazione sociale, mentre la loro iperattività, che si manifesta prevalentemente con irrequietezza ed eloquio esagerato, è scarsamente tollerata socialmente e oltremodo è motivo di frustrazione nei genitori che difficilmente riescono a contenerli. Durante la fase adolescenziale tali sintomi potrebbero regredire; ma gli adolescenti con ADHD presentano un alto rischio di scarsa autostima, difficoltà di relazione, rapporto conflittuale con i genitori, delinquenza, fumo e abuso di sostanze (Barkley, 1998).

La validità della diagnosi di ADHD è stata fonte di molte diatribe nel campo scientifico; dovuto all'estrema variabilità individuale; pertanto sono state mosse numerose critiche sulla facilità di diagnosi di disturbo da iperattività in bambini "normalmente" esuberanti e vivaci che venivano così etichettati come mentalmente disturbati e di conseguenza sottoposti ad inappropriati trattamenti farmacologici. Poiché l'ADHD è una condizione molto complessa e variabile dal punto di vista

sintomatologico, il suo trattamento necessita dell'intervento multidisciplinare di specialisti, con la collaborazione tra pediatra, genitori ed insegnanti guidati da neuropsichiatri, psicologi esperti. Nonostante i progressi fatti nella valutazione e nel trattamento dei pazienti affetti da tale disturbo, rimane in parte controversa la diagnosi. A tale proposito, l'American Academy of Pediatrics e l'American Psychiatric Association hanno sviluppato apposite linee guida per la diagnosi del disturbo; su tali guide possiamo identificare tre sottotipi di ADHD: di tipo "prevalentemente da carenza di attenzione" con sintomi di distrazione ma non di iperattività/impulsività; di tipo "prevalentemente iperattivo/impulsivo" con sintomi di iperattività/impulsività ma non di distrazione; di tipo "combinato" con sintomi di disattenzione e di iperattività/impulsività. La complessità clinica riflette un altrettanto eterogenea patofisiologia; processi ambientali possono modificare specifiche componenti delle funzioni cerebrali in specifici periodi di sviluppo e determinare manifestazioni cliniche molto variabili. Nonostante l'eziologia della patologia resti sconosciuta, le moderne tecniche di ricerca hanno largamente espanso le conoscenze riguardo questo disturbo relativamente comune. Alterazioni del sistema noradrenergico e dopaminergico sarebbero alla base dell'insorgenza e della manifestazione della sintomatologia dell'ADHD. Esistono differenti ipotesi sull'eziologia dell'insorgenza del deficit:

- Ipotesi catecolaminergica
- Ipotesi genetica
- Ipotesi ambientale/tossicologica

IPOTESI CATECOLAMINERGICA

I farmaci utilizzati nel trattamento dell'ADHD agiscono sul sistema noradrenergico e dopaminergico bloccando il reuptake di dopamina e noradrenalina nei neuroni presinaptici e aumentano il rilascio di monoamine nello spazio extracellulare. Queste attivano i recettori presinaptici inibitori e determinano una riduzione del tono noradrenergico e dopaminergico (Solanto M., 1990). Il massimo effetto terapeutico si ha durante la fase di assorbimento entro due ore dalla somministrazione del farmaco. Questo si spiega ipotizzando che l'alterazione della trasmissione monoaminergica causata dal farmaco, in determinate aree cerebrali possa essere alla base dell'azione terapeutica. Questi farmaci aumentano il tono inibitorio della corteccia prefrontale sulle strutture subcorticali (Solanto, 1990). Alcuni studiosi (Satterfield et al. 1971) furono i primi ad ipotizzare che i sintomi di tale patologia fossero dovuti ad una disfunzione a carico dell'area frontolimbica, ossia ad un'alterazione nel controllo inibitorio della corteccia frontale sulle aree limbiche. Nel 1999 Dougherty et al. con l'utilizzo di tecniche tomografiche atte a misurare la densità del DAT dimostrarono una elevata concentrazione di tale trasportatore in circa il 70% dei pazienti affetti da ADHD.

IPOTESI GENETICA

Un ulteriore sostegno all'ipotesi che il sistema catecolaminergico giochi un ruolo determinante della patofisiologia dell'ADHD è stato ottenuto mediante studi genetici , che hanno messo in evidenza l'implicazione dei geni che codificano per il DAT (Cook et al., 1995) e per il recettore D₄ (Swanson et al., 1998). Il recettore D₄ alterato è considerato meno sensibile alla dopamina e meno efficace rispetto agli altri recettori D₄ nella trasduzione del segnale come inibitore dell'adenilato ciclasi. Per ciò che concerne le alterazioni a carico del DAT, alcuni studiosi hanno dimostrato il polimorfismo di tale neuro trasportatore e tale alterazione consisterebbe in una maggiore efficienza nel trasportare la dopamina all'interno della terminazione nervosa.

IPOTESI TOSSICOLOGICA E AMBIENTALE

Resta da valutare l'ipotesi tossicologia ambientale che non da meno potrebbe svolgere un ruolo essenziale. L'esposizione al piombo durante lo sviluppo può produrre anomalie comportamentali come iperattività, distraibilità, inquietudine e deficit cognitivi (Needleman, 1982). Tuttavia non è riscontrata in molti casi di ADHD. Tali considerazioni ci permettono di asserire che l'origine dell'ADHD sia multifattoriale, dovuta a variabili genetiche e ambientali che agiscono in sincrono determinando una maggiore vulnerabilità alla patologia; infatti nessun singolo fattore è necessario o sufficiente a determinare la malattia e ognuno di questi singoli fattori è intercambiabile.

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Il trattamento farmacologico si basa sull'utilizzo di farmaci che aumentano la concentrazione sinaptica di dopamina e noradrenalina attraverso diversi meccanismi. I farmaci d'elezione sono gli psicostimolanti come il metilfenidato e l'amfetamina. Non sono in ogni modo gli unici utilizzati. Nella terapia dell'ADHD è stato recentemente introdotta l'atomoxetina che ha la capacità di bloccare in modo selettivo il trasportatore NET come altre noti antidepressivi tra cui i triciclici. È da notare però che tale azione potrebbe determinare un aumento della concentrazione sinaptica anche di dopamina in quelle aree come la corteccia prefrontale, dove la dopamina può essere ricaptata dalle terminazioni noradrenergiche (Carboni et al., 1990; Bymaster et al., 2002). L'aumento della concentrazione di dopamina si può verificare anche in altre aree del sistema nervoso centrale in quelle aree dove l'innervazione dopaminergica e quella noradrenergica coesistono e potrebbe essere la chiave di lettura dell'efficacia terapeutica di questi farmaci (Carboni and Carta, 2009).

Amfetamina

Una delle maggiori questioni sollevate negli ultimi tempi negli Stati Uniti riguarda l'impiego di psicostimolanti (tra cui metilfenidato e amfetamina) per il trattamento farmacologico di questo disturbo. Questi composti risultano sicuri ed efficaci nel trattamento dell'ADHD in bambini, adolescenti e adulti. Migliorano i tre

sintomi caratteristici (deficit dell'attenzione, iperattività e impulsività) ma anche la vita di relazione, la socializzazione e le prestazioni scolastiche.

Numerosi studi in vitro e in vivo sono stati condotti con lo scopo di chiarire il meccanismo d'azione dell'amfetamina. È probabile che l'aumento di concentrazione di dopamina e noradrenalina sia il primo di un di una cascata di eventi che conduce all'effetto terapeutico. La concentrazione sinaptica di questi neurotrasmettitori dipende dal release firing dipendente e dall'azione dei siti di re-uptake per la dopamina e per la noradrenalina. L'amfetamina entra nei terminali dopaminergici attraverso il trasportatore per la dopamina (DAT) o per diffusione attraverso le membrane in virtù della sua lipofilia. All'interno della terminazione usa il trasportatore vescicolare per le monoammine (VMAT-2) per penetrare all'interno della vescicola dove dissipa il gradiente di pH generato da una pompa protonica che funge da motore per l'immagazzinamento (uptake) di dopamina. Il risultato è l'efflusso di dopamina dalle vescicole, il suo accumulo nel citoplasma terminale e la fuoriuscita all'esterno della terminazione a causa dell'inversione della direzione di trasporto del DAT dovuta all'azione dell'amfetamina stessa.

Altri studi su cellule cromaffini suggeriscono che l'amfetamina può dissipare i depositi vescicolari di neurotrasmettitore ad una sufficiente concentrazione di calcio che, immagazzinato nelle vescicole assieme alla dopamina, può fuoriuscire e favorire l'esocitosi nella membrana plasmatica.

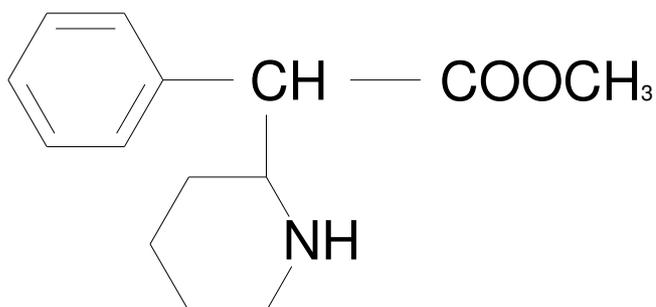
Gli auto e eterocettori agendo sulle intesi, sul firing e sul release danno infine un contributo alla trasmissione monoaminergica. In particolare è stato

proposto che negli effetti terapeutici degli psicostimolanti sia coinvolto il contributo inibitorio a livello presinaptico della trasmissione. L'uso di amfetamina può portare alla dipendenza fisica. La sottrazione brusca di questa sostanza è caratterizzata dall'insorgenza di letargia, sonnolenza e depressione; non sono da escludersi tentativi di suicidio. Le azioni dirette che questa sostanza produce sul SNC sono: euforia con aumentato senso di benessere, aumento dell'acuità mentale, nervosismo, insonnia, anoressia e dimagrimento.

L'assunzione cronica di amfetamina riduce i livelli cerebrali di noradrenalina, in modo generalizzato, e quelli di dopamina a livello di nuclei della base. I livelli di tirosina idrossilasi, l'enzima che innesca la sintesi di catecolamine dal precursore aminoacidico, sono diminuiti. Anche il sistema serotoninergico è inibito dall'azione cronica dell'amfetamina. L'uso protratto di amfetamine è pertanto accompagnato da rischiosi effetti collaterali. Possono verificarsi improvvisa spossatezza con un conseguente blocco della capacità del pensiero. Inoltre si possono manifestare senza preavviso brevi interruzioni dello stato di veglia. A forti dosi l'amfetamina riduce l'acuità mentale facendo perdere la capacità di compiere atti complessi anche in assenza di fatica. Chi abusa di questa sostanza può cadere in un comportamento ripetitivo, che col passare del tempo diventa sempre più irrazionale. Durante l'abuso protratto può insorgere una reazione psicotica, caratterizzata da allucinazioni visive e uditive. L'amfetamina causa una evidente dilatazione pupillare e crisi ipertensive con emorragie cerebrali.

METILFENIDATO

METILFENIDATO



Il metilfenidato è il farmaco di prima scelta per il trattamento dell'ADHD. Appartiene ai farmaci d'abuso ed è incluso nella *tabella I* degli stupefacenti. Nei pazienti affetti da ADHD il farmaco agisce aumentando l'attenzione e diminuendo l'irrequietezza in bambini che sono iperattivi, presentano difficoltà di concentrazione, o sono facilmente distraibili e impulsivi.

Negli Stati Uniti la FDA ha approvato numerosi psicostimolanti per la cura dell'ADHD, ma quello maggiormente utilizzato è proprio il metilfenidato in virtù del suo indice terapeutico (IT=100; effetto terapeutico/tossico =100: 1) che lo rende uno dei farmaci ad uso pediatrico più sicuri sul mercato. Nell'ottobre 2000 la Commissione Unica del Farmaco (CUF) e il Dipartimento del Farmaco del Ministero della Sanità hanno invitato la Ditta Novartis a presentare richiesta per la registrazione e la commercializzazione in Italia del metilfenidato cloridrato, noto con il nome commerciale di Ritalin. Tale prodotto, infatti, è stato ritirato dal mercato nazionale nel

1989 in seguito a rinuncia dell'allora Ditta produttrice Ciba-Geigy. La decisione di reintrodurre in Italia questo medicinale è derivata dall'elevata incidenza dell'ADHD in età pre-adolescenziale e dall'assenza di farmaci alternativi. Il metilfenidato è commercializzato in numerosi Paesi con diversi nomi di fantasia il più diffuso dei quali è Ritalin, le cui caratteristiche sono presentate nella tabella 2. Il Ritalin è disponibile in compresse orali da 5, 10 e 20 mg e il suo utilizzo non è autorizzato nei bambini con marcata ansietà, agitazione o tensione, con sindrome di Tourette, glaucoma, ipertiroidismo, angina grave o aritmia cardiaca, e nei bambini al di sotto dei 6 anni. Esistono però stime che evidenziano l'uso del farmaco anche in pazienti al di sotto di tale età.

TAB. 2 CARATTERISTICHE DEL RITALIN	
Principio attivo	Metilfenidato idrocloride
Indicazione	Disturbi dell'attenzione con o senza iperattività
Posologia	Adulti: 20-30 mg 2 o 3 volte al giorno mezz'ora prima dei pasti. Bambini: 5 mg 2 volte al giorno con incrementi settimanali di 5-10 mg fino a un massimo di 60 mg giornalieri.
Avvertenze	Il metilfenidato non deve essere impiegato in bambini con meno di 6 anni

Il meccanismo d'azione del farmaco nell'uomo non è ancora completamente noto, ma sembra attivare il sistema di risveglio del tronco cerebrale e della corteccia, aumentando il rilascio di dopamina.

Questo farmaco mostra un'elevata affinità per il DAT e per il NET ma una bassa affinità per il trasportatore della serotonina (SERT). La potenza in vivo del metilfenidato sul DAT e le sue proprietà psicofarmacologiche sono simili a quelle della cocaina. Il meccanismo d'azione di questo farmaco è molto complesso ed è in relazione alla sua assunzione cronica mediante somministrazione orale. In seguito alla sua assunzione si ha il blocco del 60% del DAT e un incremento delle concentrazioni di dopamina extracellulare nello striato. Se si presuppone che la funzionalità del DAT sia maggiore nei soggetti affetti da ADHD rispetto ai soggetti sani, allora questo effetto può compensare la riduzione del tono dopaminergico dovuta ad un'aumentata espressione del DAT. L'iperespressione del DAT in mancanza di un aumento della frequenza di scarica del neurone può portare ad una riduzione della concentrazione di dopamina a livello sinaptico determinando così una riduzione del tono dopaminergico. Queste considerazioni sono in accordo con l'ipotesi catecolaminergica dell'ADHD che indica nell'aumento del tono dopaminergico una possibile causa dell' patogenesi di questo disturbo. In accordo con quest'ipotesi il metilfenidato, aumentando i livelli di dopamina sugli autorecettori inibitori D₂ e D₃, può ridurre il rilascio di dopamina e il tono dopaminergico postsinaptico. Il metilfenidato somministrato per via orale alle dosi utilizzate nell'ADHD è in grado di aumentare anche la concentrazione di noradrenalina nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale, ma non nelle aree striatali

subcorticali. Questo effetto può essere dovuto alla capacità del metilfenidato di bloccare il NET, proprietà condivisa anche dagli antidepressivi triciclici.

Il problema dell'utilizzo di questo farmaco sta nel suo potenziale d'abuso. Un lavoro svolto presso l'Università della California suggerisce che ciò sia in relazione alla via di somministrazione. Se somministrato per via endovenosa, il metilfenidato, alle dosi che determinano il blocco del 60% del DAT, dà effetti di rinforzo (euforia), così come la cocaina. Se somministrato per via orale alle dosi cliniche che bloccano il neurotrasportatore si verificano gli effetti di rinforzo. Si è ipotizzato che la somministrazione intravenosa mimica la modalità fasica della trasmissione dopaminergica, che può essere un fattore critico associato agli effetti di rinforzo e all'abuso. La somministrazione orale invece, mima la modalità tonica di scarica, che può essere un fattore critico associato agli effetti clinici.

Atomoxetina



Struttura dell'atomoxetina

Questa molecola, alla base di prodotti come lo Strattera, è un inibitore selettivo del meccanismo di trasporto pre-sinaptico della noradrenalina (NET) e viene venduto come idrocloruro di atomoxetina. Non è noto come il farmaco riduca i sintomi nel deficit di attenzione ed iperattività, tuttavia si ritiene che la noradrenalina svolga un importante ruolo nel regolare l'attenzione, l'impulsività ed i livelli di attività. L'atomoxetina viene assunta una volta al giorno con un dosaggio di 0,5 mg durante la prima settimana e poi gradualmente si raggiunge la dose di mantenimento di 0,8mg.

SOSTANZE NEUROTOSSICHE

MPTP

L'MPTP o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina è una sostanza altamente lipofila in grado di attraversare la BEE in pochi minuti. L'esposizione a questa sostanza provoca una selettiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Una volta nel sistema nervoso centrale l'MPTP viene captato dalle cellule gliali dove viene ossidato a 1-metil-4fenil-2,3-diidropiridinio (MPDP+), ad opera della monoamino ossidasi (MAO-B) e convertito probabilmente per ossidazione spontanea in MPP+, il metabolita che presenta azione tossica. Questo composto viene quindi rilasciato nello spazio extracellulare attraverso un meccanismo non ancora noto e selettivamente concentrato nei neuroni dopaminergici attraverso il trasportatore per la dopamina DAT. Tale passaggio è fondamentale per dimostrare che l'alta affinità dell'MPP+ per il DAT fa sì che la neurotossina risulti selettivamente tossica per i neuroni dopaminergici. All'interno del neurone, l'MPP+ può seguire tre vie:

- Legarsi al trasportatore vescicolare per le monamine (VMAT-2) che lo sequestra nelle vescicole sinaitiche proteggendo quindi la cellula
- Rimanere nel citosol e interagire con gli enzimi qui presenti
- Concentrarsi nei mitocondri attraverso un meccanismo attivo

Analizzando quest'ultimo meccanismo, all'interno dei mitocondri l'MPP+ altera la fosforilazione ossidativa attraverso l'inibizione del complesso I interrompendo così il trasferimento di elettroni da questo complesso all'ubichinone. Tale blocco determina rapidamente una diminuzione del contenuto di ATP, riducendo quindi la funzione della pompa Na/K ATP-asi. Questo determina una parziale depolarizzazione dei

neuroni e una diminuzione del blocco voltaggio dipendente operato dal Mg dei recettori glutammatergici NMDA. A tali condizioni anche i livelli normali di glutammato possono causare un'attivazione eccitotossica dei recettori NMDA provocando un notevole aumento dei livelli di calcio intracellulare. Inoltre il deficit energetico può ridurre l'attività delle pompe al calcio ATP-asi, aumentando ulteriormente i livelli di calcio intracellulare, determinando effetti altamente tossici per la cellula ad alte concentrazioni. La deplezione di ATP riduce oltremodo l'attività del VMAT-2 di mantenere i gradienti di concentrazione necessari per l'accumulo di dopamina nelle vescicole, facilitando il rilascio del neurotrasmettitore nel citosol. L'auto-ossidazione della dopamina e il suo normale metabolismo ad opera delle MAO-B è responsabile della produzione di H_2O_2 e del costante stato di stress ossidativo che caratterizza i neuroni dopaminergici. L'aumento di dopamina nel citosol, ad opera del MPP+, contribuisce perciò ad aggravare la situazione di stress ossidativo già fisiologicamente presente. Durante la fosforilazione ossidativa dell'ATP una alta percentuale dell'ossigeno molecolare viene ridotto a H_2O a livello del complesso IV della catena di trasporto degli elettroni (ECT) e una piccola porzione viene ridotto non-enzimaticamente dagli elettroni persi dai siti localizzati lungo l'ECT. Uno di tali siti è ubicato nel complesso I. L'inibizione a questo livello da parte dell'MPP+ determina il rilascio di maggiori quantità di elettroni che possono combinarsi con l'ossigeno molecolare incrementando la produzione di specie reattive dell'ossigeno come lo ione super ossido e H_2O_2 . I ROS così formati possono a loro volta danneggiare il complesso I innescando così un ciclo che si auto-alimenta. L'azione tossica dei ROS è dovuto all'interazione con DNA, lipidi e proteine.

Attraverso questi meccanismi l'MPP+ innesca una catena di eventi cellulari che culminano con la morte dei neuroni dopaminergici nigro-striatali.

MODELLI ANIMALI DI ADHD

SHR e SD

Gli esperimenti in vivo sui farmaci anti-ADHD possono essere condotti in differenti modelli animali. Agli inizi degli anni 60' furono selezionati in Giappone i ratti SHR (*spontaneously hypertensive rats*) dal gruppo dei ratti Wistar. Oggi questi ratti SHR sono i più utilizzati perché mostrano rispetto ai loro controlli normotesi Wistar Kioto (WKY) anomalie comportamentali quali iperattività, difficoltà nell'apprendimento e iper-reattività allo stress, simili a quelle che caratterizzano l'ADHD nell'uomo. Questi ratti, se esposti a particolari situazioni rispondono con un aumento dell'attività motoria, con una maggiore risposta allo stress (dimostrato da un aumento delle concentrazioni plasmatiche di catecolamine) e con una riduzione del livello di attenzione. Queste caratteristiche riconducono ad alcuni sintomi che si manifestano nell'ADHD nell'uomo e così supportano la validità degli SHR come modelli animali dell'ADHD, nonostante ci siano ancora delle caratteristiche discordanti in relazione alle diversità presentate dai due sessi.

I sintomi d'iperattività, impulsività e deficit d'attenzione si attenuano con l'utilizzo di farmaci che potenziano la trasmissione monoaminergica come metilfenidato e amfetamine, ma anche IMAO.

La risposta degli SHR agli psicostimolanti sembra essere mediata da un anomalo rilascio di dopamina dalle terminazioni nervose nella corteccia prefrontale (PFC),

nucleo accumbens (NAc) e caudato-putamen. Inoltre il turnover della dopamina nel neostriato e nel NAc è ridotto negli SHR rispetto ai WKY. L'amfetamina aumenta il rilascio di dopamina molto più che il metilfenidato nel tessuto cerebrale degli SHR; ciò presumibilmente riflette la sua maggiore azione a livello dei depositi vescicolari intraneuronali che si somma agli effetti sul re-uptake che caratterizzano entrambi i farmaci. Queste scoperte possono suggerire un'alterazione a livello dei depositi vescicolari di dopamina negli SHR. I ratti di sei settimane hanno una significativa riduzione del re-uptake di dopamina nella corteccia frontale e nello striato. Questo suggerisce l'importante ruolo svolto dalla dopamina nello sviluppo dell'ipertensione e dell'iperattività che caratterizzano questi ratti. Studi sull'espressione dei geni implicati nella differenziazione dei neuroni dopaminergici hanno dimostrato una significativa riduzione dell'espressione della tirosina idrossilasi (TH) e del DAT nel primo mese di sviluppo post-natale in ratti SHR.

L'alterazione dei ratti SHR è dovuta inoltre ad una riduzione del numero degli elementi della proteinkinasi II Ca^{++} -calmodulina dipendente (CaMKII) e ad una ridotta espressione dei geni precoci *c-fos* e *zif-268* nella shell del nucleo accumbens. Tuttavia i livelli di CaMKII possono essere normalizzati mediante trattamento cronico con metilfenidato. Questi ratti mostrano anche un aumento delle concentrazioni di recettori D_1 e D_5 nello striato, accumbens e tubercolo olfattorio, probabilmente conseguente alla riduzione del tono dopaminergico in queste aree, che vengono però normalizzate con somministrazioni ripetute di metilfenidato.

Durante le prime fasi di sviluppo embrionale, gli SHR mostrano un'elevata attività di re-uptake della noradrenalina dovuta ad un aumento della V_{max} del NET

nella corteccia prefrontale. Questo aumento non è una diretta conseguenza dell'ipertensione che caratterizza questi ratti, ma si riscontra prima ancora che si sviluppi l'aumento pressorio. Nella corteccia prefrontale il rilascio di noradrenalina in risposta al glutammato è maggiore che nei controlli SD. L'inibizione del rilascio di noradrenalina mediato dai recettori α_2 , autorecettori inibitori, potrebbe essere deficitario negli SHR e determinare quindi un aumento della trasmissione noradrenergica con conseguente aumento dei valori della pressione sanguigna. Ma proprio l'ipertensione che caratterizza questi ratti potrebbe essere un fattore di confusione nel caratterizzare le anomalie comportamentali e di apprendimento. Ovvero molti deficit comportamentali, specialmente quelli relativi all'apprendimento e alla memorizzazione potrebbero essere dovuti a danni cerebrali causati proprio dall'ipertensione.

NHE

Un altro modello genetico è dato dai NHE (Naples high-excitability) caratterizzato da un'iperfunzionalità della trasmissione dopaminergica nelle aree limbiche e corticali. Questi ratti mostrano iperattività se esposti ad ambienti inesplorati e deficit se sottoposti a stimoli che richiedono l'attenzione visivo-spaziale.

Nonostante sia possibile ottenere diversi modelli animali caratterizzati da iperattività e deficit d'attenzione, gli SHR mostrano il più alto numero dei sintomi

comportamentali riscontrati nell'ADHD. Per questo motivo sono quelli maggiormente utilizzati nella ricerca.

MATERIALI E METODI

MICRODIALISI CEREBRALE

La metodica della microdialisi cerebrale consiste nell'impiantare in specifiche aree cerebrali una sonda munita di una sottile fibra da dialisi. La microdialisi accoppiata alla cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) consente di monitorare i diversi neurotrasmettitori centrali, quali dopamina e noradrenalina. Il recupero dei neurotrasmettitori avviene mediante il passaggio attraverso la fibra da dialisi (membrana semipermeabile), secondo gradiente di concentrazione, dall'ambiente extracellulare (a maggiore concentrazione) al liquido che percola l'interno della sonda (a minore concentrazione), sino al raggiungimento dell'equilibrio di concentrazione. Nel nostro studio in particolare viene effettuato il recupero della dopamina e della noradrenalina.

Preparazione della sonda da dialisi

Le fibre da dialisi (fig.9) sono formate da più elementi preparati separatamente e successivamente assemblati. La sonda è costruita da uno a tre giorni prima dell'esperimento riunendo le due parti principali: lo scheletro metallico, contenente i due capillari di silice fusa (Composite Metal Service, UK), e la membrana, preparate in precedenza.

Lo scheletro metallico è costituito da due porzioni, opportunamente smerigliate di aghetti inossidabili di calibro Gauge 22, disposti ad Y, che costituiranno rispettivamente l'ingresso del liquido di perfusione (*inlet*) e l'uscita del dializzato (*outlet*). L'*inlet* ha una lunghezza di 2.2 cm e presenta un foro posto a 0.6 cm dalla punta dello stesso aghetto. Nell'*inlet* è introdotto il primo dei due capillari di silice fusa (\varnothing interno 75 μm , \varnothing esterno 150 μm) che è tagliato a "becco di flauto" e fatto fuoriuscire per 7.5 mm dall'estremità inferiore, mentre il secondo capillare è veicolato all'interno dello stesso ago per 4.5 mm, attraverso il foro praticato a 0.7 cm dall'estremità superiore. In corrispondenza di questo foro si colloca la porzione metallica dell'*outlet*, che ha una lunghezza di 1.7 cm. Il punto di congiunzione dei due aghi è incollato con una goccia di colla e rinforzato con un puntale da 200 μl per micropipette Gilson, tagliato a tronco di cono con una lunghezza di 1.1 cm.

La membrana è una sottile fibra da dialisi, composta di un copolimero acrilico di sodio-meta-allil-solfonato (\varnothing interno 220 μm , \varnothing esterno 310 μm), la cui estremità inferiore è sigillata mediante colla epossidica e smerigliata a forma di cono allo scopo di ridurre al minimo la lesione durante l'impianto della fibra a livello cerebrale. La membrana è ridotta alla lunghezza di 7 mm e accoglie al suo interno i capillari di silice fusa. La membrana è quindi incollata allo scheletro mediante una goccia di colla epossidica e la sua superficie è rivestita della stessa colla, tranne che nella porzione dializzante (3mm dall'estremità distale). Quest'ultima costituisce la porzione attiva, attraverso la quale avvengono gli scambi secondo gradiente di concentrazione tra soluzione di perfusione e ambiente extracellulare dell'area cerebrale nella quale la fibra viene impiantata.

Chirurgia

I ratti vengono anestetizzati con cloralio idrato alla dose di 400 mg/kg, i.p. e immobilizzati su un apparato stereotassico (fig.10) che permette l'impianto della fibra da microdialisi nelle aree cerebrali in esame con l'ausilio di un sistema di coordinate basato su due punti: *bregma* (punto d'incontro tra l'osso frontale e occipitale) e *lambda* (punto d'incontro tra l'osso parietale e occipitale) tratte dall'atlante Paxinos (Paxinos G, Watson C; 1998).

Dopo aver esposto la teca cranica si prendono le coordinate utilizzando il bregma come punto di riferimento. Si pratica poi un piccolo foro in corrispondenza della zona di impianto della fibra e si perfora la dura madre. Le coordinate per l'impianto in corteccia sono le seguenti:

- Anteriorità (A): + 3,5 mm
- Lateralità (L) : + 0,8 mm
- Verticalità (V) : - 4,0 mm

L'anteriorità (A) è la distanza lungo l'asse anteriore del bregma;

La lateralità (L) è la distanza dal bregma lungo un asse medio-laterale;

La verticalità (V) è la distanza dalla dura madre lungo l'asse dorso-ventrale dalla punta della fibra da dialisi.

La fibra viene poi fissata alla teca cranica con del cemento per uso dentistico.

Procedura sperimentale

Gli esperimenti vengono effettuati 24 h dopo l'impianto della fibra da dialisi, in animali svegli e liberi di muoversi all'interno di semisfere di plexiglas (fig.11) nelle quali vengono posizionati subito dopo l'operazione. La soluzione di perfusione, Ringer (147 mM NaCl, 4 mM KCl e 2,2 mM CaCl₂), viene pompata attraverso il tubo d'ingresso della fibra con un flusso costante di 1,0 µl/min. I campioni di dializzato (20 µl) vengono raccolti ogni venti minuti ed immediatamente iniettati in un sistema di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), dotato di colonna cromatografica a fase inversa (LC-18-DB Supelco) e di rivelatore elettrochimico che può essere di due tipi: ANTEC (potenziale di ossidazione 0.55 V) o ESA COULOCHEM II. La fase mobile è rappresentata da Sodio Acetato 100 mM , Acido Octanesulfonico 1.8 mM, EDTA disodico 0.3 mM, a pH 5.4.

Monitorando le variazioni di concentrazione dei due trasmettitori nel liquido di perfusione è possibile avere una conoscenza della dinamica della neurotrasmissione a livello dell'area cerebrale interessata.

Trattamento farmacologico

I ratti subiscono trattamento farmacologico una volta che i valori basali dei due neurotrasmettitori in questione si sono stabilizzati. Questi vengono considerati stabili quando la variabilità delle concentrazioni extracellulari (fmoli/20 min), in tre campioni consecutivi è minore del 10%. I ratti appartenenti ai due gruppi (SHR e SD) sono trattati con Metilfenidato e Atomoxetina.

Istologia

Alla fine dell'esperimento i ratti vengono anestetizzati con una soluzione satura di cloralio idrato per poter essere sacrificati e sottoposti alla rimozione dei cervelli che vengono conservati in formaldeide al 10% per almeno due giorni, quindi affettati in sezioni coronali di 100 μm , mediante l'impiego di un vibratomo. Le fettine così ottenute (fig.12) vengono infine osservate al microscopio per valutare la corretta posizione della fibra con l'ausilio dell'atlante di Paxinos e Watson (1998).

STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante l'utilizzo del programma *STATISTIC* (Statistic USA). I dati ottenuti sono stati analizzati con il sistema *ANOVA*. I risultati dei trattamenti che sono significativi sono stati sottoposti ad un ulteriore metodo di analisi chiamato "Post-hoc Tukey Test" per accertarne la significatività dei vari punti sperimentali.

I valori basali sono dati dalla media di tre campioni consecutivi che differenziano tra loro per non più del 10%. La media dei basali è stata quindi considerata pari al 100%, ed i valori di dopamina e noradrenalina sono stati espressi come variazione percentuale rispetto ai basali.

STUDIO DELL'ATTIVITA' MOTORIA

Lo studio dell'attività motoria è una metodica utilizzata per valutare in acuto l'attivazione motoria legata ai farmaci o sostanze d'abuso. Tale metodologia viene applicata per monitorare l'effetto di attivazione o riduzione dell'attività motoria associata ad una sostanza.

L'animale viene sistemato in un "motility meter", un macchinario particolare dotato lateralmente di cellule fotoelettriche che registrano gli spostamenti dell'animale. Le cellule fotoelettriche sono localizzate su due barre poste parallelamente tra di loro e separate dalla gabbia e operano trasmettendo le une sulle altre raggi infrarossi che vengono interrotti al passaggio dell'animale. Più saranno frequenti i movimenti

dell'animale e maggiormente verranno interrotti i raggi dello strumento, permettendo ad appositi contatori di registrare tutte le interruzioni provocate dall'animale.

Quando l'animale interrompe in senso orizzontale i raggi infrarossi avremo la quantizzazione, del movimento, ottenendo così il numero di conte che l'animale ha fatto in base alla sua attività locomotoria. Quando invece l'animale presenta un'attività verticale, allora verranno interrotti i raggi in senso verticale, e sia avrà una quantizzazione che viene sommata all'attività ambulatoria. La conta della motilità viene fatta in attività ambulatoria quando l'animale si muove lungo la gabbia, mentre l'attività totale quando si sommano all'attività ambulatoria e le stereotipie.

Durante l'esperimento è necessario il controllo da parte di un operatore per monitorare le varie stereotipie che sono dipendenti dal tipo di trattamento e riguardano: Rearings, Grooming and sniffing.

Quando si valuta in acuto l'effetto del farmaco, e si dispone l'animale nella gabbia e lo si lascia per un tempo variabile, che dipende dalle caratteristiche del farmaco in studio, e si misura l'attività dell'animale.

E' importante e necessario che l'animale, prima di tale trattamento subisca un periodo di ambientamento, dove verranno misurati i movimenti dell'animale e verranno considerati come movimenti base (come normale attività motoria dell'animale).

Il giorno del test, viene somministrato il farmaco all'animale e lo si pone nella gabbia. Tutte le modificazioni rispetto al comportamento basale saranno considerate come l'effetto del farmaco.

È possibile valutare l'effetto del farmaco sull'attività motoria anche in cronico, effettuando delle somministrazioni ripetute.

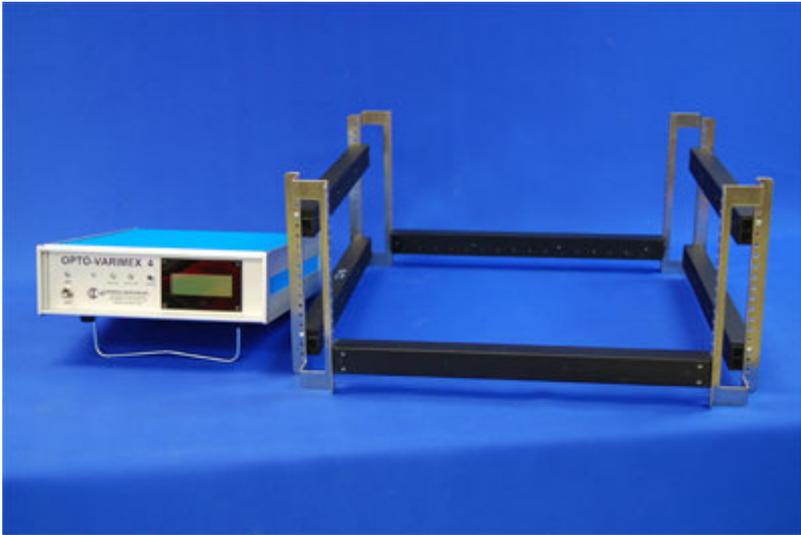


fig. Motility meter

Hight-Pressure Liquid Chromatography

I tessuti, nel caso dei tessuti di striato sono stati sonicati in 250 μ l di acido perclorico 0.2 M e successivamente centrifugati a 9391.2 giri per 15 minuti a 4 °C. Il supernatante così ottenuto è stato filtrato e diluito 1:62.5. Di questa soluzione 20 μ l sono stati analizzati in HPLC e monitorate la concentrazione di catecolamine e metaboliti.

4: SCOPO DELLA RICERCA

Il Disturbo da Deficit di Attenzione e Iperattività (ADHD) è un disturbo del comportamento che si manifesta nei bambini e spesso persiste oltre l'infanzia in età post adolescenziale e adulta. La terapia dell'ADHD ha avuto come farmaci di base gli psicostimolanti quali il metilfenidato e l'amfetamina. E solo dopo oltre trenta anni la Food and Drug Administration ha approvato un nuovo farmaco per la terapia dell'ADHD. Questo farmaco l'atomoxetina, che invece non ha proprietà psicostimolanti è stato infatti approvato negli Stati Uniti e più recentemente in Europa, dove è ancora sotto osservazione per la valutazione della sua efficacia clinica. La caratteristica principale dell' atomoxetina è la sua capacità di bloccare con alta affinità il sito del reuptake della noradrenalina (NET) determinando un aumento della concentrazione sinaptica extracellulare di noradrenalina e allo stesso tempo, di quella della dopamina (Bymaster et al. 2002), in quelle aree come la corteccia prefrontale dove l'innervazione dopaminergica coesiste con quella noradrenergica. L'azione recettoriale della dopamina in aree ad alta densità di terminazioni dopaminergiche viene normalmente interrotta mediante la catturata da parte del DAT (Carboni et al. 2006). La corteccia prefrontale ha una caratteristica innervazione da parte della noradrenalina e da parte della dopamina, quindi la dopamina rilasciata nello spazio sinaptico invece di essere catturata da parte dei siti DAT, che sono localizzati lontano dal sito di rilascio e in densità inferiore, viene catturata dal trasportatore per la noradrenalina NET presente sulle terminazione noradrenergiche. In conseguenza

dell'uso di farmaci in grado di bloccare in modo selettivo il NET quali la reboxetina (Carboni et al. 2006) o come nel suddetto caso, l'atomoxetina si determina un aumento della concentrazione sinaptica di dopamina e di conseguenza l'attivazione dei recettori dopaminergici post-sinaptici e pre-sinaptici. L'azione terapeutica nell'ADHD dell'atomoxetina ha permesso di riconsiderare le ipotesi proposte riguardo l'eziologia della suddetto disturbo. Fino a poco tempo fa infatti, veniva considerato predominante un'alterazione del sistema dopaminergico, con maggiore probabile localizzazione a livello dello striato; un'area dove la trasmissione dopaminergica ha un ruolo determinante nella motilità. Recentemente Viggiano e collaboratori nel 2004 hanno proposto una ipotesi sulle disfunzioni del sistema dopaminergico sulla base del meccanismo d'azione del metilfenidato. Questi autori, sulla base di studi farmacologici su modelli animali, hanno suggerito che l'iperattività motoria possa riflettere un'iperfunzionalità del sistema dopaminergico. Infatti dosi basse di farmaci psicostimolanti come il metilfenidato e l'amfetamina determinano un aumento della concentrazione sinaptica di catecoloamine tale da agire attraverso un'azione sugli autorecettori dopaminergici presinaptici, producendo quindi un'inibizione della trasmissione dopaminergica (Swanson et al., 1998; Grace, 1995; Solanto, 1998). L'introduzione dell'atomoxetina in terapia non supporta questa teoria, infatti questo farmaco non è in grado di modificare la trasmissione dopaminergica nello striato (Bymaster et al. 2002) in accordo con quanto riportato con la reboxetina (Carboni et al. 2001; Carboni et al. 2006). Queste osservazioni sono estremamente pertinenti riguardo uno dei sintomi dell'ADHD: l'iperattività; mentre la valutazione di una possibile alterazione dei circuiti che sovrintendono all'attenzione e alla impulsività

deve per forza tenere conto del ruolo della trasmissione noradrenergica in aree cerebrali diverse dal nucleo caudato e soprattutto della interazione tra questi due neurotrasmettitori nella corteccia prefrontale e nel nucleo accumbens o in altre aree cerebrali. In particolare nella corteccia prefrontale (CPF) le trasmissioni dopaminergica e noradrenergica hanno ruolo primario sui processi di pianificazione, organizzazione dell'azione comportamentale (Fuster, 2000) e sulle funzioni attentive (Mulder et al., 2003). Inoltre, riguardo i deficit cognitivi che sono stati osservati nei soggetti affetti da ADHD, è interessante ricordare che studi nei primati hanno dimostrato che le funzioni cognitive sono mediate dalle catecolamine nella PFC (Soltanto 1984). La complessità delle alterazioni neurobiologiche nell'ADHD è supportata dalle interazioni della CPF con altre aree, infatti la CPF proietta verso target sottocorticali come lo striato dorsale e ventrale, la sostanza nera, e l'area tegmentale ventrale e disfunzioni della CPF possono portare a una disinibizione di queste strutture con alterazione della regolazione delle funzioni motorie controllate dallo striato, in pazienti affetti da ADHD (Kolomiets et al., 2003; Petrides and Milner, 1982).

Le dosi di metilfenidato e di amfetamina che sono usate in clinica nella terapia dell'ADHD sono 0.5 e 0.25 mg/kg rispettivamente (Kuczenski and Segal, 2001) somministrate due volte al giorno. Queste dosi nei roditori sono quasi delle dosi soglia per quanto riguarda l'attivazione comportamentale e sono al di sotto di quelle utilizzate in studi di sensitizzazione (Kuczenski and Segal, 2001). Alla luce di questi studi appare ancora non chiaro il ruolo neurobiologico di un trattamento cronico con dosi basse di metilfenidato nonostante recentemente studi effettuati nel nostro

laboratorio in collaborazione con altri laboratori hanno dimostrato che il trattamento sub-cronico (14 giorni) con 1 mg/Kg di metilfenidato determina delle alterazioni del contenuto tissutale di dopamina, noradrenalina e serotonina in diverse aree cerebrali e allo stesso tempo determina una riduzione delle motilità spontanea in un modello animale di ADHD, i ratti NHE (Naples High Excitability rats) (Ruocco et al. 2010) mentre in modo area specifico determina un aumento dell'espressione del BDNF nei nuclei della base di ratti SHR. D'altro canto questi due recenti studi hanno messo in evidenza che l'atomoxetina determina variazioni sia dei contenuti di neurotrasmettitori che dell'espressione di BDNF differenti da quelle del metilfenidato.

Appare quindi importante investigare la capacità di modificare la trasmissione dopaminergica e noradrenergica da parte di questi due principali farmaci utilizzati per l'ADHD, il metilfenidato e l'atomoxetina al fine della comprensione del meccanismo d'azione dell'atomoxetina e del ruolo che le varie aree cerebrali possono avere nell'eziologia dell'ADHD. Scopo di questa ricerca è stato quindi investigare gli effetti comportamentali, con particolare riguardo alla motilità, di dosi crescenti di metilfenidato, e di atomoxetina e verificare l'esistenza di una correlazione tra gli effetti comportamentali e le variazioni delle concentrazioni sinaptiche di dopamina e di noradrenalina nella corteccia prefrontale. Gli effetti comportamentali verranno studiati mediante l'uso di un sistema automatico computerizzato per la rilevazione della motilità mentre la concentrazione extracellulare di neurotrasmettitori verrà valutata mediante il metodo della microdialisi cerebrale in vivo. Queste indagini saranno condotte sia sui ratti SHR che su un ceppo animale di controllo quali i ratti SD.

GRAFICI

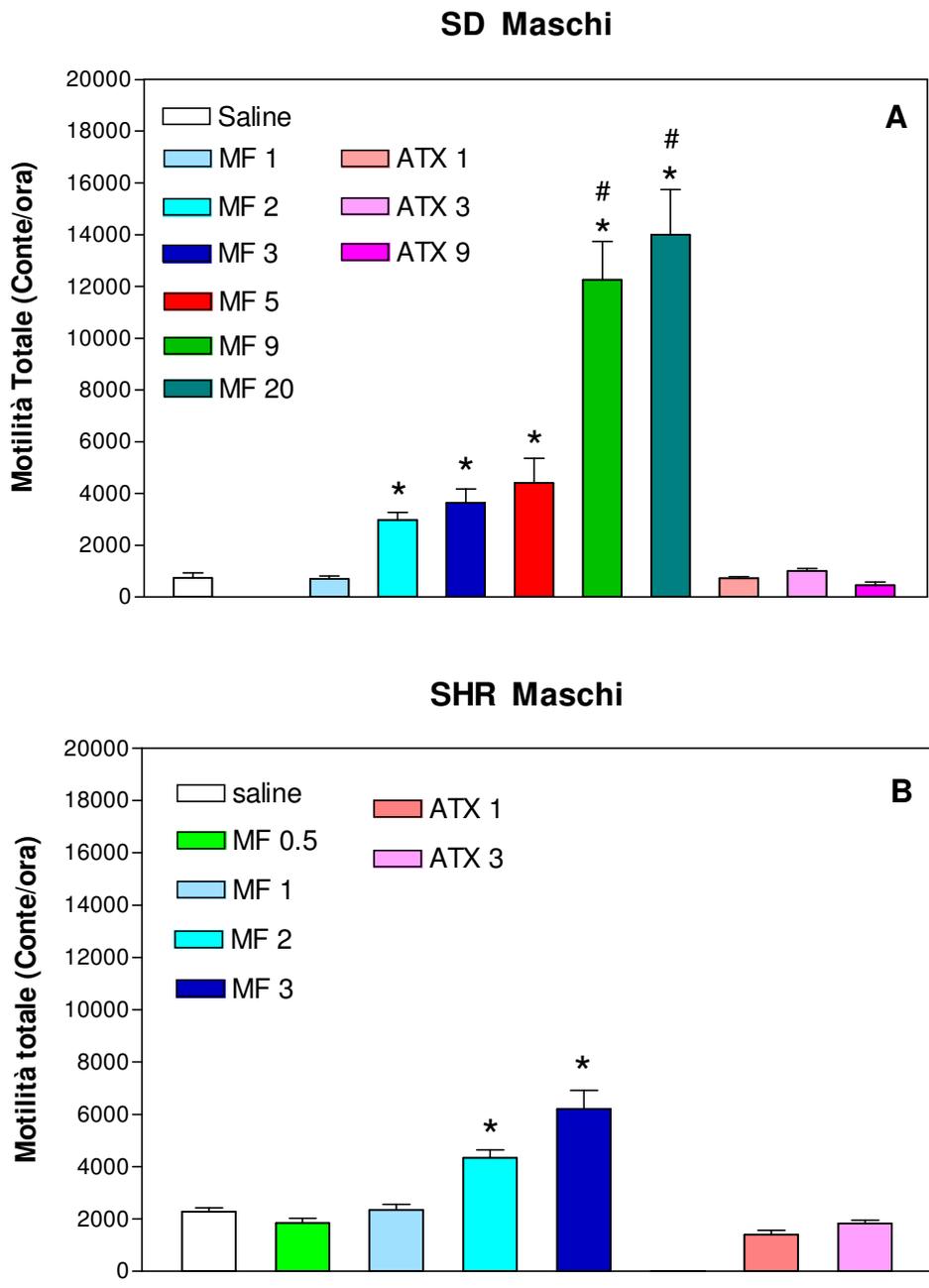


Fig 1: Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale in ratti SD maschi (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato.

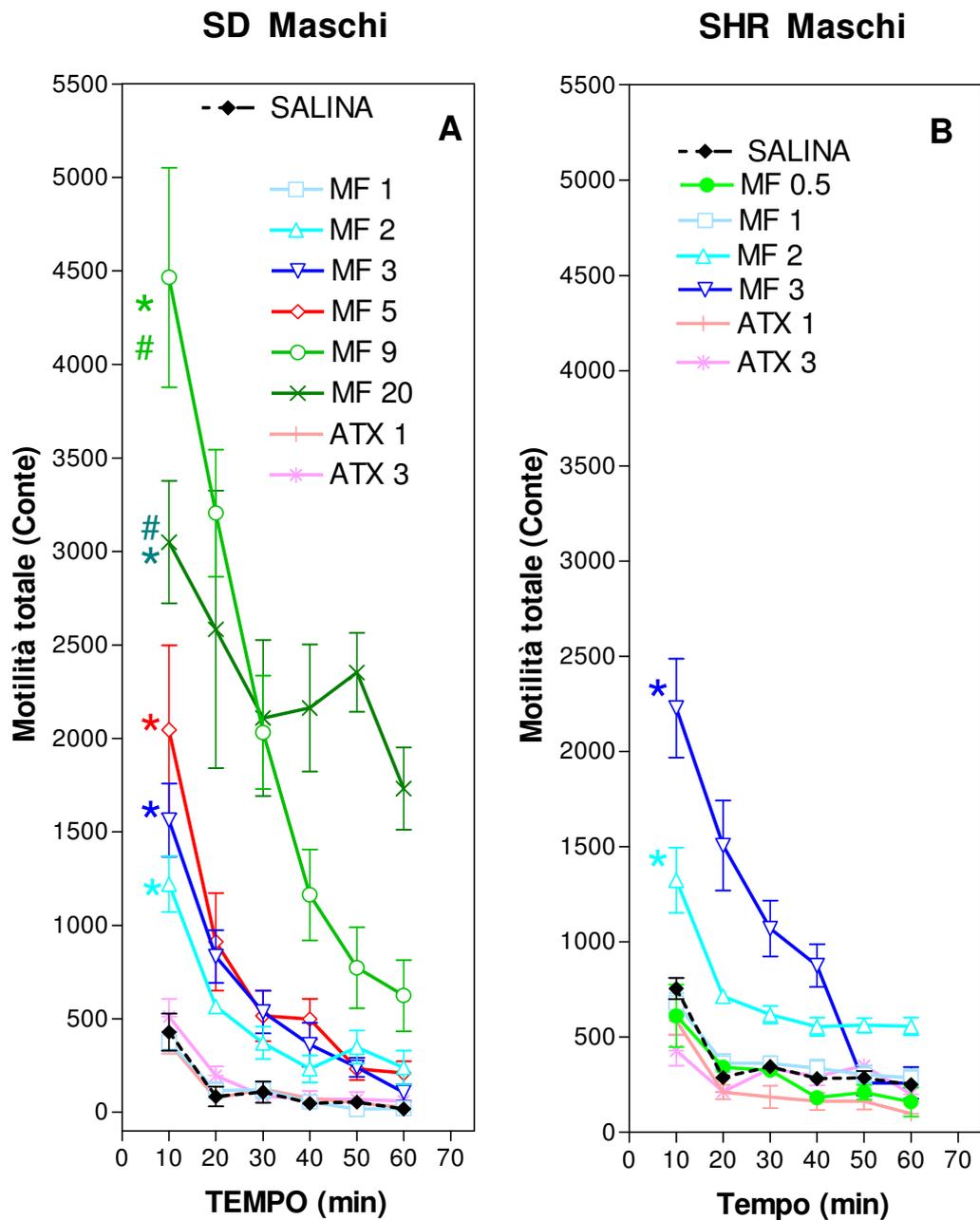


Fig 2 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale misurata ogni 10 minuti in ratti SD maschi (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato

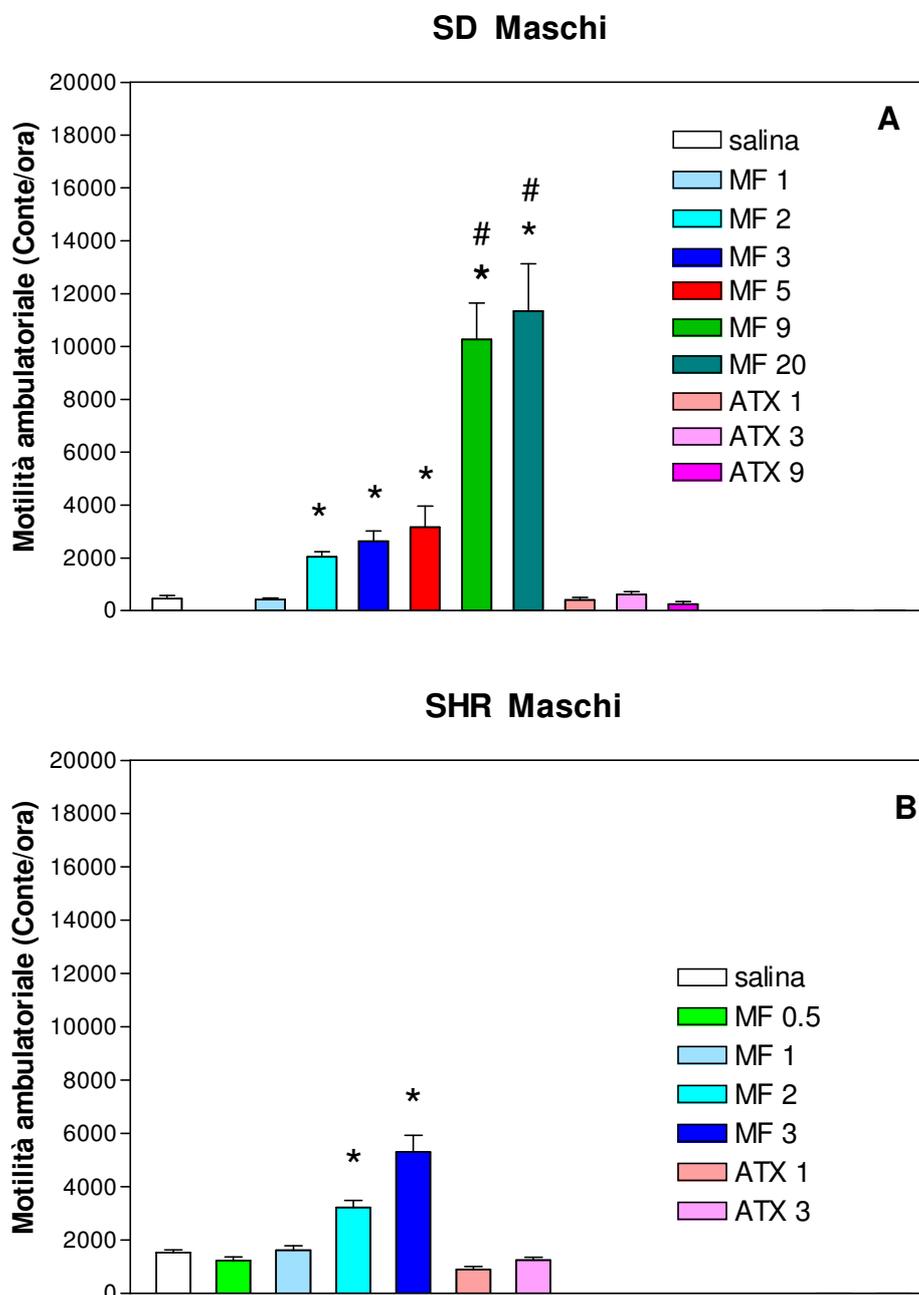


Fig 3 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità ambulatoriale in ratti SD maschi (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato

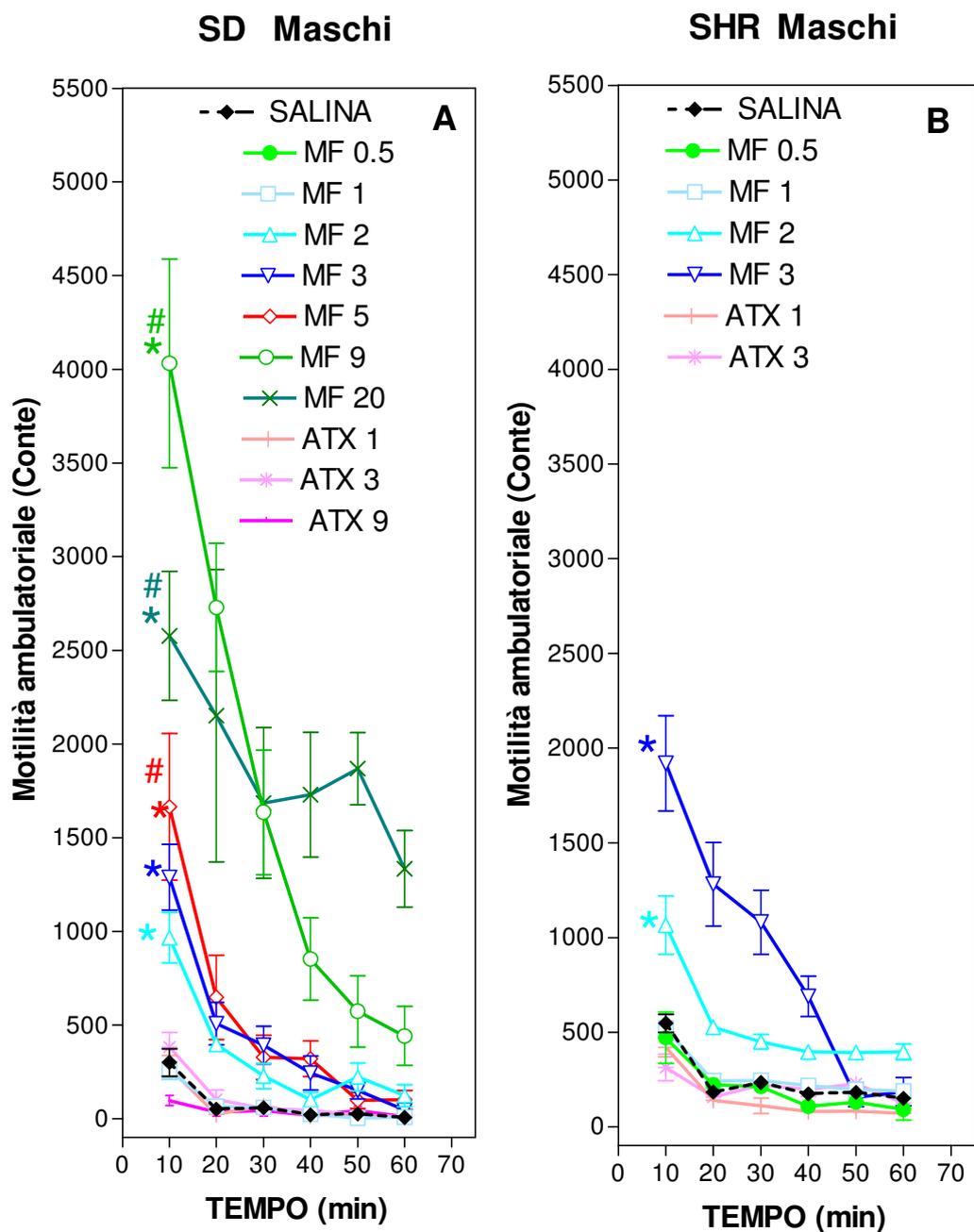


Fig 4 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità ambulatoriale misurata ogni 10 minuti in ratti SD maschi (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina; # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato.

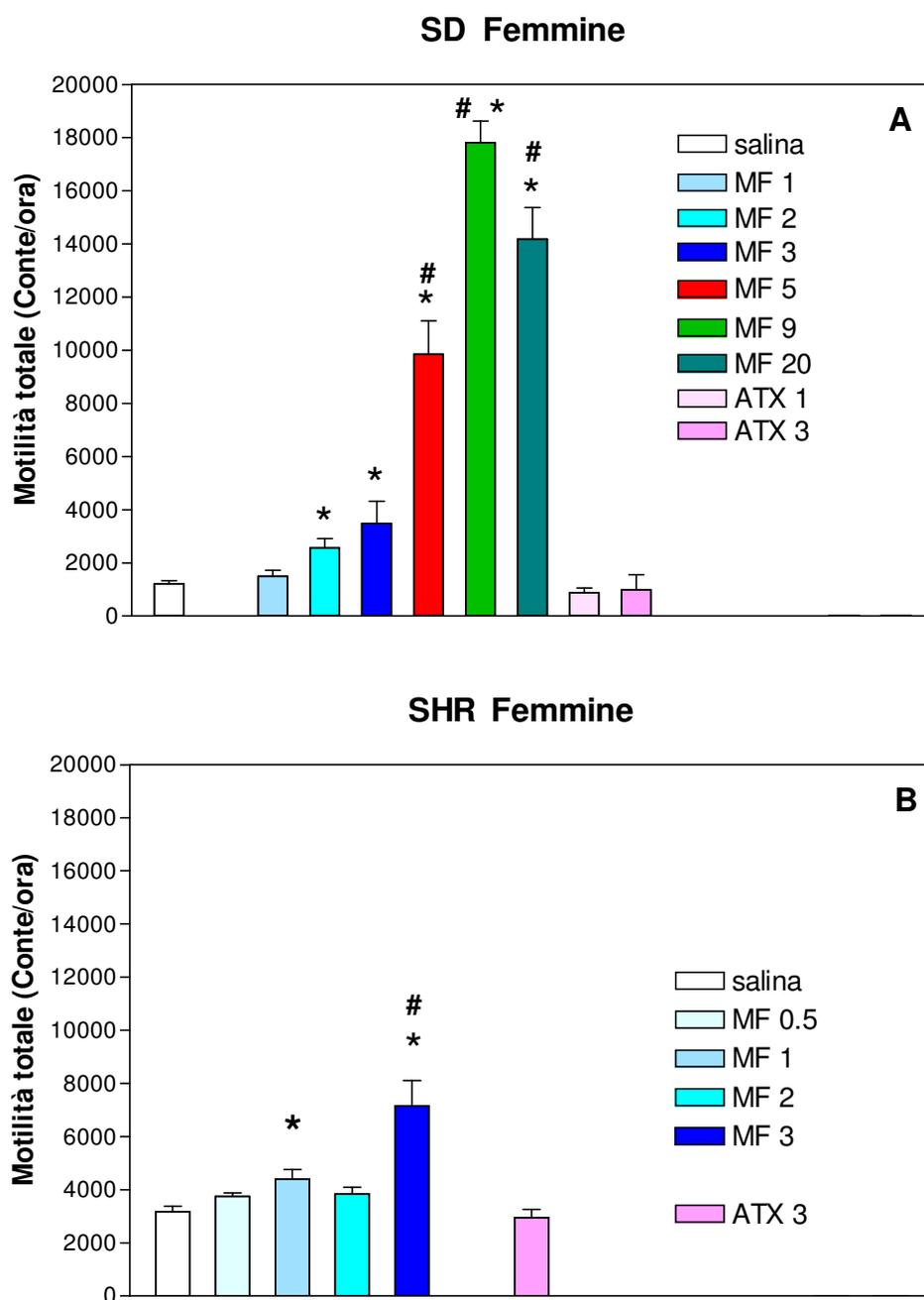


Fig 5 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale in ratti SD femmine (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 3 e 2 di metilfenidato.

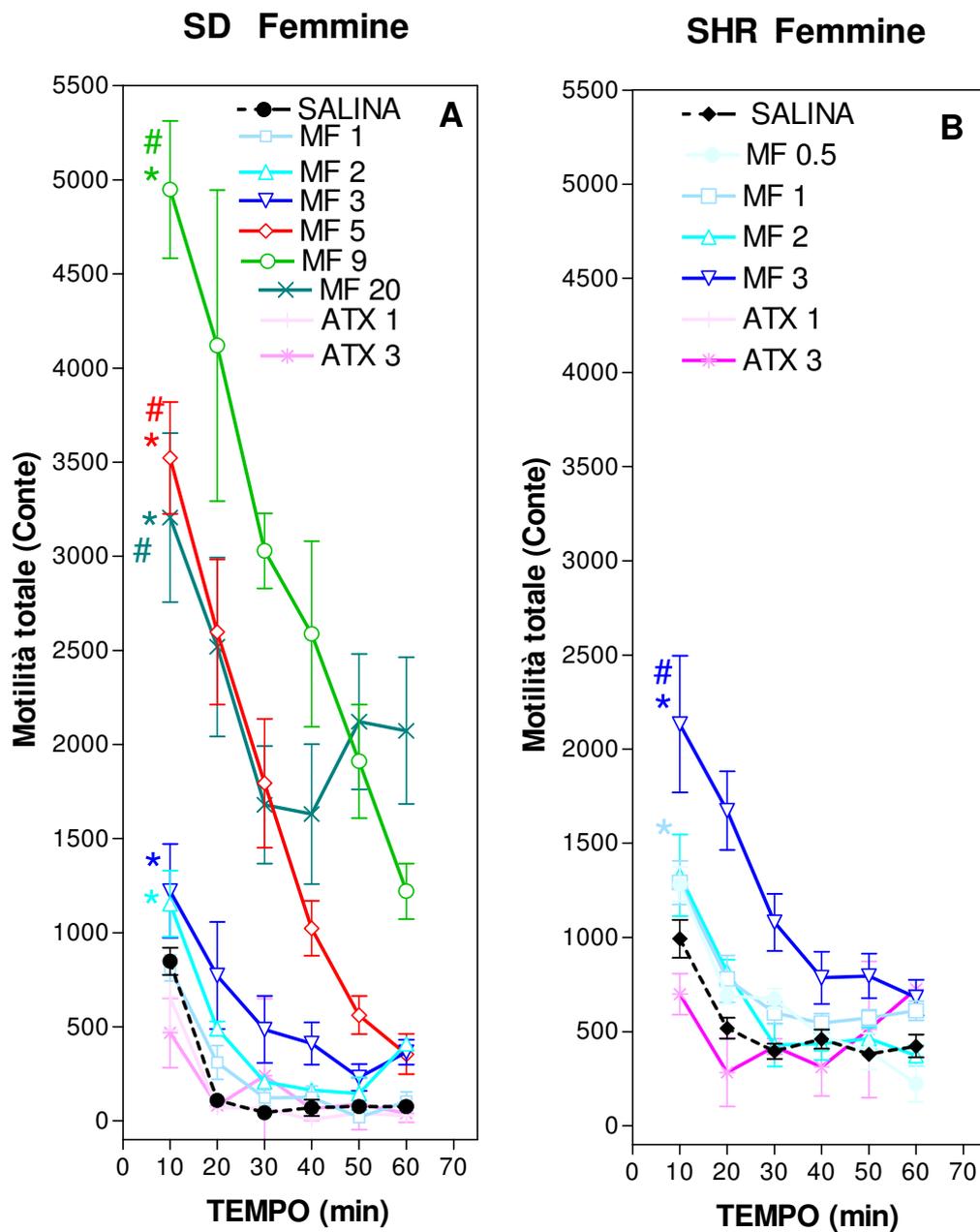


Fig 6 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale in ratti SD femmine (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 3 e 2 di metilfenidato.

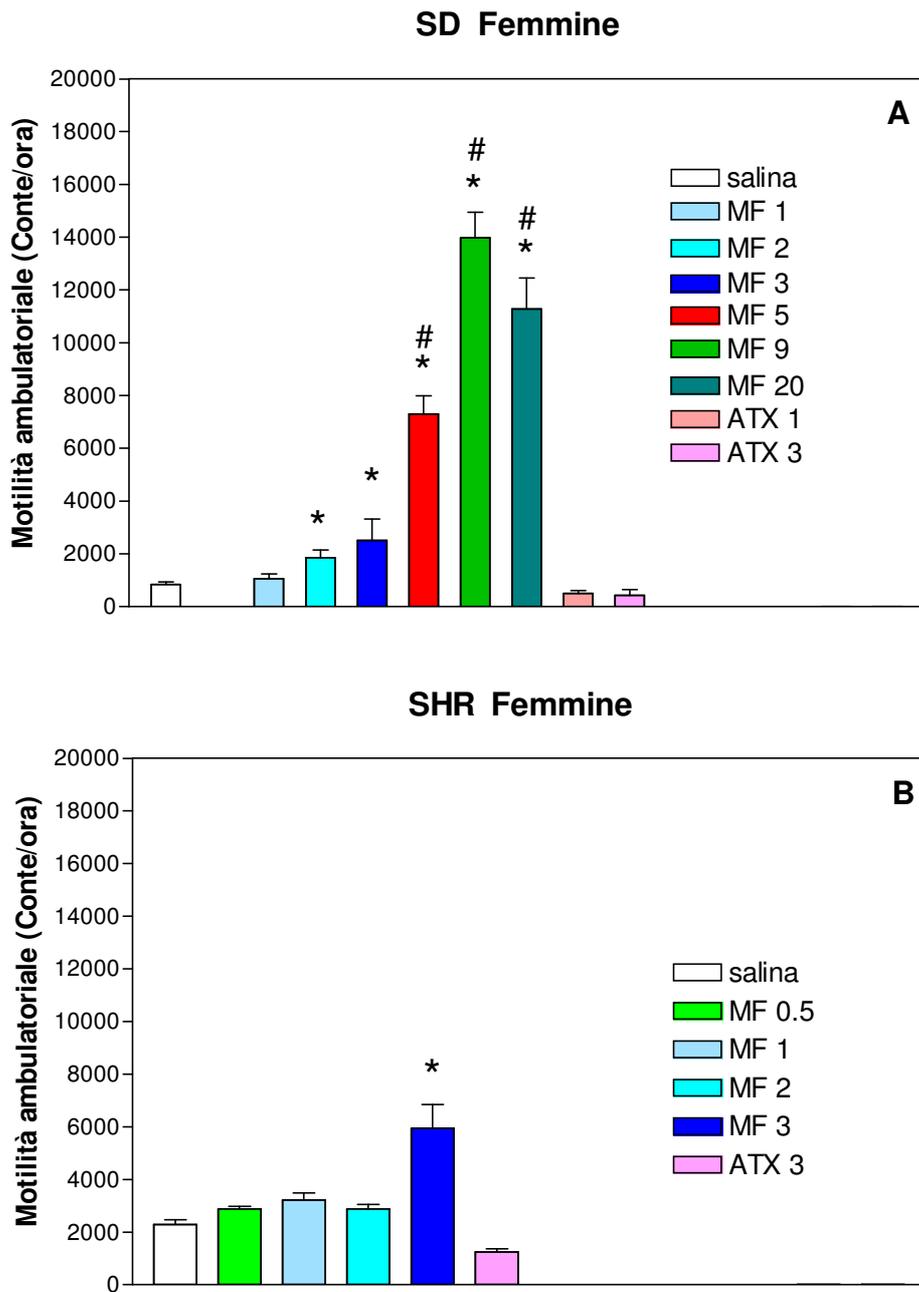


Fig 7 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità ambulatoriale in ratti SD femmine (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 3 e 2 di metilfenidato.

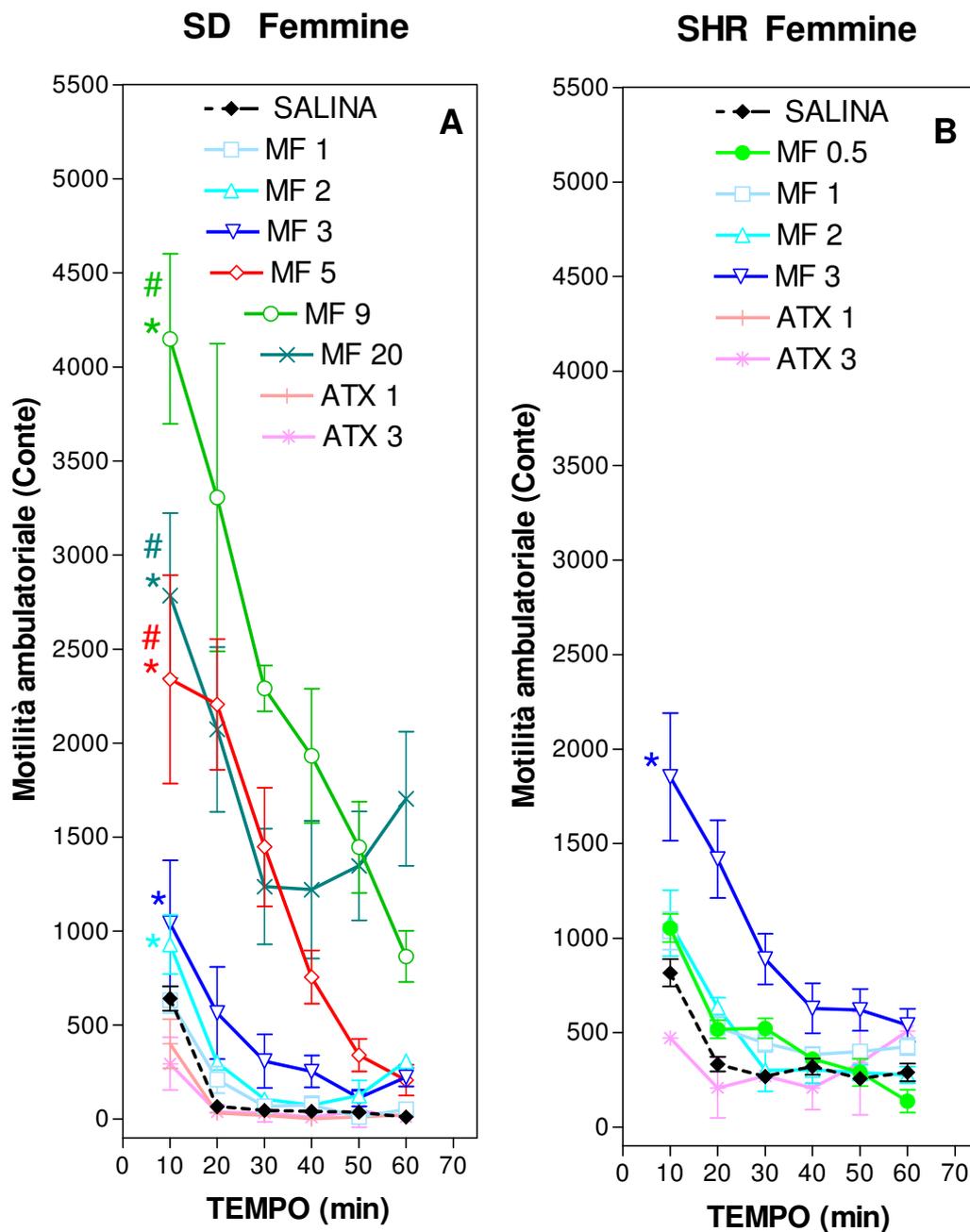


Fig 8 Effetto del metilfenidato (MF) o dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità ambulatoriale misurata ogni 10 minuti in ratti SD femmine (A) o in ratti SHR (B). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 3 e 2 di metilfenidato.

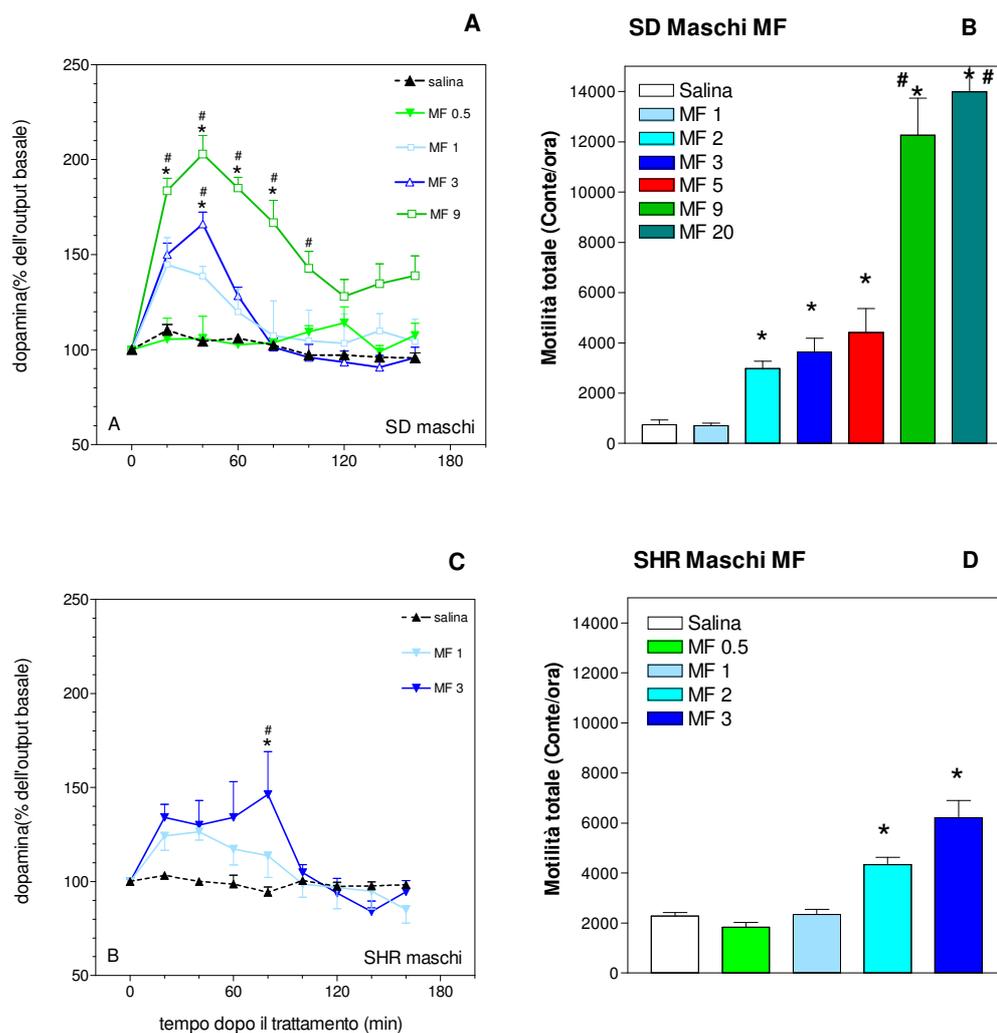


Fig. 9 (A,C) Effetto del trattamento con Metilfenidato sui livelli extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale di ratti maschi SD (A) e SHR (C). Le dosi sono espresse in mg/kg e il trattamento è stato effettuato per via intraperitoneale. * $p < 0.05$ rispetto al basale prima del trattamento. # $p < 0.05$ rispetto alla corrispondente stima temporale di dopamina del gruppo trattato con salina.

Fig. 9 (B,D) Effetto del metilfenidato (MF) sulla motilità totale in ratti SD maschi (B) o in ratti SHR (D). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato.

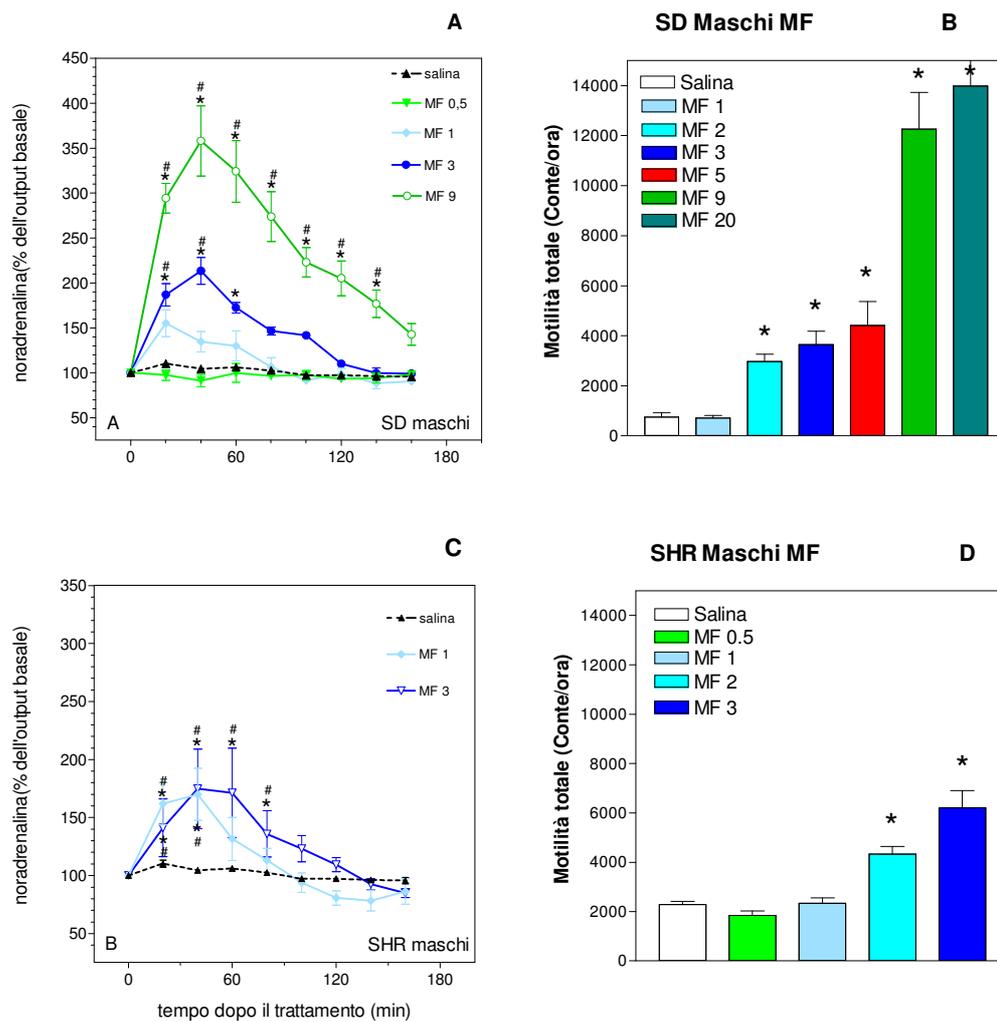


Fig. 10 (A,C) Effetto del trattamento con Metilfenidato sui livelli extracellulari di noradrenalina nella corteccia prefrontale di ratti maschi SD (A) e SHR (C). Le dosi sono espresse in mg/kg e il trattamento è stato effettuato per via intraperitoneale. * $p < 0.05$ rispetto al basale prima del trattamento. # $p < 0.05$ rispetto alla corrispondente stima temporale di noradrenalina del gruppo trattato con salina.

Fig. 10 (B,D) Effetto del metilfenidato (MF) sulla motilità totale in ratti SD maschi (B) o in ratti SHR (D). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$ nei confronti delle dosi di 5, 3, e 2 di metilfenidato.

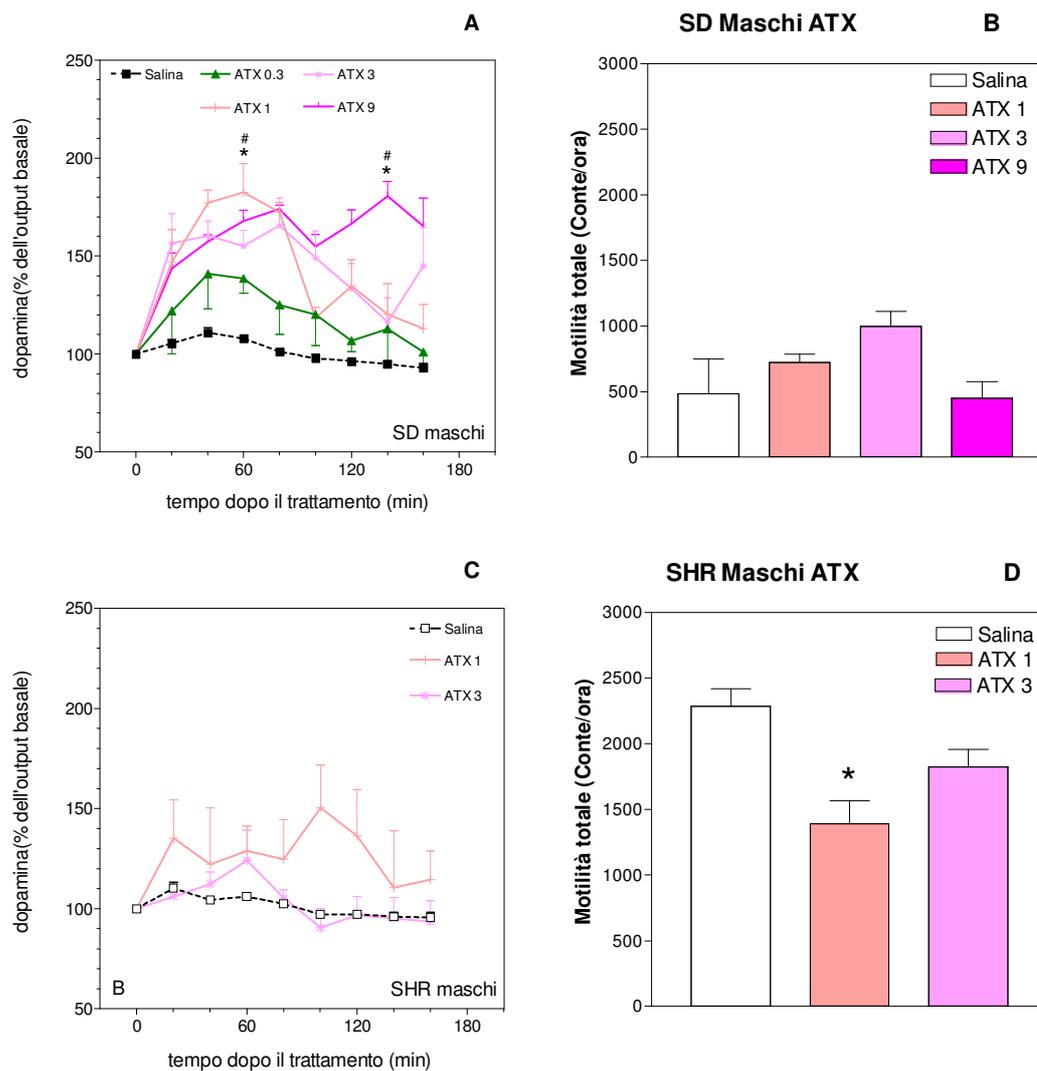


Fig. 11 (A,C) Effetto del trattamento con Atomoxetina sui livelli extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale di ratti maschi SD (A) e SHR (C). Le dosi sono espresse in mg/kg e il trattamento è stato effettuato per via intraperitoneale. * $p < 0.05$ rispetto al basale prima del trattamento. # $p < 0.05$ rispetto alla corrispondente stima temporale di dopamina del gruppo trattato con salina.

Fig. 11 (B,D) Effetto dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale in ratti SD maschi (B) o in ratti SHR (D). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. .

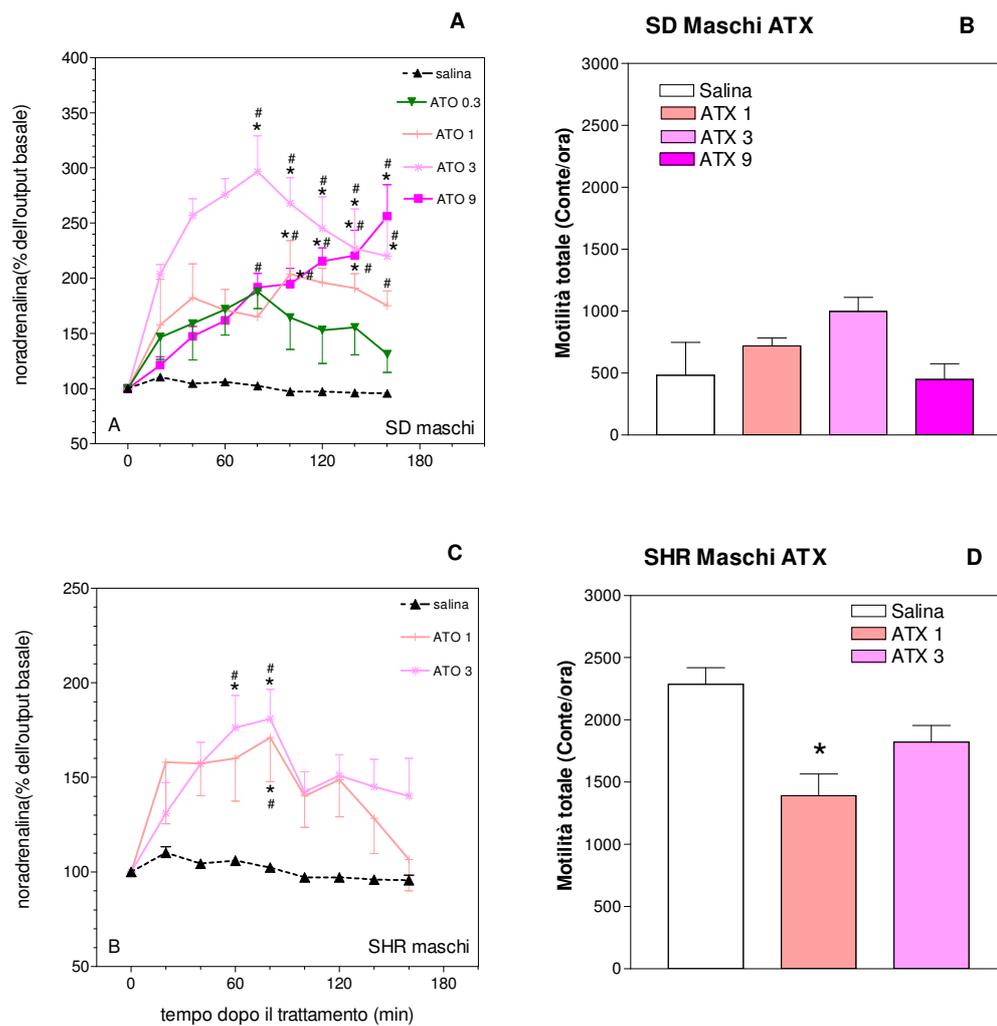


Fig. 12 (A,C) Effetto del trattamento con Atomoxetina sui livelli extracellulari di noradrenalina nella corteccia prefrontale di ratti maschi SD (A) e SHR (C). Le dosi sono espresse in mg/kg e il trattamento è stato effettuato per via intraperitoneale. * $p < 0.05$ rispetto al basale prima del trattamento. # $p < 0.05$ rispetto alla corrispondente stima temporale di noradrenalina del gruppo trattato con salina.

Fig. 12 (B,D) Effetto dell'atomoxetina (ATX) sulla motilità totale in ratti SD maschi (B) o in ratti SHR (D). * $p < 0.05$ nei confronti della salina. # $p < 0.05$

Discussione e Conclusioni

La corteccia prefrontale (PFC) ha un importante ruolo nei processi cognitivi (Seamans and Yang, 2004), nella regolazione delle emozioni, nella memoria di lavoro come anche nelle funzioni esecutive come la pianificazione dell'attività motoria, l'inibizione delle risposte inappropriate e il mantenimento dell'attenzione (Fibiger and Phillips, 1998; Granon et al., 2000; Robbins, 2002). L'associazione delle funzioni della PFC con il controllo degli impulsi è sostenuta dal fatto che danni della corteccia ventromediale causano una persistente impulsività associata con una instabilità affettiva, una ridotta capacità decisionale, una difettosa pianificazione esecutiva e una apatia verso la vita sociale (Damasio et al. 1994). La PFC ha numerose connessioni con la corteccia sensoriale, con strutture subcorticali come il caudato ma anche con altre strutture quali il cervelletto. Questi circuiti sono importanti nella regolazione dell'attenzione e nelle suddette funzioni (Arnsten 1997, Arnsten and Li 2005).

È stato suggerito che l'innervazione dopaminergica a livello del nucleo accumbens sia importante nell'attività locomotoria nelle funzioni esecutive e soprattutto nella valutazione di stimoli gratificanti (Pliszka et al., 1996). La PFC riceve un complesso insieme di innervazioni che concorre alla fine regolazione dell'output e appare evidente che eventuali alterazioni funzionali in questa area possono essere coinvolte nelle più diverse patologie psichiatriche. Possono essere incluse nell'output della PFC le proiezioni glutamatergiche che sono inviate a quei neuroni gabaergici che proiettano al nucleo accumbens, e a quei neuroni dopaminergici e gabaergici che proiettano verso regioni non identificate (Carr and Sesack 2000). Tra le innervazioni

che arrivano alla PFC le proiezioni noradrenergiche che dal LC proiettano alla CPF hanno un ruolo importante sull'attenzione e vigilanza ma anche nel comportamento avversivo (Foote et al., 1991; Arnsten et al., 1996; Posner and Dehasne, 1994). La CPF riceve anche proiezioni dal nucleo del rafe e dall'area tegmentale ventrale, e in parte manda indietro delle proiezioni a feed-back sui dendriti dei neuroni del VTA che proiettano alla PFC e in particolare sugli interneuroni gabaergici (Grillner and Mercuri, 2002) (Carboni and Silvagni, 2004; Rossetti and Carboni, 2005).

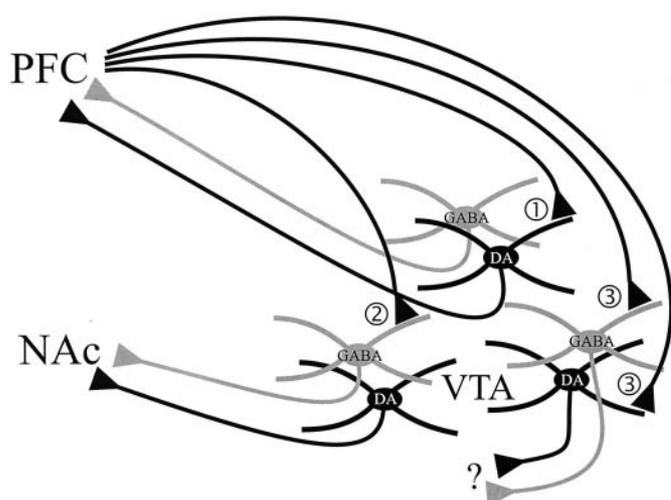


Fig. 8.1: Principali connessioni che interessano i neuroni dopaminergici dell'area ventrale tegmentale (VTA) il Nucleo Accumbens e la PFC (Carr and Sesack et al. 2000)

È stato ipotizzato che sia nell'ADHD che in modelli animali di ADHD una disfunzione dei circuiti dopaminergici e noradrenergici possa essere responsabile della comparsa dei sintomi cognitivi e motori dell'ADHD (Castellanos et al., 1996; Castellanos et al., 2002). La disfunzione per entrambi i neurotrasmettitori potrebbe coinvolgere sia i siti bersaglio come la PFC ma anche i corpi cellulari e la ramificazione dendritica a livello dei nuclei di origine. Recenti ricerche, come quelle

di neuroimaging hanno evidenziato alterazioni funzionali a carico della PFC (Kelly et al., 2007) ma è stato oggetto di studio anche il sistema di reuptake della dopamina (DAT) e in particolare recenti studi hanno dimostrato che nella CPF di pazienti adulti affetti da ADHD ci sia un aumento della densità del DAT con una possibile conseguente riduzione della concentrazione del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico (Dougherty et al., 1999).

Il sistema d'attenzione è ovviamente quello su cui sono stati indirizzati molti studi. Nell'ambito del sistema d'attenzione, potrebbe essere malfunzionante nell'ADHD sia quello posteriore che riceve una densa innervazione dal LC (Dougherty et al., 1999), e controlla la risposta verso nuovi stimoli ma anche quello anteriore che include la CPF e il giro del cingolo anteriore e invece serve per funzioni esecutive. In particolare riguardo quello anteriore potrebbe essere malfunzionante la trasmissione dopaminergica nel sistema anteriore che sembra regolare la memoria di lavoro e l'inibizione delle risposte (Arnsten and Liu, 2005).

Nonostante le numerose ricerche effettuate si è ancora lontani dall'aver caratterizzato l'eziologia dell'ADHD e l'identificazione dei circuiti il cui malfunzionamento potrebbe essere responsabile della comparsa dei sintomi dell'ADHD potrebbe essere di grande aiuto nella formulazione di una ipotesi sulle cause dell'ADHD; una via alternativa potrebbe basarsi sugli effetti ottenuti negli animali da esperimento dei farmaci usati nella terapia dell'ADHD e nella caratterizzazione del meccanismo d'azione di questi. Nel caso dell'ADHD l'azione terapeutica potrebbe non essere direttamente legata al meccanismo d'azione del farmaco che si può osservare in un animale sano ma occorre tenere conto che il beneficio clinico apportato potrebbe

essere legato in modo peculiare da azioni farmacologiche uniche legate all'esistenza di particolari deficit neurofisiologici. Questi possono essere antecedenti alla comparsa della sintomatologia e in qualche modo collegati alla maturazione del sistema nervoso e quindi dipendenti dall'età dell'individuo. Queste osservazioni implicano che sarebbe opportuno impiegare nella sperimentazione farmacologica un modello animale di ADHD e soprattutto utilizzare degli animali in età pre-adolescenziale al fine di delucidare il meccanismo d'azione dei farmaci utilizzati nell'ADHD. In tal modo ci si avvicinerebbe alle condizioni neurobiologiche che probabilmente caratterizzano i bambini affetti da ADHD.

Durante il periodo precedente l'adolescenza e in quello adolescenziale il cervello va incontro a un rimodellamento programmato di molti circuiti neuronali. Questo rimodellamento può essere responsabile dei cambiamenti nella personalità dell'individuo che si verificano nella maturazione pre e post adolescenziale. Questo processo evolve nell'assunzione della personalità tipica dell'individuo adulto (Toga et al. 2006). I circuiti catecolaminergici e in particolar modo quelli che innervano la corteccia prefrontale rappresentano il target dei farmaci utilizzati nella terapia dell'ADHD. L'assunzione di farmaci nell'infanzia e nei periodi successivi potrebbe determinare delle modificazioni di questo processo le cui conseguenze sono per la maggior parte sconosciute. Se da un lato infatti vengono apprezzati i benefici terapeutici, dall'altro non sono facilmente attribuibili all'evoluzione della patologia riscontrata in età preadolescenziale o giovanile eventuali disfunzioni o disturbi che si possono manifestare in età adulta. Allo stesso modo sono difficilmente attribuibili al farmaco eventuali interazioni con il processo di maturazione cerebrale. E' noto che le

conoscenze disponibili riguardo il meccanismo d'azione dei farmaci per l'ADHD sulla trasmissione catecolaminergica sono state ottenute per lo più nei ratti Sprague Dawley (SD) e per la maggior parte in ratti adulti. È apparso quindi opportuno investigare le interazioni tra farmaco e processo di maturazione e studiare il meccanismo d'azione dei farmaci utilizzati nell'ADHD in animali che riproducano al meglio lo stadio di maturazione del cervello degli individui a cui sono destinati i farmaci in studio. Queste osservazioni hanno portato a utilizzare animali in età preadolescenziale o adolescenziale.

I risultati di questo studio mettono in evidenza che il metilfenidato alle dosi superiori a 1 mg/kg, e in modo strettamente dose dipendente incrementa la motilità nei ratti SD maschi adolescenti, mentre l'atomoxetina non determina alcun incremento della motilità. L'aumento della motilità è moderato per le dosi di compresse tra 2 e 5 mg mentre diventa rimarchevole alla dose di 9 e di 20 mg/Kg determinano un eccezionale aumento della motilità caratterizzato da una stimolazione che apparentemente sfugge a un controllo volontario del comportamento (Fig. 8.1). In questo studio abbiamo confrontato il comportamento dei ratti SHR con quello dei ratti SD riguardo l'azione stimolante del metilfenidato. I ratti SHR esposti in un ambiente nuovo denotano una iperattività spontanea come evidenziato dalla motilità valutata dopo la iniezione di salina. Tale motilità risulta essere circa tre volte superiore nei ratti SHR rispetto a quelli SD. Sulla base di degli effetti terapeutici del metilfenidato poteva essere prevedibile che il metilfenidato riducesse la motilità nei ratti SHR e l'aumentasse nei ratti SD. I risultati ottenuti illustrati nella Tab. 1 e nella Fig. 1 pur dimostrando una minore sensibilità dei ratti SHR all'effetto del metilfenidato non confermano l'ipotesi

su sostenuta, come evidenziato dalla dose di 2 mg/kg che aumenta la motilità di 4 volte nei ratti SD e di solo due volte negli SHR.

	Salina	MF 1 mg/kg	MF 2 mg/kg	MF 3 mg/kg
Ratti SD ♂	706 = 100 %	95.5 %	402.3 %	493.7 %
Ratti SHR ♂	2286 = 100 %	102 %	189.5 %	271.3 %
Ratti SD ♀	1214 = 100 %	123 %	211.6 %	287.07 %
Ratti SHR ♀	3169 = 100 %	139 %	121.43 %	225.56 %

Tab 8.1: Effetto di dosi crescenti di metilfenidato (MF) sulla motilità totale espressa in % della motilità osservata dopo somministrazione di salina. La motilità è stata misurata per 1 ora.

Questi risultati suggeriscono quindi che l'iperomotilità dei ratti SHR adolescenti sia dovuta alla alterazione della trasmissione catecolaminergica e visto che il sito bersaglio del metilfenidato è il sito di reuptake DAT, possiamo ipotizzare che questo sia meno efficiente nei ratti SHR. Di conseguenza una maggiore concentrazione sinaptica delle catecolamine con la conseguente iperomotilità potrebbe essere una caratteristica dei ratti SHR. Infatti il blocco del trasportatore DAT, dovuto a una determinata concentrazione di metilfenidato, in proporzione ha un effetto inferiore nei ratti SHR. Le conoscenze del ruolo della dopamina nella motilità e in particolare nella iperomotilità non permettono di identificare una specifica area del cervello la cui alterazione potrebbe portare a determinare la iperomotilità dei ratti SHR. Precedenti studi effettuati nei nostri laboratori hanno evidenziato che nel nucleo accumbens shell la concentrazione di dopamina era significativamente più alta nei ratti SHR adulti rispetto a quella osservata nei ratti Wistar Kioto (WKY) che sono stati considerati il

ceppo di controllo dei ratti SHR (Carboni et al. 2004). Nel nostro studio abbiamo voluto verificare se la concentrazione basale di DA nella corteccia prefrontale dei ratti SHR fosse differente da quella osservata nei ratti SD. I risultati ottenuti in questo studio (Fig. 9) mediante l'inserzione di una fibra da dialisi nella PFC, indicano che selettive dosi di metilfenidato determinano degli aumenti di dopamina, misurata nello spazio extracellulare, che non sono differenti nei due ceppi SD e SHR come non sono differenti i livelli basali (dati non mostrati). Questa osservazione permette quindi di ipotizzare che il sistema di reuptake della dopamina non sia differente nella corteccia prefrontale dei ratti SHR rispetto a quelli SD e di conseguenza, che la concentrazione sinaptica di DA nella corteccia prefrontale non possa essere collegata alla manifestazione della ipermotilità. È da notare inoltre che la concentrazione sinaptica di DA può essere legata alla capacità di un farmaco di bloccare il sito di reuptake della noradrenalina (NET) come osservato in precedenza nei nostri laboratori (Carboni et al. 1990 e 2006). Infatti considerando che il MF ha una buona affinità per il NET (40 nM; Heal et al. 2006), alle dosi usate, esso oltre a prevenire la cattura della dopamina da parte del DAT (affinità = 160 nM; Heal et al. 2006) determina anche un ulteriore aumento di questa nello spazio sinaptico in quanto capace di prevenire il reuptake della dopamina da parte del NET (cosiddetto reuptake non specifico della DA).

La probabile mancanza di relazione tra la concentrazione sinaptica di DA nella PFC e la espressione della motilità trova conforto anche nel fatto che l'atomoxetina che ha un'affinità per il NET di 21 nM (mentre ha una affinità molto bassa per il DAT pari a 2355 nM; Heal et al. 2006) non modifica in alcun modo la motilità sia dei ratti SD che

di quelli SHR, mentre ha determinato un aumento significativo della concentrazione di dopamina nella PFC come illustrato nella Fig. 11.

L'osservazione della motilità provocata da una determinata dose di farmaco può essere fatta sia in campo aperto che in un ambiente confinato e in questo ultimo caso si può utilizzare la gabbia dell'animale oppure una gabbia dove l'animale non ha mai soggiornato. Nel nostro studio abbiamo esposti gli animali in un ambiente inesplorato in quanto i ratti SHR sono caratterizzati dall'aver una marcata ipermotilità quando sono esposti a un ambiente inesplorato. La misurazione della motilità, sia nei ratti SHR che in quelli SD, è iniziata 15 min dopo la somministrazione intraperitoneale dei farmaci. Questo tempo è stato scelto sulla base del rapido assorbimento sia del metilfenidato che dell'atomoxetina. È stato infatti riportato (Zhu et al. 2006) che la concentrazione plasmatica del metilfenidato, in seguito alla somministrazione intraperitoneale nel topo, è di 0.5, 0.1 e 0.02 microgrammi/ml di plasma rispettivamente a 10, 30 e 80 min dalla somministrazione. Agli stessi intervalli di 10, 30 e 80 min la concentrazione nel cervello risulta essere di 1.6, 0.7 e 0.5 microgrammi/grammo di tessuto cerebrale. I risultati ottenuti indicano che le maggiori differenze di motilità, tra le varie dosi testate, sono state osservate nell'intervallo di tempo 0-10 minuti mentre nel successivo intervallo 10-20 min (Fig 2) è stato osservato un decremento della motilità pari al 50 % dell'intervallo 10-20. È interessante notare che negli animali trattati con salina questo decremento è ben maggiore e raggiunge circa l'80 %. Questi dati indicano quindi che il metilfenidato produce nei ratti SD un aumento della motilità che pur sovrapponendosi all'attività esploratoria, determinata

dall'esposizione a un nuovo ambiente, produce i suoi effetti anche negli intervalli di tempo successivi, quando la motilità legata alla componente "novità" si è notevolmente ridotta, come risulta dall'osservazione della time-course della motilità nei ratti trattati con salina. Il confronto tra la motilità misurata nei due ceppi SD e SHR, dopo somministrazione con salina, evidenzia che la ipermotilità dei ratti SHR si manifesta anche negli intervalli successivi ai primi 10 min, indicando quindi che essa è legata a una disfunzione dei circuiti neurobiologici che controllano la motilità sia quella dipendente dall'esposizione ad ambienti nuovi che quella indipendente. Questa depone a favore dell'uso degli SHR come modello di ADHD, infatti i bambini iperattivi manifestano una maggiore iperattività oltre che in ambienti nuovi anche in ambienti familiari quali l'abitazione o la scuola. Un'ultima interessante osservazione riguarda il fatto che la dose di 1 mg/kg di MF non determini alcun aumento della motilità sia nei ratti SHR che in quelli SD (Fig. 2). Questo risultato, se confrontato con gli aumenti della concentrazione extracellulare (output) di DA e di NA (Figg. 9 e 10) supporta ulteriormente l'ipotesi che la motilità generata dalla somministrazione di MF non sia associata ai livelli di DA e di NA corticali. Infatti mentre la dose di 1 mg/Kg di metilfenidato determina un aumento rilevabile della DA e della NA nella PFC, anche se inferiore a quello determinato dalla dose di 3 mg/kg, essa è completamente inefficace sulla motilità, sia nei ratti SD che in quelli SHR.

Il rilevatore della motilità dell'apparato utilizzato per la misura della motilità fornisce la misurazione di due parametri: la motilità totale e quella ambulatoriale. La differenza tra i due parametri dà un'indicazione dell'attività verticale. L'attività verticale si

esprime nel ratto mediante il cosiddetto “rearing” che costituisce il sollevarsi sulle zampe posteriori, sia in prossimità della parete della gabbia sia in assenza di appoggio, quando il “rearing” si manifesta al centro della gabbia. I risultati della valutazione dell’attività ambulatoriale raccolti nelle figure 3 e 4 indicano che l’effetto dei farmaci testati si manifesta su detta attività in modo praticamente sovrapponibile alla motilità totale (Figg. 1 e 2) in entrambi i ceppi SD e SHR, sia per quanto riguarda la misurazione nell’arco dei 60 min (Fig. 3), sia per quanto riguarda la misurazione nei diversi intervalli (Fig. 4).

Tra gli scopi di questa ricerca abbiamo voluto inserire la valutazione della risposta ai farmaci testati come il metilfenidato e l’atomoxetina ai ratti femmina del ceppo SD e a quelli del ceppo SHR. Questa valutazione può contribuire alla comprensione del meccanismo d’azione del metilfenidato ma anche della eziologia dell’ADHD e infine può servire alla valutazione critica dei ratti SHR quando sono usati come modello animale di ADHD. Una delle caratteristiche dell’ADHD è la maggiore incidenza nei maschi, dove è 3 volte superiore rispetto alle femmine. Questa differenza più che a specifiche caratteristiche cromosomiche potrebbe essere legata alla differente maturazione del sistema nervoso centrale delle femmine. A questo riguardo è interessante notare che il ruolo della DA viene considerato fondamentale nella maturazione del sistema nervoso centrale che si verifica in età prescolare e preadolescenziale e in particolare nella costruzione della rappresentazione del mondo esterno e la sua relazione con la consapevolezza del proprio essere e delle proprie capacità di conseguenza del modo di interagire con il mondo esterno. Questo processo usufruisce della trasmissione dopaminergica e in particolare di quella che innerva la

parte dorsale della corteccia prefrontale mediale (Lackner et al. 2010). È da notare inoltre che la PFC ha un sistema di reuptake della DA molto meno efficiente rispetto ad altre aree dopaminergiche quali il corpo striato (Sesack et al. 1998). Il ruolo determinante della DA in questo processo è sostenuto dai risultati della valutazione delle capacità cognitive in preadolescenti e adolescenti che hanno un livello più basso di DA in conseguenza di una dieta o di un trattamento per la fenilketonuria. Questi individui hanno una performance peggiore dei controlli in test di funzionamento esecutivo (Diamonds 2001) (o in alternativa in individui che hanno una variante allelica di geni legati alla trasmissione dopaminergica come il gene per la COMT (catecolossimetiltransferasi) o il recettore dopaminergico D4. Le COMT sono responsabili della degradazione del 60 % della DA nella PFC e solo del 15 % nello striato (Karoum, 1994). Gli individui che hanno un minore efficienza nell'attività delle COMT hanno risultati migliori nei test cognitivi che richiedono l'uso della memoria di lavoro e viceversa (Diamond et al. 2004). A questo riguardo è estremamente interessante notare che quando queste variazioni si osservano nelle femmine, che normalmente hanno dei risultati migliori nei test cognitivi, non si ha un ulteriore miglioramento ma aumenta la probabilità che si verifichino delle malattie psichiatriche (Diamonds, 2007). La minore incidenza di ADHD tra le femmine si potrebbe quindi spiegare con il fatto che, avendo esse una più efficiente trasmissione dopaminergica, sono in qualche modo più protette rispetto ai maschi nei confronti di questo disturbo. Questa osservazione implicitamente depone a favore della teoria che l'ADHD si manifesti per una minore efficienza della trasmissione dopaminergica. È infatti oggetto di discussione se l'ADHD sia caratterizzato da una minore o maggiore

efficienza del sistema dopaminergico (Carboni and Silvagni 2004). A questo riguardo è interessante notare che nella PFC dei ratti SHR non abbiamo osservato una differenza significativa dei livelli di DA tra maschi e femmine mentre i ratti femmina sia del ceppo SHR che SD sono caratterizzati da una maggiore attività locomotoria di base e in particolare le femmine SHR sono notevolmente più attive di quelle SD come illustrato dalla Tab. 1 dove inoltre è indicato l'aumento della motilità causato dal metilfenidato. Come si può vedere dalla tabella le femmine risultano più sensibili alle dosi basse e meno sensibili alle dosi alte di metilfenidato. Questo fatto conferma quindi che sia le femmine SHR che quelle SD hanno un comportamento differente dai maschi sia come motilità basale che come risposta al metilfenidato, e supporta l'ipotesi che l'ulteriore studio delle differenti caratteristiche del sistema dopaminergico tra maschi e femmine sia del ceppo SHR che in uno di controllo come gli SD possa contribuire alla comprensione dell'eziologia di patologie che hanno un diversa incidenza tra maschi e femmine.

La valutazione degli effetti del MF e della Atomoxetina sui livelli extracellulari di NA (Figg. 10 e 12) nella PFC dei ratti SD e SHR, evidenzia che anche le variazioni di questo neurotrasmettitore nella PFC non sono associati alle manifestazioni comportamentali, infatti mentre in seguito alla somministrazione di MF la motilità aumenta in modo dose-dipendente gli aumenti di NA sono dose-dipendenti nei ratti SD ma non in quelli SHR. Gli aumenti dell'output di NA determinati dalla atomoxetina evidenziano una risposta a campana nei ratti SD e non sono dose-dipendente nei ratti SHR mentre nessuna dose di Atomoxetina determina un aumento della motilità. È interessante inoltre notare che la dose di 1 mg/Kg di Atomoxetina determina una

riduzione della motilità nei ratti SHR mentre è in grado di aumentare i livelli di NA nella corteccia prefrontale. In conclusione questo studio ha dimostrato che i ratti SHR e quelli SD rispondono in modo caratteristico ceppo e genere dipendente alla somministrazione di metilfenidato e atomoxetina. Suggerisce inoltre che la trasmissione dopaminergica nella corteccia prefrontale sia un comune bersaglio dei due farmaci più utilizzati nella terapia dell'ADHD, nonostante questi abbiano una notevole differente affinità per il sito di reuptake della dopamina e una, sebbene minore, differenza per quello della noradrenalina. I risultati di questa ricerca sostengono l'uso dei ratti SHR come modello animale di ADHD e in particolare la risposta farmacologica osservata sia quella di tipo biochimico che di tipo comportamentale potrebbero contribuire a chiarire l'eziologia dell'ADHD

BIBLIOGRAFIA

Barkley RA. Attention deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment. New York 1998.

Oades RD, Frontal, temporal and lateralized brain function in children with attention deficit hyperactivity disorder: a psychophysiological and neuropsychological viewpoint on development. *Behavior brain res.* 1998; 94:83-95

Solanto M. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action-deficit-hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain res.* 1998; 94:127-152.

Satterfield JH et al. Electrodermal correlates of hypertensive rats as an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav. Rev* 2000; 24: 31-39.

Dougherty DD et al. Dopamine transporter density is elevated in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 1999; 354: 2132-2133

Cook EH et al., Association of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 2002; 43:577-597.

Swanson JM, et al. Association of dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder. *Behav brain res.* 2002; 130: 73-78.

Needleman HL. The neurobehavioral consequences of low lead exposure in childhood. *neurobehav Toxicol, teratol* 1982; 4:729-732.

Carboni, E., Silvagni, A., Vacca, C., Di Chiara, G., 2006. Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *J Neurochem.* 2006 Jan;96(2):473-81. Epub 2005 Nov 29.

Adriani W., Caprioli A., Granstrem O., Carli M., Laviola G.. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:639-51.

Adriani, W. and Laviola, G., 2004. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav. Pharmacol.* 15: 341-352.

Barkley RA. Attention-deficit/hyperactivity disorder, self-regulation, and time: toward a more comprehensive theory. *J Dev Behav Pediatr.* 1997 Aug;18(4):271-9.

Bizot, J.C., Chenault, N., Houzé, B., Herpin, A., David, S., Pothion, S., et al. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacol* 2007; 193: 215-23.

- Breiter, H.C., Aharon, I., Kahneman, D., Dale, A., Shizgal, P. (2001). Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. *Neuron*, 30, 619-639.
- Carboni E., Tanda G.L., Frau R., Di Chiara G. Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem*. 1990 Sep;55(3):1067-70
- Carboni, E., Silvagni, A., Rolando, M.T., Di Chiara, G., 2000. Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J. Neurosci*. 20:RC102.
- Carboni, E., Silvagni, A., Valentini, V., Di Chiara, G., 2003. Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003.
- Carboni, E.. Microdialysis coupled with electrochemical detection. A way to investigate brain monoamine role in freely moving animals. *Methods Mol Med*. 2003; 79: 415-32.
- Carboni E., Silvagni A. Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol*. 2004;16(1-2):121-8.Review.
- Carboni, E. and Silvagni, A., 2004. Experimental investigations on dopamine transmission can provide clues on the mechanism of the therapeutic effect of amphetamine and methylphenidate in ADHD. *Neural Plast*. 11:77-95.
- Carboni, E., Silvagni, A., Vacca, C., Di Chiara, G., 2006. Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *J Neurochem*. 2006 Jan;96(2):473-81. Epub 2005 Nov 29.
- Carboni Ezio and Anna Rosa Carta 2009. The Interrelationship of Dopamine and Noradrenaline in the Prefrontal Cortex: from Physiology to Therapy. In: *Prefrontal Cortex: Roles, Intervention and Traumas*. LoGrasso Lorenzo Morretti Giovanni Eds. Nova Science Publishers Hauppauge NY.
- Carboni, E., Barros, V.G., Ibba, M., Silvagni, A., Mura, C., Antonelli, M.C., 2010. Prenatal Restraint Stress: An in Vivo Microdialysis Study on Catecholamine Release in the Rat Prefrontal Cortex. *Neuroscience*. 2010 Mar 27 Vol 168 : pp 156-166.
- Carr, D.B., Sesack, S.R. (2000a). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J. Neurosci.*, 20, 3864-3873.
- Carr, D.B., Sesack, S.R. (2000b). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse*, 38, 114-23.

Carlson CL, Lahey BB, Frame CL, Walker J, Hynd GW. Sociometric status of clinic-referred children with attention deficit disorders with and without hyperactivity. *Abnorm Child Psychol.* 1987 Dec;15(4):537-47.

Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Vauss YC, Snell JW, Lange N, Kaysen D, Krain AL, Ritchie GF, Rajapakse JC, Rapoport JL. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1996 Jul;53(7):607-16.

Castellanos F.X.

Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr (Phila).* 1997 Jul: 381-93. Review.

Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A.M., Damasio, A.R. (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*, 264, 1102-1105.

Diamond A, Briand L, Fossella J, Gehlbach L.

Genetic and neurochemical modulation of prefrontal cognitive functions in children.

Am J Psychiatry. 2004 Jan;161(1):125-32

Gattu, M., Pauly J.R., Boss, K.L., Summers, J.B., Buccafusco, J.J.. Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part I. *Brain Res.* 1997a; 771:89-103.

Gattu, M., Terry J.R. A.V., Pauly J.R., Buccafusco J.J.. Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part II. *Brain Res.* 1997B; 771:104-14.

Karoum F, Egan MF, Wyatt RJ.

Selective reduction in dopamine turnover in the rat frontal cortex and hypothalamus during withdrawal from repeated cocaine exposure.

Eur J Pharmacol. 1994 Mar 11;254(1-2):127-32.

Knardahl, S., Sagvolden, T., 1979.

Open-field behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behav. Neural Biol.* 27, 187-200.

Knardahl S., Karlsen K..

Passive-avoidance behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behav Neural Biol* 1984;42:9-22.

Kolomiets.B.P., Deniau, J.M., Glowinski, J., Thierry, A.M.. Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 2003;117:931-8.

Kuczenski R, Segal DS.

Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Mar;296(3):876-83.

Johansen, E.B., Sagvolden, T., Aase, H., Russell, V.A., 2005a. The dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD); present status and future perspectives. *Behav. Brain Sci.* 28, 451-454.

Johansen, E.B., Sagvolden, T., Kvande, G., 2005b. Effects of delayed reinforcers on the behavior of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Behav. Brain Res.* 162, 47-61.

Marshall P.

Attention deficit disorder and allergy: a neurochemical model of the relation between the illnesses.

Psychol Bull. 1989 Nov;106(3):434-46.

Rubia K, Taylor A, Taylor E, Sergeant JA

Synchronization, anticipation, and consistency in motor timing of children with dimensionally defined attention deficit hyperactivity behaviour.

Percept Mot Skills. 1999 Dec;89(3 Pt 2):1237-58

Ruocco LA, Carnevale UA, Treno C, Sadile AG, Melisi D, Arra C, Ibba M, Schirru C, Carboni E.

Prepuberal subchronic methylphenidate and atomoxetine induce different long-term effects on adult behaviour and forebrain dopamine, norepinephrine and serotonin in Naples high-excitability rats.

Behav Brain Res. 2010 Jun 26;210(1):99-106. Epub 2010 Feb 13.

Russell V., Villiers A., Sagvolden T., Lamm M., Taljaard J.. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 1995;676:343-51.

Seamans, J.K.& Yang, C.R. (2004). The principal features and mechanisms of dopaminemodulation in the prefrontal cortex. *Prog. Neurobiol.* 74, 1-58

Hao-Jie Zhu, Jun-Sheng Wang, C. Lindsay DeVane, Robin L. Williard, Jennifer L. Donovan, Lawrence D. Middaugh, Brian B. Gibson, Kennerly S. Patrick, and John S. Markowitz The role of the polymorphic efflux transporter p-glycoprotein on the brain accumulation of d-methylphenidate and d-amphetamine. *Drug metabolism and disposition* Vol 34 (7) pp 1116-1121.

PUBBLICAZIONI

Gender specific reduction of hypermotility by sub-chronic methylphenidate or atomoxetine in SHR rats, an animal model of ADHD.

Marcello Ibba, Nicola Simola, Susanna Cosseddu, Ezio Carboni

Monitoring Molecules in Neuroscience, Westerink B, Clinckers R, Smolders I, Sarre S, Michotte Y Eds, Vrije Universiteit Press, Brussel Belgium pp 498-500. ISBN/EAN 978-90-90255672-2

Introduction: The psychostimulant methylphenidate (MP) is a safe and efficacious agent for the pharmacological treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in children and adolescents, although abuse potential is a concern. Atomoxetine (ATO), a selective noradrenaline (NA) reuptake inhibitor (Bymaster et al 2002), has been proposed successfully as an alternative to stimulant treatment (Heal et al. 2009). Spontaneous hypertensive rats (SHR), because they show several behavioural abnormalities (hyperactivity, hype-reactivity to stress and cognition deficit) have been proposed as an animal model of ADHD (Sagvolden et al. 2009). The aim of this study was to assess, whether 14 day treatment with MP 1 mg/kg i.p., a dose that acutely increases dopamine (DA) output in the nucleus accumbens (Carboni et al. 2003), or ATO 3 mg/kg i.p. that acutely increases NA and DA in the prefrontal cortex (Bymaster et al 2002), could produce a reduction of spontaneous hyperactivity in adolescent male and female SHR.

Methods: Animals: Male spontaneous hypertensive rats SHR (Charles River Italy). **Treatment:** Saline, methylphenidate, atomoxetine twice a day, i.p. at 8 a.m and 8 p.m. for 14 days beginning at post natal day (PND) 29. **Motility:** Motility was assessed with an animal activity meter from Columbus, Ohio in 480 x 265 mm cage. Animal were exposed for 30 min. Total and locomotion activity were recorded every 10 min. **Results:** Fig 1 shows the effect of MP sub-chronic treatment on total activity in SHR. Two way ANOVA of data represented in panel A showed: a significant treatment effect: $F_{1,76} = 7.03$ $p < 0.01$; age effect $F_{1,76} = 4.44$ $p < 0.05$ and interaction $F_{1,76} = 4.07$ $p < 0.05$; in panel B it showed: a non significant treatment effect: $F_{1,59} = 0.37$ $p = 0.37$ and interaction $F_{1,59} = 0.33$ $p = 0.56$ but a significant age effect $F_{1,59} = 17.85$ $p < 0.001$. Post hoc analysis showed that motility

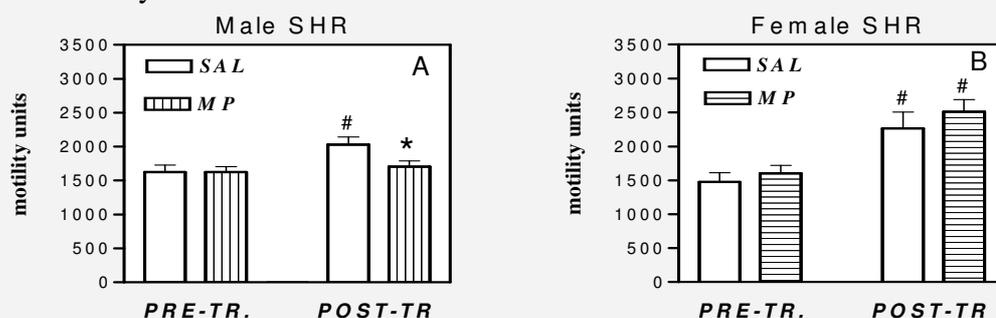


Figure 1. Effect of a sub-chronic treatment with MP on locomotion in male SHR (A) or female SHR (B). Columns represent units of motility measured in a 30 min period of observation.. * $p <$

0.05 versus saline, # $p < 0.05$ versus the pretreatment evaluation. increased during 14 days saline treatment either in males or females and this increase was prevented by MP treatment in males but not in female SHR.

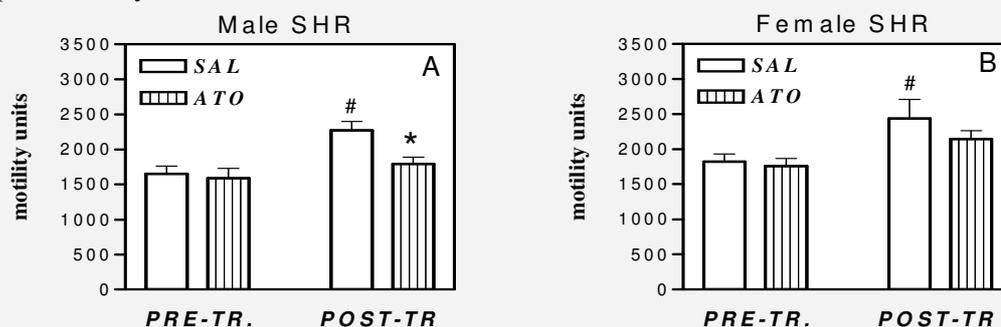


Figure 2. Effect of a sub-chronic treatment with ATO on locomotion in male SHR (A) or female SHR (B). Columns represent units of motility measured in a 30 min period of observation.. * $p < 0.05$ versus saline, # $p < 0.05$ versus the pretreatment evaluation.

Fig 2 shows the effect of ATO sub-chronic treatment in SHR. Two way ANOVA of the data represented in panel A showed a significant treatment effect: $F_{1,44} = 4.77$ $p < 0.05$; age effect $F_{1,44} = 11.03$ $p < 0.01$ but not interaction $F_{1,44} = 2.75$ $p = 0.10$; in panel B it showed: a non significant treatment effect: $F_{1,44} = 1.15$ $p = 0.28$ and interaction $F_{1,44} = 0.48$ $p = 0.49$ but a significant age effect $F_{1,44} = 9.36$ $p < 0.005$. Post hoc analysis showed that motility increased during 14 days saline treatment either in males or females and this increase was prevented by ATO treatment in males but not in female SHR.

Discussion: This study shows that either sub-chronic MP or ATX have a significant effect on locomotion in adolescent male SHR but not in female SHR. Interestingly, these drugs prevented the increase in hyperactivity observed between the 28th and the 42nd PND. Female SHR showed a more intense locomotion than males. Moreover, a similar increase with age but no significant drug effect was observed in female SHR although a tendency to locomotion reduction was observed after sub-chronic ATO. Paradoxically sub-chronic MP in female SHR showed a tendency to a further increase in locomotion. Our data is partially in agreement with a recent report showing that MP but not ATO reduced locomotion in NHE rats, a further animal model of ADHD (Ruocco et al. 2010). It is noteworthy that Ruocco's study used a single administration per day of 1 mg of MP and 1 mg of ATO. In conclusion, this study supports previous evidence suggesting that the SH rats are a suitable animal model for testing drugs with therapeutic potential for ADHD but also suggests that further investigations are needed to elucidate the role of dosage, frequency and route of administration in studies on the mechanism of action of ADHD drugs.

References

1. Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW (2002). Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*. **27**:699-711.
2. Heal DJ, Cheetham SC, Smith SL (2009) The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology* **57** 608-618
3. Sagvolden T, Johansen EB, Wøien G, Walaas SI, et. al. and Faraone SV (2009). The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the

appropriate reference strain. *Neuropharmacology*. **57**:619-626.

4. Carboni E, Silvagni A, Valentini V, Di Chiara G (2003). Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. *Neurosci Biobehav Rev*. **27**:653-659.
5. Ruocco LA, Carnevale UA, Treno C, Sadile AG, Melisi D, Arra C, Ibba M, Schirru C, Carboni E. (2010) Prepuberal subchronic methylphenidate and atomoxetine induce different long-term effects on adult behaviour and forebrain dopamine, norepinephrine and serotonin in Naples high-excitability rats. *Behav Brain Res*. **210**:99-106.

Effects of sub-chronic methylphenidate and atomoxetine on noradrenaline and dopamine transmission in the prefrontal cortex of adolescent SH rats, an animal model of ADHD

Ibba Marcello and Carboni Ezio. (2010)

Monitoring Molecules in Neuroscience, Westerink B, Clinckers R, Smolders I, Sarre S, Michotte Y Eds, Vrije Universiteit Press, Brussel Belgium pp 108-110. ISBN/EAN 978-90-90255672-2

Introduction: Among therapeutic treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), the psycho-stimulant methylphenidate (MP), is the classic treatment while atomoxetine (ATO), a selective noradrenaline (NA) reuptake inhibitor, has been proposed successfully as an alternative to stimulant treatment (Heal et al. 2009). Spontaneous hypertensive rats (SHR), because they show several behavioural abnormalities (hyperactivity, hyper-reactivity to stress and cognition deficit) have been proposed as an animal model of ADHD (Sagvolden et al. 2009). The aim of this study was to assess, through the “in vivo” microdialysis method, the basal and stimulated extracellular concentration of dopamine (DA) and NA in the prefrontal cortex (PFC) of adolescent SHR rats, after 14 day treatment with MP 1 mg/kg i.p. or ATO 3 mg/kg i.p. or saline (sal).

Methods: Animals: Male SHR (Charles River Italy). Treatment: at 8 a.m and 8 p.m. for 14 days beginning at PND 29. Probe Preparation: Concentric microdialysis probes were prepared with AN 69 (sodium methallyl sulfate copolymer) dialysis fiber (310 mm o.d. 220 mm i.d. Hospal, Dasco, Italy).

Surgery: Rats were implanted, under chloral hydrate anesthesia, in the medial PFC [Anterior (A): 2.8, Lateral (L): 0.6, Vertical (V): - 3.5], according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). Experiments: were performed on freely moving rats 24 hr after probe implant. Ringer’s solution (147 mM, NaCl; 2.2 mM CaCl₂; 4 mM KCl) was used (flow: 1 ml/min). Analytical procedure: Dialysate samples of 20 ml were analyzed by an HPLC apparatus equipped with C-8 reverse phase column (Symmetry Waters) and a coulometric detector (first electrode + 125 mV, second electrode – 175 mV) (ESA Coulochem II, Bedford, MA) to quantitate DA or NA (sensitivity 5 fmoles). Mobile phase was: 0.1 sodium acetate, 0.3 mM Na₂EDTA, 1.8 mM octane sulfonic acid 120 mL/L (vol./vol.) methanol, pH 5.4 (flow rate: 1.0 ml/min). Histology: Fiber position was ascertained and results from rats implanted outside the prefrontal cortex were discarded. Statistics: Two way ANOVA (Statistica Statsoft USA).

Results The treatment with MP or ATO did not modify basal levels of NA (23.6 ± 2.6; 22.6 ± 3.3; 23.8 ± 4.3) or DA (12.1 ± 3.9; 14.8 ± 3.1; 11.5 ± 2.0). Data is expressed in fmol/20 µL for sal, MP and ATO treated rats respectively. Fig. 1 (A) shows that a challenge dose of MP (1mg/Kg i.p.) or ATO (3 mg/Kg i.p.) significantly increased the output of NA. The maximal increase of NA determined

by MP or ATO, 250 % and 280 % above basal respectively (not shown) were comparable, although the AUC of the effect of ATO in sal treated rats is significantly higher than that of MP ($F_{4,31} = 10.74$ $p < 0.0001$).

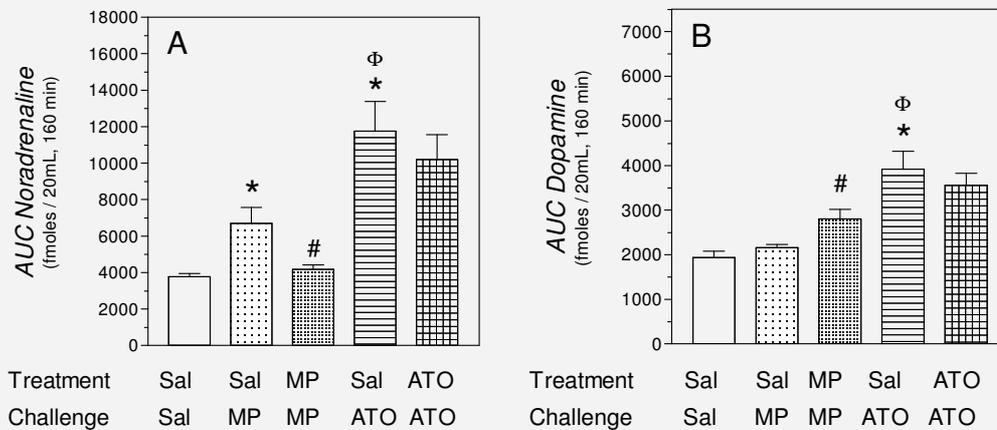


Figure 1. Effect of challenge dose of saline, MP or ATO on NA output (A) or DA output (B), in the PFC of SHR. Columns represent the AUC (area under curve) of cumulative output in fmol/20 μ L during a 3 h sampling after drug administration. * $p < 0.05$ versus saline, # $p < 0.05$ versus the same challenge in saline treated rats. Φ $p < 0.05$ versus MP effect in saline treated rats.

Fig. 1 (B) shows that a challenge dose of ATO significantly increased the output of DA. The maximal increase of DA determined by MP or ATO in sal treated rats were 50 % and 175 % (not shown), above basal respectively. MP challenge increased DA output in MP treated rats (significantly), as compared with sal treated rats. The increase of DA output induced by a challenge of ATO did not differ between sal and ATO treated rats, although was significantly higher than that of sal or that of MP in sal treated rats. **Discussion:** This study shows that the response of NA and DA transmission in the PFC of adolescent SHR after repeated treatment is different from that observed after acute administration. In particular it is surprising the complete tolerance to the effect of MP on NA transmission. These data may help to better clarify the dependence of MP therapy on the formulation, in fact ATO therapy is superior to standard MP therapy but inferior to extended release MP therapy (Garnock and Keating 2009). On the other hand these data supports the role of non-specific DA reuptake from NA neurons in the PFC (Carboni et al. 2006), in fact the increase of DA consequent to a specific blockade of NA reuptake carrier by ATO is superior to that produced by MP and seems that is not affected by tolerance. The rather similar properties of MP and ATO, on NA reuptake, suggests that the different effects on catecholamine transmission in the PFC might also be affected by the peculiar property of MP in increasing DA transmission in basal ganglia areas (Carboni et al. 2003; Heal et al. 2008). At last, these data confirm that the effects of MP or ATO may be strictly dependent on the animal model used, but also on the age of the animal, suggesting that the therapeutic effects of ADHD drugs may be related to modification of the developmental process that occurs in childhood and adolescence.

References

1. Heal DJ, Cheetham SC, Smith SL (2009) The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology* 57 608-618
2. Sagvolden T, Johansen EB, Wøien G, Walaas SI, et. al. and Faraone SV (2009). The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the

- appropriate reference strain. *Neuropharmacology*. **57**:619-626.
3. Garnock-Jones KP, Keating GM. (2010) Spotlight on atomoxetine in attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. *CNS Drugs*. **24**:85-88.
 4. Carboni E, Silvagni A, Vacca C, Di Chiara G. (2006) Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *J Neurochem*. **96**:473-481.
 5. Carboni E, Silvagni A, Valentini V, Di Chiara G (2003).Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. *Neurosci Biobehav Rev*. **27**:653-659.
 6. Heal DJ, Smith SL, Kulkarni RS, Rowley HL (2008) .New perspectives on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. *Pharmacol Biochem Behav*. **90**:184-97