

INTRODUZIONE

Durante lo sviluppo, un'esposizione anche transitoria a classi specifiche di farmaci, come gli antagonisti dell'NMDA e gli agonisti del GABA-A provoca una diffusa apoptosi neuronale nel cervello di alcuni roditori. [8,15,21,22,61,62].

In particolare, gli antagonisti del recettore NMDA come il MK801, la Phencyclidine, la Ketamina e il Protossido d'Azoto, gli agonisti del recettore GABA-A come il Phenobarbital, il diazepam, e l'Isoflurane, o l'etanolo, che ha sia proprietà antagoniste del recettore NMDA che agoniste del recettore GABA-A inducono una neurodegenerazione apoptotica diffusa quando vengono somministrati ad alcuni roditori negli stadi precoci del loro sviluppo cerebrale [8,33,34,36].

Queste scoperte hanno notevole rilevanza clinica poiché le stesse classi di farmaci, ad eccezione dell'etanolo, sono normalmente usate come sedativi, tranquillanti, anticonvulsivanti e anestetici sia in ostetricia che in pediatria cioè durante il periodo di sviluppo cerebrale umano. L'anestesia generale è routinariamente somministrata a donne gravide, a neonati e ad infanti. Inoltre un costante aumento nell'utilizzazione di questi farmaci si registra nei bambini prematuri, che necessitano di interventi chirurgici e sedazione prolungata nelle terapie intensive e che attualmente rappresentano il 10% di tutte le nascite negli USA [70].

L'esposizione dei neuroni in via di sviluppo a questi agenti potenzialmente neurotossici potrebbe dare luogo ad un loro danno che può essere misconosciuto nei primi anni di vita, ma che può manifestarsi tardivamente con un vasto spettro di disordini neuropsichiatrici che potrebbero concretizzarsi nell'iperattività, nei difetti dell'attenzione e dell'apprendimento nel bambino e in disturbi psicotici e nel disturbo depressivo maggiore in età adulta.

Le due classi di farmaci principalmente coinvolte sono:

1. Agonisti del recettore GABA-A [22]

- anestetici inalatori: Halotano (non più usato) Isoflurane, Sevoflurano;
- anestetici endovenosi: Barbiturici, Benzodiazepine, Propofol, Etomidate;

2. Antagonisti del recettore NMDA

- anestetici inalatori: Protossido d'Azoto [35];
- anestetici endovenosi: Ketamina [45].

Il comune denominatore dei farmaci antagonisti del recettore NMDA e degli agonisti del recettore GABA-A è la capacità di entrambi di ridurre l'attività neuronale. L'eccessiva depressione dell'attività neuronale sembra costituire, durante il periodo della sinaptogenesi, un generico segnale che induce la cellula neuronale al cosiddetto suicidio programmato, fenomeno comunemente noto come apoptosis.

L' APOPTOSI CELLULARE

Il termine apoptosis deriva dal greco, apo= oltre e ptosis= cadere, letteralmente indica la caduta delle foglie dagli alberi o dei petali dai fiori, questa analogia enfatizza come la morte cellulare sia parte integrante e necessaria del ciclo cellulare di tutti gli organismi viventi. Il termine apoptosis è stato introdotto per la prima volta nel 1972 da Kerr, che lo usò per descrivere un quadro di morte cellulare in culture di epatociti, che differiva totalmente dalla morte cellulare per necrosi [40].

Questo tipo di morte cellulare, geneticamente determinata, riveste un ruolo importante durante lo sviluppo di ogni organismo multicellulare, in particolare durante l'embriogenesi e la morfogenesi, e nel mantenimento dell'omeostasi tissutale sia in condizioni fisiologiche che patologiche. L'apoptosis è un processo fisiologico attraverso il quale le cellule ridondanti o che hanno fallito la connessione con i rispettivi target, vengono eliminate dall'organismo vivente. La morte per apoptosis può essere considerata un suicidio altruistico, volto all'eliminazione di cellule invecchiate, potenzialmente danneggiate, infettate da virus o che semplicemente non servono più quindi il fenomeno se limitato e controllato è un vantaggio per l'organismo.

MORTE CELLULARE: APOPTOSIS O NECROSI

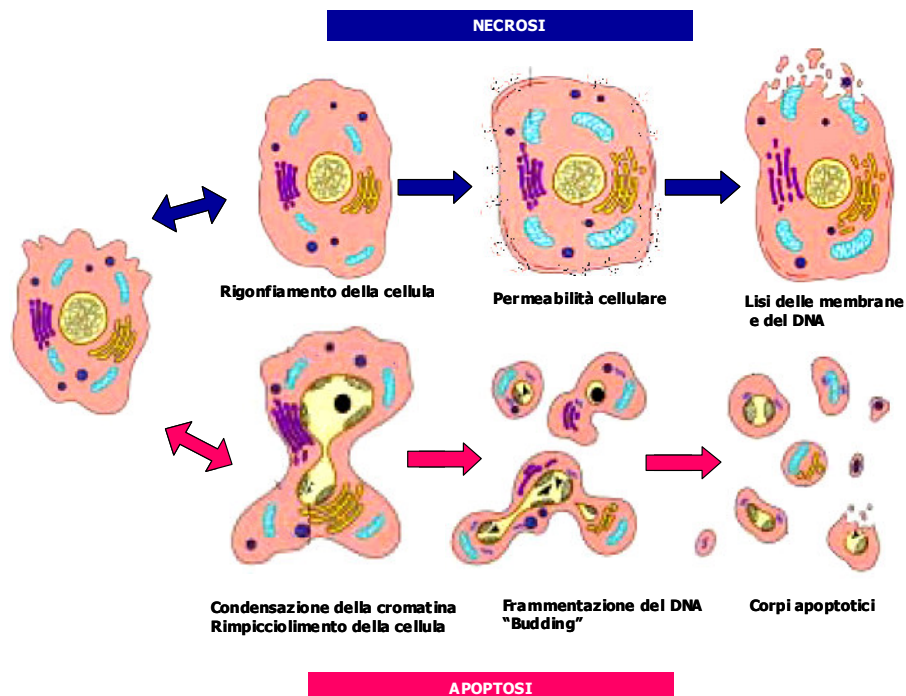
La cellula apoptotica si riconosce per gli importanti cambiamenti morfologici che subisce tra i quali la deformazione e la perdita di volume, la perdita dei rapporti con le cellule vicine, la condensazione e la migrazione della cromatina ai margini della membrana nucleare, "blebbing" or "budding" della membrana plasmatica ed infine la frammentazione dell'intera cellula in corpi apoptotici.

Gli eventi apoptotici che colpiscono selettivamente le cellule si concretizzano nell'attivazione a cascata di enzimi proteolitici che degradano il DNA e le proteine nucleari, ma preservano l'integrità della membrana plasmatica e degli organelli citoplasmatici. La cellula quindi si divide in frammenti che vengono prontamente fagocitati dalle cellule circostanti o da fagociti professionisti. Questo fenomeno si differenzia dalla morte cellulare per necrosi poiché il materiale citoplasmatico non riversandosi nell'ambiente extracellulare non causa attivazione della risposta infiammatoria locale. Questi eventi si completano nell'arco di due ore e colpiscono solamente alcune cellule all'interno di un tessuto, rendendone difficoltosa l'identificazione. [26,54].

Nel processo di morte cellulare per necrosi il nucleo, così come l'intera cellula, sembra dissolversi, la cellula si rigonfia e la membrana cellulare perde l'integrità.

Nella morte per necrosi il contenuto citoplasmatico viene rilasciato nell'ambiente extracellulare dove determina l'attivazione della risposta immunitaria tissutale locale e il danneggiamento delle cellule adiacenti.

Fig. 1: Apoptosis e Necrosi Cellulare [80]



MECCANISMI GENETICI E MOLECOLARI DELL' APOPTOSI

L'apoptosis, ovvero suicidio cellulare programmato, è un processo ben codificato, conservato nei nucleotidi cellulari e che può essere attivato da numerosi stimoli di morte sia extracellulari che intracellulari.

La sensibilità della cellula a questi stimoli di morte varia in modo dipendente dall'espressione cellulare di proteine *pro* e *anti* apoptotiche, dall'intensità dello stimolo e dalla fase del ciclo cellulare.

L'apoptosis può essere attivata attraverso tre vie:

- Via estrinseca: attivata da segnali di morte che attivano specifici recettori di superficie, chiamati death receptors. Possibili segnali di morte sono: fattori solubili, cellule infettate da virus;
- Via intrinseca: attivata da segnali endogeni ed è mediata dai mitocondri. Possibili segnali endogeni sono: deprivazione di fattori di crescita, stress ossidativi che portano alla formazione di radicali liberi, radiazioni, sostanze chimiche ecc;
- Via del reticolo endoplasmatico.

Le chiavi molecolari dell'apoptosis cellulare sono gli enzimi proteolitici appartenenti alla famiglia delle CASPASI e un gruppo di proteine appartenenti alla famiglia delle Bcl-2 e l'adattatore proteico Apaf-1.

E' stato possibile suddividere il processo apoptotico in quattro fasi:

1. **Induzione:** "cross talk" tra segnali di morte cellulare e l'espressione cellulare di proteine pro e anti apoptotiche
2. **Esecuzione:** attivazione della cascata delle caspasi;
3. **Riconoscimento e fagocitosi del corpo cellulare:** la cellula apoptotica espone segnali "eat-me" per i macrofagi
4. **Degradazione del corpo cellulare da parte della cellula fagocitica**

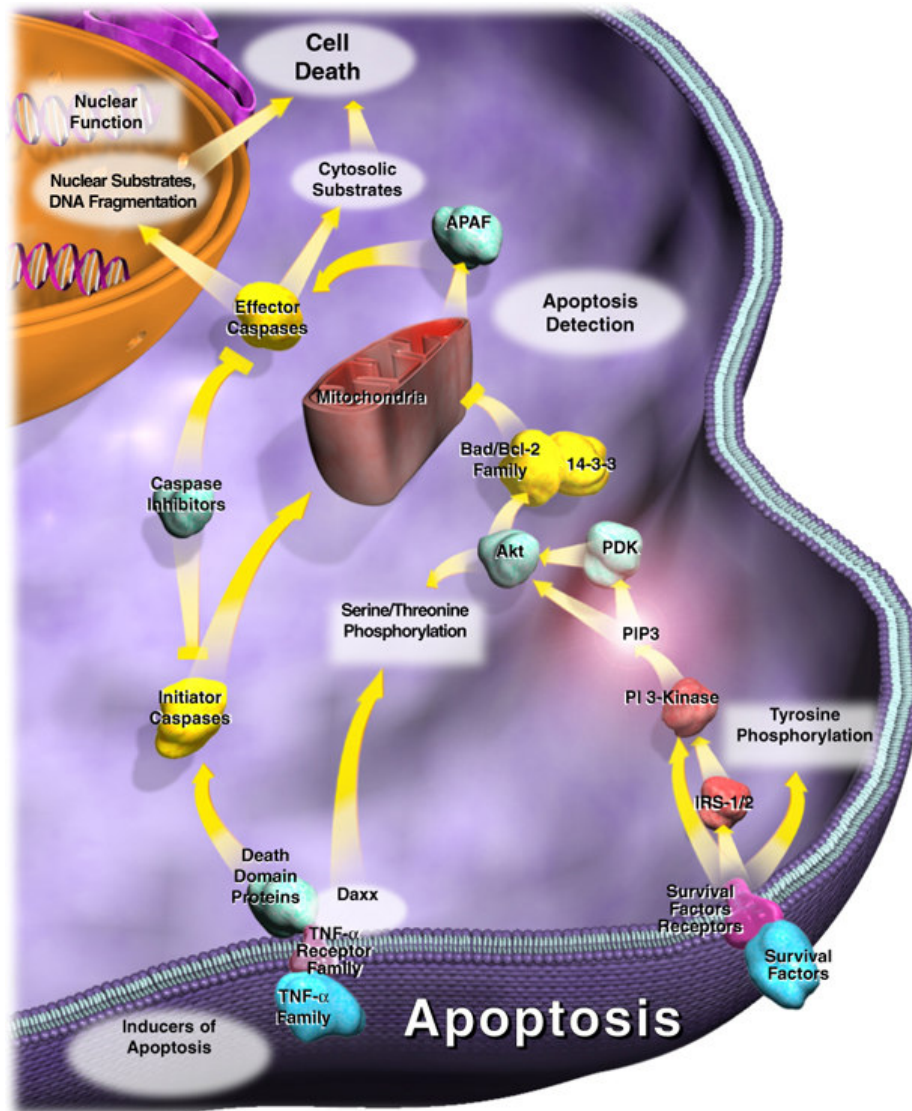


Fig. 2: Principali Vie di trasmissione del segnale apoptotico, enzimi e molecole coinvolte. [88]

Le caspasi

Le caspasi rivestono un ruolo importante nella trasmissione del segnale apoptotico (caspasi-8 e -9) e nell'esecuzione dell'apoptosis (caspasi-3, -6, -7 e -12) [10]. Sono delle proteasi cistein-aspartato specifiche la cui attività catalitica dipende dalla presenza di un residuo

di cisteina all'interno di un sito attivo altamente conservato (pentamero QACRG). Le caspasi agiscono sul loro substrato in modo selettivo dopo il residuo di aspartato. Le caspasi vengono sintetizzate come zimogeni, composti da un prodominio aminoterminale, una larga subunità e una piccola subunità e come tali sono inattive e sono chiamate pro-caspasi. La loro attivazione comporta un processo proteolitico tra i domini, seguito dall'associazione della subunità grande con quella piccola a formare un eterodimero o un tetramero attivo. Una volta attivate, le caspasi agiscono sulle altre caspasi e su altri substrati cellulari, che comprendono il DNA e alcune proteine nucleari e che conducono ai cambiamenti che caratterizzano l'apoptosis.

Le caspasi coinvolte nel fenomeno dell'apoptosis sono: Caspase-3, caspase-6, caspase-7 caspase-8, caspase-9 e caspase-12. Le altre caspasi sono coinvolte nel fenomeno dell'infiammazione.

Famiglia delle proteine Bcl-2

Famiglia delle proteine Bcl-2: hanno un ruolo centrale nella trasmissione del segnale apoptotico all'interno della cellula. Includono due tipi di proteine:

- **le proteine anti-apoptosis:** *Bcl-2* e *Bcl-XL*. Sono localizzate sulla membrana mitocondriale esterna, sul reticolo endoplasmatico e sulla membrana perinucleare. L'espressione di Bcl-2 è alta nel sistema nervoso centrale (SNC) durante lo sviluppo e si riduce dopo la nascita, mentre rimane alta nel sistema nervoso periferico (SNP) per tutta la vita. Bcl-2 favorisce la sopravvivenza neuronale in assenza del fattore di crescita neuronale (NGF) annullando il segnale di morte cellulare conseguente alla mancanza del fattore trofico [23]. Bcl-XL è presente nel cervello in via di sviluppo ma, a differenza di Bcl-2, la sua espressione aumenta durante la vita adulta. Sembra agire sui neuroni immaturi, favorendone la

sopravvivenza prima che stabiliscano connessioni sinaptiche con i rispettivi targets.

- **le proteine pro-apoptotiche:** sono localizzate nel citosol dove fungono da sensori di danno o stress cellulare. *Bax* e' una proteina pro-apoptotica espressa ubiquitariamente nel sistema nervoso e la sua attivazione, indotta dalla mancanza di fattore neurotrofico o da danno, determina morte neuronale.

L'interazione delle proteine proapoptotiche con le antiapoptotiche determina la formazione di pori di membrana che favoriscono la fuoriuscita di altre molecole pro-apoptotiche che a loro volta favoriscono la formazione dell'apoptosoma e l'attivazione della cascata delle caspasi.

Apaf-1

In fine l'adattatore proteico Apaf-1: trasmette il segnale apoptotico dai mitocondri danneggiati alle caspasi. Apaf-1 forma un complesso con il Cyt c rilasciato dai mitocondri e la pro-caspasi-9 e favorisce l'attivazione di quest'ultima. La sua attivazione innesca a cascata la caspasi-3, -6 e -7 effettori dell'apoptosis.

PRINCIPALI VIE DI TRASMISSIONE DEL SEGNALE APOPTOTICO

Le vie di conduzione del segnale del processo apoptotico si distinguono in:

- **Via estrinseca:** sulla superficie cellulare sono presenti i recettori di morte cellulare, appartenenti alla superfamiglia dei recettori dei fattori di necrosi tumorale (TNFR). Questi recettori trasducono il segnale apoptotico all'interno della cellula dopo aver legato uno specifico ligando. Il dominio citoplasmatico di questi recettori è chiamato dominio di morte (Death Domain, DD), che riconosce un dominio analogo su una proteina

citoplasmatica adattatrice (FADD Fas Associated Death Domain,), quando il recettore di morte viene attivato. Il complesso formato da DD e FADD costituisce DISC (death inducing signaling complex) ed è l'interazione del dominio DED (death effector domain) di FADD con un dominio analogo della pro-caspase-8, che attiva la caspase-8 e a cascata tutti gli altri effettori di apoptosis.

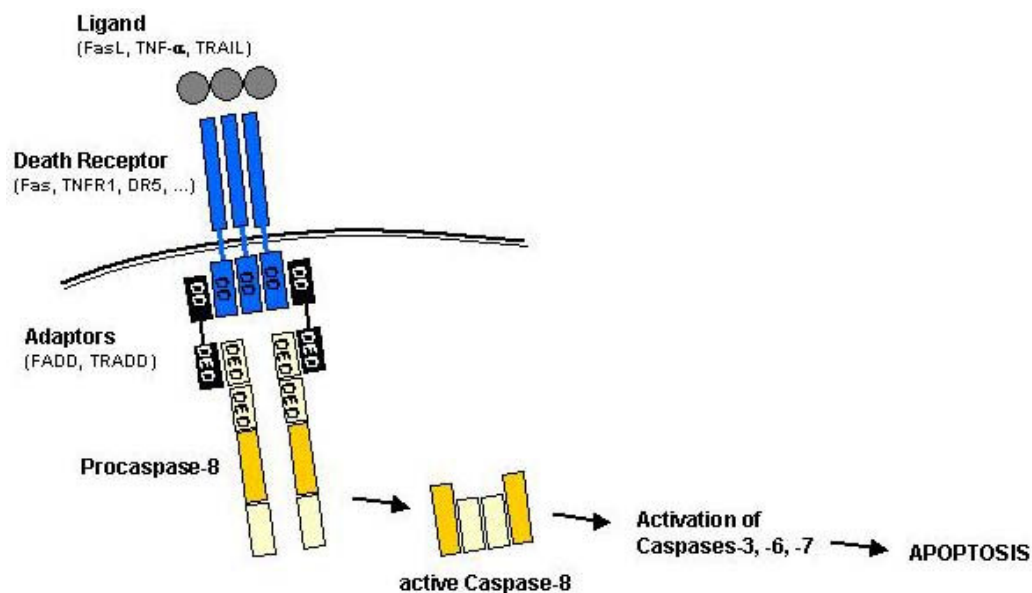
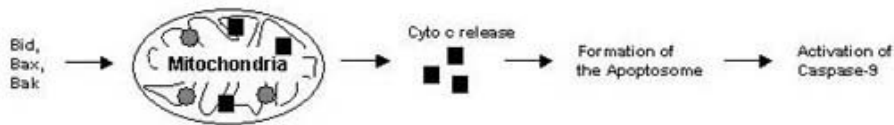


Fig. 3: Apoptosis: via estrinseca. Attivato il death receptor dal legame con il proprio ligando, richiama a sé le molecole adattatrici tramite i death domain citoplasmatici (DD). Le molecole adattatrici possiedono domini death effector (DED) che richiamano a loro volta la procaspasi-8 formando il complesso detto death-inducing signaling complex (DISC). La procaspasi viene attivata da un taglio proteolitico che forma la caspasi 8 attiva, un eterodimero composto da due subunità piccole e due grandi. La caspasi 8 attiva quindi le altre caspasi della via apoptotica. [24]

- **Via intrinseca:** i mitocondri svolgono un ruolo centrale nella trasmissione del segnale di morte originato all'interno della cellula. DNA danneggiato, stress ossidativo, "starvation" indotta da farmaci chemioterapici determinano un'alterazione del potenziale di membrana interna mitocondriale con conseguente aumento della permeabilità ai soluti, rigonfiamento

mitocondriale e rilascio di proteine pro-apoptotiche mitocondriali nel citoplasma, tra cui il citocromo c (Cyt.c) [7,39,46,72,82]. Il Cyt.c è responsabile della formazione dell'apoptosoma che determina l'attivazione della pro-caspase-9 e la caspase-9 attivata innesca la cascata apoptotica: caspase-3, -6 e -7 [14].

A. Mitochondrial pathway of caspase activation



B. Apoptosome Formation and Activation

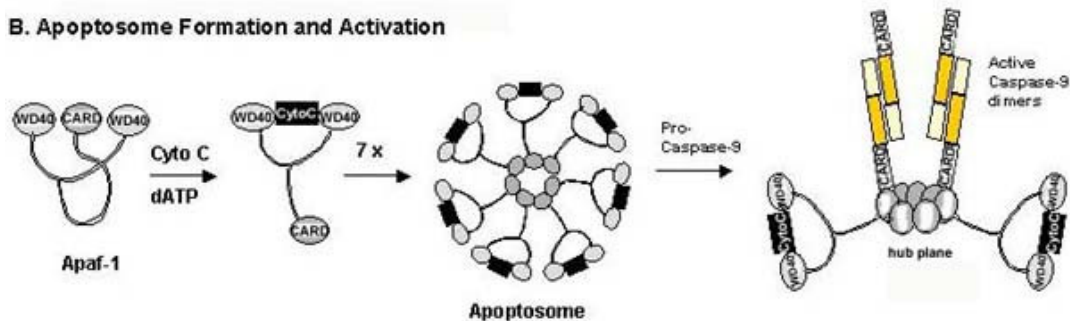


Fig. 4: Attivazione delle caspasi via mitocondriale (A) formazione e attivazione dell'apoptosoma. A: Il segnale apoptotico porta al rilascio da parte del mitocondrio nel citosol di fattori apoptogeni come il citocromo c che induce la formazione dell'apoptosoma e l'attivazione della caspasi 9. **B:** Grazie all'azione del citocromo c e di dATP, la proteina Apaf-1 assume una conformazione eptamerica a cerchio: l'apoptosoma. Le molecole di procaspasi 9 possono legare la regione "mozza" dell'apoptosoma ed essere attivate dalla forma dimerica. Il dimero caspasi 9 attivo inoltre media l'attivazione delle caspasi effettrici. [Acehar 2002]

Processi apoptotici sono stati descritti durante lo sviluppo embrionale, lo sviluppo del SNC, nell'atrofia tissutale endocrina, nel turn-over cellulare, nella selezione timica, nelle reazioni citotossiche e nelle risposte immunitarie.

Sono stati evidenziati eventi apoptotici in associazione a condizioni patologiche come cancro, malattie autoimmuni, diffusione di infezioni come nell'HIV e malattie neurodegenerative, quali il Morbo di Alzheimer.

APOPTOSIS NELLO SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Una delle funzioni dell'apoptosis all'interno di un organismo pluricellulare è quello di contribuire, insieme alla mitosi, al mantenimento dell'omeostasi numerica. È evidente che i due processi si devono equilibrare tra loro in ogni tessuto e in ogni momento della vita dell'organismo e che un loro squilibrio ha potenzialmente conseguenze molto gravi.

Nello specifico l'apoptosis neuronale è un processo naturale attraverso cui i neuroni ridondanti o che hanno fallito la connessione con i rispettivi targets, vengono eliminate dal cervello in via di sviluppo. La neurodegenerazione apoptotica coinvolge approssimativamente l'1% della popolazione neuronale di una determinata regione cerebrale e comporta la perdita della metà dei neuroni inizialmente prodotti. I neuroni vengono prodotti in eccesso e il loro numero definitivo viene regolato da questo processo di morte cellulare che si realizza durante il periodo della sinaptogenesi, quando i neuroni iniziano a stabilire le connessioni sinaptiche con i rispettivi target, dopo essersi differenziati ed essere migrati nella loro sedi definitive [63].

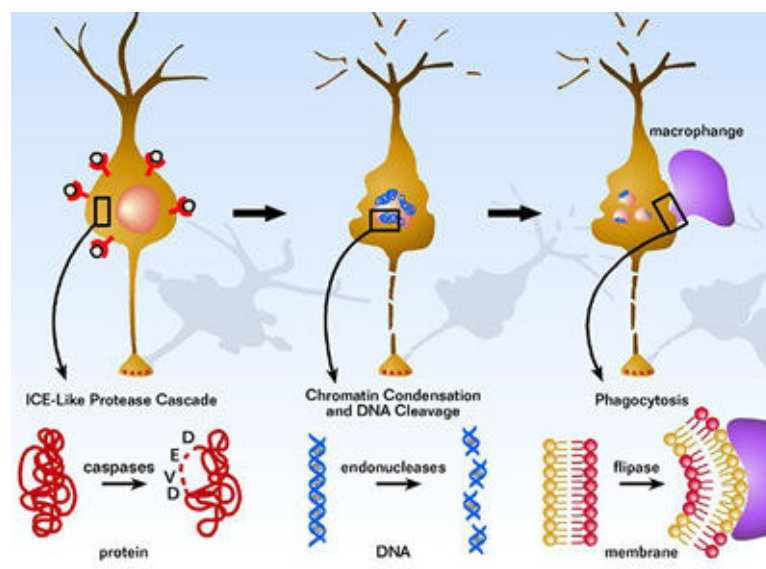


Fig. 5: Apoptosis neuronale

I processi di proliferazione, differenziazione, migrazione e plasticità neuronale sono regolati da fattori trofici neuronali tra cui i neurotrasmettitori. I due più importanti neurotrasmettitori trofici cerebrali coinvolti nella sopravvivenza neuronale sono il Glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio, e il GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio [4,5,6,27,41,42].

Altri neurotrasmettitori sono stati oggetto di numerosi studi atti a verificare i meccanismi di sopravvivenza dei neuroni durante la fase di sviluppo del sistema nervoso. Diverse classi di farmaci come gli agonisti e gli antagonisti del recettore dopaminico, gli antagonisti del recettore α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainite, gli antagonisti del recettore muscarinico e i bloccanti i canali del calcio non hanno tuttavia indotto fenomeni apoptotici a livello celebrale negli animali utilizzati per gli studi.

La principale funzione dell'apoptosis sembra essere l'adeguamento del numero dei neuroni immaturi alle dimensioni della popolazione target poiché, solo i neuroni che ricevono un adeguato fattore trofico sarebbero in grado di sopravvivere.

Tutto ciò che altera l'omeostasi di questo processo, trasforma l'apoptosis da fenomeno biologico a fenomeno patologico. Questo potrebbe spiegare l'azione neurotossica nel cervello in via di sviluppo dei farmaci che sono normalmente usati per l'anestesia generale.

Essi agiscono spegnendo l'attività neuronale attraverso due meccanismi principali: aumentando la trasmissione inibitoria agendo su i recettori GABA oppure riducendo la trasmissione eccitatoria bloccando il recettore NMDA.

E' stato dimostrato che il periodo di maggiore suscettibilità a commettere suicidio cellulare, dopo l'esposizione a farmaci antagonisti del NMDA e agonisti del GABA-A, corrisponde al periodo della sinaptogenesi, noto anche come "brain growth spurt period" [33,34].

La sinaptogenesi differisce per timing e durata nelle diverse specie:

- nei ratti: inizia un giorno prima della nascita e termina approssimativamente 14 giorni dopo. [16]
- nei guinea pigs: e' un fenomeno principalmente prenatale e dura circa dieci settimane. [16]
- nei piglets: e' sia un fenomeno prenatale che un fenomeno postnatale , dura venti settimane di cui le ultime cinque settimane della gravidanza e le prime quindici di vita. [16]
- nell'uomo e' sia un fenomeno prenatale che postnatale, dura circa due anni e comprende l'ultimo trimestre di gravidanza fino al secondo anno di vita [3,16]