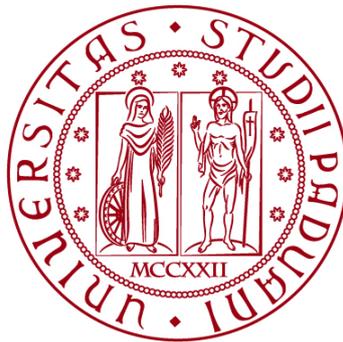


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea triennale in Biologia



TESI DI LAUREA

**CONTRIBUTO GENETICO DEL DISTURBO DA STRESS POST
TRAUMATICO (PTSD): STUDIO DEI MODELLI ANIMALI**

Relatore: Prof.ssa Gabriella Mazzotta
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Valentina Lopes

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

INDICE	Pagina
Introduzione	2
Capitolo 1. Definizione	2
Capitolo 2. Basi neurali e biologiche del disturbo	3
2.1 Circuiti cerebrali coinvolti	4
Capitolo 3. PTSD non solo nell'uomo	6
3.1 Modelli animali per il PTSD	7
3.1.1 Il modello IMO	12
Capitolo 4. Geni coinvolti nei meccanismi del PTSD	15
4.1 OPRL1	15
4.2 SLC6A4	17
Capitolo 5. Limiti degli studi epigenetici nel disturbo da stress post-traumatico e direzioni future	18
5.1 Conclusioni e possibili approcci terapeutici	19
Bibliografia	21

Introduzione

Il progressivo incremento di disturbi mentali tra la popolazione ha portato il tema della salute mentale in primo piano, soprattutto nell'ultimo periodo. I disturbi mentali sono stati definiti dall'OMS come una delle principali cause di sofferenza e disabilità nel mondo. La complessità dello studio della salute mentale richiede un approccio multidisciplinare che coinvolga fattori biologici, comportamentali, sociali e ambientali, questo lo rende tuttora difficile da trattare nella sua completezza.

In questo elaborato si pone attenzione sul disturbo da stress post traumatico e ci si propone di analizzarne le basi biologiche e neurali facendo riferimento agli studi finora effettuati, in particolare prendendo in considerazione l'utilizzo di modelli animali per lo studio del contributo genetico del disturbo. In conclusione, si sposta l'interesse anche sulle possibili applicazioni in campo terapeutico delle recenti scoperte.

1. Definizione

Il Disturbo da Stress Post Traumatico (PTSD) è una forma di disagio mentale che si sviluppa in seguito a esperienze fortemente traumatiche o ad una esposizione ripetuta e continua a episodi di violenza e di degrado (Figura 1).^[1]

Nell'uomo è stato identificato e studiato negli Stati Uniti soprattutto a partire dalla guerra del Vietnam e in seguito agli effetti osservati sui soldati superstiti, che poi vennero riscontrati in tutte le più recenti esperienze belliche. Molti soldati, infatti, erano rientrati in patria con gravi disagi psicologici (sintomi quali intrusioni, evitamento, alterazioni negative nella cognizione e nell'umore e alterazioni nell'eccitazione e reattività).

Nel linguaggio comune inizialmente ci si riferiva a questo fenomeno come la "sindrome del Vietnam" o "nevrosi da guerra". Solo nel 1980 è stato ufficialmente incluso come categoria diagnostica nel Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-II) e si è coniato il termine di "Disturbo post-traumatico da stress".^[1]

I sintomi del PTSD sono in genere suddivisi in quattro categorie:

1. Ricordi intrusivi
2. Evitamento
3. Modifiche negative nella cognizione e nell'umore
4. Alterazioni nelle risposte eccitatorie e emozionali

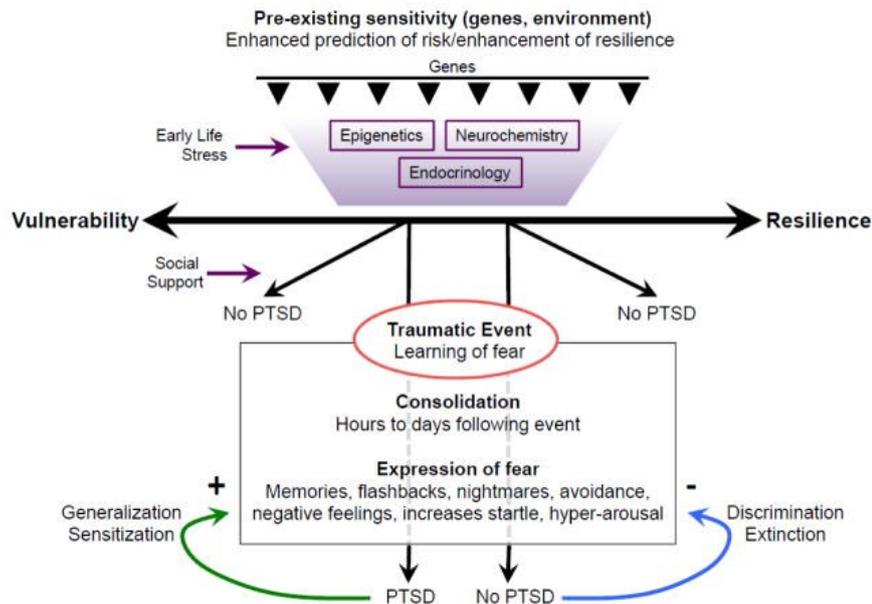


Figura 1. Schema dello sviluppo delle interazioni gene per ambiente (G x E) e dello sviluppo del disturbo da stress post-traumatico (PTSD).

L'ereditarietà genetica insieme allo stress della prima infanzia e ai traumi infantili comprendono gran parte del rischio di depressione e disturbi legati all'ansia come il disturbo da stress post-traumatico. Dopo l'evento traumatico, la memoria della paura appresa si consolida in uno stato più permanente. Gli individui che sviluppano PTSD non riescono a discriminare ed estinguere i ricordi di paura e mostrano invece sensibilizzazione e generalizzazione della risposta di paura.

2. Basi neurali e biologiche del disturbo

I segni e i sintomi del disturbo da stress post-traumatico sembrano riflettere un adattamento anormale e persistente dei sistemi neurobiologici allo stress del trauma testimoniato. I sistemi neurobiologici che regolano le risposte allo stress includono alcuni percorsi endocrini e neurotrasmettitoriali (Tabella 1) nonché una rete di regioni cerebrali note per regolare il comportamento della paura sia a livello conscio che inconscio [2]. Più specificamente, ci sono stati e continuano ad esserci studi per trovare una relazione tra i cambiamenti neurobiologici identificati nei pazienti che soffrono di PTSD e le caratteristiche cliniche specifiche che costituiscono il disturbo, inclusi apprendimento alterato, eccitazione aumentata e comportamento dissociativo intermittente [2].

Originariamente, gli sforzi per identificare i marcatori neurobiologici per PTSD presumevano che le anomalie fossero state acquisite a posteriori, cioè come conseguenza dell'esperienza traumatica. Potrebbe essere, tuttavia, che alcune anomalie nel paziente con PTSD rappresentino semplicemente una patologia preesistente o "a monte" che è funzionalmente dormiente fino a quando non viene rilasciata dall'esposizione al trauma e rilevata successivamente all'indagine [2].

I recenti studi si sono concentrati sui fattori che sembrano modulare la variazione degli esiti nei sistemi neurobiologici a seguito dell'esposizione al trauma, compresi i fattori di suscettibilità genetica, il genere, i traumi precedenti, la fase di sviluppo precoce al momento dell'esposizione traumatica e le lesioni fisiche (incluse le lesioni cerebrali traumatiche).

Feature	Change	Effect
A. Neuroendocrine		
Hypothalamic-pituitary-adrenal axis	Hypocortisolism	Disinhibits CRH/NE and upregulates response to stress Drives abnormal stress encoding and fear processing
	Sustained, increased level of CRH	Blunts ACTH response to CRH stimulation Promotes hippocampal atrophy
Hypothalamic-pituitary-thyroid axis	Abnormal T3:T4 ratio	Increases subjective anxiety
B. Neurochemical		
Catecholamines	Increased dopamine levels	Interferes with fear conditioning by mesolimbic system
	Increased norepinephrine levels/activity	Increases arousal, startle response, encoding of fear memories Increases pulse, blood pressure, and response to memories
Serotonin	Decreased concentrations of 5HT in:	
	Dorsal raphé	Disturbs dynamic between amygdala and hippocampus
	Median raphé	Compromises anxiolytic effects
	Dorsal/median raphé	Increases vigilance, startle, impulsivity, and memory intrusions
Amino acids	Decreased GABA activity	Compromises anxiolytic effects
	Increased glutamate	Fosters derealization and dissociation
Peptides	Decreased plasma NPY concentrations	Leaves CRH/NE unopposed and upregulates response to stress
	Increased CSF β -endorphin levels	Fosters numbing, stress-induced analgesia, and dissociation
C. Neuroanatomic		
Hippocampus	Reduced volume and activity	Alters stress responses and extinction
Amygdala	Increased activity	Promotes hypervigilance and impairs discrimination of threat
Cortex	Reduced prefrontal volume	Dysregulates executive functions
	Reduced anterior cingulate volume	Impairs the extinction of fear responses
	Decreased medial prefrontal activation	Unclear

Tabella 1. **Riepilogo delle caratteristiche neurobiologiche con anomalie identificate e implicazioni funzionali in pazienti con disturbo da stress post-traumatico.** CRH, ormone di rilascio della corticotropina; 5HT, serotonina; GABA, acido γ -amminobutirrico; NPY, neuropeptide Y; ACTH, adrenocorticotropina; NE, noradrenalina; CSF, liquido cerebrospinale

2.1 Circuiti cerebrali coinvolti

Utilizzando tecniche di imaging cerebrale, sono stati identificati cambiamenti caratteristici nella struttura e nella funzione del cervello in pazienti con disturbo da stress post-traumatico.

Le regioni cerebrali alterate includono l'ippocampo e l'amigdala, nonché le regioni corticali che includono il cingolo anteriore, l'insula e la regione orbitofrontale [2].

Queste aree si interconnettono per formare un circuito neurale che media, tra le altre funzioni, l'adattamento allo stress e il condizionamento alla paura. È stato ipotizzato che i cambiamenti in questi circuiti abbiano un rapporto diretto con lo sviluppo del disturbo da stress post-traumatico. Le aree del cervello più colpite dal trauma cranico includono i lobi frontali e temporali inferiori [2].

L'ippocampo (Figura 2) è implicato nel controllo delle risposte allo stress, nella memoria dichiarativa e negli aspetti contestuali del condizionamento alla paura [2]. Una caratteristica distintiva del disturbo da stress post-traumatico è la riduzione del volume dell'ippocampo: l'esposizione prolungata allo stress e ad alti livelli di glucocorticoidi negli animali da laboratorio porta alla riduzione della ramificazione dendritica e alla compromissione della neurogenesi.

Studi iniziali di risonanza magnetica (MRI) hanno rilevato volumi minori dell'ippocampo nei veterani del Vietnam con PTSD rispetto ai controlli [2].

Successivi studi che utilizzano la spettroscopia di risonanza magnetica protonica hanno inoltre osservato livelli ridotti di N-acetyl aspartato (NAA), un marker di integrità neuronale, nell'ippocampo di pazienti adulti con PTSD [2].

I deficit dell'ippocampo possono portare all'incapacità di terminare le risposte allo stress e anche compromettere la capacità nel discriminare tra contesti ambientali sicuri e non sicuri [2].

Anche l'amigdala (Figura 2) ha un ruolo fondamentale nella fisiopatologia del disturbo da stress post-traumatico. L'amigdala è una struttura limbica coinvolta nell'elaborazione emotiva ed è fondamentale per l'acquisizione delle risposte di paura e nella mediazione di risposte allo stress e apprendimento emotivo [2].

Gli studi di imaging funzionale hanno rivelato un'iper-reattività di questa struttura nel disturbo da stress post-traumatico durante la presentazione di segnali stressanti.

L'amigdala sembra anche essere sensibilizzata alla presentazione di segnali minacciosi subliminali in pazienti con PTSD, ed è stata segnalata una maggiore attivazione in pazienti con PTSD durante acquisizione della paura in un esperimento di condizionamento [2].

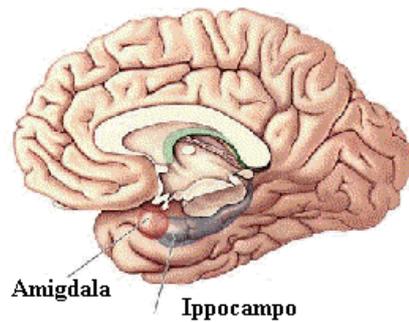


Figura 2. Rappresentazione schematica della posizione di amigdala e ippocampo nel cervello.

3. PTSD non solo nell'uomo

Il disturbo da stress post-traumatico è stato identificato e studiato anche in altri esseri viventi oltre all'uomo. Qualche esempio:

1) Uno studio documenta la condizione dei cani involontariamente abbandonati dopo il terremoto e il grave incidente nucleare a Fukushima. Molti dei cani si trovavano per le strade o erano incatenati e lasciati soli per lunghi periodi. Altri avevano vissuto uno stato semi-selvaggio nella zona di esclusione, nei pressi del reattore nucleare. Questi animali hanno assistito non solo ad un completo cambiamento delle loro condizioni di vita, ma anche alla separazione dalle loro famiglie.^[3]

Alcuni cani mostravano maggiore aggressività, ma questo non era necessariamente da ricondurre a maggiore stress, infatti analizzando i livelli di cortisolo nei cani di questo studio si avevano livelli più bassi di aggressività associati a livelli più alti di cortisolo, questo suggeriva che i sintomi dello stress non si manifestavano direttamente nel loro comportamento aggressivo. I livelli trovati erano comunque 5-10 volte maggiori rispetto ai livelli di cortisolo rilevati in gruppi di cani non provenienti da Fukushima. Altri sintomi mostrati erano una compromissione nella capacità di apprendimento (dovuta all'eccesso di glucocorticoidi), capacità comportamentali alterate per quello che riguarda l'attaccamento e il legame.^[5]

Gli autori dello studio hanno concluso dai loro risultati che ci fosse la possibilità che lo stress potesse indurre nei cani eccessivi impatti psicosomatici con manifestazioni comportamentali implicite, come i deficit di attacco e la capacità di apprendimento.^[5] Come negli esseri umani, alcuni cani sviluppano PTSD, mentre altri nelle stesse circostanze non mostravano sintomi rilevanti. La ragione di queste differenze è sconosciuta, ma gli studiosi teorizzano che la genetica abbia un ruolo

fondamentale. Alcuni animali possono essere più sensibili agli effetti del trauma psicologico rispetto ad altri. [3]

2) Un altro studio prende in esame un campione di 253 scimpanzé ospitati presso la struttura in Florida "Save the Chimps". Questi scimpanzé provenivano tutti da un passato di esperimenti scientifici, quindi, presumibilmente, da un percorso traumatico di sviluppo. Si osservarono comportamenti vistosamente anormali (i sintomi segnalati includevano disregolazione affettiva, anedonia, irritabilità, ritiro sociale, paura di uscire, episodi dissociativi e comportamenti autolesivi). Il fatto che non tutti gli animali presentassero la stessa sintomatologia può essere indice di differenze individuali e maggiore o minore predisposizione a sviluppare un PTSD. [6]

Un aspetto molto interessante di questi studi è che il fatto che anche alcuni animali possono sviluppare sintomi riconducibili al disturbo post traumatico da stress, apre la possibilità di studiare a fondo il disturbo anche grazie a modelli animali.

3.1 Modelli animali per il PTSD

Una delle caratteristiche fondamentali di un evento traumatico è l'impossibilità di elaborazione del fatto in termini mnestici. La sindrome post-traumatica, per questo motivo, è stata più volte definita come una patologia della memoria. [8]

Possiamo definire il PTSD come una forma di condizionamento esasperato e disfunzionale. Differenti autori hanno osservato come gli animali sembrano possedere strumenti differenti per far fronte a un PTSD, oppure al contrario riescano a gestire l'elaborazione di un ricordo traumatico per via dell'assenza di alcune strutture "ingombranti" invece possedute dall'uomo. [8]

Nell'uomo, il PTSD si mantiene per tempi lunghissimi, arrivando a modellare in modo durevole il comportamento e la vita in generale dell'individuo. Gli animali, al contrario, riuscirebbero in tempi più brevi a superare uno stress post traumatico, per via di alcuni meccanismi naturali di dissipazione corporea del trauma [8].

Lo studioso Levine riporta che gli animali rispondono al singolo trauma in modo estremamente efficace, "scrollandolo" via dal corpo e ripristinando per via corporea lo stato neurofisiologico antecedente il trauma stesso. Levine parla di un eccesso di energia fisica che, non potendo svilupparsi a causa dello stato di impotenza sperimentato durante il trauma, rimane nel corpo e lo perturba (stress post-traumatico): questa energia viene definita come tendenza all'azione che,

dovrebbe essere idealmente dissipata attraverso il corpo (sede dei movimenti di fuga/attacco elicitati dalla minaccia). [9]

Uno degli effetti somatici del PTSD sono tremori, eccessiva sudorazione, mani fredde: segni di questo tipo sono derivati da una risposta autonoma del sistema nervoso centrale bloccato in una modalità di difesa, in previsione di un ipotetico nuovo momento traumatico. Levine interpreta questi come segni e sintomi corporei di qualcosa che necessita di essere evacuato o dissipato (per esempio una forte rabbia che non è riuscita a esprimersi, una fuga impossibile rimasta intrappolata nel corpo). Se osserviamo per esempio un animale bloccato in una condizione di freezing (paralizzato), nel momento in cui si libera da questa situazione osserveremo che l'animale scarica attraverso il tremore lo stato di freezing stesso.

Il tremore rappresenta una risposta naturale funzionale a dissipare il terrore e l'ansia: quello che sembra essere necessario, in effetti, in natura, è che il processo di scarico della paura a seguito di un forte shock o trauma, avvenga in modo completo, fino in fondo. [9]

Per quanto riguarda la ricerca nel topo:

- i pensieri intrusivi, la riesperienza e i flashback non sono indagabili, per l'impossibilità di accedere all'esperienza rappresentata -mentale- del topo stesso;
- l'evitamento è facilmente osservabile, di fronte a possibili trigger che rievocano nella mente del topo l'evento traumatico;
- la presenza di cognizioni negative si può indagare attraverso test inerenti la motivazione, la preferenza sociale e il test della "preferenza edonica";
- esistono molteplici strumenti di rilevazione del livello di arousal;
- come accade per l'uomo, per poter attribuire al topo una condizione di post trauma, deve essere passato un certo lasso di tempo, così da escludere l'ipotesi che il topo studiato non stia vivendo semplicemente una condizione di post trauma acuta e strettamente contestuale. [8]

Generalmente, il PTSD negli animali è studiato a partire dal tipo di trauma, sottoponendo gli animali (in questo caso, il topo) a differenti tipi di stress (Tabella 2). [7]

Model	General protocol	Aims	Rationale
Fear conditioning	A brief series of tone-shock exposures. Subsequent fear response to the tone, often in the form of freezing response, is measured as an index of pathology.	To model PTSD-associated enhanced fear response in face of reminders of the original trauma.	Long-term behavioral symptoms associated with exposure to a significant stressor.
Exposure to a short session of inescapable footshocks	Exposure to a brief (15 min) session of inescapable footshocks (e.g., 10 × 6 s, 1 mA) inducing a gradually developing and long-lasting change in behavioral responses to novel environmental stimuli.	To model an exposure to a significant, unescapable stressor.	An exposure to a significant stressor under uncontrollable conditions, which are assumed to enhance the aversive impact of the stressor. The protocol is expected to induce long-lasting mood symptoms.
Stress-enhanced fear learning (SEFL)	Pre-exposure to repeated footshock in one context produces an enhancement of conditional freezing to cues associated with a single shock in a second distinct context.	To model the history of stress exposure on the lasting effects of a traumatic event.	A high level of previous stress exposure enhances the risk for the development of PTSD symptoms.
Exposure to predators or predator odor	Involuntary exposure to a predator (cat, snake,...) or predator odor, often in combination with other stressors	To model a highly naturalistic stress situation for rodents.	Exposure to predators is considered an etiologically highly relevant stressor with a high likelihood to be perceived as a traumatic event.
Single prolonged stress	Exposure to 2 h restraint, 20 min forced swimming and ether until loss of consciousness	Enhancement of lasting PTSD-like symptoms by combination of severe and systematically different stressors.	In order to induce a sufficient trauma in a rodent, the stress exposure needs to go beyond a naturalistic range of stressors and activate multiple brain circuits
Underwater trauma	Forced underwater submersion of the rat for 45 s	Creation of a highly traumatic and unescapable situation.	Exposure to this etiologically relevant and presumably highly traumatic event results in lasting PTSD-like symptoms, which can also be enhanced by later exposure to reminder cues
Immobilization/restraint	Single prolonged immobilization for 2 h with all 4 limbs on a wooden board, or prolonged restraint in a tube.	Creation of an inescapable situation and a severe psychological stressor with as a consequence long-term behavioral and neuroendocrine alterations.	Especially under laboratory housing conditions, where animals have little exposure to stressors, prolonged immobilization is a highly standardized and effective traumatic experience

Tabella 2. Sono elencati alcuni tra i più comuni modelli animali e le relative modalità utilizzate per lo studio del PTSD

I risultati cumulativi degli ultimi anni indicano che i modelli animali di PTSD non sono solo preziosi per comprendere i meccanismi di base dei processi di paura e memoria, ma sono anche in grado di catturare la complessità umana e le differenze di sensibilità ai fattori di rischio e ai fattori di stress, nonché le differenze nei principali sintomi risultanti. Tuttavia, affinché i modelli siano sensibili a tali differenze individuali e alle variazioni tra i sessi, la scelta dei fattori di rischio, del tipo di trauma e delle misure comportamentali dei sintomi, dovrebbe essere accuratamente selezionata prima di trarre conclusioni. [7]

È importante sottolineare che spostare il campo verso un approccio di analisi del profilo comportamentale, che prenda in considerazione le differenze individuali, è fondamentale per essere in grado di mettere in relazione i sintomi comportamentali con i loro correlati neurali e per stabilire piattaforme efficaci per lo sviluppo di farmaci e test antidroga. Questi nuovi sviluppi nel modo in cui il PTSD è modellato negli animali, esaminati qui, indicano che i modelli animali di PTSD sono un prezioso strumento di ricerca per promuovere la nostra comprensione della neurobiologia del PTSD.[7]

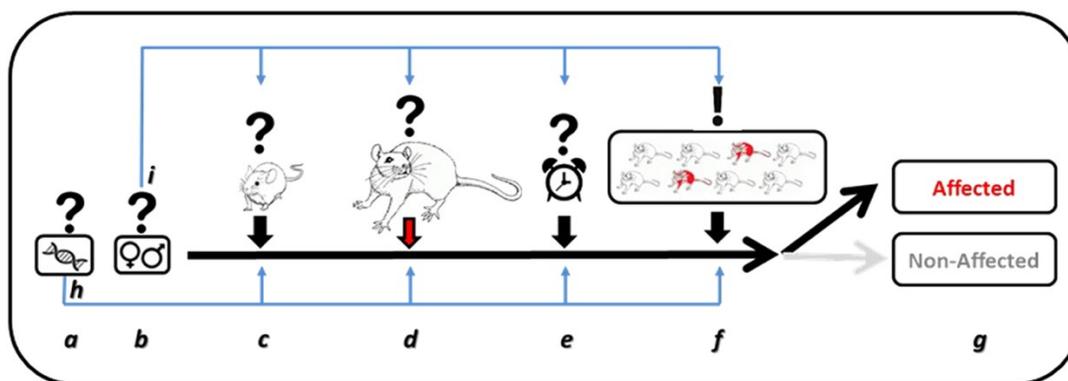


Figura 3. Principi guida per la selezione di un modello animale di PTSD

Esistono diversi principi che, secondo gli autori, dovrebbero essere incorporati al fine di aumentare la validità ecologica dei modelli e la loro rilevanza per la psicopatologia umana (Figura 3).

a. Gli esseri umani esposti al trauma hanno un background genetico eterogeneo. La selezione di una linea consanguinea dovrebbe essere considerata come una manipolazione che definisce l'ambito dell'esito dello studio. Come è indicato dalla linea a freccia azzurra (**h**), la predisposizione genetica può mediare effetti a più livelli, cioè alle avversità giovanili, alla percezione del trauma e/o all'esito individuale.

b. Maschi e femmine sono sensibili allo stress e ai traumi in modi diversi. La preferenza dovrebbe essere quella di esaminare sia i maschi che le femmine. Allo stesso modo, maschi e femmine possono differire negli aspetti comportamentali interessati e quindi possono essere necessari diversi test comportamentali per identificare maschi o femmine affetti. Come è indicato dalla linea a freccia azzurra (**i**), le differenze di sesso possono mediare effetti a più livelli, ad esempio l'avversità giovanile, la percezione del trauma e/o l'esito individuale.

c. La maggior parte degli individui esposti al trauma non svilupperà PTSD, indice del fatto che il trauma sarà efficace solo se interagisce con alcuni fattori predisponenti aggiuntivi. Lo studio della neurobiologia dei fattori predisponenti è quindi una parte fondamentale della comprensione del PTSD.

d. La scelta del trauma e dei suoi parametri dovrebbe essere attentamente considerata e descritta, poiché tale scelta definisce la rilevanza dell'esito dello studio a esposizioni di natura simile nell'uomo.

Inoltre, i ricercatori dovrebbero affrontare la questione della presunta gravità dell'esperienza traumatica. È necessaria una più chiara dissociazione tra esperienze stressanti (che rientrano nelle capacità di coping dell'animale) ed

esperienze traumatiche (che sono al di là delle capacità di coping dell'animale) e dovrebbe diventare parte della discussione di qualsiasi studio. [7]

e. Il periodo di esposizione al trauma e il tempo trascorso dopo l'esposizione sono fattori importanti da considerare testare l'impatto del trauma.

f. Poiché solo alcuni individui esposti a un trauma svilupperanno una psicopatologia, è necessaria una caratterizzazione più individuale di ciascun animale come patologicamente affetto o meno. A tal fine, sembra importante puntare all'esame degli animali su batterie di test che coprono diverse facoltà comportamentali, per ottenere una caratterizzazione più affidabile dei singoli animali.

g. La definizione individuale degli animali potrebbe quindi essere tradotta nella definizione di singoli animali come affetti o non affetti, in modo simile alla diagnosi nell'uomo. Con questo tipo di analisi, gli effetti dei farmaci possono essere esaminati come l'impatto della proporzione di individui affetti/non affetti, piuttosto che sulla gravità media di sintomi specifici [7]

Uno dei paradigmi più studiati è il paradigma della risposta condizionata alla paura. Seguendo questo tipo di ragionamento, il PTSD sarebbe da considerarsi una forma grave di condizionamento classico. Il condizionamento classico storicamente nasce da Pavlov, un fisiologo che, studiando l'attività di digestione dei cani, si rese conto di alcuni fenomeni inaspettati: il cane iniziava a salivare non solo quando gli veniva portata la carne, ma anche prima. Il riflesso naturale che porta il cane a salivare quando vede la carne è chiamata risposta incondizionata. In altri termini, il cane non ha riflessi solamente quando riceve uno stimolo (il cibo) ma anche quando attende di riceverlo. [10]

La tecnica del condizionamento si basa sul presupposto per il quale se associamo uno **stimolo condizionato** (può essere un suono, un'immagine, un contesto) allo **stimolo incondizionato** (il cibo, la scarica elettrica), un numero sufficiente di volte, l'animale tenderà ad associare i due stimoli, e ad attribuire loro lo stesso significato. Per esempio, se a un ratto viene presentato uno stimolo condizionato come quello rappresentato da un suono, che di per sé non suscita nessuna reazione nell'animale, e subito dopo gli viene somministrato uno stimolo incondizionato costituito da una leggera scarica elettrica, a seguito di numerosi abbinamenti tra suono e scarica il ratto prende a reagire al suono con le stesse risposte di paura (definite 'condizionate') che prima erano riservate alla scarica. [11]

Il condizionamento della paura rappresenta una delle principali forme di apprendimento con cui impariamo a riconoscere un pericolo e sembra svolgere un

ruolo anche nell'apprendimento delle paure patologiche (cioè dei disturbi d'ansia, come le fobie e gli attacchi di panico).^[11]

L'estinzione della paura consiste in un nuovo apprendimento inibitorio dopo ripetute o prolungate presentazioni di stimoli condizionati, senza lo stimolo incondizionato, che provoca una graduale diminuzione dell'ampiezza e della frequenza della risposta condizionata.^[12]

3.1.1 Il modello IMO

Il modello utilizzato per indagare questo processo è chiamato IMO, e consiste nell'immobilizzazione dell'animale su una tavola di legno, questo permette di studiare la regolazione genica differenziale risultante nell'apprendimento della paura. Questo modello è ritenuto valido in quanto permette un'esposizione allo stress altamente traumatica, provocando una gamma di sintomi simili a PTSD a lungo termine (24-48 ore) dopo una singola esposizione nei roditori.^[13]

Tra questi sintomi, l'IMO suscita una memoria dichiarativa a lungo termine compromessa e un aumento dell'ansia simile a quello che si verifica nei pazienti con disturbo da stress post-traumatico.

Metodi utilizzati per lo studio della compromissione della memoria dichiarativa

I topi sono stati inizialmente esposti per 2 ore utilizzando il paradigma IMO, seguiti 6 giorni dopo da un'attività di labirinto d'acqua. Il labirinto d'acqua di Morris (Figura 4) è un test di apprendimento e memoria spaziale. Gli animali vengono posizionati in una bacinella d'acqua resa opaca da lattice o tempera non tossici, dove devono nuotare fino ad una piattaforma nascosta.^{[12][14]}

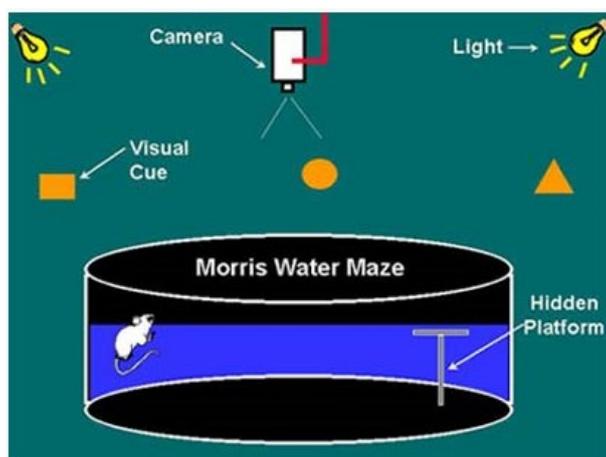


Figura 4. Rappresentazione schematica del labirinto d'acqua di Morris

Sono state rilevate delle differenze nella memoria spaziale a lungo termine, ma non a breve termine nei topi sottoposti a IMO. Tuttavia, non c'era alcuna differenza tra i gruppi durante l'allenamento in termini di tempo impiegato per raggiungere la piattaforma, questo indicava una motivazione e abilità sensomotorie intatte dopo l'IMO. [12]

I risultati del test della memoria a lungo termine (Figura 5) hanno mostrato che gli animali IMO trascorrevano meno tempo rispetto agli animali di controllo nell'area target della piattaforma. Viceversa, i topi sottoposti a IMO trascorrevano più tempo nella piattaforma opposta a quella target rispetto ai topi di controllo.

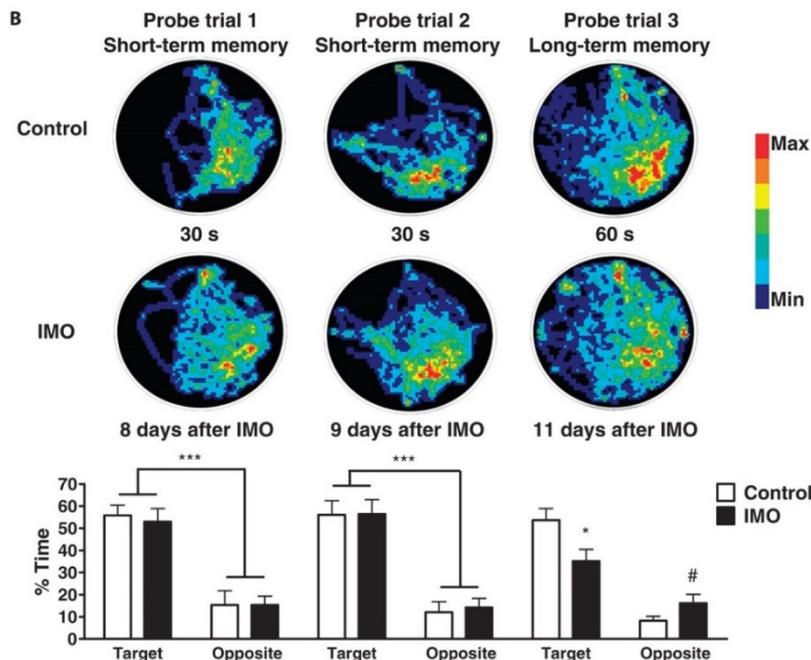


Figura 5. Nei test effettuati 8 e 9 giorni dopo l'IMO, non sono state riscontrate differenze con i gruppi di controllo per quello che riguarda la memoria a breve termine. Il giorno 11 i test sulla memoria a lungo termine hanno evidenziato che gli animali IMO trascorrevano meno tempo nell'area target rispetto ai controlli, e più tempo nell'area opposta.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che i topi, come i ratti, mostrano un comportamento simile all'ansia prolungato e un deficit nell'apprendimento spaziale dopo un singolo stress di immobilizzazione. [12]

Studio dell'estinzione della paura

Successivamente si voleva verificare se il precedente IMO alterasse anche l'estinzione della paura, un altro deficit osservato nei pazienti con disturbo da stress post-traumatico. I topi sono stati esposti per 2 ore all'immobilizzazione su una tavola di legno (IMO) 6 giorni prima del test in un labirinto più elevato o un test in campo aperto.

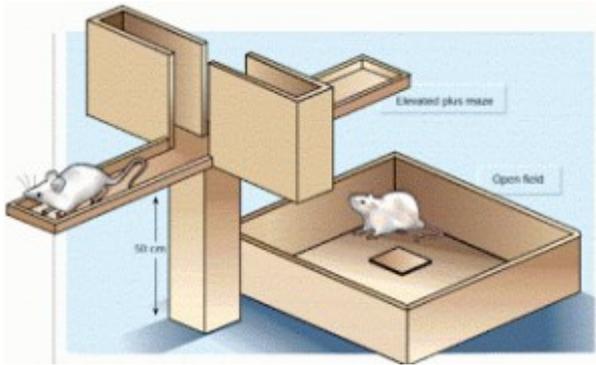


Figura 6. Rappresentazione schematica del labirinto elevato e del labirinto a campo aperto

Il labirinto elevato (Figura 6) ha una struttura a forma di croce con due braccia aperte e due braccia chiuse, ed è elevato dal pavimento. Questo compito sfrutta il conflitto tra la paura innata che i roditori hanno delle aree aperte rispetto al loro desiderio di esplorare nuovi ambienti. La sicurezza è fornita dalle braccia chiuse mentre le braccia aperte offrono valore esplorativo. Quando sono ansiosi, la tendenza naturale dei roditori è quella di preferire spazi chiusi e bui a spazi aperti e luminosi. In questo contesto, il comportamento correlato all'ansia è misurato dal grado in cui il roditore evita le braccia non chiuse del labirinto. ^[15]

Il campo aperto è un recinto, generalmente di forma quadrata (Figura 6), rettangolare o circolare con muri di cinta che impediscono la fuga. L'esito di interesse è il "movimento", questo può essere influenzato dalla potenza motoria, dalla spinta esplorativa, dal congelamento o da altri comportamenti legati alla paura ^[16].

I dati hanno mostrato che i topi trattati con IMO hanno mostrato una maggiore ansia sia nel labirinto più elevato che nel labirinto a campo aperto (Figura 7).

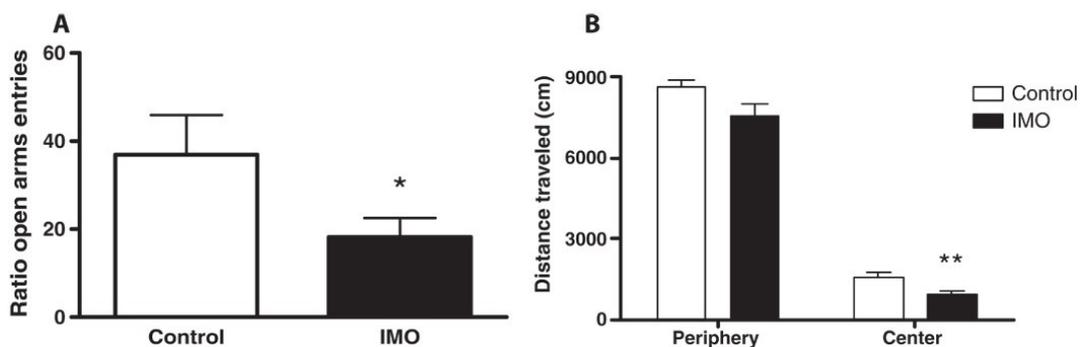


Figura 7.

(A) L'esposizione di cinque minuti nel labirinto più elevato ha rilevato che i topi IMO hanno mostrato un'ansia aumentata a lungo termine in base al rapporto tra il tempo trascorso nelle braccia aperte e quelle chiuse. ^[12]

(B) L'esposizione di 30 minuti a un campo aperto ha portato a topi che mostravano un'ansia maggiore quando è stato calcolato il tempo che i topi di controllo o IMO hanno trascorso al centro dell'apparato. ^[12]

4. Geni coinvolti nei meccanismi del PTSD

4.1 OPRL1

È stata studiata l'espressione di paura indotta in topi sottoposti a un singolo episodio precedente di IMO, a confronto con il gruppo di controllo, sottoposto invece alla manipolazione compensativa 6 giorni prima del condizionamento alla paura.^[12]

È stato utilizzato il condizionamento uditivo-paura dove lo stimolo condizionato era un tono (30 s, 6 kHz) che coterminava con uno stimolo incondizionato, che era un lieve shock elettrico (0,5 s, intensità 1-mA). I risultati suggeriscono che i topi IMO hanno difficoltà a discriminare tra periodi non pericolosi (intervallo tra le prove) e segnali di pericolo (stimolo condizionato). Questo è in accordo con un recente rapporto che mostra che i pazienti con disturbo da stress post-traumatico presentano una discriminazione alterata della sicurezza e segnali di pericolo.^[12]

Due ore dopo il test, il tessuto dell'amigdala è stato raccolto per eseguire analisi di microarray di mRNA. Un gene la cui espressione è stata rilevata con elevata specificità nell'amigdala rispetto ad altre aree del cervello era il gene del tipo recettore oppioide 1 (Oprl1).

Oprl1 è espresso nei topi nell'amigdala centrale, mentre la sua espressione in altre regioni dell'amigdala è relativamente bassa. Il gene Oprl1 codifica per il recettore della nociceptina (NOP-R), che è attivato dal peptide nociceptina (NOP).^[12]

L'analisi quantitativa della reazione a catena della polimerasi (qPCR) ha confermato il risultato del microarray: l'mRNA di Oprl1 è stato down-regolato dopo il test di condizionamento della paura e di espressione della paura negli animali di controllo ma non negli animali con precedente esposizione all'IMO. Inoltre, la down-regolazione dell'mRNA di Oprl1 si è verificata quando gli stimoli condizionati e incondizionati erano accoppiati ma non quando sono disaccoppiati. Le concentrazioni di mRNA di Oprl1 non cambiano dopo il condizionamento alla paura o il test di espressione della paura in gruppi di controllo o IMO. È stato ipotizzato che la disregolazione specifica dell'espressione del gene Oprl1 nell'amigdala dopo il condizionamento della paura e l'espressione della paura nei topi IMO possano spiegare parzialmente i meccanismi di alterazione nell'apprendimento della paura.^[12]

Gli stessi autori hanno inoltre esaminato se Oprl1 fosse coinvolto nel disturbo da stress post-traumatico e apprendimento della paura in una popolazione umana traumatizzata.

Metodi

È stata condotta un'analisi per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in una regione che copre 20 kb del locus Oprl1 (Figura 7), per un totale di cinque SNP,

verificando se ogni SNP fosse associato alla diagnosi di PTSD in un gruppo di soggetti altamente traumatizzati (n = 1847). Rispetto ai CC (individui non portatori), l'associazione genetica dei portatori dell'allele G per il rischio di disturbo da stress post-traumatico è aumentata con il grado di esposizione al trauma. [12] (Figura 8).

Questi risultati sembrano sostenere l'ipotesi che anche nell'uomo Orpl1 sia coinvolto nei processi di apprendimento della paura in soggetti con esperienze traumatiche.

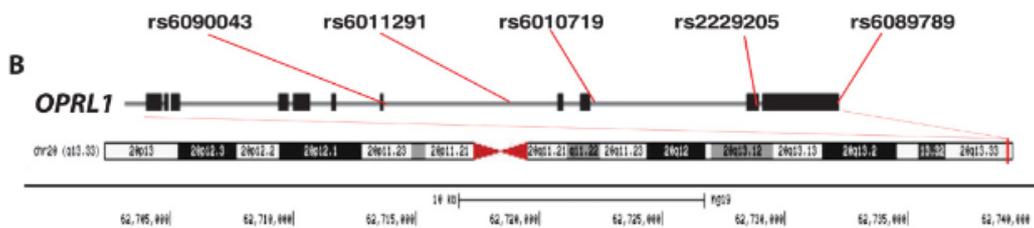


Figura 7. Posizione degli SNP all'interno del gene OPRL1 (intervallo medio inter-SNP di 3,5 kb) e posizione del gene sul cromosoma 20.

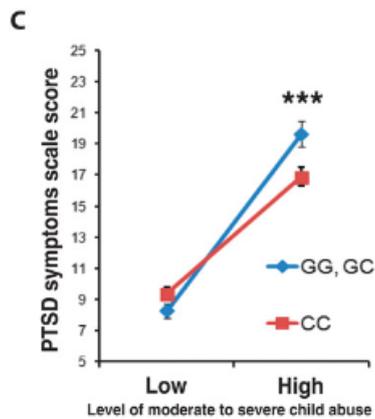


Figura 8. Interazioni specifiche dei portatori dell'allele G (GG, GC) rispetto ai portatori dell'allele CC del rs6010719 SNP in OPRL1, dimostrano che i portatori dell'allele G che hanno subito un trauma maggiore sono a maggior rischio di sintomi da stress post-traumatico [12]

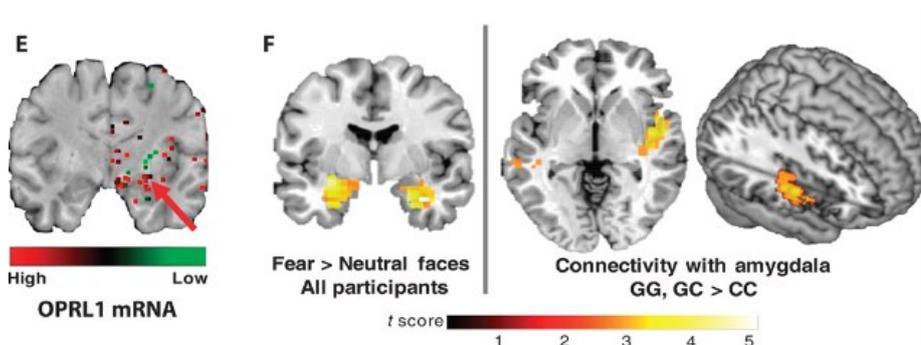


Figura 9. Risultati ottenuti con la fMRI (risonanza magnetica funzionale) applicata a donne traumatizzate a cui sono stati sottoposti stimoli facciali paurosi e neutri. La freccia indica l'amigdala centrale.

L'mRNA di OPRL1 è altamente espresso nell'amigdala centrale umana, in accordo con il pattern di espressione genica del topo. L'analisi degli effetti casuali all'interno del gruppo ha mostrato una maggiore attivazione bilaterale dell'amigdala in risposta a stimoli facciali timorosi rispetto a quelli neutri in tutti i partecipanti, indipendentemente dal genotipo. (Figura 9) ^[12]

Per stimoli facciali paurosi rispetto a quelli neutri, i portatori dell'allele G mostravano una maggiore connettività funzionale tra l'amigdala (regione del seme) e l'insula posteriore destra, rispetto ai soggetti CC. Una significativa interazione del genotipo e del tipo di stimolo condizionato ha indicato che i portatori dell'allele G non discriminavano sulla risposta FPS (spavento potenziato dalla paura) tra segnali di pericolo (+) e segnali di sicurezza (-) durante la paura tardiva condizionata. Al contrario, quelli con il genotipo CC mostravano un aumento della risposta FPS allo stimolo condizionato (+) rispetto allo stimolo condizionato (-). ^[12]

A livello molecolare, all'interno dell'amigdala, sono necessarie la regolazione genica e la sintesi proteica per il consolidamento della formazione della memoria della paura.

4.1 SLC6A4

Altri studi nell'uomo hanno dimostrato una correlazione tra la metilazione di SLC6A4 (gene codificante per un trasportatore della serotonina) e i sintomi del disturbo da stress post-traumatico a seguito di eventi traumatici. Gli individui soggetti a eventi più traumatici sono risultati ad aumentato rischio di PTSD, ma solo quando avevano livelli di metilazione più bassi nel locus SLC6A4. A livelli di metilazione più elevati, gli individui sottoposti a eventi più traumatici erano protetti dallo sviluppo di PTSD. Tali risultati sono molto interessanti in quanto suggeriscono che lo stato di metilazione di SLC6A4 interagisca con il numero di eventi traumatici per mediare il rischio di PTSD. (Figura 10).

Questi studi confermano il ruolo della regolazione serotoninergica nell'elaborazione emotiva che interagisce con il trauma e l'esposizione allo stress per aumentare il rischio (o la resilienza) dei sintomi correlati al disturbo da stress post-traumatico. ^[17]

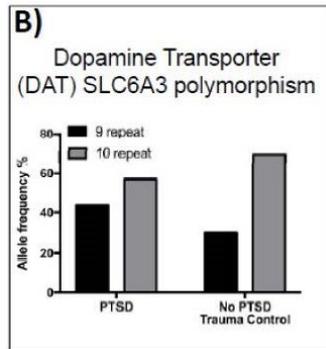


Figura 10. Il polimorfismo SLC6A3 del trasportatore della dopamina 9 e 10 ripetono (barre nere e grigie, rispettivamente) frequenze alleliche e genotipiche in individui con PTSD cronico e sopravvissuti al controllo del trauma senza PTSD. [17]

Si sono accumulate prove che meccanismi epigenetici come la metilazione del DNA sono coinvolti nella risposta allo stress traumatico e nel conseguente rischio di disturbo da stress post-traumatico.

In uno studio condotto su soldati che hanno ottenuto la remissione, pazienti con disturbo da stress post-traumatico non rimessi e un gruppo di controllo di militari esposti a traumi, sono stati studiati i cambiamenti longitudinali dei livelli di metilazione del DNA dell'intero genoma in relazione alla psicoterapia focalizzata sul trauma per il disturbo da stress post-traumatico.

Si è dimostrato che il recupero dal disturbo da stress post-traumatico dopo la psicoterapia correlata al trauma è accompagnato da specifici cambiamenti di metilazione del DNA. [18]

Nel complesso, i risultati supportano ed estendono studi precedenti che presentano cambiamenti della metilazione del DNA in geni specifici correlati a trattamenti psicologici per disturbi psichiatrici incluso PTSD.

5. Limiti degli studi epigenetici nel disturbo da stress post-traumatico e direzioni future

Un numero crescente di prove supporta un ruolo nella regolazione epigenetica del disturbo da stress post-traumatico. Sebbene questi risultati offrano una prospettiva stimolante per futuri lavori di ricerca, dovrebbero essere evidenziati diversi limiti degli studi epigenetici nel PTSD. Innanzitutto, la maggior parte degli studi fino ad oggi utilizza modelli animali o analisi del tessuto sanguigno umano. Questi studi sono limitati dalla specificità tissutale dei cambiamenti epigenetici e dall'incapacità di studiare il tessuto cerebrale negli esseri umani viventi.

Questa problematica può essere superata in una certa misura da approcci traslazionali che combinano dati provenienti da modelli animali, tessuto cerebrale umano post mortem e valutazioni negli esseri umani viventi. [19]

In secondo luogo, sebbene la regolazione epigenetica di alcuni siti genomici nel disturbo da stress post-traumatico sia stata confermata da numerosi studi, la replica dei risultati epigenetici esistenti è in gran parte carente e dovrebbe essere ricercata da studi futuri.

Inoltre, gli studi sull'epigenetica del disturbo da stress post-traumatico si sono finora concentrati sulla metilazione del DNA, ma sarebbe importante considerare l'intero spettro di modificazioni epigenetiche che sono state implicate nella patogenesi dei disturbi psichiatrici, comprese le modificazioni istoniche post-traduzionali, gli RNA non codificanti e le variazioni dimensionali nella conformazione della cromatina.

Infine, dovrebbero essere compiuti sforzi per identificare i cambiamenti epigenetici che mediano i risultati positivi dopo l'esposizione al trauma, come la crescita post-traumatica. Imitare questi cambiamenti per promuovere la resilienza al trauma sarebbe un effetto desiderabile delle strategie preventive per il disturbo da stress post-traumatico.^[19]

5.1 Conclusioni e possibili approcci terapeutici

Le scoperte in merito al ruolo del gene Oprl1 all'interno dell'amigdala lo identificano come necessario affinché si verifichi la normale formazione della memoria della paura. Questo apre la strada a un approccio terapeutico conveniente, sebbene non ancora realizzato, che comprenderebbe trattamenti precoci che potrebbero prevenire lo sviluppo di PTSD compromettendo il consolidamento della memoria della paura. Questo intervento precoce sarebbe particolarmente appropriato per gli individui a più alto rischio di PTSD dopo un trauma, come anche per soggetti con una storia di traumi precedenti o portatori di polimorfismi genetici associati al rischio di PTSD.^[12]

Attualmente non esistono trattamenti farmacologici preventivi approvati per il disturbo da stress post-traumatico. Bloccare il disturbo con un agonista del recettore oppioide sembra essere una strada possibile per questo tipo di trattamento.

Recenti dati pubblicati mostrano che l'attività degli oppioidi può bloccare il consolidamento dei ricordi della paura.^[12]

Alcune osservazioni cliniche suggeriscono che l'analgesia da oppiacei, fornita subito dopo il trauma, può ridurre lo sviluppo del disturbo da stress post-traumatico.

L'infusione sistemica di un agonista del recettore NOP altamente selettivo, o l'iniezione di questo nell'amigdala centrale dei topi porterebbe alla compromissione del consolidamento dei ricordi della paura. Inoltre, l'attivazione del recettore NOP codificato da Oprl1 può bloccare il consolidamento della

memoria della paura, con implicazioni per la prevenzione del PTSD dopo eventi traumatici. ^[12]

Negli esseri umani, questo può tradursi nella capacità di prevenire la probabilità di sviluppare PTSD a seguito di un trauma. In particolare, la morfina, un agonista principalmente del recettore oppioide, se somministrato entro 48 ore dal trauma, riduce il rischio di successivo sviluppo di PTSD negli studi osservazionali. ^[12]

L'agonismo selettivo di NOP-R negli esseri umani può imitare l'effetto benefico della morfina nel ridurre il consolidamento della memoria della paura senza effetti indesiderati degli oppioidi (ad esempio dipendenza, tolleranza, sintomi gastrointestinali e insufficienza respiratoria). ^[12]

Gli agonisti NOP-R possono essere candidati importanti per la prevenzione del PTSD, in particolare in un contesto di intervento precoce, poco dopo l'esposizione a esperienze traumatiche.

La speranza è che i trattamenti possano essere più facilmente tradotti in studi clinici arricchiti per gruppi di pazienti.

Inoltre, l'individuazione di specifici cambiamenti epigenetici legati al recupero del disturbo da stress post-traumatico potrebbe anche aiutare a svelarne l'eziologia e aprire strade a nuovi trattamenti e opportunità predittive. ^[20]

Bibliografia

- [1] EpiCentro, <https://www.epicentro.iss.it/stress/>
- [2] Jonathan E. Sherin, Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues clin neurosci.* 2011
- [3] Kelley, L. C. Canine PTSD: Its causes, signs and symptoms. Psychology Today. 2012
- [4] Perry, T. Military's dogs of war also suffer post-traumatic stress disorder. Chicago Tribune. 2012
- [5] Bioconus, <https://ita.bioconus.com/continued-distress-among-abandoned-dogs-fukushima-483874>
- [6] Stacy M. Lopresti-Goodman, Jocelyn Bezner, Chelsea Ritter, Psychological Distress in Chimpanzees Rescued From Laboratories, *Journal of Trauma & Dissociation* (2015)
- [7] Gal Richter-Levin, Oliver Stork, Mathias V. Schmidt Animal models of PTSD: a challenge to be met, *Molecular Psychiatry*, 2019
- [8] ilfogliopsichiatrico.it "Il trauma(PTSD) negli animali"
- [9] <http://www.psychiatryonline.it/> "Il corpo dissipa il trauma: alcune osservazioni dal lavoro di Peter A. Levine" 2019
- [10] igorvitale.org "condizionamento classico di Pavlov"
- [11] [Treccani.it](http://treccani.it) "neuroscienze, basi biologiche delle emozioni"
- [12] Raúl Andero, Shaun P. Brothers, Tanja Jovanovic, Amygdala-Dependent Fear Is Regulated by Oprl1 in Mice and Humans with PTSD, *Science Translational Medicine*, 2013

[13] A. Armario, R. M. Escorihuela, R. Nadal, Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1121–1135 (2008)

[14] Charles V Vorhees, Michael T Williams, Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols* , 2006

[15] Alicia A Walf¹, Cheryl A Frye The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2007

[16] Shannon HE “Open field test: a measure of anxiety” *conductscience.com* 2017

[17] Sunayana B.Banerjee, Filomene G.Morrisona, Kerry J.Ressler, Genetic approaches for the study of PTSD: Advances and challenges *Neuroscience letters*, 2017

[18] Christiaan H. Vinkers, Elbert Geuze, Sanne J. H. van Rooij, Successful treatment of post-traumatic stress disorder reverses DNA methylation marks, *Molecular Psychiatry*, 2015

[19] Anthony S. Zannas, Nadine Provençal, Elisabeth B. Binder, Epigenetics of Posttraumatic Stress Disorder: Current Evidence, Challenges, and Future Directions, *Biological Psychiatry*, 2015

[20] Jessica Deslauriers, Mate Toth, Andre Der-Avakian, Victoria B Risbrough, Current status of animal models of PTSD: behavioral and biological phenotypes, and future challenges in improving translation, *Biol Psychiatry* 2018