



Università degli studi di Sassari

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili

Sezione di Farmacologia

(Direttore: Prof.ssa Maria Speranza Desole)

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze XXI Ciclo

Studio della trasmissione dopaminergica e del metabolismo energetico striatale in modelli animali di Parkinson

Tutor:

Prof. Pier Andrea Serra

Coordinatore:

Prof. Egidio Miele

Tesi di dottorato del Dott. Gianfranco Bazzu

Anno Accademico 2007-2008

1.	Introduzione	3
1.1.	La malattia di Parkinson.....	4
1.2.	La via nigro-striatale e la sinapsi dopaminergica.....	6
1.3.	Eziopatogenesi della malattia di Parkinson.....	9
1.3.1.	Fattori genetici.....	9
	<i>Parkina</i>	10
	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1)</i>	10
	<i>DJ-1</i>	11
	<i>α-sinucleina</i>	11
1.3.2.	Fattori ambientali	12
	<i>Rotenone</i>	13
	<i>Paraquat</i>	13
	<i>Metalli di transizione</i>	14
	<i>6-idrossidopamina (6-OHDA)</i>	16
	<i>1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)</i>	16
1.4.	Modelli sperimentali di Parkinson	19
	<i>Rotenone</i>	20
	<i>Paraquat</i>	20
	<i>6-OHDA</i>	21
	<i>MPTP</i>	22
	<i>α-sinucleina</i>	24
1.5.	Sistema antiossidante neuronale	25
1.6.	Metabolismo energetico neuronale	27
1.7.	Tecniche di monitoraggio neurochimico in vivo	28
1.7.1.	<i>Lo spazio extracellulare</i>	28
1.7.2.	<i>Microdialisi</i>	28
1.7.3.	<i>Principio della microdialisi</i>	29
1.7.4.	<i>Fattori che influenzano la microdialisi</i>	30
2.	Scopo della Ricerca.....	32
3.	Materiali e Metodi.....	34
3.1.	Sostanze chimiche e soluzioni	35
3.2.	Animali.....	35
3.3.	Costruzione della sonda microdialitica	36
3.3.1	<i>Sonda singola intrastriatale</i>	36
3.3.2	<i>Sonda doppia intrastriatale</i>	37
3.4.	Chirurgia stereotassica	38
3.5.	Microdialisi	39
3.5.1	<i>Procedura microdialitica</i>	39
3.5.2	<i>Swivel e Swivel GB1sw</i>	40
3.5.3	<i>Trattamento sub-acuto con MPTP in topi C57BL/6</i>	42
3.5.4	<i>Trattamento sub-cronico con MPTP in topi C57BL/6</i>	42
3.5.5	<i>Trattamento con dosi a scalare di MPTP in ratti Wistar</i>	42
3.5.6	<i>Trattamento con d-amfetamina in ratti Wistar</i>	42
3.5.7	<i>Trattamento con α-sinucleina in ratti Wistar</i>	43
3.5.8.	<i>Tecnica del doppio flusso asimmetrico microdializzante</i>	43
3.6.	Istologia.....	44

3.7. Preparazione ed analisi neurochimica tissutale di campioni di striato e brainstem	45
3.8. Analisi dei campioni di microdializzato	45
3.8.1 <i>Analisi Cromatografica</i>	45
3.8.2 <i>Analisi Spettrofotometrica</i>	46
3.9. Forced swim test	48
3.10. Analisi statistica	48
4. Risultati	49
4.1 Effetti del trattamento sub-acuto con MPTP in topi C57BL/6	50
4.1.1. <i>Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DA e 3-MT tissutali nello striato e SNpc</i>	50
4.1.2. <i>Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DOPAC e HVA tissutali nello striato</i>	51
4.1.3. <i>Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su AA e DHAA tissutali nello striato e SNpc</i>	53
4.1.4. <i>Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su 5-HT e 5-HIAA tissutali nello striato</i>	55
4.2 Effetti di un trattamento sub-cronico con MPTP in topi C57BL/6.....	57
4.2.1. <i>Effetto del trattamento sub-cronico con MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale</i>	57
4.2.2. <i>Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale</i>	58
4.2.3. <i>Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DOPAC e HVA nel dializzato striatale</i>	59
4.2.4. <i>Effetto di una “dose challenge” di MPTP su AA nel dializzato striatale</i> 60	
4.2.5. <i>Effetto di una “dose challenge” di MPTP su Forced Swim Test</i>	62
4.3 Metabolismo e neurochimica energetico striatale in ratti Wistar.....	62
4.3.1. <i>Determinazione sperimentale del doppio flusso asimmetrico microdializzante</i>	63
4.3.2. <i>Effetto dell’MPTP sul metabolismo energetico nel dializzato striatale</i> ... 64	
4.3.3. <i>Effetto dell’MPTP su acido ascorbico, DA e suoi metaboliti nel dializzato striatale</i>	67
4.3.4. <i>Effetto di una singola dose di d-amph su DA e metabolismo energetico nel dializzato striatale</i>	68
4.4 Effetti di un trattamento con α -sinucleina in ratti Wistar	70
4.4.1. <i>Effetto di un trattamento con TAT-α-synA30P su DA nel dializzato striatale</i>	70
4.4.2. <i>Effetto della nicotina sul release di DA nel dializzato striatale</i>	71
5. Discussione	74
Conclusioni	83
6. Riassunto	85
Bibliografia	87

1. Introduzione

1.1. La malattia di Parkinson

Descritta per la prima volta da James Parkinson nel “Trattato sulla paralisi agitante” pubblicato nel 1817, la malattia di Parkinson (Parkinson’s Disease, PD) è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva (Parkinson, 1817). È causata dalla perdita della via nigro-striatale (**figura 1**) dovuta all’alterazione dei processi di degradazione delle proteine nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNpc) di Sömmering, un nucleo situato a livello del mesencefalo in cui viene prodotta la dopamina (DA), un neurotrasmettitore essenziale per il controllo del movimento (**figura 2**). Questa patologia è generalmente legata all’avanzare dell’età e con una leggera prevalenza nel sesso maschile; l’età media di insorgenza è intorno ai 60-70 anni, anche se il 4% dei pazienti presenta uno sviluppo precoce della malattia (prima dei 50 anni) (de Rijk et al., 2000; Twelves, D. et al., 2003; Van Den Eeden et al., 2003) . La sintomatologia clinica del PD si manifesta quando si ha la perdita di almeno il 60% dei neuroni dopaminergici della SNpc e circa 80% di deplezione di dopamina nello striato (Dauer and Przedborski, 2003). La maggior parte dei disturbi interessa il circuito riverberante dei nuclei della base del sistema extrapiramidale implicato nella regolazione delle attività motorie causando nei pazienti parkinsoniani:

1. ipocinesia (bradicinesia ed acinesia);
2. rigidità muscolare del tronco e degli arti;
3. tremore a riposo;
4. amimia;
5. instabilità posturale.

Sintomi demenziali si riscontrano nel 30% dei casi e sono caratterizzati da disorientamento, confusione e perdita di memoria.

Nei riscontri autoptici dei pazienti affetti da PD si rilevano la perdita dei neuroni dopaminergici, la depigmentazione della SNpc e il rinvenimento di corpi di Lewy nelle cellule della *substantia nigra*.

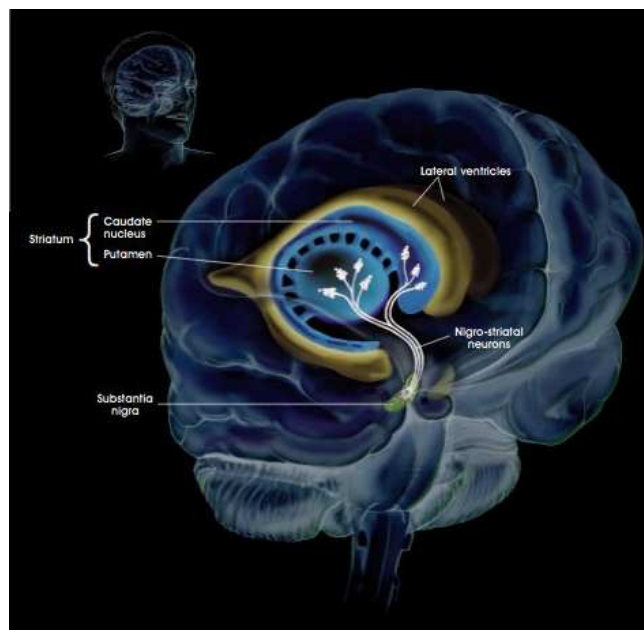


Figura 1. La via dopaminergica nigro-striatale.

Il morbo di Parkinson è una malattia ad eziologia complessa e multifattoriale e le cause della sua insorgenza si possono distinguere in:

1. fattori genetici: danno un quadro patologico definito Parkinson familiare;
2. fattori ambientali: danno un quadro patologico definito Parkinson sporadico.

La terapia farmacologia del PD è quasi esclusivamente sintomatica e si basa principalmente sulla somministrazione della L-3,4-dihydroxyphenylalanine (levodopa, L-Dopa). La levodopa, introdotta nel 1967, è il precursore metabolico della dopamina; somministrata per via orale è rapidamente assorbita dall'intestino tenue e viene convertita in DA all'interno dei neuroni dopaminergici.

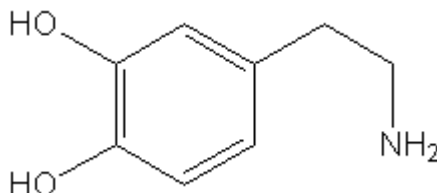


Figura 2. Struttura molecolare della dopamina, il principale neurotrasmettitore implicato nella malattia di Parkinson.

La L-Dopa viene generalmente somministrata in associazione ad un inibitore delle decarbossilasi periferiche, questo previene una sua precoce conversione nel circolo periferico e aumenta la disponibilità del farmaco che raggiunge il sistema nervoso centrale (CNS). Inoltre la dopamina rilasciata in circolo dalla decarbossilazione periferica della levodopa produce effetti indesiderati tra i quali la nausea ed effetti cardiovascolari.

Negli stadi precoci della malattia il grado di miglioramento dei sintomi può essere completo. La principale limitazione all'uso a lungo termine della L-Dopa è l'apparente perdita, col tempo, della capacità di controllare il deficit dopaminergico; questo comporta drammatiche fluttuazioni dello stato motorio del paziente a seguito di ciascuna dose del farmaco portando, negli stadi avanzati, a una situazione chiamata *fenomeno on/off*.

Gli agonisti diretti dei recettori dopaminergici striatali e gli inibitori degli enzimi responsabili del metabolismo della levodopa e della dopamina, sono l'alternativa alla terapia con L-Dopa.

1.2. La via nigro-striatale e la sinapsi dopaminergica

La via nigro-striatale è un circuito nervoso motorio extrapiramidale dei nuclei della base del telencefalo che collega la *substantia nigra* al corpo striato. Dalla SNpc, dove risiedono i corpi cellulari dei neuroni, si estendono delle efferenze verso il corpo striato dove si trovano i terminali assonici dopaminergici. Oltre alle afferenze nigrali, giungono al corpo striato proiezioni dai nuclei motori del talamo e da tutte le aree della corteccia e qui, attraverso diversi neurotrasmettitori, vengono regolate le attività motorie. La perdita dei neuroni dopaminergici nigrali, come accade nel Parkinson, causa un deficit di DA nello striato e, di conseguenza, riduzione di eccitazione della corteccia motoria da parte del talamo.

La perdita dell'equilibrio nei rapporti tra neurotrasmettitori provoca la comparsa della sintomatologia clinica nei pazienti: uno squilibrio tra DA e GABA (acido amino- γ -butirrico) è alla base dei disturbi di ipocinesia, mentre la rigidità e il tremore a riposo sono dovuti al mancato feedback della dopamina nei confronti dell'acetilcolina.

La dopamina, il principale neurotrasmettitore di questa via, fa parte della famiglia delle catecolamine ed è implicata oltre che nel Parkinson (Serra et al., 2003a; Rocchitta et al., 2004; Rocchitta et al., 2005) anche nelle funzioni cognitive (O'Neill, 2005) e nella via della ricompensa (Wightman and Robinson, 2002). Le sue variazioni neurochimiche sono state ampiamente studiate utilizzando differenti tecniche, come la microdialisi (Serra et al., 2003b; Chiou et al., 2007) e la voltammetria (Gordito et al., 2003; Yavich and Tiihonen, 2000) sia *in vivo* che *in vitro*.

Nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* viene espresso il gene per la *tirosina idrossilasi* (Tyrosine Hydroxylase, TH), questo enzima converte l'aminoacido tirosina in L-Dopa. Nel terminale assonico striatale la levodopa, mediante la perdita di un gruppo carbossilico, viene trasformata in DA ad opera di una decarbossilasi degli L-aminoacidi aromatici. Qui la dopamina viene concentrata all'interno delle vescicole presinaptiche e rilasciata in risposta ad un potenziale d'azione. La DA liberata nel vallo sinaptico si lega ai recettori postsinaptici D1 e D2 striatali per esplicare la sua funzione fisiologica. L'eccesso di dopamina presente nella sinapsi va incontro sia a processi di reuptake, dove la DA viene riportata all'interno del terminale presinaptico tramite il trasportatore DAT (dopamine transporter) e rivescicolata, sia a processi di catabolismo in cui viene inattivata.

La dopamina ricaptata all'interno del terminale presinaptico e non rivescicolata viene inattivata mediante ossidazione enzimatica dalle monoamino ossidasi mitocondriali (MAO) con produzione di DOPAC intracellulare, il quale poi diffonde nel vallo sinaptico. Nella membrana del terminale postsinaptico sono localizzati sia i recettori D1 e D2 sia gli enzimi deputati al catabolismo della DA presente nello spazio extracellulare denominati COMT (catecol-O-metil transferasi) che trasformano la dopamina in 3-MT (3-metossitiramina) e il DOPAC in acido omovanillico (HVA). La 3-MT così prodotta entra nel neurone presinaptico dove, ad opera delle MAO, viene convertita in HVA che è dunque il prodotto finale del metabolismo enzimatico della DA. (**figura 3**). In condizioni di stress ossidativo, una notevole quantità di DA extracellulare viene convertita in DA-ortoquinone con una reazione di auto-ossidazione. Il neurotrasmettitore norepinefrina (NE) è sintetizzata a partire dalla DA

ad opera dell'enzima DA-β-idrolasi, nel CNS è implicata in una ampia varietà di funzioni fisiologiche e neurologiche tra cui la regolazione del metabolismo energetico cerebrale. La NE infatti modula il rilascio del glucosio dalle riserve astrocitarie attraverso la stimolazione dei recettori β-adrenergici che inducono la glicogenolisi in queste cellule (Fillenz et al., 1999).

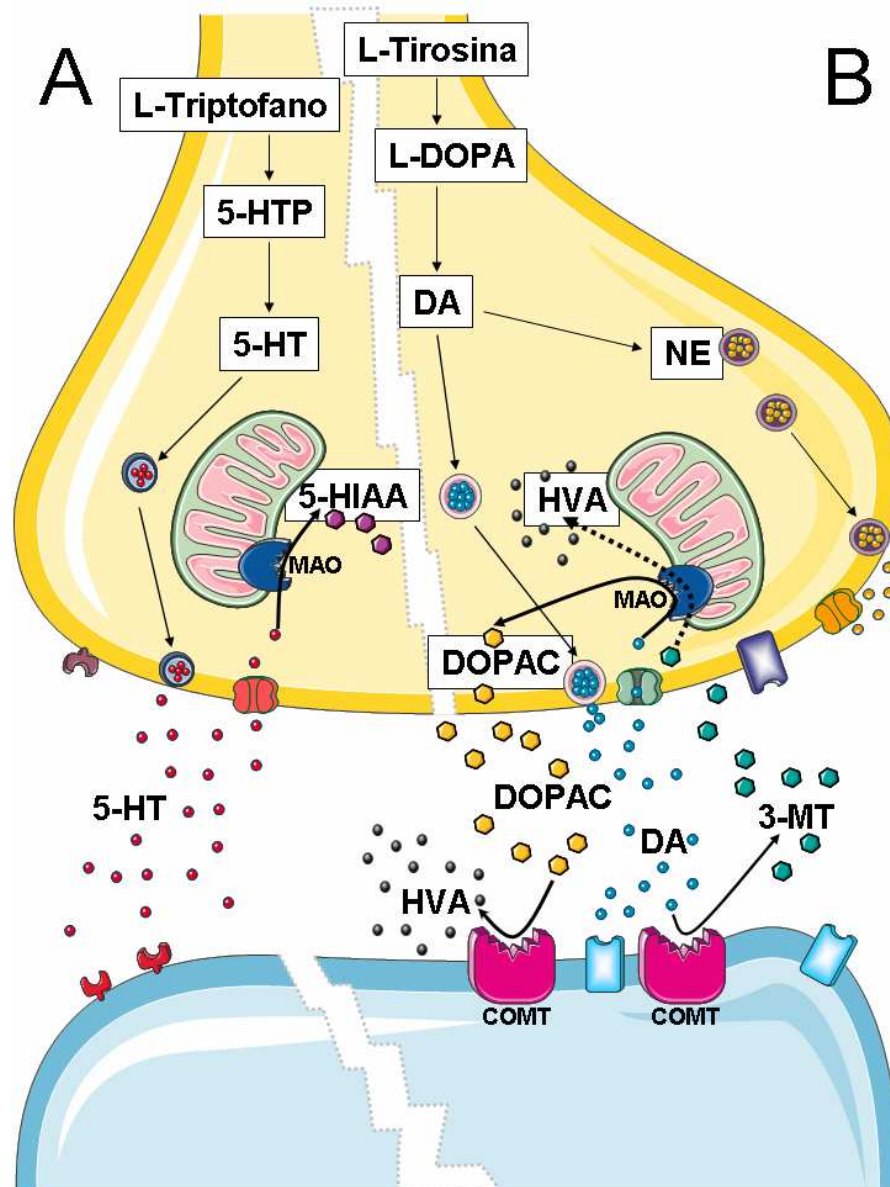


Figura 3. Rappresentazione schematica delle sinapsi striatali serotoninergica (A) e dopaminergica (B). metabolismo e catabolismo cerebrale della serotonina e della dopamina.

1.3. Eziopatogenesi della malattia di Parkinson

L'eziopatogenesi del PD è sconosciuta, tutt'ora si dibatte sul ruolo dei fattori ambientali e quelli genetici nell'insorgenza della malattia. L'ipotesi dei fattori ambientali è stata quella predominante nel secolo scorso, dovuta soprattutto alla scoperta del parkinsonismo indotto da MPTP e dagli esempi di PD post-encefalico. La scoperta di geni implicati nel PD, studi del 1980, hanno rinnovato l'interesse verso i fattori di suscettibilità genetica ereditaria. Probabilmente entrambi sia i fattori ambientali che quelli genetici giocano un ruolo nella causa scatenante del Parkinson. Un'altra possibilità, che non rientra nei fattori genetici nè in quelli ambientali, è che neurotossine endogene siano responsabili della neurodegenerazione nel PD. L'alterazione del normale metabolismo può creare sostanze tossiche a causa dell'esposizione a rischi ambientali o vie metaboliche modificate (Dauer and Przedborski, 2003).

Qualunque sia l'insulto che innesca la neurodegenerazione, gli studi sui modelli di Parkinson suggeriscono due ipotesi principali per la patogenesi della malattia:

1. **“Misfolding and Aggregation of Proteins”**: mal ripiegamento e aggregazione delle proteine;
2. **“Mitochondrial dysfunction and oxidative stress”**: disfunzione mitocondriale e stress ossidativo.

1.3.1. Fattori genetici

Gli studi riguardanti il Parkinson familiare sono riconducibili all'ipotesi del **Misfolding and Aggregation of Proteins** (Dauer and Przedborski, 2003). Infatti tutti i geni coinvolti nel PD quali α -sinucleina, DJ-1, parkina and ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) risultano implicati più o meno direttamente nell'alterazione del complesso UPS (Ubiquitine Proteasome System). Il complesso UPS, in condizioni fisiologiche, è deputato alla degradazione delle proteine mutate, danneggiate o mal ripiegate (McNaught and Olanow, 2003); il suo malfunzionamento ha come risultato l'accumulo di proteine anomale che non possono essere rimosse e la loro successiva aggregazione forma delle inclusioni insolubili (*corpi di Lewy*) che determinano l'alterazione dell'omeostasi e l'integrità

cellulare. I corpi di Lewy (LBs) sono aggregati sferici di numerose proteine citoplasmatiche eosinofile (Forno, 1996; Spillantini et al., 1998) necessari per la diagnosi definitiva del PD, ma riscontrabili anche in altre patologie del sistema nervoso centrale chiamate α -sinucleopatie tra cui la malattia di Alzheimer in una condizione detta “*demenza con corpi di Lewy*” (Gibb and Lees, 1988; Recchia et al., 2004).

Parkina

Mutazioni nel gene codificante la Parkina determinano la forma familiare recessiva di Parkinson (Kitada et al., 1998). Nonostante queste mutazioni si riscontrino in pazienti con insorgenza precoce della malattia (circa 30 anni, e per questo era stata chiamata “*autosomal recessive juvenile parkinsonism*” o “AR-JP”), include anche pazienti con insorgenza tardiva della malattia (Lincoln et al., 2003). La parkina è una E3 ubiquitin ligasi (Zhang et al., 2000; Shimura et al., 2000), una componente del complesso UPS che identifica e lega le proteine al proteosoma affinché vengano degradate (Sherman and Goldberg, 2001). La mutazione presso il locus PARK2 (6q25.2-q27 nel cromosoma 6) non consente alla parkina di legare le proteine da eliminare che in questo modo si accumulano nel citoplasma.

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1)

La mutazione dominante (I93M) in UCHL-1 è stata identificata in una famiglia con PD ereditario (Leroy et al., 1998). Questo enzima è implicato nel riciclo della catena di poliubiquitina legata alle proteine in fase di degradazione, catalizzando l'idrolisi dei monomeri e rendendoli disponibili per successive proteolisi (Wilkinson, 2000). La mutazione sul locus PARK 5 (q14;q15.1 nel cromosoma 14) riduce la possibilità di avere monomeri di ubiquitina disponibili per le successive proteolisi, che risultano compromesse.

DJ-1

Il gene per DJ-1 si trova sul cromosoma 1 (p36) e codifica per una proteina di 189 amminoacidi a localizzazione in parte citoplasmatica e in parte mitocondriale (Lee and Liu, 2008; Shendelman et al., 2004). Sinora non si conosce la sua reale funzione fisiologica; desta però particolare interesse il possibile utilizzo come proteina anti-ossidante o come sensore dello stress ossidativo (Mitsumoto and Nakagawa, 2001; Mitsumoto et al., 2001); in questo contesto, pare avere un ruolo importante la Cys106, anche se il meccanismo molecolare ancora non è stato chiarito. Infine, DJ-1, tramite la sua funzione di *chaperone* molecolare sensibile allo stress ossidativo, sembra essere in grado di limitare l'aggregazione dell' α -sinucleina nei neuroni (Shendelman et al., 2004).

α -sinucleina

Due mutazioni a carico del gene codificante per l' α -sinucleina [Ala⁵³ \rightarrow Thr (A53T) e Ala³⁰ \rightarrow Pro (A30P)] sono responsabili della forma autosomica dominante della malattia (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger et al., 1998). L' α -sinucleina è particolarmente espressa nel tessuto cerebrale, in particolare nel corpo cellulare e nei terminali presinaptici neuronali (Maroteaux et al., 1988; George et al., 1995). La funzione della α -sinucleina non è ancora nota, anche se è stata suggerita una sua funzione nei meccanismi di trasporto delle vescicole sinaptiche (Kahle et al., 2002). Nelle terminazioni striatali dopaminergiche è coinvolta nella modulazione delle funzioni sinaptiche probabilmente attraverso la regolazione della velocità con cui il pool di neurotrasmettitori è disponibile ad un nuovo rilascio (Abeliovich et al., 2000). Sia l' α -sinucleina normale che quella mutata, in condizioni fisiologiche, sono proteine non ripiegate (Recchia et al., 2004) ed entrambe hanno la tendenza a formare fibrille amiloidi (Conway et al., 1998; Giasson et al., 1999) e protofibrille (Conway et al., 1998). L'evidenza che le due mutazioni promuovono la formazione di protofibrille (Conway et al., 2000), induce ad identificare in queste le responsabili della tossicità della α -sinucleina. In accordo con questa ipotesi e con l'associazione della α -sinucleina con le vescicole sinaptiche, alcuni studi hanno riportato che le

protofibrille potrebbero spiegare un effetto tossico attraverso la permeabilizzazione delle membrane delle vescicole stesse (Volles et al., 2001; Lashuel et al., 2002), permettendo così alla DA di diffondere nel citoplasma e partecipare a reazioni che generano stress ossidativo. Il ritrovamento dell' α -sinucleina nei LBs, di cui è la principale componente, suggerisce che la sua sovra-espressione e la sua propensione al mal ripiegamento e formazione di fibrille amiloidi possa essere la causa della sua neurotossicità in situazioni patologiche come il Parkinson, e che le mutazioni incrementino la possibilità di questa funzione tossica.

1.3.2. Fattori ambientali

Molti casi di malattia di Parkinson si manifestano sporadicamente senza cause evidenti, si pensa che il PD insorga come risultato di una complessa interazione tra fattori ambientali e predisposizione genetica. L'esposizione a sostanze come rotenone, paraquat, metalli di transizione, 6-idrossidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) sono tra le principali cause dell'insorgenza del parkinsonismo sporadico. La tossicità di questi composti è riconducibile all'ipotesi **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress**. L'idea che un deficit nella fosforilazione ossidativa potesse avere un ruolo nella patogenesi del PD, è nata quando si è scoperto che l' MPTP inibiva il complesso I della catena di trasporto elettronico mitocondriale (Nicklas et al., 1987), studi successivi identificarono delle anomalie nell'attività del complesso I nei pazienti parkinsoniani (Greenamyre et al., 2001). Circa il 100% dell'ossigeno molecolare è consumato dalla respirazione mitocondriale, durante la quale vengono normalmente ottenuti potenti ossidanti, quali il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), come sottoprodotti delle reazioni. L'inibizione del complesso I incrementa la produzione di $O_2^{\bullet-}$, il quale può dare luogo alla formazione di radicali idrossilici o reagire con l'ossido nitrico per formare il perossinitrito. Questi radicali possono causare danno cellulare reagendo con gli acidi nucleici, le proteine e i lipidi. Uno dei target di queste molecole sembra essere la stessa catena di trasporto elettronico (Cohen, 2000) che provoca una disfunzione mitocondriale e un'ulteriore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La presenza dei ROS inoltre, può aumentare la quantità di proteine mal ripiegate, incrementando la richiesta del complesso UPS per rimuoverle. I neuroni

dopaminergici sono un fertile terreno per la produzione di ROS, poiché il metabolismo della dopamina produce H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, e l'auto-ossidazione della DA produce DA-chinone (Graham, 1978) una molecola che reagendo con i residui di cisteina danneggia le proteine. La deplezione energetica che consegue al danno mitocondriale, porta alla liberazione degli store di DA dalle vescicole sinaptiche che, riversata nel citoplasma, produce e amplifica pericolose reazioni verso le macromolecole cellulari. Quindi la DA potrebbe essere il motivo principale della particolare suscettibilità agli insulti ossidativi dei neuroni della SNcp.

Rotenone

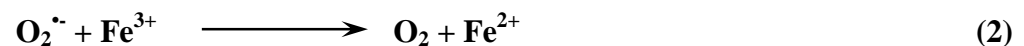
È un composto citotossico di derivazione naturale estratto dalle radici di alcune piante tropicali, e ampiamente utilizzato come insetticida e piscicida (Bovè et al., 2005). Il rotenone è altamente lipofilico (figura 6), si diffonde rapidamente in tutti gli organi (Talpade et al., 2000) e attraversa liberamente le membrane cellulari e può essere accumulato all'interno dei mitocondri. Nei mitocondri, il rotenone danneggia la fosforilazione ossidativa legandosi e inibendo l'attività NADH-ubichinone reduttasica del complesso I. Può inoltre inibire la formazione dei microtubuli di tubulina. Poiché un eccesso di monomeri di tubulina possono rivelarsi tossici per le cellule, questo effetto potrebbe essere rilevante nel meccanismo di degenerazione dei neuroni dopaminergici (Bovè et al., 2005).

Paraquat

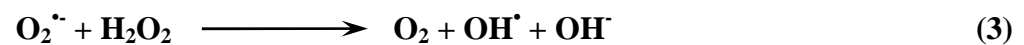
Il diserbante paraquat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinio), è un'altra molecola che può indurre parkinsonismo e si pensa possa essere una tossina ambientale. La sua tossicità risulta legata alla formazione del radicale $O_2^{\bullet-}$ (Day et al., 1999) e finora sono stati riscontrati diversi casi di decessi dovuti ad ingestione o ad esposizione al paraquat. Nonostante la sua struttura (figura 6) non consenta una facile diffusione attraverso la barriera ematoencefalica (BBB), sono stati riscontrati danni cerebrali in persone decedute a causa di una intossicazione da paraquat.

Metalli di transizione

Come già accennato, i neuroni della SNpc sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo anche in condizioni fisiologiche a causa del metabolismo dopaminergico. Questa condizione risulta incrementata nei pazienti affetti da PD, in quanto gli alti livelli di ferro bivalente (Fe^{2+}) normalmente riscontrabili nella *sustantia nigra* reagiscono con la H_2O_2 prodotta dalle MAO causando la formazione di radicali irossilici (OH^\bullet) e anioni superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), altamente citotossici, mediante le reazioni di Fenton



e la reazione di Haber-Weiss



Entrambe le reazioni avvengono solo in presenza di ferro non legato alla ferritina. L'insorgere dei processi infiammatori e la conseguente attivazione della microglia, nei pazienti affetti da Parkinson, hanno effetti devastanti sull'ambiente cellulare. Il rilascio di citochine durante l'infiammazione, porta all'attivazione delle ossidonitrico sintasi inducibili (iNOS), le quali danno inizio ad una massiva produzione di ossidonitrico (NO). La neurotossicità dell'NO può essere spiegata attraverso due meccanismi differenti: il primo attraverso sua reazione con l'anione superossido e la formazione di perossinitrito, un composto altamente tossico che induce la nitrosilazione delle tirosine nelle proteine cellulari; il secondo attraverso l'alterazione dell'omeostasi del ferro. È stato infatti dimostrato che il NO induce il distacco del ferro dalla ferritina, con il conseguente accumulo di Fe^{2+} libero nel citosol e che può quindi dar luogo alle reazioni di Fenton e Haber-Weiss ([Hunot and Hirsch, 2003](#)). Inoltre la neuromelanina (NM), sito di accumulo-riduzione del ferro nella SNpc, è in grado di legare i metalli di transizione come il Fe, promuoverne la riduzione e generare, quindi, lo stato di valenza utile per la reazione di Fenton ([Ben Shachar et](#)

al., 1991) o la reazione di Haber-Weiss. La somministrazione di deferoxamina, un chelante selettivo per il Fe^{2+} , è in grado di prevenire le succitate reazioni di ossidoriduzione ed ha dimostrato espletare un ruolo protettivo *in vitro* su colture cellulari dopaminergiche (Desole et al., 1998). Questi processi catalitici possono richiedere l'intervento di specie endogene riducenti, quali altri metalli di transizione (Cu e Mn) oltre alla neuromelanina (Zecca et al., 2000; Zecca et al., 2001b). La NM prodotta dai neuroni dopaminergici è il risultato dell'auto-ossidazione della dopamina e rappresenta la principale fonte di ferro intraneuronale (Connor et al., 1990; Zecca et al., 2001a). Agendo, quindi, da deposito endogeno di Fe, riveste un ruolo importante nella difesa dai radicali liberi. Nonostante ciò, in presenza di alte concentrazioni di Fe, la NM sembra agire da pro-ossidante piuttosto che da anti-ossidante (Ben Shachar et al., 1991). Questo paradosso è da attribuire al legame Fe-melanina, in quanto la variazione dello stato di ossidazione del Fe permette la formazione del radicale idrossilico (Double et al., 1999; Mochizuki et al., 1993). A dimostrazione di ciò si è visto che incubando *in vivo* NM e Fe il danno ossidativo aumenta invece che decrescere (Ben Shachar et al., 1991). Nei neuroni dopaminergici il danno selettivo è quindi correlato alla presenza di complessi Fe-NM che, in certe condizioni, possono indurre stress ossidativo ed effetti neurotossici.

Una intossicazione da manganese può indurre nell'uomo una sindrome simile alla malattia di Parkinson clinicamente evidenziata in minatori cileni cronicamente esposti al metallo (Elbaz and Moisan, 2008). Esperimenti condotti su cellule PC12, una linea tumorale in grado di produrre e secernere DA, hanno dimostrato che il manganese (Mn) è in grado di indurre apoptosi (Desole et al., 1997) in questa linea cellulare, inoltre studi *in vitro* (Migheli et al., 1999) e *in vivo* (Serra et al., 2000) hanno dimostrato che l'associazione di concentrazioni sub-tossiche del Mn incrementano la citotossicità della L-DOPA.

L'aumento dell'auto-ossidazione della L-DOPA e della DA sono state suggerite come meccanismo d'azione nella potenziata tossicità del manganese, la quale tuttavia viene inibita dalla somministrazione di N-acetilcisteina (NAC) e acido ascorbico.

6-idrossidopamina (6-OHDA)

È stato il primo modello animale di PD associato alla perdita di neuroni dopaminergici (Ungerstedt, 1968). La 6-OHDA (**figura 6**) è un analogo idrossilato della DA e mostra una elevata affinità sia per i trasportatori della dopamina (DAT) che della norepinefrina (NET) (Luthman et al., 1989). Grazie a questa caratteristica la 6-OHDA può entrare nei neuroni dopaminergici e noradrenergici danneggiando la via catecolaminergica del sistema nervoso centrale e di quello periferico. Il meccanismo d'azione, attraverso cui questa tossina distrugge le strutture catecolaminergiche, è un effetto combinato dovuto alla produzione di H_2O_2 e *para*-chinone (Bovè et al., 2005).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)

Nel 1982, giovani tossicodipendenti svilupparono una rapida e progressiva sindrome Parkinson-simile dopo l'assunzione intravenosa di eroina sintetica a base di MPPP (1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine), un analogo del narcotico meperidina (Demerol) (Langston et al., 1983). Fu l'MPTP, inavvertitamente prodotto durante la sintesi illecita dell'MPPP, la causa della contaminazione neurotossica. Negli umani e nelle scimmie, l'MPTP causa una severa e irreversibile sindrome parkinson-simile caratterizzata da tutte le sintomatologie inclusi tremore, rigidità, lentezza nei movimenti e instabilità posturale. Nei modelli umani e di primati non umani si possono notare gli stessi benefici e complicazioni della somministrazione a lungo termine di L-DOPA riscontrabili nei pazienti malati di Parkinson. Inoltre analogamente al PD, la suscettibilità verso l'MPTP aumenta con l'età avanzata sia nei modelli sperimentali con le scimmie sia in quelli coi topi (Rose et al., 1993; Irwin et al., 1993 ; Ovadia et al., 1995). L'MPTP è una molecola altamente lipofila (**figura 6**) e attraversa la BBB in pochi minuti dopo la somministrazione sistemica (Markey et al., 1984). Una volta raggiunto il cervello, la protossina MPTP è ossidata a MPDP⁺ (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium) dalle monoamino ossidasi B (MAO-B) della glia e dei neuroni serotoninergici, uniche cellule a possedere questo enzima. Attraverso, probabilmente, una ossidazione spontanea, l'MPDP⁺ è convertito ad MPP⁺, tossina attiva, e rilasciato nello spazio extracellulare con un meccanismo

non ancora chiarito. Poiché si tratta di una molecola carica, l' MPP^+ utilizza la sua affinità verso il DAT per essere internalizzato nei neuroni mediante un sistema di trasporto attivo (Javitch et al., 1985; Mayer et al., 1986). La capacità del DAT di trasportare l' MPP^+ all'interno dei neuroni non spiega completamente la selettività della lesione nigrostriatale dopaminergica causata dall' MPTP (figura 4).

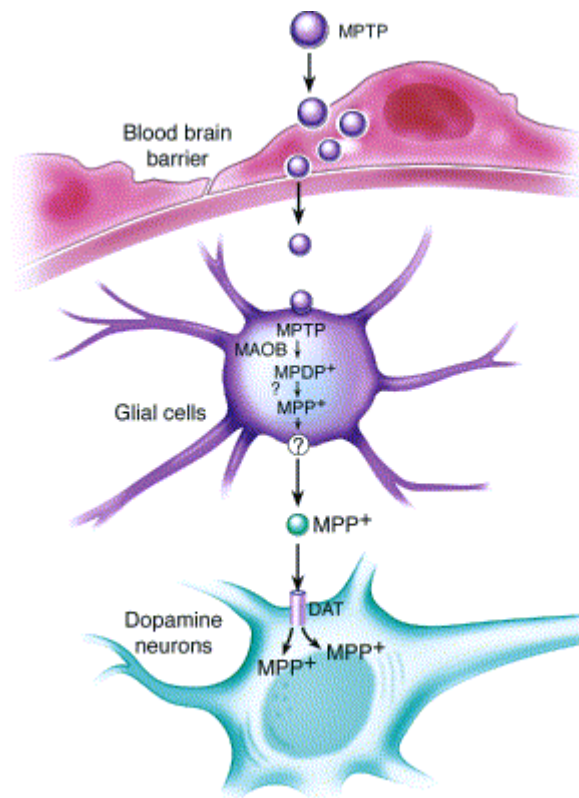


Figura 4. Rappresentazione schematica del metabolismo del MPTP dopo una somministrazione sistemica. (Dauer and Przedborski, 2003)

All'interno dei neuroni, l' MPP^+ può seguire 3 vie (figura 5):

- I. Si lega alle VMAT2 (vesicular monoamine transporter-2) che lo traslocano all'interno delle vescicole sinaptiche (Liu et al., 1992);
- II. Si concentra dentro i mitocondri con un meccanismo che dipende da potenziale trans-membrana mitocondriale (Ramsay and Singer, 1986);
- III. Rimane nel citoplasma e interagisce con gli enzimi citosolici, specialmente quelli recanti cariche negative (Klaidman et al., 1993).

Il trasporto all'interno delle vescicole sembra proteggere le cellule dalla neurodegenerazione indotta dall' MPTP, in quanto impedisce alla tossina di raggiungere il mitocondrio, il suo principale sito d'azione (Dauer and Przedborski, 2003).

Una volta penetrato all'interno del mitocondrio, l' MPP⁺ danneggia la fosforilazione ossidativa legandosi e inibendo l'attività NADH-ubichinone reduttasica del complesso I della catena di trasporto elettronico mitocondriale (Nicklas et al., 1985). Questa inibizione conduce ad una rapida e drastica riduzione dell'ATP nei tessuti, in particolare nello striato e nel mesencefalo ventrale (Chan et al., 1991; Fabre et al. 1999), le regioni del cervello più sensibili all'MPTP. Un ulteriore insulto causato dall'inibizione MPP⁺-dipendente del complesso I è lo stress ossidativo; infatti, impedendo il flusso elettronico, la neurotossina può stimolare la produzione di ROS e in particolare di anione superossido (Hasegawa et al., 1990; Hasegawa et al., 1997) inoltre la deplezione di ATP si ripercuote sull'attività delle VMAT2 che non sono più in grado di mantenere il gradiente intravescicolare di DA, riversandola nel citosol con la conseguenza di aumentare lo stress ossidativo nella cellula (Johnson, 1988). Le alterazioni nella produzione di ATP e la generazione di ROS sono eventi che si verificano in poche ore dalla somministrazione dell'MPTP, giorni prima che si riscontrino una effettiva morte neuronale (Jackson-Lewis et al., 1995); questi eventi iniziali, quindi, di solito non sono implicati direttamente nella morte cellulare, ma piuttosto mettono in moto una cascata di reazioni che hanno come conseguenza ultima la morte dei neuroni dopaminergici (Mandir et al., 1999; Saporito et al., 2000; Vila et al., 2001).

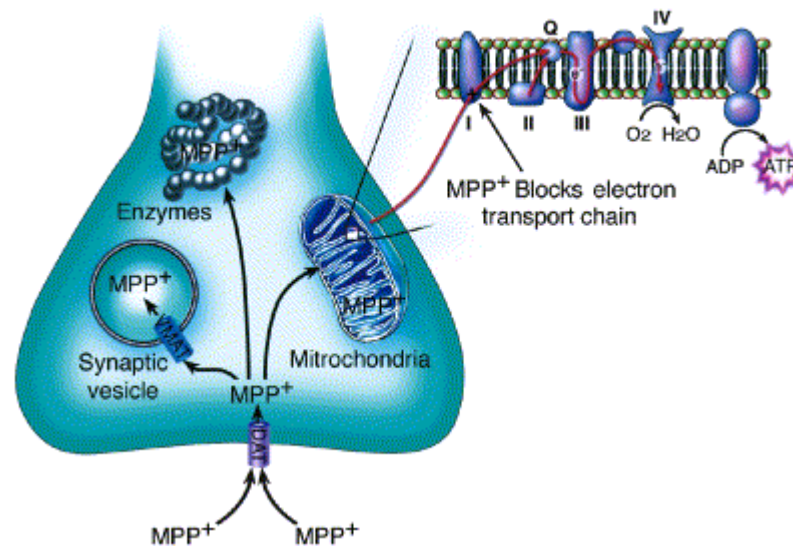


Figura 5. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione dell' MPP^+ (Dauer and Przedborski, 2003)

1.4. Modelli sperimentali di Parkinson

Sebbene l'utilizzo della L-DOPA abbia rivoluzionato la terapia del Parkinson, al momento sono disponibili solo cure sintomatiche, nessuna delle quali è in grado di fermare o ritardare la degenerazione dei neuroni dopaminergici. Il maggior ostacolo per lo sviluppo di nuovi farmaci neuroprotettivi è la mancata conoscenza degli specifici eventi molecolari che determinano la neurodegenerazione nel PD.

Il trattamento di animali con neurotossine quali rotenone, paraquat, 6-OHDA, MPTP e α -sinucleina sono uno strumento importante nello studio delle cause e dei meccanismi molecolari che provocano la morte dei neuroni dopaminergici e che determinano modelli sperimentali *in vivo* della malattia di Parkinson. Sebbene tutte queste tossine abbiano in comune la neurodegenerazione dei neuroni della SNpc, ciascuna produce effetti clinici e neuropatologici che la differenzia dalle altre. Ogni modello possiede vantaggi e svantaggi e nessuno può essere indicato come modello ideale capace di rappresentare tutti gli aspetti del PD; quindi la scelta del modello di PD indotto da tossine è relativo al tipo di studio che si intende intraprendere (Bovè et al., 2005).

Rotenone

È stato ampiamente utilizzato come veleno mitocondriale nelle colture cellulari, ma meno frequentemente come tossina in modelli animali. Nei modelli *in vivo*, il rotenone può essere utilizzato con diverse vie di somministrazione: la somministrazione orale, tramite il cibo, sembra essere responsabile di una leggera neurotossicità negli animali (Marking, 1988); la somministrazione sistemica, sia intravenosa (i.v.) che sottocutanea (s.c.), causa spesso neurotossicità e mortalità il cui grado è dose-dipendente; la somministrazione stereotassica del rotenone nel *medial forebrain bundle* causa la deplezione della DA e della serotonina striatale (Heikkila et al., 1985). L'infusione intravenosa di una bassa dose di rotenone causa la selettiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali accompagnata da inclusioni simili ai LBs immunoreattive per l'ubiquitina e l' α -sinucleina (Betarbet et al., 2000). Dal punto di vista comportamentale, gli animali trattati con rotenone sistemico mostrano una ridotta mobilità, una postura alterata e in alcuni casi rigidità (Sherer et al., 2003) e catalessi (Alam and Schmidt, 2002). Da alcuni studi sembra che queste disfunzioni motorie possano essere migliorate con la somministrazione di L-DOPA (Alam et al., 2004).

Paraquat

Per molti anni, gli studi sperimentali con il paraquat si sono focalizzati sui suoi effetti nei polmoni, nel fegato e nei reni, probabilmente a causa del fatto che la morte per esposizione acuta è dovuta alla tossicità che questo diserbante provoca in questi organi (Smith, 1988). A seguito di una somministrazione sistemica di paraquat, sono state evidenziate una ridotta attività motoria, una perdita dose-dipendente delle fibre dopaminergiche striatali e dei corpi cellulari nigrali (Brooks et al., 1999), ed elevati livelli di inclusioni di α -sinucleina nei neuroni della *substantia nigra* (Manning-Bog et al., 2002).

6-OHDA

La somministrazione sistemica della 6-OHDA produce un danno al livello del sistema nervoso periferico, mentre non ha nessuna ripercussione cerebrale. A causa della sua struttura, la 6-OHDA non attraversa facilmente la BBB e quindi non riesce a raggiungere, nel cervello, concentrazioni tossiche a seguito di una somministrazione sistemica. Nei modelli animali indotti da 6-OHDA si ricorre alla somministrazione diretta della tossina in diverse aree cerebrali (Bovè et al., 2005) mediante metodiche stereotassiche o “free-hand”. Inizialmente fu utilizzata sui ratti, mentre ora sono presenti anche modelli di lesione sviluppati su topi e scimmie (Mandel et al., 1985; Annett et al., 1997; Crofts et al., 2001; He et al., 2001; Ma et al., 2002; Lundblad et al., 2004; Baker et al., 2004). La metodica più comune per indurre una lesione nella via nigrostriale con 6-OHDA è la somministrazione unilaterale nella SNpc, nel *medial forebrain bundle* (che comprende il tratto nigrostriatale) o nello striato, effettuata attraverso l'utilizzo di un sistema stereotassico (Javoy et al., 1976). La lesione bilaterale con 6-OHDA è incompatibile con la vita dell'animale. Dopo la somministrazione intranigrale unilaterale, la morte dei neuroni dopaminergici ha inizio entro le prime 24h, senza che questi mostrino una morfologia apoptotica (Jeon et al., 1995); la massima riduzione dei livelli della DA striatale si registra invece tra 3-4 giorni dopo la lesione (Faull and Laverty, 1969) e la DA residua striatale risulta meno del 20% rispetto ai controlli. Dal punto di vista comportamentale, la lesione unilaterale causa nell'animale una tipica asimmetria nei movimenti rotatori, la cui grandezza è correlata al grado della lesione nigrostriatale (Hefti et al., 1980). Questi comportamenti asimmetrici sono amplificati dall'utilizzo di farmaci che stimolano i recettori dopaminergici, come ad esempio l'apomorfina (rotazione nel senso opposto rispetto al lato lesionato), o farmaci che inducono il rilascio di dopamina, come l'amfetamina (rotazione nello stesso senso del lato lesionato), e sono dovuti allo squilibrio neurochimico tra la parte lesionata e quella non lesionata dell'animale. La quantificazione di questo tipo di rotazioni viene utilizzata per testare le potenzialità anti-parkinsoniane di nuovi farmaci (Jiang et al., 1993), del trapianto di cellule e della gene therapy (Kirik et al., 1993; Bjorklund et al., 2002).

Finora non è mai stata dimostrata la formazione di LBs nei cervelli di animali trattati con 6-OHDA.

MPTP

I dati neuropatologici, derivati soprattutto da esperimenti su primati non umani, hanno dimostrato che la somministrazione di MPTP causa un danno alla via dopaminergica nigrostriatale simile a quello riscontrato nel PD (Agid et al., 1987). Come nel Parkinson, si evidenzia una grande perdita dei neuroni dopaminergici nella SNpc e nell'area tegumentale ventrale (Seniuk et al., 1990; Sirinathsinghji et al., 1992; Varastet et al., 1994; Muthane et al., 1994) e, nelle scimmie, una degenerazione dei terminali nervosi dopaminergici striatali (Moratalla et al., 1992; Snow et al. 2000). In tutti i modelli di PD indotto da MPTP non sono fin'ora stati ritrovate i caratteristici LBs (Forno et al. 1993), nonostante siano state descritte delle inclusioni neuronali li ricordano (Forno et al. 1986). La somministrazione di MPTP attraverso modalità differenti e l'utilizzo di diversi dosaggi ha portato lo sviluppo di numerosi modelli animali, ognuno dei quali caratterizzato da aspetti comportamentali e/o biochimici ben definiti, ottimizzati nel creare una lesione che sia la più severa e stabile possibile riducendo al minimo gli effetti indesiderati. La lesione più comune, affidabile e riproducibile viene indotta attraverso la somministrazione sistemica (iniezione sottocutanea, intravenosa, intraperitoneale o intramuscolare), ma la tossina può anche esser somministrata attraverso una iniezione intracerebrale stereotassica o per retrodialisi.

Gli animali maggiormente usati come modelli di studio con MPTP sono: le scimmie, i topi e i ratti.

Le scimmie rappresentano il miglior modello della malattia nella valutazione di nuove strategie e nuovi farmaci per la cura dei sintomi del PD. Le somministrazioni più comunemente utilizzate sono: iniezioni multiple intraperitoneali (i.p.) o intramuscolari (i.m.) e l'infusione intracarotidea della tossina. Oggigiorno nei modelli di PD sulle scimmie sono utilizzati due protocolli: uno acuto, con somministrazione di alte dosi di MPTP in un breve tempo (Petzinger and Langston, 1998); l'altro cronico, con somministrazioni di basse dosi di MPTP in un periodo di

tempo prolungato (settimane o mesi) (Schneider and Roeltgen, 1993; Bezard et al., 1997; Schneider et al., 1999). Sia il modello acuto che quello cronico sono utili nello studio delle terapie sperimentali tese ad alleviare i sintomi del PD, mentre il modello cronico è presumibilmente il più indicato anche nello studio di strategie neuroprotettive.

Esistono inoltre due ulteriori modelli definiti sub-acuto e sub-cronico.

I topi sono la specie più comunemente utilizzata nei laboratori come modello di Parkinson indotto sia per motivi tecnici, ad esempio la maneggevolezza, che finanziari. Presentano alcune differenze rispetto al modello con le scimmie, infatti i topi sono meno sensibili all'MPTP, per cui è necessaria una dose maggiore per produrre una lesione significativa nella SNpc; non sviluppano un vero parkinsonismo; il grado della lesione è dose-dipendente e correlato al protocollo utilizzato. La suscettibilità degli animali alla neurotossina, e la riproducibilità della lesione, è influenzata da vari fattori quali la specie, il sesso, l'età e il peso corporeo dell'animale. Per quanto riguarda i topi, un'ottima riproducibilità della lesione si ottiene utilizzando i topi maschi C57BL/6, di un'età compresa tra le 8-10 settimane e del peso di 25-30 grammi (Przedborski et al., 2001).

I ratti sono il terzo modello animale di PD. Più resistenti dei topi all'insulto provocato da MPTP, negli esperimenti vengono utilizzate dosi molto più elevate che negli altri animali. Oltre alla somministrazione sistemica, nei ratti viene praticata l'infusione stereotassica cerebrale, o retrodialitica, dell'MPP⁺, il metabolita tossico dell'MPTP

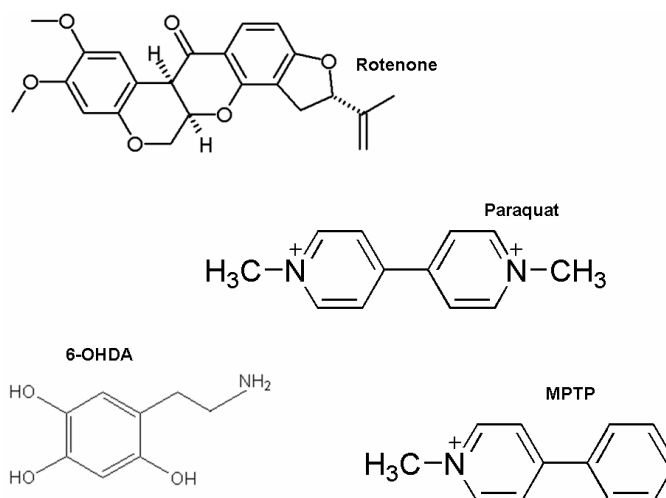


Figura 6. Struttura molecolare delle principali neurotossine utilizzate nei modelli sperimentali di malattia di Parkinson

α -sinucleina

L'ultimo modello di PD, in ordine di tempo, è quello basato sul legame genetico e neuropatologico tra il Parkinson e l' α -sinucleina (α -syn). Sono disponibili due tipi di modelli animali, quello "transgenico" e quello "non transgenico".

Nei modelli "transgenici", su *Drosophila* e topi, si ha la sovra-espressione sia delle α -syn umane wild-type che di quelle mutate (A30P e A53T). Nei modelli di *Drosophila* si è riscontrata una significativa perdita di DA, mentre i modelli murini non mostrano rilevanti anomalie per quel che riguarda i neuroni dopaminergici, anche se alcuni mostrano una neurodegenerazione indotta da sinucleopatia. I modelli murinici transgenici rimangono comunque un importante strumento nello studio della tossicità dell' α -syn *in vivo* e delle cause che ne modulano l'aggregazione.

I modelli "non transgenici" si basano invece sulla somministrazione dell' α -syn, attraverso vettori virali, direttamente nella SNcp. I vettori virali, come ad esempio quelli derivati dal virus dell'HIV, consentono la somministrazione in qualsiasi zona del cervello e in qualsiasi momento della vita dell'animale, e in più sono utilizzabili sui ratti, maggiormente utilizzati negli studi comportamentali (Recchia et al., 2008). La somministrazione dell' α -syn, mutata o wild-type associata al vettore, provoca la selettiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nella SNcp del ratto e il

ritrovamento di strutture citoplasmatiche contenenti α -syn molto simili ai LBs (Recchia et al., 2004).

1.5. Sistema antiossidante neuronale

Un complesso sistema antiossidante endogeno è coinvolto nella protezione dagli insulti ossidativi portati dai ROS e RNS (specie reattive dell'azoto). Ne fanno parte sia sostanze come l'acido urico (UA), l'acido ascorbico (AA), il glutatione, la vitamina A, la vitamina E, sia alcuni enzimi antiossidanti come la catalasi, la superossidodismutasi (SOD), la glutatione reduttasi e la glutatione perossidasi. Il monitoraggio delle variazioni nella concentrazione di alcuni componenti del sistema antiossidante è un utile strumento nei modelli animali per la valutazione sia del danno ossidativo e che delle strategie neuroprotettive.

L'acido urico svolge la sua funzione di antiossidante oltre che come scavenger del perossinitrito, anche nella protezione della DA (Church and Ward, 1994) e dell'AA (Sevanian et al., 1991) probabilmente formando complessi con gli ioni ferro, e nella prevenzione della perossidazione dei lipidi causata dall' H_2O_2 (Weisskopf et al., 2007). È il prodotto finale del catabolismo dei nucleotidi purinici, dove la xantina ossidasi (XO) converte l'ipoxantina, derivata dall'ATP, in xantina e quindi quest'ultima in UA. Nelle reazioni catalizzate dalla XO oltre all'acido urico vengono prodotti anche ROS, in particolare H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$.

L'Acido Ascorbico, o Vitamina C, è una molecola idrosolubile essenziale sintetizzata in numerose specie animali a partire dal glucosio, con il quale condivide una stretta analogia chimico-strutturale. Nei primati (uomo compreso) e nelle cavie questa capacità di sintesi viene meno, l'AA deve essere quindi assunto con la dieta. È coinvolto in numerose reazioni enzimatiche e protegge i tessuti dagli insulti ossidativi reagendo con i radicali liberi. Nel sistema nervoso centrale (CNS) l'AA viene concentrato principalmente all'interno dei neuroni (10mM) attraverso un sistema di co-trasporto con il Na^+ mediato dal trasportatore SVCT2. Qui l'AA, fungendo da riducente, viene ossidato a deidroascorbato (DHA) e utilizzando i trasportatori specifici per il glucosio fuoriesce dal neurone (GLUT3) ed entra nell'astrocita (GLUT1) (Hediger, 2002). All'interno degli astrociti, il glutatione

(GSH) consente la riconversione del DHA ad AA, prevenendone la deplezione nel cervello. L'AA così riconvertito viene rilasciato dall'astrocita attraverso un meccanismo ancora sconosciuto. La concentrazione extracellulare dell'acido ascorbico può essere modulata anche dal rilascio del neurotrasmettitore glutammato, infatti un etero scambio AA/glutammato previene gli effetti citotossici causati da alte concentrazioni di questo neurotrasmettitore aminoacidico (Rice, 2000). Il glutatione ossidato (GSSG) nella riconversione dell'acido ascorbico viene ridotto a GSH dalla glutatione reduttasi, ricostituendone il pool.

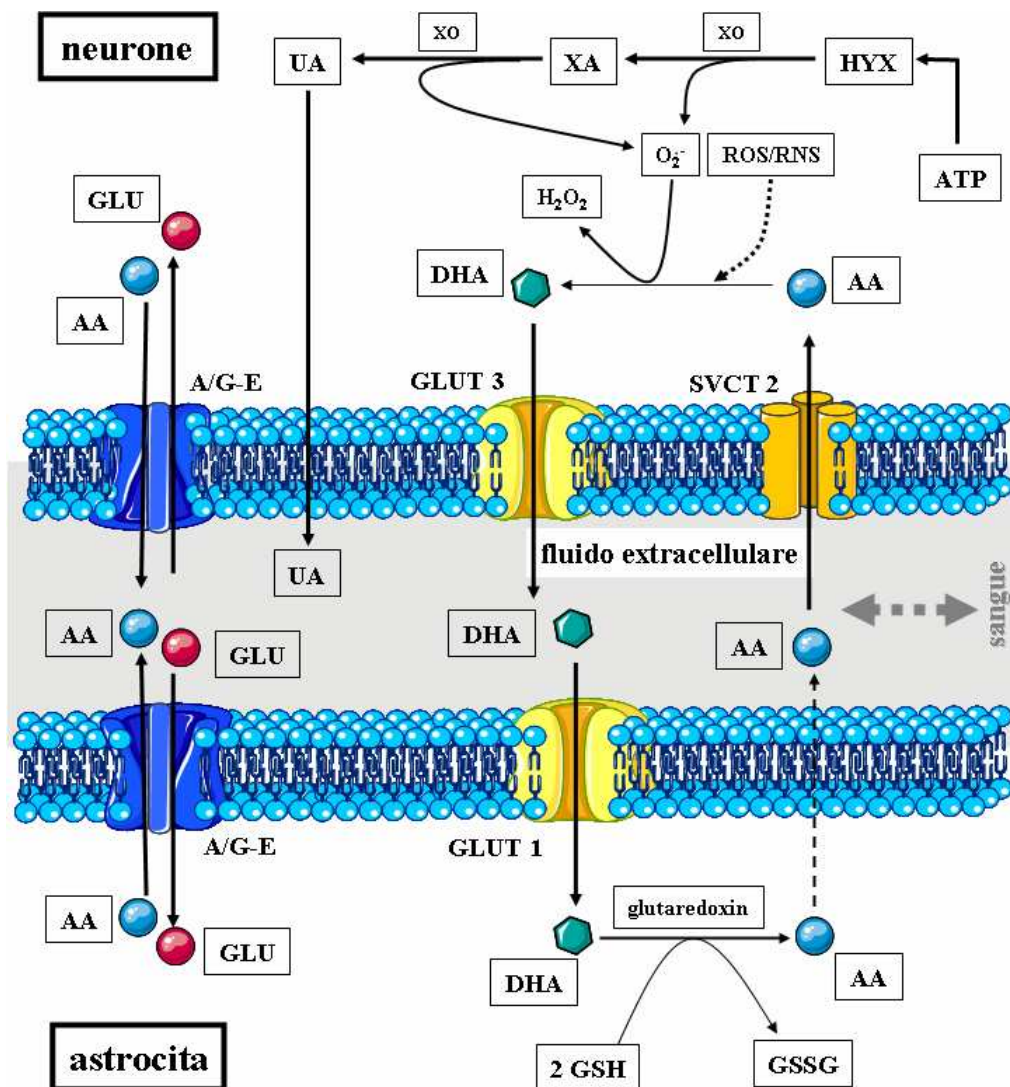
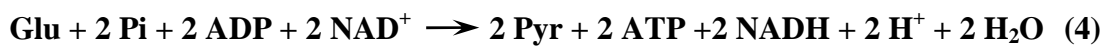


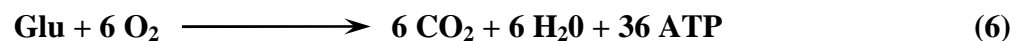
Figura 7. Sistema anti-ossidante neuronale: ciclo dell'acido ascorbico. AA: acido ascorbico; DHA: deidroascorbato; UA: acido urico; HYX: ipoxantina; XA: xantina; XO: xantina ossidasi; GSH: glutatione ridotto; GSSG: glutatione ossidato; GLU: glutammato; A/G-E: eteroscambio AA/GLU

1.6. Metabolismo energetico neuronale

L'incremento dell'attività neuronale è sempre accompagnato da un aumento della richiesta energetica cellulare. In condizioni fisiologiche, il principale apporto energetico nel cervello è fornito dal glucosio (Darbin et al., 2006). Il metabolismo energetico cellulare ha inizio con la glicolisi, dove il glucosio (Glu) viene ossidato nel citoplasma e trasformato in piruvato (Pyr) e ATP attraverso una serie di reazioni in assenza di ossigeno, che si possono brevemente riassumere in forma generale:



Il piruvato citosolico viene quindi trasportato all'interno del mitocondrio dove, attraverso il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa, con un meccanismo ad elevato rendimento energetico viene completamente ossidato ad anidride carbonica (CO₂), acqua ed ATP in presenza di O₂. L'energia che si ricava dalla completa ossidazione di una molecola di glucosio attraverso i tre diversi stadi della respirazione cellulare, è uguale a 36 molecole di ATP:



In assenza d'ossigeno o a causa del blocco della catena respiratoria mitocondriale, il piruvato prodotto nella glicolisi (reazione 4) viene trasformato in lattato (Lac) dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH, reazione 7). Questa via metabolica anaerobica riduce la resa energetica a sole 2 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio:



La determinazione della concentrazione del glucosio nel fluido extracellulare cerebrale (ECF) è importante per la valutazione del metabolismo e dell'energetica del cervello. Si è visto che nel corpo striato del ratto la concentrazione del glucosio

nel ECF, ottenuta mediante microdialisi, è stata di $350 \pm 20 \mu\text{M}$ (Fray et al., 1997; McNay and Gold, 1999). L'innalzamento del lattato nell'ECF è la conseguenza dell'attivazione neuronale e dell'incrementata richiesta energetica cerebrale (Fillenz, 2005). Il rapporto Lac/Pyr riflette l'equilibrio della conversione del piruvato in lattato, le variazioni delle condizioni redox dei neuroni e/o della glia possono modificare questo rapporto e un suo aumento nell'ECF indica uno shift dal normale metabolismo aerobio verso un metabolismo anaerobio (Darbin et al., 2006).

1.7. Tecniche di monitoraggio neurochimico in vivo

1.7.1. Lo spazio extracellulare

Lo spazio extracellulare, stimato approssimativamente nel 20% del volume totale del tessuto, è il crocevia di un incredibile numero di sostanze chimiche nella comunicazione tra le cellule e il circolo sanguigno. Attraverso l'ECF i nutrienti passano dal sangue alle cellule, i metaboliti si muovono invece in direzione opposta, una grande varietà di molecole intermedia la comunicazione intercellulare. È qui che i neurotrasmettitori regolano la comunicazione tra i neuroni e dove la maggior parte delle droghe, farmaci e tossine interferiscono sulle funzioni del sistema nervoso.

Nel cervello, la presenza della barriera ematoencefalica fa sì che l'ECF risulti come una entità separata, con una differente composizione rispetto al flusso ematico da un lato e al citoplasma delle cellule dall'altro (Ungersted, 1991).

L'introduzione di una sonda microdialitica o di un sensore voltammetrico nel cervello, permette di esaminare in modo specifico gli eventi chimici che intervengono nell'ambiente extracellulare.

1.7.2. Microdialisi

Un accurato e continuo monitoraggio *in vivo* delle concentrazioni delle sostanze presenti nello spazio extracellulare cerebrale, è il prerequisito di molti studi neurologici. La tecnica della microdialisi rende, virtualmente, possibile il recupero di ogni sostanza dalla maggior parte delle regioni cerebrali con un limitato trauma

tissutale (Benveniste, 1991). L'idea della microdialisi è quella di una sonda microdialitica impiantata nel tessuto che mima la funzione di un capillare sanguigno negli scambi tra il torrente ematico e la popolazione cellulare, permettendo, quindi, sia il recupero (recovery) sia la somministrazione di sostanze in maniera topica.

Le principali caratteristiche della tecnica della microdialisi sono:

- Recupera campioni dall'ECF;
- Può essere eseguita localmente in quasi tutti gli organi e tessuti del corpo, incluso il sangue;
- Può essere eseguita in animali vivi, svegli e liberi di muoversi (freely moving);
- È possibile effettuare il campionamento continuo per ore o giorni sullo stesso animale, riducendo così il numero degli animali necessari;
- Può essere utilizzata per recuperare e/o somministrare sostanze sia endogene che esogene;
- Fornisce un campione rappresentativo di tutte le sostanze presenti nel ECF capaci di attraversare la membrana e le rende disponibili alle tecniche analitiche convenzionali;
- Causa un minimo danno invasivo nei tessuti e nella BBB.

La sensibilità della tecnica è determinata dalla tecnica analitica utilizzata (Ungersted, 1991).

1.7.3. Principio della microdialisi

La microdialisi è una tecnica molto semplice nella sua idea fondamentale. Una membrana da dialisi, montata all'estremità di una sonda per facilitarne l'inserzione, viene posizionata nell'organo o nel tessuto da studiare, ad esempio il corpo striato nello studio della via nigrostriatale; il sistema viene perfuso con un liquido la cui composizione è simile a quella dell'ECF, ad un flusso costante, da una pompa collegata all'ingresso della sonda. All'interno dello striato la membrana dialitica, permeabile ad H₂O e piccoli soluti, separa due compartimenti fluidi distinti: il fluido extracellulare (all'esterno della membrana) e il ringer di perfusione (all'interno della membrana). In assenza di una pressione osmotica e/o di un potenziale elettrico, il

movimento dei soluti fra i due compartimenti è dovuto esclusivamente alla diffusione secondo il gradiente di concentrazione. Le sostanze presenti nell'ECF cerebrale possono così diffondere all'interno della sonda ed essere recuperate nel campione di microdializzato nella sua estremità in uscita, per poter essere analizzate con diversi sistemi di lettura monitorizzandone le variazioni. In senso opposto, sostanze presenti nel ringer di perfusione possono diffondere nello striato andando ad interagire con le cellule neuronali e perturbando le concentrazioni delle molecole nell'ECF.

1.7.4. Fattori che influenzano la microdialisi

Nonostante l'apparente semplicità della microdialisi, sono molti i fattori che possono influenzare i risultati ottenuti con questa tecnica.

Per prima cosa bisogna sempre tener presente che, benchè minimamente, si tratta sempre di una tecnica invasiva. Questo è importante soprattutto nella microdialisi cerebrale, dove l'esperienza e la cura nelle procedure chirurgiche riducono i danni causati dall'inserzione della sonda e preserva l'integrità cerebrale.

La membrana dialitica comunica con il fluido extracellulare mediante il principio della diffusione, le sostanze si muovono secondo il proprio gradiente di concentrazione e vengono poi rilevate nel microdializzato. Diversi fattori influenzano il recovery delle sostanze dall'ECF, tra questi vanno ricordati:

la composizione del ringer di perfusione, è importante perché modifica l'area immediatamente circostante la membrana dialitica. La deplezione degli ioni calcio dal ringer, ad esempio, impedisce la trasmissione sinaptica, quindi la composizione del ringer dovrebbe essere il più simile possibile all'ECF ed eventuali modificazioni dovrebbero essere apportate in relazione alle esigenze sperimentali; *la lunghezza della membrana dialitica*, tanto maggiore è l'area in contatto con l'ECF tanto maggiore sarà la diffusione delle molecole attraverso la membrana e quindi il recovery; *la velocità di diffusione nell'ECF*, proprietà correlata alla matrice parenchimale e al fattore di tortuosità λ che è indice del discostamento della diffusione delle molecole da una linea retta; *cut-off della membrana dialitica*, correlato al grado di permissività della membrana, determina le dimensioni delle sostanze che possono diffondere tra i due compartimenti (come i neurotrasmettitori e

altre sostanze a basso peso molecolare) e quelle che non possono attraversare la membrana (come le proteine); *il flusso di perfusione del ringer*, determina il tempo in cui le molecole hanno la possibilità di equilibrarsi tra i due compartimenti, più lento è il flusso e maggiore sarà il tempo a disposizione delle molecole per raggiungere la stessa concentrazione tra l'ECF e il ringer.

2. Scopo della Ricerca

La malattia di Parkinson (Parkinson's Disease, PD) è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva causata dalla perdita della via nigro-striatale dovuta all'alterazione dei processi di degradazione delle proteine nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNpc). La sua eziologia è sconosciuta, e l'insorgere della malattia può essere dovuto a fattori ambientali, genetici o una concomitanza di entrambi. L'utilizzo su animali di neurotossine, quali MPTP, 6-OHDA, rotenone e paraquat ha permesso di ottenere diverse tipologie di modelli sperimentali di Parkinson chimico. L'ultimo modello di parkinsonismo, in ordine di tempo, è quello indotto mediante somministrazione di una forma mutata della proteina α -sinucleina. Lo scopo del presente studio, tramite la comparazione di modelli sperimentali sia con MPTP che con α -sinucleina, è quello di caratterizzare un modello sperimentale appropriato in cui poter in seguito impiantare nello striato o nella *substantia nigra* cellule staminali adulte al fine di valutarne il potenziale terapeutico.

3. Materiali e Metodi

3.1. Sostanze chimiche e soluzioni

I seguenti reagenti: d-amfetamina (d-amph), acido ascorbico (AA), acido urico (UA), L-DOPA, DOPAC, noradrenalina (NE), dopamina (DA), acido 5-idrossi-indolo-acetico (5-HIAA), HVA, 3-MT, serotonina (5-HT), K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , EDTA, metanolo (MeOH, HPLC grade), sodio octilsolfato (OSA), MPTP, 6-OHDA e nicotina sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano). L'alfasinucleina modificata (TAT- α -synA30P) è stata gentilmente donata dal prof. Giusti. Le soluzioni stock di AA, delle catecolamine e delle indolamine sono state preparate in acido fosforico e conservate a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. L'UA viene disciolto in acqua Milli Q tiepida nella quantità di 1 mg/10ml con l'aggiunta di 100 μl di NaOH 0.1N. Tutte le soluzioni vengono diluite nel ringer alla concentrazione necessaria al momento dell'uso. Le soluzioni di MPTP, d-amph e nicotina sono state preparate pochi minuti prima della somministrazione, sciogliendo i composti in soluzione salina (MPTP, d-amph) e ringer (nicotina). La TAT- α -synA30P è stata utilizzata disciolta in soluzione salina con 0.1% ascorbato di sodio.

3.2. Animali

Durante tutti gli esperimenti sono stati utilizzati:

- 1) Topi C57BL/6 maschi con peso corporeo compreso tra i 30-35 gr (Charles River laboratori spa, Calco, Italia)
- 2) Ratti Wistar maschi con peso corporeo compreso tra i 280-320 gr (Morini laboratori, Reggio Emilia, Italia)

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie con libero accesso a cibo ed acqua *ad libitum*, mantenuti secondo un ciclo luce/buio di 12:12 h (la luce inizia alle 07:00 a.m.) e con una temperatura ambientale costante di $21\text{ }^\circ\text{C}$. prima dell'inizio di ogni esperimento è stata verificata la salute degli animali in accordo alle vigenti normative (Morton and Griffiths, 1985). Tutte le procedure utilizzate sono state approvate dalla direttiva 86/609 della Comunità Europea inclusa nel Decreto No. 116/192 del Ministero Italiano della Salute Pubblica.

3.3. Costruzione della sonda microdialitica

Durante tutti gli esperimenti sono stati utilizzati due tipi di sonde microdialitiche:

- 1) Sonda singola
- 2) Sonda doppia

3.3.1 Sonda singola intrastriatale

La sonda microdialitica a singola via (Serra et al., 2003b), impiantata nei C57BL/6, è stata realizzata secondo una geometria coassiale dove un capillare siliceo rivestito in materiale plastico (i.d.75/o.d. 150 μ m, Scientific glass engineering, Milton Keynes, UK), utilizzato come inlet, è stato posizionato al centro di una fibra da dialisi semi-permeabile in poliacrilonitrile ed a cui viene aggiunta una sezione di un tubo di polietilene (i.d. 0.58 mm, portex, Hythe, UK) per completare la via d'ingresso della sonda. La fibra da dialisi, con cut-off del peso molecolare di 12 KDa (AN69, Hospal Industrie, Francia) e forma cilindrica, è stata sigillata ad una estremità con una resina epossidica bicomponente ad essiccazione rapida mentre l'altra estremità della fibra è stata introdotta in una seconda sezione di polietilene che funge da outlet. Infine la membrana microdialitica viene schermata con un sottilissimo strato di resina epossidica lasciando libera solo una zona attiva di 2 mm di lunghezza (**figura 8**). Una sonda analoga a quella utilizzata nel topo, con una zona attiva di 4mm, è stata costruita per gli esperimenti condotti sui ratti wistar trattati con l' α -sinucleina per ridurre al minimo il danno in animali già precedentemente sottoposti a chirurgia stereotassica per l'induzione della lesione nigrale.

La sonda ha un diametro finale di circa 0.22 mm.



Figura 8. Ricostruzione 3D della sonda a singola via

3.3.2 Sonda doppia intrastrinatale

La sonda microdialitica doppia (Rocchitta et al., 2004), impiantata nei ratti Wistar per la simultanea analisi cromatografica e spettrofotometrica del microdializzato, è una modificazione di quella precedentemente descritta e combina due sonde singole indipendenti tra loro, dalla geometria coassiale con due separati inlet a cui corrispondono due separati outlet (**figura 9**) che permettono l'infusione simultanea, ma separata, e il recupero di separati campioni di dializzato dallo stesso sito intrastrinatale.

La sonda microdialitica doppia è stata costruita secondo una geometria coassiale dove due pezzi di capillare siliceo rivestito in materiale plastico (i.d.75/ o.d. 150 μm , Scientific glass engineering, Milton Keynes, UK), utilizzati come inlet, sono stati posizionati al centro di due fibre da dialisi semi-permeabile in poliacrilonitrile ed a cui vengono aggiunte due sezione di un tubo di polietilene (i.d. 0.58 mm, portex, Hythe, UK) per completare la via d'ingresso della sonda. Le due fibre da dialisi, con cut-off del peso molecolare di 12 KDa (AN69, Hospal Industrie, Francia) e forma cilindrica, sono state sigillate ad una estremità con una resina epossidica bicomponente ad essiccazione rapida mentre l'altra estremità della fibra è stata introdotta in una seconda sezione di polietilene che funge da outlet. Infine le due membrane microdialitiche, strettamente ravvicinate, vengono schermate con un sottilissimo strato di resina epossidica lasciando libera solo una zona attiva di 4 mm

di lunghezza. Ogni sonda ha un diametro finale di circa 0.22 mm e il diametro finale della sonda doppia è di circa 0.45 mm.



Figura 9. Ricostruzione 3D della sonda a doppia via

3.4. Chirurgia stereotassica

La chirurgia è stata eseguita sotto anestesia da cloralio idrato (400 mg/kg) somministrata per via intraperitoneale (i.p.). Durante l'anestesia, la temperatura corporea dell'animale è stata mantenuta costante a 37 °C con l'utilizzo di un tappetino isotermico (Harvard Apparatus, Kent, UK). Posizionato sul tavolo operatorio (Kopf 900 + Cunningham mouse and neonatal rat adaptor), assicurato tramite una barra dentale e due barre auricolari, all'animale si impianta la sonda microdialitica nello striato destro secondo le coordinate stereotassiche fornite dall'atlante Paxinos & Franklin ([Paxinos and Franklin, 2004](#)):

A/P: +0.5 mm, M/L: -1.8 mm dal bregma, e D/V: -3.5 mm dal tavolato cranico per le operazioni effettuate sui topi e secondo le coordinate stereotassiche fornite dall'atlante Paxinos & Watson ([Paxinos and Watson, 1986](#)):

A/P: +0.5 mm, M/L: -2.5 mm dal bregma, e D/V: -7.0 mm dalla dura madre per le operazioni effettuate sui ratti.

Negli esperimenti con somministrazione intranigrare (TAT- α -synA30P) è stata inserita una cannula direttamente nella SNpc di destra utilizzando le coordinate stereotassiche fornite dall'atlante Paxinos & Watson:

A/P: -5.7 mm, M/L: -2.0 mm dal bregma, and D/V: -8.7 mm dalla dura madre per le operazioni effettuate sui ratti (Recchia et al., 2008).

3.5. Microdialisi

3.5.1 Procedura microdialitica

Al termine dell'operazione chirurgica, gli animali sono stati sistemati all'interno di un gabbia cilindrica di plexiglass trasparente (bowl) del diametro di circa 45 cm e mantenuti in un ambiente con luce e temperatura controllate, avendo libero accesso ad acqua e cibo. Gli esperimenti di microdialisi sono stati eseguiti a partire dalle 24h dopo l'impianto della sonda, nello stesso bowl e con l'animale freely moving. La composizione della soluzione ringer utilizzata è descritta nella tabella che segue:

soluzione Ringer	pH 6.0
NaCl	147.0 mM
KCl	4.0 mM
Ca Cl ₂	1.2 mM
MgCl ₂	1.0 mM

Tabella 1. Composizione della soluzione ringer utilizzata negli esperimenti di microdialisi

La soluzione ringer così preparata è identica per tutti gli esperimenti; concentrata 10X è stata suddivisa in aliquote da 1ml, congelata a -20 °C e diluita 1:10 in soluzione fisiologica al momento dell'uso.

Una pompa da microinfusione (CMA/100; Microdialysis, Stockholm, Sweden) perfonde il ringer ad un flusso costante mediante una o più siringhe, ciascuna collegata al corrispondente inlet della sonda da dialisi con un tratto di tubo in polietilene. Ogni 20 minuti si è proceduto al recupero manuale dei campioni di dializzato che, depositati in provette da microcentrifuga del volume di 250 µl, sono stati immediatamente iniettati nei sistemi analitici.

Durante tutti gli esperimenti sono stati utilizzati i seguenti flussi di perfusione:

1. flusso di 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ per l'analisi neurochimica delle catecolamine, indolamine, AA e UA (HPLC-EC);
2. flusso di 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ per l'analisi del metabolismo energetico (CMA Iscus).

I trattamenti farmacologici con d-amph e MPTP sono stati somministrati in maniera sistemica mediante iniezione intraperitoneale durante lo svolgimento degli esperimenti. Il trattamento intranigrare con TAT- α -synA30P è stato eseguito in sede di chirurgia mediante microinfusione topica con l'ausilio di una pompa da microinfusione (CMA/100). Il trattamento farmacologico con nicotina è stato somministrato tramite retrodialisi striatale (1h di infusione) durante lo svolgimento degli esperimenti.

3.5.2 Swivel e Swivel GB1sw

Durante gli esperimenti di microdialisi, per limitare le interferenze dovute alla manipolazione dell'animale da parte dell'operatore, ci si è avvalsi di un dispositivo detto *swivel*. Lo *swivel* è una device utilissima negli esperimenti di infusione continua in quanto impedisce l'aggrovigliamento del catetere causato dalle rotazioni dell'animale nel bowl. Agendo sullo *swivel* e non direttamente sull'animale l'operatore riesce a preservare il flusso di perfusione senza interferire con l'esperimento. Sono stati utilizzati 2 modelli di *swivel*:

1. Dual Channel Swivel a due canali separati;
2. Single Channel Swivel ad un unico canale.

Il Dual Channel Swivel (mod. 375/D/22, Instech Solomon, Plymouth Meeting PA, USA) permette sia l'infusione in un canale e il monitoraggio nell'altro sia l'infusione dei due canali in maniera indipendente. Questo modello "stainless steel" è stato utilizzato negli esperimenti in cui è stata impiantata la sonda doppia.

Il Single Channel Swivel **GB1sw** è un prototipo da me ideato, costruito e testato nel laboratorio di microdialisi durante il dottorato. Si tratta di un "*swivel* plastico" ad un solo canale utilizzato negli esperimenti in cui è stata impiantata la sonda singola. Si tratta di due sezioni di metallo con un diametro leggermente differente (o.d. 0.9 mm et 0.6 mm) che vengono inserite l'una nell'altra all'interno di una camera plastica a

tenuta stagna, la quale fornisce anche il fulcro di rotazione del sistema. Un corpo e un holder di materiale plastico completano il dispositivo. Per il fissaggio delle parti esterne al circuito di perfusione è stata utilizzata della resina epossidica e del cianoacrilato. Del silicone è stato utilizzato come lubrificante e isolante nel fulcro di rotazione (**Figura 10**).

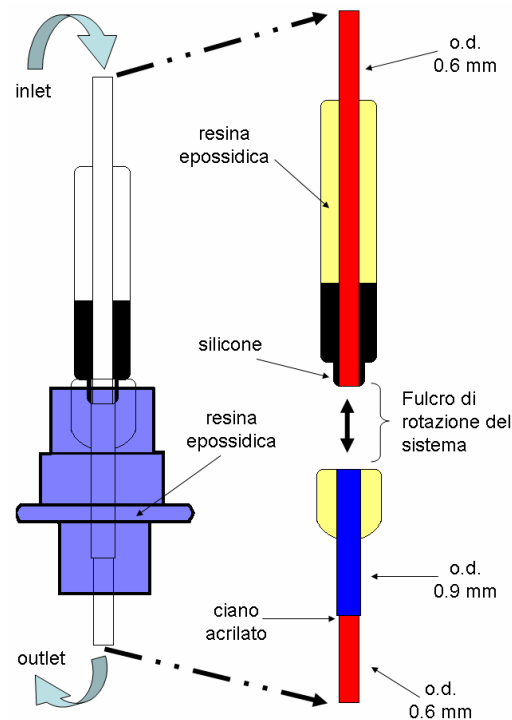


Figura 10. Rappresentazione schematica del GB1sw. Holder (a sinistra) e sistema di rotazione e perfusione (a destra)

La semplicità nella costruzione e nel reperire i materiali utilizzati, il ridotto volume morto e la possibilità di adattare il dispositivo ai diversi modelli animali fanno del GB1sw uno swivel “usa e getta” che riduce al minimo la possibilità di interferenze dovute ai diversi trattamenti eseguiti nei vari esperimenti e mantiene altresì contenuti i costi di ogni singolo esperimento di microdialisi, offrendo così un vantaggio sui modelli di swivel ad un singolo canale sia in materiale metallico che plastico già presenti in commercio.

3.5.3 *Trattamento sub-acuto con MPTP in topi C57BL/6*

Gli animali, divisi in gruppi di 3 topi ciascuno, hanno ricevuto 4 somministrazioni di MPTP (20 mg/Kg/i.p./100 µl soluzione salina) in un unico giorno, distanziate di 4h l'una dall'altra. Dopo ogni iniezione gli animali sono stati stabulati in una stanza a temperatura controllata (28°C circa) per favorirne la termoregolazione, con libero accesso a cibo ed acqua. Il gruppo controllo ha ricevuto 4 somministrazioni di soluzione salina (100 µl i.p.).

3.5.4 *Trattamento sub-cronico con MPTP in topi C57BL/6*

Gli animali, divisi in gruppi di 3 topi ciascuno, hanno ricevuto 1 somministrazione di MPTP (25 mg/Kg/i.p./100 µl soluzione salina) al giorno per 5 giorni consecutivi. Dopo ogni iniezione gli animali sono stati stabulati in una stanza a temperatura controllata (28°C circa) per favorirne la termoregolazione, con libero accesso a cibo ed acqua. Il gruppo controllo ha ricevuto 4 somministrazioni di soluzione salina (100 µl i.p.).

3.5.5 *Trattamento con dosi a scalare di MPTP in ratti Wistar*

Gli animali, divisi in gruppi di 3 ratti ciascuno, hanno ricevuto 1 somministrazione di MPTP a scalare (rispettivamente 25, 15 e 10 mg/Kg/i.p./2.5ml soluzione salina) al giorno per 3 giorni consecutivi. Dopo ogni iniezione gli animali sono stati stabulati in una stanza a temperatura controllata (28°C circa) per favorirne la termoregolazione, con libero accesso a cibo ed acqua. Il gruppo controllo ha ricevuto 3 somministrazioni di soluzione salina (2.5 ml i.p.).

3.5.6 *Trattamento con d-amfetamina in ratti Wistar*

Gli animali, divisi in gruppi di 3 ratti ciascuno, hanno ricevuto 1 somministrazione di d-amph (2 mg/Kg/i.p./2.5ml soluzione salina) dopo 60' dall'inizio dell'esperimento di microdialisi

3.5.7 *Trattamento con α -sinucleina in ratti Wistar*

Gli animali, divisi in gruppi di 3 ratti ciascuno, hanno ricevuto 1 somministrazione di TAT- α -synA30P direttamente nella SNpc. La TAT- α -synA30P (1 μ g/ μ l in soluzione salina + 0.1% ascorbato di sodio) è stata somministrata in sede di chirurgia stereotassica utilizzando una siringa Hamilton da 27Gauge montata su una pompa da microinfusione (CMA/100) ad un flusso di 0.5 μ l/min. Ogni ratto ha ricevuto 5 μ l totali di TAT- α -synA30P. La cannula è stata lasciata in situ per 5 minuti prima di essere lentamente rimossa dall'animale.

I controlli, divisi in gruppi di 3 ratti ciascuno, hanno ricevuto 1 somministrazione intranigrale di 5 μ l di soluzione salina + 0.1% ascorbato di sodio con le stesse modalità dei trattati.

3.5.8. *Tecnica del doppio flusso asimmetrico microdializzante*

Il concetto di recovery è molto importante nella tecnica della microdialisi. È utile distinguere due tipi di recovery: il *recovery relativo* e il *recovery assoluto*.

Quando tutte le componenti che costituiscono la sonda microdialitica sono standardizzate, il recovery relativo è la concentrazione di una particolare sostanza, recuperata nel dializzato, espressa come valore percentuale della concentrazione del fluido in cui la sonda è immersa. Il recovery assoluto è la quantità totale di una sostanza recuperata in un predefinito periodo di tempo ed espressa in moli/litro. Quando una sonda da dialisi viene testata *in vitro*, all'aumentare del flusso di perfusione il recovery relativo decresce mentre il recovery assoluto aumenta.

Negli esperimenti *in vivo* il recovery relativo è costante finché rimangono uguali le condizioni di perfusione, il recovery assoluto di una sostanza, invece, varia in relazione alla sua produzione/rilascio nel tessuto in esame.

Negli esperimenti condotti, si è utilizzata una sonda doppia, con due inlet e due outlet separati e indipendenti, che ha permesso la simultanea analisi della neurochimica e del metabolismo energetico striatale. Il sistema era così composto (**figura 11**): i due inlet della sonda doppia, impiantata nello striato destro, sono stati collegati ciascuno ad una pompa da microinfusione e perfusi utilizzando

due differenti flussi ($1.5 \mu\text{l}/\text{min}$ per la neurochimica e $0.6 \mu\text{l}/\text{min}$ per il metabolismo energetico). Ogni 20 minuti il campione di dializzato è stato raccolto dal corrispettivo outlet e successivamente analizzato per la determinazione delle concentrazioni dei vari analiti.

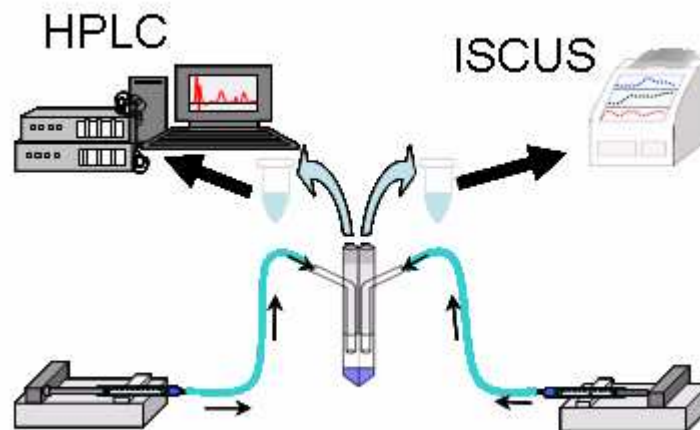


Figura 11. Rappresentazione schematica del sistema a doppio flusso asimmetrico microdializzante utilizzato per la simultanea rivelazione della neurochimica e del metabolismo energetico striatale negli esperimenti di microdialisi

Test *in vitro* e *in vivo* sono stati condotti per stabilire il flusso di perfusione più idoneo per il recovery dei metaboliti energetici, ottimizzandolo in relazione alla sensibilità del sistema di analisi e sincronizzandolo alla tempistica del recovery delle catecolamine con lo scopo di ridurre la manipolazione dell'animale durante gli esperimenti. È stata valutata inoltre la possibilità di una mutua interferenza nel recovery delle sostanze causata dall'utilizzo di due flussi diversi.

3.6. Istologia

Al termine degli esperimenti, gli animali sono stati sacrificati con una overdose di cloralio idrato ($800 \text{ mg}/\text{kg}$ i.p.). il posizionamento delle sonde microdialitiche è stato confermato post-mortem mediante analisi istologica. Il cervello è stato fissato e tramite un criostato sono state ottenute delle sezioni coronali dello spessore di $50 \mu\text{m}$. Le sezioni sono state colorate con cresyl violet e osservate al microscopio.

3.7. Preparazione ed analisi neurochimica tissutale di campioni di striato e brainstem

Dopo il sacrificio degli animali, sono stati rimossi rapidamente lo striato e il brainstem comprensivo della SNpc, quindi pesati ed omogeneizzati in acido metafosforico (*meta*-H₃PO₄) all'1% contenente EDTA 1mM. Dopo centrifugazione (17,500 × g per 10 min a 4 °C), il sopranatante è stato diviso in 2 aliquote. La prima aliquota è stata filtrata e immediatamente iniettata nel sistema HPLC per l'analisi di DA, DOPAC, HVA, 3-MT e acido ascorbico. Nella seconda aliquota, portato il pH a 7.0 con K₂HPO₄ al 45%, è stato aggiunto l'1% di DL-omocisteina per ridurre l'acido deidroascorbico (DHAA) ad acido ascorbico. Il campione è stato incubato per 30 minuti a 25 °C, quindi portato a pH 3.0 con *meta*-H₃PO₄ al 30%, filtrato e iniettato (20µl) in HPLC per la determinazione dell'acido ascorbico tissutale totale. La concentrazione del DHAA è stata calcolata come differenza tra il contenuto di acido ascorbico della prima e della seconda aliquota.

3.8. Analisi dei campioni di microdializzato

I campioni di microdializzato raccolti durante l'esperimento, sono stati analizzati con due diversi sistemi per valutare le variazioni delle concentrazioni delle sostanze in esame. I sistemi analitici utilizzati sono uno cromatografico e l'altro spettrofotometrico.

3.8.1 Analisi Cromatografica

La quantificazione neurochimica delle catecolamine, indolamine, AA e UA è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevazione elettrochimica (high performance liquid chromatography with electrochemical detection, HPLC-EC). È stata utilizzata una pompa Varian 9001 HPLC dotata di un iniettore Rheodyne (mod. 7725), una colonna a fase inversa (Adsorbosphere C18, 100 mm × 4.6 mm i.d., particle size: 3 µm) (Alltech, USA), un detector

elettrochimico BAS mod. LC4B. i cromatogrammi sono stati acquisiti tramite interfaccia Varian Star Chromatographic Workstation v. 4.0 per l'elaborazione e il calcolo. La fase mobile finale era così composta: KH_2PO_4 2.1 g/l, K_2HPO_4 0.7 g/l, EDTA 0.5 mM, MeOH 8.0% e OSA 100 mg/l (pH=2.65); è stato utilizzato un flusso 0.8 ml/min e un potenziale applicato di +780 mV. Il pH è stato aggiustato con acido fosforico concentrato. Per la quantificazione delle sostanze nei campioni è stata utilizzato un mix di standard, le cui concentrazioni erano: AA 7.5 μM , UA 1.0 μM , NE 15 nM, L-DOPA 12.7 nM, DOPAC 0.6 μM , DA 7.0 nM, 5-HIAA 0.5 μM , HVA 0.5 μM , 3-MT 50 nM and 5-HT 5 nM.

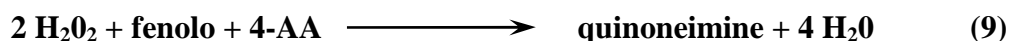
3.8.2 Analisi Spettrofotometrica

La quantificazione del metabolismo energetico è stata eseguita utilizzando il dispositivo ISCUS (Clinical Microdialysis Analyzer, CMA/Microdialysis Sweden). Si tratta di un sistema di analisi basato sulla cinetica enzimatica con una rivelazione spettrofotometrica, in grado di determinare le concentrazioni di glucosio, lattato, piruvato e il rapporto lattato/piruvato direttamente dal microdializzato.

Il glucosio viene ossidato enzimaticamente dalla glucosio ossidasi (GOD) in gluconolattone e perossido d'idrogeno dalla seguente reazione:

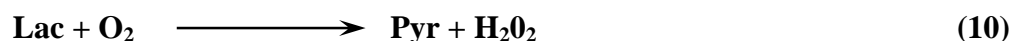


la perossidasi (POD) catalizza la reazione colorimetrica con il perossido di idrogeno, il formosio, il fenolo e il 4-amino-antipyrine (4-AA) producendo il quinoneimine, un composto colorato rosso/viola:



L'assorbanza del composto colorato viene letta ad una lunghezza d'onda di 530 nm e confrontata con uno standard per determinare la concentrazione di glucosio nel dializzato.

Il lattato viene ossidato enzimaticamente dalla lattato ossidasi (LOD) in piruvato e perossido d'idrogeno dalla seguente reazione:



la perossidasi (POD) catalizza la reazione colorimetrica con il perossido di idrogeno formatosi, il fenolo e il 4-AA producendo il quinoneimine, un composto colorato rosso/viola:



L'assorbanza del composto colorato viene letta ad una lunghezza d'onda di 530 nm e confrontata con uno standard per determinare la concentrazione di glucosio nel dializzato.

Il piruvato viene ossidato enzimaticamente dalla piruvato ossidasi (PyrOx) in presenza di fosfato inorganico (Pi) ad acetilfosfato, anidride carbonica e perossido d'idrogeno dalla seguente reazione:



la perossidasi (POD) catalizza la reazione colorimetrica con il perossido di idrogeno formatosi, il TOOS e il 4-AA producendo il quinonediimine, un composto colorato rosso/viola:



L'assorbanza del composto colorato viene letta ad una lunghezza d'onda di 530 nm e confrontata con uno standard per determinare la concentrazione di glucosio nel dializzato.

Il rapporto L/P viene calcolato dall'apparecchio sui valori di lattato e piruvato registrati nel microdializzato. L'ISCUS fornisce il valore del L/P solo quando

entrambe le sostanze sono leggibili nel campione, se una delle due non fosse calcolabile non viene registrato il rapporto L/P per quel campione.

3.9. Forced swim test

Il forced swim test permette di slatentizzare il danno neuromotorio dovuto alla somministrazione di MPTP diversi giorni dopo la prima iniezione della neurotossina. A tale scopo è stata utilizzata una piccola piscina costruita in plexiglass di 25 cm di larghezza, 40 cm di lunghezza, 16 di profondità. L'acqua è stata mantenuta ad una temperatura costante di 27 ± 2 °C. (Haobam R. et al 2005). La qualità del nuoto è stata valutata in un tempo di 15' in base a scores prestabiliti.

3.10. Analisi statistica

Gli effetti farmacologici dei trattamenti sulla neurochimica cerebrale degli animali, sono stati valutati come variazione dei valori assoluti nella concentrazione sia nel tessuto che nel dializzato. La significatività statistica è stata confermata dall'analisi della varianza (ANOVA) per le differenze tra i gruppi e nel tempo. Le differenze nei e tra i gruppi sono state calcolate attraverso il paired o unpaired t-test (Student-Newman-Keuls multiple comparison adjustment).

4. Risultati

4.1 Effetti del trattamento sub-acuto con MPTP in topi C57BL/6

A seguito del trattamento sub-acuto con MPTP, sono stati valutati i livelli tissutali di DA, 3MT, DOPAC, HVA, AA, DHAA, 5-HT e 5-HIAA sia nei gruppi controllo (somministrazione intraperitoneale di soluzione salina) che nei gruppi trattati. Le variazioni delle concentrazioni dei campioni provenienti dallo striato e dal brainstem (inclusa la SNpc) sono state valutate 1, 7, 14, e 21 giorni dopo le 4 somministrazioni intraperitoneali di MPTP.

4.1.1. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DA e 3-MT tissutali nello striato e SNpc

Come illustrato nella **figura 12**, la somministrazione sistemica di MPTP ha indotto un rapido declino nella DA tissutale nei campioni di origine striatale, già ad un giorno dal trattamento (-92.8% rispetto ai controlli; $p < 0.05$). Tale diminuzione si è mantenuta relativamente costante nel corso delle tre settimane successive con una riduzione pari a -96.5% riscontrabile in 21^a giornata.

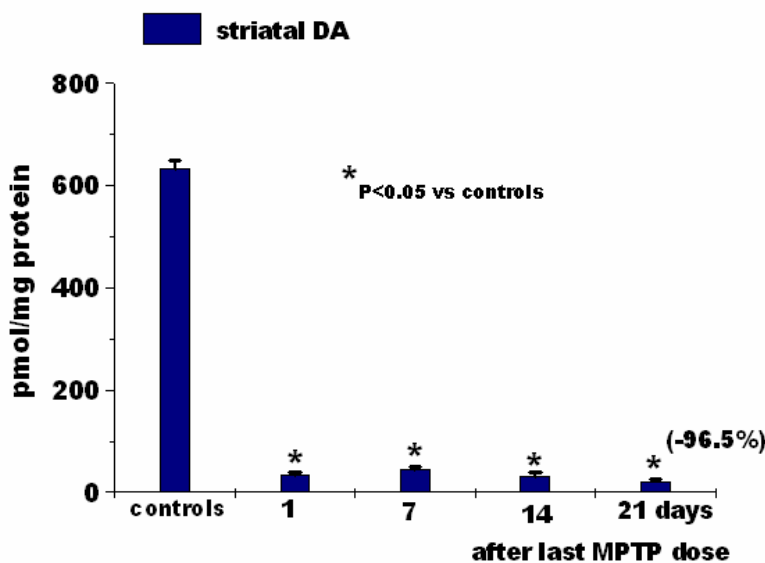


Figura 12. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DA striatale tissutale

Nei campioni di brainstem che includevano la SNpc (**figura 13**), al contrario, la DA tissutale non è significativamente variata rispetto ai controlli nella prima settimana dopo il trattamento, manifestando un declino significativo solo a partire dal 14° giorno con una diminuzione massima in 21^a giornata (-65.6% rispetto ai controlli; $p < 0.05$).

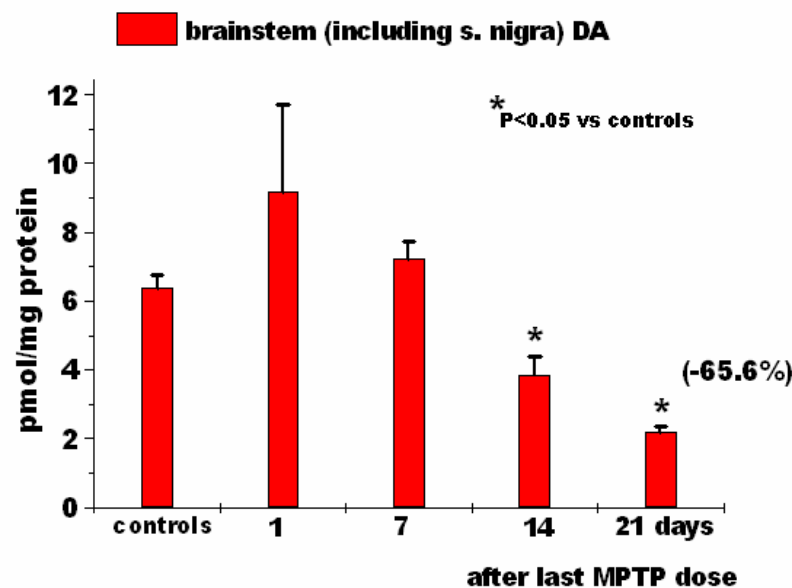


Figura 13. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DA tissutale nel brainstem

La 3MT ha mostrato un decremento simile alla DA sia nei tessuti di origine striatale che in quelli provenienti dal brainstem (dati non riportati).

4.1.2. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DOPAC e HVA tissutali nello striato

Nei campioni di tessuto provenienti dalla regione striatale, l'effetto del trattamento sub-acuto con MPTP sui livelli di DOPAC e HVA ha indotto con una marcata riduzione della loro concentrazione (-95.8% rispetto ai controlli; $p < 0.05$), già ad un giorno dal trattamento. Tuttavia si può osservare come, a partire dalla 14^a giornata, si manifesti un graduale aumento di DOPAC+HVA che risultano essere significativi se confrontati con quelli del giorno 1 (**figura 14A**).

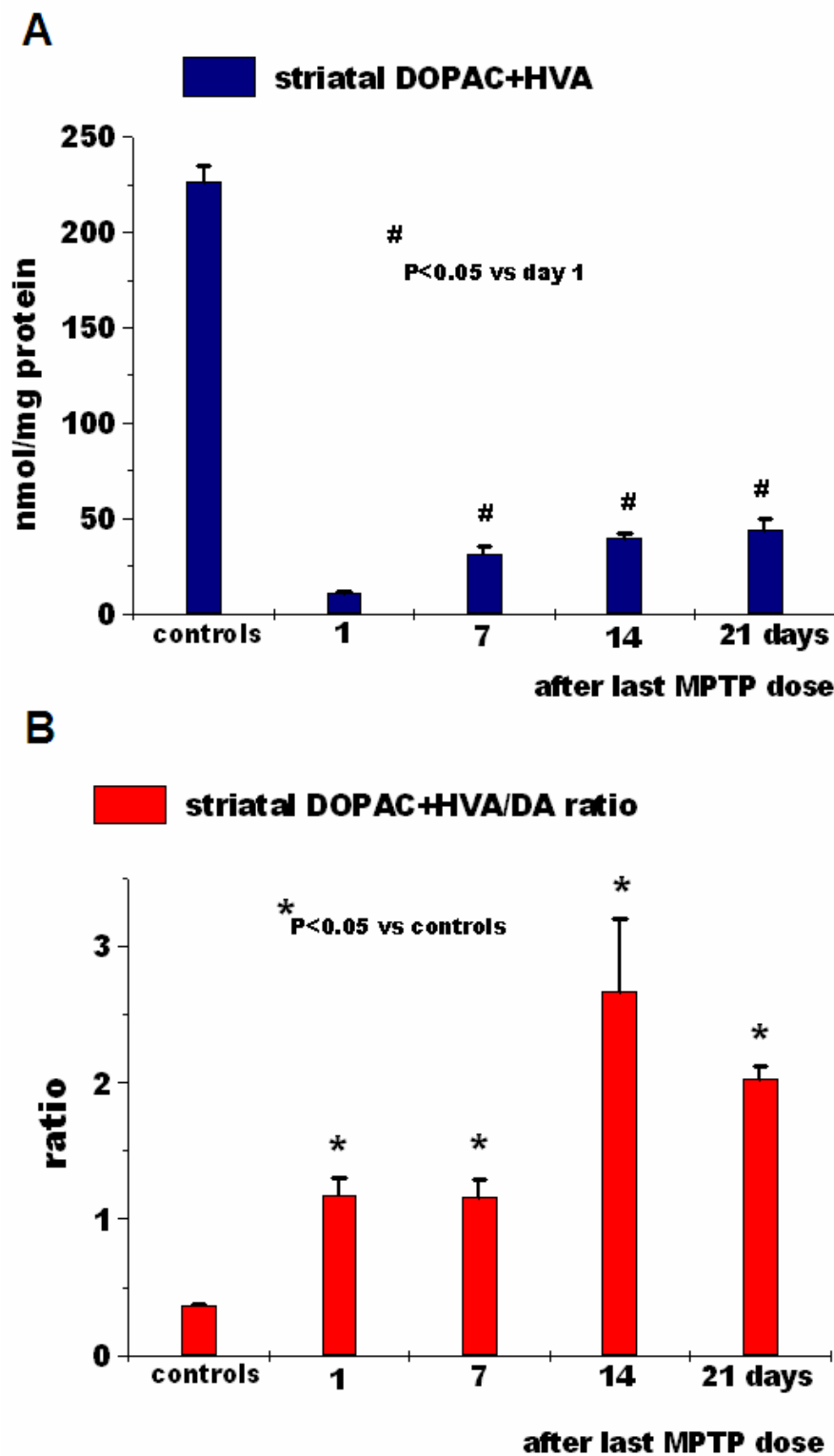


Figura 14. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su DOPAC e HVA tissutali nello striato

Il rapporto DOPAC+HVA/DA è un indice del turnover della dopamina, mostra un significativo aumento rispetto ai controlli durante le 3 settimane successive al trattamento come si evidenzia dalla **figura 14B**, con un incremento massimo in 14^a giornata.

4.1.3. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su AA e DHAA tissutali nello striato e SNpc

Nei campioni di tessuto provenienti dalla regione striatale, un trattamento sub-acuto con MPTP i.p. non ha modificato significativamente i livelli di AA e AA+DHAA rispetto ai controlli durante i 21 giorni di osservazione. Al contrario nella regione del brainstem si è dimostrata una progressiva diminuzione dei valori sia di AA sia di AA+DHAA, che risulta statisticamente significativa ($p < 0.05$) rispetto ai controlli già a partire dalla 7^a giornata, con una diminuzione massima riscontrabile in 21^a giornata rispettivamente del -17% per AA e -19.5% per AA+DHAA ($p < 0.05$). Inoltre si è visto che, sia nei controlli sia in animali sottoposti a trattamento sub-acuto, i valori tissutali di AA rinvenuti nel brainstem risultano essere sempre più elevati di quelli riscontrati nello striato nei giorni di osservazione ma perdono significatività statistica già dalla 7^a giornata come illustrato in **figura 15**.

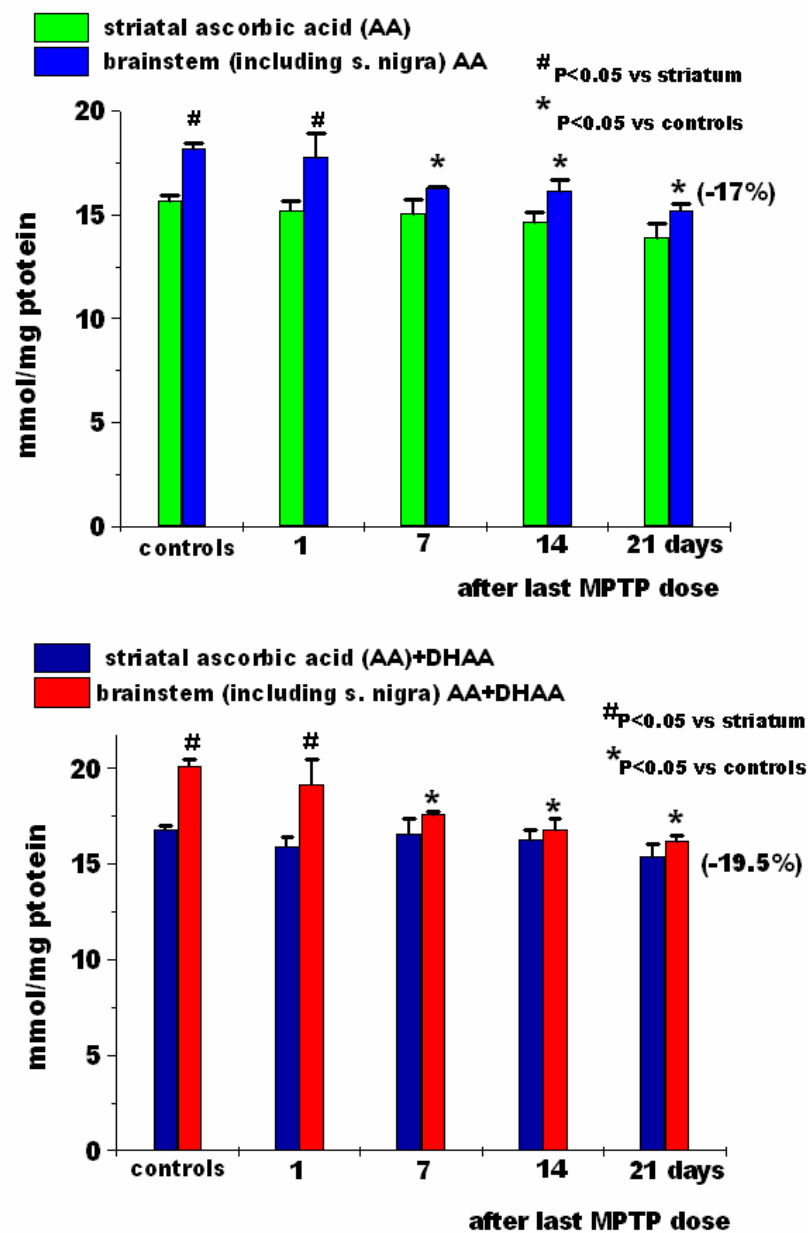


Figura 15. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su AA e DHAA tissutali nello striato e SNpc

L'analisi dei tessuti di origine striatale effettuata nelle ore immediatamente successive alla somministrazione dell'ultima dose del trattamento sub-acuto con MPTP, ha evidenziato come non vi siano variazioni statisticamente significative nei valori di AA (**figura 16A**), mentre si riscontra una significativa riduzione dei valori di DHAA a 3h e 24h dall'ultima iniezione della tossina rispetto alle giornate 7, 14, 21, dove si registra un aumento dei livelli di DHAA (**figura 16B**).

Il rapporto DHAA/AA (**figura 16C**) si riduce durante la prima giornata dopo l'ultima somministrazione di MPTP e in particolare in maniera statisticamente significativa rispetto ai controlli a 3h e 24h dall'ultima dose (rispettivamente -36% e -30% , $p < 0.05$), mentre in 7^a, 14^a, 21^a giornata si ha un incremento significativo del rapporto rispetto ai controlli (rispettivamente $+38\%$, $+34.5\%$ e $+45.3\%$, $p < 0.05$).

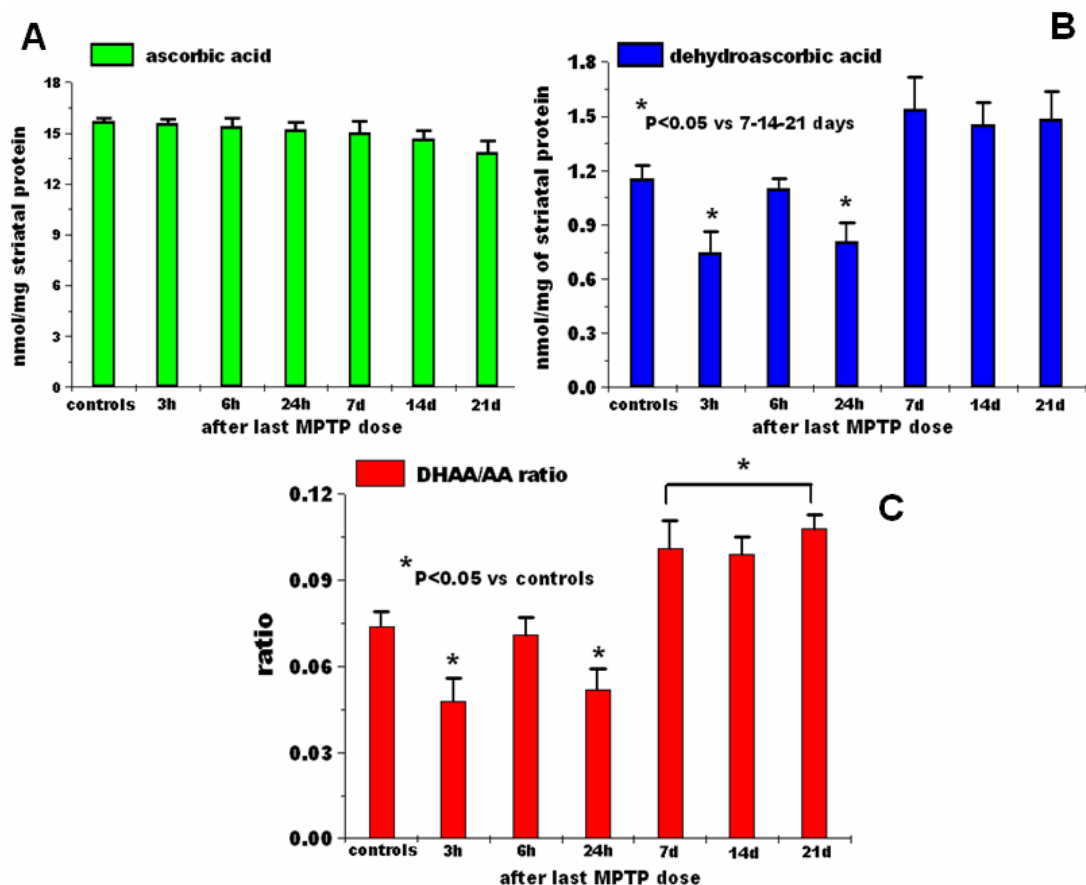


Figura 16. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su AA, DHAA e DHAA/AA ratio tissutali nello striato nelle prime ore dopo il trattamento

4.1.4. Effetto del trattamento sub-acuto con MPTP su 5-HT e 5-HIAA tissutali nello striato

Come illustrato nella **figura 17A**, la somministrazione sistemica di MPTP non ha modificato le concentrazioni di 5-HT nei campioni di origine striatale, mentre ha indotto un progressivo declino nella 5-HT tissutale nei campioni provenienti dal

brainstem già ad un giorno dal trattamento, fino ad una riduzione pari a -63.8% (rispetto ai controlli; $p < 0.05$) riscontrabile in 21^a giornata.

Nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di 5-HIAA è stata riscontrata sia nei campioni provenienti dallo striato che in quelli del brainstem (figura 17B) a seguito della somministrazione di MPTP i.p.

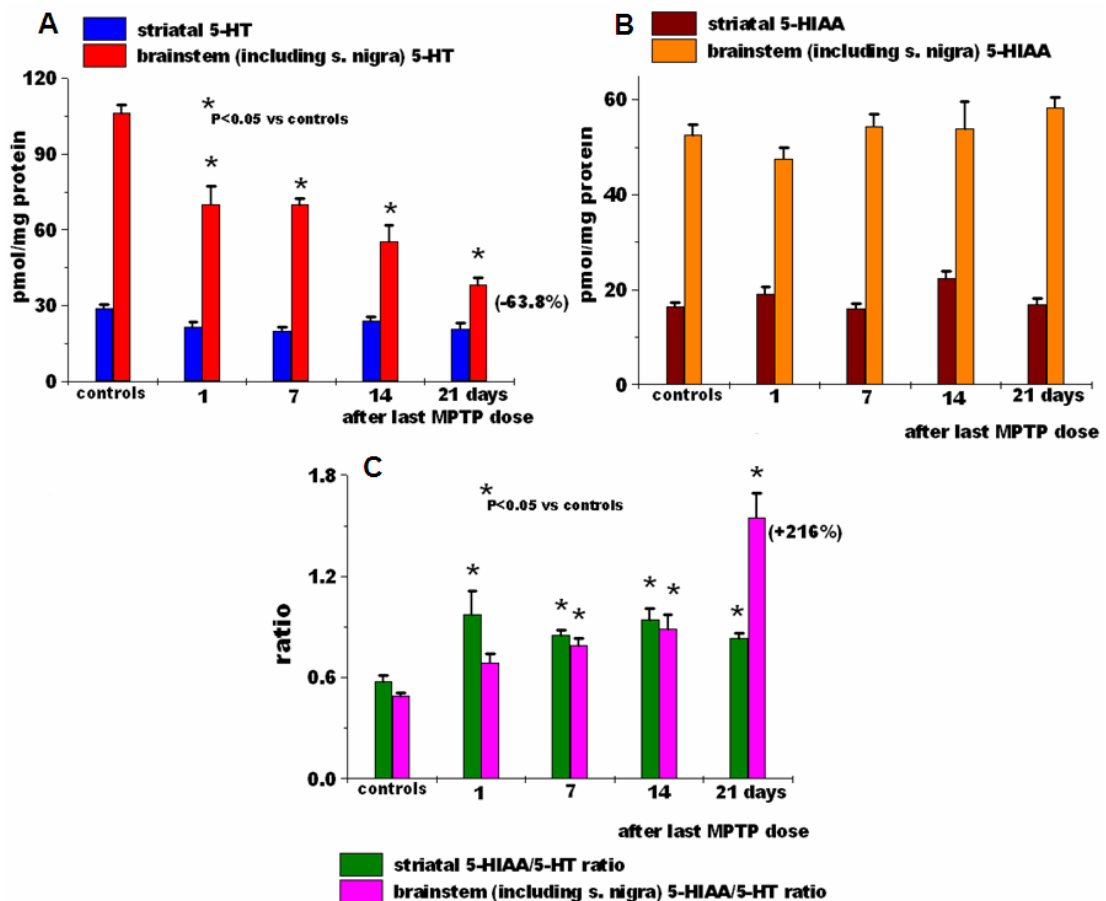


Figura 17. Effetto del trattamento sub-acute con MPTP su 5-HT e 5-HIAA tissutali nello striato

Il rapporto 5-HIAA/5-HT risulta invece aumentato sia nello striato che nel brainstem, come è evidente dalla figura 17C. L'incremento maggiore nello striato si ha in 1^a giornata (+66,7% rispetto ai controlli; $p < 0.05$), mentre nel brainstem si riscontra in 21^a giornata (+216% rispetto ai controlli; $p < 0.05$)

4.2 Effetti di un trattamento sub-cronico con MPTP in topi C57BL/6

A seguito di un trattamento sub-cronico con MPTP sono stati valutati i livelli striatali di DA, 3MT, DOPAC, HVA e AA. Le variazioni delle concentrazioni delle succitate sostanze nello striato degli animali, sono state valutate, mediante microdialisi cerebrale sia durante il trattamento sia 7, 14, e 21 giorni dopo la sospensione della somministrazione intraperitoneale di MPTP. La sonda micro dialitica a singola via è stata inserita nello striato destro 24h prima dell'esperienza di dialisi.

4.2.1. Effetto del trattamento sub-cronico con MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale

Come illustrato in **figura 18**, la prima somministrazione sistemica di MPTP determina un aumento significativo della concentrazione della DA e della 3-MT nel dializzato striatale rispetto ai valori della linea di base (0-40 min). Il picco massimo di DA è riscontrabile 100 minuti dopo la somministrazione di MPTP, mentre per la 3-MT la concentrazione più alta si riscontra dopo 120 minuti dalla somministrazione.

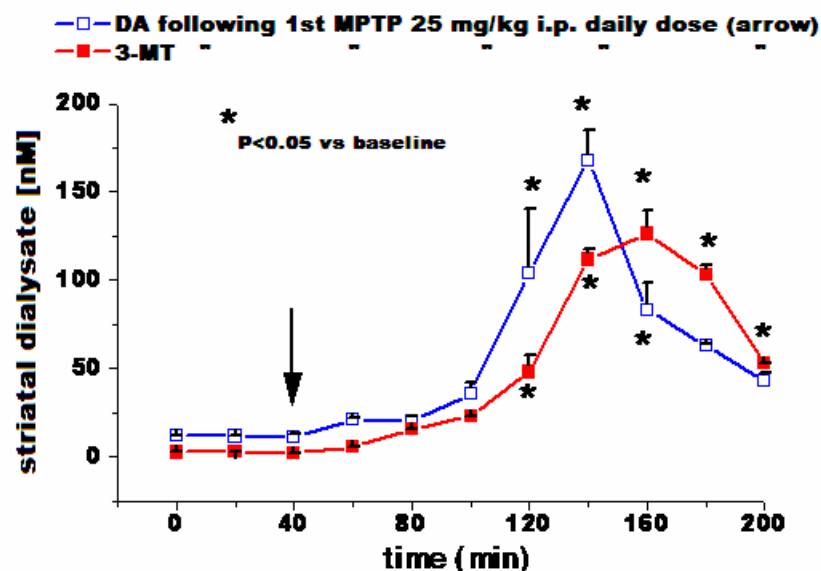


Figura 18. Effetto del trattamento sub-cronico con MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale day 1

I valori basali di DA e 3-MT registrati durante il quinto giorno (**figura 19**) di trattamento risultarono essere più bassi di quelli rinvenuti al giorno 1. A seguito della somministrazione della dose di MPTP si è evidenziato un significativo aumento delle concentrazioni extracellulari di DA e 3-MT con latenza ed ampiezza inferiori rispetto a quelle evidenziate in prima giornata. Sia i valori basali che i valori di DA e 3-MT a seguito della singola somministrazione di MPTP, risultarono decrescere progressivamente durante il trattamento, come dimostrato in animali il cui monitoraggio microdialitico è stato effettuato nei giorni 2, 3 e 4 (dati non riportati).

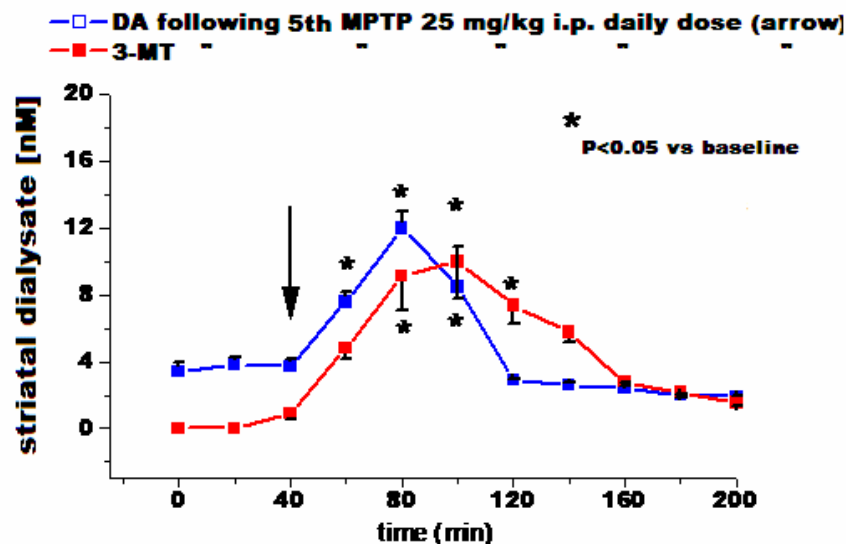


Figura 19. Effetto del trattamento sub-cronico con MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale day 5

4.2.2. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale

La somministrazione sistemica di una “dose challenge” di MPTP in topi precedentemente sottoposti ad un trattamento sub-cronico, induce un immediato release di DA con aumento della stessa e della 3-MT nel dializzato striatale. Poiché la 3-MT viene prodotta dalle COMT agendo sulla dopamina extracellulare, la somma DA+3-MT può essere considerata un indice della quantità totale di DA rilasciata e presente negli spazi extracellulari. In diversi gruppi di animali pre-trattati la “dose

challenge” di MPTP è stata somministrata per via intraperitoneale 7, 14 e 28 giorni dopo la fine del trattamento sub-cronico.

La **figura 19** mostra come la somministrazione di una “dose challenge” di MPTP induca sempre un aumento di DA+3MT statisticamente significativo ($p<0.05$) rispetto ai valori basali e come tale aumento diventi più marcato con il passare del tempo dall’ultima dose del trattamento sub-cronico. In 28^a giornata l’aumento di DA+3MT a seguito della iniezione di MPTP i.p., è risultato statisticamente superiore ($p<0.05$) a quello avvenuto in 7^a e 14^a giornata.

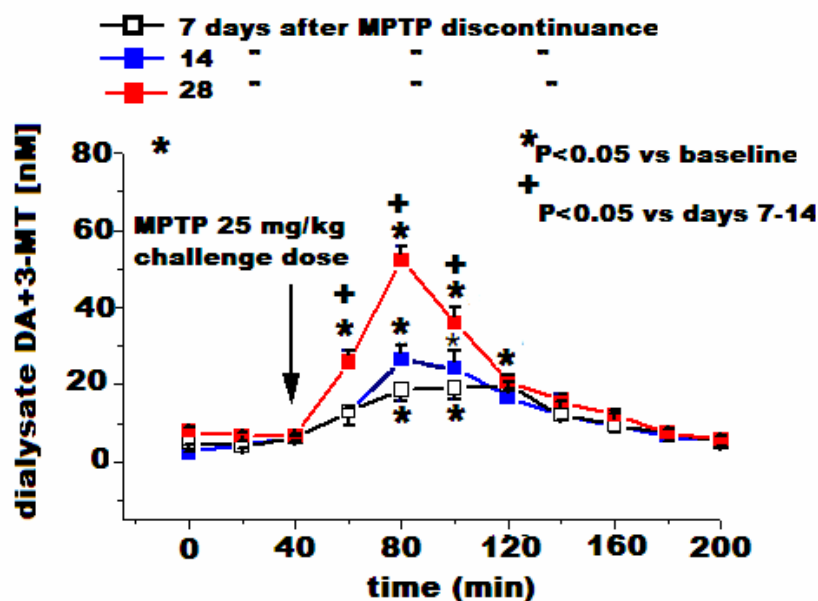


Figura 20. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DA e 3MT nel dializzato striatale

4.2.3. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DOPAC e HVA nel dializzato striatale

La prima somministrazione sistemica di MPTP determina una riduzione statisticamente significativa dei valori medi di DOPAC+HVA ($p<0.05$) rispetto ai valori medi basali. Come mostrato in **figura 21**, a seguito di una “dose challenge” nei giorni 7 e 28, sia i valori basali che i valori di DA e 3-MT registrati dopo la somministrazione di MPTP sono risultati essere ancora statisticamente significativi ($p<0.05$ rispetto alla 1^a giornata) anche se è evidente un aumento dei valori dei

cataboliti della DA con il passare del tempo dall'ultima dose del trattamento sub-cronico.

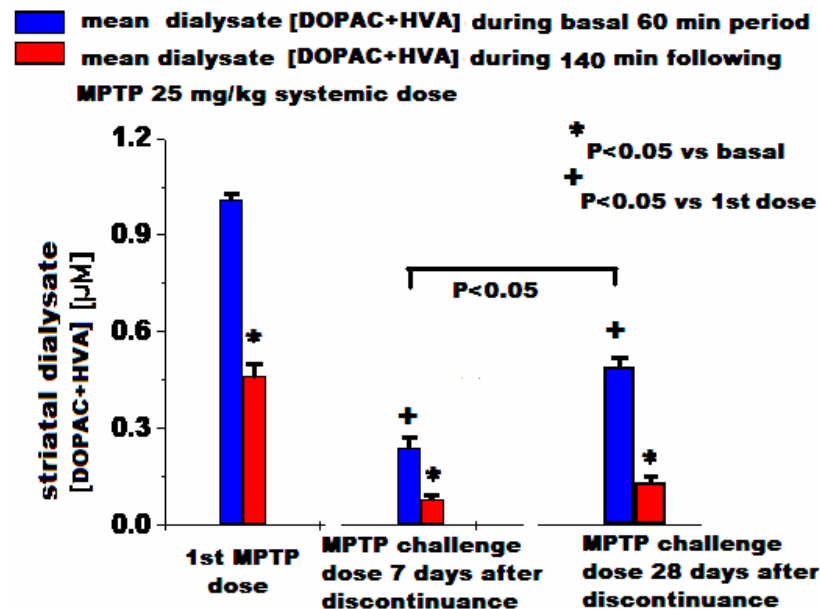


Figura 21. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su DOPAC e HVA nel dializzato striatale

4.2.4. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su AA nel dializzato striatale

In animali soggetti a trattamento sub-cronico, la somministrazione sistemica di MPTP ha mostrato un leggero, ma statisticamente non significativo, aumento dei valori medi di AA rispetto ai valori medi basali (**figura 22A**). In diversi gruppi di animali pre-trattati la “dose challenge” di MPTP, somministrata per via intraperitoneale 7, 14 e 28 giorni dopo la fine del trattamento sub-cronico, ha evidenziato una riduzione dei valori medi basali di AA rispetto quelli riscontrati durante il trattamento. È presente un trend di recupero tendente a ripristinarne i valori particolarmente visibile in 28^a giornata ($p < 0.05$ rispetto al giorno 7). Per quanto riguarda i valori medi di AA dopo la somministrazione della “challenge dose”, si è riscontrata una diminuzione statisticamente significativa nella 7^a e 14^a giornata ($p < 0.05$ rispetto ai basali) mentre si è riscontrato un aumento dell'AA in 28^a giornata

statisticamente significativo ($p < 0.05$) rispetto al giorno 7 e 14 come mostrato in figura 22B.

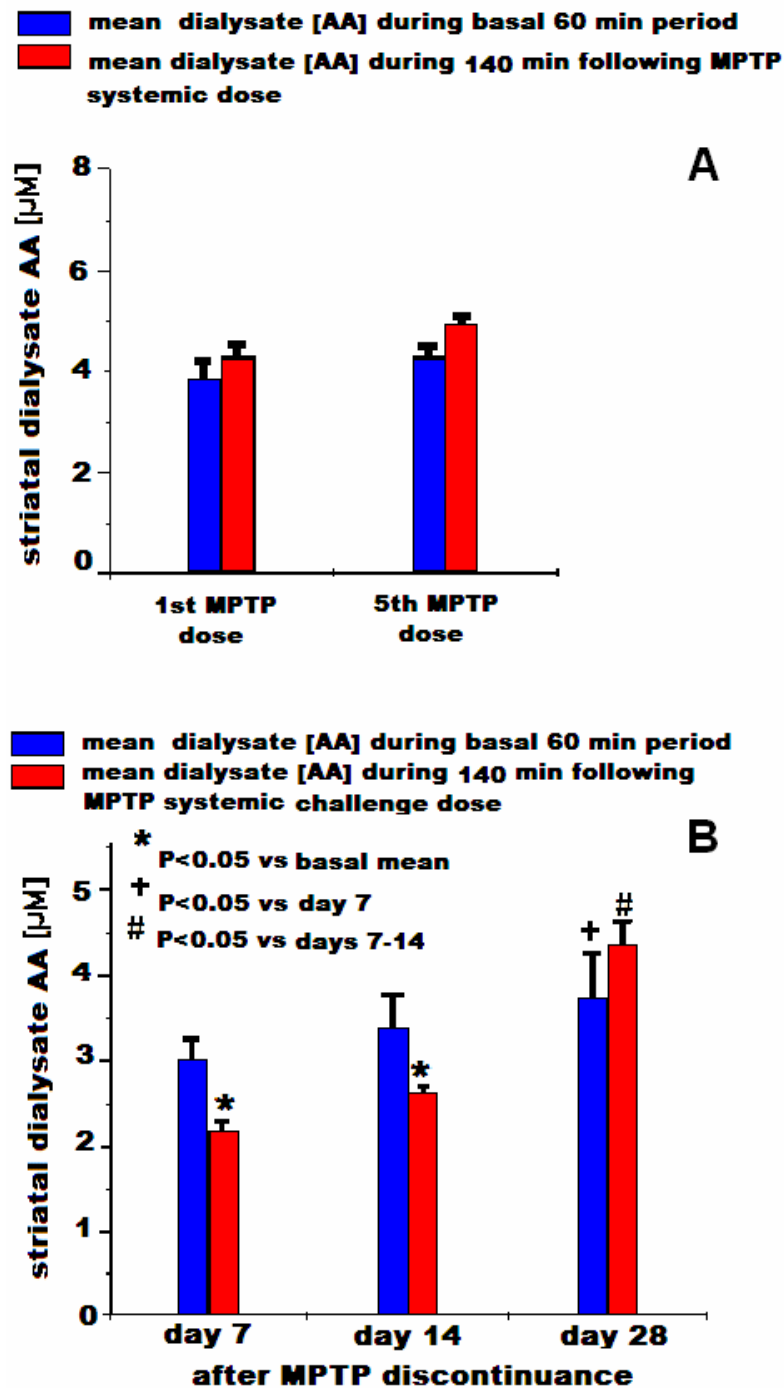


Figura 22. Effetto di una "dose challenge" di MPTP su AA nel dializzato striatale

4.2.5. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su Forced Swim Test

Animali soggetti a trattamento sub-cronico con MPTP sono stati sottoposti a Forced Swim Test. I diversi gruppi di animali (controlli e trattati) sono stati immersi in una vasca e costretti a nuotare per 15 minuti consecutivi mentre la loro prestazione veniva valutata con un punteggio secondo degli score prestabiliti.

Dopo la quinta dose di MPTP del trattamento sub-cronico, si è riscontrata una diminuzione significativa (70%, $p < 0.05$) dello score rispetto ai controlli; lo stesso test è stato ripetuto 6 giorni dopo la sospensione del trattamento e si è evidenziato una ripresa dello score rispetto ai controlli. La somministrazione di una “dose challenge” di MPTP i.p. in 7^a giornata dopo la sospensione del trattamento determina una riduzione dello score nel swim test statisticamente significativa rispetto ai controlli (34%, $p < 0.05$) come mostrato in **figura 23**.

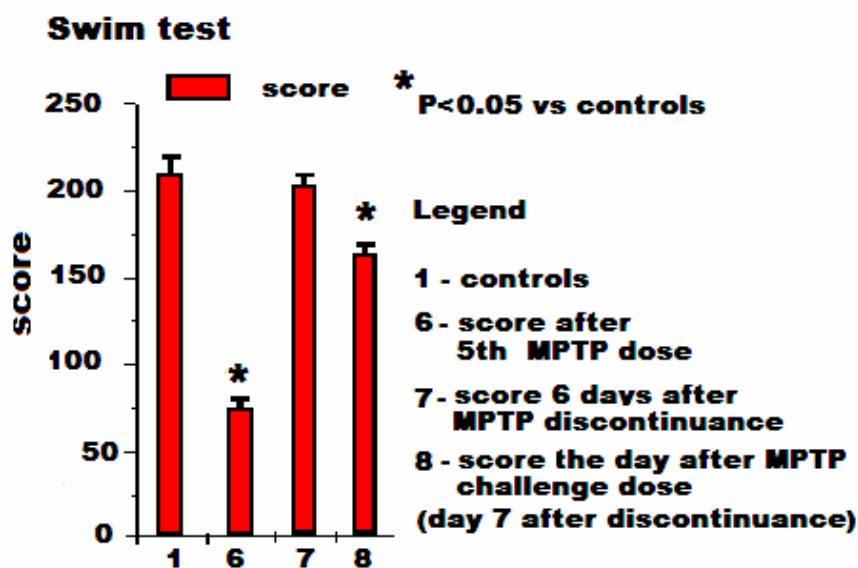


Figura 23. Effetto di una “dose challenge” di MPTP su Forced Swim Test

4.3 Metabolismo e neurochimica energetico striatale in ratti Wistar

A seguito di una somministrazione intraperitoneale di MPTP in ratti wistar, sono stati valutati i livelli striatali di glucosio, lattato, piruvato e il rapporto lattato/piruvato

(L/P ratio). Le variazioni della concentrazione di dopamina striatale e le modificazioni del metabolismo energetico sono state valutate mediante microdialisi cerebrale nel corso di 3 giorni, a partire dalla somministrazione di MPTP. La sonda microdialitica doppia è stata inserita nello striato destro dell'animale 24h prima dell'esperimento di dialisi.

4.3.1. Determinazione sperimentale del doppio flusso asimmetrico microdializzante

La validazione *in vitro* della sonda doppia è stata effettuata in una bulk solution contenente glucosio (1mM), lattato (1mM) e piruvato (1mM). È stata eseguita una dialisi continua, con campionamento di 20 minuti, variando la combinazione dei flussi sui due ingressi della sonda; si è così calcolato il recovery relativo della sonda che risulta essere rispettivamente del 41.1% per il glucosio, 52.3% per il lattato e 45.1% per il piruvato (**figura 24**). Le modificazioni dei flussi, nelle varie combinazioni testate, non hanno influenzato la capacità di recovery delle due emisonde che agiscono quindi come due entità separate non mutualmente influenzabili.

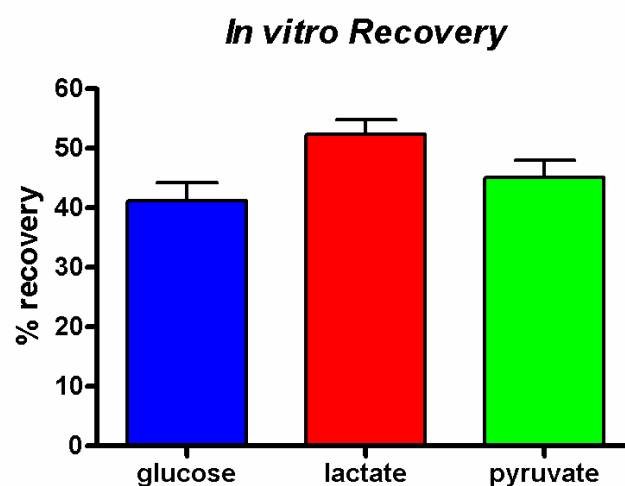


Figura 24. Recovery *in vitro* di glucosio, lattato e piruvato con doppio flusso asimmetrico microdializzante

Una seconda batteria di test è stata effettuata per valutare la performance della sonda doppia in una matrice artificiale, con lo scopo di ricreare le condizioni relative alla velocità di diffusione delle sostanze in esame nel cervello. La sonda, inserita in un gel di agaroso 0.5% equilibrato con una bulk solution contenente glucosio (1mM), lattato (1mM) e piruvato (1mM), ha confermato i risultati ottenuti *in vitro* con la sola bulk solution, sia per quanto riguarda il recovery relativo che l'indipendenza delle due emisonde rispetto alle perturbazioni dovute ai flussi differenti (dati non riportati).

I test *in vivo* concludono e validano la tecnica del doppio flusso asimmetrico.

In tabella sono riportati alcuni dati relativi alle concentrazioni di glucosio, lattato e piruvato registrate nello striato di un ratto (n=3).

Flusso $\mu\text{l}/\text{min}$	Glucosio [μM]	Lattato [μM]	Piruvato [μM]
0.6	634 ± 21	829 ± 30	55.1 ± 2.3
0.6	616 ± 16	819 ± 27	57.6 ± 2.1
0.6	623 ± 28	853 ± 25	53.2 ± 1.8
0.9	588 ± 19	735 ± 21	37.2 ± 1.2
0.6	630 ± 24	841 ± 37	51.9 ± 2.1
1.5	259 ± 8	347 ± 11	13.5 ± 0.5

Tabella 2. *Recovery in vivo*

Come si può vedere, quantunque diminuisca all'aumentare del flusso di perfusione, il recovery di ciascuna delle due emisonde è indipendente dal flusso di perfusione della controparte.

4.3.2. Effetto dell'MPTP sul metabolismo energetico nel dializzato striatale

La prima somministrazione intraperitoneale di MPTP, come mostrato in **figura 25**, induce un aumento non significativo nei livelli extracellulari di glucosio nello striato del ratto. Nei giorni successivi è stata registrata una progressiva, e statisticamente

significativa ($p < 0.05$), diminuzione sia dei valori di glucosio extracellulare basale che in risposta ad una somministrazione di MPTP. Tale somministrazione in giorno 3 non è più in grado di evocare un aumento del glucosio rispetto ai basali.

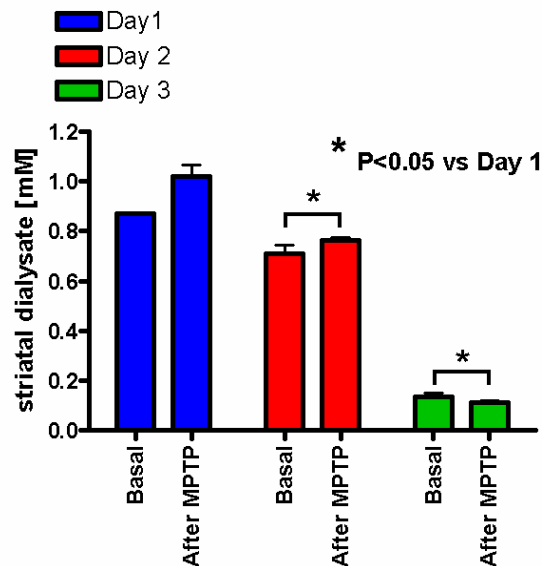


Figura 25. Effetto dell'MPTP sul glucosio extracellulare striatale

Per quanto riguarda il lattato, la prima somministrazione di MPTP induce un aumento significativo dei livelli di questo analita rispetto ai valori basali ($p < 0.05$), nei giorni successivi si sono registrati valori basali di lattato significativamente aumentati rispetto a quelli del giorno 1 ($p < 0.05$). Una ulteriore somministrazione di MPTP alla 2^a e 3^a giornata non evoca più un incremento dei livelli extracellulari di lattato, che in 3^a giornata, benché ancora statisticamente significativo rispetto al giorno 1 e 2, risulta essere diminuito in maniera non significativa se confrontato con i basali dello stesso giorno (**figura 26**)

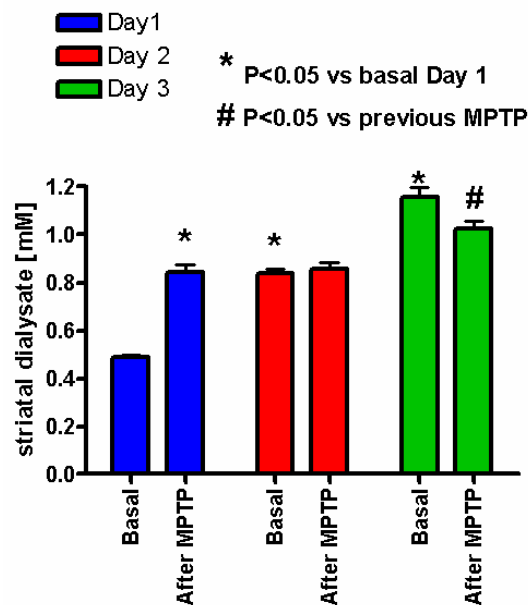


Figura 26. Effetto dell'MPTP sul lattato extracellulare striatale

La somministrazione di MPTP alla 1^a giornata, evoca un significativo aumento del piruvato ($p < 0.05$). Come mostrato in **figura 27**, nelle giornate 2 e 3 si ha un declino dei livelli di piruvato nel fluido extracellulare dello striato, tale declino è risultato statisticamente significativo sia nei livelli basali che dopo il trattamento con MPTP.

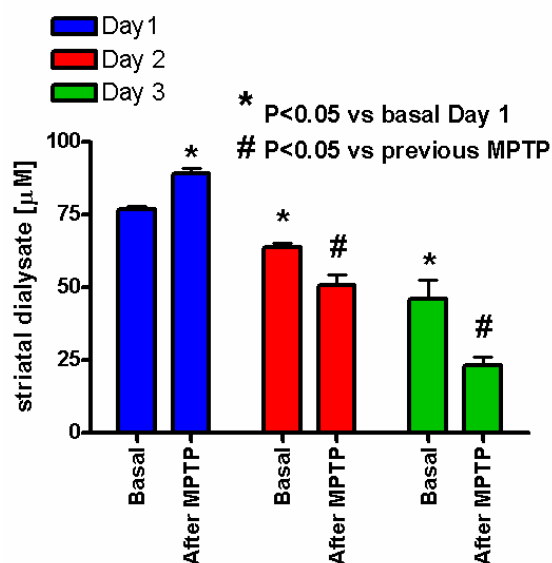


Figura 27. Effetto dell'MPTP sul piruvato extracellulare striatale

Di conseguenza, il rapporto lattato/piruvato (L/P ratio) nelle giornate esaminate, mostra un incremento costante e significativo ($p < 0.05$) sia per quanto riguarda i livelli basali che quelli dopo le somministrazioni di MPTP, in cui i valori di L/P ratio risultano ampiamente incrementati già dalla 2^a giornata, e manifestano il massimo aumento in 3^a giornata dopo l'ultima somministrazione di MPTP (**figura 28**)

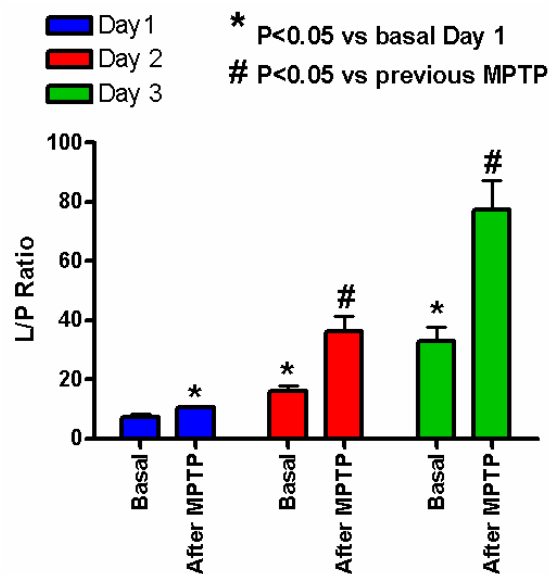


Figura 28. Effetto dell'MPTP sul rapporto lattato/piruvato extracellulare striatale

4.3.3. Effetto dell'MPTP su acido ascorbico, DA e suoi metaboliti nel dializzato striatale

La somministrazione sistemica di 3 dosi a scalare di MPTP ha evidenziato un andamento qualitativamente simile dei livelli di acido ascorbico, dopamina, 3-MT, DOPAC e HVA (dati non riportati) a quello già descritto nei topi C57BL/6 sottoposti a trattamento sub-cronico con MPTP (prime 3 somministrazioni).

4.3.4. Effetto di una singola dose di d-amph su DA e metabolismo energetico nel dializzato striatale

Come precedentemente dimostrato (Miele et al., 2000), una somministrazione intraperitoneale di d-amph (2 mg/Kg) induce un immediato incremento del release striatale di dopamina seguito da una diminuzione di DOPAC e HVA ed un aumento di 3MT (figura 29B) rispetto ai valori basali (figura 29A).

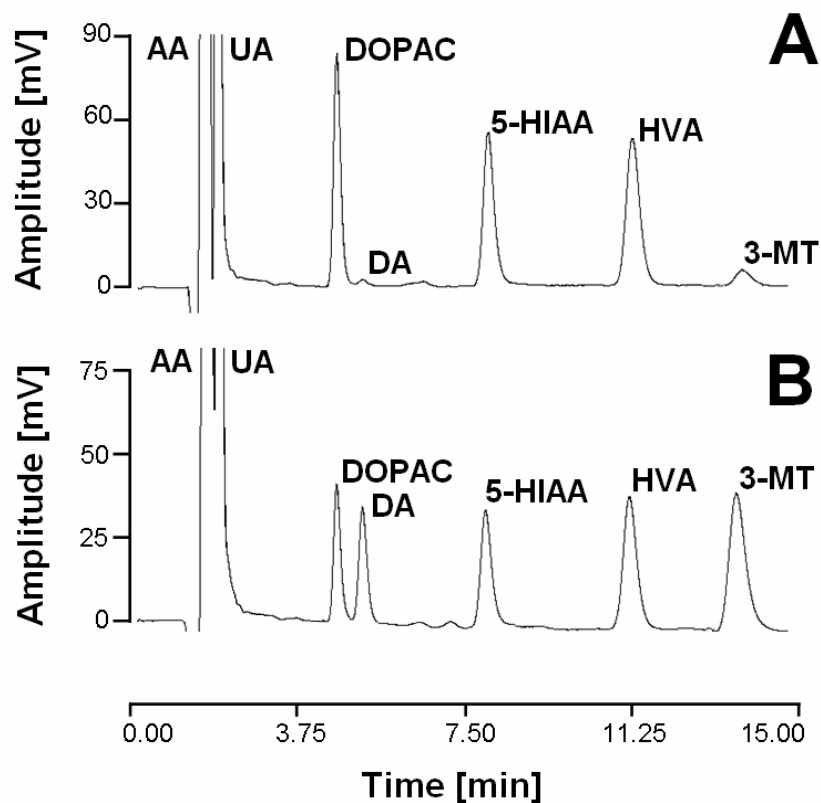


Figura 29. Cromatogramma del dializzato striatale del ratto. valori basali (A) e modificazione neurochimica a seguito di somministrazione di d-amph (B). Amplificazione: 100 nA/V.

L'analisi spettrofotometrica del microdializzato ha inoltre evidenziato un'immediata modificazione dei livelli di glucosio, lattato e piruvato nella stessa regione cerebrale. Come riportato nella dalla **figura 30**, dopo il trattamento, si sono registrati aumenti statisticamente significativi dei livelli degli analiti in esame se paragonati ai corrispettivi valori basali ($p < 0.05$). Il rapporto lattato/piruvato non ha mostrato variazioni statisticamente significative.

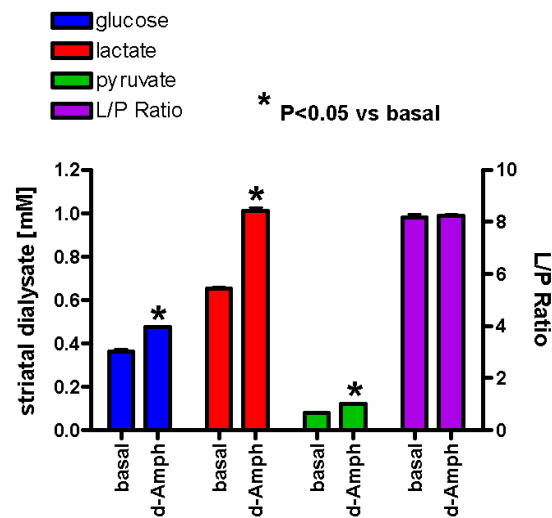


Figura 30. Effetto di una singola dose di d-amph su DA e metabolismo energetico nel dializzato striatale

La **figura 31**, evidenzia l'effetto sul rapporto lattato/piruvato della somministrazione di una singola dose di d-amph e di una singola dose di MPTP. I livelli basali non mostrano differenze statisticamente significative, dopo i trattamenti mentre nella d-amph non si riscontra un aumento significativo del rapporto, dopo la somministrazione di MPTP si registrano valori di L/P ratio significativamente aumentati ($p < 0.05$) rispetto ai valori basali.

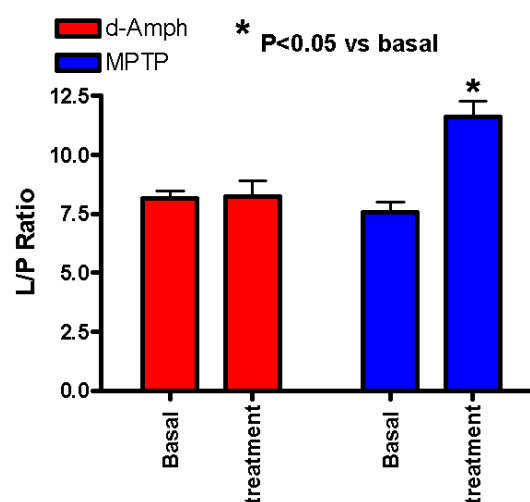


Figura 31. Modificazione del rapporto lattato/piruvato a seguito di una somministrazione singola di d-amph e di MPTP nel microdializzato striatale di ratto

4.4 Effetti di un trattamento con α -sinucleina in ratti Wistar

A seguito di una somministrazione intranigrale di α -sinucleina mutata (TAT- α -synA30P), sono stati valutati i livelli basali di DA striatale sia nei gruppi controllo (somministrazione intranigrale di soluzione salina con 0.1% ascorbato di sodio) che nei gruppi trattato. Le variazioni della concentrazione striatale di dopamina sono state valutate 7, 14 e 21 giorni dopo la somministrazione intranigrale mediante microdialisi cerebrale. La sonda microdialitica è stata inserita nello striato destro 24h prima dell'esperimento di dialisi.

4.4.1. Effetto di un trattamento con TAT- α -synA30P su DA nel dializzato striatale

Come illustrato in **figura 32**, i livelli basali di DA registrati negli animali trattati con TAT- α -synA30P mostrano una diminuzione statisticamente significativa in tutte le 3 giornate in esame. La riduzione media di DA risulta essere del 70% rispetto ai valori riscontrati nei gruppi controllo. In 14^a e 21^a giornata, nel gruppo controllo, si sono registrati valori basali statisticamente significativi rispetto a quelli riscontrati in 7^a giornata.

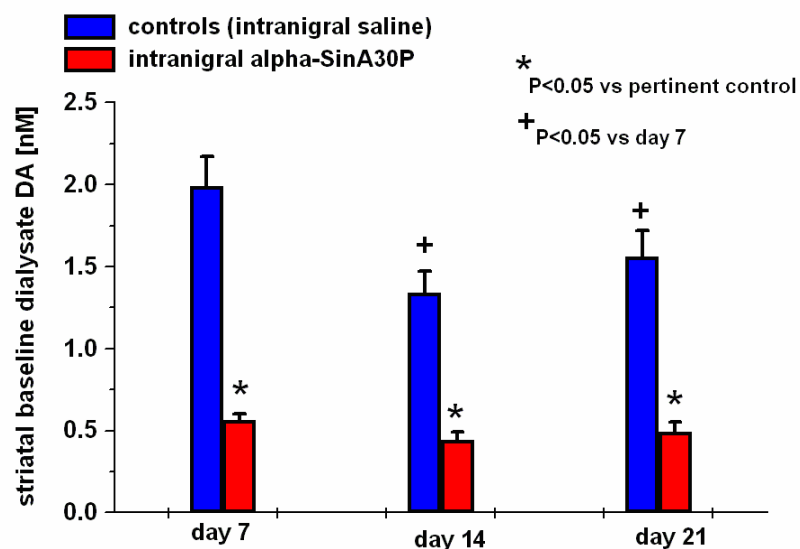


Figura 32. Effetto di trattamento con TAT- α -synA30P su DA nel dializzato striatale

4.4.2. Effetto della nicotina sul release di DA nel dializzato striatale

La somministrazione per retrodialisi di nicotina (5mM) della durata di 60 minuti, induce un immediato release di DA con aumento della stessa nel dializzato striatale.

In **figura 33**, si vede come la somministrazione di nicotina induca sempre un aumento di DA statisticamente significativo ($p < 0.05$) rispetto ai valori basali sia nei gruppi controllo sia nei gruppi precedentemente sottoposti ad un trattamento con TAT- α -synA30P.

Si è evidenziato, nei gruppi trattati, un significativo aumento delle concentrazioni extracellulari di DA con latenza ed ampiezza inferiori rispetto a quelle evidenziate nei controlli sia in 7^a che in 21^a giornata (rispettivamente **figura 33A** et **33C**, e un significativo aumento delle concentrazioni extracellulari di DA con medesima latenza ed ampiezza inferiore rispetto a quelle evidenziate nei controlli in 14^a giornata (**figura 33B**).

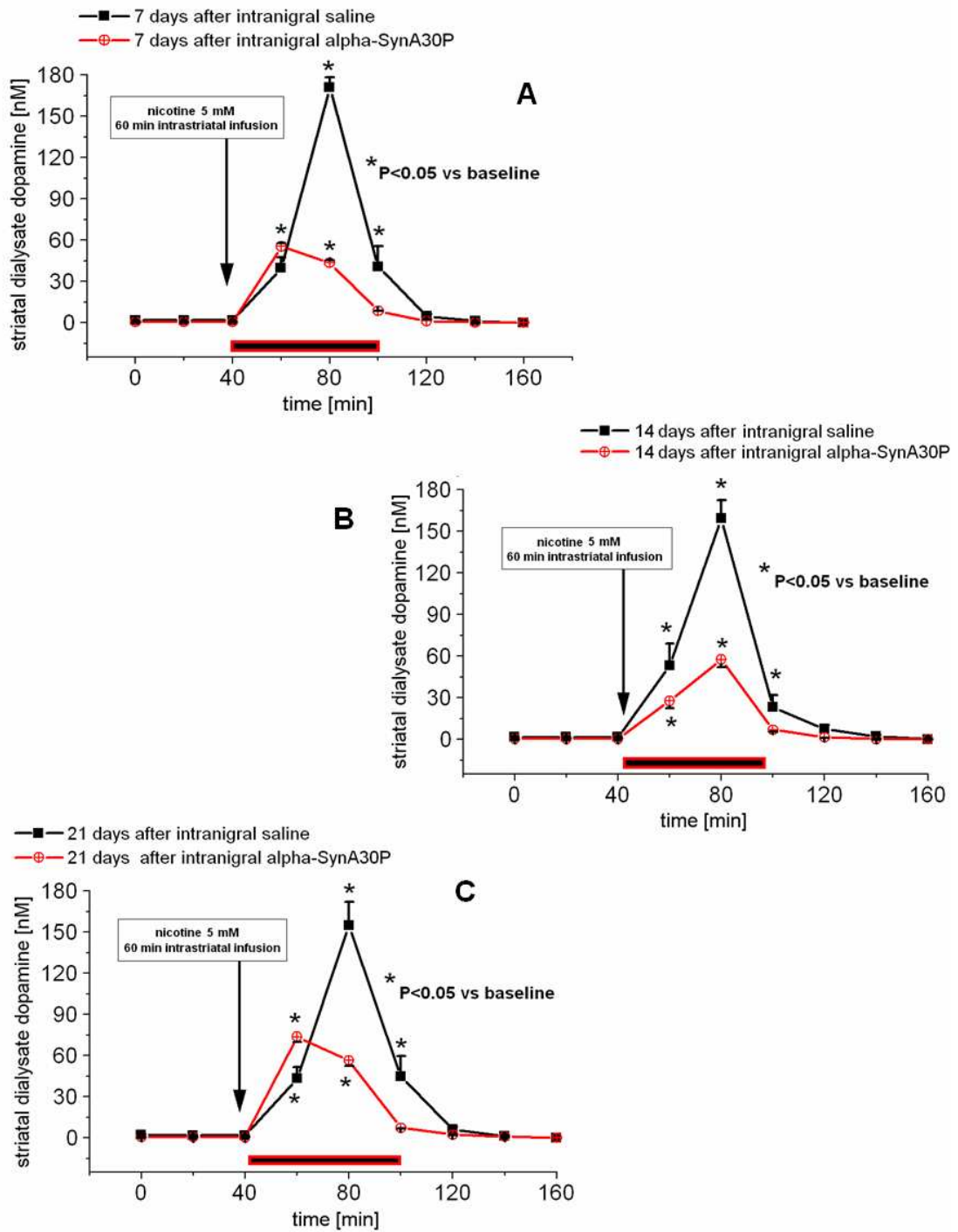


Figura 33. Effetto della nicotina su DA nel dializzato striatale a 7(A),14(B),21(C) giorni dopo somministrazione di salina (controlli) o TAT- α -synA30P (trattati)

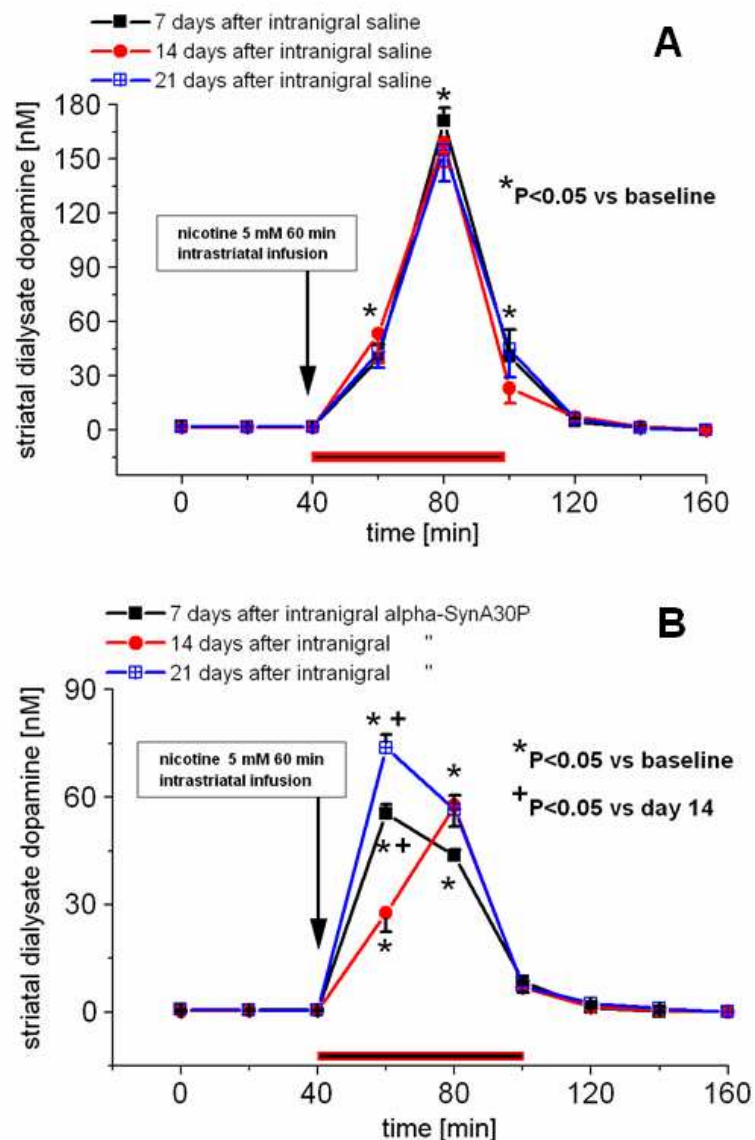


Figura 34. *Differente risposta nel release di DA a seguito di un trattamento con nicotina nei controlli (A) e nei trattati (B)*

La somministrazione di nicotina induce nei gruppi controllo un aumento di DA statisticamente significativo ($p < 0.05$) rispetto ai valori basali, ma non si evidenzia significatività rispetto all'ampiezza della risposta evocata in 7^a, 14^a e 21^a giornata (**figura 34A**).

In **figura 34B** è evidenziato come, nei gruppi trattati con TAT- α -synA30P, oltre che statisticamente significativo ($p < 0.05$) rispetto ai valori basali, tale aumento diventi più marcato con il passare del tempo.

5. Discussione

La deplezione di DA nei modelli animali di malattia di Parkinson dipende principalmente dalla morte dei neuroni dopaminergici, con la conseguente degenerazione delle proiezioni striatali.

L'MPTP, una neurotossina in grado di indurre parkinsonismo nell'uomo, è ampiamente utilizzato nei modelli animali per studiare la patogenesi della malattia di Parkinson ([Jackson-Lewis and Przedborski, 2007](#)). Sebbene il miglior modello di parkinsonismo indotto con MPTP risulti quello sulle scimmie, sono state fatte molte ricerche anche sui topi e sui ratti. In questi studi sono stati usati diversi regimi di trattamento con MPTP; due modelli sono stati standardizzati in quanto risultati i più efficaci nell'induzione della lesione della via nigro-striatale: il trattamento definito sub-acuto consiste in quattro somministrazioni da 20 mg/Kg/i.p. (100µl) ogni quattro ore nell'arco di una giornata; il trattamento definito sub-cronico consiste in una somministrazione al giorno, per un totale di cinque giorni, di 30 mg/Kg/i.p. (100µl). Per quanto riguarda i topi, un'ottima riproducibilità della lesione si ottiene utilizzando i topi maschi C57BL/6, di un età compresa tra le 8-10 settimane e del peso di 25-30 grammi ([Przedborski et al., 2001](#)). In un precedente studio su topi Swiss ([Serra et al., 2002](#)), è stato dimostrato che la morte dei neuroni nigrali avveniva per apoptosi al 6° giorno dopo la sospensione del trattamento con MPTP, e che la DA tissutale striatale subiva una deplezione del 59% al giorno 1 con uno stabile trend di recupero dal giorno 3 al giorno 14 dopo la sospensione di MPTP (circa il 28% di deplezione della DA rispetto ai controlli). In questo studio, topi C57BL/6 sottoposti ad un trattamento sub-acuto di MPTP, come descritto nei materiali e metodi, hanno confermato i dati neurochimici riscontrati sui topi Swiss, mostrando una drammatica riduzione della dopamina tissutale striatale pari al 96.5% ed al 65.6% nel brainstem (comprendente la SNcp) in 21^a giornata dalla sospensione del trattamento. Il rapporto DOPAC+HVA/DA indica il turnover della dopamina, un suo incremento indica un aumento del catabolismo ossidativo della DA, legato all'attività di MAO e COMT, nel tessuto in esame. Le analisi tissutali striatali e nel brainstem hanno evidenziato un incremento statisticamente significativo di tale rapporto già a partire dalla 7^a giornata nello striato e dalla 1^a giornata dopo la sospensione dell'MPTP.

I valori decisamente più alti nel brainstem rispetto a quelli riscontrati nello striato, ed il time course delle modificazioni neurochimiche, evidenziano come la lesione indotta da MPTP abbia inizio a livello della sinapsi striatale e proceda in maniera retrograda verso il corpo neuronale nigrale. I livelli di AA e AA+DHAA nel brainstem risultano diminuiti rispettivamente del 17% e del 19.5%, mentre non sono significativamente modificati nello striato dove però risulta significativamente modificato il rapporto DHAA/AA indice dello stato di ossidazione dell'acido ascorbico e della formazione di ROS. Durante le prime 24h dall'ultima somministrazione di MPTP il rapporto decresce, probabilmente a causa di un release di AA che viene richiamato da altri tessuti. A partire dalla 7^a sino alla 21^a giornata dopo l'ultima dose, il DHAA/AA ratio subisce un deciso aumento ad indicare il forte consumo di AA e la marcata produzione di specie ossidanti nello striato. Il rapporto 5-HIAA/5-HT è un indice del turnover della serotonina, il suo incremento è dipendente dall'aumentato catabolismo ossidativo della 5-HT da parte delle MAO. Diversi studi hanno dimostrato che l'infusione intrastriatale di MPP⁺ determina l'incremento della concentrazione della DA nel microdializzato striatale in topi "freely moving". Rollema e colleghi (Rollema et al., 1999), hanno dimostrato che la somministrazione intrastriatale di MPP⁺ in topi, ratti e scimmie non anestetizzati, induce un massivo release di DA, accompagnato da un pronunciato decremento dei metaboliti della DA (DOPAC e HVA). Uezono e colleghi (Uezono et al., 2001), hanno dimostrato un incremento (circa 28- 93 volte) dei valori di DA, nello striato di C57BL/6 "freely moving", mediante l'infusione di MPP⁺. Il meccanismo di release della DA tramite la somministrazione locale di MPP⁺ è stato correlato all'impairment energetico (Foster et al., 2003) a seguito dell'ingresso dell'MPP⁺ nel terminale presinaptico attraverso il DAT. Non esistono in letteratura informazioni sull'effetto indotto da una somministrazione sistemica o di infusione intrastriatale di MPTP sul release *in vivo* di DA nello striato, se non quelle recentemente fornite dal nostro gruppo di ricerca (Serra et al, 2008). Con lo scopo di valutare dinamicamente le modificazioni neurochimiche riscontrate a livello tissutale, si sono approntati una serie di esperimenti di microdialisi su C57BL/6 sottoposti ad un regime sub-cronico di MPTP come descritto nei materiali e metodi.

Il trattamento sub-cronico ha evidenziato una progressiva riduzione dei livelli striatali di DA e 3-MT nel microdializzato durante il trattamento.

La somministrazione di una “dose challenge” di MPTP 7, 14, e 28 giorni dopo la sospensione del trattamento, ha evidenziato un immediato aumento dei livelli di DA+3-MT nel dializzato striatale. Poiché la 3-MT viene prodotta dalle COMT agendo sulla dopamina extracellulare, la somma DA+3-MT può essere considerata un indice della quantità totale di DA rilasciata e presente negli spazi extracellulari. Inoltre l'incremento sempre maggiore anche dei metaboliti della DA, DOPAC e HVA, che si riscontra nei giorni successivi alla sospensione dell'MPTP e il miglioramento degli score comportamentali relativi allo swim test indicano una progressiva ripresa funzionale dell'attività dopaminergica in questo modello animale di PD. Test microdialitici preliminari effettuati con il GBR12783 (dati non riportati), un inibitore del DAT, il trasportatore implicato nel re-utake della DA e via d'ingresso del MPP⁺ nel neurone, hanno rivelato la capacità dell'MPTP come tale di evocare un massivo release di DA nello striato di ratti Wistar, sia somministrato sistemicamente che tramite infusione intrastriatale retrodialitica. Ciò sta ad indicare un'azione diretta dell'MPTP sulla terminazione presinaptica con conseguente rilascio di DA. Ulteriori studi sono tutt'ora in corso per identificare il meccanismo d'azione dell' MPTP e dell'MPP⁺ che regola tale release.

Un incremento dell'attività neuronale è accompagnato da una aumentata richiesta energetica. Recentemente sono state fatte numerose ricerche nel tentativo di spiegare il meccanismo di produzione di questa energia supplementare legata alla disponibilità del substrato energetico (Fillenz et al., 1999).

In condizioni fisiologiche, la domanda energetica del cervello è soddisfatta dal consumo di glucosio. L'aumento dei livelli di piruvato, prodotto nella glicolisi, riflette un incremento dell'attività metabolica del cervello. Successivamente, il piruvato può essere metabolizzato in lattato tramite fermentazione lattica o andare incontro a fosforilazione ossidativa mantenendo un equilibrio tra metabolismo anaerobio/aerobio finalizzato sia ad ottimizzare la produzione di ATP sia a limitare la produzione di lattato. Infatti, un aumento del rapporto lattato/piruvato riflette un incremento nel metabolismo anaerobio (Darbin et al., 2006). Diverse sono le ipotesi su come il glucosio fornisca l'energia necessaria durante l'attivazione neuronale, tra

le due principali risultano comunque coinvolti in maniera decisiva gli astrociti. Fillenz e colleghi (Fillenz et al., 1999), sostengono l'ipotesi che gli astrociti ricoprono un importante ruolo nell'apporto energetico neuronale, sia incrementando il flusso ematico cerebrale locale (rCBF) sia aumentando la disponibilità del glucosio durante l'attivazione neuronale. Secondo Fillenz, il glucosio del circolo ematico non viene rilasciato direttamente nello spazio extracellulare dei neuroni, ma entra negli astrociti dove è immagazzinato sotto forma di glicogeno. La stimolazione, da parte del glutammato, dei recettori ampa/kainato astrocitari porta ad un release di arginina successivamente utilizzata per la sintesi di NO, che induce a sua volta vasodilatazione e un incremento del rCBF. Il glucosio, la cui disponibilità aumenta proporzionalmente al flusso ematico, è captato dagli astrociti, dove viene convertito in glicogeno. L'azione della NE sui recettori β -adrenergici astrocitari determina la conversione del glicogeno, mediante glicogenolisi, a glucosio che è poi rilasciato nel fluido extracellulare. Internalizzato dai neuroni ne diviene la principale fonte energetica.

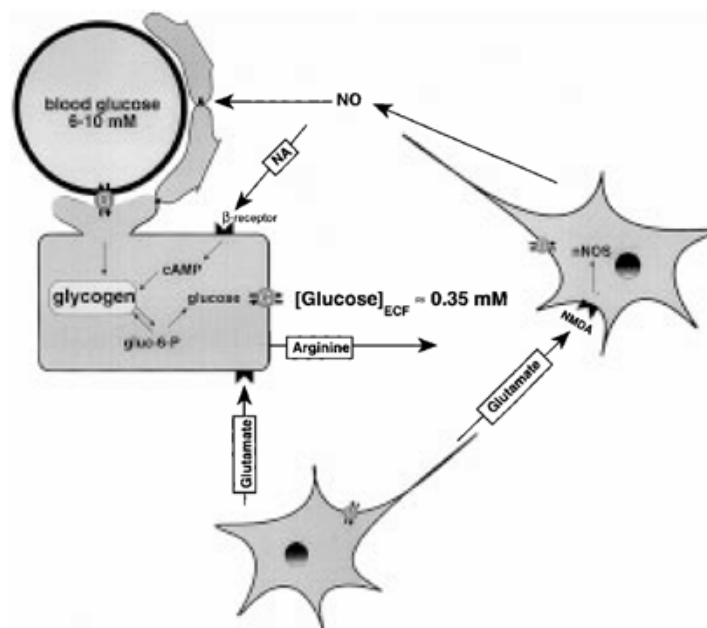


Figura 35. Modello energetico neuronale secondo Fillenz (Fillenz et al., 1999)

Magistretti e Pellerin (Magistretti and Pellerin, 1999), sostengono invece che il substrato energetico utilizzato dai neuroni durante l'attivazione sia il lattato prodotto

dagli astrociti e non il glucosio. Secondo la loro ipotesi il glutammato rilasciato dai terminali neuronali è internalizzato dagli astrociti, che circondano il complesso sinaptico, attraverso un co-trasporto con ioni Na^+ . L'attivazione della pompa Na^+/K^+ -ATPase determina l'assunzione del glucosio dal sangue all'interno degli astrociti grazie al trasportatore Glut1. Qui, attraverso la glicolisi, il glucosio viene metabolizzato a lattato in presenza, ma senza l'utilizzo, di ossigeno (glicolisi aerobia). Il lattato rilasciato nell'ECF dal trasportatore MCT-1 entra all'interno del neurone mediante il trasportatore MCT-2. Nel neurone il lattato riconvertito in piruvato, viene processato all'interno del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa per fornire l'energia necessaria all'attivazione del neurone. I trasportatori del lattato MCT-1 e MCT-2 sono definiti "shuttle astrocita-neurone del lattato". La conversione del piruvato in lattato all'interno degli astrociti è determinata dalla isoforma LDH_5 della lattato deidrogenasi (che si ritrova nei tessuti produttori di lattato) mentre nei neuroni è presente l'isoforma LDH_1 della lattato deidrogenasi (che si ritrova nei tessuti consumatori di lattato). Le reazioni catalizzate dai due enzimi, sebbene reversibili, hanno un equilibrio spostato verso la produzione di uno solo dei prodotti a partire dal corrispondente substrato, per cui si può parlare di una compartimentalizzazione nella produzione dei substrati energetici (e del loro utilizzo) ed un'alta specializzazione e differenziazione funzionale tra astrociti e neuroni. In particolare è degna di nota la sequenza di eventi che vede il metabolismo astrocitario prevalentemente anaerobio e quello neuronale aerobio. L'utilizzo neuronale del lattato, inoltre, consentirebbe al neurone di avere alte concentrazioni del substrato energetico in condizioni ischemiche nonostante sia necessario l'ossigeno per un suo utilizzo mitocondriale.

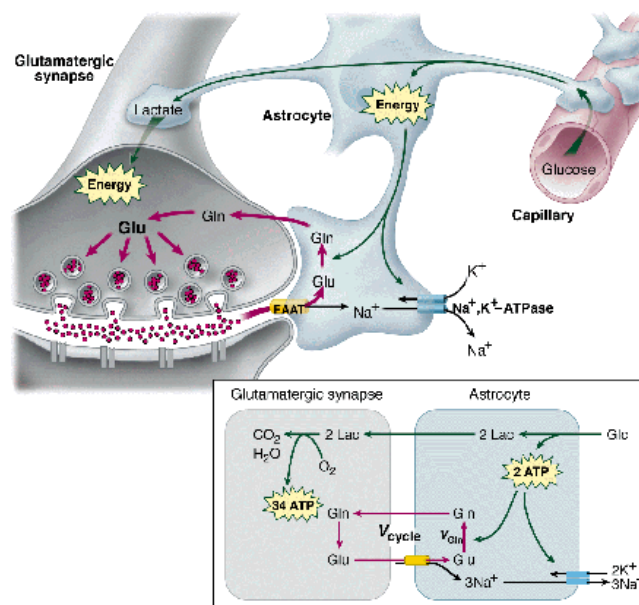


Figura 36. Modello energetico neuronale secondo Magistretti e Pellerin (Magistretti et al., 1999)

La somministrazione intraperitoneale di d-amph, induce un immediato aumento dei livelli striatali di DA registrati mediante microdialisi, tale incremento si può quantificare in circa 8-9 volte rispetto ai valori basali con un picco massimo di circa il 912% dopo 40-60 minuti dalla somministrazione (Miele et al., 2000). Oltre all'incremento dei livelli di DA, la somministrazione di d-amph provoca un aumento dei livelli di glucosio, lattato e piruvato nel dializzato cerebrale. Il rapporto lattato piruvato non viene invece modificato. La singola somministrazione di MPTP per via sistemica, induce un immediato release della DA striatale, registrata sempre mediante microdialisi, con un picco massimo dopo 40-60 minuti dalla somministrazione. Inoltre l'MPTP induce un aumento dei livelli di glucosio, lattato, piruvato e del rapporto lattato/piruvato. In un trattamento a dosi scalari della durata di 3 giorni, si è evidenziata una riduzione dei valori basali di glucosio e piruvato, mentre si registrano valori sempre maggiori di lattato.

Nel corso dei giorni si è registrata una ridotta capacità dell'MPTP di evocare un aumento sia dei livelli di DA che di glucosio, lattato e piruvato rispetto ai corrispettivi valori basali, che risultano anzi diminuiti durante il terzo giorno. Tale diminuzione non riguarda il rapporto lattato/piruvato che risulta sempre incrementato, rispetto ai corrispettivi valori basali e ai giorni precedenti, dopo ogni somministrazione di MPTP. L'attivazione neuronale che consegue alla

somministrazione sia di d-amph che di MPTP, induce un massivo release di DA. Questa attivazione porta ad una aumentata richiesta energetica da parte dei neuroni che si traduce in un incremento del glucosio extracellulare circa 40 minuti dopo il picco di DA. Secondo Fillenz e colleghi, l'azione della catecolamina NE su recettori β -adrenergici, provoca l'aumento del glucosio disponibile per i neuroni attraverso l'attivazione della glicogenolisi astrocitaria. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che il β -bloccante propanololo, somministrato per via retrodialitica, era in grado di annullare la glicogenolisi successiva alla attivazione neuronale striatale (Fillenz et al., 1999). Negli esperimenti condotti con la microdialisi, non sono stati evidenziati aumenti di NE nello striato che possano giustificare l'incremento dei livelli di glucosio registrati. È però possibile che un'azione su tali recettori da parte della DA, rilasciata in maniera massiva nella fessura sinaptica sia dalla d-amph e dall'MPTP, induca una glicogenolisi astrocitaria con il conseguente aumento del glucosio extracellulare. Ripetendo l'esperimento di Fillenz e colleghi con il β -bloccante si potrà convalidare o meno tale ipotesi. Per Magistretti e Pellerin, il substrato energetico utilizzato dai neuroni è il lattato prodotto dagli astrociti. L'azione della d-amph aumenta i livelli sia di lattato che di piruvato, ma non modifica il loro rapporto. Questo può essere spiegato tramite il modello di Magistretti e Pellerin, dove a seguito dell'aumentata richiesta energetica relativa all'attivazione neuronale, il lattato prodotto dagli astrociti viene riconvertito in piruvato dai neuroni e quindi avviato al ciclo di Krebs e alla fosforilazione ossidativa. La somministrazione di MPTP, induce un aumento di glucosio, lattato, piruvato e del rapporto lattato/piruvato. L'incremento di questo rapporto riflette uno shift dal normale metabolismo aerobio verso un metabolismo anaerobio (Darbin et al., 2006). L'azione dell'MPTP si esplica sul complesso I della catena respiratoria mitocondriale, bloccando di fatto le ultime tappe della ossidazione del glucosio e riducendo la produzione di ATP. Il blocco del mitocondrio, porta ad una condizione di metabolismo anaerobio dove l'incremento di glucosio, dovuto al release di DA, viene metabolizzato a lattato nella fermentazione lattica giustificando così il suo aumento nel ECF. I ridotti livelli dei giorni successivi di glucosio, sono probabilmente correlati alla diminuzione delle riserve di glicogeno negli astrociti, e la diminuita risposta a seguito delle successive somministrazioni di MPTP, è da

mettere in relazione sia alla minore disponibilità di glucosio, sia alla diminuzione del release di DA (capace solo in parte di evocare un'azione sui recettori β -adrenergici) dovuta alla riduzione della dose della tossina somministrata. L'aumento del rapporto lattato/piruvato invece indica una condizione anaerobia sempre più consistente e può quindi essere considerato come un indice del danno neurodegenerativo provocato dalla tossina. A seguito dei risultati ottenuti, quindi, il modello proposto da Fillenz e quello di Magistretti e Pellerin ben si adattano ad una condizione fisiologia o ad una attivazione neuronale a seguito di una somministrazione di d-amph, ma sono solo in parte verificabili con il modello con MPTP, dove si ha un imponente danno mitocondriale che blocca la possibilità della completa ossidazione del piruvato attraverso il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa.

Le mutazioni nel gene che codifica per l' α -sinucleina sono diventate oggetto di grande attenzione da quando si è scoperto che gli aggregati fibrillari di questa proteina sono in grado di indurre tossicità nei neuroni dopaminergici *in vivo* e risultano essere i maggiori componenti dei corpi di Lewy (Conway et al., 1998). La fusione della forma mutata A30P dell' α -sinucleina con la sequenza TAT derivata dal virus di immunodeficienza umana (HIV) ne permette, a seguito di una sua somministrazione intranigrale mediante chirurgia stereotassica, la diffusione attraverso le membrane dei neuroni determinando una perdita localizzata della funzione dopaminergica e un deficit motorio a lungo termine (Recchia et al., 2008). Studi di microdialisi cerebrale effettuati su ratti Wistar freely moving, realizzati mediante l'inserimento di una sonda microdialitica nello striato, hanno permesso di monitorare le variazioni neurochimiche striatali della DA in animali in cui è stata somministrata la TAT- α -sinucleina (5 μ l) e in animali controllo in cui è stata somministrata una soluzione di controllo. Le analisi cromatografiche condotte sui campioni di microdializzato 7, 14 e 21 giorni dopo la somministrazione intranigrale della TAT- α -synA30P, hanno evidenziato un ridotto contenuto striatale di dopamina extracellulare (-70%) rispetto al contenuto di DA registrato negli animali che avevano ricevuto solo la soluzione di controllo nella SNcp. La deplezione di dopamina conseguente al trattamento, si è rivelata costante durante l'intero periodo di osservazione mostrando una stabilità della lesione maggiore rispetto di quella procurata con MPTP somministrato per via sistemica in cui si è dimostrata una

tendenza al recupero sin dalla prima settimana dopo la sospensione del trattamento. Diminuzioni significative dei livelli extracellulari di DA sono state tuttavia riscontrate anche negli animali controllo, probabilmente dovute alla doppia chirurgia sostenuta. Per valutare la riserva funzionale neuronale di dopamina, si è proceduto alla somministrazione retrodialitica di nicotina 5mM sia negli animali trattati che nel gruppo controllo. Durante i 60 minuti di infusione con nicotina si è avuto un massivo release di DA nello spazio extracellulare di circa 100 volte superiore ai livelli basali prima dell'infusione, sia nei gruppi controllo che in quelli trattati. Non si sono verificate alterazioni significative relative alla latenza e all'ampiezza della risposta alla nicotina da parte dei controlli a 7, 14 e 21 giorni; nei gruppi trattati con α -sinucleina, benché l'aumento di dopamina a seguito della infusione di nicotina risulti sempre essere incrementato di circa 100 volte rispetto ai valori basali, ha una ampiezza ridotta al solo 45-55% se paragonato all'aumento mostrato dai controlli. Tale ampiezza della risposta alla infusione retrodialitica di nicotina aumenta con il passare del tempo dalla lesione nigrale. Benchè lo studio sia limitato alle prime tre settimane dalla somministrazione della α -sinucleina, il modello sperimentale mostra una maggiore stabilità neurochimica rispetto al modello con sub-acuto e sub-cromnico con MPTP o con 6-OH-DA (Recchia et al., 2008). Ulteriori studi dovranno essere condotti per valutare la risposta dinamica a lungo termine del sistema dopaminergico ad un trattamento con nicotina e valutare contemporaneamente i parametri comportamentali. Interessante sarà estendere lo studio del metabolismo energetico (sia striatale che nigrale) al modello proposto onde evidenziare un *impairment* energetico ed il time course di un possibile coinvolgimento mitocondriale nella genesi della lesione. Il modello di parkinsonismo indotto con α -sinucleina intranigrale sembra essere molto promettente per lo studio del potenziale ruolo protettivo delle cellule staminali adulte *in vivo*.

Conclusioni

I dati ottenuti *ex vivo* su topi C57BL/6 sottoposti ad un trattamento sub-acuto con MPTP, hanno confermato quanto già precedentemente dimostrato dagli esperimenti condotti su topi Swiss, l'abbattimento della dopamina tissutale striatale, l'incremento del turnover della DA e della formazione di ROS e del conseguente instaurarsi di una

condizione di stress ossidativo. Gli esperimenti microdialitici *in vivo* su topi C57BL/6 sottoposti ad un trattamento sub-acuto, hanno dimostrato che l'MPTP è in grado di indurre un massivo release di DA nello striato, e che questo release risulta proporzionale alla dose somministrata ed inversamente proporzionale alla durata del trattamento. Si è inoltre dimostrata una diretta proporzionalità tra la somministrazione della tossina e l'impairment motorio, evidenziando, tramite swim test, la dose-dipendenza del deficit motorio. La somministrazione di una "dose challenge" di MPTP diversi giorni dopo la sospensione del trattamento ha permesso di studiare la riserva funzionale di DA nello striato di animali già sottoposti ad un precedente trattamento con la tossina, ed ha evidenziato un recupero funzionale dinamico, della dopamina striatale e nello swim test, già dopo una settimana dall'ultima dose di MPTP. L'MPTP dimostra effetti drammatici anche sul metabolismo energetico striatale. La somministrazione sistemica di MPTP induce una diminuzione del glucosio e un aumento del lattato striatali in maniera proporzionale alla durata del trattamento. Tali variazioni non possono essere imputabili ad un incremento del metabolismo energetico conseguente all'aumento della DA striatale, in quanto la somministrazione di d-amph, pur aumentando il metabolismo energetico non modifica il rapporto lattato/piruvato. Questi dati confermano un importante danno mitocondriale, e candidano lo studio del metabolismo energetico striatale come elemento fondamentale nella valutazione dei meccanismi di danno e neuroprotezione. Il modello di malattia di Parkinson con MPTP studiato in dettaglio, pur rimanendo quello di riferimento per le future ricerche, presenta una limitazione al momento insormontabile per lo studio del potenziale terapeutico delle cellule staminali: la capacità di recupero dell'animale (sia neurochimica che comportamentale) è troppo elevata. Tale constatazione ci ha portati alla caratterizzazione microdialitica di un modello in cui il danno è magari meno evidente ma più stabile nel tempo. Ha risposto a queste esigenze il modello con α -sinucleina, che ha mostrato un danno stabile durante tutto il periodo di osservazione. Il modello con α -sinucleina si pone come ideale per lo studio del potenziale terapeutico delle cellule staminali adulte trapiantate nello striato o nella *substantia nigra*.

6. Riassunto

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva, causata dalla perdita della via nigro-striatale e dovuta all'alterazione dei processi di degradazione delle proteine nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*. In questo studio, sono stati condotti esperimenti su topi C57BL/6 e ratti Wistar. I C57BL/6 sottoposti a trattamento sub-acuto con MPTP, hanno confermato una marcata riduzione della dopamina tissutale striatale, l'incremento del turnover della DA e della formazione di ROS, e del conseguente instaurarsi di una condizione di stress ossidativo, già precedentemente dimostrato dagli esperimenti condotti su topi Swiss. Gli esperimenti microdialitici su topi C57BL/6 sottoposti ad un trattamento sub-acuto, hanno dimostrato che l'MPTP è in grado di indurre un massivo release di DA nello striato, e che questo release risulta proporzionale alla dose somministrata ed inversamente proporzionale alla durata del trattamento. Si è inoltre dimostrata una diretta proporzionalità tra la somministrazione della tossina e l'impairment motorio, e la sua dose-dipendenza. La somministrazione di una "dose challenge" di MPTP, diversi giorni dopo la sospensione del trattamento, ha permesso di studiare la riserva funzionale di DA nello striato di animali già sottoposti ad un precedente trattamento con la neurotossina, evidenziando un recupero funzionale dinamico neurochimico e comportamentale. L'MPTP ha, inoltre, dimostrato effetti drammatici anche sul metabolismo energetico striatale, alterando in particolare il rapporto lattato/piruvato, determinando quindi, nello striato, il passaggio da un metabolismo aerobio ad uno anaerobio ma soprattutto un irreversibile danno mitocondriale. Il modello di malattia di Parkinson con MPTP studiato in dettaglio, pur rimanendo quello di riferimento per le future ricerche, presenta una limitazione al momento insormontabile per lo studio del potenziale terapeutico delle cellule staminali, la capacità di recupero dell'animale è troppo elevata (sia neurochimica che comportamentale). Tale constatazione ci ha portati alla caratterizzazione microdialitica di un modello con α -sinucleina, che ha evidenziato un danno meno evidente ma più stabile durante tutto il periodo di osservazione. Il modello con α -sinucleina si pone come ideale per lo studio del potenziale terapeutico delle cellule staminali adulte trapiantate nello striato o nella *substantia nigra*.

Bibliografia

- [Abeliovich](#), A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A. Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A., 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. **25**, pp. 239-252.
- [Agid](#), Y., Javoy-Agid, F., Ruberg, M., 1987. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease, in *Movement Disorders 2 (Marsden C. D. and Fahn S., Butterworths, London)* pp. 166-230.
- [Alam](#), M. and Schmidt, W.J., 2002. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.* **136**, pp. 317-324.
- [Alam](#), M., Mayerhofer, A., Schmidt, W.J., 2004. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav. Brain Res.* **151**, pp. 117-124.
- [Annett](#), L.E., Torres, E.M., Clarke, D.J., Ishida, Y., Barker, R.A., Ridley, R.M., Baker, H.F., Dunnett, S.B., 1997. Survival of nigral grafts within the striatum of marmosets with 6-OHDA lesions depends critically on donor embryo age. *Cell Transplant.* **6**, pp. 557-569.
- [Baker](#), S.A., Baker, K.A., Hagg, T., 2004. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* **20**, pp. 575-579.
- [Ben Shachar](#), D., Riederer, P., Youdim, M.B.H., 1991. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implication for PD. *J. Neurochem.* **57**, pp.1609-1614.
- [Benveniste](#), H., 1991. Introduction to intracerebral microdialysis. In: *T.E. Robinson and J.B. Justice. Microdialysis in the Neurosciences, Elsevier Science Publishers B.V.*
- [Betarbet](#), R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. and Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, pp. 1301-1306.
- [Bezard](#), E., Imbert, C., Deloire, X., Bioulac, B., Gross, C.E., 1997. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res.* **766**, pp. 107-112.
- [Bjorklund](#), L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Isacson, O., 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, pp. 2344-2349.
- [Bové](#), J., Prou, D., Perier, C., Przedborski, S., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* **2**, pp. 484-494.

- [Brooks](#), A.I., Chadwick, C.A., Gelbard, H.A., Cory-Slechta, D.A., Federoff, H.J., 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* **823**, pp. 1-10
- [Chan](#), P., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W. and Di Monte, D., 1991. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* **57**, pp. 348-351.
- [Chiou](#), S.H., Kao, C.L., Chang, Y.L., Ku, H.H., Tsai, Y.J., Lin, H.T., Yen, C.J., Peng, C.H., Chiu, J.H., Tsai, T.H., 2007. Evaluation of anti-Fas ligand-induced apoptosis and neural differentiation of PC12 cells treated with nerve growth factor using small interfering RNA method and sampling by microdialysis. *Anal Biochem.* **363**, pp. 46-57.
- [Church](#), W.H. and Ward V.L., 1994. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain Res. Bull.* **33**, pp. 419-425.
- [Cohen](#), G., 2000. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann. N Y Acad. Sci.* **899**, pp. 112-120.
- [Connor](#), J., Menzies, S., St. Martin, S.M., Mufson, E.J., 1990. The cellular distribution of transferrin, ferritin and iron in normal and aged human brains. *J. Neurosci. Res.* **27**, pp. 595-611.
- [Conway](#), K.A., Harper, J.D. and Lansbury, P.T., 1998. Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* **4**, pp. 1318-1320.
- [Conway](#), K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E. and Lansbury Jr., P.T., 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, pp. 571-576.
- [Crofts](#), H.S., Dalley, J.W., Collins, P., Van Denderen, J.C., Everitt, B.J., Robbins, T.W., Roberts, A.C., 2001. Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set. *Cereb. Cortex* **11**, pp. 1015-1026.
- [Darbin](#), O., Carre, E., Naritoku, D., Risso, J.J., Lonjon, M., Patrylo, P.R., 2006. Glucose metabolites in the striatum of freely behaving rats following infusion of elevated potassium. *Brain Res.* **1116**, pp. 127-131.
- [Dauer](#), W. and Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* **39**, pp. 889-909.
- [Day](#), B.J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L.Y. and Stamler, J.S., 1999. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, pp. 12760-12765.
- [de Rijk](#), M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A., 2000. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology.* **54**, pp. 21-23.

- [Desole](#), M.S., Sciola, L., Delogu, M.R., Siriana, S., Migheli, R., Miele, E., 1997. Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *Neurochem. Int.* **31**, pp. 169-176.
- [Desole](#), M.S., Sciola, L., Sircana, S., Godani, C., Migheli, R., Delogu, M.R., Piras, G., De Natale, G., Miele, E., 1998. Protective effect of deferoxamine on sodium nitroprusside-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **247**, pp. 1-4.
- [Double](#), K., Riederer, P., Gerlach, M., 1999. The significance of neuromelanin in PD. *Drug News Develop.* **12**, pp. 33-45.
- [Elbaz](#), A., Moisan, F., 2008. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* **21**, pp. 454-460.
- [Fabre](#), E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja, G. and Leret, M.L., 1999. Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J. Physiol. Biochem.* **55**, pp. 325-331.
- [Faulk](#), R.L. and Laverty, R., 1969. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp. Neurol.* **23**, pp. 332-340.
- [Fillenz](#), M., 2005. The role of lactate in brain metabolism. *Neurochem. Int.* **47**, pp. 413-417.
- [Fillenz](#), M., Lowry J.P., Boutelle M.G., Fray A.E., 1999. The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism. *Acta Physiol. Scand.* **167**, pp. 275-284.
- [Forno](#), L.S., 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, pp. 259-272.
- [Forno](#), L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I. and Langston, J.W., 1993. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease: Neuropathologic considerations. *Adv. Neurol.* **60**, pp. 600-608.
- [Forno](#), L.S., Langston, J.W., DeLanney, L.E., Irwin, I. and Ricaurte, G.A., 1986. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* **20**, pp. 449-455.
- [Foster](#), S.B., Wrona, M.Z., Han, J., Dryhurst, G., 2003. The parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) mediates release of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and inhibition of L-DOPA decarboxylase in the rat striatum: a microdialysis study. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, pp. 1372-1384.
- [Fray](#), A.E., Boutelle, M.G. & Fillenz, M., 1997. Extracellular glucose turnover in the striatum of unanaesthetized rats measured by quantitative microdialysis. *J. Physiol.* **504**, pp. 721-726.
- [George](#), J.M., Jin, H., Woods, W.S. and Clayton, D.F., 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* **15**, pp. 361-372.
- [Giasson](#), B.I., Uryu, K., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., 1999. Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**, pp. 7619-7622.

- [Gibb](#), W.R. and Lees, A.J., 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **51**, pp. 745-752.
- [Gordito](#), M.P., Kotsis, D.H., Minteer, S.D., Spence, D.M., 2003. Flow-based amperometric detection of dopamine in an immobilized cell reactor. *J. Neurosci. Methods*. **124**, pp. 129-134.
- [Graham](#), D.G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* **14**, pp. 633-643.
- [Greenamyre](#), J.T., Sherer, T.B., Betarbet, R. and Panov, A.V., 2001. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* **52**, pp. 135-141.
- [Haobam](#) R., Sindhu, K.M., Chandra, G., Mohanakumar, K.P., 2005. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav. Brain Res.* **163**, pp. 159-167.
- [Hasegawa](#), E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minakami, S. and Takeshige, K., 1997. A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, pp. 69-74.
- [Hasegawa](#), E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y. and Minakami, S., 1990. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, pp. 1049-1055.
- [He](#), Y., Appel, S., Le, W., 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* **909**, pp. 187-193.
- [Hediger](#), M.A., 2002. New view at C. Transporters for vitamin C keep vitamin concentrations optimal in the body. A new mouse knockout of one transporter reveals previously unknown requirements for the vitamin. *Nat. Med.* **8**, pp. 514-517.
- [Hefti](#), F., Melamed, E., Wurtman, R.J., 1980. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* **195**, pp. 123-137.
- [Heikkila](#), R.E., Nicklas, W.J., Vyas, I., Duvoisin, R.C., 1985. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Lett.* **62**, pp. 389-394.
- [Hunot](#), S. and Hirsch, E.C. 2003. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, pp. 49-60.
- [Irwin](#), I., DeLanney, L.E. and Langston, J.W., 1993. MPTP and aging: Studies in the C57BL/6 mouse. *Adv. Neurol.* **60**, pp. 197-206.
- [Jackson-Lewis](#), V., Jakowec, M., Burke, R.E. and Przedborski, S., 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* **4**, pp. 257-269.

- [Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2007.](#) Protocol for the MPTP model of Parkinson's disease. *Nat. Protoc.* **2**, pp.141-151.
- [Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M. and Snyder, S.H., 1985.](#) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridinium by dopamine neurons explain selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, pp. 2173-2177.
- [Javoy, F., Sotelo, C., Herbert, A., Agid, Y., 1976.](#) Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* **102**, pp. 210-215.
- [Jeon, B.S., Jackson-Lewis, V., Burke, R.E., 1995.](#) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* **4**, pp. 131-137.
- [Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Dollison, A., Ferreira, M., Espinosa, A., Parsons, B., Przedborski, S., 1993.](#) Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* **613**, pp. 347-351.
- [Johnson Jr., R.G., 1988.](#) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.* **68**, pp. 232-307.
- [Kahle, P.J., Haass, C., Kretschmar, H.A. and Neumann, M., 2002.](#) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J. Neurochem.* **82**, pp. 449-457.
- [Kirik, D., Georgievska, B., Burger, C., Winkler, C., Muzyczka, N., Mandel, R.J., Bjorklund, A., 2002.](#) Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, pp. 4708-4713.
- [Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N., 1998.](#) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, pp. 605-608.
- [Klaidman, L.K., Adams Jr., J.D., Leung, A.C., Kim, S.S. and Cadenas, E., 1993.](#) Redox cycling of MPP⁺: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, pp. 169-179.
- [Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Pzuntek, H., Eppelen, J.T., Schols, L. and Riess, O., 1998.](#) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **18**, pp. 107-108.
- [Langston, J.W., Ballard, P. and Irwin, I., 1983.](#) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, pp. 979-980.

- [Lashuel](#), H.A., Petre, B.M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R.J., Walz, T. and Lansbury Jr., P.T., 2002. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J. Mol. Biol.* **322**, pp. 1089-1102.
- [Lee](#), F.J. and Liu, F., 2008. Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res. Rev.* **58**, pp. 354-364.
- [Leroy](#), E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D., Polymeropoulos, M.H., 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**, pp. 451-452.
- [Lincoln](#), S., Wiley, J., Lynch, T., Langston, J.W., Chen, R., Lang, A., Rogaeva, E., Sa, D.S., Munhoz, R.P., Harris, J., Marder, K., Klein, C., Bisceglia, G., Hussey, J., West, A., Hulihan, M., Hardy, J., Farrer, M., 2003. Parkin-proven disease: Common founders but divergent phenotypes. *Neurology* **60**, pp. 1605-1610.
- [Liu](#), Y., Roghani, A. and Edwards, R.H., 1992. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to *N*-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, pp. 9074-9078.
- [Lundblad](#), M., Picconi, B., Lindgren, H., Cenci, M.A., 2004. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.* **16**, pp. 110-123.
- [Luthman](#), J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G. and Archer, T., 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav. Brain Res.* **33**, pp. 267-277.
- [Ma](#), K.H., Huang, W.S., Chen, C.H., Lin, S.Z., Wey, S.P., Ting, G., Wang, S.D., Liu, H.W., Liu, J.C., 2002. Dual SPECT of dopamine system using [99mTc]TRODAT-1 and [123I]IBZM in normal and 6-OHDA-lesioned formosan rock monkeys. *Nucl. Med. Biol.* **29**, pp. 561-567.
- [Magistretti](#), P.J. and Pellerin, L., 1999. Cellular mechanism of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**, pp. 1155-1163
- [Magistretti](#), P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L., Shulman, R.G., 1999. Energy on demand. *Science* **283**, pp. 496-497
- [Mandel](#), R.J. and Randall, P.K., 1985. Quantification of lesion-induced dopaminergic supersensitivity using the rotational model in mouse. *Brain Res.* **330**, pp. 358-363.
- [Mandir](#), A.S., Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Wang, Z.Q., Simbulan-Rosenthal, M., Smulson, M.E., Hoffman, B.E., Guastella, D.B., Dawson, V.L. and Dawson, T.M., 1999. Poly (ADP-ribose) polymerase activation mediates MPTP-induced parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, pp. 5774-5779.

- [Manning-Bog](#), A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., Di Monte, D.A., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **277**, pp. 1641-1644.
- [Markey](#), S.P., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S. and Herkenham, M.A., 1984. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* **311**, pp. 464-467.
- [Marking](#), L., 1988. Oral toxicity of rotenone to mammals. *Investig Fish Control.* **94**
- [Maroteaux](#), L., Campanelli, J.T. and Scheller, R.H., 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, pp. 2804-2815.
- [Mayer](#), R.A., Kindt, M.V. and Heikkila, R.E., 1986. Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J. Neurochem.* **47**, pp. 1073-1079.
- [McNaught](#), K.S. and Olanow, C.W., 2003. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, pp. 73-86.
- [McNay](#), E. C. and Gold, P. E., 1999. Extracellular glucose concentrations in the rat hippocampus measured by zero-net-flux: effects of microdialysis flow rate, strain, and age. *J. Neurochem.* **72**, pp. 785-790.
- [Miele](#), M., Mura, M.A., Enrico, P., Esposito, G., Serra, P.A., Migheli, R., Zangani, D., Miele, E., Desole, M.S., 2000. On the mechanism of d-amphetamine-induced changes in glutamate, ascorbic acid and uric acid release in the striatum of freely moving rats. *Br. J. Pharmacol.* **129**, pp. 582-588.
- [Migheli](#), R., Godani, C., Sciola, L., Delogu, M.R., Serra, P.A., Zangani, D., De Natale, G., Miele, E., Desole, M.S., 1999. Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* **73**, pp. 1155-1163.
- [Mitsumoto](#), A. and Nakagawa, Y., 2001. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic. Res.* **35**, pp. 885-893.
- [Mitsumoto](#), A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Takanezawa, Y., 2001. Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic. Res.* **35**, pp. 301-310.
- [Mochizuki](#), H., Nishi, K., Mizuno, Y., 1993. Iron-melanin complex is toxic to dopaminergic neurons in nigrostriatal co-culture. *Neurodegeneration* **2**, pp. 1-7.
- [Moratalla](#), R., Quinn, B., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., Graybiel, A.M., 1992. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, pp. 3859-3863.
- [Morton](#), D.B. and Griffiths, P.H.M., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* **116**, pp. 431-436.

- [Muthane](#), U., Ramsay, K.A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M., Przedborski, S., 1994. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp. Neurol.* **126**, pp. 195-204.
- [Nicklas](#), W.J., Vyas, I. and Heikkila, R.E., 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by MPP⁺, a metabolite of the neurotoxin MPTP. *Life Sci.* **36**, pp. 2503-2508.
- [Nicklas](#), W.J., Yougster, S.K., Kindt, M.V. and Heikkila, R.E., 1987. MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. *Life Sci.* **40**, pp. 721-729.
- [O'Neill](#), R. D., 2005. Long-Term Monitoring of Brain Dopamine Metabolism In Vivo with Carbon Paste Electrodes. *Sensors* **5**, pp. 317-342.
- [Ovadia](#), A., Zhang, Z. and Gash, D.M., 1995. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging* **16**, pp. 931-937.
- [Parkinson](#), J., 1817. An essay on the shaking palsy. *London: Sherwood, Neely and Jones, Paternoster Row.*
- [Paxinos](#), G. and Frankilin, K.B.S., 2004. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates *San Diego, Academic Press.*
- [Paxinos](#), G. and Watson, C., 1986. Rat Brain in Stereotaxic Coordinates *San Diego, Academic Press.*
- [Petzinger](#), G.M. & Langston J.W. 1998. The MPTP-lesioned non-human primate: a model for Parkinson's disease, in *Advances in Neurodegenerative Disorders. Parkinson's Disease (Marwah J. and Teitelbaum H., Prominent Press, Scottsdale)* pp. 113-148.
- [Polymeropoulos](#), M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R. *et al.*, 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, pp. 2045-2047.
- [Przedborski](#), S., Jackson-Lewis, V., Naini, A.B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., Akram, M., 2001. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J. Neurochem.* **76**, pp. 1265-1274.
- [Ramsay](#), R.R. and Singer, T.P., 1986. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **261**, pp. 7585-7587.
- [Recchia](#), A., Debetto, P., Negro, A., Guidolin, D., Skaper, S.D., Giusti, P., 2004. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J.* **18**, pp. 617-626.
- [Recchia](#), A., Rota, D., Debetto, P., Peroni, D., Guidolin, D., Negro, A., Skaper, S.D., Giusti, P., 2008. Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **30**, pp. 8-18.
- [Rice](#), M.E., 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* **23**, pp. 209-216.

- [Rocchitta](#), G., Delogu, R.M., Migheli, R., Solinas, L., Susini, G., Desole, M.S., Miele, E., Miele, M., Serra, P.A., 2004. On the mechanism of levosimendan-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, pp. 299-304.
- [Rocchitta](#), G., Migheli, R., Mura, M.P., Esposito, G., Desole, M.S., Miele, E., Miele, M., Serra, P.A., 2004. Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca²⁺ entry through store-operated channels. *Brain Res.* **1023**, pp. 243-252.
- [Rocchitta](#), G., Migheli, R., Mura, M.P., Grella, G., Esposito, G., Marchetti, B., Miele, E., Desole, M.S., Miele, M., Serra P.A., 2005. Signaling pathways in the nitric oxide and iron-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: role of extracellular Ca²⁺ and L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res.* **1047**, pp. 18-29.
- [Rollema](#), H., Alexander, G.M., Grothusen, J.R., Matos, F.F., Castagnoli, Jr N., 1999. Comparison of the effects of intracerebrally administered MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) in three species: microdialysis of dopamine and metabolites in mouse, rat and monkey striatum. *Neurosci. Lett.* **106**, pp. 275-281.
- [Rose](#), S., Nomoto, M., Jackson, E.A., Gibb, W.R.G., Jaehnig, P., Jenner, P. and Marsden, C.D., 1993. Age-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of common marmosets. *Eur. J. Pharmacol.* **230**, pp. 177-185.
- [Saporito](#), M.S., Thomas, B.A. and Scott, R.W., 2000. MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J. Neurochem.* **75**, pp. 1200-1208.
- [Schneider](#), J.S. and Roeltgen, D.P. 1993. Delayed matching-to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Brain Res.* **615**, pp. 351-354.
- [Schneider](#), J.S., Tinker, J.P., Van Velson, M., Menzaghi, F., Lloyd G.K., 1999. Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, pp. 731-739.
- [Seniuk](#), N.A., Tatton, W.G., Greenwood C. E., 1990. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res.* **527**, pp. 7-20.
- [Serra](#), P.A., Esposito, G., Enrico, P., Mura, M.A., Migheli, R., Delogu, M.R., Miele, M., Desole, M.S., Grella, G., Miele, E., 2000. Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **130**, pp. 937-945.
- [Serra](#), P.A., Migheli, R., Rocchitta, G., Taras, M.G., Mura, M.P., Delogu, M.R., Esposito, G., Desole, M.S., Miele, E., Miele, M., 2003a. Role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway and ascorbic acid in 3-morpholinopyridone (SIN-1)-induced increases in dopamine secretion from PC12 cells. A microdialysis in vitro study. *Neurosci Lett.* **353**, pp. 5-8.

- [Serra](#), P.A., Pluchino, S., Marchetti, B., Desole, M.S., Miele, E., 2008. The MPTP mouse model: cues on DA release and neural stem cell restorative role. *Parkinsonism. Relat. Disord.* **14**, pp. 189-193.
- [Serra](#), P.A., Rocchitta, G., Delogu, M.R., Migheli, R., Taras, M.G., Mura, M.P., Esposito G., Miele E., Desole M.S., Miele M., 2003b. Role of the nitric oxide /cyclic GMP pathway and extracellular environment in the nitric oxide donor-induced increase in dopamine secretion from PC12 cells. A microdialysis in vitro study. *J Neurochem.* **86**, pp. 1403-1413.
- [Serra](#), P.A., Sciola, L., Delogu, M.R., Spano, A., Monaco, G., Miele, E., Rocchitta, G., Miele, M., Migheli, R., Desole, M.S., 2002 The neurotoxin MPTP induces apoptosis in mouse nigro-striatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J. Biol. Chem.* **277**, pp. 34451-33461.
- [Sevanian A](#), Davies KJ, Hochstein P., 1991. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* **54**, pp. 1129-1134
- [Shendelman](#), S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., Abeliovich, A., 2004. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol.* **2**
- [Sherer](#), T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2003. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp. Neurol.* **179**, pp. 9-16.
- [Sherman](#), M.Y. and Goldberg, A.L., 2001. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, pp. 15-32.
- [Shimura](#), H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, pp. 302-305.
- [Sirinathsinghji](#), D.J., Kupsch, A., Mayer, E., Zivin, M., Pufal, D. and Oertel, W.H., 1992. Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **12**, pp. 267-274.
- [Smith](#), J.G., 1988. Paraquat poisoning by skin absorption: a review. *Hum Toxicol* **7**, pp. 15-19.
- [Snow](#), B.J., Vingerhoets, F.J., Langston, J.W., Tetrud, J.W., Sossi, V., Calne, D.B., 2000. Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **68**, pp. 313-316.
- [Spillantini](#), M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. and Goedert, M., 1998. α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, pp. 6469-6473.
- [Talpade](#), D.J., Greene, J.G., Higgins Jr., D.S. and Greenamyre, J.T., 2000. In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J. Neurochem.* **75**, pp. 2611-2621.

- [Twelves](#), D., Perkins, K.S., Counsell, C., 2003. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **18**, pp. 19-31.
- [Uezono](#), T., Matsubara, K., Shimizu, K., Mizukami, H., Ogawa, K., Saito, O., Hayase, N., Eto, H., Kimura, K., Shiono, H., 2001. Glutamate is not involved in the MPP β -induced dopamine overflow in the striatum of freely moving C57BL/6 mice. *J. Neural. Transm.* **108**, pp. 899-908.
- [Ungerstedt](#), U., 1968. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, pp. 107-110.
- [Ungerstedt](#), U., 1991. Introduction to intracerebral microdialysis. In: *T.E. Robinson and J.B. Justice. Microdialysis in the Neurosciences, Elsevier Science Publishers B.V.*
- [Van Den Eeden](#), S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A., Nelson, L.M., 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* **157**, pp. 1015-1022.
- [Varastet](#), M., Riche, D., Maziere, M. and Hantraye, P., 1994. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* **63**, pp. 47-56.
- [Vila](#), M., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Djaldetti, R., Liberatore, G., Offen, D., Korsmeyer, S.J. and Przedborski, S., 2001. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, pp. 2837-2842.
- [Volles](#), M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C. and Lansbury Jr., P.T., 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* **40**, pp. 7812-7819.
- [Weisskopf](#), M.G., O'Reilly, E., Chen, H., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2007. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* **166**, pp. 561-567.
- [Wightman](#), R. M. and Robinson, D. L., 2002. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. *J Neurochem.* **82**, pp. 721-735.
- [Wilkinson](#), K.D., 2000. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, pp. 141-148.
- [Yavich](#), L. and Tiihonen, J., 2000. In vivo voltammetry with removable carbon fibre electrodes in freely-moving mice: dopamine release during intracranial self-stimulation, *J. Neurosci. Methods* **104**, pp. 55-63.
- [Zecca](#), L., Gallorini, M., Schunemann, V., 2001a. Iron, neuromelanin, and ferritin content in the *substantia nigra* of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J. Neurochem.* **76**, pp. 1766-1773.
- [Zecca](#), L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., Ito, S., Fardello, R., [Gallorini](#), M., 2000. The neuromelanin of human *substantia nigra* and its interaction with metals. *J. Neural Transm.* **109**, pp. 663-672.

-
- [Zecca](#), L., Tampellini, D., Gerlach, M., Riederer, P., Fariello, R.G. and Sulzer, D., 2001b. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol. Pathol.* **54**, pp. 414-418.
- [Zhang](#), Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L. and Dawson, T.M., 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, pp. 13354-13359.