



Università degli Studi di Pisa
Dottorato di Ricerca in Neuroscienze di Base
(Triennio 2004-2006)

*“Study of brain aging and life extension in a
short-lived vertebrate”*

Candidato:

Eva Terzibasi

Relatori:

Dr. Enrica strettoi

Prof. Luciano Domenici

Riassunto

L'attività scientifica condotta nell'ambito del mio dottorato di ricerca in Neuroscienze di Base e dello Sviluppo mira a chiarire i processi neuro-fisiologici alla base dell'invecchiamento, al fine di valutare gli effetti globali del medesimo sul SNC e sul metabolismo generale del fenotipo senescente.

Gli studi fin qui condotti nei vertebrati sono stati fortemente limitati dalla mancanza di appropriati modelli animali caratterizzati da ridotta aspettativa di vita. La mia ricerca si è incentrata sull'utilizzo di un modello alternativo di vertebrato per lo studio dell'invecchiamento, in grado di garantire sia un'ampia gamma di applicazioni sperimentali, sia tempi ridotti di raccolta dei dati relativi a trattamenti cronici atti ad allungare la durata della vita. Tale modello è rappresentato da una specie di pesce annuale africano, *Nothobranchius furzeri*, in funzione delle seguenti caratteristiche:

- Questa specie può essere allevata in laboratorio e le uova sono facilmente conservate in condizioni di essiccamento a temperatura ambiente per mesi o anni, offrendo in tal modo un metodo facile e poco dispendioso di conservazione degli embrioni.
- la specie *N. furzeri* presenta un' aspettativa di vita massimo di 12 settimane, consentendo pertanto di ottenere risultati relativi ad un dato trattamento sperimentale in tempi nettamente minori rispetto a qualsiasi altro modello di vertebrato impiegato finora in ambito scientifico.
- *N. furzeri* può essere definito a pieno diritto un modello di invecchiamento, in quanto la sua cinetica di popolazione rispecchia fedelmente la Legge di Gompertz ("aumento esponenziale della probabilità di morte in funzione dell'età"), considerata una definizione oggettiva di invecchiamento.

In *N. furzeri* abbiamo dimostrato l'espressione precoce di alcuni tipici markers dell'invecchiamento (lipofuscina, SAβeta-galattosidase activity, degenerazione neurofibrillare), alcuni dei quali già osservati in Zebrafish; inoltre abbiamo documentato

tramite test di apprendimento e registrazioni video la riduzione delle capacità cognitive e dell'attività motoria in funzione dell'età. Tutte queste osservazioni dimostrano che questa specie a ridotta aspettativa di vita presenta aspetti morfo-fisiologici tipici dell'invecchiamento nei vertebrati, quali appunto marcatori istologici dell'invecchiamento e decadimento età-dipendente delle funzioni psico-motorie. Il nostro modello è stato in seguito utilizzato per testare due manipolazioni sperimentali:

- Nel primo studio abbiamo testato su *N. furzeri* gli effetti del Resveratrolo, un composto naturale presente in alcuni frutti quali l'uva e noto per le sue capacità antiossidanti.
- Nel secondo studio è stato preso in esame l'effetto modulatore delle variazioni di temperatura sulla velocità di accrescimento, la durata dell' aspettativa di vita ed il decadimento locomotorio e cognitivo età-dipendente del nostro modello.

Validazione di *N. furzeri* come nuovo modello sperimentale per gli studi sull'invecchiamento

Esame istologico di alcuni marcatori dell'invecchiamento

Abbiamo caratterizzato il processo di senescenza in questo pesce, evidenziando processi di accumulo età-dipendente di alcuni marcatori dell'invecchiamento di validità generale: a tale scopo sono stati esaminati, in tessuti neurali e non, lipofuscina, attività beta-galattosidasi dipendente dall'invecchiamento e degenerazione neurofibrillare. I risultati hanno evidenziato un aumento della concentrazione di ciascun marcatore nei soggetti a 9 rispetto a quelli a 5 settimane

.

*Esame delle funzioni psico-motorie del fenotipo senescente in *N. furzeri**

Tanto i test relativi al comportamento motorio, quanto quelli di apprendimento hanno evidenziato anche un significativo declino età-dipendente di attività motoria e performance cognitiva degli animali a 9 rispetto a quelli a 5 settimane.

L'insieme dei dati sperimentali ottenuti da questi studi preliminari è stato preso come riferimento per tutti gli esperimenti successivi applicati al nostro modello.

Effetti del Resveratrolo sull'invecchiamento di *N. furzeri*

Effetto del Resveratrolo sulle curve di sopravvivenza

157 *N. furzeri* sono stati cresciuti in condizioni standard fino a 4 settimane. In seguito un centinaio di questi sono stati prelevati e suddivisi in tre gruppi sperimentali, per essere alimentati con cibo arricchito di Resveratrolo in tre diverse concentrazioni: 24µg/g di cibo (0.1µM, n=30), 120µg/g di cibo (0.5µM, n=60), 600µg/g di cibo (2.5µM, n=20); i restanti 47 soggetti sono stati usati come controlli e pertanto nutriti mediante dieta standard.

La somministrazione di Resveratrolo ha prodotto un significativo aumento della aspettativa di vita nei gruppi trattati con un chiaro effetto dose-risposta: il trattamento a dose minore (24µg/g di cibo) non ha mostrato alcun effettivo aumento della sopravvivenza, sia rispetto ai controlli, che al gruppo non trattato di riferimento. Il trattamento a dose intermedia (120µg/g di cibo) ha prodotto invece un incremento della aspettativa di vita media e massima del 33% e del 27% rispettivamente ($p < 0.001$, Log-Rank test); mentre il trattamento a dose più alta (600µg/g di cibo) ha indotto un aumento del 56% e del 59% della aspettativa di vita media e massima rispettivamente ($p < 0.01$, Log-Rank test). Il trattamento a dose massima di Resveratrolo si è rivelato significativamente più efficace di quello a dose intermedia ($p < 0.01$, Log-Rank test).

L'estensione della aspettativa di vita è stata studiata separatamente nei maschi e nelle femmine e non ha mostrato nessuna significativa differenza tra i due sessi. Infine abbiamo osservato che l'aumento della sopravvivenza non risultava connesso con la riduzione o perdita di fertilità; al contrario, le femmine dei gruppi trattati continuavano a produrre uova e i maschi risultavano ancora fertili a 12 settimane, quando tutti i controlli erano già morti.

Effetto del Resveratrolo sui marcatori istologici dell'invecchiamento

A livello istologico, abbiamo analizzato e confrontato la degenerazione neurofibrillare in controlli giovani e vecchi (5 vs 9 settimane) in soggetti vecchi trattati con Resveratrolo 0.5µM (120µg/g di cibo). I controlli giovani non mostravano alcun segno di degenerazione

neurofibrillare, mentre i controlli vecchi presentavano un evidente marcatura nel tessuto cerebrale. Al contrario, i soggetti vecchi trattati con Resveratrolo risultavano totalmente preservati dal processo di degenerazione neurale.

Effetto del resveratrolo sul decadimento delle funzioni motorie e cognitive

Abbiamo testato e confrontato l'attività locomotoria spontanea a 5 e 9 settimane dei tre gruppi trattati a concentrazioni crescenti e dei controlli. Le analisi statistiche relative hanno rivelato una riduzione del movimento spontaneo nei controlli di 9 settimane, in accordo con i dati di riferimento ottenuti negli esperimenti iniziali. Tale riduzione era ritardata nei pesci trattati con Resveratrolo 0.5 μ M e la differenza tra controlli e trattati a 9 settimane risultava significativa.

L'esplorazione in campo aperto, un tipico test comportamentale usato anche sui roditori per quantificare l'attività motoria associata all'esplorazione di un nuovo ambiente, ha rivelato una riduzione età-dipendente del tempo trascorso in movimento e della velocità media nei controlli a 9 rispetto a 5 settimane. Al contrario, l'attività motoria risultava pressoché inalterata nei soggetti a 9 settimane trattati con Resveratrolo (0.5 μ M): più precisamente, la performance motoria dei pesci trattati aumentava fino alla decima settimana, per decrescere intorno alla tredicesima.

Infine, il decadimento di efficienza nelle performances cognitive osservato nei controlli di 9 rispetto a quelli di 5 settimane, così come negli esperimenti preliminari di riferimento, risultava totalmente prevenuto nei soggetti a 9 settimane trattati con Resveratrolo 0.5 μ M.

Effetti della variazione della temperatura sul fenotipo senescente di *N. furzeri*

E' noto che le variazioni di temperatura ambientale sono in grado di modulare la sopravvivenza e i processi d'invecchiamento in organismi pecilotermi quali vermi, moscerini e pesci

Nel seguente esperimento abbiamo studiato l'azione delle variazioni di temperatura sulla cinetica d'invecchiamento e su alcune forme di deficit psico-motorio età-dipendente del nostro modello.

Effetto dell'abbassamento di temperatura sulle curve di sopravvivenza

La riduzione della temperatura da 25°C standard a 22°C nell'ambiente di allevamento ha mostrato una significativa estensione dell'aspettativa di vita medio da 9 a 10 settimane, nonché di quello massimo da 11 a 12.5 settimane (LogRank test, $p < 0.0001$).

Effetto dell'abbassamento di temperatura sulle curve di crescita

La quantificazione della taglia ha rivelato che i soggetti sperimentali allevati a 22°C risultavano nettamente più piccoli rispetto a quelli mantenuti a 25°C (Mann-Whitney U-test, $p < 0.0001$).

Effetto dell'abbassamento di temperatura sul decadimento delle funzioni cognitive e motorie

Nella quantificazione dell'attività locomotoria, gli animali di controllo a 9 settimane presentavano una riduzione rispetto a quelli a 5 settimane tanto della velocità media (one-way ANOVA, $p < 0.001$) quanto del tempo complessivo trascorso in movimento (one-way ANOVA, $p < 0.001$). Nei soggetti sperimentali di 9 settimane allevati a 22°C il deficit motorio risultava completamente prevenuto e gli animali mostravano addirittura una velocità media di spostamento più alta rispetto sia a quelli di 5 che a quelli di 9 settimane mantenuti a 25°C.

Infine abbiamo quantificato il grado di apprendimento mediante l'uso di una "shuttle-box" opportunamente modificata per supportare il test sperimentale. Per prima cosa, sono stati testati due gruppi di controllo a 5 e 9 settimane, che hanno dato risultati in perfetto accordo con i dati degli esperimenti preliminari di riferimento: i soggetti vecchi sottoposti al test mostravano una percentuale di successi del 43% su 50 trials consecutivi, contro il 73% dei soggetti giovani. Questa differenza è stata valutata fortemente significativa (Mann-Whitney U-test, $p < 0.001$). I risultati relativi al set di animali a 22°C hanno mostrato che la bassa

temperatura è in grado di preservare totalmente i soggetti da questa forma di deficit cognitivo età-dipendente.

Differenze nel fenotipo senescente dei diversi isolati di *N. furzeri*

In ultima analisi, sono state confrontate le curve di sopravvivenza di diverse popolazioni di *N. furzeri* provenienti da regioni con diversa durata della stagione delle piogge.

Inoltre, le differenze nell'aspettativa di vita delle popolazioni di *N. furzeri* studiate si riflettono nella cinetica di accumulo dei vari marcatori fisiologici di invecchiamento, vale a dire Lipofuscina, degenerazione neuro-fibrillare e deficit psico-motorio età- dipendente.

In base alle informazioni che emergono da tali confronti, potranno essere impostati opportuni esperimenti di genetica comparativa volti ad identificare geni o gruppi di essi direttamente coinvolti nella modulazione dell' aspettativa di vita di questo nuovo modello animale d'invecchiamento.