

Università di Pisa
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Tesi di Laurea Specialistica in Neurobiologia

Effetti dell'arricchimento ambientale materno
durante la gravidanza
sullo sviluppo della retina nel feto.

Candidata: Gaia Scabia.

Relatore: Dott.sa Maria Cristina Cenni.

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

A Roberto

Abstract.

Recently, experiments performed in our laboratories showed that postnatal environmental enrichment, a condition of increased physical exercise, social interactions and sensory stimulation, promotes the maturation of the visual cortex and accelerates the postnatal development of the retina. Much less is known about the influence of the environment on the development of central nervous system during prenatal life. The only available evidence concerns the deleterious effects elicited by prenatal stress on the embryonic development while the possibility that maternal exposure to conditions of increased sociality and sensory-motor activity could influence the embryonic development remains unexplored. Here we investigated the influence of prenatal enrichment on the early development of the visual system in the fetus. We studied the anatomical development of the rat retina, by analyzing the migration of neural progenitors and the process of retinal ganglion cell death, which exerts a key role in sculpturing the developing retinal system at perinatal ages. The number of apoptotic cells in the retinal ganglion cells layer was analyzed using two distinct methods: the presence of pyknotic nuclei stained for cresyl violet and the appearance of DNA fragmentation (Tunel method). We report that environmental enrichment of the mother during pregnancy affects the structural maturation of the retina, accelerating the migration of neural progenitors and the dynamics of natural cell death. These effects seem to be under the control of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I): its levels, higher in enriched pregnant rats and in their milk, are increased also in their offspring, its neutralization abolishes the action of maternal enrichment on retinal development and chronic Insulin-like Growth Factor-I injections to standard-reared females mimics the effects of enrichment in the fetuses. Thus, the development of the visual system is sensitive to environmental stimulation during prenatal life. These findings could have a bearing in orienting clinical research in the field of prenatal therapy.

Key words: prenatal enrichment, retinal development, apoptosis, neural migration, Insulin-like growth factor-I.

Riassunto.

Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'arricchimento ambientale postnatale, una condizione caratterizzata da intenso esercizio fisico volontario, possibilità di instaurare nuove relazioni sociali ed elevata stimolazione sensoriale, è capace di promuovere la maturazione della corteccia visiva e di accelerare lo sviluppo postnatale della retina. Sappiamo molto meno per quanto riguarda l'influenza dell'ambiente sullo sviluppo prenatale. I soli dati disponibili riguardano gli effetti deleteri dello stress prenatale sullo sviluppo embrionale, mentre la possibilità che l'esposizione della madre a condizioni di ottimizzazione ambientale possa influenzare lo sviluppo fetale rimane inesplorata. La presente ricerca intende pertanto indagare l'influenza dell'arricchimento prenatale sullo sviluppo del sistema visivo del feto. Abbiamo studiato lo sviluppo anatomico della retina di ratto attraverso l'analisi della migrazione dei progenitori neurali e del processo di morte naturale delle cellule gangliari retiniche, processi che esercitano un ruolo chiave nel costruire la citoarchitettura retinica durante le fasi precoci dello sviluppo. Il numero di cellule apoptotiche nello strato delle cellule gangliari è stato analizzato usando due diversi metodi: la presenza di nuclei picnotici evidenziati con il cresilvioletto e la comparsa di DNA frammentato (metodo del TUNEL).

Abbiamo osservato che l'arricchimento ambientale della madre durante la gravidanza influenza la maturazione strutturale della retina, anticipando la migrazione dei progenitori neurali e accelerando le dinamiche di morte cellulare programmata. Questi effetti sembrano essere sotto il controllo del fattore di crescita Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I). Infatti i livelli di questo fattore di crescita, più alti nelle ratte gravide arricchite e nel loro latte, sono aumentati anche nella loro prole. Inoltre la neutralizzazione di IGF-I previene gli effetti dell'arricchimento materno sullo sviluppo retinico e la sua somministrazione alle madri non arricchite mima gli effetti dell'arricchimento sui feti.

I nostri risultati dimostrano che lo sviluppo del sistema nervoso retinico è sensibile alla stimolazione ambientale durante la vita prenatale e suggeriscono che gli effetti dell'ambiente sullo sviluppo fetale siano mediati dalla madre attraverso il controllo dei

livelli di IGF-I. Questi risultati possono essere rilevanti nell'orientare la ricerca clinica nel campo delle terapie prenatali.

Parole chiave: arricchimento prenatale, sviluppo retinico, apoptosi, migrazione neurale, Insulin-like growth factor-I.

INDICE

INTRODUZIONE.

Il sistema visivo. _____ 2

L'obiettivo di questo studio: la retina. _____ 4

Architettura della retina matura. _____ 4

I fotorecettori.

Le cellule bipolari.

Le cellule orizzontali.

Le cellule amacrine.

Le cellule gangliari.

La retina e il suo sviluppo. _____ 10

Interazione geni-ambiente nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso. _____ 14

L'arricchimento ambientale (EE). _____ 17

Definizione e caratteristiche del protocollo sperimentale.

L'EE influenza il cervello e il comportamento di animali adulti. _____ 21

Variazioni a livello anatomico.

Variazioni a livello molecolare.

Variazioni a livello comportamentale.

L'EE postnatale influenza lo sviluppo del sistema visivo. _____ 24

Arricchimento ambientale precoce e sviluppo della corteccia visiva.

Arricchimento ambientale precoce e sviluppo della retina.

Arricchimento ambientale precoce e cure materne.

EE prenatale e sviluppo del sistema nervoso centrale. _____ 36

IGF-I : un fattore importante per lo sviluppo del sistema nervoso.

Arricchimento ambientale e stress prenatale.

Arricchimento ambientale prenatale e sviluppo retinico.

L'arricchimento ambientale materno accelera le dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs nella retina della prole.

I livelli di espressione di IGF-I aumentano nelle madri allevate in arricchimento ambientale durante la gravidanza e nei loro piccoli.

L'influenza dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo fetale non è ristretta solo alla retina.

SCOPO DELLA TESI.

MATERIALI E METODI.

Trattamento degli animali.	63
Condizioni di allevamento.	63
<i>Condizione arricchita (EC).</i>	
<i>Condizione standard (SC).</i>	
Istologia.	66
Immunoistochimica.	66
Analisi dell'intensità della marcatura per DCX e IGF-I, e conta delle cellule marcate per DCX, Islet-1 e calbindin.	67
Stima del numero dei nuclei picnotici.	68
Infusioni croniche di anticorpo anti-IGF-I e proteina IGF-I eseguite su femmine gravide.	68

RISULTATI.

L'arricchimento ambientale materno accelera la migrazione dei progenitori neurali in differenziamento nella retina del feto.	69
Le cellule che mostrano un'accelerazione della migrazione appartengono alla popolazione delle RGCs.	73
Gli effetti dell'arricchimento materno sullo sviluppo retinico dipendono dall'espressione di più alti livelli di IGF-I.	77

DISCUSSIONE.

Lo sviluppo della retina è sensibile alla stimolazione ambientale prenatale.	83
IGF-I ha un ruolo chiave negli effetti dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo retinico.	84
Passaggio di IGF-I dalla madre al feto.	85
Osservazioni finali.	86

RINGRAZIAMENTI.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUZIONE.

Studi condotti nel Laboratorio di Neurobiologia della Scuola Normale Superiore, guidato dal Prof. Maffei, hanno dimostrato che l'arricchimento ambientale dalla nascita è capace di accelerare lo sviluppo del sistema visivo nei roditori. Tale effetto di accelerazione è stato ritrovato a livello anatomico, con una precoce apertura degli occhi, a livello funzionale, con una precoce maturazione dell'acuità visiva e a livello molecolare, con accresciuti livelli di fattori neurotrofici in corteccia visiva e una precoce attivazione di cascate molecolari (Cancedda et al., 2004).

Alcuni degli effetti osservati erano così precoci da indurre ad ipotizzare che potessero essere mediati da differenti livelli di cure materne ricevute dai piccoli nelle due situazioni confrontate (standard e arricchita). Lo studio del comportamento materno ha confermato che i piccoli arricchiti ricevono più alti livelli di cure materne (Sale et al., 2004).

Poiché il controllo materno dello sviluppo del piccolo si esercita tramite la mediazione di fattori ormonali e trofici, era possibile che anche stazioni nervose periferiche, come la retina, fossero coinvolte in questi effetti di modificazione dello sviluppo indotti dall'arricchimento. Uno studio recente, effettuato da Maffei e collaboratori, ha trovato un accelerato sviluppo funzionale della retina al pari del resto del sistema visivo sotto l'influenza dell'EE, dimostrando che anche la retina risponde da un punto di vista funzionale all'ambiente (Landi et al., 2007).

Queste ricerche hanno dimostrato, quindi, che una complessa stimolazione sensoriale e motoria quale quella derivante dalla vita in un ambiente arricchito è capace di influenzare profondamente gli eventi di sviluppo del sistema nervoso, con due possibili fasi che si susseguono tra loro: una più precoce mediata dalle madri, ed una più tardiva in cui i piccoli, divenuti soggetti attivi dell'ambiente, interagiscono in maniera diretta con le accresciute opportunità di stimolazione che l'arricchimento offre loro.

La presente ricerca, nel cui ambito si inserisce il lavoro da me svolto, intende approfondire l'indagine sui meccanismi cellulari e molecolari influenzati dal controllo materno in condizioni di arricchimento ambientale, utilizzando come modello lo sviluppo retinico. La

maturazione dell'architettura retinica è un modello particolarmente adatto per un'indagine sugli effetti materni sui meccanismi di sviluppo, perché avviene in una fase molto precoce dello sviluppo del piccolo, segue un andamento temporale già sufficientemente noto nelle sue dinamiche generali e si realizza tramite meccanismi molecolari che sono influenzati dall'ambiente. Inoltre è stato recentemente dimostrato che anche la retina, classicamente considerata una struttura poco plastica, risponde ad una stimolazione ambientale potenziata (Landi et al., 2007).

Lo scopo della mia tesi è quello di studiare l'influenza dell'arricchimento ambientale effettuati nel periodo prenatale, allevando cioè in condizioni arricchite femmine di ratto gravide a partire dal primo giorno di gestazione, sullo sviluppo della retina del feto. Lo studio prevede di investigare anche i fattori molecolari coinvolti, rivolgendo particolare attenzione all'Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), che è considerato un forte modulatore della crescita fetale e postnatale e capace di regolare gli stadi precoci dello sviluppo neurale.

Il sistema visivo.

Nel sistema visivo dei Mammiferi le informazioni vengono elaborate a livello della retina e vengono inviate a differenti strutture cerebrali, localizzate nel mesencefalo e nel talamo, attraverso gli assoni delle cellule retiniche gangliari (RGCs), che formano il nervo ottico.

Nei Roditori la maggioranza delle RGCs proietta al collicolo superiore (SC), e il 30% circa di queste manda collaterali al nucleo genicolato laterale dorsale del talamo (dLGN), che è la più importante stazione sottocorticale. Le RGCs di ogni occhio inviano assoni ad entrambi gli emitalami, ma la maggior parte delle afferenze del dLGN derivano dall'occhio controlaterale (solo il 5-10% degli assoni gangliari proietta ipsilateralmente). All'interno del dLGN gli assoni delle RGCs non si mescolano tra loro: nei gatti, nei furetti e nei Primati terminano in strati alternati occhio-specifici, strettamente monoculari (Hickley e Guillery, 1974). Nei Roditori, invece, non si ha una vera e propria laminazione del dLGN, ma le fibre retiniche controlaterali e ipsilaterali sono comunque segregate, anche se in modo non uniforme, e danno origine a due territori occhio-specifici: il nucleo interno, ipsilaterale, e il guscio esterno, controlaterale (Reese e Jeffery, 1983; Reese, 1988).

Dal dLGN, poi, le informazioni visive sono trasmesse alla corteccia visiva attraverso le connessioni talamo-corticali che terminano nello strato IV della corteccia visiva primaria (V1), per poi passare alle aree visive successive o a stazioni sottocorticali. La corteccia visiva primaria è organizzata in moduli funzionali: i neuroni hanno un'organizzazione colonnare e interi gruppi di colonne vanno a costituire tali moduli, ciascuno dei quali è deputato all'elaborazione di informazioni provenienti da zone specifiche del campo visivo. Sono state identificate le *colonne di orientamento*, formate da cellule il cui campo recettivo ha l'asse di orientamento pressoché identico, i *blob*, formazioni cellulari approssimativamente cilindriche localizzate negli strati II e III, e le *colonne di dominanza oculare*, disposizioni ordinate di cellule che ricevono afferenze solo dall'occhio destro o da quello sinistro oppure da entrambi, e che rivestono grande importanza per le interazioni binoculari.

Tali sistemi, orientati in senso verticale, comunicano tra loro per mezzo di connessioni orizzontali che si stabiliscono tra cellule dello stesso strato.

Hubel e Wiesel hanno coniato il termine di *ipercolonna* per indicare un intero gruppo di colonne dedicato all'analisi di linee aventi ogni possibile orientamento e provenienti da singole zone dello spazio; ciascun modulo di elaborazione è come una finestra aperta sul campo visivo, e all'interno di ognuno vengono analizzate tutte le informazioni provenienti da quella porzione di campo visivo (Kandel et al., 2000).

Anche nei Roditori tale organizzazione strutturale e funzionale della corteccia visiva primaria è presente, sebbene ad uno stadio primitivo; Thurlow e Cooper (1988) hanno osservato un accenno di organizzazione irregolare delle afferenze controlaterali e ipsilaterali nella corteccia visiva del ratto, usando un marcatore funzionale (deossiglucosio), e questo risultato è stato recentemente confermato da registrazioni elettrofisiologiche (Caleo et al., 1999).

L'obiettivo di questo studio: la retina.

Architettura della retina matura.

Diversamente dalle altre strutture sensoriali, la retina non è un organo periferico ma è parte del sistema nervoso centrale (SNC), e la sua organizzazione sinaptica è simile a quella di altre strutture neurali centrali.

La cornea e la lente (il cristallino) focalizzano la luce sullo strato dei fotorecettori. La retina si trova a contatto con l'epitelio pigmentato, che circonda la parte posteriore dell'occhio. Le cellule dell'epitelio pigmentato contengono melanina, un pigmento scuro che assorbe la luce in eccesso, non captata dai fotorecettori, impedendo così processi di riflessione dal retro dell'occhio alla retina che disturberebbero la visione delle immagini. Perché la luce possa raggiungere i fotorecettori senza essere assorbita o scomposta, gli assoni dei neuroni negli strati prossimali della retina non sono mielinizzati; in questo modo tali strati di cellule risultano relativamente trasparenti. Inoltre i corpi cellulari dei neuroni retinici prossimali situati all'interno di una regione specializzata della retina, la fovea, sono spostati lateralmente in modo da permettere ai fotorecettori di questa regione di ricevere l'immagine visiva in modo meno distorto possibile. Tale spostamento laterale è maggiormente pronunciato nella foveola, la zona al centro della fovea. La fovea non è presente nella retina dei Roditori.

La retina dei Mammiferi contiene una grande varietà di tipi cellulari (circa 55), ognuno con differenti funzioni. I principali tipi cellulari sono rappresentati dai fotorecettori (coni e bastoncelli), dalle cellule orizzontali, dalle cellule bipolari, dalle cellule amacrine, dalle cellule gangliari e dalle cellule della glia di Müller.

In sezione trasversale è possibile apprezzare l'alternanza tra strati nucleari, costituiti dai corpi cellulari dei vari tipi di neuroni, e strati plessiformi, costituiti dai processi cellulari tramite i quali le cellule stabiliscono tra loro le connessioni sinaptiche.

Procedendo dall'epitelio pigmentato verso il cristallino è possibile distinguere, nell'ordine: lo strato nucleare esterno (ONL -outer nuclear layer-), che contiene i corpi cellulari dei fotorecettori, lo strato plessiforme esterno (OPL -outer plexiform layer-), contenente gli

assoni dei coni e dei bastoncelli e i dendriti delle cellule orizzontali e bipolari, lo strato nucleare interno (INL -inner nuclear layer-), con i corpi cellulari delle cellule orizzontali, bipolari, amacrine e di Müller, lo strato plessiforme interno (IPL -inner plexiform layer-), dove si trovano gli assoni delle cellule bipolari e amacrine, e i dendriti delle cellule gangliari, e infine lo strato delle cellule gangliari (GCL -ganglion cell layer-), che contiene il soma delle cellule gangliari e delle cellule amacrine *displaced* (Figura 1.1).

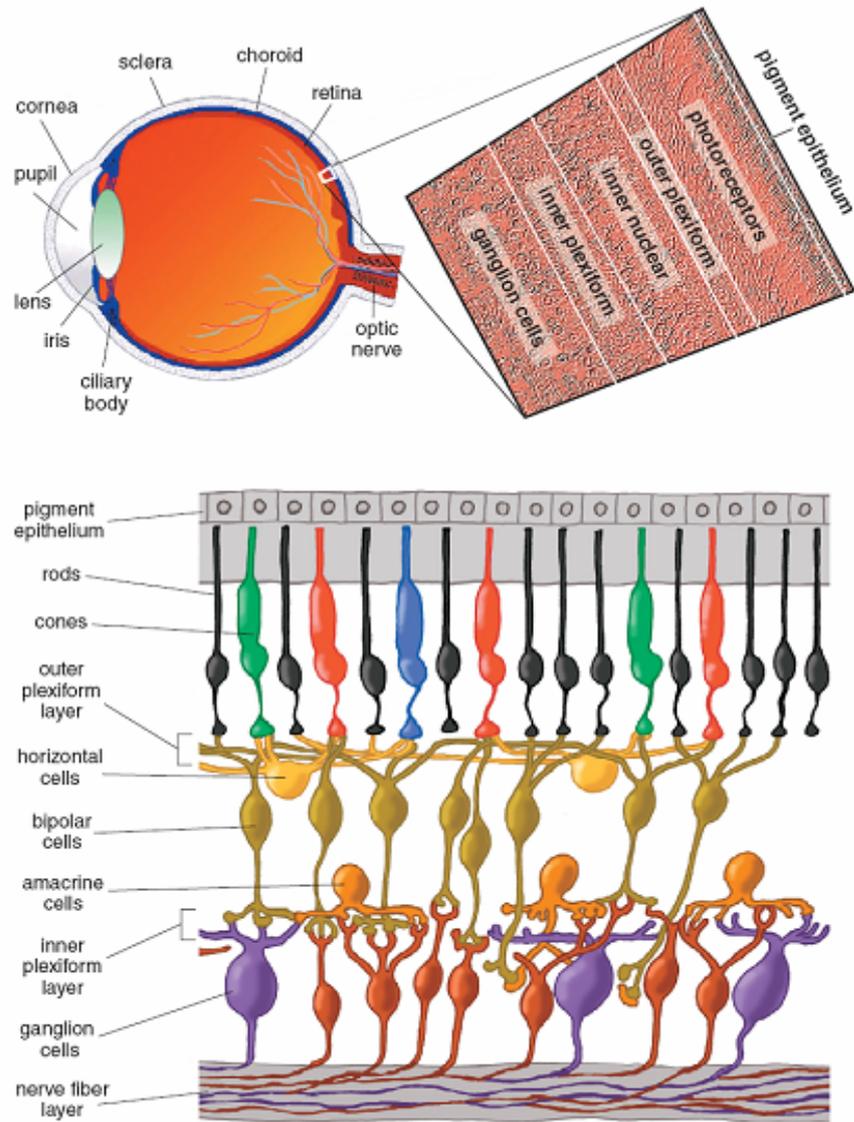


Figura 1.1: posizione anatomica e architettura della retina matura. Tratta dal sito internet <http://americanscientists.org>.

I fotorecettori.

I fotorecettori rappresentano la porzione recettrice della retina. Lo stimolo luminoso dai fotorecettori raggiunge le cellule bipolari che lo inviano alle cellule gangliari.

Nei Roditori il numero dei bastoncelli è molto più grande di quello dei con; in particolare nei topi i con sono il 3% circa di tutti i fotorecettori. In una tipica retina di Mammifero ci sono dai 9 agli 11 tipi di cellule bipolari connesse con i con, a formare pathways che vanno dalla retina esterna a quella interna. Ognuno di questi è responsabile di un differente tipo di informazione.

L'output dei con è separato in segnali ON e OFF. Tutte le sinapsi dei con rilasciano glutammato come neurotrasmettitore, ma tipi diversi di cellule bipolari rispondono al glutammato in modo diverso. Alcune cellule bipolari hanno recettori per il glutammato ionotropici: il glutammato fa aprire un canale cationico, e la cellula si depolarizza. Altre cellule bipolari hanno sinapsi a segno invertito, mediate da recettori per il glutammato metabotropici; queste cellule bipolari si iperpolarizzano in risposta al glutammato (Nawi et al., 1991). I due tipi di cellule sono presenti in numero approssimativamente uguale.

I fotorecettori si iperpolarizzano a seguito dell'assorbimento della luce, e le loro sinapsi rilasciano una minor quantità di glutammato. Quando la retina viene stimolata dalla luce un tipo di cellule bipolari si depolarizza, mentre l'altro tipo si iperpolarizza. Questa distinzione, creata alla prima sinapsi retinica, si propaga all'interno dell'intero sistema visivo.

Le cellule bipolari.

Le cellule bipolari prendono contatto da una parte con i fotorecettori, mentre dalla parte opposta inviano l'assone negli strati sottostanti.

Le classi di cellule bipolari ON e OFF sono ulteriormente suddivise; ci sono infatti da tre a cinque tipi diversi di bipolari ON e da tre a cinque tipi diversi di bipolari OFF, il cui scopo è quello di separare i canali per le informazioni ad alta e a bassa frequenza (Kaneko et al., 1970; Awatramani et al., 2000). Questa distinzione è dovuta alla presenza di diversi recettori per il glutammato che recuperano dalla desensitizzazione velocemente per le

informazioni ad alta frequenza e più lentamente per quelle a bassa frequenza (DeVries et al., 2000).

Non esistono tuttavia coni che forniscono input esclusivamente all'una o all'altra classe di cellule bipolari, ma ogni cono è connesso con più cellule bipolari a formare molti canali paralleli, ognuno dei quali comunica una versione diversa della stessa informazione alla retina interna.

La maggior parte delle cellule amacrine e gangliari riceve sinapsi da cellule bipolari connesse ai coni, ma la retina funziona in diverse condizioni di illuminazione, e questo grazie alla spartizione del lavoro tra i coni (per la luce piena) e i bastoncelli (per la luce debole). I segnali che originano dai bastoncelli raggiungono le cellule gangliari (RGCs) attraverso una via indiretta, il cui percorso finale è rappresentato dai terminali assonici delle cellule bipolari connesse ai coni (Famiglietti e Kolb, 1975; Strettoi et al., 1990 e 1992). Esiste un unico tipo di bastoncelli e un unico tipo di cellule bipolari associate con questi. Le cellule bipolari dei bastoncelli sinaptano con cellule amacrine specializzate, dette AII, che poi trasmettono le informazioni alle cellule gangliari. Questo avviene attraverso sinapsi delle AII sui terminali assonici delle cellule bipolari dei coni, che poi eccitano le cellule gangliari. La circuiteria associata ai bastoncelli è più semplice di quella dei coni: più bastoncelli convergono su una singola cellula bipolare, e questo comporta un guadagno in acuità visiva a scapito di sensibilità.; poiché i bastoncelli si sono evoluti più tardi rispetto ai coni, è probabile che la circuiteria dei bastoncelli si sia formata sulla base di quella, già presente, dei coni, e questo spiegherebbe l'azione indiretta dei bastoncelli sulle cellule gangliari.

Le cellule orizzontali.

Le cellule orizzontali sono deputate a trasportare l'impulso in senso orizzontale, permettendo così una prima integrazione delle informazioni provenienti da unità recettoriali differenti.

Tutti i coni e i bastoncelli ricevono afferenze da parte delle cellule orizzontali, ma queste cellule rappresentano una piccola proporzione degli interneuroni della retina a livello numerico (meno del 5% delle cellule presenti nello strato nucleare interno) (Jeon et al.,

1998). Nella maggior parte dei Mammiferi sono presenti due tipi di cellule orizzontali, mentre nei Roditori ce n'è soltanto uno.

Si pensa che le cellule orizzontali servano per aumentare il contrasto tra zone adiacenti di luce e buio e per adattare la risposta del sistema al livello generale di illuminazione. L'eccitazione di un cono al centro della zona in questione causa un'inibizione a feedback del cono eccitato e di un anello di coni attorno a questo. Dato che ogni cono, sia esso quello centrale o uno di quelli vicini, trasmette un segnale alla retina interna, il risultato è che un piccolo stimolo eccita quelle RGCs che si trovano direttamente in corrispondenza della zona stimolata, ma inibisce le RGCs vicine. Questa è la classica organizzazione "centro-periferia", nella quale una RGCs viene eccitata o inibita da uno stimolo che cade nel centro del suo campo recettivo, mentre ha un effetto opposto se cade nella periferia.

Le cellule amacrine.

Le cellule amacrine, come le cellule orizzontali, sono neuroni associativi. Tutte le RGCs ricevono input dalle cellule bipolari dei coni, ma la maggior parte delle sinapsi sono indirette, tra le RGCs e le cellule amacrine (Freed et al., 1988; Calkins et al., 1994). Le cellule amacrine formano anche sinapsi inibitorie con i terminali assonici delle cellule bipolari, controllando in questo modo il loro output verso le RGCs. A differenza delle cellule orizzontali, che hanno un unico compito di carattere generale, le cellule amacrine svolgono una serie di funzioni che vanno dal modellare al controllare la risposta delle RGCs. Differenti cellule amacrine hanno partner pre e postsinaptici diversi, contengono vari neurotrasmettitori, controllano zone sia ristrette che ampie del campo visivo, formano arborizzazioni sia all'interno di un solo strato che tra diversi strati. Le specifiche molecole che esprimono e la loro morfologia rispecchiano funzioni diverse.

Le cellule amacrine dopaminergiche adattano le risposte della retina alle condizioni di luce intensa o debole (Hampson et al., 1992), potenziano la risposta dei recettori ionotropici per il glutammato situati sulle cellule bipolari e influenzano l'equilibrio centro-periferia delle RGCs.

Le cellule amacrine "starburst" sembrano essere strettamente associate con un particolare circuito computazionale; formano arborizzazioni in sottili lamine (2-4 mm) all'interno dell'IPL, dove formano sinapsi colinergiche con specifiche RGCs, quelle particolarmente

sensibili al movimento. Queste cellule, attraverso un'azione eccitatoria/inibitoria (rilasciano sia acetilcolina che GABA), sono importanti per la selettività rispetto alla direzione (Masland, 2001).

Le cellule gangliari.

Le RGCs elaborano e convogliano le informazioni dalla retina ai centri visivi del cervello. Questi neuroni comprendono diverse popolazioni con struttura e funzioni diverse (Sernagor et al., 2001).

La morfologia delle RGCs è varia. Il loro soma e le loro arborizzazioni dendritiche hanno dimensione variabile e anche l'architettura dei dendriti (Cajal, 1893; Wassle e Boycott, 1991; Rodieck, 1993) e il pattern delle proiezioni assoniche (Garraghty e Sur, 1993; Yamagata e Sanes, 1995a e b) sono diversi.

A livello funzionale le RGCs hanno risposte diverse alla luce (per una review, vedi Wassle e Boycott, 1991; Rodieck, 1998; Dacey, 1999). La loro risposta può essere transiente o sostenuta, veloce o lenta, tonica o fasica. Alcune RGCs sono buoni rilevatori di movimento, mentre altre hanno una direzione preferita di movimento dello stimolo, altre ancora sono sensibili all'orientamento dello stimolo ma non alla sua direzione. Inoltre le RGCs mostrano una diversa sensibilità al contrasto e una diversa acuità visiva. Alcuni studi elettrofisiologici hanno rivelato l'esistenza di una stretta correlazione tra la morfologia e la funzione di queste cellule nei Vertebrati (Saito, 1983; Stanford e Sherman, 1984; Amthor et al., 1984, 1989a e b; Dacey, 1999).

Studi sulla struttura e la funzione delle RGCs condotti su varie specie hanno permesso di identificare diverse sottoclassi di queste cellule.

Nella retina dei Primati si distinguono due classi funzionali di RGCs: le M (per *magno*, grandi), e le P (per *parvo*, piccole). Ognuna di queste classi include sia cellule centro-ON che cellule centro-OFF. Le RGCs M hanno grandi campi recettivi e grandi alberi dendritici, e rispondono in modo transiente all'illuminazione sostenuta. Rispondono in modo ottimale ad oggetti di grandi dimensioni e seguono bene rapidi cambiamenti dello stimolo. Le RGCs P, invece, le più numerose, hanno campi recettivi piccoli, rispondono in modo specifico a certe lunghezze d'onda e sono coinvolte nella percezione della forma e del colore. Le cellule P sono ritenute le responsabili della percezione dei dettagli fini presenti

nell'immagine visiva, sebbene anche alcune M possano essere coinvolte in questa funzione.

Nella retina del gatto, quella maggiormente studiata, sono state identificate le RGCs beta e le RGCs alfa. In generale, le sottoclassi di RGCs, comprese le alfa e beta del gatto, possono essere ulteriormente suddivise in cellule che si depolarizzano (RGCs ON) o iperpolarizzano (RGCs OFF) alla luce. Ogni sottotipo mostra alcune caratteristiche tipiche: (i) il loro pattern di arborizzazione e la dimensione dell'albero dendritico sono simili in ogni data posizione all'interno della retina; (ii) i loro campi dendritici si sovrappongono, formando un mosaico che ricopre l'intera superficie della retina (Wassle et al., 1983; Cook e Chalupa, 2000); (iii) ricevono lo stesso complesso di input presinaptici; (iv) proiettano alle stesse regioni situate nell'ambito dei target cerebrali.

Tuttavia non tutte le diverse sottoclassi individuate in una specie sono presenti anche in tutte le altre. In tutte le specie studiate fin ora, comunque, l'IPL, lo strato all'interno del quale le RGCs formano le connessioni intraretiniche, è organizzato in due sublamine distinte a livello anatomico e funzionale. Indipendentemente dalla sottoclasse, gli alberi dendritici delle RGCs ON stratificano nella regione interna dell'IPL, la sublamina b, mentre quelli delle RGCs OFF lo fanno nella parte esterna dell'IPL, la sublamina a (Famiglietti e Kolb, 1976; Nelson et al., 1978). Le cellule con l'albero dendritico in entrambe le sublamine hanno risposte ON e OFF.

La retina e il suo sviluppo.

L'occhio come organo bilaterale deriva da un singolo campo morfogenetico localizzato nella piastra neurale anteriore. Il singolo campo dell'occhio viene separato in due regioni dalla migrazione di precursori neurali diencefalici. In seguito eventi di proliferazione ed evaginazione danno luogo alle due vescicole ottiche. Queste si invaginano a formare due coppe ottiche, da cui prenderanno origine i peduncoli ottici, la retina neurale e l'epitelio pigmentato della retina.

Nella retina il differenziamento cellulare, a partire da precursori retinici, inizia nello strato interno della porzione centrale della coppa ottica, e prosegue con andamento concentrico verso la periferia della retina (Isenmann et al., 2003).

I neuroni sembrano essere generati secondo la stessa sequenza temporale in tutte le specie analizzate fin ora: RGCs, cellule amacrine, cellule orizzontali e coni, cellule bipolari, bastoncelli e cellule di Müller. I progenitori neurali sono situati sulla superficie del tubo neurale, che diverrà la zona ventricolare delle vescicole ottiche, delle coppe ottiche e della retina in sviluppo. Le cellule postmitotiche lasciano la zona ventricolare e migrano in uno dei tre strati cellulari della retina, ma rimangono connesse da un lato all'altro della retina in senso radiale. Non appena raggiungono la posizione corretta, perdono le loro connessioni radiali ed iniziano ad acquisire una polarità formando le proiezioni assoniche e dendritiche (Figura 1.2).

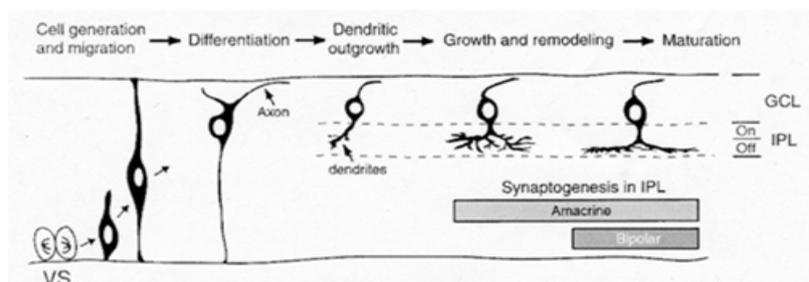


Figura 1.2: rappresentazione schematica dei principali stadi di sviluppo delle cellule gangliari retiniche. Riadattata da Sernagor et al.(2001).

Studi ultrastrutturali (Olney, 1968; Fisher, 1979a; Blanks et al., 1974) suggeriscono che la formazione di sinapsi tra le principali classi di neuroni retinici avviene seguendo tre tappe. Le RGCs e le cellule amacrine sono i primi tipi di cellule che si differenziano e formano i primi circuiti funzionali della retina in sviluppo, nell'IPL. Subito dopo si differenziano le cellule orizzontali e i coni, e prendono contatto tra loro, formando l'OPL. Le connessioni verticali tra la retina interna e quella esterna si completano una volta che le cellule bipolari si differenziano e prendono contatto con le RGCs.

Questo modello di formazione delle sinapsi è comune a tutte le specie, sebbene l'intervallo tra la formazione dei circuiti della retina esterna ed interna vari da specie a specie (da poche ore nello zebrafish a diversi giorni e settimane nei Mammiferi).

Le cellule di Müller, importanti per la formazione del nervo ottico e per l'organizzazione degli strati plessiforme e nucleare, vengono generate in due ondate di propagazione. Dopo la citogenesi nella zona ventricolare, la proliferazione cellulare continua nella zona subventricolare.

Un processo fondamentale nello sviluppo della retina è la morte cellulare programmata (apoptosi), un processo attivo che spesso necessita di sintesi proteica; per esempio le cellule gangliari, popolazione sulla quale si è principalmente focalizzato lo studio di questo processo, vengono ridotte nei Roditori del 54-74% durante lo sviluppo (Dreher e Robinson, 1988). Il periodo in cui avviene il fenomeno apoptotico coincide con quello in cui ha luogo la formazione delle sinapsi. Questo ha suggerito che la morte per apoptosi possa contribuire alla formazione dei circuiti. In particolare è stato ipotizzato che l'apoptosi possa avere un ruolo nel controllo del corretto numero di popolazioni neuronali interconnesse tra loro, nel rifinire le connessioni sinaptiche ed eliminare le proiezioni topograficamente non corrette e nel controllare la densità cellulare, portando così alla formazione dell'architettura neurale propria dell'adulto (per una review, vedi Cellerino et al., 2000).

Fino a pochi anni fa si pensava che la funzionalità retinica fosse matura al momento dell'apertura degli occhi (Tian et al., 2001). Infatti la maggior parte dei sistemi morfologici e neurochimici della retina, come il numero di cellule, il numero di sinapsi, l'espressione di trasportatori e di recettori per i neurotrasmettitori, raggiungono i livelli tipici dell'adulto proprio in corrispondenza dell'età in cui si osserva l'apertura degli occhi

(Fisher, 1979a; Greiner e Weidman, 1981; Sasso-Pognetto e Wassle, 1997; Pow e Barnett, 2000). Tuttavia alcuni studi dimostrano che la maturazione delle risposte visive continua anche dopo tale momento. Le risposte alla luce iniziano ad emergere quando il pathway fotorecettori-cellule bipolari inizia a maturare, subito dopo l'apertura degli occhi. Le prime risposte delle RGCs alla luce sono deboli e le cellule si adattano rapidamente (Masland, 1977; Tootle, 1993). Quando si iniziano a vedere risposte più robuste, pochi giorni dopo, è già presente l'organizzazione centro-periferia (come quella centro ON o centro OFF) (Bowe-Anders et al., 1975; Masland, 1977; Tootle, 1993). Registrazioni elettrofisiologiche sul furetto dimostrano chiaramente che la connettività della retina interna viene rimodellata nel corso della maturazione. Nel periodo post-natale le RGCs del furetto hanno input ON e OFF convergenti prima della maturazione (Wang et al., 2001). In queste cellule la maturazione delle risposte dei campi recettivi comporta la perdita di un tipo di input. Le proprietà specifiche dei campi recettivi, come la selettività per la direzione dello stimolo, si sviluppano prima dell'apertura degli occhi (Masland, 1977; Sernagor e Grzywacz, 1995), sebbene la base sinaptica di tali proprietà debba sempre essere determinata.

Interazione geni-ambiente nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso.

Le influenze ambientali e genetiche sullo sviluppo del sistema nervoso e sul suo output funzionale, il comportamento, sono state considerate per lungo tempo processi che si escludono a vicenda. Molti studi si sono focalizzati sulla questione del rapporto "nature versus nurture" (per una review, vedi Krubitzer and Kahn, 2003).

Nella seconda metà dell'ultimo secolo questo problema è stato affrontato da studiosi appartenenti a due diverse scuole di pensiero: la scuola Behaviourista e la scuola Etologica.

I Behaviouristi sostenevano che il concetto di "innato" è inesatto e non-scientifico, e che tutti i comportamenti vengono appresi (Hebb, 1953). Questo approccio, sebbene riduttivo, ha portato ad un gran numero di ricerche sui processi di apprendimento che hanno

permesso di compiere passi avanti sulla conoscenza dell'organizzazione del comportamento.

Gli Etologi, invece, focalizzarono la loro attenzione su quei comportamenti caratteristici degli individui appartenenti alla stessa specie, e le loro ricerche portarono all'individuazione di comportamenti altamente stereotipati, svolti in modo corretto fin dalla prima esecuzione, in totale assenza di processi di apprendimento. Questo portò al concetto di "comportamento istintivo" e alla nuova idea che i tratti comportamentali potessero essere ereditati.

Fu il Premio Nobel Konrad Lorenz a formulare la teoria che risolse questo dibattito. Egli introdusse per la prima volta il concetto di "predisposizione innata ad apprendere" (Lorenz, 1961), secondo il quale tutti i processi di apprendimento devono avvenire entro i limiti fisiologici di una data specie. Poiché le specie sono morfologicamente e fisiologicamente diverse e poiché queste differenze sono regolate da leggi genetiche di selezione ed ereditarietà, anche la potenzialità di acquisire nuove informazioni attraverso processi di apprendimento deve essere regolata e programmata entro i limiti specie-specifici.

Secondo questa teoria "innato" e "appreso" non sono in antitesi, ma rappresentano due vie attraverso le quali le informazioni circa l'ambiente diventano disponibili per gli organismi, vengono registrate nei circuiti del sistema nervoso e danno origine poi a comportamenti adattativi (Lorenz, 1961; Rescorla, 1988).

Così l'influenza genetica durante la filogenesi e l'apprendimento e la memoria durante l'ontogenesi collaborano nella costruzione della personalità individuale.

A livello neurobiologico la maggior parte delle informazioni circa il ruolo e l'importanza dell'esperienza nello sviluppo e nella maturazione del sistema nervoso deriva dal lavoro di Hubel e Wiesel nei primi anni '60, che descrisse per la prima volta l'esistenza di colonne di dominanza oculare nella corteccia visiva primaria del gatto. Attraverso registrazioni elettrofisiologiche dalla corteccia visiva primaria, notarono che i due occhi attivavano in modo diverso i neuroni corticali e che le cellule con una preferenza simile per uno dei due occhi erano raggruppate insieme in colonne che chiamarono "di dominanza oculare" (Hubel e Wiesel, 1963). Inoltre osservarono che se un occhio viene privato della visione in uno stadio precoce della vita, tramite sutura delle palpebre (protocollo al quale ci si riferisce comunemente con il termine di *deprivazione monoculare*), la maggior parte dei

neuroni visivi corticali diventa responsiva solo agli stimoli presentati all'occhio rimasto aperto e si osserva un'alterazione anatomica delle colonne di dominanza oculare (Shatz,1990), in parallelo ad una consistente compromissione dell'acuità visiva dell'occhio deprivato, nota come ambliopia (Odom,1983).

Il modello delle colonne di dominanza oculare rimane un esempio paradigmatico di come geni ed ambiente interagiscono nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso.

Recentemente è stato suggerito che il processo di formazione delle colonne di dominanza oculare implichi due fasi: una prima fase di formazione, che viene controllata da programmi molecolari controllati geneticamente e indipendenti dall'esperienza, e una seconda fase di maturazione e plasticità, che viene influenzata dalle caratteristiche dell'attività nervosa ritrasmessa dalle afferenze sensoriali (per una review, vedi Crowley e Katz, 2002; Katz e Crowley, 2002).

Un altro protocollo sperimentale che ha fornito sostegno a questo concetto è quello del *dark rearing*, che prevede l'allevamento fin dalla nascita in completa oscurità. In queste condizioni la corteccia visiva di gatti e ratti rimane fino all'età adulta in uno stato di immaturità, con la grande maggioranza delle cellule corticali che, pur rispondendo agli stimoli, non mostrano selettività per l'orientamento e sono per la maggior parte binoculari. Inoltre la risposta delle cellule è debole, va rapidamente incontro ad abitudine, i campi recettivi delle cellule sono più grandi e l'acuità visiva è minore (Cynader e Mitchell, 1980; Mower, 1991; Fagiolini et al., 1994). Quindi esistono dei periodi critici durante lo sviluppo in cui il sistema nervoso è sensibile all'influenza esercitata dall'ambiente e dall'esperienza sensoriale.

L'arricchimento ambientale (EE).

Un gran numero di studi nel corso degli anni ha posto in rilievo l'importanza dell'esperienza sensoriale nel rifinire e modellare le appropriate connessioni neurali.

Come abbiamo visto, l'approccio più diretto per investigare l'influenza dell'esperienza sul sistema nervoso è quello di manipolare il pattern di stimolazione ambientale a cui gli animali vengono esposti.

In questo contesto un importante contributo, in parallelo agli studi di Hubel e Wiesel, è stato offerto dagli esperimenti di Rosenzweig e colleghi.

Questi autori introdussero per la prima volta l'arricchimento ambientale, un protocollo sperimentale per testare gli effetti dell'esperienza sensoriale sul sistema nervoso e sul comportamento. Furono i primi a fornire la prova che l'esposizione ad un ambiente arricchito, nel quale si ha una modificazione della qualità e dell'intensità della stimolazione da parte dell'ambiente, può portare a cambiamenti morfologici, biochimici e fisiologici del cervello (Rosenzweig, 1966; Rosenzweig e Bennett, 1969).

Da allora molti studi hanno utilizzato questo protocollo sperimentale.

Definizione e caratteristiche del protocollo sperimentale.

L'arricchimento ambientale (EE) è stato definito per la prima volta da Rosenzweig et al. (1978) come *"a combination of complex and social stimulation"*.

Gli animali arricchiti vengono allevati in gruppi numerosi (in genere 8-12 individui) e in gabbie di grandi dimensioni, accessoriate con giochi, tunnels, scale, piattaforme, scatole, ruote e diversi materiali per la costruzione del nido. Gli oggetti presenti nelle gabbie di arricchimento vengono sostituiti con altri, o almeno ne viene variata la posizione, una volta alla settimana. Il cibo e l'acqua sono presenti ad libitum, e anche la loro posizione viene frequentemente cambiata. Una componente essenziale della condizione di arricchimento è l'opportunità per gli animali di praticare esercizio fisico volontario.

La definizione riportata di arricchimento ambientale si basa sulla comparazione delle condizioni dell'ambiente arricchito (EC: enriched condition) con la condizione standard

(SC: standard condition), condizione alternativa di allevamento, frequentemente usata in laboratorio, e con la condizione detta di impoverimento (IC: impoverished condition).

Nella condizione standard gli animali vengono allevati in gruppi composti da 3-5 individui, in gabbie di piccole dimensioni, nelle quali non sono presenti particolari oggetti eccetto il materiale per la costruzione del nido e cibo ed acqua ad libitum.

Nella condizione di impoverimento, invece, l'animale viene allevato da solo in una gabbia identica, per dimensioni e presenza di accessori, a quella dell'allevamento standard (Figura 1.3).

L'ambiente creato nella condizione di arricchimento stimola gli animali a vari livelli: permette loro di attuare attività fisica volontaria, fornisce una continua stimolazione multi-sensoriale, aumenta la possibilità di instaurare nuove relazioni sociali per ogni singolo animale, risveglia le loro tendenze esplorative e suscita la loro curiosità ogni volta che gli oggetti nella gabbia vengono cambiati e/o spostati.

Molti studi hanno tentato di stabilire quale fosse il contributo delle varie componenti agli effetti esercitati dalla condizione arricchita sul sistema nervoso centrale e sul comportamento. La visione predominante è che nessuna variabile singola possa rendere conto delle conseguenze dell'arricchimento ambientale (van Praag et al., 2000). In particolare, è stato stabilito che è necessaria l'interazione diretta con l'ambiente arricchito (i cosiddetti "TV rats", a cui è data la possibilità di osservare ma non di sperimentare la ricchezza dell'ambiente, non mostrano gli effetti dell'arricchimento; Ferchmin e Bennett, 1975), e che la sola componente di incrementata socialità non è sufficiente per produrre tutti gli effetti dell'arricchimento (Rosenzweig et al., 1978).

È interessante notare, tuttavia, che le singole componenti possono agire in modo additivo, come suggerito da studi morfologici, dai quali risulta che la densità sinaptica, il numero di sinapsi per neurone e la lunghezza massima delle zone di contatto sinaptico sono maggiori negli animali arricchiti, intermedi nei ratti allevati in gruppi numerosi e più bassi in animali isolati (Turner e Greenough, 1985; Sirevaag e Greenough, 1985).

La maggior parte degli effetti presenti negli animali arricchiti sono simili a quelli riscontrati in animali sottoposti ad intenso esercizio fisico (per una review, vedi Cotman e Berchtold, 2002). L'attività fisica migliora le funzioni cognitive (Fordyce e Farrar, 1991; Kramer et al., 1999; Churchill et al., 2002), incrementa la neurogenesi (van Praag et al., 1999 a, b) ed è neuroprotettiva, dal momento che determina miglioramenti dei danni

neurobiologici provocati da diverse patologie neurodegenerative (Arkin, 1999; Petejan e White, 1999; Larsen et al., 2000; Mattson, 2000; Carro et al., 2000, 2001); inoltre l'esercizio fisico aumenta l'angiogenesi (Black et al., 1990; Isaacs et al., 1992) ed aumenta i livelli cerebrali di neurotrofine (Neeper et al., 1996; Oliff et al., 1998; Carro et al., 2000; Johnson et al., 2003; Farmer et al., 2004; Klintsova et al., 2004).

Dal momento che l'arricchimento ambientale fornisce l'opportunità di svolgere studi sull'ottimizzazione piuttosto che sulla riduzione o alterazione dell'esperienza sensoriale, e poiché è in grado di influenzare l'output funzionale del sistema nervoso, il comportamento, i risultati ottenuti con l'utilizzo di questo paradigma sperimentale sono di grande interesse e applicabilità anche per l'uomo, in diversi campi, dalla psicologia alla clinica medica.

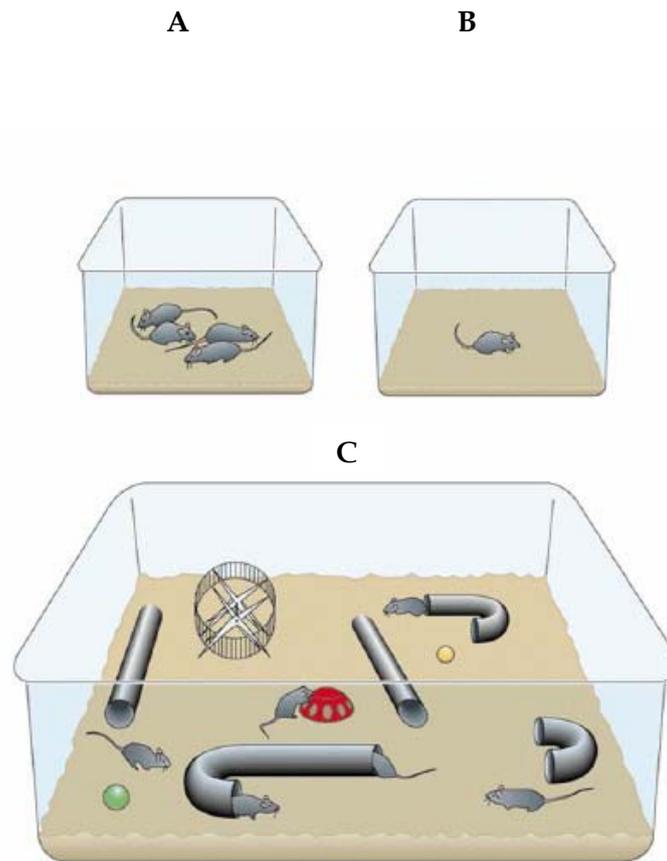


Figura 1.3: differenti condizioni di allevamento.

A. Condizioni standard: gli animali sono alloggiati in piccoli gruppi in gabbie di dimensioni standard senza nessun oggetto;

B. Condizioni di impoverimento: gli animali sono alloggiati individualmente in gabbie analoghe a quelle dell'allevamento standard;

C. Condizioni di arricchimento: l'arricchimento ambientale promuove l'interazione sociale (numerosi animali in ogni gabbia), stimola l'attività motoria, il comportamento esplorativo e le capacità cognitive degli animali.

L'EE influenza il cervello e il comportamento di animali adulti.

Variazioni a livello anatomico.

Gli esperimenti iniziali del 1964 da Rosenzweig e colleghi, contemporanei a quelli svolti dai premi Nobel Hubel e Wiesel sugli effetti della deprivazione monoculare sull'anatomia e la fisiologia della corteccia visiva, fornirono per la prima volta la prova che la corteccia dei ratti allevati in condizione arricchita per 30 giorni aumenta in spessore e in peso rispetto a quella di ratti allevati in condizione standard. Da allora sono stati riscontrati altri effetti diffusi a livello anatomico:

- un aumento della dimensione del soma e del nucleo delle cellule nervose (Diamond, 1988).
- un aumento delle arborizzazioni dendritiche (Holloway, 1966; Globus et al., 1973; Greenough et al., 1973).
- un aumento della lunghezza delle spine dendritiche, della dimensione e del numero delle sinapsi (Mollgaard et al., 1971; Turner e Greenough, 1985; Black et al., 1990).
- un aumento dello spessore postsinaptico (Diamond et al., 1964) e della gliogenesi (Diamond et al., 1966).

Per produrre questi cambiamenti sono necessari almeno quattro giorni consecutivi di arricchimento ambientale (Wallace et al., 1992), mentre trenta giorni di allevamento in condizione arricchita inducono cambiamenti a lungo termine, che persistono anche dopo 30 giorni di allevamento in gabbie individuali (Camel et al., 1986). Sono stati riscontrati anche alcuni effetti per le cellule piramidali delle aree CA1 e CA3 e nelle cellule granulari del giro dentato (Walsh et al., 1969; Walsh and Cummins, 1979; Rosenzweig and Bennett, 1996, Rampon et al., 2000b). Un altro effetto anatomico dell'arricchimento ambientale si verifica a carico della neurogenesi ippocampale (Kempermann et al., 1997). Gli studi inerenti questo aspetto sono iniziati quando è stato dimostrato che il cervello dei Roditori mantiene le capacità di neurogenesi anche dopo la maturità sessuale (Gueneau et al., 1982; Kuhn et al., 1996), come quello delle scimmie e dell'uomo (rispettivamente, Gould et al., 1999; Eriksson et al., 1998). Studi più recenti dimostrano che l'esposizione ad un ambiente

arricchito produce un aumento significativo nella neurogenesi ippocampale (Kempermann et al., 1997). Un effetto simile è indotto anche da aumentati livelli di esercizio fisico praticati attraverso le ruote per il movimento (van Praag et al., 1999a e b), ma le due condizioni sembrano agire con meccanismi diversi; infatti mentre l'esercizio fisico da solo, praticato in condizioni standard, induce un aumento della neurogenesi con un incremento sia della proliferazione dei precursori neurali sia del tasso di sopravvivenza dei neuroni appena generati, l'esposizione all'ambiente arricchito è in grado di agire solo sulla sopravvivenza delle cellule appena generate (van Praag et al., 1999b). Questi risultati mettono in discussione la visione tradizionale secondo la quale le strutture anatomiche del cervello adulto in condizioni non patologiche sono immutabili e rivelano una plasticità inaspettata a livello strutturale indotta da stimolazioni ambientali.

Variazioni a livello molecolare.

Gli effetti anatomici appena trattati sono accompagnati da diversi cambiamenti a livello molecolare. In particolare è stato dimostrato che l'arricchimento ambientale influenza:

- la funzionalità dei sistemi colinergico, serotonergico e noradrenergico; l'arricchimento ambientale determina un'aumento dell'attività dell'acetilcolinesterasi (Rosenzweig et al., 1962 e 1967), un aumento dei livelli di espressione dell'mRNA per il recettore 5-HT_{1A} della serotonina (Rasmuson et al., 1998) e un aumento del sistema di traduzione del recettore beta-adrenergico (Escorihuela et al., 1995; Naka et al., 2002). Tutti questi neurotrasmettitori sono capaci di influenzare l'apprendimento e la plasticità nel cervello adulto (van Praag et al., 2000) e sono coinvolti nello stato di arousal del cervello (Hobson et al., 1975; Berridge e Waterhouse, 2003).
- la produzione e l'azione di neurotrofine, coinvolte nel riarrangiamento dei circuiti neurali sia durante lo sviluppo sia durante i processi di plasticità (per una review, vedi Bonhoeffer et al., 1996; Caleo et al., 2004; Berardi et al., 2003); in particolare, l'arricchimento ambientale determina l'aumento dei livelli dell'mRNA per NT-3 e NGF nella corteccia visiva e nell'ippocampo (Torasdotter et al., 1996 e 1998) e dei livelli di NGF, BDNF e NT-3 in diverse regioni del cervello di ratto (Ickes et al., 2000; Pham et al., 2002).

- l'aumento della fosforilazione del fattore di trascrizione CREB (*cyclicAMP response element binding protein*; Young et al., 1999), che regola l'espressione di BDNF.
- l'up-take cerebrale di IGF-I, un altro fattore trofico considerato mediatore dell'espressione di BDNF e l'attivazione di c-fos (Carro et al., 2000), aumentare la neurogenesi ippocampale (Trejo et al., 2001) e avere effetti neuroprotettivi contro lesioni (Carro et al., 2001).
- vari geni, analizzati attraverso la tecnica del *gene chip analysis*, che vengono attivati dopo appena tre ore di arricchimento ambientale con espressione persistente fino a due settimane dall'inizio del protocollo di arricchimento (per i topi, Rampon et al., 2000a; per i ratti, Keyvani et al., 2004).

Variazioni a livello comportamentale.

Nel 1947 Hebb notò che alcuni ratti, portati a casa per alcune settimane come animali domestici per i suoi figli e poi riportati in laboratorio, esibivano prestazioni migliori in molti tests comportamentali rispetto ai ratti che erano rimasti in laboratorio (Hebb, 1949).

A partire da questa osservazione aneddotica, vari gruppi di ricerca hanno studiato gli effetti dell'arricchimento ambientale sulle performance comportamentali in condizioni sperimentali controllate, spinti anche dagli effetti osservati nel rimaneggiamento strutturale a livello di corteccia cerebrale e ippocampo. È stato così dimostrato che l'allevamento in condizioni arricchite induce un miglioramento nelle performance comportamentali, specialmente per quanto riguarda l'apprendimento cognitivo e la memoria spaziale (per una review, vedi Renner e Rosenzweig, 1987).

Uno degli effetti più evidenti sul comportamento di topi e ratti è stato osservato in compiti che coinvolgono la memoria spaziale dipendente dall'ippocampo, come nel caso del *Morris water maze test*; in questo test gli animali arricchiti mostrano un miglioramento dell'apprendimento e della memoria spaziale, indipendentemente dal genere e dall'età degli individui testati (Pacteau et al., 1989; Tees et al., 1990; Falkenberg et al., 1992; Paylor et al., 1992; Moser et al., 1997; Kempermann et al., 1998; Tees, 1999; Williams et al., 2001), o comunque l'arricchimento ambientale allevia il declino cognitivo della memoria spaziale generalmente associato con l'avanzare dell'età (per una review, vedi Winocur, 1998).

Gli effetti indotti dall'arricchimento ambientale sull'apprendimento e sulla memoria non sono limitati al contesto della memoria di natura spaziale, come mostrato in dettaglio nella sistematica analisi comportamentale condotta da Rampon et al. (2000a), in cui si evidenzia come l'ambiente arricchito migliori le performances mnemoniche in tre differenti compiti di natura non-spaziale. In particolare, l'arricchimento incrementa la memoria di riconoscimento visivo nel test del *novel object recognition* e la memoria di associazione nel test di *contextual fear-conditioning* e nel test di *cued fear-conditioning*.

Considerando l'impatto generale della stimolazione ambientale sul comportamento, uno speciale interesse meritano gli studi relativi all'influenza dell'ambiente arricchito sulle reazioni emozionali e sullo stress, date le ben documentate relazioni che intercorrono tra i livelli di stress e le funzioni cognitive (Isgor et al., 2004; Sandi, 2004; Lupien et al., 2005). Risultati ottenuti in topi BALB/c (un modello patologico per l'ansia) sembrano supportare un effetto ansiolitico dell'ambiente arricchito (Trullas e Skolnick, 1993; Chapillon et al., 1999). Gli studi in questo ambito, tuttavia, sono abbastanza contraddittori, anche se l'arricchimento ambientale sembra avere un generale effetto ansiolitico e i soggetti EC sembrano avere maggiori capacità di combattere lo stress (Chapillon et al., 1999), con ridotti livelli di attivazione dell'asse surrenale-ipotalamico-ipofisario, e corrispondenti ridotti livelli basali di corticosterone.

L'EE postnatale influenza lo sviluppo del sistema visivo.

Nonostante la grande quantità di dati ottenuti con gli animali arricchiti adulti, è stata scarsamente approfondita la possibilità che un'ottimizzazione precoce della stimolazione sensorio-motoria, come quella fornita dall'ambiente arricchito, potesse indurre variazioni sia a livello neurale che comportamentale. Lo scarso interesse nei confronti degli studi circa l'arricchimento ambientale precoce può essere attribuito parzialmente al fatto che esso è caratterizzato da una minima interazione degli animali con l'ambiente nelle prime fasi di vita, dato che i piccoli sono troppo giovani ed inerti per questo tipo di attività. Poiché elevati livelli di attività fisica e l'esplorazione attiva dell'ambiente sono considerati componenti essenziali del protocollo di arricchimento (van Praag et al., 2000) questo può

spiegare per quale motivo la possibilità di evocare modificazioni comportamentali e neurali attraverso un protocollo di arricchimento precoce sia stata generalmente considerata piuttosto limitata. Per esempio, mentre è stato dimostrato che l'arricchimento ambientale in età adulta ha l'effetto di stimolare la neurogenesi ippocampale in topi e ratti (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999), un effetto paragonabile non è stato riscontrato in protocolli di arricchimento precoce in cui piccoli da P7 a P21 vengono sottoposti a complesse combinazioni di stimolazioni tattili, olfattive, visive, acustiche e vestibolari (Kohl et al., 2002).

Tuttavia, dal momento che l'arricchimento ambientale precoce fornisce alti livelli di stimolazioni plurisensoriali durante una fase di rimodellamenti anatomici e funzionali della corteccia cerebrale, ci possiamo aspettare che questo protocollo agisca sullo sviluppo del sistema nervoso attraverso processi di plasticità dipendenti dall'esperienza.

Questo è stato confermato da alcuni risultati, benché sporadici, presenti in letteratura. Infatti è stata riscontrata una più complessa ramificazione dendritica a seguito di arricchimento ambientale effettuato nel periodo P10-P24 (Venable et al., 1989) o a partire dal periodo postsvezzamento (Kolb, 1995). Questo effetto è particolarmente evidente per quanto riguarda i neuroni piramidali della corteccia parieto-occipitale (Venable et al., 1989; Fernandez et al., 2003), confermando così i risultati ottenuti dagli studi sull'arricchimento in soggetti adulti circa la particolare sensibilità di questa regione del cervello alla stimolazione ambientale. È stato anche osservato un significativo aumento del differenziamento cellulare nella corteccia motoria di ratti sottoposti ad arricchimento ambientale nel periodo che va da P5 a P21, accompagnato da un miglioramento delle performance motorie in molte risposte adattative, misurate con diversi test motori (Pascual e Figueroa, 1996).

Koo e collaboratori (Koo et al., 2003), invece, hanno dimostrato che la condizione arricchita a partire dalla nascita è in grado di recuperare gli effetti deleteri dello stress prenatale sulle capacità cognitive, sulla proliferazione cellulare e sull'espressione delle proteine sinaptiche, ma anche che la neurogenesi delle cellule granulo dell'ippocampo, i livelli di espressione di NCAM, sinaptofisine e BDNF, sia nell'ippocampo che in corteccia, sono significativamente aumentati dall'allevamento in ambiente arricchito (Koo et al., 2003). Queste scoperte dimostrano che l'arricchimento ambientale precoce può avere effetti terapeutici sia attenuando le conseguenze che si verificano a seguito di condizioni

prenatali avverse sia provocando un miglioramento generale dello sviluppo delle funzioni cerebrali in condizioni fisiologiche.

Come abbiamo visto, lo sviluppo dei sistemi sensoriali viene fortemente influenzato dall'esperienza percettiva, che ha un ruolo essenziale nel modellare e rifinire l'organizzazione della circuiteria neurale durante lo sviluppo. Quindi è lecito attendersi che l'arricchimento ambientale precoce possa influenzare la maturazione dei sistemi sensoriali.

È stata recentemente documentata un'influenza dell'arricchimento precoce sulle proprietà funzionali dei neuroni della corteccia uditiva, che mostrano un incremento dell'ampiezza delle risposte corticali a stimoli sonori (Engineer et al., 2004). Inoltre, la capacità dell'allevamento in ambiente arricchito di trasformare le proprietà dei sistemi sensoriali è stata dimostrata anche per la corteccia somatosensoriale, anche se l'unico studio riguardante tale questione è stato condotto su animali adulti. In particolare, è stato osservato che il trasferimento di ratti ad un ambiente più simile a quello naturale, come quello arricchito, che promuove l'esecuzione del repertorio comportamentale completo di questa specie, induce un raffinamento funzionale su larga scala delle mappe corticali sensoriali, causando una contrazione della rappresentazione corticale delle vibrisse, associata ad una diminuzione delle dimensioni dei campi recettivi (Polley et al., 2004).

Per quanto riguarda il sistema visivo, Prusky e collaboratori (Prusky et al., 2000a) hanno dimostrato che l'arricchimento ambientale a partire dalla nascita induce un aumento dell'acuità visiva nel topo, suggerendo che una stimolazione motoria e sensoriale precoce possa esercitare un ruolo importante per quanto riguarda la maturazione funzionale delle proprietà visive.

Forse l'analisi più completa e sistematica degli effetti dell'arricchimento ambientale precoce ci è pervenuta da due lavori di recente pubblicazione, che hanno dimostrato che l'arricchimento ambientale influenza in modo consistente lo sviluppo del sistema visivo (Cancedda et al., 2004; Landi et al., 2007).

Arricchimento ambientale precoce e sviluppo della corteccia visiva.

Nello studio di Cancedda et al. (2004) è stato approfondito il contributo dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo del sistema visivo ed è stata condotta un'analisi comparata dello

sviluppo dell'acuità visiva in topi arricchiti e in topi non arricchiti, utilizzando il metodo comportamentale descritto da Prusky e colleghi (*visual water box*: Prusky et al., 2000a), di natura non invasiva, che permette misurazioni longitudinali dello sviluppo della funzionalità visiva. In primo luogo, è stato osservato che gli animali arricchiti (EC) hanno prestazioni migliori degli animali standard (SC) nella fase di training: questo primo dato è molto interessante, dal momento che indica che il protocollo di arricchimento ambientale dalla nascita è in grado di indurre un miglioramento delle prestazioni di apprendimento, una delle modificazioni che più spesso è stata riconosciuta tra gli effetti dell'arricchimento ambientale.

Il punto centrale, però, è stata la scoperta che gli animali EC mostrano un'accelerazione dello sviluppo dell'acuità visiva (Cancedda et al., 2004): essi, infatti, presentano un'acuità visiva pari a quella dell'adulto già a P25, mentre gli animali SC non raggiungono valori paragonabili fino a P40-P45. Inoltre, è stato osservato che gli animali EC, anche a P43, presentano un'acuità visiva maggiore degli animali SC, a conferma dei risultati ottenuti da Prusky et al. (2000b). Il precoce sviluppo dell'acuità visiva negli animali arricchiti, testata a livello comportamentale, è stato osservato anche tramite misurazioni elettrofisiologiche dei potenziali visivi evocati (VEPs) (Figura 1.4).

Le variazioni a livello funzionale osservate nella corteccia visiva primaria sono precedute da cambiamenti a livello molecolare; sia negli animali arricchiti che in quelli standard i livelli proteici di BDNF mostrano un incremento in parallelo allo sviluppo e raggiungono un plateau a P20, ma gli animali arricchiti presentano livelli superiori di BDNF a P7.

Dal momento che topi che sovraesprimono BDNF esibiscono un'accelerazione dello sviluppo dell'acuità visiva, dovuta ad una precoce maturazione della circuiteria GABAergica (Huang et al., 1999), è stata fatta l'ipotesi che anche negli animali arricchiti si potesse osservare una maturazione precoce della circuiteria inibitoria.

Per analizzare lo sviluppo del sistema GABAergico nella corteccia visiva degli animali arricchiti, è stato usato come marcatore GAD65/67 (due isoforme dell'acido glutammico decarbossilasi). È stato evidenziato un incremento dei livelli della proteina GAD65 negli animali EC a P7 e P15 (Cancedda et al., 2004).

Dunque è stato chiaramente dimostrato che esporre gli animali ad un ambiente arricchito dalla nascita può accelerare in maniera notevole lo sviluppo del sistema visivo a livello corticale.

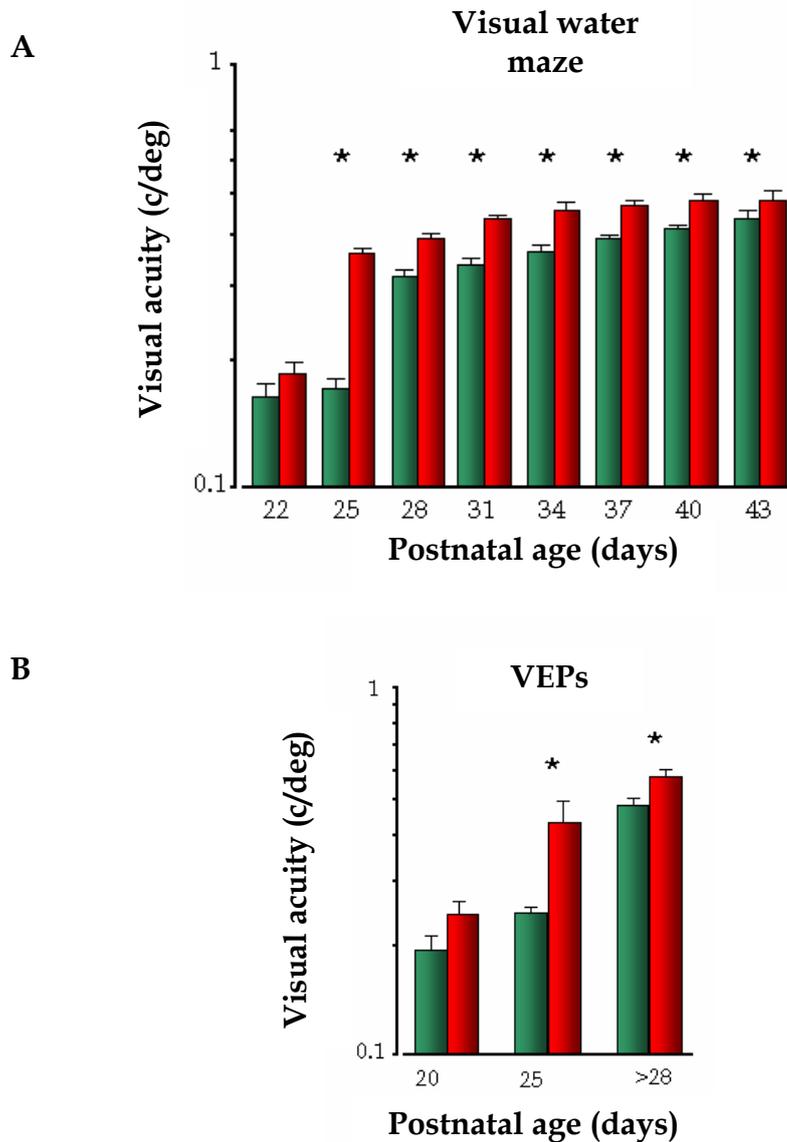


Figura 1.4: La maturazione dell'acuità visiva è accelerata in topi arricchiti dalla nascita. Analisi comportamentale (A) ed elettrofisiologica (B) dell'acuità visiva a differenti età in animali arricchiti (EE, rosso) e non arricchiti (SC, verde). Gli asterischi indicano le differenze statisticamente significative (ANOVA a due vie, $p < 0,001$; post-hoc Tukey test, $p < 0,05$). Le barre indicano il SEM. Riadattato da Cancedda et al. (2004).

Arricchimento ambientale precoce e sviluppo della retina.

Dallo studio di Landi e collaboratori (2007) è emerso che l'arricchimento ambientale induce un'accelerazione dell'acuità retinica, misurata tramite il P-ERG (*pattern electroretinogram*), in ratti allevati in condizione arricchita durante il periodo che va dalla nascita fino all'età adulta (da P0 a P25-26). I ratti arricchiti raggiungono il livello di acuità retinica tipico dell'età adulta con 10 giorni di anticipo rispetto ai ratti non arricchiti (P34-35 negli animali arricchiti rispetto a P44-45 negli animali standard; Figura 1.5). Il livello di acuità retinica finale, stimata all'età P44-45, non differisce tra ratti EC e SC, suggerendo che l'arricchimento ambientale influenza il decorso temporale dello sviluppo dell'acuità retinica senza avere alcun effetto sui livelli finali (Landi et al., 2007).

Quindi anche lo sviluppo retinico è sensibile all'esperienza sensoriale fornita dall'ambiente arricchito.

Nei ratti EC è stata osservata una precoce apertura degli occhi, anticipata di 2 giorni rispetto a quanto visto nei ratti SC (P12 per gli animali EC e P14 per gli SC), ma esperimenti in cui ratti EC sono stati allevati in condizione di oscurità fino all'età P14 (in modo da annullare ogni possibile vantaggio acquisito grazie all'apertura precoce degli occhi) o nei quali è stata effettuata un'apertura degli occhi forzata a P10 per i ratti SC hanno dimostrato che l'apertura precoce degli occhi non è necessaria per l'accelerazione della maturazione dell'acuità retinica indotta dall'arricchimento ambientale (Landi et al., 2007).

È stato anche dimostrato che per ottenere gli effetti osservati sull'accelerazione dello sviluppo funzionale retinico sono sufficienti 10 giorni di allevamento in condizioni arricchite, da P0 a P10. Quindi l'arricchimento ambientale influenza fattori che sono in grado di indurre lo sviluppo delle proprietà retiniche funzionali, e lo fa nei primi 10 giorni di vita dell'animale (Landi et al., 2007).

Landi e collaboratori hanno inoltre dimostrato che nella retina, come in corteccia, ed in particolare nello strato delle cellule gangliari, si osserva un precoce aumento del livello di espressione di BDNF in seguito ad allevamento in condizioni arricchite (in condizioni normali il livello di espressione della proteina BDNF è molto basso fino a P14, mentre nei ratti arricchiti è possibile individuare immunoreattività per questa proteina già a partire

da P7) e che il blocco dell'espressione di questo fattore neurotrofico effettuato tramite oligonucleotidi antisenso, iniettati a livello intraoculare in animali EC, annulla gli effetti dell'arricchimento sulla maturazione funzionale della retina.

Quindi BDNF potrebbe essere il mediatore degli effetti dell'arricchimento ambientale precoce sulla maturazione funzionale della retina.

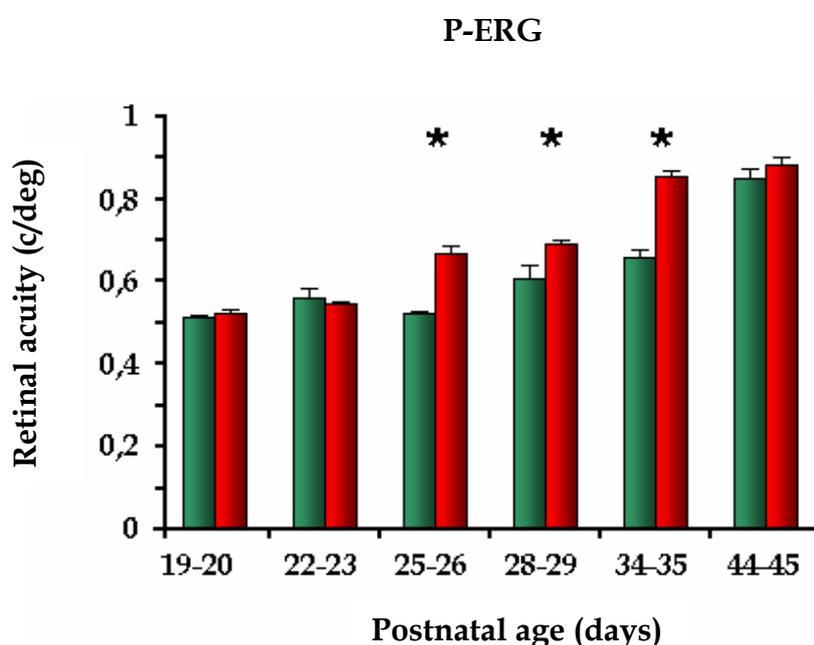


Figura 1.5: analisi tramite P-ERG (patterned electroretinogram) dell'acuità retinica di ratti EE (rosso) e non-EE (verde) durante lo sviluppo postnatale. Le barre indicano il SEM. L'ANOVA a due vie mostra un effetto significativo sia dell'età sia delle condizioni ambientali di allevamento ($P < 0.001$ in entrambi i casi), e anche un'interazione significativa tra questi due parametri ($P < 0.001$). Il test *post hoc* di Tukey rivela una differenza significativa (*) da P25 a P34-35 tra i gruppi EE e non-EE ($P < 0.05$). Riadattato da Landi et al. (2007).

Arricchimento ambientale precoce e cure materne.

È interessante notare che le variazioni osservate a livello molecolare negli esperimenti effettuati da Maffei e collaboratori (Cancedda et al., 2004; Landi et al., 2007), a livello di corteccia visiva e retina, rispettivamente, di animali arricchiti e standard sono molto precoci (P7-P15), e si verificano ad un'età in cui gli animali sono totalmente dipendenti dalla madre, hanno ancora gli occhi chiusi e passano la maggior parte del loro tempo all'interno del nido; era quindi poco probabile che i livelli aumentati di neurotrofine osservati nei piccoli EC fossero dovuti ad un incremento dell'attività elettrica causata dalla ricchezza dell'ambiente o da maggiori quantità di movimento praticate dai piccoli, mentre era plausibile che questo avvenisse grazie ad una mediazione materna. È noto, infatti, che l'esperienza acquisita nel periodo che intercorre tra la nascita e lo svezzamento è fondamentale per promuovere e regolare lo sviluppo neurale e i tratti comportamentali dei piccoli nella maggior parte delle specie di Roditori e Primati (Fleming et al., 1999). Durante questo periodo, caratterizzato da un'intensa plasticità del sistema nervoso dei piccoli, l'influenza esercitata dalla madre viene considerata una delle più importanti fonti di esperienza sensoriale per i soggetti in sviluppo (Hofer, 1984; Ronca et al., 1993; Liu et al., 2000), in grado di regolare direttamente la crescita corporea e di promuovere la maturazione delle strutture cerebrali implicate nelle funzioni cognitive (Fleming et al., 1999). Questo problema è stato ampiamente studiato su animali da laboratorio, nei quali il comportamento materno è costituito da moduli di comportamento stereotipato che sono facilmente investigabili e che possono essere manipolati in condizioni sperimentali controllate. Nell'ambito di questi studi è stato dimostrato che un breve periodo (3-15 minuti) di separazione quotidiana della madre dai piccoli di ratto e di topo (un trattamento chiamato *handlin*"), effettuato durante le prime due settimane di vita dopo la nascita, ha l'effetto di diminuire l'intensità delle risposte allo stress nell'adulto, sia a livello comportamentale che a livello endocrino (per una review, vedi Meaney et al., 1996 e Francis and Meaney, 1999), mentre lunghi periodi (3-6 ore di separazione giornaliera dalla madre (un trattamento chiamato *maternal separation*) provoca l'effetto opposto, aumentando le risposte allo stress (van Oers et al., 1998; Ladd et al., 2000). La separazione dalla madre rappresenta una fonte di stress per i piccoli e induce un aumento del livello di

glucocorticoidi. È stato dimostrato che questa procedura sopprime le risposte cellulari nei confronti dei tre più importanti ormoni trofici, e in particolare all'ormone della crescita, alla prolattina e all'insulina (Kuhn and Schanberg, 1998) e che anche un'ora di separazione dalla madre produce nel ratto una diminuzione nell'attività dell'enzima ornitina decarbossilasi (Wang et al., 1996), enzima essenziale per la normale crescita del piccolo (Marton and Morris, 1987). Questo effetto può essere completamente evitato attraverso stimolazioni tattili praticate con una spazzola ad una frequenza simile a quella con cui viene praticato il licking materno (Pauk et al., 1986) e allevando ratti sottoposti a tale procedura in condizione arricchita nel periodo che va dallo svezzamento fino al giorno P70 (Francis et al., 2002).

Mentre i meccanismi coinvolti nel *maternal separation* sono ben caratterizzati (Kuhn and Schanberg, 1998), gli effetti benefici dell'*handling* hanno fatto nascere un dibattito circa la natura dei processi regolatori coinvolti (Francis and Meaney, 1999). È stato proposto che gli effetti dell'*handling* postnatale possano essere mediati da variazioni delle interazioni madre-piccolo, e in particolare dagli aumentati livelli di cure materne ricevuti dai piccoli sottoposti a *handling* rispetto ai piccoli non disturbati (Levine, 1975, per una review, vedi Denenberg, 1999). Questa ipotesi risultò essere corretta, come dimostrato da Meaney e collaboratori (Liu et al., 1997), i quali provarono che madri di piccoli sottoposti a *handling* praticavano livelli aumentati di licking/grooming (LG) e di arched back nursing (ABN), due tra i più importanti moduli comportamentali nel repertorio delle cure materne verso la prole.

Nel ratto esistono variazioni naturali nei livelli di cure praticate dalla madre, ed è possibile isolare le sottopopolazioni di femmine caratterizzate da alti o bassi livelli di questo comportamento, sulla base della frequenza alla quale i due moduli comportamentali di LG e ABN vengono praticati quando le madri sono nel nido ad occuparsi dei piccoli (Champagne et al., 2003). È stato ripetutamente dimostrato che i piccoli di madri caratterizzate da alti livelli di LG-ABN hanno ridotta attitudine alla paura e ridotti livelli di stress da adulti, rispetto alla prole di madri con bassi livelli di LG-ABN. Quindi i piccoli di madri con alti livelli di cure materne mostrano effetti simili a quelli dei piccoli *handled* (Liu et al., 1997; Caldji et al., 1998). Le differenze tra piccoli sottoposti ad alti e bassi livelli di cure materne vanno al di là di processi fisiologici legati alle risposte allo stress, e coinvolgono anche quei sistemi che sono noti mediare lo sviluppo neurale dipendente

dall'esperienza. In particolare i piccoli di madri caratterizzate da alti livelli di cure materne mostrano un aumento nell'espressione di subunità del recettore NMDA per il glutammato e dell'mRNA per BDNF nell'ippocampo, accompagnati da un incremento del rilascio ippocampale di acetilcolina e dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi nei due principali siti di proiezione, l'ippocampo e la corteccia prefrontale (Liu et al., 2000).

Alla luce di questi dati sono stati svolti esperimenti volti a chiarire se l'aumento dei livelli di BDNF in corteccia osservato a P7 nei piccoli di madri arricchite, aumento indotto, quindi, dall'ambiente arricchito, fosse dovuto a variazioni nei livelli di cure materne praticate da madri EC rispetto a madri SC.

Una dettagliata analisi del comportamento di cure materne ha permesso di evidenziare che i piccoli cresciuti in condizioni di arricchimento esperiscono maggiori livelli di cure materne rispetto ai piccoli allevati in condizioni standard. Nei roditori le cure materne si verificano ad intervalli, alternate a periodi di assenza della madre, durante i quali i piccoli rimangono da soli nel nido: il tempo trascorso dai piccoli soli nel nido è molto più breve negli animali arricchiti rispetto a quelli standard; i piccoli arricchiti non sono quasi mai soli nel nido (Sale et al., 2004; Figura 1.6). Uno dei più critici comportamenti materni per la normale crescita dei piccoli è la stimolazione orale e ano-genitale (licking), già associata con la regolazione ormonale della crescita e con lo sviluppo delle risposte neuroendocrine e comportamentali allo stress (Liu et al., 1997). È stato osservato che le madri arricchite praticano livelli più alti di licking rispetto alle madri allevate in altri contesti ambientali; inoltre, mentre i livelli di licking declinano progressivamente nelle condizioni standard, essi rimangono stabilmente alti, almeno nei primi 10 giorni dopo il parto, negli animali arricchiti (Figura 1.7; Sale et al., 2004; Cancedda et al., 2004).

Quindi, livelli differenti di cure materne in differenti condizioni ambientali possono agire come mediatori indiretti per i più precoci effetti dell'arricchimento sullo sviluppo del sistema visivo, determinando, per esempio, il picco di BDNF a P7 negli animali arricchiti (Cancedda et al., 2004; Sale et al., 2004).

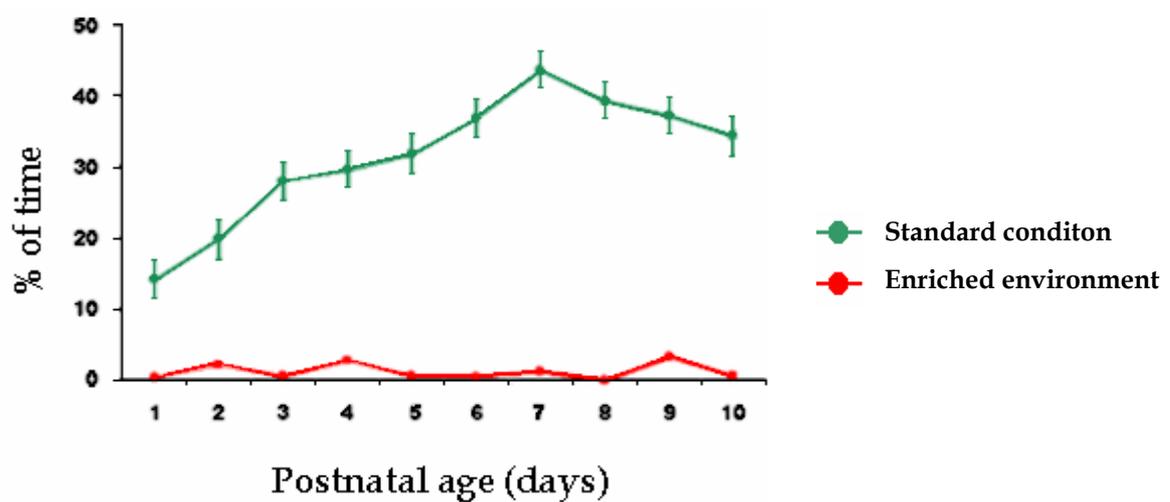


Figura 1.6: i piccoli in condizione arricchita non sono mai da soli all'interno del nido. Percentuale di tempo in cui i piccoli rimangono da soli all'interno del nido durante i primi 10 giorni dopo il parto in condizione standard (verde) e arricchita (rosso). L'ANOVA a due vie indica un effetto significativo sia dell'età sia delle condizioni ambientali di allevamento ($P < 0.001$) e un'interazione significativa tra età e condizioni ambientali di allevamento ($P < 0.001$). L'analisi SNK post hoc indica che i gruppi differiscono statisticamente. Le barre indicano il SEM. Riadattato da Sale et al. (2004).

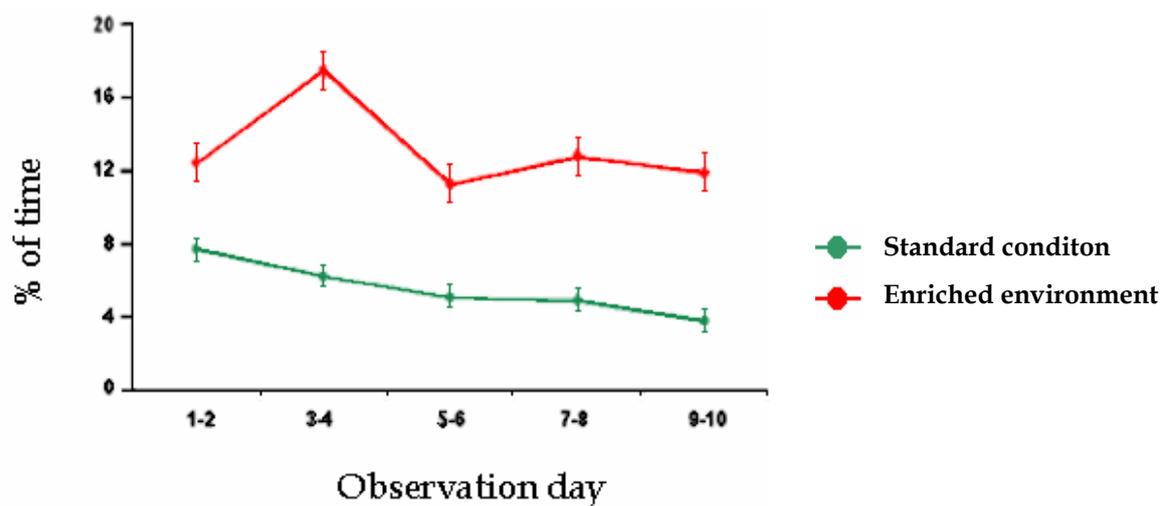


Figura 1.7: i piccoli in condizione arricchita esperiscono livelli più alti di licking. Frequenza di licking registrata durante i primi 10 giorni dopo il parto in condizione standard (verde) e arricchita (rosso). È stato sommato il licking materno e quello effettuato dalle altre femmine presenti. L'ANOVA a due vie rivela un effetto significativo dell'età e delle condizioni ambientali di allevamento ($P < 0.001$) e un'interazione significativa tra età e condizioni ambientali di allevamento ($P = 0.006$). L'analisi SNK post hoc indica che i gruppi differiscono statisticamente. Le barre indicano il SEM. Riadattato da Sale et al. (2004).

EE prenatale e sviluppo del sistema nervoso centrale.

La possibilità che durante la gravidanza la madre possa influenzare lo sviluppo del feto è avvalorata da studi secondo i quali fattori materni di crescita potenzialmente importanti per lo sviluppo del sistema nervoso possono attraversare la barriera placentare o regolare la crescita del feto. Infatti la madre può influenzare lo sviluppo del sistema nervoso del piccolo attraverso il comportamento di cure materne, nel periodo che segue la nascita, oppure attraverso lo scambio da madre ad embrione di sostanze (ormoni e neurotrofine) durante la gestazione. Uno di questi fattori è l'Insulin-like Growth Factor (IGF-I), che si sa essere coinvolto nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso.

IGF-I : un fattore importante per lo sviluppo del sistema nervoso.

- Il peptide IGF-I. IGF-I è sintetizzato principalmente nel fegato (Haselbacher et al., 1980) e la sua sintesi è regolata dall'ormone della crescita (GH) ipofisario (Daughaday e Rotwein, 1989; Clemmons e Underwood, 1991); IGF-I è, però, sintetizzato localmente anche in molti altri tessuti, tra cui il sistema nervoso: questo suggerisce che questo peptide possa avere ruoli autocrini o paracrini tessuto-specifici durante il corso del normale sviluppo e della vita dell'organismo (Behringer et al., 1990). Poco è noto, tuttavia, sui fattori ed i meccanismi che regolano l'espressione di IGF-I nel sistema nervoso: ci sono però evidenze che l'ormone della crescita (Hynes et al., 1987; Lobie et al., 1993) e lo stato nutritivo (Lowe et al., 1989; Philipps et al., 1989) possano influenzare l'espressione cerebrale di IGF-I. IGF-I è legato a proteine specifiche ad alta affinità sia nel sangue che negli altri tessuti (IGFBPs; Baxter, 1991; Clemmons, 1991; Shimasaki et al., 1991; Duan, 2002): si pensa che il legame con esse prolunghi l'emivita di IGF-I, impedendone la proteolisi, e moduli l'interazione del peptide con il relativo recettore, aumentando o diminuendo l'affinità di legame (per una review, vedi Clemmons, 1991 a, b; Clemmons, 1993). Sono state identificate sei diverse IGFBPs, denominate IGFBP1-IGFBP6 (Shimasaki et al., 1991; Drop et al., 1992): queste proteine fanno parte di una famiglia proteica, che condivide un comune motivo cisteinico nei terminali

amminico e carbossilico, che rende conto della loro capacità di legare IGF-I (Drop et al., 1992). L'azione di IGF-I è mediata dall'interazione con specifici recettori presenti sulla membrana cellulare (Czech, 1989). Il recettore specifico, a cui IGF-I si lega con elevata affinità, è il recettore per i fattori di crescita insulino-simili di tipo I (IGFR-I), ma l'ormone cross-reagisce, sebbene con livelli di affinità molto inferiori, con altri recettori (Massague e Czech, 1982): in particolare, IGF-I lega con moderata affinità il recettore per i fattori di crescita insulino-simili di tipo II (IGFR-II, che è il recettore specifico di IGF-II) ed ha scarsa affinità anche per il recettore dell'insulina (Massague e Czech, 1982).

- Effetti sistemici di IGF-I. IGF-I media la maggior parte degli effetti dell'ormone della crescita (GH) sulla crescita somatica (Baxter, 1986; Daughaday e Rotwein, 1989; Behringer et al., 1990; Jones e Clemmons, 1995). Numerose osservazioni, infatti, hanno indicato che le azioni dell'ormone somatotropo, sia sull'accrescimento corporeo che sul metabolismo, si esplicano nelle cellule bersaglio in modo più complesso di quanto avvenga per altri ormoni. La molecola ormonale, pur legandosi con una proteina recettrice membranale, può esplicare le sue azioni solo in presenza di altri fattori, che ne esaltano e completano gli effetti. Il primo di questi fattori ad essere identificato è stato denominato somatomedina. Sono stati poi riconosciuti altri fattori dello stesso tipo, facilitanti o mediati l'azione del GH, tanti da creare un gruppo, detto delle somatomedine: si tratta di peptidi che, per la loro somiglianza strutturale con il pro-ormone insulinico, sono anche noti come fattori di crescita insulino-simili (IGF); di questa famiglia fa parte IGF-I. Il GH ha due principali azioni strettamente correlate: stimola l'accrescimento corporeo e regola il metabolismo cellulare. L'ormone somatotropo esplica un'intensa azione stimolante sull'accrescimento corporeo, soprattutto nel periodo giovanile; essa si esprime in vario modo sui diversi apparati, ma influenza principalmente lo sviluppo scheletrico. Nelle ossa lunghe il GH stimola, nelle cartilagini in accrescimento, la condrogenesi dal lato epifisario e l'ossificazione da quello diafisario, determinando così il loro allungamento e l'accrescimento della statura. Il GH stimola l'accrescimento anche di altri tessuti, provocando un aumento dimensionale dei visceri e della muscolatura scheletrica, un'azione che concorre ad aumentare il peso

corporeo e che si interrompe normalmente dopo la pubertà. Il GH esplica la sua azione sullo sviluppo somatico stimolando la moltiplicazione e l'accrescimento delle cellule. A livello metabolico, il GH ha azione anabolica. La più intensa azione metabolica del GH sulle cellule di tutti i tessuti, ma particolarmente evidente su quelle del fegato e del muscolo, consiste nell'aumento della produzione e dell'accumulo di proteine. Per quanto riguarda il metabolismo glucidico e lipidico, il GH esercita un'azione lipocinetica e lipolitica: favorisce, cioè, sia la mobilitazione dei lipidi dal tessuto adiposo che il loro ingresso e la demolizione ossidativa delle loro molecole nelle cellule degli altri tessuti. Il GH, inoltre, determina una diminuzione del catabolismo dei glucidi, e quindi tende decisamente ad orientare il metabolismo cellulare verso l'utilizzazione dei lipidi, quali fonti energetiche preferenziali: l'ormone, infatti, facilita la trasformazione in glicogeno del glucosio, che entra nelle cellule, e deprime la glicolisi (vedi Casella-Taglietti, 1996).

- Espressione di IGF-I nel sistema nervoso centrale. Molti lavori suggeriscono che IGF-I sia una proteina importante anche per il sistema nervoso centrale, in particolar modo perché svolge un ruolo essenziale durante lo sviluppo (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996; Anlar et al., 1999; D'Ercole et al., 2002). Infatti, benché IGF-I sia sintetizzato principalmente nel fegato, è prodotto anche in molti altri tessuti del corpo, tra cui il sistema nervoso. I primi studi sul pattern di espressione di IGF-I nel sistema nervoso centrale hanno analizzato il contenuto di mRNA di questo fattore di crescita in varie fasi dello sviluppo embrionale e postnatale: è stato dimostrato che IGF-I è abbondantemente espresso nel cervello di ratto a partire da E14, ma declina rapidamente, raggiungendo un plateau già a P1 (Rotwein et al., 1988; Werther et al., 1990; Bondy et al., 1993). Responsabili della sintesi cerebrale di IGF-I sono sia le cellule gliali che i neuroni (Rotwein et al., 1988). IGF-I, dunque, ha un pattern di espressione, regolato durante lo sviluppo, che presenta un picco in coincidenza con le fasi precoci della crescita neuronale. Tuttavia, studi successivi, tramite ibridazione in situ, hanno analizzato l'espressione di IGF-I durante la maturazione di differenti gruppi di neuroni funzionalmente correlati (Bartlett et al., 1991; Bondy, 1991; Bondy e Lee, 1993a e b) ed hanno rilevato

che, nei diversi sistemi di neuroni presi in considerazione, il picco di espressione di IGF-I è confinato ad una diversa e specifica finestra temporale, correlata alle variazioni regionali dei tempi di sviluppo. Per esempio, lo sviluppo della corteccia cerebellare di ratto ha luogo nelle prime settimane postnatali e, durante questo periodo, si osserva un'intensa espressione di IGF-I nei principali neuroni del cervelletto, le cellule del Purkinje. Nell'ippocampo l'espressione di IGF-I è elevata durante le prime due settimane di vita postnatale, ma permane più a lungo ad alti livelli nel giro dentato, nel quale la proliferazione cellulare non è confinata alle fasi di sviluppo. L'espressione di IGF-I è marcata durante le ultime fasi di vita embrionale nel bulbo olfattivo, mentre inizia solo nei primi giorni di vita postnatale nella corteccia piriforme (Bondy, 1991). Questa osservazione suggerisce che IGF-I venga espresso più precocemente nelle strutture periferiche e solo successivamente nelle strutture più centrali. Tale ipotesi è stata confermata dall'analisi del pattern di espressione di IGF-I nelle diverse stazioni di trasmissione del sistema visivo: infatti, nelle cellule gangliari retiniche è più precoce di quanto non sia nel collicolo superiore, nel tetto ottico e nel talamo (Bondy, 1991). Nella corteccia visiva di ratto l'espressione di IGF-I aumenta a partire da P15 fino a P21 (Ciucci et al., 2007), un periodo di intensa sinaptogenesi in tutti gli strati corticali (Miller, 1986), e che corrisponde all'inizio del periodo critico per il rimodellamento esperienza-dipendente delle connessioni visive nel ratto (Fagiolini et al., 1994). Gli studi di ibridazione in situ hanno dimostrato che l'espressione del gene di IGF-I presenta un picco solo per un breve periodo di tempo, che differisce nelle varie regioni, durante la maturazione del sistema nervoso. IGF-I è espresso anche in molte regioni del sistema nervoso del ratto adulto: nel cervello maturo è particolarmente elevato il contenuto di IGF-I nell'ippocampo, nel bulbo olfattivo e nel cervelletto (Rotwein et al., 1988; Werther et al., 1990; Bondy et al., 1993). Analisi quantitative del contenuto proteico di IGF-I nel sistema nervoso hanno dimostrato che la presenza di questo ormone è più diffusa e consistente di quanto ci si sarebbe potuti aspettare dagli studi di localizzazione dell'mRNA, sia durante lo sviluppo che nella vita adulta (Yamaguchi et al., 1990; Garcia-Segura et al., 1991). Diversi studi hanno dimostrato che IGF-I attraversa la barriera ematoencefalica (Duffy et al., 1988; Reinhardt e Bondy, 1994; Carro et al., 2000; Pulford e Ishii, 2001) e, quindi, il cervello è

influenzato anche dalla componente ematica di IGF-I. E' stato suggerito che i recettori di IGF-I e le IGFBPs, che sono abbondantemente espressi sui capillari cerebrali (Duffy et al., 1988; Lee et al., 1993), possano facilitare il transito di IGF-I al cervello (Reinhardt e Bondy, 1994), benché un recente lavoro escluda il coinvolgimento dei recettori IGF-I e delle IGFBPs e suggerisca un trasporto mediato da un carrier specifico (Pulford e Ishii, 2001).

- Espressione del recettore per IGF-I e delle IGFBPs nel sistema nervoso centrale. Il recettore di IGF-I è stato biochimicamente identificato e caratterizzato nel cervello adulto di topo, ratto e uomo (Gammeltoft et al., 1988; Ocrant et al., 1988; Santos et al., 1994). La sua espressione è ampiamente distribuita nel cervello di ratto adulto (Bohannon et al., 1988; Frolich et al., 1998): virtualmente tutte le regioni cerebrali posseggono siti di legame. Tramite ibridazione in situ, è stato dimostrato che l'mRNA del recettore è ampiamente espresso nel sistema nervoso centrale del ratto, già a partire da E14 (Bondy et al., 1990). Studi quantitativi indicano che il picco di espressione del recettore si verifica tra E15 e E20 (Baron-Van Evercooren et al., 1991). Assunti contestualmente, questi dati suggeriscono che il recettore per IGF-I è ubiquitario nel cervello e che la sua espressione prende avvio precocemente durante lo sviluppo. IGFBP-2, 4 e 5 sono le proteine IGFBPs espresse in maggior quantità nel cervello. L'espressione di IGFBP-2 inizia precocemente durante l'embriogenesi del ratto, almeno a E7 (Wood et al., 1992); nella vita postnatale, tale espressione è confinata all'astroglia (Lee et al., 1993). Durante lo sviluppo i siti di espressione di questa proteina e di IGF-I sono spesso temporalmente e spazialmente correlati, in particolare a livello di cervelletto, retina, sistemi sensoriali (Wood et al., 1990; Wood et al., 1992; Lee et al., 1992; Lee et al., 1993), suggerendo che l'interazione di IGFBP-2 con IGF-I possa influenzare la fisiologia di IGF-I, incrementando la sua concentrazione vicino alle cellule in cui agisce o modulandone gli effetti. L'espressione di IGFBP-4 è più diffusa in fasi avanzate dello sviluppo (Brar e Chernausedk, 1993; Stenvers et al., 1994): a E20 si ha espressione nei neuroni dei gangli basali, nel periodo postnatale precoce l'ippocampo inizia ad esprimere IGFBP-4 e nel ratto adulto IGFBP-4 è anche espresso nei neuroni degli strati II e IV della corteccia cerebrale, nel bulbo olfattivo

e nell'amigdala. L'mRNA di IGFBP-5, come IGFBP-2, esibisce un pattern di espressione temporale, che sembra essere coordinato con l'espressione di IGF-I (Bondy e Lee, 1993a e b; Brar e Chernausk, 1993). Per esempio, IGFBP-5 e IGF-I sono coespressi nei neuroni dei sistemi sensoriali, come quelli del bulbo olfattivo, dei corpi del genicolato e nei nuclei vestibolari (Bondy e Lee, 1993a e b). Per quanto riguarda IGFBP-3, invece, non sono riportati in letteratura studi della sua espressione nel cervello in condizioni fisiologiche, ma è stato osservato che la trascrizione del suo mRNA è indotta a seguito di danno ischemico (Gluckman et al., 1992). IGFBP-1 non sembra essere espresso nel cervello; tuttavia, questa proteina potrebbe essere importante per la funzione del sistema nervoso periferico, dal momento che è stata localizzata tramite analisi immunohistochimica a livello delle sinapsi delle giunzioni muscolari (Ma et al., 1994 a, b).

- Effetti di IGF-I sul sistema nervoso centrale: studi in vitro. I primi studi riguardanti il ruolo di IGF-I sul sistema nervoso sono stati condotti in vitro su specifici tipi cellulari neurali. Numerose sono state le osservazioni effettuate su colture primarie di cellule neuronali. Cellule neuroepiteliali di embrione di topo in coltura sembrano essere dipendenti da IGF-I per la proliferazione e la sopravvivenza (Drago et al., 1991). IGF-I stimola anche la proliferazione di colture di neuroni embrionali, di precursori gliali di topo (Lenoir e Honegger, 1983), e di neuroni del bulbo olfattivo di ratto (Werther et al., 1998). Studi effettuati su neuroni corticali di ratto (Aizeman e DeVellis, 1987) e di embrioni di pollo (Neff et al., 1993) e su motoneuroni spinali di topo (Ang et al., 1992; Ang et al., 1993), indicano infatti che IGF-I promuove la sopravvivenza, ma non stimola la proliferazione dei neuroni. Torres-Aleman et al. (1990) hanno evidenziato che IGF-I promuove la sopravvivenza di neuroni ipotalamici di ratto in coltura. Torres-Aleman et al. (1992) hanno osservato anche che cellule del Purkinje di ratto sopravvivono in coltura in presenza di IGF-I nel mezzo; in modo simile si comportano le cellule granulari del cervelletto (D'Mello et al., 1993). Altre evidenze suggeriscono che IGF-I stimola anche il differenziamento di alcune popolazioni neuronali. Per esempio è stato dimostrato che IGF-I stimola l'allungamento dei neuriti e l'espressione della acido glutammico decarbossilasi in neuroni corticali in coltura (Aizeman e DeVellis, 1987). Inoltre, IGF-I promuove la

crescita neuritica in colture di neuroni simpatici espianati dai gangli lombosacrali dell'embrione di pollo (Zackenfels et al., 1995), ma anche il differenziamento postmitotico di colture di neuroni sensoriali, isolati dai gangli delle radici dorsali di ratti adulti (Ferryhough et al., 1993). Recentemente è stato osservato che IGF-I stimola il differenziamento neuronale delle cellule staminali del cervello di ratti adulti (Brooker et al., 2000).

- Effetti di IGF-I sul sistema nervoso centrale: studi in vivo. Gli studi in vivo sull'azione di IGF-I si sono focalizzati principalmente sui topi transgenici con alterazioni genetiche dell'espressione di IGF-I, del suo recettore e delle IGF-BPs. Sono state generate molte linee di topi con alterazioni genomiche del sistema proteico di IGF-I (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996; D'Ercole et al., 2002). I primi topi transgenici studiati sono stati quelli che sovraesprimono IGF-I (Mathews et al., 1988; Behringer et al., 1990). In relazione al grado di espressione del transgene nei tessuti nelle diverse linee di questi topi, una ragguardevole crescita somatica inizia a 3-4 settimane di età e conduce, in età adulta, ad un incremento di peso di circa il 30% rispetto ai topi wild-type. Questi topi presentano una crescita particolarmente sproporzionata di alcuni organi, in particolare del cervello (Ye et al., 1995; Ye et al., 1996), in relazione al grado di espressione organo-specifica del transgene, diverso nelle varie linee di topi mutanti. Sono stati creati un gran numero di altri topi transgenici IGF-I, usando diversi tipi di promotori, in modo da ottenere una sovraespressione di IGF-I organo-specifica (per una review, vedi D'Ercole et al., 2002). Per esempio è stata generata una linea di topi transgenici, che sovraesprime IGF-I solo nel sistema nervoso centrale (Ye et al., 1996). La sovraespressione di IGF-I a livello cerebrale incrementa il numero di neuroni, come evidenziato dall'aumento del contenuto di DNA (Behringer et al., 1990), le dimensioni dei corpi cellulari dei neuroni, l'estensione delle ramificazioni neuritiche (Gutierrez-Ospina et al., 1996), il contenuto di mielina (Ye et al., 1995). Analisi morfometriche e stereologiche del cervello di topi transgenici sovraespressanti IGF-I hanno riportato un sostanziale incremento del numero totale di neuroni nella corteccia cerebrale (Gutierrez-Ospina et al., 1996), nella corteccia cerebellare (Ye et al., 1996), nel giro dentato dell'ippocampo (O'Kusky et al., 2000)

ed in alcuni nuclei del tronco dell'encefalo (Dentremont et al., 1999). Anche la generazione e lo studio dei topi portatori di delezioni dei geni di IGF-I e del recettore di IGF-I hanno fornito evidenze dirette del ruolo importante di IGF-I nella crescita somatica e del recettore IGFR-I nel mediare le azioni di IGF-I (Efstratiadis, 1998). I topi omozigoti per la delezione di IGF-I, cioè i topi knock-out, hanno un marcato ritardo della crescita embrionale e postnatale ed hanno scarse probabilità di sopravvivere dopo la nascita (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993). I topi knock-out per il recettore di IGF-I esibiscono un ritardo ancora più consistente della crescita embrionale ed invariabilmente non sopravvivono al parto. La delezione eterozigote sia di IGF-I che del recettore ha, invece, un impatto meno drammatico (Baker et al., 1993). I cervelli dei topi knock-out sono molto più piccoli rispetto ai controlli, sebbene il ritardo nello sviluppo risulti meno marcato rispetto a quello somatico; non sono state riscontrate, però, anomalie morfologiche (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993). Negli animali con delezione del gene IGF-I (Beck et al., 1995; Camarero et al., 2001) è stata osservata una diminuzione del numero di neuroni nella corteccia cerebrale, nel giro dentato dell'ippocampo, nello striato e nel nucleo cocleare.

- IGF-I: neurogenesi e apoptosi. Quanto abbiamo riportato sull'espressione di IGF-I e delle proteine ad esso correlate, sugli studi in vitro e sulle linee di topi transgenici indica che IGF-I promuove lo sviluppo del sistema nervoso centrale, incrementando il numero dei neuroni e delle connessioni sinaptiche, in parallelo all'estensione delle arborizzazioni neuritiche dei singoli neuroni. Inoltre, l'incremento del numero di neuroni sembra derivare sia da un incremento della proliferazione neuronale che da un'inibizione dell'apoptosi durante la fase dello sviluppo caratterizzata da una massiva ondata di morte neuronale. Mentre gli studi in vitro hanno evidenziato che IGF-I è essenziale per la proliferazione ed il differenziamento neuronale (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996), la maggior parte delle evidenze in vivo documentano un'azione antiapoptotica di IGFI. Studi morfometrici dettagliati sono stati effettuati solo in topi transgenici, in cui l'espressione di IGF-I inizia nel periodo postnatale, quando la fase di proliferazione si è conclusa nella maggior parte delle regioni del sistema nervoso centrale (Hicks e D'Amato, 1968; Spreafico et al., 1995;

Verney et al., 2000). Iniezioni intraperitoneali di BrdU (5-bromo-2'-deossiuridina) non hanno evidenziato una differenza nella proporzione delle cellule marcate tra i topi transgenici e quelli normali (Ye et al., 1996; Dentremont et al., 1999; Camarero et al., 2001). L'analisi del tasso di apoptosi, tramite tecnica TUNEL, ha rivelato, invece, un significativo decremento nei topi transgenici rispetto ai controlli (Dentremont et al., 1999; Camarero et al., 2001; Chrysis et al., 2001). L'attività della caspasi-3 è fortemente ridotta nei topi transgenici così come l'espressione dei geni pro-apoptotici Bax e Bad, mentre l'espressione dei geni anti-apoptotici Bcl-2 aumenta (Baker et al., 1999; Dentremont et al., 1999; Camarero et al., 2001; Chrysis et al., 2001). Questi dati confermano ulteriormente che IGF-I inibisce l'apoptosi neuronale durante lo sviluppo postnatale precoce del sistema nervoso. Solo nel giro dentato dell'ippocampo dei topi che sovraesprimono IGF-I si può osservare sia un incremento della proliferazione cellulare che una diminuzione del tasso di apoptosi (O'Kusky et al., 2000): indicando che IGF-I agisce incrementando la proliferazione neuronale ed inibendo l'apoptosi in questa regione cerebrale, in cui la neurogenesi si prolunga fino alla vita adulta. L'espressione di IGF-I nel cervello dei roditori, tuttavia, ha inizio già durante la vita embrionale (da E14 o prima; Bach et al., 1991); esso è espresso anche nelle cellule staminali neurali del cervello adulto (Brooker et al., 2000). Inoltre, molte regioni del sistema nervoso centrale dei roditori hanno picchi di espressione di IGF-I da E16 a E21 (Bondy, 1991). Tutte queste osservazioni indicano la possibilità di un'azione di IGF-I durante lo sviluppo embrionale del sistema nervoso. Infatti, un lavoro di recente pubblicazione ha evidenziato che IGF-I ha un importante ruolo nello sviluppo del sistema nervoso anche più precocemente della fase di morte neuronale massiva (Popken et al., 2004): Popken e colleghi hanno creato un topo transgenico che sovraesprime IGF-I già durante la vita prenatale sotto il controllo del promotore della nestina, proteina del citoscheletro, espressa nei progenitori neurali nella maggior parte delle regioni del sistema nervoso centrale (Hockfield e McKay, 1985) ed i cui livelli di espressione declinano però rapidamente una volta che le cellule si differenziano verso un destino neuronale o gliale (Zimmerman et al., 1994; Dahlstrand et al., 1995; Matsuda et al., 1996) ed hanno osservato che in questi topi si osserva un incremento del volume tissutale di molte regioni cerebrali (tra cui la corteccia, lo striato,

l'ippocampo, i gangli della base, il talamo), già significativo durante la vita embrionale (E18) ed ancora più consistente dopo la nascita (P12). In età embrionale, così come dopo la nascita, la densità cellulare non differisce significativamente tra gli animali transgenici e quelli di controllo, mentre il numero totale di cellule è significativamente superiore nel cervello dei topi transgenici. L'espressione embrionale di IGF-I in questi topi ha inizio durante la fase proliferativa di neurogenesi dello sviluppo e prima dell'inizio dell'ondata di apoptosi. Marcando le cellule neuroepiteliali in proliferazione delle zone ventricolare e subventricolare degli embrioni E14 con BrdU (5-bromo-2'-deossiuridina), è stato osservato che IGF-I accelera la mitosi nei topi transgenici. In relazione, invece, alla marcatura con l'anticorpo contro la caspasi-3, si può apprezzare una significativa riduzione della morte cellulare dei neuroni nella corteccia cerebrale. Tali risultati dimostrano, quindi, che IGF-I promuove lo sviluppo cerebrale sia durante l'embriogenesi che durante la vita postnatale precoce, in un primo tempo stimolando la proliferazione delle cellule neuronali e successivamente inibendo i processi apoptotici (Popken et al., 2004): probabilmente, la stimolazione della proliferazione delle cellule embrionali avviene tramite un meccanismo che coinvolge la riduzione della lunghezza del ciclo cellulare (Popken et al., 2004). Già precedentemente era stato osservato, infatti, che IGF-I in colture di cellule staminali di muscolo scheletrico riduce la transizione da fase G1 a fase S (Chakravarthy et al., 2000). Gli effetti in vivo di IGF-I sulle cinetiche del ciclo cellulare sono state analizzate su embrioni di topi transgenici nestina/IGF-I ed è stato osservato che i progenitori neuronali degli animali transgenici hanno un ciclo cellulare più corto del normale: in particolare, è stato rilevato che questo decremento della durata totale del ciclo cellulare è dovuto interamente ad una riduzione della lunghezza della fase G1 (Hodge et al., 2004), che negli animali normali aumenta, invece, con lo sviluppo (Takahashi et al., 1995). Inoltre, nei topi transgenici nestina/IGF-I è significativamente aumentata la proporzione di cellule che rientrano nel ciclo cellulare: IGF-I, dunque, mantiene alta anche la frazione proliferativa (frazione P) di progenitori neurali (Hodge et al., 2004), che normalmente andrebbe diminuendo (Takahashi et al., 1994; Takahashi et al., 1996). Analisi morfometriche della corteccia cerebrale (in particolare, dell'area somatosensoriale) di topi MT-1/IGF-I hanno rivelato, nonostante l'incremento del

numero totale dei neuroni, un significativo decremento nella densità dei corpi cellulari (cellule per unità di volume): questa osservazione indica che il volume occupato dai processi neuritici dei neuroni, che separano i singoli corpi cellulari, è notevolmente ampliato ed è perfettamente in linea con gli studi in vitro, precedentemente menzionati, che hanno dimostrato che IGF-I promuove il differenziamento di alcune popolazioni neuronali (Aizeman e DeVellis, 1987; Nataf e Monier, 1992; Fernyhough et al., 1993; Zackenfels et al., 1995; Brooker et al., 2000). Inoltre è noto che IGF-I gioca un ruolo centrale nella costruzione della citoarchitettura della retina (Hernandez-Sanchez et al., 1995), nell'ambito della quale promuove la proliferazione e il differenziamento cellulare (Frade et al., 1996) e ha effetti neuroprotettivi sulle cellule gangliari di ratto a seguito del taglio del nervo ottico (Kermer et al., 2000).

Riepilogando, gli studi in vitro ed in vivo hanno fornito incontestabili evidenze che IGF-I promuove lo sviluppo del sistema nervoso, incrementando il numero dei neuroni e l'elongazione dei processi neuritici. IGF-I esercita la sua azione sul numero di neuroni, sia incrementando il tasso di proliferazione che inibendo l'apoptosi dei neuroni in due fasi differenti dello sviluppo. Alcune regioni del sistema nervoso, in particolare il giro dentato dell'ippocampo, sono dipendenti dagli effetti proliferativi di IGF-I anche in fasi successive.

- IGF-I media gli effetti dell'esercizio fisico sul sistema nervoso. Recenti evidenze associano l'esercizio fisico a diversi indicatori di funzionalità neuronale, come un'incrementata espressione dei fattori neurotrofici, un potenziamento dell'espressione genica e un aumento della neurogenesi ippocampale (Neeper et al., 1995; van Praag et al., 1999 a, b). Tuttavia, i meccanismi, che sono alla base di queste modificazioni, non sono stati identificati per diverso tempo. Dal momento che è stato dimostrato che, a seguito di esercizio fisico, aumentano i livelli ematici di IGF-I (Schwarz et al., 1996; Wallace et al., 1999), è stato ipotizzato che IGF-I possa modulare la risposta cerebrale all'attività fisica. Carro et al. (2000) hanno osservato che abbondanti quantità di IGF-I ematico passano nel tessuto cerebrale, attraversando la barriera ematoencefalica, in ratti sottoposti ad esercizio fisico: già dopo un'ora di corsa sulla ruota, infatti, si può mettere in evidenza una diffusa marcatura di differenti aree cerebrali (corteccia, ippocampo, striato, setto, talamo,

ipotalamo, cervelletto e molti nuclei del tronco encefalico) con anticorpi contro IGF-I, mentre negli animali di controllo si rileva solo una debole marcatura. La maggior parte delle cellule che accumulano IGF-I sono neuroni, come si può dedurre dalla tipica morfologia e dalla positività di marcatura per la calbindina. Inoltre, l'iniezione intra-carotidea di IGF-I marcato con digossigenina risulta in una marcatura delle stesse aree cerebrali marcate dopo l'esercizio fisico (Carro et al., 2000). La scoperta più interessante è che la somministrazione di IGF-I mima, almeno in parte, gli effetti dell'esercizio fisico: infatti, l'esercizio fisico e la somministrazione di IGF-I determinano un comune pattern di espressione di c-Fos nel sistema nervoso centrale; inoltre, un incremento simile dell'espressione ippocampale di BDNF è stato trovato sia in animali sottoposti ad esercizio fisico sia negli animali trattati con IGF-I (Carro et al., 2000). Per determinare se il passaggio di IGF-I dalla barriera ematoencefalica è critico nella mediazione degli effetti dell'esercizio fisico, è stato bloccato l'uptake di IGF-I da parte delle cellule cerebrali prima che gli animali fossero sottoposti al training fisico: la cronica somministrazione nel liquido cerebrospinale di un anticorpo antiIGF-I insieme ad un antagonista del recettore di IGF-I (JB-1) risulta in un blocco del passaggio di IGF-I nel cervello e questa procedura determina anche un blocco dell'attivazione di c-Fos. Questo lavoro suggerisce un nuovo ruolo fisiologico di IGF-I tramite un meccanismo che prevede il passaggio di IGF-I dal circolo sanguigno al cervello, il suo accumulo in specifici gruppi neuronali, la stimolazione dell'espressione neuronale di c-fos e BDNF e l'induzione di modificazioni a lungo termine dell'attività neuronale. Studi successivi, effettuati dallo stesso gruppo, hanno dato ulteriore corpo all'evidenza che IGF-I media gli effetti dell'esercizio fisico. Trejo et al. (2001) hanno dimostrato che l'uptake cerebrale di IGF-I ematico media gli effetti stimolanti dell'esercizio fisico sulla neurogenesi ippocampale: infatti, bloccando il passaggio di IGF-I dal circolo sanguigno al cervello in ratti sottoposti ad intenso esercizio fisico, si ottiene una completa inibizione nell'incremento di neuroni ippocampali. Altre osservazioni che permettono di accomunare le azioni sul sistema nervoso dell'esercizio fisico e dell'IGF-I includono l'aumento delle prestazioni in tests di memoria (Sonntag et al., 1997; Markowska et al., 1998; Radaka et al., 2001), l'incremento dell'angiogenesi (Black et al., 1990; Sonntag et al., 1997) e

del consumo cerebrale di glucosio (Cheng et al., 2000; Ide e Secher, 2000). Carro et al. (2001), partendo dall'osservazione che la somministrazione sistemica di IGF-I, da cui scaturisce un incremento dei livelli cerebrali di IGF-I, ha effetti neuroprotettivi (Fernandez et al., 1999), hanno messo in evidenza che IGF-I media anche gli effetti neuroprotettivi dell'esercizio fisico: infatti, la somministrazione sottocutanea di un anticorpo bloccante IGF-I, che impedisce l'uptake cerebrale di IGF-I, ad animali sottoposti ad esercizio fisico neutralizza gli effetti protettivi dell'esercizio fisico in ogni tipo di modello animale di lesione o patologia neurodegenerativa studiato.

Arricchimento ambientale e stress prenatale.

L'ambiente può esercitare una profonda influenza anche prima della nascita: i dati disponibili circa l'influenza dell'ambiente sullo sviluppo del sistema nervoso durante il periodo prenatale sono relativi agli effetti deleteri dello stress prenatale sullo sviluppo embrionale, come riportato da numerosi studi (per una review, vedi Mulder et al., 2002).

Lo stress prenatale è strettamente associato con ritardo della crescita (Barlow et al., 1978; Benesova et al., 1989), con malformazioni strutturali (Benesova et al., 1989), con ritardo nello sviluppo motorio (Gramsbergen et al., 1998), e con anomalie comportamentali e riduzione delle funzioni cognitive che si presentano in età adulta (Shiota e Kayamura, 1989; Shneider, 1992; Poltyrev et al., 1996; Lordi et al., 1997; Szuran et al., 2000; Kofman, 2002; Weinstock, 1997). Nell'uomo è noto che i figli di madri sottoposte a stress durante la gravidanza mostrano un aumento del rischio di morte improvvisa dovuto a malformazioni strutturali, un aumento della frequenza di aborto spontaneo, peso ridotto alla nascita e anomalie comportamentali a lungo termine (per una review, vedi Kofman, 2002). In particolare studi retrospettivi hanno dimostrato che esiste una correlazione tra lo stress prenatale della madre e diverse forme di patologie psicologiche, come la schizofrenia e la depressione (Ward, 1991).

La vasta letteratura disponibile nel campo delle ricerche animali conferma questi dati, dimostrando che lo stress prenatale è strettamente associato con anomalie fisiche quali ritardo della crescita (Barlow et al., 1978; Benesova e Pavlik, 1989), malformazioni a livello strutturale (Benesova e Pavlik, 1989) e ritardo dello sviluppo motorio (Gramsbergen and

Mulder, 1998), e con modificazioni a livello comportamentale evidenti in età adulta, come scarso istinto esplorativo e alti livelli di comportamento ansioso (Wakshlak and Weinstock, 1990; Poltyrev et al., 1996), diminuzione delle funzioni cognitive (Shiota e Kayamura, 1989; Schneider, 1992; Lordi et al., 1997; Szuran et al., 2000; Kofman, 2002), e anomalie a livello sociale e sessuale (Weinstock, 1997; Frye and Orecki, 2002; Kofman, 2002).

Si pensa che questi effetti siano dipendenti, in modo parziale o totale, dall'aumento dei livelli di alcuni ormoni nella circolazione sanguigna del feto, che può ricevere quantità anormali di glucocorticoidi prodotti dalla madre in condizione di stress, i quali possono attraversare la barriera placentare (Mulder et al., 2002). Inoltre, sebbene esistano alcuni meccanismi volti a proteggere il feto dal cortisolo prodotto dalla madre (questo succede specialmente nei feti umani), una sovrapproduzione di glucocorticoidi nel feto può essere causata da quantità di cortisolo che sfuggono ai meccanismi di inattivazione a livello placentare.

Gli effetti deleteri dello stress prenatale non sembrano essere irreversibili, ma possono essere annullati da trattamenti che agiscono sulla qualità dell'ambiente esperita dal soggetto in sviluppo dopo la nascita. È stato dimostrato che l'arricchimento ambientale effettuato a partire dal momento dello svezzamento annulla i disturbi provocati dallo stress prenatale sul comportamento di gioco sociale e sulle capacità di risposta allo stress indotto (Morley-Fletcher et al., 2003). Inoltre è stato dimostrato che l'arricchimento ambientale effettuato molto precocemente dopo la nascita annulla le alterazioni immunologiche in ratti stressati durante il periodo prenatale (Laviola et al., 2004) e annulla anche i difetti riscontrati nelle abilità cognitive, nella proliferazione cellulare e nell'espressione di proteine sinaptiche (Koo et al., 2003).

Tuttavia non esistono prove dirette che documentino l'influenza dell'arricchimento ambientale materno durante la gravidanza sullo sviluppo della prole, cioè mentre sono in corso gli eventi di maturazione.

Arricchimento ambientale prenatale e sviluppo retinico.

Uno studio di recente pubblicazione (Sale et al., 2007), nell'ambito del quale si inserisce il lavoro da me svolto per questa tesi, ha preso in esame questo aspetto del problema, cercando di individuare e caratterizzare gli effetti del protocollo sperimentale dell'arricchimento ambientale prenatale sullo sviluppo del sistema visivo del feto, riferendosi in particolare alla retina.

Per studiare se le condizioni ambientali durante il periodo prenatale abbiano qualche impatto sullo sviluppo del sistema nervoso degli embrioni, questa ricerca ha analizzato gli effetti di tale protocollo sperimentale, effettuato per l'intera durata della gravidanza, su caratteristiche anatomiche e molecolari della maturazione del sistema visivo, analizzate sia nel periodo prenatale sia immediatamente dopo la nascita, prestando un'attenzione particolare al processo di morte cellulare naturale che caratterizza le fasi precoci dello sviluppo retinico.

La scelta di monitorare lo sviluppo precoce del sistema visivo del ratto attraverso l'analisi della maturazione della citoarchitettura retinica è dovuta al fatto che questa struttura si sviluppa come evaginazione delle vescicole telencefaliche, ed è quindi una parte facilmente accessibile del sistema nervoso centrale, e pertanto rappresenta un potente strumento sperimentale per lo studio dei processi che avvengono a livello cerebrale. Lo sviluppo retinico del ratto, poi, è un processo che avviene in una fase molto precoce della vita dell'animale e segue un andamento temporale che è già sufficientemente noto per quanto riguarda le dinamiche generali.

La struttura altamente organizzata della retina, descritta nel paragrafo "L'obiettivo di questo studio: la retina" della presente introduzione, viene raggiunta attraverso stadi di sviluppo successivi, costituiti da fenomeni quali la proliferazione cellulare, il differenziamento e la migrazione dei progenitori neurali retinici, e la sinaptogenesi. Questi stadi di sviluppo sono altamente regolati a livello temporale e avvengono con un ordine conservato in tutte le specie studiate fino ad ora, ma con decorso temporale diverso per ogni tipo cellulare della retina.

Durante la fase di intensa neurogenesi, che nel ratto avviene durante l'ultimo periodo di vita fetale, si verifica una sovrapproduzione di RGCs, che inizialmente coincide e poi è immediatamente seguita da un periodo di degenerazione neuronale che porta alla perdita di circa il 50% del numero totale di RGCs (Perry et al., 1983). Questa eliminazione di cellule avviene tramite un programma di morte cellulare naturale (l'apoptosi), un processo che è stato studiato in modo esauriente ed è noto avvenire in quasi tutte le regioni cerebrali esaminate fin ora (per una review, vedi Yuan e Yankner, 2000). In particolare si sa che nella retina di ratto il processo apoptotico inizia intorno al giorno embrionale 17-18 (E17-18), raggiunge il culmine in corrispondenza del primo giorno dopo la nascita (P1) e termina intorno alla prima settimana di vita dell'animale, circa a P10 (Perry et al., 1983). Pertanto lo scopo degli esperimenti svolti nella prima parte di questa ricerca è stato quello di valutare il contributo dell'arricchimento ambientale effettuato nel periodo prenatale, allevando cioè in condizioni arricchite femmine di ratto gravide a partire dal primo giorno di gestazione, sullo sviluppo retinico, utilizzando come modello la curva di sviluppo dell'apoptosi nello strato delle RGCs. Da questi esperimenti è emerso che il decorso temporale della morte per apoptosi negli embrioni viene accelerato a seguito dell'allevamento della madre in condizioni arricchite.

L'arricchimento ambientale materno accelera le dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs nella retina della prole.

Il processo apoptotico è stato inizialmente analizzato tramite la stima del numero dei nuclei picnotici presenti nello strato delle RGCs di piccoli di madri arricchite rispetto a quelli di madri standard, utilizzando retine whole-mount colorate con il cresilvioletto, che evidenzia la condensazione della cromatina (una delle caratteristiche morfologiche delle cellule in apoptosi). È stata riscontrata una marcata diminuzione nel numero di nuclei picnotici nello strato delle RGCs di animali EC rispetto agli animali SC nel primo giorno di vita postnatale (P1), età in cui normalmente, nel ratto, il processo di morte naturale raggiunge il culmine (Figura 1.8). A questa età il numero di cellule picnotiche osservate negli animali EC è diminuito del 40% circa rispetto a quello degli animali SC. È stato poi analizzato se anche durante il periodo che precede la nascita si potessero osservare variazioni nei livelli di morte cellulare programmata ed è stato trovato che nel

diciottesimo giorno di vita embrionale (E18) gli animali EC mostrano un aumento di circa il 70% di cellule picnotiche rispetto agli animali SC (Figura 1.8).

In una seconda serie di esperimenti è stata ripetuta la stima del numero di cellule in apoptosi utilizzando un metodo diverso, quello del TUNEL. Questa metodologia permette di evidenziare la frammentazione del DNA, un'altra caratteristica delle cellule in apoptosi. I risultati ottenuti con la tecnica del cresilvioletto sono stati confermati; è stata infatti osservata una diminuzione del numero di cellule in apoptosi nei ratti EC a P1 rispetto ai ratti SC, e un aumento di questo numero sia a E18 che a E20 nei ratti EC rispetto ai ratti SC (Figura 1.9).

Dato che le variazioni nel numero di cellule picnotiche osservate negli animali EC potrebbero essere dovute anche a modificazioni dello stato di attivazione o del numero di cellule microgliali, è stato stimato il numero e controllata la morfologia delle cellule microgliali retiniche in entrambi i gruppi sperimentali a P1. Per questo esperimento è stata effettuata una marcatura delle cellule microgliali con isolectina B4, che evidenzia tutte le cellule microgliali, sia quelle attive che quelle quiescenti, e permette di individuare sia eventuali variazioni morfologiche o di intensità della marcatura, che riflettono variazioni nel grado di attivazione, sia variazioni nel numero di cellule. Da questo esperimento non sono emerse differenze qualitative tra i due gruppi per quanto riguarda la forma e l'intensità della marcatura (Figura 1.10 A) e il numero di cellule microgliali stimato in EC e SC non differisce statisticamente (Figura 1.10 B).

È stato anche valutato se il cambiamento nel rate di morte naturale osservato negli EC rispetto ai SC inducesse variazioni nel numero finale delle RGCs nell'animale adulto. Per valutare gli effetti delle diverse condizioni di allevamento sul numero finale delle RGCs sono stati usati due diversi metodi di misurazione. Per prima cosa è stato stimato il numero delle RGCs come il 50% del numero totale di cellule presenti nello strato delle RGCs di animali adulti (>P60) EC e SC, secondo il metodo descritto nel lavoro di Perry e collaboratori (1983): il numero delle RGCs è stato stimato su retine whole-mount marcate con il cresilvioletto; dalla conta sono state escluse le cellule piccole con nuclei chiazzati (descritte come cellule gliali; Miller et al., 1981). Seguendo questa procedura non sono emerse differenze nel numero totale di RGCs tra EC e SC (Figura 1.11). Comunque, dal momento che questo metodo è basato sull'assunzione che nello strato delle cellule gangliari sia presente un uguale proporzione di RGCs e di cellule amacrine displaced,

mentre la percentuale relativa di queste due classi di cellule non è nota per quanto riguarda la condizione arricchita, è stato stimato il numero di RGCs usando anche un metodo di misurazione più preciso. Un gruppo separato di ratti EC è stato sottoposto a taglio del nervo ottico, una procedura che porta alla perdita di circa il 95% di RGCs ma che non influisce sul numero di cellule amacrine displaced (Perry et al., 1983). Quindi il numero di cellule gangliari è stato calcolato sottraendo il numero di cellule amacrine displaced contato nella retina ipsilaterale al nervo ottico tagliato dal numero totale di cellule contate nella retina controlaterale. Anche con questo metodo di misurazione non sono state riscontrate differenze nel numero di RGCs nella retina di ratti adulti EC e SC (Figura 1.11). Il numero delle RGCs è stato stimato anche a P1, ovvero nel momento in cui il fenomeno apoptotico raggiunge il culmine, utilizzando il primo dei metodi di misurazione appena menzionati. Anche in questo caso non sono state riscontrate differenze nel numero di RGCs tra condizione arricchita e condizione standard (195240 ± 7009 per gli SC, 185607 ± 7101 per gli EC; t-test, $P=0,347$). Dunque è possibile che il decremento di morte cellulare programmata osservata a P1 negli animali arricchiti possa compensare l'aumento del numero di cellule in apoptosi riscontrato in questi animali durante il periodo embrionale (E18 e E20).

Quindi complessivamente questi risultati dimostrano che i cambiamenti nel numero di cellule picnotiche osservati nei piccoli di madri arricchite, indotti dall'arricchimento ambientale, riflettono una variazione nel decorso temporale delle dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs, che viene accelerato dall'allevamento della madre in condizione arricchita durante la gravidanza.

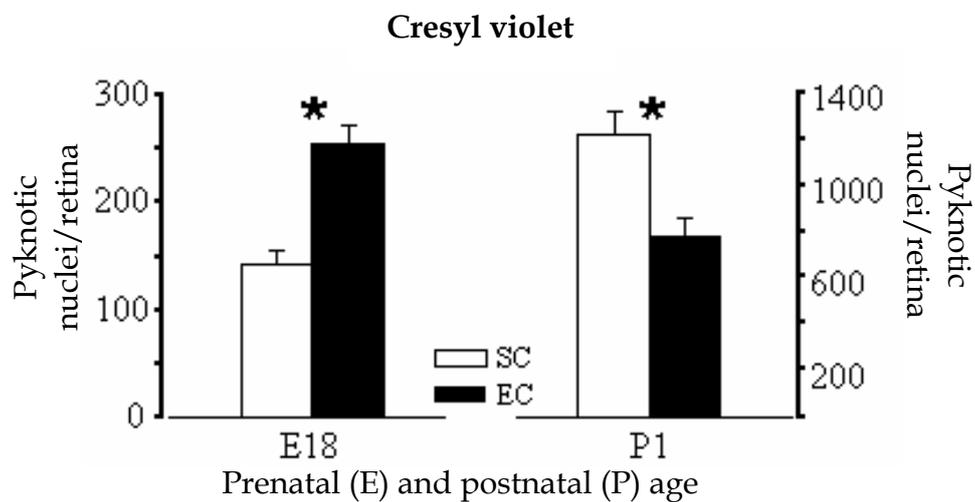


Figura 1.8: stima del numero dei nuclei picnotici nello strato delle cellule gangliari di ratti arricchiti (EC) e non-arricchiti (SC), alle età indicate, con il metodo del cresilvioletto su retine whole-mount. L'ANOVA a due vie dimostra un effetto sia dell'età ($P < 0.001$) sia delle condizioni di allevamento ($P < 0.05$) e un'interazione significativa tra i due parametri (età e condizioni di allevamento). Il test di Mann-Whitney con la correzione di Bonferroni rivela una differenza tra EC e SC a E18 e P1 ($P = 0.02$). Riadattato da Sale et al. (2007).

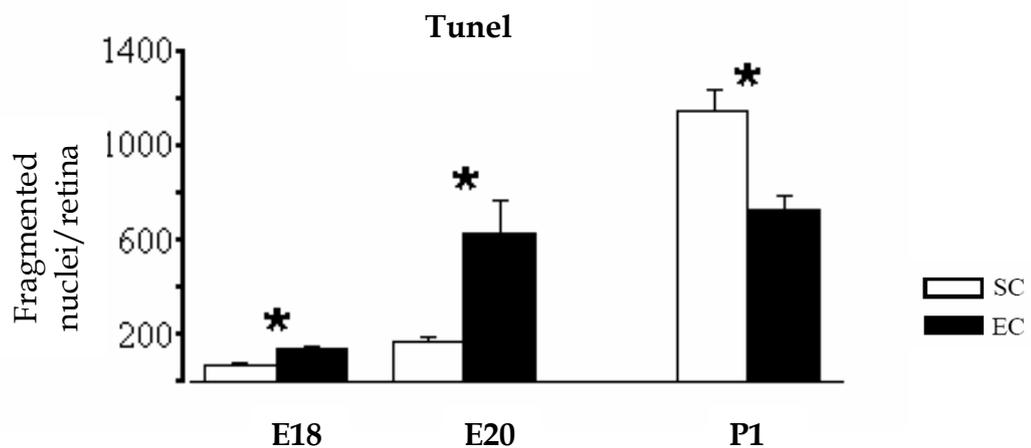


Figura 1.9: stima del numero delle cellule in apoptosi, alle età indicate, con il metodo del TUNEL su sezioni verticali di retina. L'ANOVA a due vie dimostra un effetto sia dell'età ($P < 0.001$) sia delle condizioni di allevamento ($P < 0.05$) e un'interazione significativa tra i due parametri (età e condizioni di allevamento). Il test di Mann-Whitney con la correzione di Bonferroni rivela una differenza tra EC e SC a E18, E20 e P1 ($P < 0.001$). Riadattato da Sale et al. (2007).

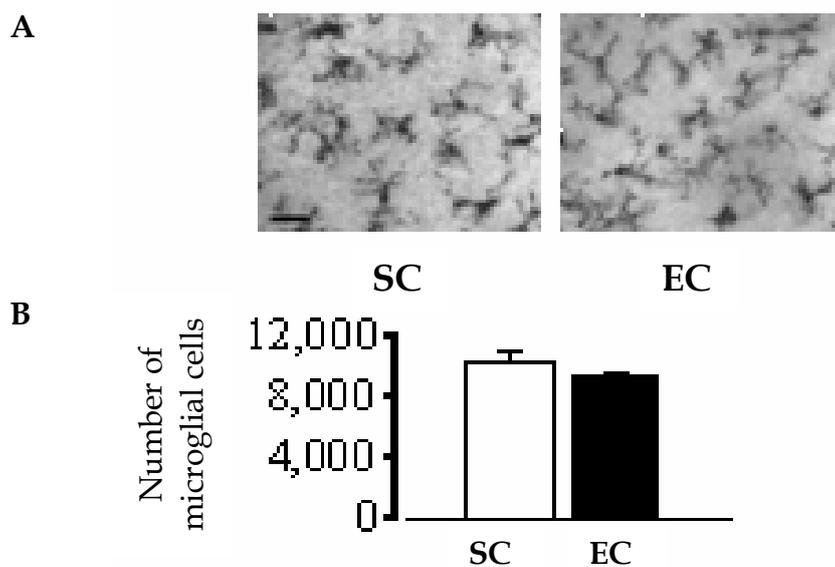


Figura 1.10: analisi della morfologia, dell'intensità della marcatura e del numero di cellule microgliali in ratti EC e SC a P1.

A: micrografia dello strato GCL di retine a P1 whole-mount marcate con isolectina B4. Non sono state riscontrate differenze qualitative né per la forma né per l'intensità della marcatura delle cellule microgliali tra ratti EC e SC. Scale bar: 20 μm .

B: numero di cellule microgliali nello strato GCL di ratti EC e SC. Il test di Mann-Whitney dimostra che non c'è differenza tra i due gruppi ($P=0.429$). Le barre indicano il SEM. Riadattato da Sale et al. (2007).

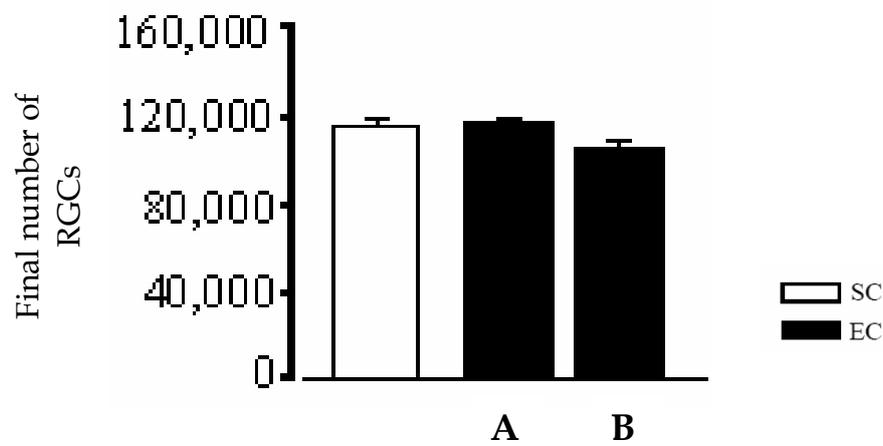


Figura 1.11: misura del numero delle RGCs in animali adulti EC e SC. Il numero finale di RGCs non differisce tra ratti adulti EC e SC sia quando viene stimato come il 50% delle cellule totali presenti nello strato GCL (colonna A), sia quando viene calcolato sottraendo il numero di cellule amacrine displaced rimaste nello strato GCL dopo un periodo di trenta giorni a seguito del taglio del nervo ottico ipsilaterale dal numero di cellule totali presenti nella retina controlaterale (colonna B). ($P=0.77$ e 0.28 , rispettivamente, con il t-test). Riadattato da Sale et al. (2007).

I livelli di espressione di IGF-I aumentano nelle madri allevate in arricchimento ambientale durante la gravidanza e nei loro piccoli.

Una volta evidenziati gli effetti dell'arricchimento ambientale prenatale sulle dinamiche di morte cellulare durante lo sviluppo della retina dei piccoli, si è cercato di chiarire quale potesse essere il meccanismo molecolare coinvolto. Il primo passo è stato quello di verificare se l'allevamento della madre in ambiente arricchito a partire dal primo giorno di gravidanza inducesse qualche variazione nei livelli di fattori di crescita importanti per lo sviluppo del sistema visivo della prole. L'attenzione si è focalizzata sull'Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) che è considerato un forte modulatore della crescita fetale e postnatale e della maturazione degli organi (Olanrewaju et al., 1996), che regola gli stadi precoci dello sviluppo neurale e i cui livelli cerebrali risultano essere fortemente aumentati dall'esercizio fisico sostenuto (Carro et al., 2000).

Pertanto sono stati analizzati i livelli di IGF-I nelle madri EC e sono stati confrontati con quelli delle madri SC. Dato che i livelli di IGF-I nel sangue sono difficili da rilevare a causa del veloce uptake da parte dei tessuti, i livelli di IGF-I sono stati misurati nel cervello e nel latte di femmine di ratto gravide EC e SC. I risultati ottenuti dimostrano che le madri EC presentano livelli più alti di IGF-I nel cervello rispetto alle madri SC, e che il latte prelevato dal contenuto gastrico dei piccoli di madri EC a P1 contiene maggiori quantità di IGF-I rispetto a quello prelevato dai piccoli di madri SC (Figura 1.12).

In parallelo è stata analizzata l'espressione di IGF-I nello strato delle RGCs della prole di madri EC e SC, da E15 a P10, quando il periodo di morte naturale delle RGCs è più o meno concluso. L'espressione di IGF-I è risultata essere regolata durante lo sviluppo: in entrambi i gruppi sperimentali aumenta progressivamente durante le fasi tardive dello sviluppo embrionale e i primi giorni di vita postnatale, per poi declinare intorno a P10. Inoltre è stato osservato un marcato aumento dei livelli di IGF-I nello strato delle cellule gangliari a E15 e a E18 nei ratti EC rispetto agli SC (Figura 1.13). Così questi risultati suggeriscono che gli effetti dell'arricchimento ambientale osservati a livello retinico potrebbero essere spiegati dall'aumento precoce dell'espressione di IGF-I.

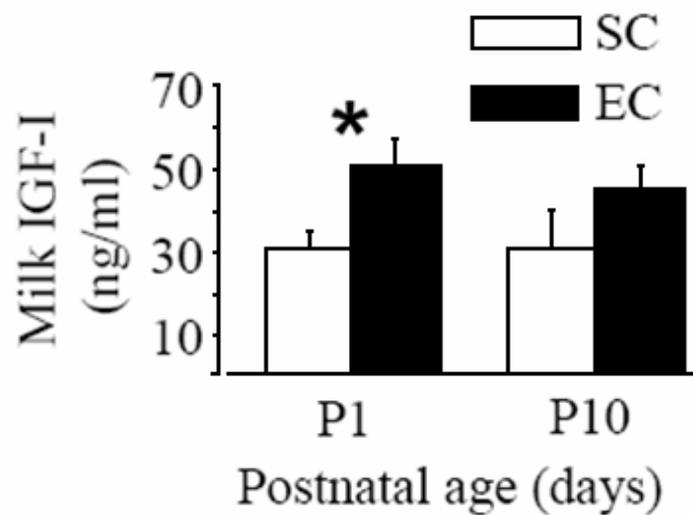


Figura 1.12: la concentrazione di IGF-I aumenta nel latte materno. Determinazione della concentrazione di IGF-I nel latte di ratti neonati EC e SC tramite RIA. L'ANOVA a due vie dimostra una interazione significativa tra età e condizioni di allevamento ($P < 0.05$). Il test post hoc di Tukey rivela una differenza significativa tra EC e SC a P1 ($P < 0.05$), ma non a P10 ($P = 0.258$). Le barre indicano il SEM. Riadattato da Sale et al. (2007).

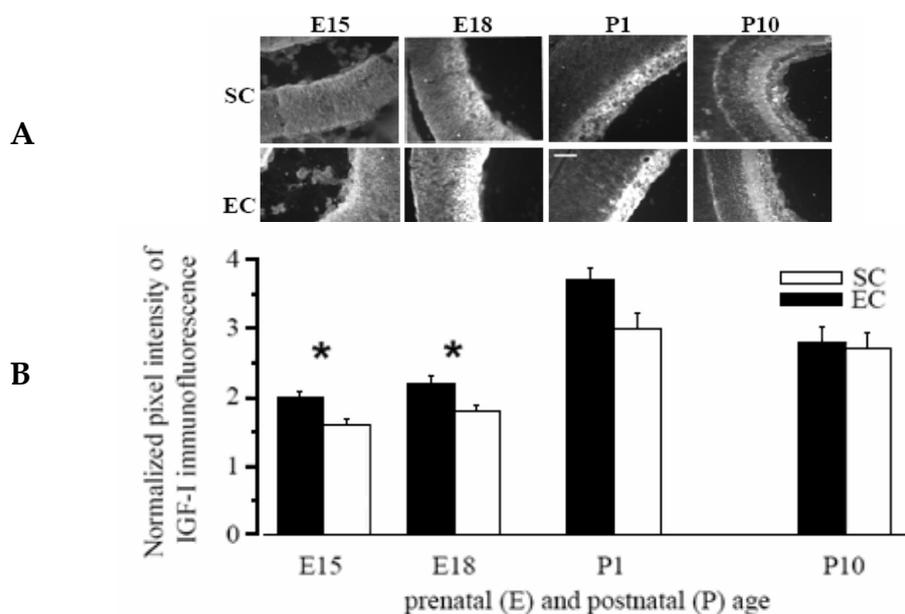


Figura 1.13: l'espressione di IGF-I aumenta nello strato delle cellule gangliari della prole di madri EC. A. micrografie di sezioni di retine EC e SC marcate per IGF-I a differenti età. Scale bar: 50 μ m. **B:** analisi quantitativa per l'immunofluorescenza della marcatura di IGF-I nello strato delle cellule gangliari di ratti EC e SC. L'ANOVA a due vie dimostra un effetto significativo dell'età ($P < 0.001$) e delle condizioni di allevamento ($P < 0.001$). Il t-test con la correzione di Bonferroni rivela una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi a E15 ($P = 0.009$) e E18 ($P < 0.01$). Le barre indicano il SEM. Riadattato da Sale et al. (2007).

L'influenza dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo fetale non è ristretta solo alla retina.

Per caratterizzare meglio l'influenza dell'arricchimento della madre sullo sviluppo globale del piccolo, è stata ricercata la presenza di cambiamenti maturazionali nei soggetti EC e SC al di fuori della retina. Dal momento che IGF-I è un noto modulatore della maturazione cerebellare (Torres-Aleman et al., 1994) e della crescita fetale (Fowden, 2003), sono stati analizzati i livelli di IGF-I nel cervelletto e il peso corporeo dei ratti EC e SC a differenti età. Gli animali arricchiti mostrano un marcato incremento nell'espressione della proteina IGF-I a livello cerebellare, rispetto agli animali standard, e il loro peso corporeo è aumentato di circa il 10%, sia a E18 sia a P1. L'aumento dei livelli cerebellari di IGF-I e del peso corporeo osservati negli embrioni EC suggeriscono che l'allevamento della madre in condizione arricchita durante il periodo della gravidanza influenzi lo sviluppo globale del feto.

SCOPO DELLA TESI.

Lo studio svolto durante il mio periodo di tesi si inserisce nell'ambito dello studio sperimentale svolto nel Laboratorio di Neurobiologia della Scuola Normale Superiore, volto a comprendere quali fossero le influenze dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo del sistema visivo della prole.

Riassumendo i risultati descritti nel capitolo "Arricchimento ambientale prenatale e sviluppo retinico" dell'Introduzione, in questo studio è stato dimostrato che l'arricchimento ambientale precoce induce un'accelerazione del decorso temporale della morte naturale programmata delle RGCs, e che questo effetto è accompagnato da un aumento dei livelli di IGF-I nel cervello e nel latte della madre e nello strato delle RGCs dei piccoli.

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato quello di ampliare l'analisi degli effetti dell'arricchimento ambientale materno sulla maturazione retinica; a questo fine si è scelto di valutare, in animali arricchiti e standard, altri aspetti importanti dello sviluppo retinico, come la migrazione di specifiche popolazioni cellulari retiniche. È stata inoltre approfondita l'analisi di un coinvolgimento di IGF-I negli effetti dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo retinico del feto. In particolare, per determinare se l'aumento dei livelli di IGF-I fosse necessario all'esplicarsi degli effetti dell'EE sullo sviluppo della maturazione retinica, sono stati effettuati esperimenti causali di blocco di IGF-I in madri arricchite e di infusione di questo fattore in madri standard, ed è stata esaminata la migrazione dei progenitori neurali e il decorso temporale della morte naturale programmata nello strato delle cellule gangliari dei loro piccoli.

MATERIALI E METODI.

Trattamento degli animali.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su ratti Long Evans hooded secondo le direttive del Ministero Italiano della Salute per la cura e l'uso degli animali da laboratorio. I piccoli di ratto (P1) sono stati anestetizzati per ipotermia, mentre i giovani (P10) e gli adulti sono stati anestetizzati con cloralio di idrato o con avertina (1 ml/100 g di peso corporeo).

Condizioni di allevamento.

Condizione arricchita (EC).

Le gabbie di arricchimento sono ampie (100x50x82 cm) con tre piani collegati da scale, contenenti diversi serbatoi per il cibo, due ruote per il movimento, e vari oggetti di forme diverse (giochi, tunnel, tubi) che venivano riposizionati e/o sostituiti con altri una volta alla settimana (Figura 3.1B). In ogni gabbia sono state allevate almeno 6 femmine adulte e un maschio. Il maschio veniva rimosso dopo 7 giorni. Con questa procedura l'intera gravidanza avveniva in condizioni arricchite.

Condizione standard (SC).

L'allevamento in condizione standard prevede l'uso di gabbie di dimensioni standard (40x30x20 cm) in cui sono state allevate un massimo di tre animali (due femmine e un maschio; Figura 3.1A). Il maschio veniva rimosso dopo 7 giorni.

In entrambe le condizioni di allevamento l'acqua e il cibo erano disponibili *ad libitum*.

Per fare in modo che la gravidanza avesse inizio in un momento noto allo sperimentatore è stata adottata la seguente procedura: un maschio veniva introdotto e tenuto nella stessa gabbia della femmina dalle 16:00 fino alle 9:00 della mattina successiva., sia nella condizione arricchita che nella condizione standard. Quest'ultimo giorno del calendario veniva considerato come il primo giorno di gestazione (E0). Il giorno del parto (le prime 24 ore dopo il parto) veniva considerato come il primo giorno dopo la nascita (P0).

Istologia.

Per prelevare gli occhi dagli embrioni E15 e E18 le femmine gravide sono state anestetizzate con cloralio idrato e perfuse attraverso il cuore con paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M (pH7.4), e gli embrioni sono stati rimossi tramite isterectomia.

Per prelevare gli occhi dei ratti a P1, i piccoli sono stati perfusi attraverso il cuore con paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M (pH7.4).

Immunoistochimica.

Per la marcatura immunoistologica per DCX sono state utilizzate sezioni verticali di retina (spessore di 16 μ m) ottenute con il criostato. Le sezioni di retina sono state permeabilizzate in triton X100 allo 0.3% (blocking step) e poi incubate in anticorpo policlonale di capra anti-doublecortin (1:1000, C-18 Santa Cruz). In seguito sono state esposte ad anticorpo anti immunoglobuline di capra fatto in coniglio coniugato con la biotina (1:200, Vector lab), seguito da extravidina coniugata a fluoresceina (1:300, Sigma). Il numero degli animali usati per l'analisi di DCX è stato 6 animali a E15 e 5 a E18 per gli EC; 4 animali a E15 e 4 a E18 per gli SC.

Per la marcatura immunoistologica per Islet-1 e calbindin le sezioni verticali di retina sono state incubate, dopo lo step di blocking, con anticorpo monoclonale anti-Islet-1 (1:50, DSHB) e anticorpo policlonale anti-calbindin fatto in coniglio (1:1000, Swant), rispettivamente. La reazione immunoistologica è stata evidenziata usando un anticorpo biotinilato anti-mouse fatto in cavallo o un anticorpo biotinilato anti-rabbit fatto in capra (1:200, Vector lab), seguiti da extravidina coniugata a fluoresceina (1:300, Sigma). Il numero di animali usati per l'analisi di Islet-1 è stato 6 animali a E15 (EC) e 3 a E15 (SC). Per l'analisi di calbindin, invece, sono stati utilizzati 3 animali per gruppo (E15 EC e SC).

Per la marcatura immunoistologica per IGF-I le sezioni verticali di retina sono state processate nel seguente modo. Le sezioni, dopo lo step di blocking, sono state incubate in anticorpo policlonale anti-IGF-I fatto in coniglio (1:500; l'anticorpo ci è stato fornito dal

Prof. Ignacio Torres-Aleman). La reazione immunohistologica è stata evidenziata grazie all'incubazione delle sezioni con un anticorpo biotinilato anti-rabbit fatto in capra (1:200, Vector lab), seguito da extravidina coniugata a fluoresceina (1:300, Sigma). Il numero di animali utilizzati per questo esperimento è stato: 7 animali per EC e 5 animali per SC, a E18.

Analisi dell'intensità della marcatura per DCX e IGF-I, e conta delle cellule marcate per DCX, Islet-1 e calbindin.

Le immagini sono state acquisite sia con il microscopio Zeiss Axiophot connesso con una videocamera Zeiss HR Axiocam ad un ingrandimento 20x e digitalizzate tramite il software Axiovision, sia con il microscopio confocale Olympus Optical ad un ingrandimento del 20x, zoom 1.5, campi di 460x460 μm , acquisiti con una risoluzione di 1024x1024 pixel. I settaggi inerenti a intensità del laser, gain, offset e pinhole sono stati ottimizzati all'inizio della procedura e poi sono stati mantenuti costanti per tutta la durata dello studio. Per ogni retina sono state acquisite almeno 4-5 sezioni (spessore di 16 μm) prese al livello della testa del nervo ottico, e sono stati presi quattro campi per ogni sezione. Le immagini della retina ottenute sono state importate nel sistema per l'analisi di immagini MetaMorph, e sono state usate per valutare il livello di intensità della immunofluorescenza per DCX e per IGF-I e per contare il numero delle cellule marcate per DCX, Islet-1 e calbindin nello strato neuroblastico.

Per IGF-I l'intensità dei pixel è stata misurata all'interno di un'area ottenuta contornando tutto lo strato delle RGCs, mentre per DCX l'area era centrata nello strato dei neuroblasti. Il livello di immunoreattività è stato calcolato come il rapporto tra l'intensità dei pixel e il livello del background, misurato per IGF-I nello strato nucleare esterno e per DCX nella parte interna della retina. I valori ottenuti da almeno 8-10 campi retinici sono stati usati per calcolare il valore medio di intensità dei pixel per animale.

Tutte le acquisizioni e le analisi sono state eseguite "in cieco" rispetto alle condizioni di allevamento e sperimentali. Per vedere se le cellule in migrazione positive per DCX erano positive anche per Islet-1 è stato eseguito un esperimento di doppia marcatura sulle retine

EC e SC a E15 per Islet-1 e DCX. Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento del 60x, zoom 2.5, campi di 92x92 μm , con una risoluzione di 1024x1024 pixel.

Stima del numero dei nuclei picnotici.

Gli occhi prelevati dagli embrioni E18 di madri EC e SC sottoposte a infusione cronica di anticorpo anti-IGF-I o di proteina IGF-I, rispettivamente, sono stati fissati in paraformaldeide al 4% per 24 ore. Le retine sono state poi dissezionate dall'occhio, montate su vetrini gelatinati, poi fissate con glutaraldeide al 2.5% per circa un'ora e mantenute per 4/7 giorni in una soluzione di formalina e etanolo (1:9). Infine le retine whole-mount sono state colorate con il cresilvioletto (0.1%), deidratate tramite passaggi successivi in etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 95%, 99%) e analizzate. Il numero di nuclei picnotici è stato contato, seguendo una procedura "in cieco", nello strato delle RGCs in 60 campi (80x80 mm) per retina (in media), uniformemente distribuiti. La percentuale della retina campionata con questa procedura varia dal 2.1 al 13.8%. I nuclei picnotici sono stati contati con un ingrandimento del 100X usando il microscopio computerizzato Zeiss (software Stereoinvestigator, Microbrighfield). Le cellule picnotiche sono state identificate sulla base della presenza di nuclei marcati in modo uniforme e scuri, talvolta frammentati. Quando due o più frammenti venivano individuati all'interno della stessa cellula venivano contati come facenti parte di una singola cellula picnotica. Il numero totale di cellule picnotiche per retina è stato stimato moltiplicando la densità media di cellule per campo per il rapporto tra l'area totale di ogni retina e l'area del campo.

Infusioni croniche di anticorpo anti-IGF-I e proteina IGF-I eseguite su femmine gravide.

Le femmine gravide sono state allevate sia in EC che in SC a partire dal primo giorno di gestazione. Al decimo giorno di gestazione (E10) le femmine gravide EC e SC sono state

sottoposte ad infusione di anticorpo anti-IGF-I o di proteina IGF-I, rispettivamente. È riportato in letteratura (Trejo et al., 2001) che l'anticorpo anti-IGF-I ha una cross-reattività <1% sia con l'insulina sia con IGF-II. Le infusioni sono state effettuate tramite l'impianto di minipompe osmotiche (Alzet; infusione di anti-IGF-I: 20% in soluzione salina; infusione di proteina IGF-I: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; frequenza di infusione: 0.25 $\mu\text{l}/\text{ora}$ in entrambi i casi) posizionate a livello sottocutaneo nella regione scapolare dell'animale (Carro et al., 2000). Le osservazioni qualitative eseguite sia durante la fase diurna sia durante quella notturna del ciclo giornaliero hanno rivelato un comportamento apparentemente normale delle femmine che hanno subito l'impianto. In particolare, le femmine gravide EC usavano frequentemente la ruota per il movimento. A E18 le femmine gravide sono state perfuse attraverso il cuore e i loro embrioni sono stati rimossi per isterectomia. Gli occhi degli embrioni E15 sono stati prelevati, fissati e analizzati dopo trattamento immunohistochimico per DCX e Islet-1, in modo da contare il numero di cellule positive per questi due markers negli strati esterni della retina (DCX: n = 7 animali per EC+anti-IGF-I, n = 5 animali per SC+IGF-I; Islet-1: n = 7 animali per EC+anti-IGF-I, n = 5 animali per SC+IGF-I), e analizzati per l'espressione dei livelli di IGF-I (n = 7 per EC+anti-IGF-I, n = 5 per SC+IGF-I), come descritto in precedenza. Nelle retine degli embrioni E18 è stata analizzata la morte cellulare delle RGCs (n = 13 per EC+anti-IGF-I, n = 20 per SC+IGF-I) con la metodologia del cresilvioletto, per la stima del numero dei nuclei picnotici, come descritto in precedenza.

L'esame istologico di sezioni cerebrali non ha messo in evidenza alcun segno di malformazione o di anomalie morfologiche sia negli embrioni trattati con anti-IGF-I sia in quelli trattati con la proteina IGF-I.

RISULTATI.

L'arricchimento ambientale materno accelera la migrazione dei progenitori neurali in differenziamento nella retina del feto.

Da esperimenti precedenti è emerso che l'arricchimento ambientale materno è in grado di influenzare le dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs del feto, e lo fa accelerando questo processo (come descritto nel paragrafo "L'arricchimento ambientale materno accelera le dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs nella retina della prole."). Sulla base di questo risultato ci siamo chiesti se l'accelerazione del fenomeno apoptotico osservata negli animali EC non fosse una conseguenza dell'accelerazione delle dinamiche migratorie dei progenitori neurali retinici nello strato delle RGCs. Con questo proposito abbiamo eseguito un esperimento di immunostochimica per DCX, che marca cellule in migrazione ed è un buon marker per la distribuzione spaziale e temporale dei progenitori neurali durante gli stadi precoci dello sviluppo della retina del ratto (Lee et al., 2003), su sezioni verticali di retina prelevata da embrioni E15 e E18 di madri EC e SC.

I livelli di immunofluorescenza analizzati negli strati esterni della retina non differiscono tra animali EC e SC a E18, quando nello strato delle RGCs compare una chiara banda di marcatura, che riflette il progressivo accumulo di cellule in migrazione durante la maturazione della retina (Figura 4.1), mentre abbiamo osservato livelli più alti di intensità dell'immunofluorescenza a E15 (Figura 4.1).

Ci siamo allora chiesti se l'aumento dell'intensità della marcatura osservato a E15 fosse dovuto ad un aumento del numero di cellule positive per DCX; abbiamo allora contato il numero di cellule in migrazione nella regione compresa tra lo strato dei progenitori neurali e lo strato in formazione delle RGCs negli embrioni EC e SC a E15. Abbiamo trovato che il numero delle cellule in migrazione marcate per DCX era significativamente più alto nei feti EC rispetto agli SC (Figura 4.2).

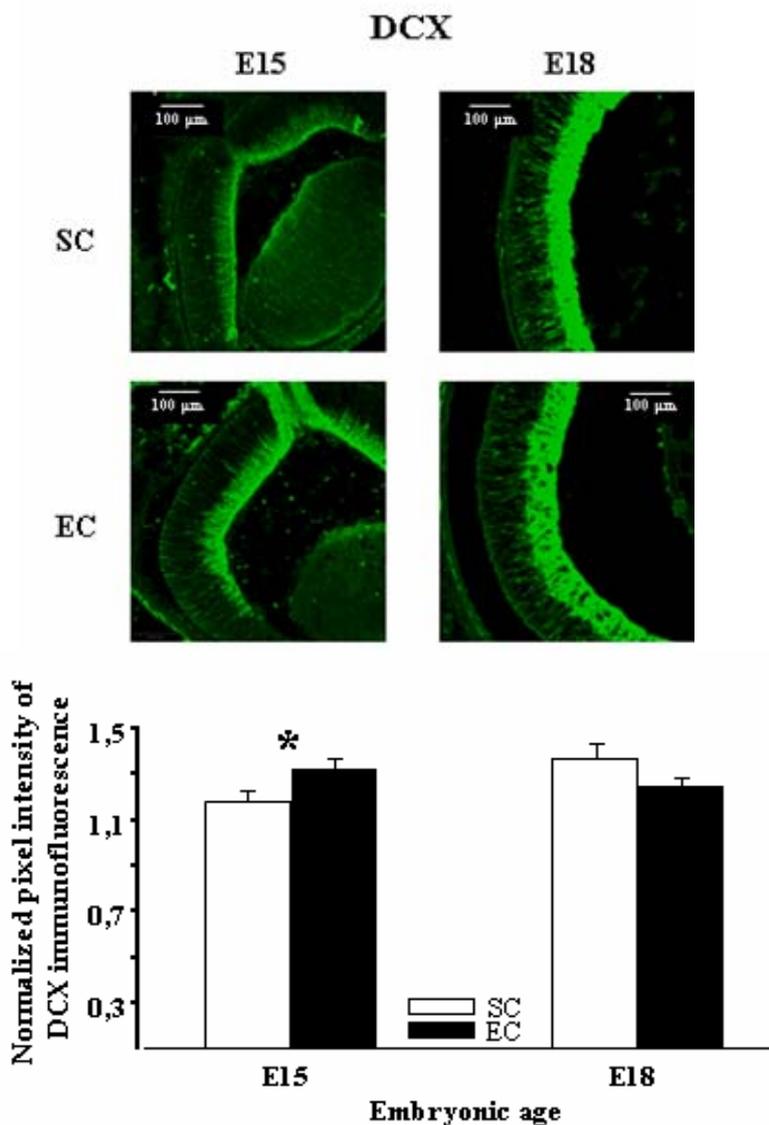


Figura 4.1: intensità dell'immunofluorescenza nei feti EC e SC.

In alto: micrografia di sezioni di retina EC e SC marcate per doublecortin (DCX) a E15 e E18. L'espressione di DCX è aumentata nei ratti EC a E15.

In basso: analisi quantitativa dell'intensità dell'immunofluorescenza negli strati esterni della retina di embrioni EC e SC. L'ANOVA a due vie mostra un'interazione statisticamente significativa tra età dell'animale e condizioni di allevamento ($P = 0.02$). La Pairwise Multiple Comparison Procedure (metodo di Holm-Sidak) rivela che i due gruppi differiscono statisticamente a E15 ($P = 0.03$), ma non a E18 ($P = 0.19$). Le barre indicano il SEM.

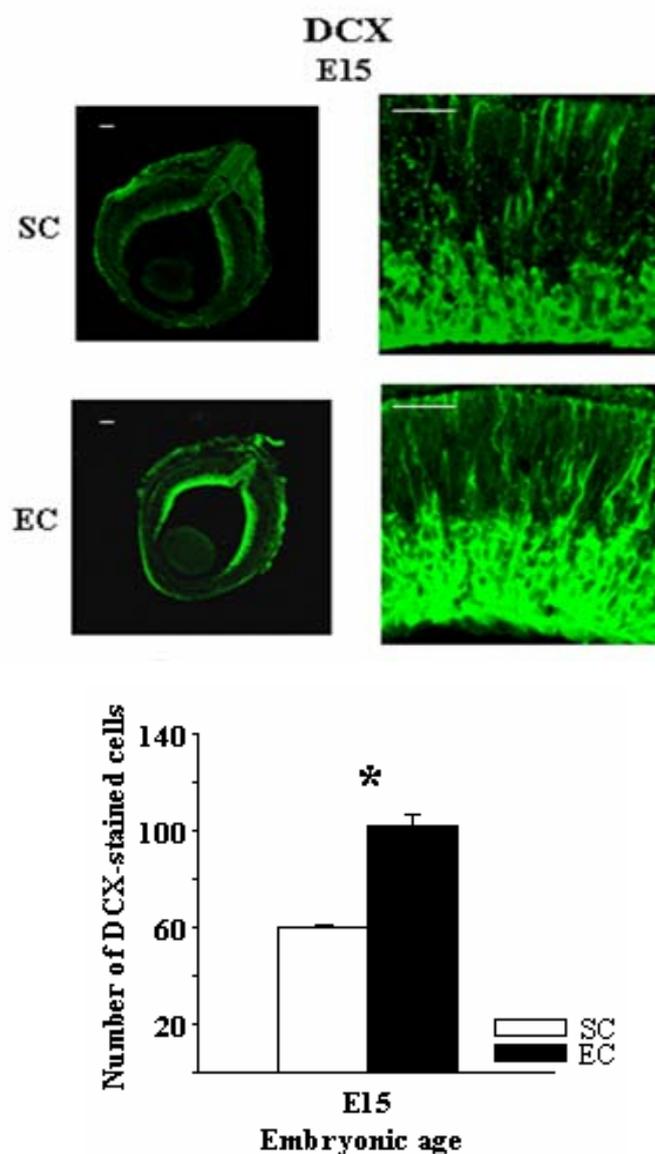


Figura 4.2: conta del numero di cellule marcate per DCX in feti EC e SC.

In alto: micrografia di sezioni di retina EC e SC marcate per doublecortin (DCX) a E15, acquisite con un ingrandimento 5X (a sinistra; scale bar = 100 μ m) e 20X (a destra; scale bar = 50 μ m), per contare il numero delle cellule in migrazione.

In basso: numero di cellule marcate per DCX negli strati esterni della retina di ratti EC e SC. Il numero di cellule DCX-postive è più alto negli embrioni EC rispetto agli SC (test di Mann-Whitney, $P < 0.05$) Le barre indicano il SEM.

Le cellule che mostrano un'accelerazione della migrazione appartengono alla popolazione delle RGCs.

Dato che DCX marca cellule in migrazione e differenziamento, indipendentemente dal tipo di cellula retinica, ci siamo chiesti a quale popolazione appartenessero queste cellule. Per analizzare questo aspetto abbiamo marcato distinte popolazioni di cellule in differenziamento con anticorpi cellula-specifici, come Islet-1, un fattore di trascrizione che marca precocemente cellule gangliari e cellule amacrine colinergiche, calbindin, che evidenzia le cellule orizzontali, e rodopsin, un marker per i fotorecettori. Abbiamo poi contato il numero di ogni tipo cellulare marcato in modo differenziale negli strati esterni della retina di embrioni EC e SC a E15. Abbiamo così osservato che nei feti EC a E15 è presente un più alto numero di cellule marcate con Islet-1 rispetto agli SC (Figura 4.3), che non c'è nessuna differenza nel numero di cellule positive per calbindin (Figura 4.4), e che rodopsin non è espressa nella retina fetale in nessuno dei due gruppi. È interessante notare che il numero di cellule DCX-positive è risultato essere molto simile a quello delle cellule Islet-1-positive; questo suggerisce che le cellule in migrazione appartengano alla popolazione delle cellule gangliari e delle cellule amacrine colinergiche. L'ipotesi è stata ulteriormente confermata da un esperimento di doppia marcatura, nel quale le cellule marcate per Islet-1 sono risultate essere positive anche per DCX (Figura 4.5). Dalla letteratura è noto che i neuroni retinici generati più precocemente sono le cellule gangliari (Rapaport et al., 2004; Farah e Easter, 2005); inoltre è noto che le cellule amacrine colinergiche vengono generate con uno o due giorni di ritardo rispetto alle cellule gangliari (E14 per le RGCs e E16 per le cellule amacrine colinergiche; Reese e Colello, 1992), così noi pensiamo che le cellule evidenziate dalla doppia marcatura appartengano principalmente alla popolazione delle cellule gangliari.

I risultati ottenuti indicano che l'influenza dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo strutturale della retina si estende anche a stadi di maturazione che sono precedenti alla morte cellulare programmata; in particolare abbiamo dimostrato l'influenza di questo protocollo sperimentale sulle dinamiche migratorie delle RGCs.

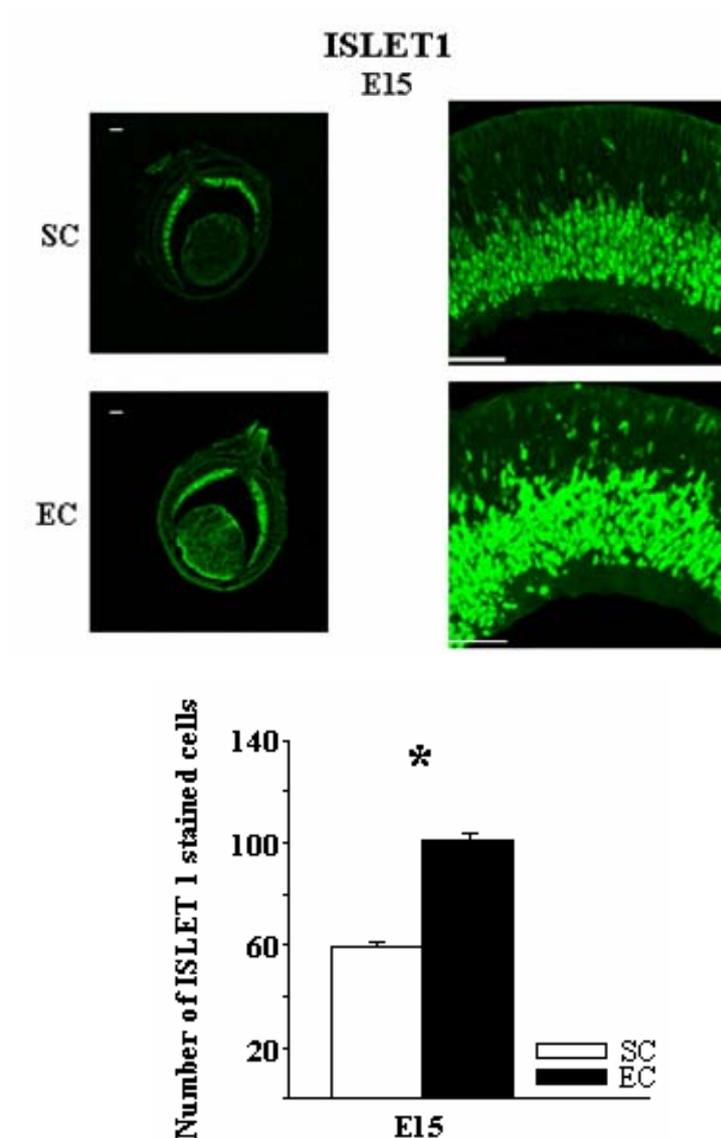


Figura 4.3: immunoistochimica per Islet-1.

In alto: micrografia di sezioni di retina EC e SC marcate per Islet-1 (un marker per cellule gangliari e cellule amacrine colinergiche) a E15, acquisite con un ingrandimento 5X (a sinistra; scale bar: 100 μ m) e 20X (a destra; scale bar: 50 μ m).

In basso: numero di cellule marcate per Islet-1 negli strati esterni della retina di ratti EC e SC. Il numero di cellule Islet-1-positive è più alto negli embrioni EC rispetto agli SC (t-test; $P < 0.001$) Le barre indicano il SEM.

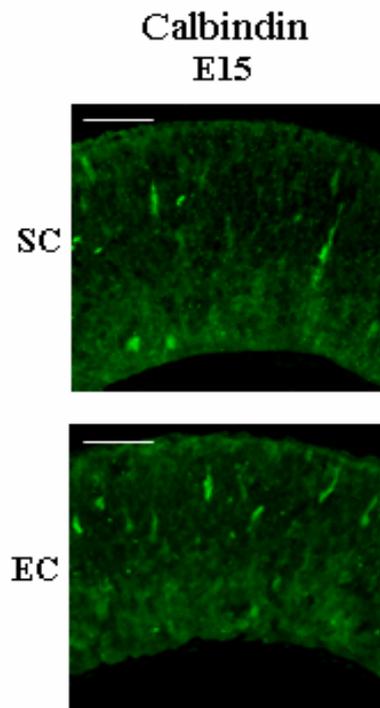


Figura 4.4: immunoistochimica per calbindin.

Micrografia di sezioni di retina EC e SC marcate per calbindin (un marker per le cellule orizzontali) a E15, acquisite con un ingrandimento 20X (scale bar: 50 μ m).

Il numero di cellule calbindin-postive non differisce tra gli embrioni EC e gli SC (t-test; $P = 0.253$).

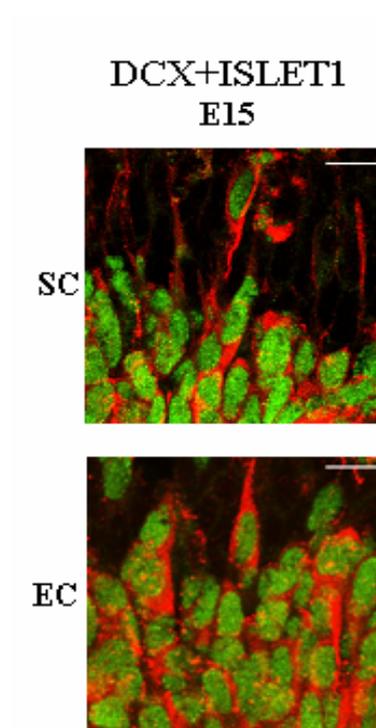


Figura 4.5: esperimento di doppia marcatura per DCX e Islet-1.

Micrografia di sezioni di retina EC e SC marcate per DCX (rosso) e per Islet-1 (verde) a E15, acquisite con un ingrandimento 60X (scale bar: 10 μ m).

Gli effetti dell'arricchimento materno sullo sviluppo retinico dipendono dall'espressione di più alti livelli di IGF-I.

È stato recentemente dimostrato che le madri arricchite a partire dal primo giorno di gestazione presentano livelli accresciuti di IGF-I nel cervello e nel latte e che un simile incremento nei livelli di IGF-I è presente anche nella retina e nel cervello della loro prole (Sale et al., 2007).

Gli effetti osservati ci hanno indotto ad ipotizzare che l'aumento di IGF-I fosse necessario a mediare gli effetti dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo retinico osservato nel feto. Per investigare questa ipotesi abbiamo sottoposto femmine di ratto gravide, allevate in condizione arricchita a partire dal primo giorno di gestazione, ad infusione cronica di anticorpo anti-IGF-I, e femmine di ratto gravide allevate in condizioni standard ad infusione cronica di proteina IGF-I. La somministrazione di anticorpo anti-IGF-I e di proteina IGF-I è stata effettuata tramite l'impianto di minipompe osmotiche applicate nella regione scapolare dell'animale a livello sottocutaneo, dal giorno E10 al giorno E15 o E18.

Per prima cosa abbiamo analizzato i livelli di espressione di IGF-I nello strato delle RGCs degli embrioni di femmine EC trattate con l'anticorpo anti-IGF-I e di femmine SC trattate con la proteina IGF-I, e abbiamo riscontrato che il trattamento della madre con l'anticorpo anti-IGF-I previene totalmente l'aumento di questo fattore di crescita indotto dall'arricchimento ambientale nella retina del feto (Figura 4.6); aumentando i livelli di IGF-I nella madre SC si osserva un corrispondente cambiamento dei livelli di IGF-I dell'embrione.

Abbiamo poi quantificato il numero di cellule evidenziate dalla marcatura per DCX e Islet-1 negli embrioni di entrambi i gruppi sperimentali a E15, ovvero all'età in corrispondenza della quale avevamo osservato una differenza nel numero di cellule in migrazione tra animali EC e SC e abbiamo riscontrato che il numero di cellule positive per DCX e Islet-1 è significativamente più basso negli embrioni E15 EC trattati con l'anticorpo anti-IGF-I rispetto agli embrioni EC non trattati, e che il numero di queste cellule non differisce da quello stimato negli embrioni SC alla stessa età (Figura 4.7 A e B).

Nell'esperimento opposto, nel quale IGF-I è stato somministrato a femmine gravide allevate in condizione standard il numero di cellule positive per DCX e Islet-1 è risultato essere significativamente più alto negli embrioni E15 SC trattati con la proteina IGF-I rispetto a quello degli embrioni SC non trattati (Figura 4.7 A e B). Gli effetti della somministrazione di IGF-I sono comparabili a quelli indotti dall'arricchimento ambientale materno per quanto riguarda l'accelerazione della migrazione delle RGCs: il numero di cellule positive per DCX e Islet-1 stimato negli embrioni SC a E15 trattati con IGF-I non differisce da quello osservato negli embrioni EC alla stessa età (Figura 4.7 A e B).

Quindi la somministrazione di IGF-I mima gli effetti dell'arricchimento ambientale materno sulla maturazione dei progenitori neurali retinici, mentre l'infusione di anticorpo anti-IGF-I blocca completamente tali effetti.

Il passo successivo è stato quello di analizzare i livelli di morte cellulare programmata delle RGCs negli embrioni E18 di entrambi i gruppi sperimentali marcando i profili picnotici con il metodo del cresilvioletto. Abbiamo riscontrato che il numero di cellule picnotiche nello strato delle RGCs è più basso negli embrioni di madri EC trattate con l'anticorpo anti-IGF-I rispetto agli embrioni di madri arricchite non trattate; questo numero non differisce da quello osservato negli embrioni di madri SC alla stessa età (Figura 4.8). Al contrario, il numero di cellule picnotiche è risultato essere più alto nello strato delle RGCs nella retina degli embrioni di madri SC trattate con la proteina IGF-I rispetto agli embrioni di madri SC non trattate (Figura 4.8) e simile a quello osservato negli embrioni di madri EC non trattate. La somministrazione di IGF-I, quindi, è sufficiente per indurre negli animali SC i cambiamenti indotti dall'arricchimento ambientale per quanto riguarda l'accelerazione delle dinamiche di morte cellulare programmata delle RGCs.

I risultati di questi esperimenti indicano che la somministrazione di IGF-I esogeno alla madre allevata in condizioni standard a partire dal decimo giorno di gravidanza è in grado di mimare gli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo retinico del feto, mentre il blocco di IGF-I tramite la somministrazione di un anticorpo anti-IGF-I nella madre arricchita previene questi effetti. Così l'aumento di IGF-I sembra essere un evento necessario e sufficiente per l'esplicarsi degli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo della retina del feto.

Infine, sulla base di osservazioni fatte in precedenza circa l'influenza dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo globale del feto, abbiamo misurato il peso corporeo

degli embrioni di madri arricchite trattate con l'anticorpo anti-IGF-I a E18, e lo abbiamo confrontato con quello ottenuto precedentemente in animali EC e SC alla stessa età. Gli embrioni di madri EC mostrano un aumento di circa il 10% del peso corporeo, confermando i risultati precedenti, mentre la somministrazione di anti-IGF-I alle madri EC riporta il peso corporeo degli embrioni ai valori di controllo (embrioni EC = $1,37 \pm 0,04$ g; embrioni EC anti-IGF-I = $1,15 \pm 0,05$ g; Test di Mann-Whitney, $P = 0.005$).

Concludendo, i nostri risultati dimostrano che IGF-I è un mediatore degli effetti dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo retinico del feto, in particolare è in grado di regolare fenomeni strutturali fondamentali per la maturazione dell'architettura retinica, quali la migrazione e l'apoptosi delle cellule gangliari.

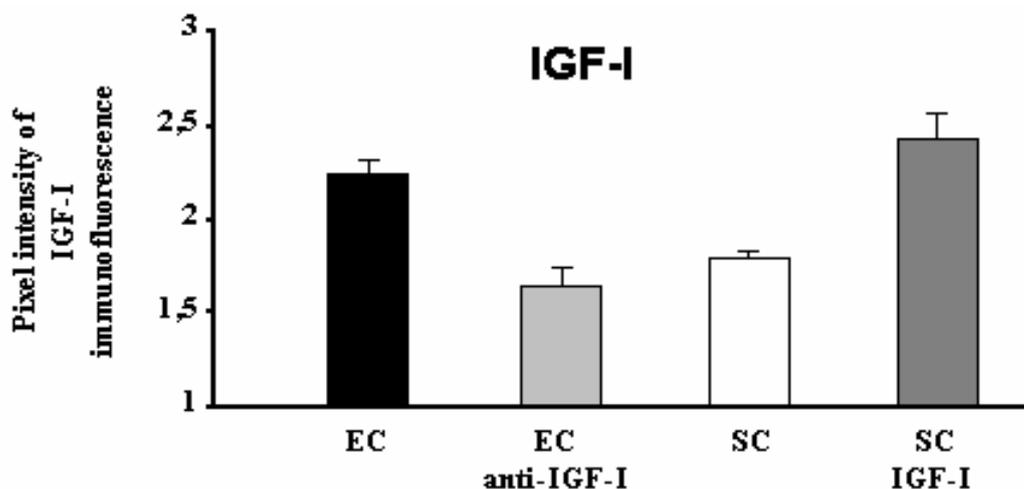


Figura 4.6: intensità dell'immunofluorescenza per IGF-I. Analisi quantitativa dell'intensità dell'immunofluorescenza per IGF-I nello strato delle cellule gangliari di embrioni di madri EC, EC anti-IGF-I, SC e SC IGF-I. A seguito del trattamento con anti-IGF-I, i livelli di espressione di IGF-I nello strato delle RGCs degli embrioni EC sono diminuiti rispetto a quelli degli embrioni SC; dopo infusione cronica di proteina IGF-I, i livelli di espressione di IGF-I nello strato delle RGCs è aumentato e raggiunge quello degli embrioni EC. L'ANOVA a una via dimostra un effetto delle condizioni di allevamento ($P < 0.001$). È stata trovata una differenza tra i gruppi EC e SC, tra EC e EC anti-IGF-I e tra SC e SC IGF-I (Test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$). Non è stata trovata, invece, differenza tra i gruppi EC anti-IGF-I e SC e tra EC e SC IGF-I. Le barre indicano il SEM.

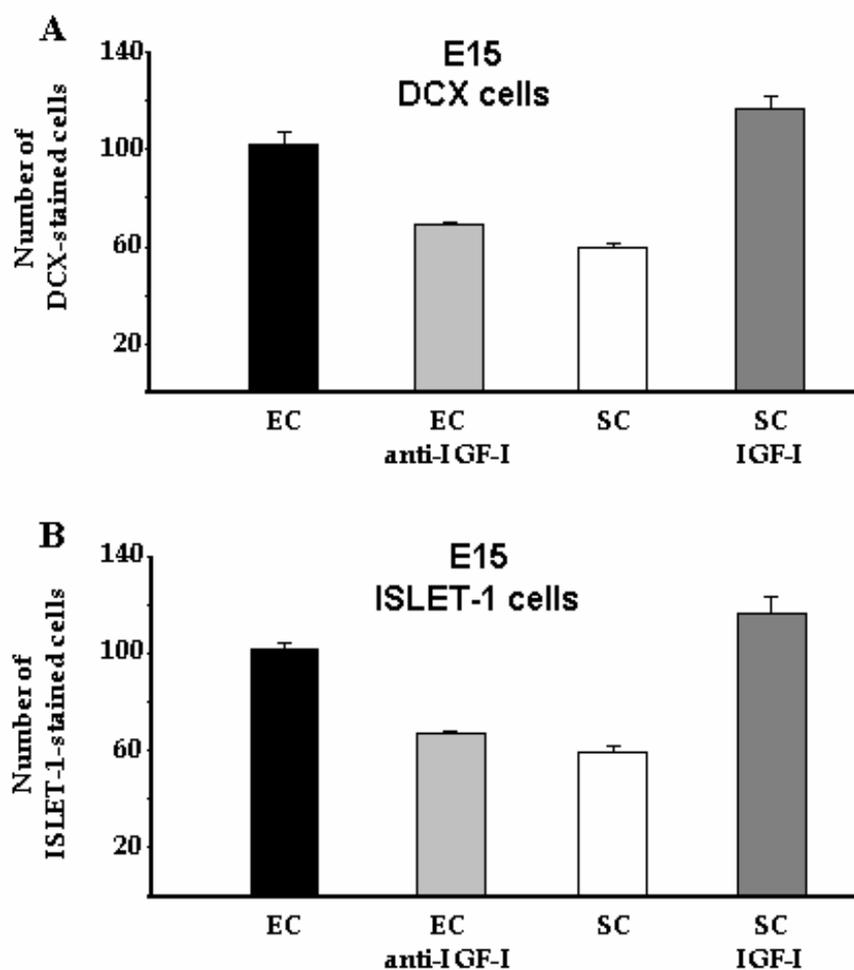


Figura 4.7 A e B: analisi del numero di cellule positive per DCX e Islet-1 a E15. Il numero di cellule positive per DCX (A) e per Islet-1 (B) negli strati esterni della retina di embrioni di madri EC, EC anti-IGF-I, SC e SC IGF-I, a E15. Per entrambi (A e B) l'ANOVA a una via dimostra un effetto del trattamento ($P < 0.05$). È stata osservata una differenza tra i gruppi EC e SC, tra EC e EC anti-IGF-I e tra SC e SC IGF-I (Test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$). Invece i gruppi EC anti-IGF-I e SC, e EC e SC IGF-I non differiscono l'uno dall'altro. Le barre indicano il SEM.

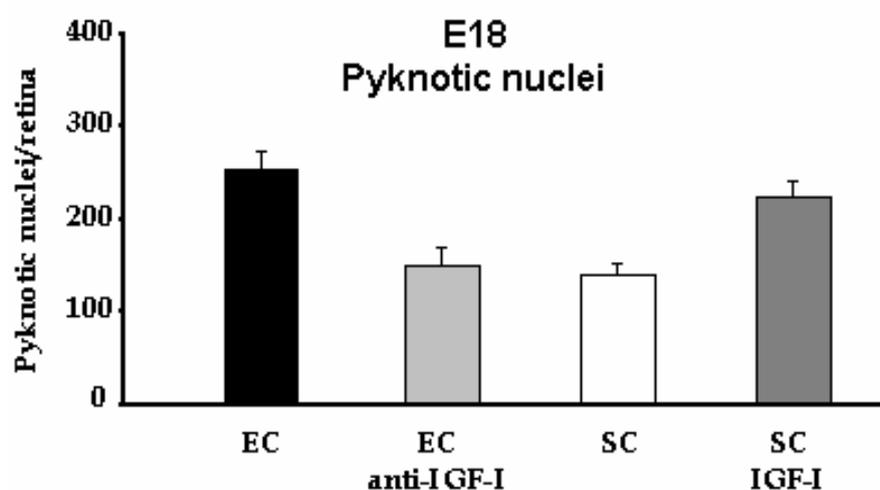


Figura 4.8: analisi del numero dei nuclei picnotici a E18. Il numero di cellule picnotiche negli embrioni di madri EC, EC anti-IGF-I, SC e SC IGF-I a E18. Dopo il trattamento con anti-IGF-I il numero dei nuclei picnotici nello strato delle RGCs degli embrioni EC è più basso rispetto a quello degli embrioni SC, mentre dopo l'infusione cronica di proteina IGF-I il numero di cellule picnotiche nello strato delle RGCs degli embrioni SC è aumentato, e non differisce da quello degli embrioni EC. L'ANOVA a una via dimostra un effetto delle condizioni di allevamento ($P < 0.001$). È stata trovata una differenza tra i gruppi EC e SC, tra EC e EC anti-IGF-I e tra SC e SC IGF-I (Test post-hoc di Tukey, $P < 0.05$). Non è stata trovata, invece, differenza tra i gruppi EC anti-IGF-I e SC e tra EC e SC IGF-I. Le barre indicano il SEM.

DISCUSSIONE.

I risultati ottenuti dimostrano che lo sviluppo del sistema nervoso è sensibile alla stimolazione ambientale anche durante il periodo prenatale. Gli effetti dell'ambiente sullo sviluppo del feto sono mediati dalla madre; le condizioni ambientali arricchite fornite alla madre durante la gravidanza influenzano lo sviluppo retinico del feto attraverso il controllo di fattori di crescita fetale, in particolare di IGF-I, determinando un aumento della crescita somatica.

Lo sviluppo della retina è sensibile alla stimolazione ambientale prenatale.

È stato precedentemente dimostrato che l'arricchimento ambientale dalla nascita promuove la maturazione della corteccia visiva (Cancedda et al., 2004; Sale et al., 2004; Landi et al., 2007;) e accelera lo sviluppo funzionale della retina (Landi et al., 2007). La scoperta che gli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo del sistema visivo siano presenti anche nella retina è particolarmente rilevante, dal momento che questa struttura veniva classicamente considerata resistente alle alterazioni dipendenti dall'esperienza. I nostri esperimenti hanno ampliato le conoscenze relative alla plasticità della retina, dimostrando che l'ambiente può influenzare lo sviluppo di questa struttura anche durante il periodo di vita prenatale. Infatti dal nostro lavoro è emerso che l'arricchimento ambientale materno può influenzare profondamente lo sviluppo della retina dell'embrione anticipando processi strutturali critici per la sua maturazione, come la migrazione di progenitori neurali e le dinamiche temporali del processo fisiologico di morte naturale. Fino ad ora un cambiamento del decorso temporale dello sviluppo retinico era stato osservato soltanto in topi con mutazioni naturali che influenzano il "rate" di morte naturale programmata (Williams et al., 1990). Questo è il primo caso nel quale viene dimostrato che l'ambiente accelera la dinamica di migrazione e di morte cellulare, caratteristiche chiave dello sviluppo del sistema visivo. Il preciso assemblaggio dei circuiti

neurale richiede infatti uno stretto controllo del corretto numero di neuroni pre- e post-sinaptici che vanno a formare le connessioni sinaptiche. Dunque, il fatto che la morte delle RGCs avvenga più precocemente negli animali arricchiti può essere determinante per la maturazione accelerata dei circuiti intra-retinici e per la formazione delle proiezioni retinofugali.

IGF-I ha un ruolo chiave negli effetti dell'arricchimento ambientale materno sullo sviluppo retinico.

Gli effetti che abbiamo riscontrato sullo sviluppo retinico sembrano dipendere da IGF-I, come suggerito da esperimenti di immunostochimica nei quali è stato osservato un aumento nell'espressione precoce di questo fattore nelle femmine di ratto gravide EC e nella loro prole. Sebbene un'analisi rigorosa dei livelli di IGF-I nella retina di embrioni EC e SC dovrebbe prevedere l'uso di saggi quantitativi, non ci è stato possibile eseguirli a causa della quantità troppo bassa di proteina IGF-I che può essere ottenuta anche da un numero cospicuo di retine embrionali. Tuttavia una forte indicazione del coinvolgimento di IGF-I nell'accelerazione dello sviluppo retinico indotto dall'arricchimento materno ci perviene dai risultati delle manipolazioni artificiali dei livelli di IGF-I effettuati su femmine di ratto gravide EC e SC. Da questi esperimenti, infatti, risulta che la neutralizzazione di IGF-I abolisce l'azione dell'arricchimento materno sulla migrazione e sull'apoptosi delle RGCs, e che questi effetti sono accompagnati da una marcata riduzione del livello di IGF-I nella retina degli animali EC. Invece l'infusione cronica di IGF-I effettuata durante la gravidanza è sufficiente ad indurre negli animali SC tutti i cambiamenti prodotti dall'arricchimento ambientale sullo sviluppo della retina. Alla luce di questi risultati pensiamo che IGF-I abbia un ruolo fondamentale come mediatore degli effetti dell'arricchimento prenatale sullo sviluppo retinico.

I recettori per IGF-I sono presenti nella retina (Rodrigues et al., 1988; Waldbillig et al., 1988) e sono espressi in modo sviluppo-dipendente (Frade et al., 1996; Lee et al., 1992). Inoltre, è noto che IGF-I ha un ruolo centrale nel costruire la citoarchitettura della retina (Hernandez-Sanchez et al., 1995), nel promuovere la proliferazione cellulare durante gli

stadi precoci di sviluppo (Hodge et al., 2004), il differenziamento (Frade et al., 1996) e la migrazione (Imai e Clemmons, 1999; Shigematsu et al., 1999). Quindi è possibile che alterazioni nell'espressione di IGF-I possano influenzare la migrazione e la morte cellulare programmata delle RGCs che avviene naturalmente durante lo sviluppo. In modo più specifico, è plausibile che aumentati livelli di IGF-I nella retina indotti dall'arricchimento possano fare aumentare la proliferazione dei progenitori neurali, che a sua volta possa indurre un'anticipazione del differenziamento, della migrazione e della morte cellulare programmata.

Questo modello è supportato dai nostri risultati, i quali dimostrano che il numero di cellule retiniche che esprimono doublecortin (DCX) e positive per Islet-1 è maggiore negli embrioni EC rispetto agli SC a E15, suggerendo che un decorso temporale anticipato della migrazione cellulare possa portare all'anticipazione delle dinamiche apoptotiche osservate negli animali EC.

Dal momento che Islet-1 è un marker specifico per le cellule gangliari e per le cellule amacrine colinergiche, non possiamo escludere la possibilità che IGF-I eserciti la sua azione in parallelo su entrambi i tipi cellulari. Pensiamo tuttavia che un effetto indiretto di IGF-I sulle cellule amacrine displaced sia improbabile. Infatti è noto dalla letteratura che lo sviluppo delle cellule amacrine avviene in ritardo rispetto a quello delle RGCs (E14 per le RGCs e E16 per le cellule amacrine colinergiche; Reese e Colello, 1992), che costituiscono la prima classe di neuroni retinici a differenziarsi, e noi abbiamo osservato un aumento dell'espressione di IGF-I nello strato delle RGCs in maturazione degli embrioni EC, in un periodo dello sviluppo in cui le cellule amacrine displaced rappresentano soltanto la minoranza della popolazione cellulare totale.

Passaggio di IGF-I dalla madre al feto.

Sulla base dei dati disponibili in letteratura, possiamo fare alcune ipotesi per cercare di spiegare come un aumento del livello di espressione di IGF-I nelle madri arricchite possa indurre aumentati livelli di IGF-I nei loro piccoli.

IGF-I contenuto sia nel liquido amniotico (Bloomfield et al., 2002), sia nel latte materno, come da noi recentemente confermato (Sale et al., 2007), potrebbe venire ingerito da parte dell'embrione ed è sicuramente assunto da parte del piccolo. In questo contesto l'azione di IGF-I potrebbe essere diretta; dal contenuto gastrico IGF-I potrebbe passare nella circolazione sanguigna, e da lì essere trasportato attivamente nel cervello da parte delle cellule del plesso coroideo (Carro et al., 2001).

Un'altra ipotesi si basa sul fatto che IGF-I è un mediatore degli effetti dell'ormone della crescita (GH) sulla crescita somatica (Baxter, 1986; Daughaday e Rotwein, 1989; Behringer et al., 1990; Jones e Clemmons, 1995). In questo caso l'azione di IGF-I sarebbe indiretta: IGF-I indurrebbe l'aumento dell'apporto di nutrienti, tra cui GH, nel feto (grazie all'aumentato trofismo della placenta) e nel piccolo (grazie all'accelerazione dello sviluppo della mucosa intestinale che questo fattore induce; Olanrewaju et al., 1996). L'aumentato apporto di GH, a sua volta, indurrebbe nel feto o nel piccolo un aumento della sintesi di IGF-I da parte del fegato, che, una volta entrato nella circolazione sanguigna, viene trasportato attivamente nel cervello tramite le cellule del plesso coroideo

Osservazioni finali.

Studi recenti hanno dimostrato che l'allevamento di ratti in condizione arricchita a partire dal primo giorno dopo la nascita determina una marcata accelerazione dello sviluppo del sistema visivo, individuabile sia a livello funzionale, con una precoce maturazione dell'acuità retinica e corticale, sia a livello molecolare, con l'aumento dei livelli di BDNF nella retina (Cancedda et al., 2004; Landi et al., 2007). L'effetto più precoce indotto dall'arricchimento ambientale è stato osservato nel periodo postnatale che precede l'apertura degli occhi, e quindi ad un'età in cui i piccoli di ratto sono totalmente dipendenti dalla madre e non esplorano attivamente l'ambiente; per questo è stato ipotizzato che tale effetto potesse dipendere da una diversa stimolazione materna ricevuta dai piccoli nelle diverse condizioni ambientali. Infatti è stato dimostrato che le madri EC praticano livelli più elevati di cure materne rispetto alle madri SC (Sale et al., 2004).

I risultati presentati in questa tesi dimostrano che l'accelerazione dello sviluppo del sistema visivo indotta dall'allevamento in ambiente arricchito può avere inizio anche nel periodo che precede la nascita. Quindi, alla luce di questi risultati e di quelli ottenuti dal lavoro svolto da altri ricercatori (Cancedda et al., 2004; Landi et al., 2007; Sale et al., 2007), proponiamo un modello in cui tre distinte fasi temporali durante lo sviluppo del piccolo di ratto sono controllate in modo differenziale dalla ricchezza dell'ambiente. Nella prima fase, l'arricchimento ambientale materno durante la gravidanza influenza l'espressione di IGF-I nello strato delle RGCs del feto, aumentandola, e questo porta all'accelerazione dello sviluppo della retina. Successivamente, i livelli più alti di cure materne effettuati dalle madri EC forniscono ai piccoli in sviluppo una robusta stimolazione tattile che può provocare l'aumento del livello di BDNF nella retina e nella corteccia visiva, e la precoce apertura degli occhi. Infine, quando i piccoli iniziano ad esplorare attivamente l'ambiente che li circonda, la complessa stimolazione sensoriale e motoria fornita dall'ambiente arricchito può influenzare direttamente lo sviluppo del loro sistema visivo, contribuendo ad accelerare ulteriormente la maturazione dell'acuità visiva. Gli effetti di queste tre fasi temporali si verificano in modo sequenziale, ma è probabile che siano legati tra loro in maniera causale, e che ogni fase possa agire da innesco per la successiva.

Questi studi suggeriscono che l'influenza dell'ambiente sullo sviluppo e sulla plasticità del sistema visivo sia dovuta non solo a cambiamenti nel livello di stimolazione sensoriale ma anche, e soprattutto, a fattori che vengono attivati anche in assenza dell'esperienza visiva.

La scoperta che l'arricchimento ambientale durante la gravidanza provoca un aumento di IGF-I, che è essenziale durante la gestazione ed è un modulatore chiave della crescita fetoplacentale (Torres-Aleman et al., 1994; Anthony et al., 1995), può essere rilevante nell'orientare la ricerca clinica nel campo delle terapie prenatali.

RINGRAZIAMENTI.

Il mio percorso di studio è stato purtroppo lungo e tortuoso, accompagnato dal dolore per la perdita di mio padre e in seguito dal rimorso per aver perso del tempo prezioso e dalla sensazione di inadeguatezza dovuta alla mia età. Nonostante tutto ho perseguito il mio obiettivo, e l'ho raggiunto, non senza l'aiuto delle persone a me vicine, che hanno sempre trovato le parole giuste per spronarmi ad andare avanti, e che mi hanno persuaso a non sottovalutarmi, alle quali va il mio affetto e la mia riconoscenza (mamma, Roberto e zia Imperia, Mario, Irene, Silvia, Elena e Michelangelo).

Quando ho deciso di intraprendere questa "avventura" non sapevo a cosa andavo incontro, né se sarei stata all'altezza della situazione, avendo avuto così poca esperienza nella pratica di laboratorio, sia dal punto di vista pratico che emotivo. Voglio quindi ringraziare le persone dell'Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa che mi hanno guidato con pazienza, condividendo con me la loro esperienza e le loro conoscenze, preziosissime. Prima tra tutte la Dott.ssa Maria Cristina Cenni, un punto di riferimento insostituibile per esperienza e conoscenza, e per la capacità di saperle trasmettere, a cui va tutta la mia stima.

Il Dott. Alessandro Sale, che ringrazio per il tempo e l'impegno dedicato a rispondere alle mie domande e per non avermi fatto perdere di vista la mia formazione etologica.

La Dott.ssa Silvia Landi e la Dott.ssa Francesca Ciucci, che mi hanno guidata all'inizio di questo percorso, nel momento per me più difficile, con pazienza e disponibilità.

Ho raggiunto l'obiettivo, con la consapevolezza che è solo il primo di una lunga serie.

BIBLIOGRAFIA.

Aizeman Y, De Vellis J (1987) Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferring, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 17:32-42.

Amthor FR, Oyster CW, Takahashi ES (1984) Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res* 298:187-190.

Amthor FR, Takahashi ES, Oyster CW (1989a) Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. *J Comp Neurol* 280:97-121.

Amthor FR, Takahashi ES, Oyster CW (1989b) Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with concentric receptive fields. *J Comp Neurol* 280:72-96.

Ang LC, Bhaumick B, Munoz DG, Sass J, Jurlink BH (1992) Effects of astrocytes, insulin and insulin-like growth factor I on the survival of motoneurons in vitro. *J Neurol Sci* 109:168-172.

Ang LC, Bhaumick B, Jurlink BH (1993) Neurite promoting activity of insulin, insulin-like growth factor I and nerve growth factor on spinal motoneurons is astrocyte dependent. *Brain Res Dev Brain Res* 74:83-8.

Anlar B, Sullivan KA, Feldman EL (1999) Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. *Horm Metab Res* 31:120-125.

Arkin SM (1999) Elder rehab: a student-supervised exercise program for Alzheimer's patients. *Gerontologist* 39:729-735.

Awatramani GB, Slaughter MM (2000) Origin of transient and sustained responses in ganglion cells of the retina. *J Neurosci* 20:7087-7095.

Bach LA, Salemi R, Leeding KS (1995) Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II-induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology* 136:5061-5069.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.

Baker NL, Carlo Russo V, Bernard O, D'Ercole AJ, Werther GA (1999) Interactions between bcl-2 and the IGF system control apoptosis in the developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 118:109-118.

- Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM (1978) Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology* 18:211-218.
- Baron-Van Evercooren A, Olichon-Berthe C, Kowalski A, Visciano G, Van Obberghen E (1991) Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci Res* 28:244-253.
- Bartlett WP, Li XS, Williams M, Benkovic S (1991) Localization of insulin-like growth factor-1 mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147: 239-250.
- Baxter RC, Martin J (1986) Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 78:1504-1512.
- Baxter RC, Van den Brande JL, Baxter R (1991) Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: the role of serum IGFbps in regulating IGF availability. *Acta paediatr Scand Suppl* 372:107-115.
- Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F (1995) Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14:717-730.
- Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ (1990) Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 127:1033-1040.
- Benesova O, Pavlik A (1989) Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology* 28:89-97.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-378.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33-84.
- Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT (1990) Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5568-5572.
- Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN (1974) Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina. *J Comp Neurol* 156:81-93.
- Bohannon NJ, Corp ES, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM, Baskin DG (1988) Localization of binding sites for IGF-I in the rat brain by quantitative autoradiography. *Brain Res* 444:205-213.

- Bondy CA, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D (1990) Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4:1386-1398.
- Bondy CA (1991) Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11: 3442-3455.
- Bondy CA, Lee WH (1993a) Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 692: 33-43.
- Bondy C, Lee WH (1993b) Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* 13:5092-5104.
- Bonhoeffer T (1996) Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 6:119-126.
- Bowe-Anders C, Miller RF, Decheux R (1975) Developmental characteristic of receptive organization in the isolated retina-eyecup of the rabbit. *Brain Res* 87:61-65.
- Brar AK, Chernausk SD (1993) Localization of insulin-like growth factor binding protein-4 expression in the developing and adult rat brain: analysis by in situ hybridization. *J Neurosci Res* 35:103-114.
- Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF (2000) Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res* 59:332-341.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5335-5340.
- Caleo M, Lodovichi C, Pizzorusso T, Maffei L (1999) Expression of the transcription factor Zif268 in the visual cortex of monocularly deprived rats: effects of nerve growth factor. *Neuroscience* 91:1017-26.
- Caleo M, Cenni MC (2004) Anterograde transport of neurotrophic factors: possible therapeutic implications. *Mol Neurobiol* 29:179-196.
- Calkins DJ, Schein SJ, Tsukamoto Y, Sterling P (1994) M and L cones in macaque fovea connect to midget ganglion cells by different numbers of excitatory synapses. *Nature* 371:70-72.
- Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG, Varela-Nieto I (2001) Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal IGF-1-deficient mice. *J Neurosci* 21:7630-7641.

Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, et al (2004) Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J Neurosci* 24: 4840-4848.

Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20: 2926-2933.

Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21: 5678-5684.

Casella C, Taglietti V (1996) *Principi di fisiologia 1 e 2. La Goliardica Pavese.*

Cellerino A, Bahr M, Isenmann S (2000) Apoptosis in the developing visual system. *Cell Tissue Res* 301:53-69.

Chakravarthy MV, Abraha TW, Schwartz RJ, Fiorotto ML, Booth FW (2000) Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 275:35942-35952.

Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ (2003) Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 79:359-371.

Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J (1999) Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 29:41-46.

Cheng CM, Reinhardt RR, Lee WH, Joncas G, Patel SC, Bondy CA (2000) Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10236-10241.

Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ (2001) Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 21:1481-1489.

Churchill JD, Galvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF, Greenough WT (2002) Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol Aging* 23:941-955.

Ciucci F, Putignano E, Baroncelli L, Landi S, Berardi N, Maffei L (2007) Insuline-like growth factor-I mediates the effects of the enriched environment (EE) on visual cortical development. *Plos One* 5:1-10.

Clemmons DR, Underwood LE (1991) Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 11:393-412.

Clemmons DR (1993) IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev* 35:368-375.

Cook JE, Chalupa LM (2000) Retinal mosaics: new insights into an old concept. *Trends Neurosci* 23:26-34.

Cotman CW, Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 295-301.

Czech MP, Lewis RE, Corvera S (1989) Multifunctional glycoprotein receptors for insulin and the insulin-like growth factors. *Ciba Found Symp* 145:27-41.

D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G (1996) The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13:227-255.

D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR (2002) Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 36: 209-220.

Dacey DM (1999) Primate retina: cell types, circuits and color opponency. *Prog Retin Eye Res* 18:737-763.

Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84:109-129.

Daughaday WH, Rotwein P (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.

Denenberg VH (1999) Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Dev Psychobiol* 34:1-3.

Dentremont KD, Ye P, D'Ercole AJ, O'Kusky JR (1999) Increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression during early postnatal development differentially increases neuron number and growth in medullary nuclei of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 114:135-141.

DeVries SH (2000) Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28:847-856.

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10989-10993.

Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harvey RP, Bartlett PF (1991) Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursor depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2199-203.

- Dreher B, Robinson SR (1988) Development of the retinofugal pathway in birds and mammals: evidence for a common 'timetable'. *Brain Behav Evol* 31:369-390.
- Drop SLS, Schuller AGP, Lindenbergh-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A, Zwarthoff EC (1992) Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Reg* 2:69-79.
- Duan C (2002) Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol* 175:41-54.
- Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG (1988) Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism* 37:136-140.
- Efstratiadis A. (1998) Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol.* 42(7): 955-76.
- Engineer ND, Percaccio CR, Pandya PK, Moucha R, Rathbun DL, Kilgard MP (2004) Environmental enrichment improves response strength, threshold, selectivity, and latency of auditory cortex neurons. *J Neurophysiol* 92:73-82.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M (1995) Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Learn Mem* 64:49-57.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Berardi N, Domenici L, Maffei L (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res* 34:709-720.
- Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138:153-156.
- Famiglietti EV, Jr., Kolb H (1975) A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res* 84:293-300.
- Famiglietti EV, Jr., Kolb H (1976) Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194:193-195.
- Farah MH, Easter SS Jr (2005) Cell birth and death in the mouse retinal ganglion cell layer. *J Comp Neurol* 489:120-34.
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124:71-79.

Ferchmin PA, Bennett EL (1975) Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J Comp Physiol Psychol* 88:360-367.

Fernandez AM, Gonzalez de la Vega A, Planas B, Torres-Aleman I (1999) Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivocerebellar pathway. *Europ J Neurosci* 11: 2019-2030.

Fernandez V, Fernandez B, Adaro L (2003) Early polysensorial enrichment: specific experience-induced structural changes in the parieto-occipital cortex of the rat. *Growth Dev Aging* 67:3-10.

Fernyhough P, Willars GB, Lindsay RM, Tomlinson DR (1993) Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. *Brain Res* 607:117-124.

Fisher LJ (1979) Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina. *J Comp Neurol* 187:359-372.

Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW (1999) Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev* 23:673-685.

Fordyce DE, Farrar RP (1991) Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav Brain Res* 43:115-123.

Fowden AL (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24:803-812.

Frade JM, Marti E, Bovolenta P, Rodriguez-Pena MA, Perez-Garcia D, Rohrer H, Edgar D, Rodriguez-Tebar A (1996) Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Development* 122:2497-2506.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22:7840-7843.

Freed MA, Sterling P (1988) The ON-alpha ganglion cell of the cat retina and its presynaptic cell types. *J Neurosci* 8:2303-2320.

Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105:423-438.

Frye CA, Orecki ZA (2002) Prenatal stress alters reproductive responses of rats in behavioral estrus and paced mating of hormone-primed rats. *Horm Behav* 42:472-483.

- Gammeltoft-S, Ballotti R, Kowalski A, Westermark B, Van Obberghen E (1988) Expression of two types of receptor for Insulin-like Growth Factors in human malignant glioma. *Cancer Res* 48:1233-1237.
- Garcia-Segura LM, Pérez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Aleman I (1991) Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* 560:167-74.
- Garraghty PE, Sur M (1993) Competitive interactions influencing the development of retinal axonal arbors in cat lateral geniculate nucleus. *Physiol Rev* 73:529-545.
- Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K. (1992) A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182:593–599.
- Gomez-Pinilla F, Dao I, Vannarith S (1997) Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 764:1– 8.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5263-5267.
- Gramsbergen A, Mulder EJ (1998) The influence of betamethasone and dexamethasone on motor development in young rats. *Pediatr Res* 44:105-110.
- Greiner JV, Weidman TA (1981) Histogenesis of the ferret retina. *Exp Eye Res* 33:315-332.
- Gueneau G, Privat A, Drouet J, Court L (1982) Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix. A high-resolution autoradiographic study. *Dev Neurosci* 5:345-358.
- Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ (1996) In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology* 137:5484-5492.
- Hampson EC, Vaney DI, Weiler R (1992) Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina. *J Neurosci* 12:4911-4922.
- Haselbacher GK, Andres RY, Humbel RE (1980) Evidence for the synthesis of a somatomedin similar to insulin-like growth factor I by chick embryo liver cells. *Eur J Biochem* 111:245-250.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hebb DO (1953) *Heredity and Environment in Mammalian Behaviour*. *Brit J Anim Beh* 1: 43-47.

- Hernandez-Sanchez C, Lopez-Carranza A, Alarcon C, de La Rosa EJ, de Pablo F (1995) Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. Proc Natl Acad Sci U S A 92:9834-9838.
- Hickey TL, Guillery RW (1974) An autoradiographic study of retinogeniculate pathways in the cat and the fox. J Comp Neurol 156:239-253.
- Hicks SP, D'Amato CJ (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. Anat Rec 160:619 - 634.
- Hobson JA, Mc Carley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. Science 189:55-58.
- Hockfield S, McKay RD. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. J Neurosci. 5: 3310-28.
- Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR (2004) Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing g1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex. J Neurosci 24:10201-10210.
- Hofer MA (1984) Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement. Psychosom Med 46:183-197.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. Cell 98:739-755.
- Hubel DH, Wiesel TN (1963) Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. J Physiol 165:559-568.
- Hynes MA, Van Wyck JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen J, Lund PK (1987) Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II messenger ribonucleic acids. Mol Endocrinol 1:233-242.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, et al. (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. Exp Neurol 164: 45-52.
- Ide K, Secher NH (2000) Cerebral blood flow and metabolism during exercise. Prog Neurobiol 61:397-414.
- Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT (1992) Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. J Cereb Blood Flow Metab 12:110-119.

- Isemann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 22:483-543.
- Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ (2004) Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14:636-648.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936-8946.
- Johnson RA, Mitchell GS (2003) Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res* 983:108-114.
- Jones JL, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
- Kaneko A (1970) Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J Physiol* 207:623-633.
- Katz LC, Crowley JC (2002) Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* 3:34-42.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 8:939-942.
- Kermer P, Klöcker N, Labes M, Bähr M (2000) Insulin-Like Growth Factor-I Protects Axotomized Rat Retinal Ganglion Cells from Secondary Death via PI3-K-Dependent Akt Phosphorylation and Inhibition of Caspase-3 *In Vivo*. *J Neurosci* 20:722-728.
- Keyvani K, Sachser N, Witte OW, Paulus W (2004) Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:598-609.
- Klintsova AY, Dickson E, Yoshida R, Greenough WT (2004) Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res* 1028:92-104.
- Kofman O (2002) The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 26:457-470.
- Kohl Z, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kempermann G (2002) Prewaning enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice. *Genes Brain Behav* 1:46-54.

- Kolb, B (1995) Brain plasticity and behavior. Erlbaum, Mahwah, NJ.
- Koo JW, Park CH, Choi SH, Kim NJ, Kim HS, Choe JC, Suh YH (2003) The postnatal environment can counteract prenatal effects on cognitive ability, cell proliferation, and synaptic protein expression. *Faseb J* 17:1556-1558.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999) Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400:418-419.
- Krubitzer L, Kahn DM (2003) Nature versus nurture revisited: an old idea with a new twist. *Prog Neurobiol* 70:33-52.
- Kuhn CM, Schanberg SM (1998) Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci* 16:261-270.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM (2000) Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122:81-103.
- Landi S, Sale A, Berardi N, Viegi A, Maffei L, Cenni MC (2007) Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *FASEB J* 21: 130-139.
- Larsen JO, Skalicky M, Viidik A (2000) Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum. *J Comp Neurol* 428:213-222.
- Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R (2004) Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 20:1655-1664.
- Lee WH, Michels KM, Bondy CA (1993) Localization of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA during postnatal brain development: correlation with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 53:251-265.
- Lee EJ, Kim IB, Lee E, Kwon SO, Oh SJ, Chun MH (2003) Differential expression and cellular localization of doublecortin in the developing rat retina. *Eur J Neurosci* 17:1542-1548.
- Lenoir D, Honnegger P (1983) Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates DNA synthesis in foetal rat brain cell cultures. *Dev Brain Res* 7: 205-13.

Levine S (1975) Psychosocial factors in growth and development. In L. Levi (ed), *Society, stress and disease* (pp. 43-50). London: 1975. Oxford University Press.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.

Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3:799-806.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.

Lobie PE, García-Aragón J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ (1993) Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 74:225-33.

Lordi B, Protais P, Mellier D, Caston J (1997) Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Physiol Behav* 62:1087-1092.

Lorenz K (1961) *Evolution and modification of behaviour*. Harvard University Press.

Lowe Jr WL, Adamo M, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D (1989) Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor: effects on gene expression and binding. *J Clin Invest* 84:619-626.

Lupien SJ, Fiocco A, Wan N, Maheu F, Lord C, Schramek T, Tu MT (2005) Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology* 30:225-242.

Ma J, Yang SX, Ho GJ, Festoff BW (1994 a) Insulin-like growth factor binding protein-1 at mouse neuromuscular synapses. *Synapse* 17:225-9.

Ma J, Yang SX, Ho GJ, Festoff BW (1994 b) Insulin-like growth factor binding protein-1 is pre-synaptic at mouse neuromuscular synapses and is transported in nerve. *Neurochem Res* 19:1363-8.

Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE (1998) Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* 87: 559-569.

Marton LJ, Morris DR (1987) Molecular and cellular functions of the polyamines. In: *Inhibition of Polyamine Metabolism: Biological Significance and Basis for New Therapies*; McGann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A. New York: Academic Press, 79-105.

- Masland RH (1977) Maturation of function in the developing rabbit retina. *J Comp Neurol* 175:275-286.
- Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886.
- Massague J, Czech MP (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem* 257:5038-45
- Mathews LS, Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD (1988) Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 123:433-437.
- Matsuda M, Katoh-Semba R, Kitani H, Tomooka Y (1996) A possible role of the nestin protein in the developing central nervous system in rat embryos. *Brain Res* 723:177-189.
- Mattson MP (2000) Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 886:47-53.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18:49-72.
- Miller MW (1986). Maturation of rat visual cortex. III. Postnatal morphogenesis and synaptogenesis of local circuit neurons. *Dev. Brain Res.* 25:271-285.
- Miller NM, Oberdorfer M (1981) Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats. *Comp Neurol* 202:493-504.
- Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G (2003) Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 18:3367-3374.
- Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P (1997) Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 380:373-381.
- Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH (2002) Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev* 70:3-14.
- Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N (2002) An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res* 924:124-126.
- Nawy S, Jahr CE (1991) cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* 7:677-683.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 726:49-56.

Neff NT, Prevet D, Houenou JL, Lewis ME, Glicksman MA, Yin Q-W, Oppenheim RW (1993) Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. *J. Neurobiol.* 24:1578-1588.

Nelson R, Famiglietti EV, Jr., Kolb H (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* 41:472-483.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.

Ocrant I, Valentino KL, Eng LF, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG (1988) Structural and immunohistochemical characterization of insulin-like growth factor I and II receptors in the murine central nervous system *Endocrinology* 123:1023-1034.

Odom JV (1983) Effects of visual deprivation on monocular acuities of humans and animals. *Am J Optom Physiol Opt* 60:472-480.

O'Kusky, J.R., Ye, P., and D'Ercole, A.J. (2000) Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 20, 8435-8442.

Olanrewaju HA, Sanzenbacher ED, Seidel ER (1996) Insulin-like growth factor I in suckling rat gastric contents. *Dig Dis Sci* 41:1392-1397.

Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW (1998) Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 61:147-153.

Olney JW (1968) An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol* 7:250-268.

Pacteau C, Einon D, Sinden J (1989) Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav Brain Res* 34:79-96.

Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanez T, Kotchabhakdi N (2003) Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett* 352:45-48.

Pascual R, Figueroa H (1996) Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. *Biol Neonate* 69:399-404.

Pauk J, Kuhn CM, Field TM, Schanberg SM (1986) Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. *Life Sci* 39:2081-2087.

Paylor R, Morrison SK, Rudy JW, Waltrip LT, Wehner JM (1992) Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young rats. *Behav Brain Res* 52:49-59.

Perry VH, Henderson Z, Linden R (1983) Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol* 219:356-368.

Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:167-175.

Philipps A, Drakenberger K, Persson B, Sjögren B, Eklöf A, Hall K, Sara V (1989) The effects of altered nutritional status upon insulin-like growth factors and their binding proteins in neonatal rats. *Pediatr Res* 26:128-134.

Polley DB, Kvasnak E, Frostig RD (2004) Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. *Nature* 429:67-71.

Poltyrev T, Keshet GI, Kay G, Weinstock M (1996) Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol* 29:453-462.

Popken GJ, Hodge RD, Ye P, Zhang J, Ng W, O'Kusky JR, D'Ercole AJ (2004) In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci* 19:2056-2068.

Pow DV, Barnett NL (2000) Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci Lett* 280:21-24.

Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA (1993) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7:2609-2617.

Prusky GT, Reidel C, Douglas RM (2000a) Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behav Brain Res* 114:11-15.

Prusky GT, West PW, Douglas RM (2000b) Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Res* 40:2201-2209.

- Pulford BE, Ishii DN (2001) Uptake of circulating insulin-like growth factors (IGFs) into cerebrospinal fluid appears to be Independent of the IGF receptors as well as IGF-Binding Proteins. *Endocrinology* 142:213-220.
- Radaka Z, Kanekob T, Taharab S, Nakamotoc H, Pucsokd J, Sasvarie M, Nyakase C, Gotoc S (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38:17-23.
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y (2000a) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12880-12884.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000b) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-244.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, La Vail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 468:304-324.
- Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT_{1A} receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 53:285-290.
- Reese BE (1988) 'Hidden lamination' in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Res* 472:119-137.
- Reese BE, Jeffery G (1983) Crossed and uncrossed visual topography in dorsal lateral geniculate nucleus of the pigmented rat. *J Neurophysiol* 49:877-885.
- Reese BE, Colello RJ (1992) Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neurosci* 46:419-429.
- Reinhardt RR, Bondy CA (1994) Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135:1753-1761.
- Renner MJ and Rosenzweig MR (1987) Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior. Springer-Verlag, New York.
- Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43:151-160.
- Rodieck RW, Watanabe M (1993) Survey of the morphology of macaque retinal ganglion cells that project to the pretectum, superior colliculus, and parvicellular laminae of the lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 338:289-303.
- Ronca AE, Lamkin CA, Alberts JR (1993) Maternal contributions to sensory experience in the fetal and newborn rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 107:61-74.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 55:429-437.

Rosenzweig MR (1966) Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am Psychol* 21:321-332.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC (1967) Effects of differential environments on brain anatomy and brain chemistry. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc* 56:45-56.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1969) Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. *Dev Psychobiol* 2:87-95.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153:563-576.

Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 265-269.

Saito HA (1983) Morphology of physiologically identified X-, Y- and W-type retinal ganglion cells of the cat. *J Comp Neurol* 221:279-288.

Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res* 39:57-62.

Sale A, Putignano E, Cancedda L, Landi S, Cirulli F, Berardi N, Maffei L (2004) Enriched environment and acceleration of visual system development. *Neuropharmacology* 47:649-660.

Sale A, Cenni MC, Ciucci F, Putignano E, Chierzi S, Maffei L (2007) Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *Plos One* 11:1-8.

Sandi C (2004) Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5:917-930.

Santos A, Yusta B, Fernández-Moreno MD, Blázquez E (1994) Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene in rat brain and liver during development and in regenerating adult rat liver. *Mol Cell Endocrin* 101:85-93.

Sassoe-Pognetto M, Wassle H (1997) Synaptogenesis in the rat retina: subcellular localization of glycine receptors, GABA(A) receptors, and the anchoring protein gephyrin. *J Comp Neurol* 381:158-174.

Schneider ML (1992) Prenatal stress exposure alters postnatal behavioral expression under conditions of novelty challenge in rhesus monkey infants. *Dev Psychobiol* 25:529-540.

Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM (1996) Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3492-3497.

Sernagor E, Grzywacz NM (1995) Emergence of complex receptive field properties of ganglion cells in the developing turtle retina. *J Neurophysiol* 73:1355-1364.

Sernagor E, Eglen SJ, Wong RO (2001) Development of retinal ganglion cell structure and function. *Prog Retin Eye Res* 20:139-174.

Shatz CJ (1990) Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron* 5:745-756.

Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP, Ling N (1991) Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult Rat Serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J Biol Chem* 266:10646-10653.

Shiota K, Kayamura T (1989) Effects of prenatal heat stress on postnatal growth, behavior and learning capacity in mice. *Biol Neonate* 56:6-14.

Sirevaag AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry. *Brain Res* 351:215-226.

Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM (1997) Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 138:3515-3520.

Spreatico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De Biasi S (1995) In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J Comp Neurol* 363:281-295.

Stanford LR, Sherman SM (1984) Structure/function relationships of retinal ganglion cells in the cat. *Brain Res* 297:381-386.

Stenvers, K.L., Zimmermann, E.M., Gallagher, M., and Lund, P.K. (1994) Expression of insulinlike growth factor binding protein-4 and -5 mRNAs in adult rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* 339,91-105.

Strettoi E, Dacheux RF, Raviola E (1990) Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina. *J Comp Neurol* 295:449-466.

Strettoi E, Raviola E, Dacheux RF (1992) Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 325:152-168.

Szuran TF, Pliska V, Pokorny J, Welzl H (2000) Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav* 71:353-362.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness Jr VS (1994) Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:375-379.

Takahashi T, Nowakowski R, Caviness Jr VS (1995) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the murine cerebral wall. *J Neurosci* 15:6046-6057.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness Jr VS (1996) The Leaving or Q Fraction of the Murine Cerebral Proliferative Epithelium: A General Model of Neocortical Neuronogenesis. *J Neurosci* 16:6183-6196.

Tees RC (1999) The influences of rearing environment and neonatal choline dietary supplementation on spatial learning and memory in adult rats. *Behav Brain Res* 105:173-188.

Tees RC, Buhrmann K, Hanley J (1990) The effect of early experience on water maze spatial learning and memory in rats. *Dev Psychobiol* 23:427-439.

Thurlow GA, Cooper RM (1988) Metabolic activity in striate and extrastriate cortex in the hooded rat: contralateral and ipsilateral eye input. *J Comp Neurol* 274:595-607.

Tian N, Copenhagen DR (2001) Visual deprivation alters development of synaptic function in inner retina after eye opening. *Neuron* 32:439-449.

Tootle JS (1993) Early postnatal development of visual function in ganglion cells of the cat retina. *J Neurophysiol* 69:1645-1660.

Torasdötter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1996) Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions. *Neurosci Lett* 218:107-110.

Torasdötter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 93:83-90.

Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ (1990) Trophic effects of insulin-like growth-I on fetal rat hypothalamic cells in culture. *Neuroscience*. 35(3): 601-8.

Torres-Aleman I, Pons S, Ssantos-Benito FF (1992) Survival of Purkinje Cells in Cerebellar Cultures is Increased by Insulin-like Growth Factor I. *Eur J Neurosci* 4: 864-869.

Torres-Aleman I, Pons S, Arevalo MA. (1994) The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: developmental regulation and role in neuronak survival and differentiation. *J Neurosci Res* 39:117-26.

Trullas R, Skolnick P (1993) Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 111:323-331.

Turner AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res* 329:195-203.

van Oers HJ, de Kloet ER, Li C, Levine S (1998) The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology* 139:2838-2846.

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-13431.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.

van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.

Venable N, Fernandez V, Diaz E, Pinto-Hamuy T (1989) Effects of preweaning environmental enrichment on basilar dendrites of pyramidal neurons in occipital cortex: a Golgi study. *Brain Res Dev Brain Res* 49:140-144.

Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (2000) Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev Neurosci* 22:125-138.

Wakshlak A, Weinstock M (1990) Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiol Behav* 48:289-292.

Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosen T, Jorgensen JO, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH (1999) Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3591-3601.

Wang GY, Liets LC, Chalupa LM (2001) Unique functional properties of on and off pathways in the developing mammalian retina. *J Neurosci* 21:4310-4317.

- Wang S, Bartolome JV, Schanberg SM (1996) Neonatal deprivation of maternal touch may suppress ornithine decarboxylase via downregulation of the proto-oncogenes c-myc and max. *J Neurosci* 16:836-842.
- Ward AJ (1991) Prenatal stress and childhood psychopathology. *Child Psychiatry Hum Dev* 22:97-110.
- Wassle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Re* 71:447-480.
- Wassle H, Peichl L, Boycott BB (1983) A spatial analysis of on- and off-ganglion cells in the cat retina. *Vision Res* 23:1151-1160.
- Weinstock M (1997) Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev* 21:1-10.
- Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC (1990) Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by *in situ* hybridization – relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 4:773–778.
- Werther GA, Russo V, Baker N, Butler G (1998) The role of the insulin-like growth factor system in the developing brain. *Horm Res* 49 (Suppl 1):37–40.
- Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, McCoy JG (2001) Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav* 73:649-658.
- Winocur G (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Neurobiol Aging* 19:589-597.
- Wood TL, Brown AL, Rechler MM, Pintar JE (1990) The expression pattern of an insulin-like growth factor (IGF)-binding protein gene is distinct from IGF-II in the midgestational rat embryo. *Mol Endocrinol* 4:1257-1263.
- Wood, T.L., Streck, R.D. and Pintar, J.E. (1992) Expression of the IGFBP-2 gene in post-implantation rat embryos. *Development* 114; 59-66.
- Yamagata M, Herman JP, Sanes JR (1995a) Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 15:4556-4571
- Yamagata M, Sanes JR (1995b) Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development* 121:189-200.
- Yamaguchi F, Itano T, Mizobuchi M, Miyamoto O, Janjua NA, Matsui H, Tokuda M, Ohmoto T, Hosokawa K & Hatase O (1990) Insulin-like growth factor I (IGF-I) distribution in the tissue and extracellular compartment in different regions of rat brain. *Brain Res* 533:44–347.

Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ (1996) In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 95:44-54.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5:448-453.

Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.

Zackenfels K, Oppenheim RW, Rohrer H (1995) Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron* 14:731-741.

Zimmerman L, Parr B, Lendhal U, Cunningham M, McKay R, Gacin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursor. *Neuron*. 12: 11-24.