

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia del Comportamento

Ciclo XXV

**Analisi del fenotipo comportamentale
e metabolico di una linea di topo con
inattivazione condizionale del gene
NPY-1R**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Stefano Parmigiani

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Paola Palanza

Dottorando: Riccardo Panelli

*a nonna Felida,
che non ce l'ha fatta ad
essere qui con noi, oggi*

Indice

Verso una biologia della mente	V
1 Perchè un modello animale?	1
1.1 Geni e comportamento: <i>la neurogenetica</i>	1
1.1.1 Metodi di studio della genetica del comportamento: gli studi sulle adozioni	2
1.1.2 Modelli animali	3
1.2 Modelli animali transgenici	3
1.2.1 Tecniche <i>reverse</i> e tecniche <i>forward</i>	4
1.2.2 Metodo del <i>Knock-out condizionale</i>	4
1.2.3 Espressione inducibile di un transgene: controllo spaziale del gene modificato (sistemi <i>Tet-on</i> e <i>Tet-off</i>)	5
1.2.4 Espressione inducibile di un transgene: controllo temporale del gene modificato	7
2 Il modello murino knock-out condizionale per NPY-Y1R nel proencefalo (NPY^{rfb})	9
2.1 Il Neuropeptide Y (NPY)	9
2.1.1 Effetti di NPY sul comportamento	10
2.1.2 Il ruolo di NPY nel metabolismo e comportamento alimentare	11
2.2 Il recettore Y1R	15
2.2.1 Effetti di Y1R su comportamento emozionale	15
2.2.2 Effetti di Y1R su comportamento alimentare e bilancio energetico	18
2.2.3 NPY-Y1R e GABA (acido γ -aminobutirrico)	19
2.3 Generazione del modello knock-out condizionale per Y1R	21
2.3.1 Generazione e analisi del knock-out germinale	21
2.3.2 Analisi della colocalizzazione di α -CaMKII e del recettore Y1R	22
2.3.3 Effetti della delezione di Y1R	24
3 Generazione animali sperimentali e analisi dell'ambiente precoce	25
3.1 Obiettivo di questo lavoro	27
3.2 Allevamento delle linee murine	28
3.2.1 Trattamento con antibiotico Doxiciclina	29
3.3 Genotipizzazione	29
3.3.1 Materiali e metodi	29
3.4 Analisi dell' ambiente perinatale precoce (<i>crossfostering</i>)	31
3.4.1 Osservazione del comportamento materno	31

3.4.2	Analisi del comportamento materno	34
3.4.3	Risultati	37
3.4.4	Discussione	38
4	Analisi del comportamento alimentare e metabolico	41
4.1	Stile di cura materno e crescita corporea	41
4.1.1	Risultati	42
4.2	Vulnerabilità ad obesità indotta da una dieta ipercalorica	49
4.2.1	Materiali e metodi	50
4.2.2	Risultati	52
4.2.3	Consumo di cibo (<i>food intake</i>)	55
4.2.4	Glucose Tolerance Test	57
4.2.5	Quantità di tessuto adiposo bianco (WAT)	57
4.2.6	Parametri ematici	62
4.3	Confronto fra effetti dieta ricca in grassi e dieta standard	66
4.3.1	Materiali e metodi	66
4.3.2	Risultati	68
4.3.3	Discussione	78
5	Analisi comportamento ansioso e sociale	81
5.1	Valutazione dei comportamenti di tipo ansioso	82
5.1.1	Risultati	83
5.2	Valutazione evitamento/preferenza sociale	86
5.2.1	Risultati	88
5.3	Ipofagia indotta da novità (NIH)	94
5.3.1	Risultati	95
5.4	Comportamenti simil-autistici	98
5.4.1	I disturbi dello spettro autistico	98
5.4.2	Test delle tre camere	99
5.4.3	Risultati	101
5.5	Discussione	105
6	Risposta a stress psicosociale cronico	107
6.1	Il paradigma della sconfitta sociale: il test residente/intruso	108
6.1.1	Materiali e metodi	109
6.1.2	Risultati	109
6.2	Stress psicosociale cronico (CPS)	110
6.2.1	Valutazione anedonia	111
6.2.2	Materiali e metodi	111
6.2.3	Risultati	115
6.2.4	Discussione	121
	Conclusioni	122
	Bibliografia	131
	Indice delle figure	147

Introduzione

Verso una biologia della mente

Fin dalla fondazione di quel laboratorio di tre stanze attrezzato con strumenti rudimentali a Lipsia nel 1879 ad opera di Wilhelm Maximilian Wundt, fu chiara la direzione che la moderna psicologia stava prendendo, alla ricerca di quella scientificità che i tempi iniziavano a richiederle. Il suo *“Fondamenti di psicologia fisiologica”* (1873-1874) può essere considerato il primo vero trattato psicologico-scientifico della storia, in cui il filosofo e psicologo tedesco raccolse e scrisse una mole gigantesca di materiale riguardante la nascente disciplina dando alla materia per la prima volta una base concettuale e un assetto organico. E' la scissione storica tra filosofia e psicologia, scissione che si fa ancora più profonda quando alcuni psicologi iniziano ad assumere i metodi rigorosi delle discipline biologiche aspirando alla creazione di una “biologia della mente”. Con gli anni e con i progressi in tutte le aree della Scienza (psicologia, filosofia, medicina, biologia, genetica), il legame fra geni e fenotipo è diventato sempre più complesso e ha portato alla nascita di discipline ibride quali la biologia e la genetica del comportamento, le scienze cognitive e le neuroscienze, fino all'epigenetica. Citando Tucci e Tucci (2009), possiamo affermare che in questa nuova visione della scienza dei geni e dei comportamenti la questione *“nature vs. nurture”* (Galton, 1869) ha superato lo stadio di dibattito per diventare vero e proprio settore di indagine sperimentale che può essere quantificato:

“Nell’ ambito delle scienze del comportamento, la scoperta che i cambiamenti ontogenetici sono determinati in buona parte da fattori ereditari ha rappresentato un notevole cambiamento: il codice che permette l’ ereditarietà dei comportamenti vive con noi attraverso le generazioni, si modifica e partecipa al processo di adattamento dell’organismo sulla terra. In questo scenario, lo studio sperimentale del “gap” tra geni e comportamenti entra in laboratorio, se ne manipolano le componenti biologiche e diventa, a pieno titolo, un oggetto di studio scientifico ”

Tucci e Tucci (2009)

Il lavoro presentato in questa Tesi va esattamente in questa direzione ibrida, alla ricerca di interazioni fra geni e ambiente, fra sfera fisica e sfera psichica, fra *res cognitans* e *res extensa*.

Capitolo 1

Perchè un modello animale?

Una delle maggiori conquiste del ventesimo secolo sono senz'altro le scoperte nel campo della genetica, dalle leggi di Mendel sull'ereditarietà all'ottenimento della prima sequenza del DNA dell'intero genoma umano. Queste scoperte e la crescente consapevolezza dei meccanismi genomici hanno portato ad un maggiore interesse da parte anche di tutte le altre discipline che studiano la vita nei confronti della trasmissione del patrimonio ereditario, dalla psicologia alle neuroscienze, alle scienze del comportamento. Esperimenti naturali di genetica come quelli sui gemelli o sulle adozioni, ad esempio, sono studi ormai di dominio anche di discipline storicamente meno "esatte" come la psicologia.

1.1 Geni e comportamento: *la neurogenetica*

Tutte le informazioni necessarie ad ogni cellula di un organismo per poter funzionare sono contenute nei geni, responsabili della trasmissione dei caratteri ereditari di generazione in generazione. I geni sono presenti in due forme lievemente differenti (alleli), responsabili della "variabilità genetica" di una specie, variabilità che sta alla base dell'evoluzione di una specie; spesso la ricerca scientifica si basa proprio sulla creazione di alleli modificati artificialmente per studiare le funzioni genomiche, alla ricerca di una maggiore comprensione delle basi biologiche ed ereditarie del comportamento. Lo studio di come i geni interagiscono fra loro e di come strutturino il comportamento prende il nome di Neurogenetica, ovvero la branca della Genomica Funzionale che si occupa dell'analisi genetica della struttura e della funzione del cervello in relazione al comportamento; la Neurogenetica si avvale spesso per questi studi di mutazioni genetiche note allo scopo di analizzare nel dettaglio la funzione a livello di fenotipo comportamentale del gene mutato (Plomin *et al.*, 2001).

Tutti gli organismi hanno geni che codificano in questo modo e regolano lo sviluppo di tutti gli apparati, compreso il Sistema Nervoso e quindi anche del comportamento. Un singolo allele non codifica mai per un determinato comportamento, ma per un determinato enzima, il quale catalizzerà reazioni implicate in più caratteri (Pleiotropia); d'altro canto spesso un unico carattere è controllato da più geni (Poligenia).

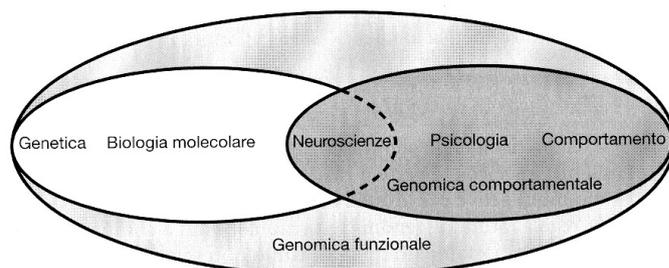


Figura 1.1: Interazione fra le diverse discipline che si occupano di geni e comportamento

1.1.1 Metodi di studio della genetica del comportamento: gli studi sulle adozioni

Molti comportamenti sono ricorrenti nelle famiglie, ma le somiglianze fra i membri di una famiglia possono essere dovute sia alla genetica sia all'ambiente di crescita. La via più diretta per capire quali sono le fonti genetiche e ambientali delle somiglianze fra i membri di una famiglia è rappresentata dalle adozioni. Le adozioni creano individui geneticamente imparentati che non condividono però lo stesso ambiente. Le somiglianze fra questi individui forniscono una stima del contributo genetico alle somiglianze fra membri di una famiglia. Le adozioni creano inoltre individui che condividono lo stesso ambiente, ma che non sono geneticamente imparentati. Si prendano ad esempio in considerazione i genitori e i figli. In uno studio familiare i genitori sono tali sia per quanto riguarda l'effetto dei geni, sia per quanto riguarda quello dell'ambiente, poiché condividono con i figli sia l'ambiente di crescita sia il patrimonio genetico, sono cioè genitori genetici e ambientali (Plomin *et al.*, 2001).

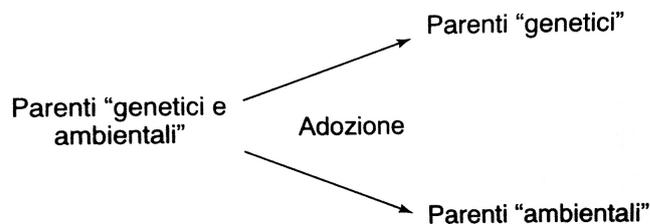


Figura 1.2: L'adozione è un esperimento genetico che crea dei parenti "genetici" e dei parenti "ambientali".

L'adozione separa i genitori genetici da quelli ambientali: i genitori genetici sono quelli che danno in adozione i propri figli molto presto dopo la nascita. Le somiglianze fra questi e la prole data in adozione, sono indice diretto delle somiglianze genetiche fra figli e genitori. I genitori ambientali sono i genitori che adottano bambini a loro geneticamente non correlati. Se la scelta dei genitori adottivi è casuale, le somiglianze fra i genitori adottivi e la prole adottata, sono indice diretto del contributo dell'ambiente di crescita post-natale. Poiché i dati sui genitori naturali sono ottenibili solo in pochi casi, l'influenza genetica può essere dedotta anche comparando le famiglie in cui i genitori sono genetici e ambientali con le famiglie adottive, nelle quali l'unica influenza è data dall'ambiente familiare. Oltre ai genitori, possono

anche essere studiati i fratelli genetici e ambientali. I fratelli genetici sono figli degli stessi genitori ma adottati molto presto dopo la nascita da famiglie diverse. I fratelli ambientali sono coppie di bambini geneticamente non correlati adottati molto presto dopo la nascita dalla stessa famiglia (Plomin *et al.*, 2001).

1.1.2 Modelli animali

Nella ricerca scientifica, i modelli animali svolgono un ruolo fondamentale per la comprensione di svariati meccanismi fisiopatologici, genetici e molecolari dell'organismo umano, oltre che delle cause e dei meccanismi dell'insorgenza di numerose malattie. Rappresentano, inoltre, utili strumenti farmacologici e chirurgici per lo sviluppo di terapie innovative contro patologie già note e trattate, o ancora parzialmente sconosciute. Specialmente in campo biotecnologico, gli animali sono mezzi fondamentali per lo studio della funzione di geni e proteine specifici, la cui dettagliata conoscenza ne consente, mediante le tecniche di ingegneria genetica, la modificazione di espressione o funzione; in questo modo è possibile effettuare indagini in vivo ed esaminare la rilevanza fisiopatologica di qualunque proteina direttamente in un organismo vivente complesso. Per quanto riguarda lo studio di patologie comportamentali, neurologiche e psichiatriche, l'utilizzo di animali da laboratorio (soprattutto se di piccola taglia e particolarmente prolifici) come modelli ha notevoli e ovvi vantaggi, rispetto all'uso di soggetti umani. Tuttavia la distinzione tra la sfera neurologica e quella psichiatrica è di difficile demarcazione quando si studia un modello animale, in particolare modo quando il dato che otteniamo è derivante solo dall'osservazione del comportamento. Modelli come il topo condividono con l'uomo un ampio repertorio comportamentale, tuttavia ci si chiede sempre se il parallelismo possa essere così diretto, e dove sia il confine fra ciò che possiamo inferire sul comportamento umano a partire da quello murino (Tucci e Tucci, 2009). Un errore da evitare accuratamente è quello di creare test che non tengano conto delle differenze comportamentali fra uomo e topo, vale a dire test apparentemente uguali ma che non tengano però conto della *validità di contenuto*, test cioè senza validità etologica.

1.2 Modelli animali transgenici

I progressi dell'ingegneria genetica hanno portato ad un uso sempre maggiore di animali geneticamente modificati, usati in maniera crescente per definire o chiarire le funzioni in vivo di specifiche molecole, precedentemente studiate in vitro. I fenotipi di animali mutanti possono essere studiati a vari livelli, dalla biochimica alla biologia cellulare, dalla fisiologia dei sistemi al comportamento. Le moderne biotecnologie consentono la caratterizzazione sia di disordini che portano a un guadagno di funzione (caso in cui la proteina mutante viene espressa con funzione alterata, o un gene wild-type, cioè selvatico, è sovraespresso), sia di quelli che risultano in un calo di funzione (caso in cui un gene endogeno viene inattivato o la proteina mutante non è funzionale). In tali studi si spera, quindi, di ritrovare negli animali alterati risposte, o, in caso di patologie, sintomi, simili a quelli osservati nell'uomo (Aguzzi *et al.*, 1996; Ludolph, 1996), e che la patogenesi sia simile fra le due specie, in modo da poter studiare il quadro complessivo della malattia in esame. Il modello animale maggiormente impiegato in questo genere di studi è il topo, in quanto presenta molte

somiglianze fisiologiche con la specie umana ed è facilmente manipolabile sia a livello molecolare che embrionale. Sebbene per lo studio del comportamento si sia tradizionalmente preferito il ratto al topo, la ricerca transgenica si è per lo più avvalsa di quest'ultimo, appunto per la maggiore facilità di manipolazione dell'embrione e per un più piccolo numero di ceppi incrociati, e quindi geneticamente omogenei, come background. Per tali motivi, i topi rappresentano la specie animale più adatta per quegli studi che si propongono di manipolare il genoma con le tecniche dell'ingegneria genetica, al fine di creare modelli di condizioni genetiche e molecolari più simili possibile a quelli dei disturbi umani.

1.2.1 Tecniche *reverse* e tecniche *forward*

Negli studi genetici sul topo si distinguono fondamentalmente due approcci per analizzare le funzioni dei geni: l'approccio al gene (gene-driven) e l'approccio al fenotipo (phenotype-driven). Il primo, detto anche genetica *reverse*, parte da uno specifico target genetico, ad esempio una sequenza genomica, e cerca di risalire al fenotipo associato; il secondo approccio, parte da un particolare fenotipo a cui si è interessati e mira a identificare successivamente il gene che ne è responsabile ed è detto genetica *forward* (Tucci e Tucci, 2009). Fra le tecniche *reverse*, esistono vari metodi per manipolare geneticamente una linea di animali e studiare il ruolo di singoli geni sul comportamento:

- *metodo degli ibridi*: incrocio fra specie affini per verificare la ripercussione sul fenotipo di un genotipo ibrido;
- *metodo del mosaico*: è un metodo per capire come i geni influenzino le basi biologiche del comportamento, creando individui che hanno il gene di interesse non in tutto il soma, ma a “macchia di leopardo”; così facendo, sapendo esattamente in quale area ogni individuo ha o non ha quel gene, ed osservandone il comportamento, potremmo dire in quali aree quel gene ha bisogno di essere per poter essere espresso fenotipicamente;
- *metodo della mutagenesi mirata* (gene targeting): in questi animali si altera volutamente un gene per alterarne la funzione. Si parla di *animali transgenici* se il gene mutato è estraneo al normale genoma di quella specie, oppure di animali *knock-out* se si tratta di soppressione selettiva di un gene mediante delezione di un particolare frammento di DNA. Esistono tuttavia tecniche ancora più moderne dove si introducono modifiche ancora più sottili, capaci di regolare l'espressione di quel gene a nostro piacimento, piuttosto che annullarla del tutto, ottenendo quindi una delezione limitata spazialmente, temporalmente, o entrambe le condizioni (modelli *knock-out condizionale*).

1.2.2 Metodo del *Knock-out condizionale*

Il metodo del knock-out condizionale è importantissimo, in quanto spesso la soppressione totale di quel gene sarebbe incompatibile con la vita dell'embrione, oppure la delezione da tutto il soma dell'animale controproducente per gli scopi della ricerca, in quanto potrebbe mettere in moto processi di compensazione non previsti nel disegno sperimentale. Con tecniche più sofisticate è possibile generare dei topi

modificati geneticamente in cui la rimozione del gene avviene solo in determinati tessuti nell'adulto oppure dopo somministrazione di determinate sostanze. È il caso dei mutanti condizionali, che permette di capire cosa succede se un gene è alterato in un tessuto adulto, per esempio per effetto di mutageni. Lo studio di animali knock-out ha permesso di comprendere il ruolo di molti geni, alcuni dei quali già studiati senza successo in vitro.

Come si ottiene un animale knock-out

La differenza fondamentale è che un gene già presente nel genoma può essere sostituito, modificato o inattivato, mentre con i transgeni si può solo inserire un gene in più. La creazione di un topo transgenico comincia con l'individuazione del gene di interesse e di un transgene, ovvero della porzione di DNA che deve essere inserita nel genoma nel topo per permetterne il controllo dell'espressione. L'elemento è spesso un cDNA, che codifica per una specifica proteina o parte di essa (Galvin-Parton *et al.*, 1997; Moxham *et al.*, 1993). Il transgene viene subclonato a valle di un adatto promotore, che guiderà la sua espressione. Per quanto riguarda gli studi sul sistema nervoso, l'espressione del transgene può essere controllata da specifiche sequenze promotrici, che portano all'espressione del transgene in specifiche aree cerebrali. Molti studi hanno utilizzato promotori che si attivano dopo la nascita, per evitare potenziali effetti negativi sullo sviluppo dell'animale, dovuti all'espressione del transgene durante il periodo prenatale. Il transgene viene introdotto in una singola cellula embrionale di topo, mediante l'iniezione nel pronucleo (Hogan *et al.*, 1986); una volta che è all'interno del pronucleo, il transgene può integrarsi in maniera casuale nel genoma, oppure può essere degradato dalle esonucleasi. A questo punto, dopo l'impianto della cellula staminale embrionale ingegnerizzata in una madre adottiva, tutte o quasi le cellule del topo risultante contengono il transgene. Se, però, l'inserzione di quest'ultimo è avvenuta dopo numerosi cicli di divisione cellulare, è possibile che si formi un topo definito "mosaico", cioè con il transgene presente solo in una piccola popolazione di cellule. Il transgene sarà trasmesso alle generazioni seguenti se è presente nelle cellule della linea germinale; in questo caso i topi vengono chiamati capostipite, e possono essere studiati al fine di capire le conseguenze fenotipiche dovute all'espressione del costrutto. Il gene d'interesse dovrebbe essere espresso prevalentemente a livello cerebrale (Tsien *et al.*, 1996), sebbene gli effetti dell'inserzione possano risultare in un'espressione ectopica (espressione di un gene con una localizzazione differente da quella normale).

1.2.3 Espressione inducibile di un transgene: controllo spaziale del gene modificato (sistemi *Tet-on* e *Tet-off*)

Come già visto, l'espressione cronica di un transgene potrebbe causare anomalie nello sviluppo o fenomeni compensativi, in grado di mascherare il ruolo della proteina di interesse. Per evitare tali complicazioni, è auspicabile impiegare un controllo sull'espressione del transgene. Sono disponibili numerosi sistemi inducibili con caratteristiche comuni. Un esempio è il *tetracycline-regulatory system* (Gossen e Bujard, 1992; Shockett *et al.*, 1995), regolato da un antibiotico della famiglia delle Tetracicline (**Tet**), in cui sono richiesti la generazione e l'incrocio di due diverse linee di topi. La prima esprime il transattivatore tTA (*tetracycline transactivator*) sotto il

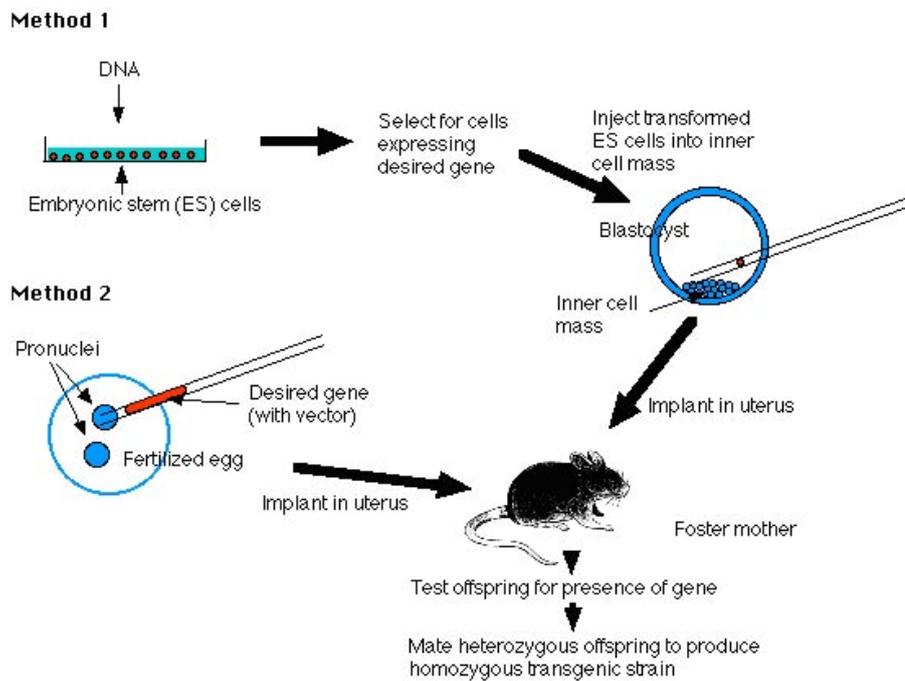


Figura 1.3: Come ottenere un topo transgenico

controllo di un promotore, che dirige la sua espressione nel tessuto d'interesse. Il transattivatore della tetraciclina è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni a valle della sua sequenza promotrice (TetOp). La seconda linea di topi ospita il transgene, contenente il gene d'interesse a valle del TetOp. L'inducibilità del sistema Tet dipende dalla presenza di una tetraciclina, come ad esempio la Doxiciclina (**Dox**). Nel sistema "Tet-off", la Tet inibisce l'interazione fra tTA e TetOp. L'induzione del transgene nella fase adulta dell'animale richiede l'esposizione persistente del topo, cominciando dal concepimento, a livelli di antibiotico sufficienti a prevenire l'espressione del transgene. Per massimizzare la responsabilità e minimizzare gli effetti collaterali degli antibiotici, i topi vengono esposti alla quantità minima richiesta per reprimere la trascrizione del transgene. Un sistema alternativo, che elimina la necessità di un'esposizione cronica ad antibiotico, utilizza una forma mutante del tTA, il *reverse tTA* (rtTA), che viene attivato, piuttosto che represso, dalla presenza di tetraciclina ("Tet-on").

Modello animale knock-out condizionale $Npy1r^{fb}$

Come vedremo nel prossimo capitolo, nel caso del modello animale da noi utilizzato ($NPY1R^{fb}$), il sistema Tet-off è stato usato per dirigere l'espressione del transgene in specifiche regioni cerebrali, in particolari momenti della vita adulta del topo (Mayford *et al.*, 1996). Il promotore per α -CaMKII è stato usato per restringere l'espressione del tTA nel proencefalo. Questi topi sono stati poi incrociati con un'altra linea transgenica, portante una forma mutata di α -CaMKII sotto il controllo di TetOp, per generare topi contenenti entrambi i transgeni. In presenza

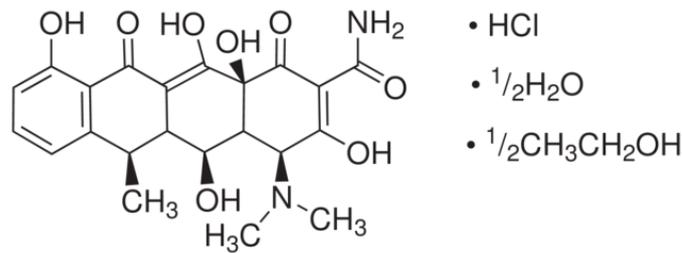


Figura 1.4: La Doxyciclina è un antibiotico della famiglia delle Tetracicline particolarmente efficace nel controllo di sistemi Tet

A Transgene activity in principal neurons of the forebrain of *Npy^{rtb}* mice

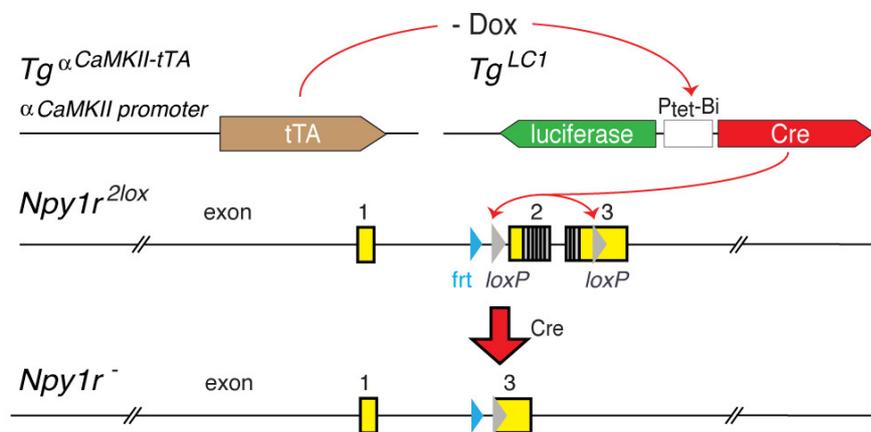


Figura 1.5: Il sistema Tet-off nel modello murino NPY ^{rtb}

della tetraciclina Doxyciclina, particolarmente efficace nella regolazione dell'attività del tTA, la trascrizione del transgene mutante CaMKII nel cervello viene repressa. Quando la Dox è sospesa, la chinasi mutante viene espressa in subregioni differenti del proencefalo, dipendenti dalle linee di topo usate.

1.2.4 Espressione inducibile di un transgene: controllo temporale del gene modificato

Per superare i limiti ed i rischi determinati dalla comparsa di compensazioni funzionali, che mascherino il fenotipo risultante dall'assenza cronica di un gene endogeno, oppure la morte prematura dell'embrione, è possibile realizzare un controllo temporale dell'ablazione di un gene, utilizzando l'enzima Cre-ricombinasi del batteriofago P1 di *E. coli*. La ricombinasi Cre riconosce e si lega a una sequenza di DNA di 34 bp, chiamata sito loxP, che contiene due sequenze ripetute di 13 bp, in orientamento opposto, che fiancheggiano una sequenza spaziatrice di 8 bp (Abremski e Hoess, 1984; Hoess *et al.*, 1982). Se due siti loxP sono presenti in un frammento di DNA, tale frammento viene detto "floxato" (fiancheggiato da siti loxP).

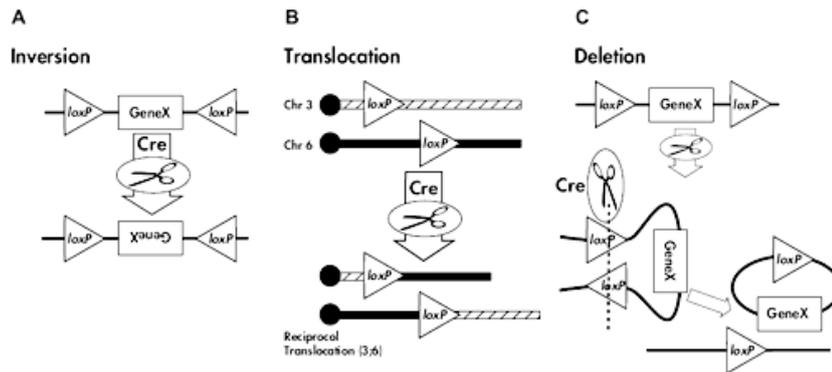


Figura 1.6: Vari esempi di utilizzo di tecniche Cre-lox

La ricombinazione mediata dalla ricombinasi Cre risulta nella rimozione dell'intero segmento floxato, e lascia dietro solo un sito loxP. Questo metodo è adottato per ottenere la rimozione del gene di interesse in una regione specifica del cervello e in un momento particolare della vita dell'animale, periodo postnatale nel caso del modello animale oggetto dei nostri studi.

Capitolo 2

Il modello murino knock-out condizionale per NPY-Y1R nel proencefalo (NPY^{rfb})

In questo lavoro mi sono servito di un modello di topo knock-out condizionale per uno dei 5 sottotipi recettoriali del Neuropeptide Y: Y1R. Mediante le tecniche di inducibilità controllata di un transgene appena viste nei paragrafi 1.2.3 e 1.2.4, l'espressione della ricombinasi Cre è stata così guidata per avvenire solo nelle aree proencefaliche esprimenti α -CaMKII. Poichè questo promotore viene attivato solo dopo la nascita (per la fine del trattamento con Doxiciolina), il taglio del gene viene quindi regolato sia temporalmente che spazialmente.

2.1 Il Neuropeptide Y (NPY)

Il neuropeptide Y (NPY) è un peptide di 36 aminoacidi, per la prima volta isolato da cervello di maiale, che, insieme al peptide YY (PYY) e al polipeptide pancreatico (PP), forma la famiglia dei peptidi pancreatici (Tatemoto *et al.*, 1982). NPY è ampiamente conservato tra diverse specie e, da studi immunoistochimici e di ibridazione in situ, è risultato essere uno dei peptidi più ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale (SNC), sia negli umani che nei roditori. In particolare, per quanto riguarda questi ultimi, risulta espresso molto abbondantemente in varie regioni cerebrali, tra cui ipotalamo, amigdala, ippocampo, nucleo del tratto solitario, locus coeruleus, nucleus accumbens e corteccia cerebrale (Allen *et al.*, 1983; Chronwall *et al.*, 1985; de Quidt e Emson, 1986; Dumont *et al.*, 1992). NPY è coinvolto nel controllo di una serie di funzioni fisiologiche, come assunzione di acqua e cibo, apprendimento e memoria, locomozione, regolazione della temperatura corporea, comportamento sessuale ed emozionale, eccitabilità neuronale, omeostasi cardiovascolare, secrezione ormonale e ritmi circadiani (Baraban *et al.*, 1997; Colmers e Bleakman, 1994; Grun-demar *et al.*, 1992; Inui, 1999; Munglani *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1993; Vezzani *et al.*, 1999; Wahlestedt e Reis, 1993). In aggiunta, si pensa che possa giocare un rilevante ruolo anche in diversi disordini psichiatrici, tra cui depressione, disordini alimentari, ansia ed epilessia (Baraban *et al.*, 1997; Colmers e Bleakman, 1994; Inui, 1999; Stanley *et al.*, 1993; Wahlestedt e Reis, 1993).

Sottotipi recettoriali per NPY

NPY interagisce con una famiglia di recettori accoppiati a proteine G che include i sottotipi Y1, Y2, Y4, Y5 e y6 (Michel *et al.*, 1998). I recettori Y1 (Y1R), Y2 (Y2R) e Y5 (Y5R) legano principalmente NPY e PYY, mentre quello Y4 (Y4R) mostra selettività per il PP. La proteina recettoriale y6 (y6R), è invece tronca nella maggior parte dei mammiferi e risulta funzionale solo nel topo e nel coniglio (Lundell *et al.*, 1995; Rose *et al.*, 1995; Starbäck *et al.*, 2000; Weinberg *et al.*, 1996). Tra tutti i recettori per NPY, il sottotipo Y1 ha ricevuto particolari attenzioni per il suo ruolo nella stimolazione del comportamento alimentare (Kanatani *et al.*, 2000; Kask *et al.*, 1998a; Mullins *et al.*, 2001; Wisialowski *et al.*, 2000), nell'inibizione della nocicezione (Naveilhan *et al.*, 2001b; Zhang *et al.*, 1994), nella regolazione della secrezione ormonale (Besecke *et al.*, 1994; Kalra *et al.*, 1992) e nel modulare comportamento emozionale, risposta allo stress (Broqua *et al.*, 1995; Heilig, 1995) e assunzione di etanolo (Schroeder *et al.*, 2003; Sparta *et al.*, 2004; Thiele *et al.*, 2002; Thiele e Badia-Elder, 2003; Eva *et al.*, 2008).

2.1.1 Effetti di NPY sul comportamento

NPY riveste un ruolo centrale anche nella regolazione del comportamento emozionale e nella risposta a stimoli stressanti; diversi studi hanno dimostrato che un articolato network di elementi contenenti il peptide, tra cui, in particolare, amigdala ed ippocampo, gioca un ruolo importante nella regolazione di tali effetti (Fig. 2.1). La somministrazione intracerebroventricolare (ICV) del peptide produce un potente effetto ansiolitico in diversi modelli comportamentali (Broqua *et al.*, 1995) e topi knock-out per NPY mostrano un fenotipo ansiogeno (Bannon *et al.*, 2000). Inoltre, l'iniezione di un vettore virale, codificante per NPY, a livello dell'amigdala induce un aumento del livello di mRNA per NPY e del peptide stesso, associato alla diminuzione dei comportamenti ansiosi nel test del labirinto sopraelevato (Primeaux *et al.*, 2005). NPY inibisce diverse risposte metaboliche e comportamentali allo stress, tra cui le conseguenze gastrointestinali, il comportamento ansioso e la riduzione del sonno indotta da pentobarbital. È stato inoltre dimostrato un antagonismo funzionale tra NPY e il fattore di rilascio delle corticotropine (CRF) in vari nuclei del circuito di stress/ansia, come ippocampo (Thorsell *et al.*, 2000), ipotalamo (Hastings *et al.*, 2001), locus coeruleus (Charney, 2004), grigio periacqueduttale (Kask *et al.*, 1998b) e complesso settale (Kask *et al.*, 2001). Studi precedenti hanno stabilito che CRF presenta un potente affetto ansiogeno, che si traduce in una serie di stati comportamentali e fisiologici correlati a paura e stress. La somministrazione centrale di antagonisti di CRF, difatti, blocca molti degli effetti comportamentali dello stress (Kalin *et al.*, 1988; Liang *et al.*, 1992). NPY inibisce l'effetto simil-ansiogeno di CRF (Britton *et al.*, 2000), e ciò suggerisce che questo neuropeptide possa agire da agente endogeno in grado di tamponare il rilascio di CRF indotto da stress nell'amigdala, struttura nota per la sua criticità nella generazione, espressione e nel mantenimento di stress, paura e ansia, sia negli animali sperimentali che nell'uomo (Davis, 1998; Rogan e LeDoux, 1996). In aggiunta, si è dimostrato che NPY ha un effetto neuromodulatorio sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA; vedi paragrafo 2.2.2).

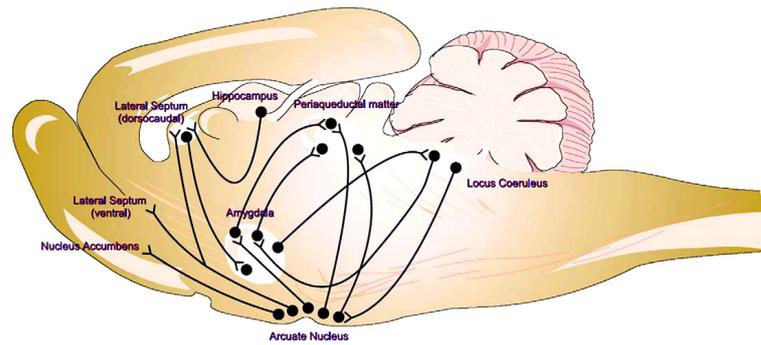


Figura 2.1: Pathways di NPY che si pensa siano coinvolti in effetti di NPY correlati a stress e comportamento emozionale (basato su Heilig, 2004)

2.1.2 Il ruolo di NPY nel metabolismo e comportamento alimentare

Il sistema NPY svolge, tra gli altri, un ruolo fondamentale nel comportamento alimentare, il quale risulta molto importante per il mantenimento dell'omeostasi energetica ed è regolato da diversi segnali neuronali, metabolici ed endocrini, integrati a livello dell'ipotalamo. Segnali ormonali e neuronali con azione a breve termine che derivano dal tratto gastrointestinale, tra cui colecistochina (CCK), polipeptide pancreatico (PP) e grelina, controllano la quantità di cibo assunta. La regolazione a lungo termine delle riserve energetiche è data, invece, dai principali ormoni circolanti, insulina e leptina. Tutti questi segnali agiscono attraverso pathways che convergono nell'ipotalamo, un'area che contiene un gran numero di neurotrasmettitori anabolici e catabolici, come anche neuropeptidi, tra i quali NPY è uno dei principali (Eva *et al.*, 2006b). NPY modula il comportamento alimentare inducendo, in particolare, l'assunzione di carboidrati (Stanley *et al.*, 1985). Nell'ipotalamo viene sintetizzato soprattutto in neuroni con corpi cellulari situati nei nuclei della porzione mediale dell'ARC o nei nuclei DMH, che proiettano ad aree adiacenti, come il PVN, l'ipotalamo perifornicale, i nuclei ipotalamici VMH e l'area ipotalamica laterale (LH), che è coinvolta nella regolazione giornaliera dell'appetito e del bilancio energetico. Ci sono anche brevi proiezioni che terminano nella porzione laterale dell'ARC, dove NPY regola negativamente sia l'attività di NPY stesso, sia l'attività anoressizzante dei neuroni prooppiomelanocortinici (POMC). NPY viene anche sintetizzato nel complesso dorsovagale del midollo, che riceve i nervi afferenti dal tratto gastrointestinale e proietta al PVN e al DMH (Eva *et al.*, 2006b).

Prove recenti hanno dimostrato che NPY, dopo iniezione nei ventricoli cerebrali o nell'ipotalamo, esercita un potente effetto stimolatorio sull'assunzione di cibo anche in ratti sazi, portando infine ad obesità (Clark *et al.*, 1984; Levine e Morley, 1984). NPY fa inoltre diminuire la termogenesi nel tessuto adiposo bruno (BAT), attraverso inibizione delle afferenze provenienti dal sistema nervoso (Billington *et al.*, 1991). In seguito, prove di un ruolo fisiologico di NPY nel controllo del comportamento alimentare e del peso corporeo sono state ottenute dalla dimostrazione che esiste una stretta relazione tra il cibo ingerito e i livelli di espressione di NPY nell'ipotalamo. In situazioni di bilancio energetico negativo, come fame, lattazione (Smith e Grove, 2002) o diabete di tipo I (carenza d'insulina), la sintesi ipotalamica di NPY e il suo rilascio a livello dei neuroni di ARC/PVN risultano incrementati (Frankish *et al.*,

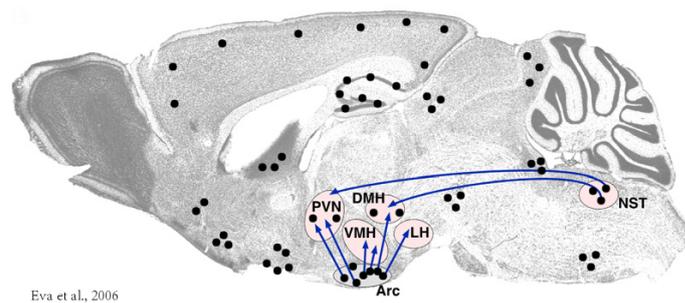


Figura 2.2: Le linee blu indicano il pathway ipotalamico di NPY coinvolto nel comportamento alimentare (tratto da Eva *et al.*, 2006b).

1993; Sahu *et al.*, 1992). Inoltre, il blocco degli effetti di NPY, tramite immunoneutralizzazione o deplezione dello stesso, sopprime il comportamento alimentare e riduce l'obesità (Dube *et al.*, 1994; Segal-Lieberman *et al.*, 2003).

Leptina ed insulina vengono sintetizzate perifericamente e rilasciate nel plasma in proporzione all'estensione del grasso corporeo; esse agiscono a livello centrale per inibire l'assunzione di cibo e aumentare la spesa energetica (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995). Tra i sistemi neuronali oressigenici, NPY è uno dei principali candidati implicati nel contrastare l'azione della leptina nell'ipotalamo. Diverse popolazioni di neuroni nell'ARC esprimono recettori per la leptina e, insieme, vari neuropeptidi, tra cui NPY (Dryden *et al.*, 1995; Stephen *et al.*, 1995). Studi in vivo hanno mostrato che la leptina inibisce la sintesi e il rilascio di NPY (Schwartz *et al.*, 1999) e controbilancia il suo effetto sull'alimentazione, mentre NPY si oppone all'effetto anoressizzante della leptina.

La maggior parte dei neuroni dell'ARC esprimono, dunque, recettori per la leptina e l'insulina, che hanno il compito di trasmettere al SNC l'esistenza di massa adiposa nell'organismo. Elevati livelli di questi ormoni inibiscono i neuroni NPY-AGRP e, parallelamente, stimolano i neuroni POMC-CART per attivare la via anoressizzante e per bloccare la via oressizzante di NPY-AGRP (vedi fig. 2.4). Bassi livelli circolanti dei segnali di adiposità causano un effetto opposto, stimolando l'appetito, poiché la via NPY-AGRP non viene spenta (Schwartz *et al.*, 2003). L'effetto oressizzante di NPY è stato dimostrato dall'evidenza che la somministrazione ICV (intracerebroventricolare) di NPY stimola rapidamente l'appetito e che l'infusione continua del peptide induce l'assunzione di cibo anche in ratti sazi (Eva *et al.*, 2006b). Si è visto che l'espressione di NPY in neuroni dell'ARC di ratto diminuisce dopo somministrazione centrale di insulina, laddove gli stessi neuroni, normalmente, diventano iperattivi quando i livelli dell'ormone cadono, in condizioni di denutrizione (Sahu *et al.*, 1995; Sipols *et al.*, 1995). Specifiche regioni dell'ipotalamo e del tronco encefalico contengono inoltre neuroni in grado di rilevare il glucosio, che possono individuare cambiamenti nella disponibilità della molecola (Gozali *et al.*, 2002). I neuroni NPY sensibili al glucosio sono stati identificati nel nucleo arcuato mediale, dove vengono rilasciati sia NPY che AGRP, e i neuroni NPY sembrano essere sensibili al glucosio e attivati dall'ipoglicemia (Funahashi *et al.*, 1999). Dunque, il glucosio potrebbe rappresentare un altro segnale di feedback negativo, accanto a leptina e insulina, per regolare l'attività dei neuroni che producono NPY.

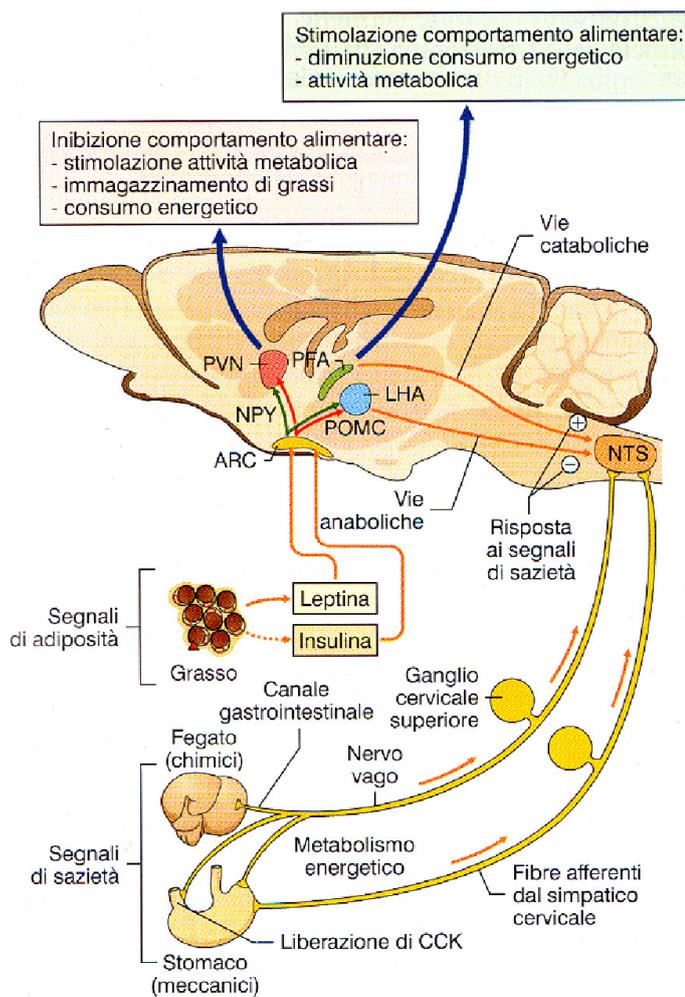


Figura 2.3: Meccanismi, segnali e circuiti nervosi coinvolti nella regolazione dell' assunzione di cibo. NTS: nucleo del tratto solitario; ARC: nucleo arcuato; PVN: nucleo paraventricolare; PFA: area perifornicale; LHA: ipotalamo laterale; CCK: colecistochinina; NPY: neuropeptide Y; POMC: propriomelanocortina (tratto da Peres, 2011)

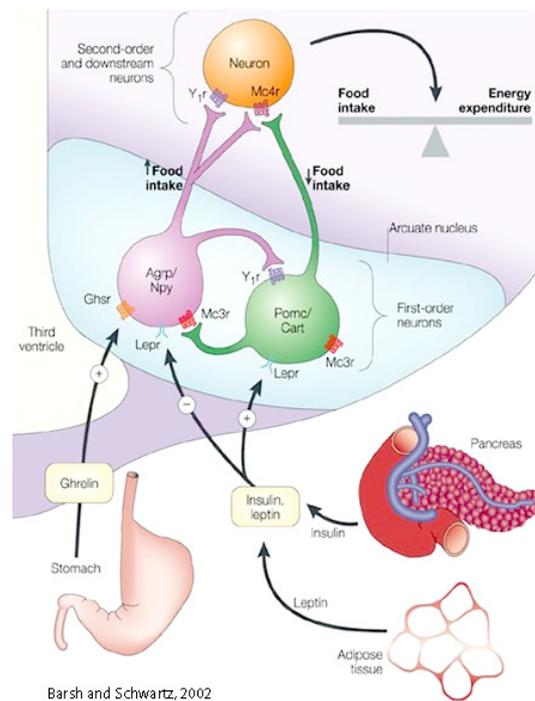


Figura 2.4: Circuiti ipotalamici oressizzante (Npy-Agrp) e anoressizzante (Pomc-Cart) mediate da Y1R

I dati raccolti suggeriscono, quindi, che NPY sia un trasduttore dell'appetito e che rappresenti un target ipotalamico per molti segnali metabolici e ormonali (Eva *et al.*, 2006b); È stato stabilito che i recettori per NPY coinvolti nella regolazione dell'alimentazione sono Y1R e Y5R, entrambi espressi nei siti ipotalamici importanti per la regolazione giornaliera dell'assunzione di cibo e del bilancio energetico, come ARC, PVN, DMH, VMH e LH (Dumont *et al.*, 1992; Eva *et al.*, 2006b). L'importanza di Y1R nel comportamento alimentare è stata dapprima dimostrata da studi farmacologici, usando agonisti e antagonisti selettivi. Nei ratti, la somministrazione ICV di analoghi peptidici di NPY che legano selettivamente Y1R stimola l'appetito (Mullins *et al.*, 2001) e induce iperinsulinemia, indipendentemente dall'assunzione di cibo (Gao *et al.*, 2004). Al contrario, la somministrazione di antagonisti, peptidici e non, selettivi per il recettore Y1R, blocca la stimolazione dell'appetito (Eva *et al.*, 2006b; Kask *et al.*, 1998a). Ciò è stato recentemente confermato dall'osservazione che la somministrazione periferica di un antagonista altamente selettivo per Y1R inibisce l'assunzione di cibo indotta da NPY, e che questo composto è privo di attività quando somministrato a topi knock-out per il recettore (Kanatani *et al.*, 2000). La dimostrazione che la segnalazione di NPY-Y1R giochi un ruolo cardine nella stimolazione di appetito e obesità viene anche dall'osservazione che cambiamenti nel comportamento alimentare e nell'equilibrio energetico inducono una marcata plasticità nella funzione e nell'espressione di Y1R in specifiche regioni dell'ipotalamo.

NPY e modelli di obesità indotta da dieta

In modelli di obesità indotta tramite dieta si è visto che, quando è presente un bilancio energetico positivo, l' mRNA per NPY nell' ARC può aumentare, diminuire o rimanere inalterato, e questi cambiamenti compensatori sembrano dipendere dal background genetico delle diverse linee di roditori e dal tipo di trattamento (Bergen *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 1992; Leibowitz *et al.*, 2005). Inoltre, non sono state riscontrate variazioni significative nell' espressione dell' mRNA per Y1R nell' ARC di topi, predisposti e resistenti all' obesità, nutriti con una dieta ad alto apporto calorico, e ciò suggerisce che il sistema NPY-Y1R dell' ARC non giochi un ruolo fondamentale nell' indurre l' iperfagia associata a una dieta particolarmente appetibile (Huang *et al.*, 2004). Al contrario, un forte aumento dell' espressione di NPY è stato riscontrato in DMH e VMH di topi con obesità indotta da dieta, suggerendo che l' incrementata attività dei neuroni NPY in queste regioni cerebrali possa partecipare al mantenimento dell' omeostasi energetica (Yang *et al.*, 2008); infatti, si è scoperto che l' aumentata attività neuronale nel DMH contribuisce allo sviluppo dell' obesità causata da ingestione della dieta ricca in grassi, mentre lesioni del DMH di ratto attenuano l' aumento di peso indotto da dieta grassa (Bellinger e Bernardis, 2002).

2.2 Il recettore Y1R

Y1R è stato il primo recettore per NPY ad essere clonato nel ratto (Eva *et al.*, 1990; Krause *et al.*, 1992), ed è poi stato isolato nell' uomo (Herzog *et al.*, 1992) e nel topo (Eva *et al.*, 1992). Nel complesso, risulta ampiamente conservato durante l' evoluzione (Larhammar e Salaneck, 2004). Le azioni più comuni di questo sottotipo recettoriale sono l' inibizione dell' adenilato ciclasi e la mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari (Herzog *et al.*, 1992). Y1R si colloca principalmente a livello post-sinaptico, sebbene in alcuni casi possa essere riscontrato anche in siti pre-sinaptici. Diversi studi hanno analizzato la sua localizzazione nel SNC di mammifero; tra questi, i primi sono stati condotti tramite autoradiografia del recettore, utilizzando un antagonista di Y1R, per distinguere il legame di Y1R da quello di Y4R/Y5R (Dumont *et al.*, 1998). In questi studi, livelli medio-alti di siti di legame per Y1R sono stati individuati nella corteccia cerebrale, nell' *ippocampo* (con particolare intensità nel giro dentato), nel *nucleo mammillare*, nel *nucleo genicolato* e nel *nucleo del tratto solitario* (NST). Bassi livelli ne sono, invece, stati trovati nel setto, nel cervelletto e nei nuclei paraventricolare (PVN) e dorsomediale (DMH) dell' ipotalamo.

Studi più recenti, effettuati in ratto e topo con l' utilizzo di specifiche sonde a cRNA e tecniche di ibridazione in situ (Kishi *et al.*, 2005), hanno individuato una quantità maggiore di nuclei positivi, in particolare in *talamo*, *sistema limbico* (ippocampo, amigdala e letto della stria terminale) e *ipotalamo* (area preottica mediale, nucleo ventromediale e Arcuato).

2.2.1 Effetti di Y1R su comportamento emozionale

L'azione ansiolitica di NPY è mediata dall' attivazione del recettore Y1R, e la somministrazione di antagonisti e oligonucleotidi antisense diretti contro tale recet-

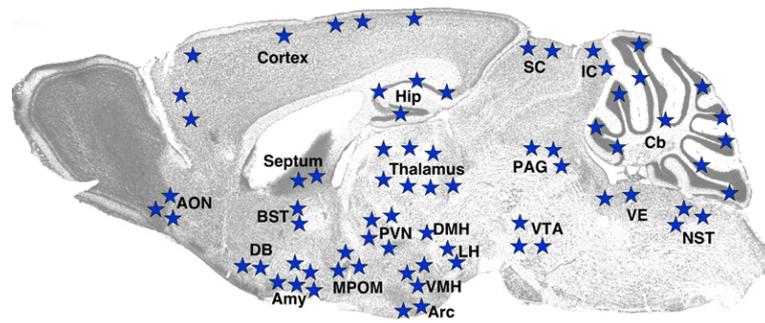


Figura 2.5: Distribuzione di Y1R nel cervello di roditori. Abbreviazioni: Amy, amigdala; AON, nucleo olfattivo anteriore; ARC: nucleo Arcuato; BST: nucleo del letto della stria terminalis; Cb: cervelletto; DB: banda diagonale del Broca; DMH: nucleo ipotalamico dorsomediale; Hip: ippocampo; IC: collicolo inferiore; LC: locus coeruleus; LH: nucleo ipotalamico laterale; MPOM: nucleo preottico mediale; NST: nucleo del tratto solitario; PAG: grigio periacqueduttale; PVN: nucleo paraventricolare; SC: collicolo superiore; VE: complesso vestibolare; VMH: nucleo ipotalamico ventromediale; VTA: area tegmentale ventrale (tratto da Eva *et al.*, 2006b).

tore favorisce la comparsa di comportamenti ansiosi negli animali trattati (Heilig, 2004). Il coinvolgimento di Y1R nell'effetto ansiolitico di NPY è stato inizialmente suggerito dall'osservazione del fatto che NPY, fornito con somministrazione ICV o direttamente nell'amigdala centrale, suscita risposte comportamentali in diversi modelli animali di ansia, in test come l' EPM (Elevated Plus Maze), tipicamente usato per la misura dell' ansia (Britton *et al.*, 1997; Broqua *et al.*, 1995). Al contrario, oligonucleotidi antisenso che hanno come target Y1R, e fanno diminuire la densità di tali recettori, inducono effetti comportamentali nell' EPM opposti rispetto a quelli visti con la somministrazione di NPY (Heilig, 1995) ICV. Studi più recenti hanno mostrato che la deplezione di Y1R, in topi geneticamente modificati, può sia aumentare che diminuire l' ansia, a seconda dei ritmi circadiani (Karl *et al.*, 2006). Paradossalmente, uno stress moderato causa una riduzione dei livelli d' ansia in topi knock-out per Y1R, suggerendo che cambiamenti compensatori in Y2R potrebbero essere almeno in parte responsabili del fenotipo alterato di questi animali (Wittmann *et al.*, 2005). Diversi studi hanno dimostrato che la segnalazione endogena di NPY (in particolare quella mediata da Y1R) è implicata in risposte neuronali allo stress, ad esempio si è osservato come l' espressione dell' mRNA per NPY e del peptide stesso sia dinamica e sensibile a stress da "restraint" acuti e ripetuti, in numerose regioni di proencefalo, ponte e midollo (Krukoff *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1999, 2000). Tuttavia, non è chiaro come l' esposizione al restraint possa alterare l' espressione cerebrale di NPY, dal momento che il restraint ripetuto o acuto può produrre aumento, diminuzione o non dare nessun cambiamento dell' mRNA per NPY e del peptide stesso, il che apparentemente dipende da ceppo di topo o tipo di stress. Uno di questi studi ha mostrato che l' esposizione a restraint acuto riduce l' mRNA per NPY e la concentrazione della proteina in amigdala e corteccia nel ratto, mentre al contrario, l' osservazione che l' esposizione a restraint ripetuto, up-regola l' espressione del gene codificante per NPY, in amigdala e ARC, suggerisce che l' aumentata sintesi e liberazione di NPY potrebbe contribuire allo sviluppo dell' adattamento e

che il peptide potrebbe agire da tampone degli effetti comportamentali di segnali in grado di suscitare stress, come CRF (Thorsell *et al.*, 1999). In accordo con ciò, è stato mostrato come l' esposizione acuta al restraint faccia aumentare l' espressione genica di Y1R nell' amigdala centrale e mediale e nel PVN di topi Y1R/LacZ, suggerendo che questa up-regulation potrebbe essere parte di un meccanismo compensatorio condotto dalla riduzione, indotta da stress, della trasmissione funzionale mediata da NPY nell' amigdala (Eva *et al.*, 2006b). Restraint ripetuti, invece, non hanno influito sull' espressione del transgene Y1R/LacZ nell' amigdala e nel PVN dei topi, e ciò potrebbe implicare che non sia richiesto un cambiamento nell' attività trascrizionale del promotore genico per Y1R per l' adattamento allo stress da restraint (Mele *et al.*, 2004).

In sostanza, numerose evidenze suggeriscono che un folto network di circuiti che utilizzano la segnalazione mediata da NPY, con amigdala e ippocampo come elementi centrali, agisca come un sistema di allarme endogeno. Questo sistema sembra attivarsi quando l' organismo si trova ad affrontare situazioni stressanti, e la sua attivazione funzionale compensa gli effetti comportamentali inizialmente messi in atto per far fronte allo stimolo minaccioso. In una prospettiva a lungo termine, la regolazione dell' espressione di NPY pare servire come meccanismo per l' adattamento delle risposte comportamentali individuali allo stress cronico. Da queste premesse è evidente come una disregolazione di questo sistema potrebbe facilmente contribuire alla patofisiologia di disordini depressivi e dell' ansia (Heilig, 2004).

Secondo Karl *et al.* (2004), NPY è inoltre fondamentale nella coordinazione fra regolazione di assunzione di cibo, crescita e riproduzione, assicurando che la procreazione e la crescita si verifichino solo quando il cibo è abbondante e consentendo il risparmio energetico quando il cibo è scarso; per quanto sia noto come le risposte emotive e comportamentali superiori siano coinvolte in tutte queste funzioni, la comprensione del coordinato fisiologico della regolazione da parte delle emozioni sulle funzioni fisiologiche manca. In questo lavoro, infatti, Karl *et al.* (2004) dimostrano come il sistema NPY svolga un ruolo centrale in questo processo, in quanto si è visto come l' ablazione del gene per il recettore Y1 porta ad un forte aumento del comportamento aggressivo territoriale. Questi risultati suggeriscono che NPY agisce attraverso i recettori Y1 regola i circuiti serotoninergici, consentendo quindi il coordinamento fra processi fisiologici di sopravvivenza, come l'assunzione di cibo, con l'attivazione del comportamento aggressivo di tipo territoriale.

Per quanto gli effetti fisiologici di Y1R sono inizialmente stati scoperti tramite studi farmacologici, utilizzando agonisti selettivi e antagonisti che mostrassero alta affinità di legame per questo sottotipo recettoriale, tuttavia il gran numero di recettori per NPY e la disponibilità di pochi agonisti e antagonisti selettivi hanno reso difficile delineare le funzioni di Y1R. Una valida alternativa all' approccio farmacologico è stata quella dei modelli animali knock-out per il recettore, sebbene il confronto tra gli studi farmacologici e quelli condotti con linee di animali knock-out germinali abbia mostrato alcuni risultati contrastanti (Lin *et al.*, 2004). Diversi gruppi hanno generato modelli murini knock-out per Y1R, nei quali la sequenza codificante per il recettore è stata rimpiazzata con una cassetta contenente un gene per la resistenza alla neomicina, tramite ricombinazione omologa (Kanatani *et al.*, 2000; Kushi *et al.*, 1998; Naveilhan *et al.*, 2001b; Pedrazzini *et al.*, 1998). L' analisi dei topi

mutati privi di Y1R, per quanto riguarda diverse funzioni fisiologiche nelle quali il recettore risulta implicato, ha mostrato che i fenotipi, o presentano minimi cambiamenti, o risultano contrastanti se comparati con quelli degli studi farmacologici. Ad esempio, la somministrazione centrale di agonisti di Y1R suscita un potente effetto ansiolitico, mentre topi privi del gene codificante per il recettore mostrano comportamento simil-ansioso, ma solo in certi modelli animali (Karl *et al.*, 2006). Inoltre, l'infusione nell'amigdala centrale (CeA) dell'antagonista di Y1R BIBP3226 riduce il consumo di alcool (Schroeder *et al.*, 2003), mentre topi senza il recettore presentano un aumento del consumo volontario di etanolo, se paragonato con quello dei topi wild type (Thiele *et al.*, 2002). È molto interessante notare come le alterazioni più significative del fenotipo siano state osservate in topi knock-out per il recettore con il gene codificante per la leptina non funzionale (Pralong *et al.*, 2002). Queste discrepanze tra gli studi farmacologici e l'approccio dei knock-out germinali sono state attribuite alla ridondanza dei sistemi che controllano differenti funzioni, il che potrebbe portare a cambiamenti compensatori durante lo sviluppo. In accordo con ciò, Wittmann *et al.* (2005) hanno illustrato un aumento dell'espressione di mRNA per Y2R nell'ippocampo e nell'amigdala di topi knock-out per Y1R, suggerendo che questi adattamenti possano contribuire al fenotipo alterato dei topi mutati. Inoltre, risultati discordanti derivati da knock-out e approcci non genetici potrebbero anche essere la conseguenza della delezione di Y1R in tutti i tessuti dove è normalmente espresso, producendo un fenotipo che è il derivato della somma di tutte le funzioni perse (Eva *et al.*, 2006a). Questo è il limite dei knock-out germinali ed il punto di snodo da cui ha avuto origine il filone di studi su un modello knock-out con modalità d'espressione ristretti nel tempo e nello spazio (**knock-out condizionale**).

2.2.2 Effetti di Y1R su comportamento alimentare e bilancio energetico

Da subito il recettore Y1 è stato al centro della ricerca sull'obesità a causa della sua caratterizzazione come "recettore dell'alimentazione", in quanto mediatore ad esempio dell'iperfagia indotta da NPY (Kanatani *et al.*, 2000, 2001; Mullins *et al.*, 2001). Studi successivi hanno rivelato che, oltre alla alimentazione, il recettore Y1 gioca ruoli importanti nel mediare altri effetti metabolici di NPY correlate all'omeostasi energetica, come dispendio energetico, metabolismo lipidico e la secrezione di insulina (Herzog, 2003). Y1R media anche l'azione di NPY nelle reazioni di stress attraverso le interazioni con l'*asse ipotalamo-ipofisi-surrene* (HPA) e corticosteroidi. Infatti, un antagonismo funzionale tra NPY e il CRH¹ è stata dimostrato in vari nuclei nei circuiti limbici che regolano lo stress (Broqua *et al.*, 1995; Pedrazzini, 2004), suggerendo che NPY possa agire come un agente endogeno contrastante il rilascio dell'ormone di rilascio delle corticotropine (CRH) mediante connessioni glutammato-GABA (Herman *et al.*, 2004); studi precedenti hanno infatti mostrato come i Y1Rs siano associati con neuroni glutammato-positivi ed NPY-positivi in

¹L'ormone di rilascio della corticotropina, abbreviato in CRH (dall'inglese *Corticotropin-releasing hormone*, e originariamente conosciuto come CRF ovvero *corticotropin-releasing factor*), ed anche chiamato corticoliberina, è un ormone polipeptidico ipotalamico, nonché un neurotrasmettitore, coinvolto nella risposta agli stress. Il CRH è prodotto dalle cellule neuroendocrine del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; è rilasciato dalle terminazioni di tali neuroni nell'eminenza mediana dell'adenoipofisi.

nuclei ippocampali che risultano la base anatomica della modulazione del rilascio di glutammato ed NPY (St-Pierre *et al.*, 2000).

L'importanza di Y1R nel comportamento alimentare è stata dapprima dimostrata da studi farmacologici, usando agonisti e antagonisti selettivi. Nei ratti, la somministrazione ICV di analoghi peptidici di NPY che legano selettivamente Y1R stimola l'appetito (Mullins *et al.*, 2001) e induce iperinsulinemia, indipendentemente dall'assunzione di cibo (Gao *et al.*, 2004). Al contrario, la somministrazione di antagonisti, peptidici e non, selettivi per il recettore Y1R, blocca la stimolazione dell'appetito (Eva *et al.*, 2006b; Kask *et al.*, 1998b). Ciò è stato recentemente confermato dall'osservazione che la somministrazione periferica di un antagonista altamente selettivo per Y1R inibisce l'assunzione di cibo indotta da NPY, e che questo composto è privo di attività quando somministrato a topi knock-out per il recettore (Kanatani *et al.*, 2001). La dimostrazione che la segnalazione di Y1R giochi un ruolo cardine nella stimolazione di appetito e obesità viene anche dall'osservazione che cambiamenti nel comportamento alimentare e nell'equilibrio energetico inducono una marcata plasticità nella funzione e nella sua espressione in specifiche regioni dell'ipotalamo. Inoltre, prove farmacologiche indicano che agonisti o antagonisti di NPY stimolano o inibiscono l'alimentazione in proporzione alla loro specificità e affinità per il recettore Y1 (Kanatani *et al.*, 1996). Come dimostrato in Karl *et al.* (2004), neuroni NPY proiettano dal nucleo arcuato non solo ad altri nuclei coinvolti nella regolazione dell'alimentazione all'interno dell'ipotalamo, ma anche verso l'amigdala mediale, dove è stato dimostrato che innervano i neuroni che esprimono CART (Broberger *et al.*, 1999), coordinando potenzialmente i comportamenti correlati all'alimentazione con quelli associati ad emozioni ed aggressività; la riduzione dell'espressione del CART in questa zona riscontrata in topi KO per Y1 potrebbe essere importante in questo processo: regolando sia l'assunzione di cibo che i livelli di aggressione, il recettore Y1 può fornire un collegamento molecolare tra l'esigenza fondamentale di cibo e il necessario livello di aggressività necessaria per raggiungerlo.

2.2.3 NPY-Y1R e GABA (acido γ -aminobutirrico)

L'acido γ -amminobutirrico (GABA) è un γ -aminoacido, principale neurotrasmettitore inibitorio nei mammiferi, del sistema nervoso centrale. Responsabile nella regolazione dell'eccitabilità neuronale in tutto il sistema nervoso. Negli esseri umani GABA è anche direttamente responsabile per la regolazione del tono muscolare. Viene rilasciato da neuroni GABAergici del cervello e può interagire con più tipi di recettori, di cui i principali sono il recettore GABA di tipo A (GABA_A) e quello di tipo B (GABA_B), tutti con effetti inibitori. Il GABA è un messaggero ubiquitario e l'attivazione o l'antagonismo a livello dei suoi recettori è il meccanismo d'azione di un gran numero di farmaci sedativi, miorilassanti, ipnotici, antiepilettici etc. Diversi lavori suggeriscono che esista un'interazione funzionale tra GABA e NPY che potrebbe essere importante per la regolazione di sedazione, alimentazione, comportamento ansioso ed eccitabilità neuronale. I primi a dar prova di un'interazione funzionale tra la trasmissione GABAergica e quella mediata dal recettore NPY-Y1R nella regolazione del comportamento emozionale sono stati Kask *et al.* (1996), che hanno dimostrato come la benzodiazepina ansiolitica *diazepam* blocchi l'effetto ansiogeno degli antagonisti di Y1R. È stato anche indicato come NPY induca effetti sedativi,

attraverso il sistema GABAergico, interagendo con il recettore Y1R nell' ipotalamo posteriore (Naveilhan *et al.*, 2001a).

Ad esempio, GABA è coespresso con NPY-AGRP (*agouti related protein*) nei neuroni del *nucleo Arcuato* (ARC) (Horvath *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 1999) che proiettano nel nucleo paraventricolare, dove agiscono sinergicamente per inibire i neuroni produttori CRH e per stimolare l' assunzione di cibo (Hahn *et al.*, 1998; Pu *et al.*, 1999). Inoltre, GABA viene co-rilasciato dai neuroni NPY/AGRP nel nucleo Arcuato, dove si è visto che inibisce i neuroni produttori Pro-opiomelanocortina attraverso diversi recettori (Horvath *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 1999; Cowley *et al.*, 2001). Si è suggerito che NPY possa anche inibire la fertilità facendo diminuire l' attività dei neuroni GABAergici afferenti verso i neuroni che producono GRH (*ormone di rilascio delle gonadotropine*), un effetto che sembra essere mediato dal sottotipo recettoriale NPY-Y1R (Sullivan e Moenter, 2004). Utilizzando un modello murino transgenico, contenente il promotore genico del Y1R di topo fuso con il gene reporter lacZ (topi Y1R/lacZ), è stato possibile studiare quest' interazione ed altri effetti ad essa correlati, aprendo uno scenario importante per la comprensione dei pathways con cui Y1R e GABA_A collaborano per definire vari aspetti delle funzioni cerebrali (Eva *et al.*, 2006a).

L' interazione funzionale tra i recettori GABA_A ed NPY-Y1R nel modello animale transgenico Y1R/LacZ

L' interazione funzionale tra i recettori GABA_A ed NPY-Y1R è stata estesamente studiata nell' amigdala grazie all' utilizzo di topi transgenici Y1R/LacZ (Eva *et al.*, 2006a). L' utilizzo di questi animali ha permesso di dimostrare che la modulazione cronica della funzione dei recettori GABA_A regola l' espressione del gene codificante per Y1R nell' amigdala degli stessi. Si è inoltre reso evidente come l' espressione del transgene Y1R/LacZ, nell' amigdala centrale e mediale, possa essere anche modulata in risposta a un incremento a lungo termine della concentrazione cerebrocorticale di steroidi neuroattivi indotto da particolari condizioni fisiologiche o farmacologiche, (Eva *et al.*, 2006a). Grazie a tecniche di immunolabelling per NPY e GABA e colorazione istochimica per l' individuazione del transgene Y1R/LacZ, è stato possibile dare prova morfologica di un' interazione funzionale tra GABA ed NPY-Y1R nell' amigdala mediale (Eva *et al.*, 2006a; Oberto *et al.*, 2001). Si è potuto vedere come GABA ed NPY spesso coesistano all' interno delle stesse fibre nervose, e, per di più, come esista un alto grado di colocalizzazione di GABA ed NPY con il transgene Y1R/LacZ. Tutto ciò suggerisce, dunque, che cambiamenti di funzione, indotti in diversi modi, del recettore GABA_A possano influenzare la trasmissione di segnali tramite NPY-Y1R, modulando l' espressione genica di Y1R a livello dell' amigdala mediale e centrale (Eva *et al.*, 2006a).

2.3 Generazione del modello knock-out condizionale per Y1R

Lo studio presentato in questa Tesi riguarda un modello knock-out condizionale per il recettore Y1 di NPY svolto in costante collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Carola Eva dell' Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi dell' Università di Torino. Questo gruppo ci ha fornito le coppie di riproduttori iniziali per la generazione delle varie linee necessarie alla generazione dei animali knock-out (KO), riproduttori che hanno a loro volta avuto in dono da Rolf Sprengel, del Max Planck Institute di Heidelberg.

2.3.1 Generazione e analisi del knock-out germinale

Inizialmente il gruppo della prof.ssa Eva ha generato e analizzato una linea KO germinale per Y1R, ottenuto incrociando il topo transgenico TgCREdel (anch'esso dono di R. Sprengel, del Max Planck Institute di Heidelberg) con una linea di topi con il gene per Y1R floxato ($NPY1r^{2lox}$), ovvero fiancheggiato da due siti LoxP (vedi paragrafo 1.2.4); questo per dimostrare l' attività funzionale dei due siti loxP in vivo. Il topo TgCREdel, infatti, esprime la ricombinasi CRE a partire dalle cellule germinali, operando quindi la delezione del gene per Y1R già nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. I topi eterozigoti $Y1R^{+/-/CREdel}$, derivati dall' incrocio sopra citato, sono prima stati analizzati tramite PCR e Southern blot, e poi incrociati fra loro per ottenere il topo omozigote. In seguito è stata effettuata una verifica dell' avvenuta delezione di Y1R mediante ibridazione in situ dell' mRNA di Y1R su fettine coronali di encefalo, ottenute da topi omozigoti $Y1R^{-/-}$, eterozigoti $Y1R^{+/-}$ e wild type. Come si può notare dalla figura 2.6, l' espressione dell' mRNA di Y1R, che si estende lungo tutto l' asse rostro-caudale dell' encefalo nei topi wild type, è ridotta di circa il 50% nei topi $Y1R^{+/-}$ ed è completamente assente nei topi $Y1R^{-/-}$.

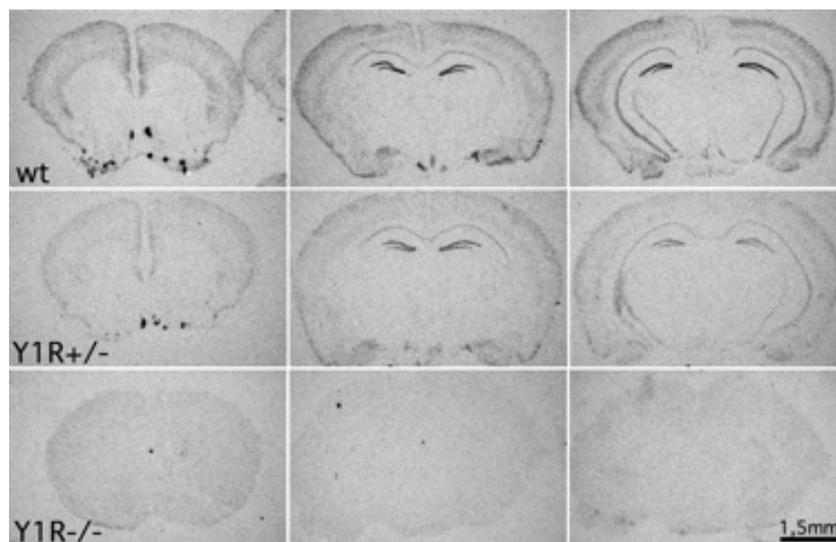


Figura 2.6: Ibridazione in situ del mRNA di Y1R su animali wild type, eterozigoti ed omozigoti

2.3.2 Analisi della colocalizzazione di α -CaMKII e del recettore Y1R

Poichè il fenotipo di questi animali era stato solo parzialmente caratterizzato da Krestel *et al.* (2004), il gruppo di Torino si è interessato ad approfondire lo studio dell'efficienza del controllo temporale di CRE, mediante il sistema tet-off, anche nei nuclei cerebrali di interesse per la nostra ricerca. Per far ciò, Eva e colleghi hanno analizzato l'espressione di CRE nel cervello di topi $Tg^{\alpha-CaMKII-tTA/LC1}$ tramite colorazione immunostochimica, ripetendo l'analisi in tempi diversi dopo la sospensione del trattamento con doxiciclina. In parallelo, hanno incrociato i topi $Tg^{\alpha-CaMKII-tTA/LC1}$ con una linea reporter, RosaR26, contenente il gene LacZ silenziato da una sequenza stop floxata, per ottenere un modello murino che permettesse l'analisi dell'espressione di CRE con una maggiore sensibilità. Nei tripli transgenici $Tg^{RosaR26/\alpha-CaMKII-tTA/LC1}$ derivati dall'incrocio è infatti possibile controllare, nel tempo e nello spazio, l'espressione del gene LacZ, rivelata tramite colorazione istochimica della β -galattosidasi su sezioni di encefalo, grazie alla formazione di un precipitato blu nelle cellule positive ad α -CaMKII. I doppi transgenici $Tg^{\alpha-CaMKII-tTA/LC1}$ e i tripli transgenici $Tg^{RosaR26/\alpha-CaMKII-tTA/LC1}$ sono stati trattati con doxiciclina (50mg/l) nell'acqua da bere fin dall'accoppiamento e durante tutta la gravidanza, fino al momento del parto, e poi sacrificati a diversi tempi di età post-natale ed in età adulta. I risultati ottenuti dalle analisi immunostochimiche di CRE (fig. 2.7) e istochimiche di β -gal (fig. 2.8), in accordo con quanto precedentemente riportato da Krestel *et al.* (2004), hanno dimostrato che, negli animali non trattati con Dox, CRE viene ampiamente espressa in numerose regioni del proencefalo, mentre, negli animali trattati con l'antibiotico fino al momento del sacrificio, l'espressione della ricombinasi non viene attivata. Inoltre, negli animali trattati con Doxiciclina fino a PND 0, l'attività di CRE ricomincia a manifestarsi 20 giorni dopo la sospensione del trattamento, raggiungendo la massima espressione tra PND 40 e PND 50; quest'azione, tuttavia, rimane confinata solo ad alcune regioni cerebrali, rispetto ai topi non trattati. Il gruppo della prof.ssa Eva si è occupato non solo di corteccia e ippocampo, già ampiamente analizzati nel lavoro di Krestel *et al.* (2004), ma anche di capire quali altre regioni cerebrali, importanti nel controllo dello stato emozionale e di altre funzioni, come amigdala e ipotalamo, esprimessero il transgene dopo la sospensione del trattamento. Si è così visto che, a PND 20, con sospensione del trattamento a PND 0, si riscontra una debole colorazione solo nella corteccia e nell'ippocampo rispetto ai topi non trattati, segno della ricomparsa dell'attività della ricombinasi. Dopo più giorni dalla sospensione (PND 40 e PND 50), la colorazione si intensifica nella corteccia (layer 2/3 e 6, cingolata e piriforme) e nell'ippocampo (soprattutto CA1 e giro dentato), compare nello striato, nei nuclei centrale e mediale dell'amigdala, e, per quanto riguarda l'ipotalamo, solo nei nuclei Arcuato e soprachiasmatici. L'espressione di CRE rimane, inoltre, inalterata anche dopo diversi mesi (6 circa) dalla sospensione del trattamento. In tutte le analisi è emersa una certa variabilità dell'intensità d'espressione fra i topi analizzati.

Analisi comparativa della distribuzione della β -Gal e di Y1R

È stata poi eseguita un'analisi comparativa della distribuzione della β -Gal e di Y1R mediante una doppia marcatura, istochimica (con X-Gal) ed immunostochimi-

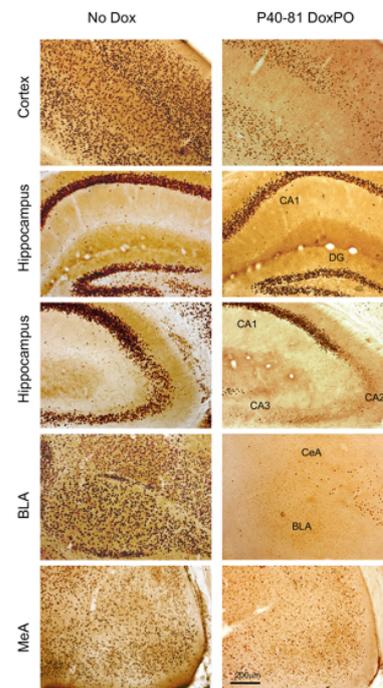


Figura 2.7: Analisi dell' espressione di CRE mediante colorazione immunohistochemica. CeA: amigdala centrale; BLA: amigdala basolaterale; MeA: amigdala mediale

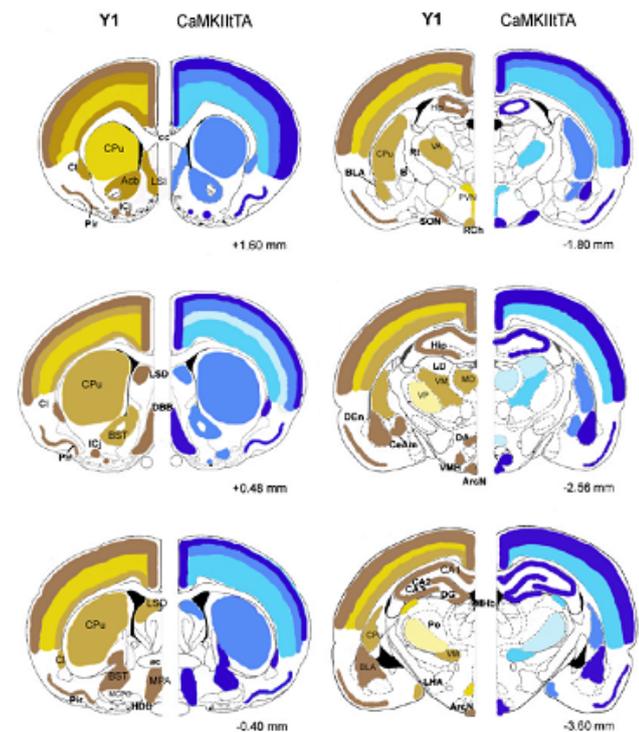


Figura 2.8: Distribuzione della β -Gal e di Y1R nei topi Rosa/tTALC

ca (per Y1R), sulla stessa sezione di encefalo di topi Tg^{RosaR26/ α -CaMKII-tTA/LC1}, ciò è servito per determinare se Y1R e α -CaMKII-CRE siano co-esistenti nelle stesse cellule, condizione necessaria per l'ottenimento del knock-out condizionale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule con Y1R esprimono anche la β -Gal, mentre non accade il contrario. In particolare, è stata osservata un'elevata colocalizzazione soprattutto nella corteccia, nell'ippocampo, nei nuclei dell'amigdala, nell'ipotalamo ventromediale e nei nuclei soprachiasmatici. Inoltre, come si può osservare in 2.8, che riassume i risultati dell'analisi effettuata su tutto l'encefalo, anche il pattern di distribuzione di Y1R e di LacZ è praticamente sovrapponibile.

2.3.3 Effetti della delezione di Y1R

I knock-out condizionali per NPY-Y1R mostrano dei tratti caratteristici, tra cui, a livello comportamentale, un aumento dell'ansia, rilevabile soprattutto attraverso il test dell'EPM. Ciò potrebbe essere dovuto alla delezione condizionale del recettore nell'amigdala mediale e basolaterale, entrambe regioni chiave nella regolazione del comportamento emozionale. È stato dimostrato, infatti, che l'iniezione di agonisti o antagonisti del recettore Y1 in questi nuclei cerebrali è in grado di produrre, rispettivamente, effetti ansiolitici e ansiogenici (Eva *et al.*, 2006a). Il lavoro di collaborazione tra l'Università di Parma e di Torino sta portando avanti questo filone di ricerca, considerando non solo l'aspetto emozionale, ma anche quello alimentare e metabolico in cui il sistema NPY/Y1R è coinvolto. Oltretutto, di recente sono stati avviati diversi studi allo scopo di analizzare il modo in cui vari gradi di cure materne, da parte di madri adottive di ceppo diverso, possano influenzare questi aspetti dello sviluppo degli animali. Bertocchi *et al.* (2011), a seguito di esperimenti di tipo comportamentale e metabolico svolti su topi NPY1R^{rfb} (KO) e NPY1R^{2lox} (controlli) adottati da femmine di ceppi diversi, hanno riportato che topi sottoposti ad inattivazione sito-specifica del gene NPY1R presentavano elevati livelli d'ansia, evidenziabili attraverso i test di Elevated Plus Maze e Open Field. Hanno inoltre rilevato un minor peso corporeo, rispetto ai topi NPY1R^{2lox} di controllo, a partire da PND 40 circa, quando si ha la massima inattivazione del gene NPY1R, mediata dalla Cre-recombinasi. Quello che è risultato interessante, tuttavia, è stato osservare come le differenze molecolari, fisiologiche e comportamentali tra topi NPY1R^{rfb} e NPY1R^{2lox} si rendessero evidenti solo quando gli animali di entrambi i genotipi venivano allevati da madri FVB (ceppo ad alto grado di cura materna), e non C57/BL6 (ceppo con minor grado di cure). In particolare, le madri FVB/J spendevano molto più tempo nella posizione di allattamento "ad arco" (*Arched back posture*) rispetto a quelle di ceppo C57. Il mio lavoro di tesi rientra nella prosecuzione di questi studi, e si propone di fornire ulteriori evidenze sul ruolo che NPY1R sembra giocare nella regolazione, a livello cerebrale, delle funzioni fin'ora discusse.

Capitolo 3

Generazione animali sperimentali e analisi dell'ambiente precoce

NPY possiede, come detto in precedenza, un ruolo molto importante nella regolazione di diverse funzioni e risposte del nostro organismo, tra cui stress, ansia, obesità e omeostasi energetica, in particolare attraverso l'attivazione dei recettori NPY-Y1 (Y1R) nel cervello. Tuttavia, il knock-out globale del gene NPY-1R non presenta nessun particolare impatto su ansia e peso corporeo. Per scoprire il ruolo dei recettori Y1R limbici, sono stati generati topi knock-out condizionali, nei quali l'inattivazione del gene è stata ristretta solo ai neuroni eccitatori del proencefalo, e solo a partire da uno stadio avanzato dello sviluppo dell'animale, utilizzando il sistema Cre-loxP (vedi par. 1.2). Si è inoltre analizzato l'impatto di diversi tipi di cure materne sullo sviluppo e il comportamento, in particolare alimentare e ansioso, della prole knock-out e controllo (Bertocchi *et al.*, 2011). Lo studio di Bertocchi *et al.* (2011) ha indicato che l'inattivazione condizionale del gene NPY1R nei principali neuroni del proencefalo di topi maschi ha condotto a un aumento dei livelli d'ansia e a un minor peso corporeo, entrambi effetti dipendenti dalle cure materne precoci. La crescita corporea dei mutanti NPY1R^{r^{fb}} ha iniziato a rallentare approssimativamente intorno al 40 giorno di età (PND 40), il che coincide con i massimi livelli di inattivazione di NPY1R mediata dalla Cre-recombinasi. Il minor peso corporeo è persistito durante l'età adulta ed è stato associato alla minore massa adiposa bianca e a più bassi livelli di leptina sierica (Bertocchi *et al.*, 2011).

Uno degli aspetti più importanti di questo studio è stato osservare come le differenze, nel fenotipo molecolare, fisiologico e comportamentale, tra i topi NPY1R^{r^{fb}} e quelli controllo (NPY1R^{2lox}) siano divenute evidenti solo quando animali di entrambi i genotipi sono stati allevati da madri adottive del ceppo FVB/J (FVB), e non da quelle del ceppo C57BL/6J (C57). Analisi quantitative del comportamento materno in FVB e C57 hanno rivelato una forte variabilità tra le linee. Le madri adottive FVB/J hanno mostrato una maggior frequenza di assunzione di cibo e riposo e hanno speso più tempo accudendo i piccoli nella posizione di Arched back rispetto alle C57, i cui piccoli d'adozione hanno mostrato peso corporeo più basso da PND 6 in poi. Queste differenze nelle cure materne nella prima settimana di vita dei piccoli potrebbero avere delle conseguenze a lungo termine per la segnalazione NPY-Y1R. Questa ipotesi trova forte supporto negli aumentati livelli di mRNA per NPY1R nelle fibre ippocampali CA1e CA3 e nel DG (giro dentato) di topi NPY1R^{2lox} allevati da madri adottive FVB, rispetto a quelli degli NPY1R^{2lox} allevati da C57.

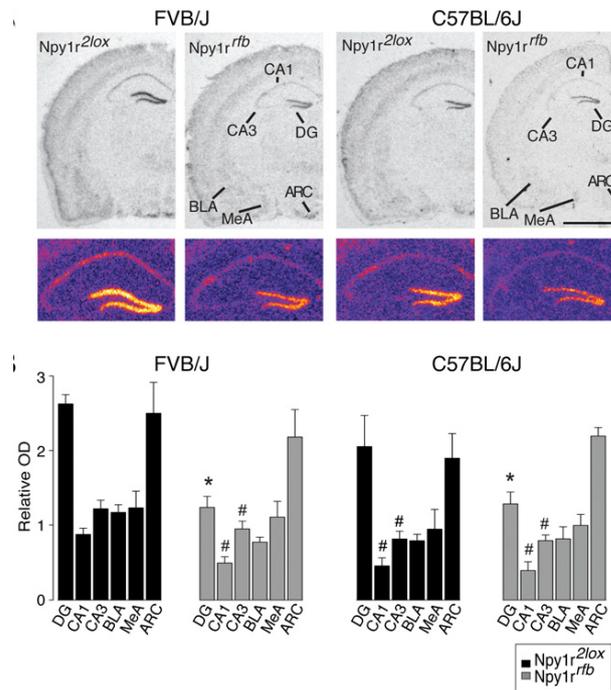


Figura 3.1: Ibridazione in situ di Y1R in ippocampo di animali NPY1R^{rfb} e loro controlli allevati da madri dei ceppi FVB/J e C57BL/6J, tratto da Bertocchi *et al.*, 2011

Come possibile conseguenza di ciò, i topi controllo NPY1R^{2lox} allevati da FVB hanno mostrato minori livelli d' ansia, maggior incremento del peso corporeo rispetto al primo giorno di basale e minore attivazione dell' asse ipotalamo/ipofisi/surrene HPA rispetto a quelli allevati da C57 (Bertocchi *et al.*, 2011). Nei cervelli di NPY1R^{2lox} ed NPY1R^{rfb} allevati da madri adottive C57, i livelli di mRNA per NPY1R si sono dimostrati molto simili tra loro e non si sono affermate significative differenze fenotipiche tra i due genotipi; ciò suggerisce che l' inattivazione indotta da CRE di NPY1R non possa far scendere ulteriormente l' espressione del gene nei neuroni eccitatori del proencefalo. La mancanza della riduzione condizionale dell' espressione di NPY1R nei topi allevati da C57 non può essere attribuita a un' alterazione dell' attività trascrizionale del promotore transgenico α -CamKII che porta CRE, dal momento che l' immunoreattività alla Cre-recombinasi è risultata comparabile tra topi NPY1R^{rfb} allevati da FVB e C57 (Bertocchi *et al.*, 2011).

L' impatto a lungo termine di bassi livelli di cure materne sulla prole, quanto ad ansia e risposte allo stress in età adulta, è ormai ben stabilito (Meaney *et al.*, 2007; Szyf *et al.*, 2007; Weaver, 2007). Un basso livello di Arched back si correla ad una ridotta espressione di recettori ippocampali per glucocorticoidi, ridotta sensibilità ai feedback negativi, aumentata espressione di CRH a livello ipotalamico e maggiore risposta dell'asse ipotalamo/ipofisi/surrene allo stress nell' adulto. Dato che NPY correla segnali eccitatori di risposta allo stress con l' attività dell' asse HPA (Cholewis *et al.*, 2001; Liposits, 1993), un' aumentata sensibilità al feed-back negativo dei glucocorticoidi potrebbe indurre effetti a lungo termine sull' interazione tra i sistemi NPY e CRH, influenzando cosè sull' ansia e sull' aumento di peso corporeo. Tuttavia, poichè il latte materno influenza fortemente la capacità delle ghiandole surrenali di

secernere corticosterone in risposta alla stimolazione da parte dell' ACTH (ormone adrenocorticotropo) (Levine, 2001), non si può escludere che la composizione del latte o qualche altro aspetto del comportamento materno possano giocare un ruolo nello sviluppo del sistema NPY/Y1R limbico dei piccoli in condizioni normali (Bertocchi *et al.*, 2011). È stato dunque stabilito uno strumento genetico in grado di limitare spazialmente e temporalmente l' espressione di NPY1R nel proencefalo dei topi. L' analisi condotta da Bertocchi *et al.* (2011) ha evidenziato che la riduzione condizionale dei recettori Y1R ippocampali conduce ad un aumento del comportamento correlato all' ansia. Ha inoltre fornito prove genetiche sperimentali del fatto che i recettori Y1R limbici sono necessari per la regolazione del peso corporeo. La ridotta espressione di NPY1R nel proencefalo non può, apparentemente, essere compensata dall' adattamento per mantenere l' omeostasi. Tali dati indicano, infine, che le vie neuronali NPY/Y1R nel sistema limbico sono importanti target della programmazione, indotta dalle cure materne, di ansia e omeostasi energetica.

3.1 Obiettivo di questo lavoro

L' obiettivo di questo lavoro è stato quello di contribuire alla caratterizzazione del fenotipo di topi KO condizionali per Y1R, esaminando in particolare gli effetti della delezione condizionale del gene per il recettore sul comportamento emozionale, alimentare e sul metabolismo, con particolare riguardo per le differenze sessuali, il tutto in risposta a diversi stili di cura materna (adozione), al fine di valutare le interazioni tra fattori genetici ed esperienze precoci sul comportamento e sull' espressione genica.



(a) Topo del ceppo FVB/J

(b) Topo del ceppo C57BL/6J



(c) Topo del ceppo Swiss Cd1

Figura 3.2: Ceppi di madri adottiva utilizzati in questo studio

Lo studio è stato svolto in costante collaborazione con l' Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi dell' Università di Torino, in prosecuzione di quanto già pubblicato con lo stesso gruppo di ricerca (Bertocchi *et al.*, 2011). In una prima fase abbiamo utilizzato come madri adottive topi del ceppo *outbred* SWISS CD1, che presentano un alto livello di cura materna, ceppo non preso in considerazione nel lavoro precedente, per poi proseguire ed ampliare la conoscenza degli effetti sulla prole di animali *inbred* NPY1R^{rfb} delle cure materne di madri adottive dei ceppi FVB/J (FVB) e C57BL/6J (C57).

Tutte le procedure sperimentali sugli animali sono state effettuate secondo le linee guida pubblicate dal Ministero Italiano della Salute (DDL 116/92) e approvate dal comitato di Bioetica dell'Università degli Studi di Parma.

3.2 Allevamento delle linee murine

Durante il mio Dottorato, ho allevato tutte le linee necessarie per la generazione del knock-out condizionale, presso il laboratorio di Etologia e Psicobiologia dell' Unità di Biologia del Comportamento del Dipartimento di Neuroscienze dell' Università di Parma, a partire da una colonia iniziale di animali generati dalla Prof.ssa Carola Eva dell' Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi dell' Università di Torino in collaborazione con il Max Planck Institute di Heidelberg. Le linee necessarie sono tre:

- **Linea di topi Npy1r^{lox+/+}** (o NPY1R^{2lox}): Questi topi presentano il gene Y1R tra due siti loxP su entrambi gli alleli (omozigosi), riconosciuti dalla ricombinasi CRE. Per mantenere questa linea è necessario mantenere il gene "floxato" in omozigosi, accoppiando fra loro individui della stessa linea.
- **La linea di topi transgenici Npy1r^{lox+/+}/LC1^{+/+}** (o NPY1R^{2lox}/Tg^{LC1}): La linea di topi transgenici TgLC1 contiene il gene per la ricombinasi CRE e quello per il gene reporter Luciferasi sotto un promotore controllato da tTA, composto da 7 siti di legame per il repressore Tet (tetraciclina-dipendente), oltre al gene Y1R floxato, tutti in omozigosi; per ciò per il mantenimento di questa linea è necessario accoppiare individui della stessa linea.
- **Linea di topi transgenici Npy1r^{lox+/+} α -CaMKII-tTA^{+/-}** (o NPY1R^{2lox}/Tg ^{α -CaMKII-tTA}): contiene il transattivatore controllato da doxiciclina a valle della subunità alfa della calcio-calmodulina chinasi di tipo II (α -CaMKII), una chinasi la cui espressione è ristretta ad alcune aree del proencefalo: neocorteccia, ippocampo, amigdala, e gangli basali (Mayford *et al.*, 1996; Krestel *et al.*, 2004). Per mantenere questa linea, questi animali vanno incrociati con gli NPY1R^{2lox} e la prole andrà genotipizzata per identificare quali individui sono portatori del transgene Tg ^{α -CaMKII-tTA} o meno.

A questo punto, per l'ottenimento del modello knock-out condizionale di Y1R in specifiche regioni del proencefalo, abbiamo accoppiato le due linee portatrici di entrambi i transgeni Tg ^{α -CaMKII-tTA} e Tg^{LC1}, al fine di possibile operare il controllo spazio-temporale della ricombinasi CRE per opera di un promotore specifico

(promotore α -CamKII) e del sistema *tet-off*. Trattandosi di un *tet-off*, in presenza di doxiciclina la trascrizione sarà impedita, mentre, in assenza dell' antibiotico, il tTA sarà in grado di legarsi al TRE (Tet Responsive Element) e attivare la trascrizione della ricombinasi. È la linea di topi knock-out condizionali NPY1R^{rfb} (o NPY1R^{lox^{+/+}/ α -CaMKII/tTA^{+/-}/LC1^{+/-}}), oggetto dei nostri studi; la linea si ottiene grazie all' incrocio delle due linee NPY1R^{2lox}/Tg ^{α -CaMKII-tTA} e NPY1R^{2lox}/Tg^{LC1}; la prole ottenuta andrà successivamente genotipizzata per identificare quali individui siano portatori del sistema di taglio del gene per Y1R.

3.2.1 Trattamento con antibiotico Doxiciclina

Ad ogni coppia è stata somministrata Doxiciclina (SIGMA-ALDRICH, 50mg/l) nell' acqua a partire dal primo giorno di accoppiamento. Il trattamento con l' antibiotico è stato interrotto alla nascita dei piccoli (*postnatal day* 0, PND 0). L' interruzione del trattamento con la Dox consente al transattivatore tTa di attivarsi e di indurre l' espressione della ricombinasi CRE, che diventa effettiva all' incirca a partire dal 40° giorno di età (PND 40), con conseguente espressione del fenotipo knock-out condizionale. Gli animali a questo punto sono pronti per essere dati in adozione a madri *Dox-naive* (mai esposte a Doxiciclina) appartenenti a diversi ceppi, al fine di valutare l' effetto dell' ambiente precoce sul modello NPY1R^{rfb}.

3.3 Genotipizzazione

Gli animali da porre in sperimentazione devono essere prima di tutto caratterizzati dal punto di vista genomico, in modo da distinguere tra i knock-out e quelli in cui, invece, non è avvenuta la delezione del gene per Y1R (usati come controlli). Per far ciò è stato estratto il DNA dalla coda di ogni singolo topo, per poi procedere all' analisi di PCR.

3.3.1 Materiali e metodi

Estrazione e purificazione del DNA

Ad ogni topo sono stati tagliati 2 mm di coda da cui estrarre il DNA. La procedura di estrazione e di purificazione del DNA genomico da tessuti solidi, effettuata utilizzando l' Aquapure genomic DNA kit (Bio-Rad Laboratories), ha previsto diversi passaggi: - Lisi cellulare: a circa 5-10 mg di campione viene aggiunta la soluzione di lisi (300 μ l) per lisare le membrane cellulari e liberare gli acidi nucleici, coadiuvata dalla Proteinase K (1,5 μ l-20 mg/ml) che denatura le proteine.

- Trattamento con RNasi: dopo la lisi cellulare mediante incubazione overnight a 55° nel termomixer, viene aggiunto alla soluzione l' enzima RNasi (1,5 μ l-4 mg/ml), con lo scopo di rimuovere l' RNA presente, lasciando incubare a 65° per 45 minuti;
- precipitazione delle proteine: dalla soluzione ottenuta, per mezzo della Protein Precipitation Solution (100 μ l), si fanno precipitare le proteine e i lipidi per arrivare alla fase successiva di purificazione del DNA. Mediante centrifugazione,

si separa un sovrinatante liquido, nel quale sono contenuti gli acidi nucleici, da un deposito più denso, costituito da vari frammenti cellulari e macromolecole, definito pellet e posizionato alla base di una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml;

- precipitazione del DNA: il sovrinatante viene prelevato e inserito in una nuova eppendorf per la precipitazione e il lavaggio del DNA attraverso l'aggiunta di alcoli, quali Isopropanolo al 100% (300 μ l) prima e, successivamente, Etanolo al 70% . Ad ogni passaggio viene effettuata una centrifugazione seguita dall'eliminazione dell'alcool rimanente;
- idratazione del DNA: in seguito all'evaporazione completa dell'alcool in eccesso, al DNA è aggiunta l'Hydration Solution (30-50 μ l). Il tutto viene incubato a 65° per circa un'ora. A questo punto è possibile conservare il DNA a temperature comprese tra di -20° e +4°.

In alternativa, per alcuni campioni, la precipitazione delle proteine è stata ottenuta impiegando il fenolo cloroformio. Le altre fasi rimangono invariate rispetto al protocollo sopra descritto. Per valutare la quantità e la qualità del DNA estratto, è stata effettuata un'elettroforesi su gel d'agarosio all'1%, preparato con tampone TAE 1x. Tale procedura prevede di far migrare, entro un campo elettrico, il DNA unito al Blu di Bromofenolo, che rappresenta un indicatore di corsa e una scala di peso molecolare di circa 600 paia di basi. Al gel d'agarosio si unisce l'Etidio Bromuro, che si intercala tra le basi azotate, rendendo fluorescente il DNA all'illuminazione con raggi ultravioletti. Quando il gel, ancora liquido, viene percolato sulla piattaforma della cella elettrolitica, vengono creati, tramite un apposito pettine, dei pozzetti. In questi ultimi, una volta solidificato il gel e riempita la cella con tampone TAE 1x, viene inserito il DNA combinato al Blu di Bromofenolo, il quale ha la sostanziale funzione di aumentare la densità del DNA, permettendogli di scendere all'interno del pozzetto. Viene poi applicata una corrente di circa 50 mV per un tempo di 15-20 minuti. La carica elettrica permette quindi la migrazione del DNA verso il polo positivo. Osservando ai raggi UV le bande così ottenute, è possibile valutare la quantità di DNA estratto e determinare lo stato di conservazione del campione, valutandone la qualità (fig. 3.3).

Analisi genetiche tramite PCR

Tutte le tecniche biomolecolari impiegate hanno previsto l'applicazione della *Reazione di Polimerizzazione a Catena* (PCR), che consente di selezionare una specifica sequenza di DNA e amplificarla migliaia di volte in un tempo brevissimo. In questo caso, l'elemento discriminante tra i topi knock-out e quelli senza la delezione del gene è stato il transattivatore tTA; la sua presenza indicava i KO, mentre la sua assenza gli animali da usare come controlli. Per valutare la presenza del tTA è stata effettuata, per tutti i campioni raccolti, un'amplificazione tramite PCR, utilizzando specifici primer in grado di amplificare la sequenza scelta. Per verificare la corretta amplificazione tramite PCR, è stata poi amplificata una regione del gene VGF, utilizzato come controllo interno positivo, impiegando ancora una volta specifici primer. Il DNA genomico è stato sottoposto a 30 cicli PCR in un volume di reazione di 20 μ l, impiegando 1U di GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), dNTPS

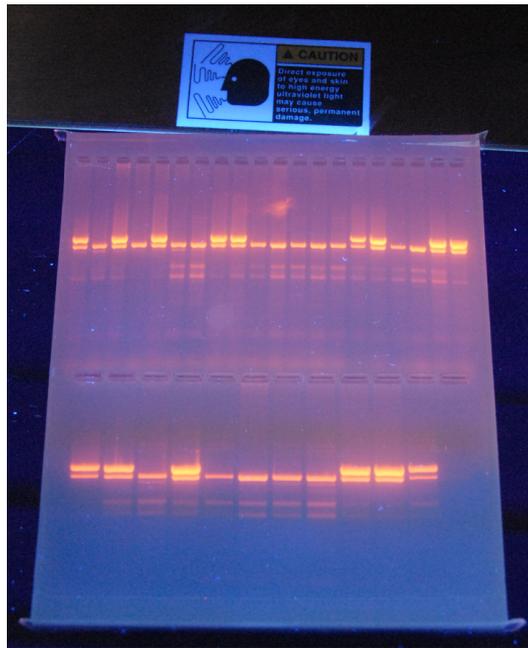


Figura 3.3: Immagine dell' elettroforesi su gel di Agarosio del DNA genomico estratto e purificato da campioni freschi; le bande indicano rispettivamente la presenza del gene VGF (sempre presente) e tTA (presente solo negli animali della linea $NPY1R^{rfb}$ ($NPY1R^{2lox}/Tg^{\alpha-CaMKII-tTA}$))

0.2 mM, 8 pmol di ciascun primer, in una soluzione a 1X Reaction Buffer. In seguito ad una iniziale denaturazione a 94° per 10 minuti, i successivi cicli hanno previsto una denaturazione a 94° per 45 sec, annealing a 56° per 45 sec ed un' estensione della catena a 72° per 45 sec. L' amplificazione viene terminata con un allungamento a 72° per 10 min. La presenza degli amplificati per il gene tTA e per il VGF è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2.5%.

3.4 Analisi dell' ambiente perinatale precoce (*crossfostering*)

Per il nostro studio abbiamo generato un totale di 482 animali fra maschi e femmine, *knock-out* e controlli, suddivisi in 7 coorti sperimentali (fig. 3.4). Tutti gli animali della linea $NPY1R^{rfb}$ sono stati dati in adozione a madri "dox-naive", per permettere l' attivazione del sistema di taglio del gene $NPY1R$ (come visto in 2.3). In questo modo è altresì possibile il controllo totale della variabile "ambiente", secondo quanto illustrato nel paragrafo 1.1.1. L'interazione fra il taglio del gene $NPY1R$ e le differenze nell'ambiente precoce dovute al diverso stile di cura materno di ogni ceppo sono stati l'oggetto e la direzione di questo lavoro di Tesi.

3.4.1 Osservazione del comportamento materno

Dal momento del parto (dopo circa 21 gg di gestazione), entro 12 ore, i neonati cuccioli sono stati pesati con una bilancia di precisione (SARTORIUS, USA) e dati

in adozione a madri dei ceppi SWISS CD1, FVB/J E C57BL/6J, a seconda delle varie coorti di animali sperimentali. Durante la procedura dell'adozione incrociata, le madri adottive sono state temporaneamente spostate dalle loro gabbie e i piccoli da adottare introdotti nel loro nido. Dopo qualche minuto, le madri adottive sono state rimesse nelle proprie gabbie.

coorte	sesso				adozione		
	M		F				
	ko	contr	ko	contr			
I	5	2	7	4	CD1		
II	10	5	8	21	CD1		
III	7	11	7	6	CD1		
IV	17	17	17	16	CD1		
V	10	15	16	6	CD1		
VI	18	23	17	26	CD1	FVB	C57
VII	45	49	41	59	CD1	FVB	C57
Tot	112	122	113	138			
Tot KO/ctrl	225		260		CD1	FVB	C57
TOT	485				340	59	86

Figura 3.4: Riepilogo numero, genotipo, sesso e ceppo di adozione dei animali generati, allevati e testati.

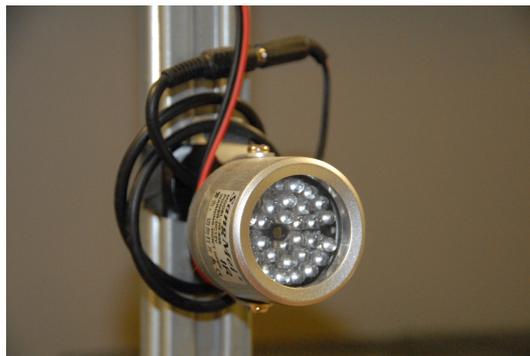
Ogni nidiata presentava un numero di piccoli compreso tra 6 ed 8 al fine di rendere le cucciolate più uniformi possibile; laddove i piccoli erano meno di 6, sono stati aggiunti cuccioli da altre nidiatae, cercando di mantenere l' omogeneità tra maschi e femmine. Il comportamento materno spontaneo delle madri adottive è stato osservato giornalmente, dalle ore 9:00 alle 11:00 del mattino (ultime due ore della fase di buio), a partire da PND 1 fino a PND 7. Il periodo di osservazione si è svolto nella fase oscura, utilizzando delle lampade a luce rossa (neon rossi da 15 W, Philips); questo perché i topi non sono in grado di percepire la luce rossa, la quale non interferisce, quindi, con il loro normale ciclo di attività (Jacobs *et al.*, 2001).

Le madri adottive erano, dunque, femmine allattanti di ceppo SWISS CD1, FVB/J, C57BL/6J, stabulate in gabbie di plexiglass (42 cm x 26.5 cm x 15 cm), con cibo ed acqua ad libitum. La temperatura della stanza sperimentale è stata mantenuta intorno ai $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ e l' illuminazione è stata regolata con un ciclo di luce-buio di 12 ore, con luce dalle 11:00 alle 23:00. Ogni madre è stata osservata ogni 4 min, per un totale di 30 osservazioni in 2 ore, tramite campionamento istantaneo. Come da Palanza *et al.* (2002), i comportamenti osservati sono stati:

- *Arched-back* (allattamento con postura ad arco): la madre allatta nella tipica posizione ad arco sopra i piccoli, con la doppia funzione di riscaldamento e di allattamento.
- *Nursing* (allattamento): la madre allatta almeno un piccolo.
- *Licking pup* (pulizia dei piccoli): la madre lecca e pulisce i cuccioli.
- *Nest building* (costruzione del nido): la madre costruisce o sistema il nido, e può trovarsi sia dentro che fuori rispetto ad esso.



(a) Impianto di illuminazione ausiliario a luce rossa per il campionamento istantaneo ad occhio nudo



(b) Illuminatore notturno a led ad infrarosso



(c) Video notturni ottenuti mediante telecamere ad infrarosso



(d) Telecamere ad infrarosso poste sopra le gabbie



(e) Videoregistratore digitale

Figura 3.5: Apparecchiatura per ripresa notturna e l' osservazione ad occhio nudo del comportamento materno

- *Eating/drinking* (mangiare/berere): la madre mangia o beve.
- *Grooming* (toelettatura): la madre si pulisce.
- (attività): la madre è attiva all' interno della gabbia, senza presentare nessuno specifico comportamento tra quelli precedentemente elencati.
- *Out of nest* (fuori dal nido): la madre si trova fuori dal nido, e, nel contempo, può svolgere una qualsiasi attività tra quelle sopra elencate.
- *Resting* (riposo): la madre è immobile, fuori o dentro il nido, senza svolgere altre attività.

In aggiunta, le madri sono state riprese mediante telecamere ad infrarosso ed illuminatoti infrarossi per tutta la notte al fine di condurre una analisi più dettagliata.

Svezzamento

A PND 27 gli animali sono stati pesati, sessati (separati i maschi dalle femmine) e marcati individualmente con una targhetta numerata posta all'orecchio (NATIONAL BAND TAG CO., New Port KY-USA) al fine di renderli facilmente identificabili in modo chiaro ed univoco; in quest' occasione si è prelevato un campione di tessuto contenente DNA genomico (2-3 mm circa dall'estremità della coda) al fine di poter procedere alla genotipizzazione di ogni individuo alla ricerca della sequenza genomica di tTA, per poter così stabilire quali animali siano knock-out e quali no.

3.4.2 Analisi del comportamento materno

Fra tutti i comportamenti osservati, quello che più contraddistingue la bontà delle cure materne, è la cosiddetta *Arched Back posture*, ovvero una postura di allattamento "ad arco" che consente la massima discesa di latte ed il massimo contatto madre/cuccioli. Come già descritto in Bertocchi *et al.* (2011), quello che differisce fra i diversi ceppi di madri non è tanto la quantità di tempo spesa nella cura della cucciolata, ma proprio la percentuale di quando del tempo totale viene passata in tale tipo di allattamento (fig. 3.6).

Oltre a calcolare le diverse quantità dei vari comportamenti delle madri di diversi ceppi con la loro prole, abbiamo anche calcolato un "Indice materno" interno ad ogni ceppo di madri, calcolando la percentuale di Arched Back su nursing totale (Arched Back + Nursing), al fine di creare un database delle madri più o meno buone da tenere in considerazione nei futuri studi comportamentali (fig. 3.8).

Analisi statistica

I dati sui comportamenti materni verso le cucciolate sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute a due fattori: ceppo della madre (CD1, FVB o C57) e giorni.



Figura 3.6: Madre adottiva in allattamento nella tipica postura ad arco (arched back)

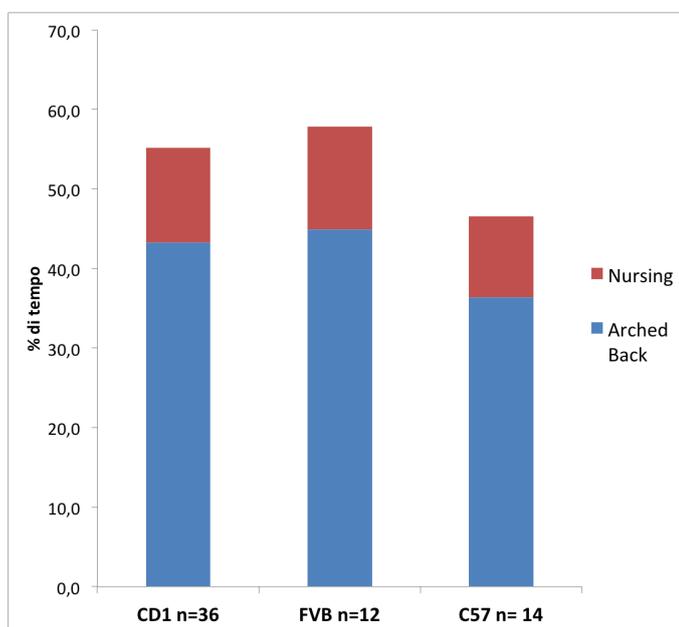
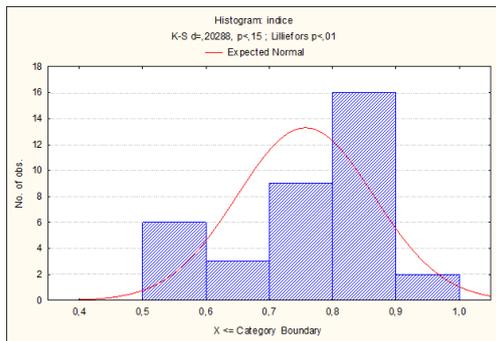
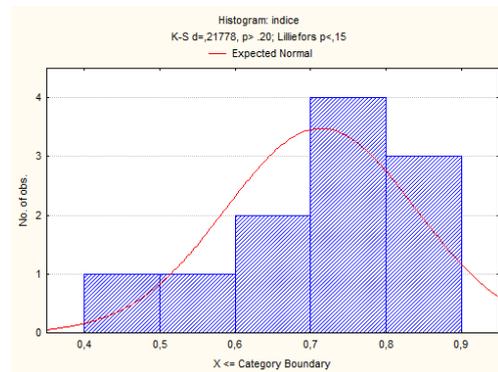


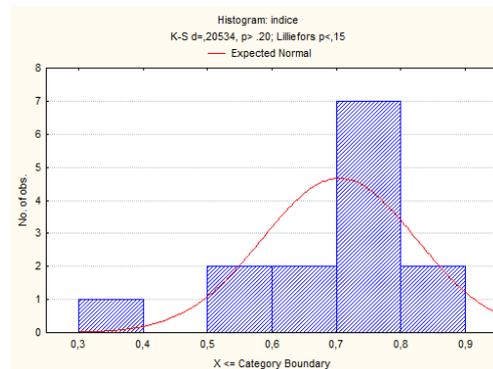
Figura 3.7: Rapporto fra tempo passato in Arched Back e tempo in allattamento totale



(a) Distribuzione dell' "Indice materno" delle madri del ceppo SWISS CD1



(b) Distribuzione dell' "Indice materno" delle madri del ceppo FVB/J

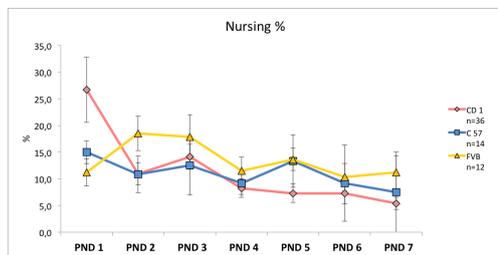


(c) Distribuzione dell' "Indice materno" delle madri del ceppo C57BL/6J

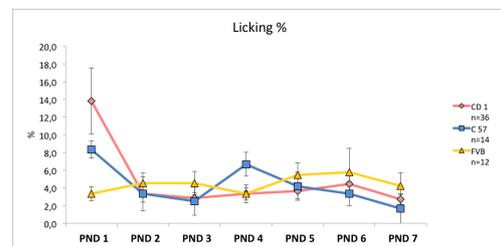
Figura 3.8: Confronto fra le distribuzioni dell' "Indice materno" dei tre ceppi di madri

3.4.3 Risultati

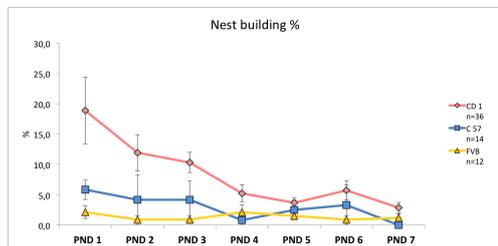
Ho condotto l'analisi della varianza a due fattori (ceppo e giorni) sui comportamenti manifestati dalle femmine dei tre ceppi di femmine in allattamento che hanno allevato la progenie sperimentale. Come previsto, i comportamenti relativi alla cura della prole sono diminuiti col passare dei giorni (effetto principale dei giorni su arched back: $F_{(6,198)}=1,8283$, $p<0,10$; nursing: $F_{(6,198)}=2,5021$, $p<0,05$; licking pup: $F_{(6,198)}=2,1312$, $p<0,05$); nest building: $F_{(6,198)}=1,9164$, $p<0,10$). Conseguentemente, si è resa evidente una significativa diminuzione del Total pup related behavior (parametro che tiene conto di tutti i comportamenti inerenti alla cura dei piccoli: arched back, nursing, licking pup, nest building) con il passare dei giorni (effetto principale dei giorni: $F_{(6,198)}=2,3011$, $p<0,05$). Al contrario, alcuni comportamenti non relativi alla cura della prole sono aumentati (effetto principale dei giorni, out of nest: $F_{(6,198)}=2,8397$, $p<0,01$ e eating: $F_{(6,198)}=9,5571$, $p<0,0001$). Ho osservato un effetto dell'interazione tra giorni e ceppo su nursing ($F_{(12,198)}=2,1741$, $p<0,01$), licking pup ($F_{(12,198)}=2,1741$, $p<0,05$), nest building ($F_{(12,198)}=1,5600$, $p<0,10$): nei primi giorni di osservazione, nelle femmine CD1 alcuni comportamenti sono più frequenti che verso gli ultimi, mentre nelle C57 e FVB non c'è variazione in funzione dei giorni. È da sottolineare, inoltre, un effetto altamente significativo del ceppo su nest building ($F_{(2,33)}=8,0912$, $p<0,01$), eating ($F_{(2,33)}=6,7370$, $p<0,01$), drinking ($F_{(2,33)}=2,9608$, $p<0,10$) e active ($F_{(2,33)}=14,9824$, $p<0,0001$): in generale, rispetto alle femmine di C57 ed FVB, le CD1 hanno mostrato livelli più alti di nest building, drinking e active; quanto all'eating, invece, sono state le C57 a raggiungere il picco maggiore.



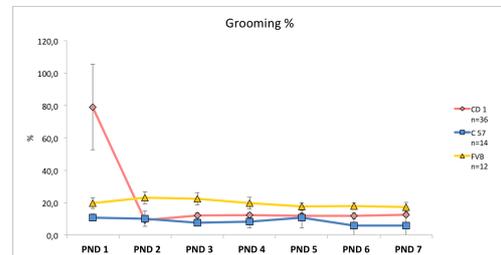
(a) Andamento del nursing in madri dei tre ceppi nella prima settimana di vita dei piccoli



(b) Andamento del licking pup in madri dei tre ceppi nella prima settimana di vita dei piccoli



(c) Andamento del nest building in madri dei tre ceppi nella prima settimana di vita dei piccoli



(d) Andamento del grooming in madri dei tre ceppi nella prima settimana di vita dei piccoli

Figura 3.9: Confronto dell' andamento temporale della frequenza dei comportamenti più rilevanti delle madri rispetto ai cuccioli

Complessivamente si può dire che, da un confronto tra i comportamenti assunti dalle femmine dei tre ceppi nei confronti dei piccoli nella prima settimana dalla nascita, si evince che esiste un livello di cura materna maggiore in FVB e CD1 rispetto alle C57 (fig. 3.10), anche se l'esiguo numero di femmine di ceppo C57 fa sì che il dato non sia facilmente sostenibile dal punto di vista statistico.

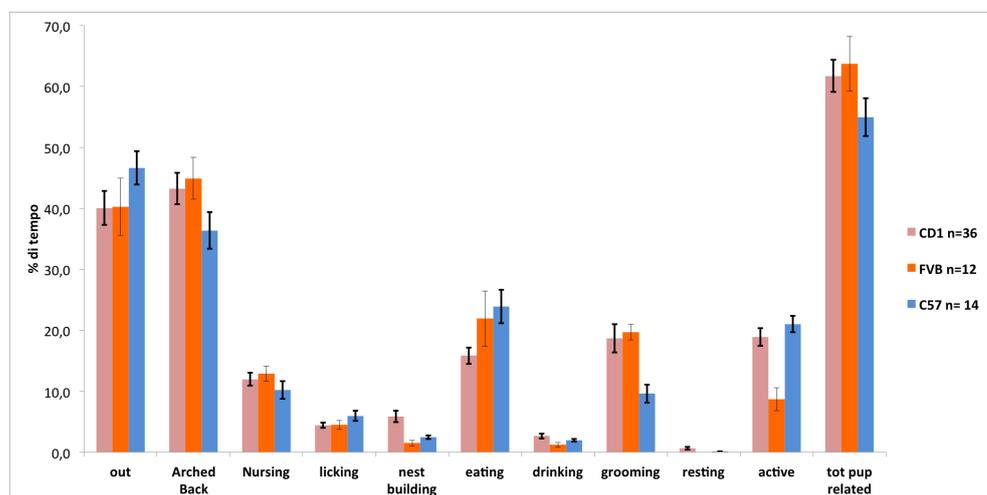


Figura 3.10: Confronto tra i comportamenti assunti dalle madri adottive di ceppo nella prima settimana di vita della prole

Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea delle nidiate

Ho effettuato un' ANOVA a due fattori (ceppo e giorni) sui pesi dei piccoli allevati dalle madri adottive FVB, CD1 e C57, considerando il periodo che va dalla nascita allo svezzamento (PND 0 – PND 27); questo per osservare l'andamento della crescita corporea prima dell'inattivazione del gene *NPY1R*, che avviene intorno a PND 40 ad opera della Cre-recombinasi. Ho osservato un effetto altamente significativo del ceppo ($F_{(2,204)}=13,1763$, $p<0,0001$) e dei giorni ($F_{(2,408)}=79,3814$, $p<0,0001$) e uno significativo dell'interazione tra giorni e ceppo ($F_{(4,408)}=4,9040$, $p<0,01$), come mostrato in fig. 3.11. Si può notare come la curva di crescita dei piccoli allevati da femmine CD1 si distanzi e raggiunga un picco molto più alto rispetto a quella dei piccoli di FVB e C57, ma possiamo ipotizzare che ciò sia dovuto principalmente alla maggior quantità di latte prodotto dalle femmine di questo ceppo ed alla diversa composizione (Bertocchi *et al.*, 2011).

3.4.4 Discussione

Come già ampiamente discusso nelle sezioni precedenti, *NPY1R* è strettamente coinvolto nel controllo di una serie di funzioni, tra cui spiccano comportamento alimentare, emozionale ed effetti correlati. I nostri studi precedenti hanno tuttavia indicato che l'espressione di *NPY1R* in area limbica è fortemente influenzata dall'ambiente materno precoce, specificatamente dal tipo di cura materna che la prole riceve nelle prime fasi della vita postnatale. In linea con quanto riportato da Bertocchi *et al.* (2011), dall'osservazione del comportamento materno di madri adottive

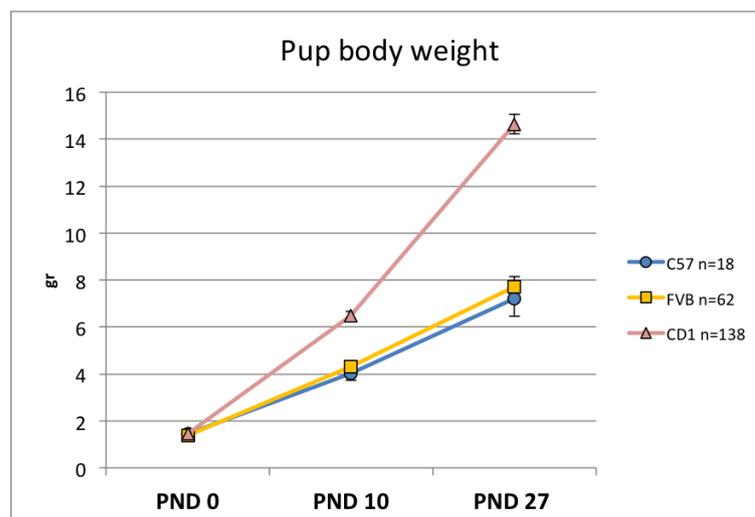


Figura 3.11: Crescita corporea dei piccoli allevati da madri dei tre ceppi, con pesi rilevati a PND 0, PND 10 e PND 27

di ceppo diverso è risultato che le femmine FVB presentano un maggior grado di cure materne rispetto alle C57, che hanno trascorso un tempo in *arched back* mediamente inferiore a quello delle FVB. A causa del ridotto numero di femmine adottive che hanno proseguito l'allevamento delle nidiatte sperimentali, non è stato possibile effettuare confronti statisticamente validi. In questo lavoro abbiamo utilizzato un terzo ceppo sperimentale, il CD1, che è risultato caratterizzato da un altro grado di cure materne. La rilevazione dei pesi dei piccoli dalla nascita allo svezzamento, a PND 0, 10 e 27, ha mostrato un incremento fortemente più marcato nella crescita della prole adottata da femmine CD1 rispetto a quello dei piccoli di C57 ed FVB, dopo un peso molto simile alla nascita, come prevedibile, tra i neonati dei tre gruppi. Ciò è probabilmente dovuto alla maggior quantità di latte prodotto dalle CD1. Questo effetto sul peso nel primo periodo di vita dei piccoli, prima dell'eventuale inattivazione del gene *NPY1R* e dell'influenza di altri fattori, è dunque fondamentale fisiologico, ma rappresenta un background molto importante per lo sviluppo dei topi, soprattutto per modellare il loro successivo profilo metabolico (Meaney *et al.*, 2007; Szyf *et al.*, 2007; Weaver, 2007).

A partire dallo svezzamento, tutti gli animali generati secondo le modalità appena viste, sono stati sottoposti a test e paradigmi sperimentali validati in letteratura, al fine di valutare il loro fenotipo, sia dal punto di vista metabolico (capitolo 4), che da quello cognitivo-comportamentale (capitolo 5); nell'ultimo capitolo, inoltre, viene indagata la risposta ad uno stress psicosociale cronico (capitolo 6).

Capitolo 4

Analisi del comportamento alimentare e metabolico

Come abbiamo visto nel capitolo 2, NPY è implicato nei meccanismi di controllo dell'omeostasi energetica, nonché nella modulazione dell'asse HPA. L'impatto a lungo termine di bassi livelli di cure materne sulla prole nella risposta ad ansia e stress in età adulta è ben definito (Meaney *et al.*, 2007; Szyf *et al.*, 2007; Weaver, 2007): bassi livelli di *Arched Back Nursing* comportano una riduzione dell'espressione dei recettori per i glucocorticoidi nell'ippocampo, una maggiore espressione di CRH ipotalamico, nonché una maggiore risposta dell'asse HPA allo stress nell'adulto, influenzando così la vulnerabilità all'ansia ed il guadagno di peso corporeo. Tuttavia, poiché il latte materno influenza fortemente la capacità delle ghiandole surrenali di secernere corticosterone in risposta alla stimolazione dell'ormone adrenocorticotropo (Levine, 2001), non si può escludere che la composizione del latte o altri aspetti dell'ambiente materno giochino un ruolo nello sviluppo del sistema NPY limbico/Y1R in cuccioli in condizioni normali. Diversi studi hanno ormai dimostrato che l'obesità ha una sostanziale componente genetica ed è strettamente correlata a un'eccessiva assunzione di cibo e ad un calo dell'attività fisica (Ikeda *et al.*, 1999). L'insulino-resistenza, in particolare, è considerata una caratteristica cardinale dei difetti metabolici correlati al peso e si pensa che si determini in seguito ad un adattamento legato ad una dieta ipercalorica (Shulman, 2000). L'obesità rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo di diabete di tipo II, ipertensione, iperlipidemia e patologie coronariche ed è la maggior causa di morbilità e mortalità (Grundy e Barnett, 1990). Da qui l'esigenza di una caratterizzazione metabolica del modello NPY1R^{rfb}.

4.1 Stile di cura materno e crescita corporea

Come già visto in Bertocchi *et al.* (2011), il diverso tipo di adozione ha effetti sulla curva di crescita ponderale della prole NPY1R^{rfb}. Perciò, abbiamo iniziato monitorando questo andamento in tutte le nidiate che abbiamo ottenuto, di ogni adozione, dal momento dello svezzamento, quando cioè ogni animale viene identificato in modo univoco mediante l'etichetta numerata all'orecchio, fino al raggiungimento dell'età adulta, quando gli animali iniziano ad essere manipolati e testati, al fine di investigare come, a parità di background genetico, l'ambiente precoce perinatale abbia influenzato l'andamento della crescita corporea.

Materiali e metodi

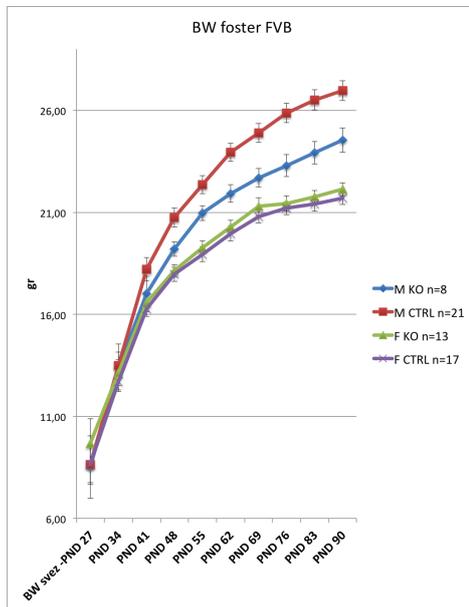
Dal momento dello svezzamento (PND 27) fino all'inizio dell'età adulta (PND 90), tutti gli animali di tutte e sette le coorti prodotte (236 maschi e 241 femmine) sono stati pesati una volta alla settimana con una bilancia digitale (KERN AND SOHN GMBH, Germania), al fine di monitorarne la curva di crescita corporea. In questo lasso di tempo tutti gli animali condividono la stessa gabbia con i loro fratelli/sorelle e sono stabulati in condizioni standard, con cibo ed acqua ad libitum, ciclo buio/luce 7:00-19:00 e temperatura di $22^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Analisi statistica

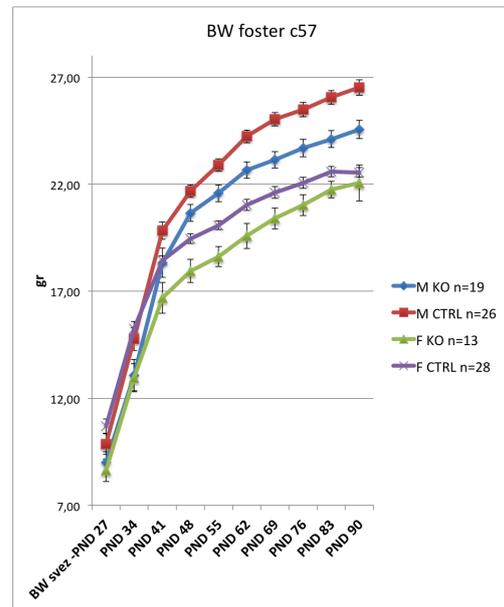
I dati su peso corporeo sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a 5 fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, KO), fenotipo (agouti o black), adozione (CD1, FVB e C57) e giorni. Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Tukey per i confronti binari.

4.1.1 Risultati

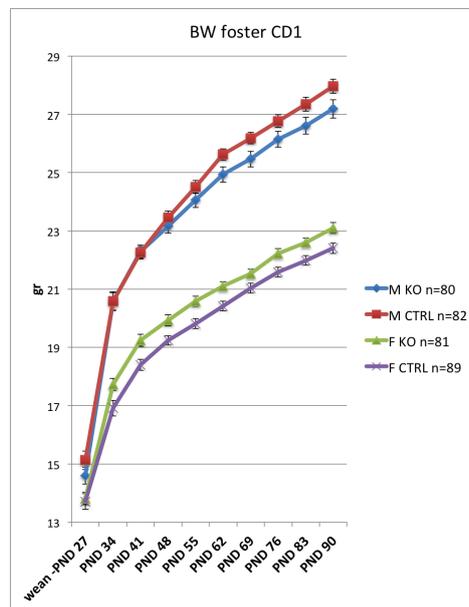
Gli andamenti ponderali in base al tipo di madre adottiva sono mostrati nella figura 4.1; l'analisi della varianza per misure ripetute a cinque fattori (sesso, genotipo, fenotipo, ceppo della madre adottiva e giorni) condotta sui pesi corporei misurati da PND 34, settimana successiva allo svezzamento, a PND 90 ha evidenziato come significativi gli effetti di sesso, genotipo e di interazione tra sesso e genotipo, per cui, come previsto, c'è una sostanziale differenza nel peso di maschi e femmine, con i maschi che pesano in modo altamente significativo più delle femmine (sesso: $F_{(1,432)}=196,06$, $p<0.0001$) e presentano una curva di crescita significativamente più ripida rispetto ad esse (interazione tra giorni e sesso: $F_{(8,3456)}=70,16$, $p<0.0001$); inoltre, in generale i topi KO erano significativamente meno pesanti rispetto ai topi controllo (genotipo: $F_{(1,432)}=8,40$, $p<0.01$), in particolare questa differenza era significativa nei maschi, ma non nelle femmine (sesso e genotipo: ($F_{(1,432)}=7,37$, $p<0.01$). Come prevedibile, dato che le madri adottive CD1 presentano una quantità maggiore di latte, gli animali adottati da queste madri, indipendentemente da genotipo, sesso, fenotipo ed età, pesavano significativamente di più rispetto agli animali adottati da FVB e C57 (foster: $F_{(2,432)}=69,72$, $p<0.0001$), effetto che riscontriamo anche nell'interazione fra sesso e ceppo della madre: $F_{(2,432)}=12,72$, $p<0.0001$. Inoltre il ceppo della madre adottiva influenza in modo altamente significativo la crescita corporea nel tempo in modo differenziale fra maschi e femmine (effetto di interazione fra adozione, sesso e giorni: $F_{(16,3456)}=7,20$, $p<0.0001$; fig. 4.2): le femmine in generale presentano una curva di crescita meno ripida rispetto ai maschi, questo andamento è particolarmente evidente nel gruppo delle femmine adottate dalle madri CD1 rispetto ai maschi adottati da femmina CD1. Inoltre i topi maschi KO presentano curve di crescita meno ripide rispetto ai maschi di controllo (giorni, sesso e genotipo: $F_{(8,3456)}=7,66$, $p<0.0001$), mentre non si sono riscontrate differenze tra le curve di crescita delle femmine KO e controllo.



(a) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta degli animali adottati da madri FVB/J



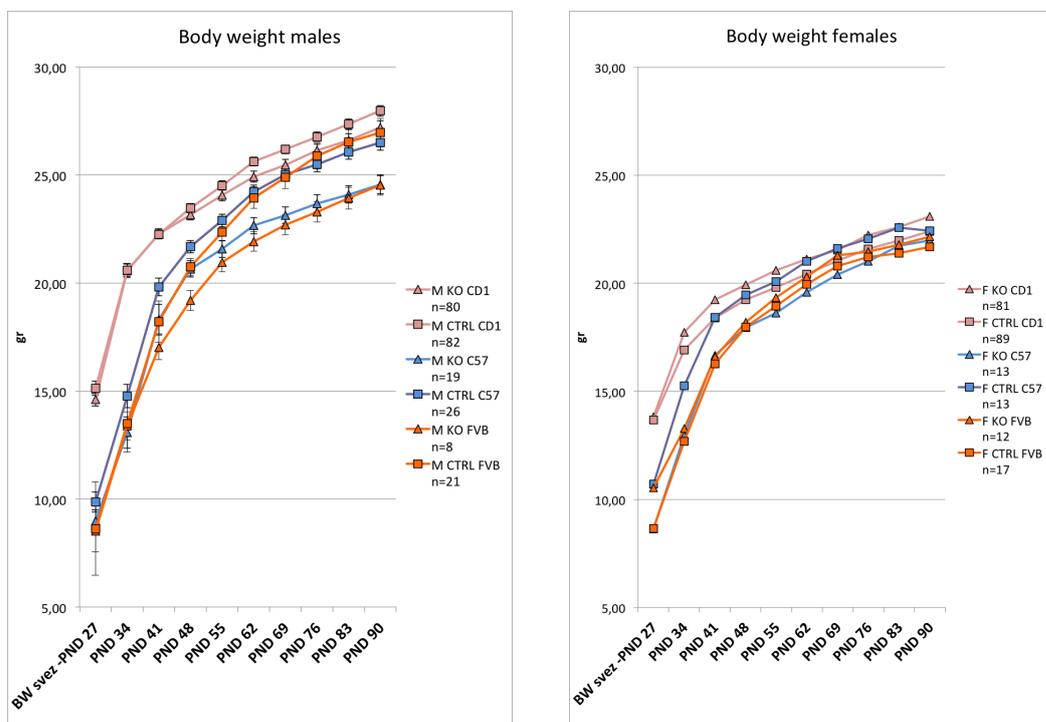
(b) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta degli animali adottati da madri C57BL/6J



(c) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta degli animali adottati da madri SWISS CD1

Figura 4.1: Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di tutti gli animali $Npy1r^{rfb}$ e loro controlli dallo svezzamento all'età adulta

Dato che quindi maschi e femmine presentano pesi diversi ed il sesso come fattore principale presenta un effetto significativo e partecipa ad interazioni con altri fattori che hanno effetti significativi, ho condotto successive ANOVA separate per maschi e femmine.



(a) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta degli animali maschi di tutte le adozioni

(b) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta degli animali femmina di tutte le adozioni

Figura 4.2: Effetto differenziale del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di maschi e femmine dallo svezzamento all'età adulta (effetto di interazione fra adozione, sesso e giorni: $(F_{(16,3456)})=7,20$, $p<0.0001$)

Durante l'analisi dei dati del peso corporeo, mi sono accorto inoltre di una crescita differenziale fra animali di fenotipo *agouti* e animali di fenotipo *black* (vedi fig. 4.3); analizzando separatamente i pesi dei due genotipi ho in effetti trovato differenze significative nell'andamento della crescita corporea di questi due fenotipi, in relazione a tipo di adozione e genotipo, come visibile nelle figure 4.4 e 4.5, anche qui suddivisi per sesso.

Esiste infatti un significativo effetto d'interazione fra il colore del manto ed il cepo della madre adottiva sul peso degli animali ($(F_{(2,432)})=5,39$, $p<0.01$), effetto ancora più significativo in relazione ai giorni (effetto di interazione fra fenotipo, adozione e giorni: $(F_{(16,3456)})=4,50$, $p<0.001$), per cui gli animali di fenotipo *black* pesano significativamente di più rispetto agli animali di fenotipo *agouti* solo se adottati da femmine CD1 ($p<0.001$) e non da FVB e C57.

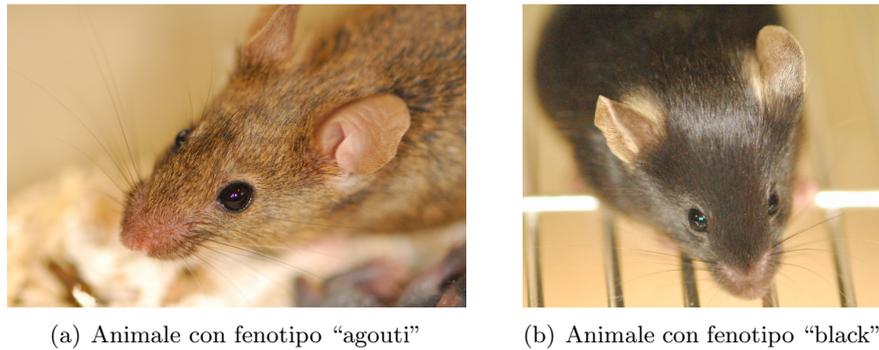


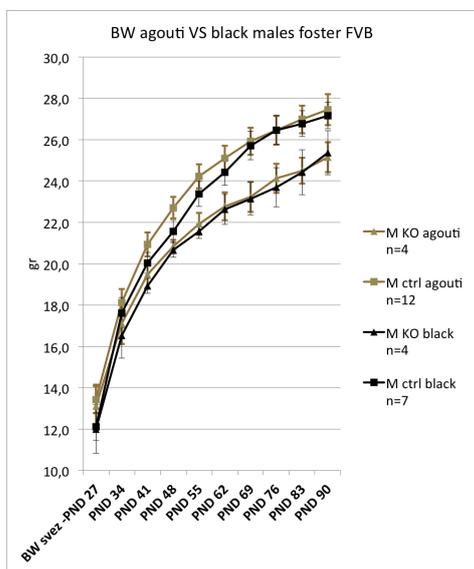
Figura 4.3: Fenotipi agouti e black a confronto

Maschi

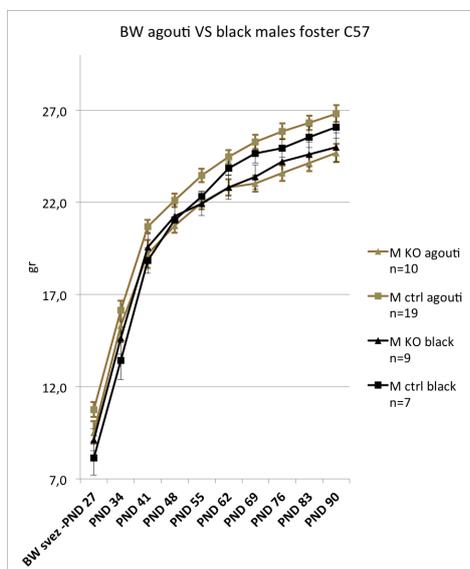
Per quanto riguarda i dati sui pesi dei maschi, l'ANOVA a 4 vie ha mostrato come significativi i seguenti fattori principali ed interazioni. I maschi KO pesano significativamente di meno rispetto ai controlli (genotipo: $F_{(1,214)}=11,59$, $p<0.001$), in particolare a partire dal giorno 62 in poi (giorni, genotipo: $F_{(8,1712)}=6,99$, $p<0.0001$). Inoltre, gli animali allevati da madri CD1 hanno mostrato una curva di accrescimento meno ripida rispetto agli animali allevati da FVB e C57 ($F_{(16,1712)}=68,64$, $p<0.0001$), pur mantenendo pesi significativamente maggiori per tutto il periodo di osservazione indipendentemente dal genotipo (adozione: $F_{(2,432)}=12,72$, $p<0.0001$) rispetto a quelli allevati da madri FVB e C57 (fig. 4.2). Ho osservato che gli animali agouti pesano meno dei black, nel caso di adozione da parte di madri CD1, ma non nel caso di adozione FVB e C57 (fenotipo, adozione: $F_{(2,432)}=4,15$, $p<0.05$).

Femmine

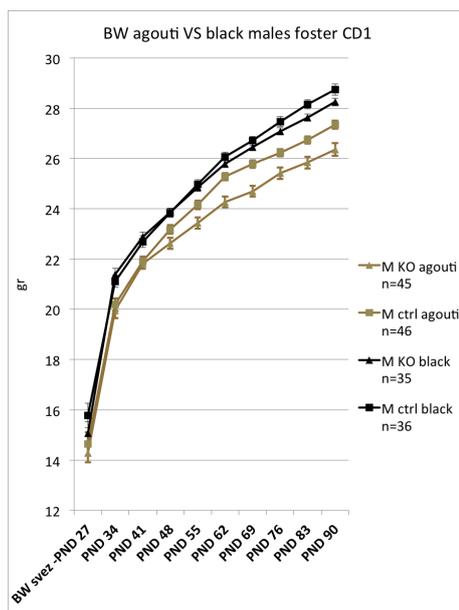
Per quanto riguarda i dati sui pesi delle femmine, l'ANOVA a 4 vie ha mostrato come significativi i seguenti fattori principali ed interazioni. Effetto tipo di adozione, con gli animali allevati da madri FVB che pesano significativamente meno di quelli allevati da madri CD1 e C57, con questi ultimi che presentano un peso intermedio ($F_{(2,218)}=17.71$, $p<0.0001$); questa differenza si nota anche nell' interazione fra genotipo e tipo di adozione, che evidenzia come KO e controlli pesino in modo diverso in relazione al tipo di madre adottiva: rispetto ai controlli, le KO pesano di più nel caso di adozione CD1, uguali se adottati da FVB, e meno se allevati da C57 ($F_{(2,218)}=5.61$, $p<0.01$). Esiste anche una interazione significativa fra genotipo e colore del manto, che ha un effetto opposto su KO e controlli: le femmine agouti e black hanno lo stesso peso se sono KO, mentre le agouti pesano significativamente meno delle black nel caso delle controllo ($F_{(1,218)}=3.82$, $p=0.05$). Per quanto riguarda l'andamento dei pesi nel tempo, l' interazione fra giorni e adozione rivela che anche le femmine CD1 hanno, come i maschi, un andamento diverso rispetto a quelle allevate da FVB e C57 ($F_{(16,1744)}=45.12$, $p<0.0001$); questo effetto ha inoltre un effetto di interazione con il genotipo, con le femmine KO che pesano nel tempo di più rispetto a quelle di controllo, se allevate da CD1, uguale se allevate da FVB e di meno se allevate da C57 ($F_{(16,1744)}=1.69$, $p<0.05$). Esiste anche una interazione fra giorni, colore del manto ed adozione che evidenzia come nelle femmine CD1 le



(a) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta dei maschi allevati da madri FVB/J, suddivisi per fenotipo

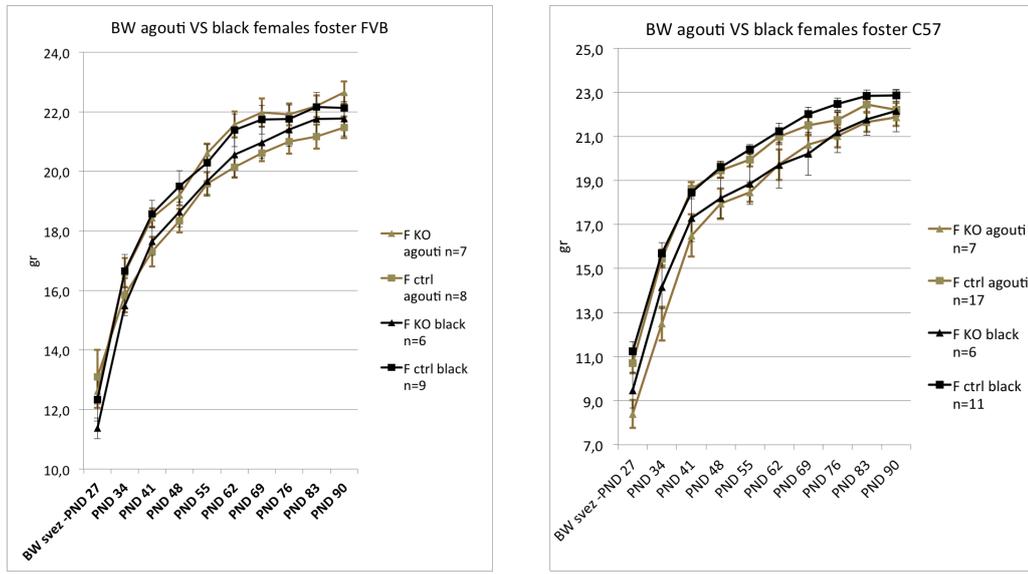


(b) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta dei maschi allevati da madri C57BL6/J, suddivisi per fenotipo



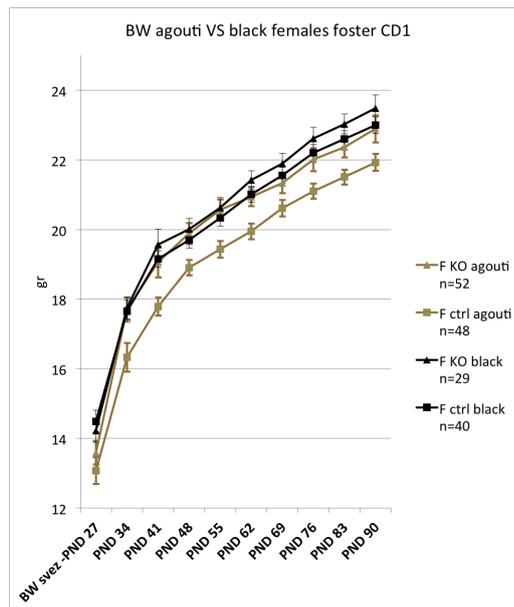
(c) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta dei maschi allevati da madri SWISS CD1, suddivisi per fenotipo

Figura 4.4: Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di animali maschi in relazione al colore del manto: gli animali black pesano significativamente di più rispetto agli animali agouti solo se adottati da femmine CD1 ma non da FVB e C57 (effetto di interazione fra fenotipo e adozione: $F_{(2,432)}=4,15, p<0.05$)



(a) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta delle femmine allevate da madri FVB/J, suddivise per fenotipo

(b) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta delle femmine allevate da madri C57BL6/J, suddivise per fenotipo



(c) Peso corporeo dallo svezzamento all'età adulta delle femmine allevate da madri SWISS CD1, suddivise per fenotipo

Figura 4.5: Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di animali femmina allevati in relazione al colore del manto: nelle femmine allevate da CD1, le femmine agouti pesano meno rispetto alle black, cosa che non avviene né nelle FVB, dove al contrario queste pesano di più, né nelle C57, dove pesano uguali alle black (interazione fra giorni, colore del manto ed adozione: $F_{(16,1744)}=4,18$, $p<0.0001$)

femmine agouti pesano meno rispetto alle black, cosa che non avviene né nelle FVB, dove al contrario queste pesano di più, soprattutto all'inizio, né nelle C57, dove pesano uguali alle black ($F_{(16,1744)}=4.18$, $p<0.0001$); l'interazione fra giorni, genotipo, fenotipo e tipo di adozione evidenzia il diverso andamento dei pesi delle femmine agouti o black, KO o controllo, in base al tipo di adozione: se allevate da CD1, le agouti pesano uguale alle black nel caso delle KO, mentre pesano di meno nel caso delle controllo. Se allevate da madri FVB, al contrario, le KO agouti pesano più delle KO black, mentre le agouti controllo pesano di meno rispetto alle black; per quanto riguarda le femmine adottate da madri C57, ho riscontrato che le agouti controllo pesano meno delle black, ma che questa differenza non c'è nelle KO.

4.2 Vulnerabilità ad obesità indotta da una dieta ipercalorica

Come visto nel capitolo 2 (par. 2.1.2), in modelli di obesità indotta tramite dieta si è visto che, quando è presente un bilancio energetico positivo, l' mRNA per NPY nell' ARC può aumentare, diminuire o rimanere inalterato, e questi cambiamenti compensatori sembrano dipendere dal background genetico delle diverse linee di roditori e dal tipo di trattamento (Bergen *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 1992; Leibowitz *et al.*, 2005). Inoltre, non sono state riscontrate variazioni significative nell' espressione dell' mRNA per Y1R nell' ARC di topi, predisposti e resistenti all' obesità, nutriti con una dieta ad alto apporto calorico, e ciò suggerisce che il sistema NPY-Y1R dell' nucleo arcuato (ARC) non giochi un ruolo fondamentale nell' indurre l' iperfagia associata a una dieta particolarmente appetibile (Huang *et al.*, 2004). Al contrario, un forte aumento dell' espressione di NPY è stato riscontrato nei nuclei dorso-mediale (DMN) e ventromediale (VMN) dell' ipotalamo (fig. 4.6) di topi con obesità indotta da dieta, suggerendo che l' incrementata attività dei neuroni NPY in queste regioni cerebrali possa partecipare al mantenimento dell' omeostasi energetica (Yang *et al.*, 2008); infatti, si è scoperto che l' aumentata attività neuronale nel DMN contribuisce allo sviluppo dell' obesità causata dal consumo di una dieta ricca in grassi, mentre lesioni del DMN di ratto attenuano l' aumento di peso indotto da dieta grassa (Bellinger e Bernardis, 2002).

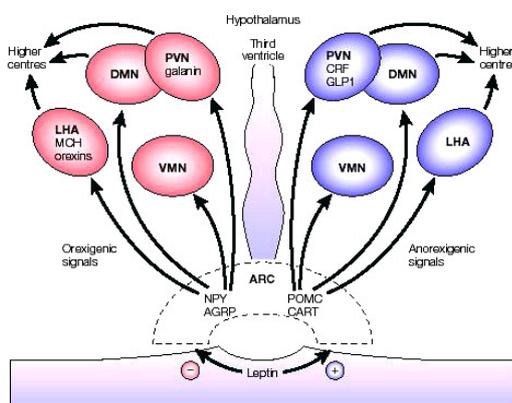


Figura 4.6: Nuclei ipotalamici coinvolti nella regolazione dell' appetito

La dieta ipercalorica è una dieta ricca in grassi (High Fat Diet, HFD) utilizzata per creare un valido modello animale di sindrome metabolica, associato ad insulino-resistenza e disfunzione delle cellule pancreatiche (Buettner *et al.*, 2007). Non esiste una composizione fissa per le diete HFD, ma ci sono diverse tipologie che differiscono tra di loro per composizione nutrizionale, contenuto energetico e proprietà organolettiche. Una dieta ricca di grassi risulta più appetibile e sazia meno rispetto ad un cibo proteico, inducendo iperfagia negli animali, che associata all'elevato contenuto calorico, porta ad un inevitabile aumento del peso corporeo.

Una dieta HFD induce insulino resistenza (soprattutto a livello adipocitario) e iperglicemia, con una maggiore predisposizione allo sviluppo del diabete di tipo II, oltre a cambiamenti nel tessuto adiposo: aumentano il numero e la grandezza degli

adipociti e si riduce la lipolisi (Buettner *et al.*, 2007). Moraes *et al.* (2009) hanno constatato un aumento dell'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie in topi con obesità sperimentalmente indotta da dieta ricca in grassi, sottolineando lo stato infiammatorio tipico dell'obesità. Al fine di valutare gli effetti di una dieta ipercalorica (HFD) sul nostro modello animale, su animali di tutti e tre i tipi di adozione sono stati condotti test di vulnerabilità ad una dieta ricca di grassi (4RF21 MOD., 5,2 kCal/gr) appositamente studiata da Mucedola (Milano, Italia) come arricchimento della normale dieta di mantenimento (4RF21, 3,9 kCal/gr).

Il test consiste nella somministrazione per un periodo di almeno 3 settimane della dieta ad aumentato apporto calorico, durante le quali abbiamo monitorato la crescita corporea degli animali e la quantità di cibo consumato. Al termine del trattamento abbiamo valutato i valori di glicemia basale, la risposta nel test di tolleranza al glucosio (Glucose Tolerance Test - GTT), alla ricerca di eventuali marcatori di sindrome metabolica, oltre ai parametri fisiologici al sacrificio quali la quantità di grasso bianco perigonadico (White Adipose Tissue - WAT) e al prelievo del tessuto adiposo bruno interscapolare (Brown Adipose Tissue - BAT) al fine di valutare la termogenesi.



Figura 4.7: Dieta HFD (a destra) e STD (a sinistra) a confronto

4.2.1 Materiali e metodi

Esposizione a dieta ipercalorica

Una volta raggiunta l'età adulta (età compresa fra PND 90 e PND 110), 28 animali allevati da madri CD1, 30 allevati da FVB e 16 allevati da C57 sono stati isolati e stabulati singolarmente e, dopo una settimana in cui hanno continuato ad alimentarsi normalmente con dieta standard, che abbiamo usato come basale, sono stati alimentati per tre settimane con HFD ad libitum al posto della normale dieta. Peso corporeo e quantità di cibo consumata sono stati misurati ogni due giorni per poi calcolare l'incremento di entrambi rispetto alla settimana basale, incremento calcolato per settimana.

Glucose Tolerance Test (GTT)

Il test di tolleranza al glucosio (*Glucose Tolerance Test* - GTT) è stato effettuato in seguito ad una notte di digiuno (12 h), dopo le tre settimane di HFD. Dopo una misurazione dei livelli ematici di glucosio a digiuno per valutare la glicemia basale, agli animali sono stati iniettati intraperitonealmente 0.1cc per ogni 10 grammi di peso corporeo di una soluzione di D-glucosio al 10%. A questo punto la glicemia è stata nuovamente misurata a 30 (T30), 60 (T60) e 120 (T120) minuti dopo l'iniezione del carico di glucosio, tramite il sangue fuoriuscito da un taglietto effettuato sulla coda. Tutte le misurazioni di glucosio ematico sono state effettuate mediante glucometro Accucheck Aviva (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).



Figura 4.8: Iniezione intraperitoneale di 0.1cc/10gr peso corporeo di D-glucosio al 10%

Prelievo sangue e tessuti

Dopo le tre settimane di dieta ipercalorica e il GTT, gli animali sono stati sacrificati, il sangue raccolto dal tronco in provette tipo “Eppendorf” con anticoagulante EDTA (SARSTEDT, Italia) e posto immediatamente in ghiaccio; subito dopo i pannelli di tessuto adiposo bianco perigonadico (WAT) sono stati prelevati e pesati mediante bilancia di precisione. Successivamente il sangue raccolto è stato centrifugato a 4000 giri/minuto per 10' in centrifuga refrigerata a 4°C ed il plasma ottenuto aliquotato in due campioni e conservato a -20°C.

Analisi statistica

I dati su peso corporeo e quantità giornaliera di cibo ingerito sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a 4 fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, KO), adozione (CD1, FVB e C57) e giorni. I dati del GTT sono stati analizzati tramite ANOVA a 3 fattori: genotipo (controlli, KO), sesso (maschi, femmine)

e tempo. Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Duncan per i confronti binari.

4.2.2 Risultati

Incremento di peso corporeo

Per analizzare l'incremento di peso corporeo durante la dieta ipercalorica, ho condotto un' ANOVA per misure ripetute a 4 vie (sesso, genotipo, adozione, giorni) sulle medie settimanali di incremento in rapporto al periodo basale in dieta standard. Si evidenzia per prima cosa, come atteso, un forte effetto del sesso ($F_{(1,64)}=66,96$, $p<0.0001$), con i maschi che guadagnano significativamente più peso rispetto alle femmine e un altrettanto forte differenza per adozione ($F_{(2,64)}=9,51$, $p<0.001$) con gli animali allevati da madri CD1 che aumentano di peso più degli allevati da C57 ed FVB. Per quanto riguarda l'effetto del genotipo, troviamo un effetto significativo ($F_{(1,64)}=5,98$, $p<0.05$) che evidenzia come i KO guadagnino in genere più peso rispetto ai controlli. Per quanto riguarda l'andamento nel tempo dell'incremento di peso, ho trovato un effetto di interazione fortemente significativo fra giorni e sesso ($F_{(2,128)}=16,22$, $p<0.0001$) da cui si vede che i maschi crescono di peso durante le tre settimane in modo maggiore rispetto alle femmine, ed uno sempre di interazione fra giorni e adozione ($F_{(4,128)}=6,08$, $p<0.001$), da cui si evince che gli animali allevati da madri CD1 guadagnano nella seconda e terza settimana più peso rispetto agli animali allevati da FVB e C57.

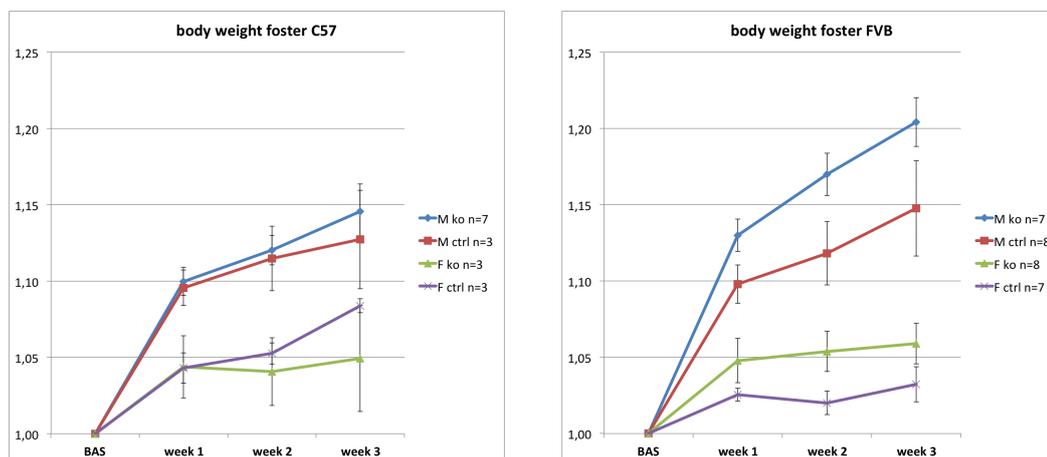
Visto il forte effetto della variabile sesso ho condotto un'ulteriore analisi separata per maschi e femmine.

Maschi

Per i maschi si evidenziano due forti effetti: il primo di genotipo ($F_{(1,35)}=5,76$, $p<0.05$) e il secondo di adozione ($F_{(2,35)}=3,71$, $p<0.05$), da cui si evince rispettivamente che i maschi KO ingrassano più dei controlli, e che a guadagnare di più siano i maschi allevati da madri CD1. Per quanto riguarda l'andamento nelle settimane, l'effetto di interazione fra giorni e adozione ($F_{(4,70)}=5,55$, $p<0.001$) ci dice che la curva di crescita più ripida è quella dei maschi allevati da madri CD1, seguita da quelli allevati da FVB e per ultimi, dai maschi allevati da C57; l'analisi mediante post-hoc dell'interazione fra genotipo e adozione rivela come la differenza fra KO e controlli nelle curve di guadagno di peso raggiunga livelli di significatività solo nei maschi allevati da FVB ($p<0.05$) e di tendenza di significatività in quelli allevati da CD1 ($p=0.07$).

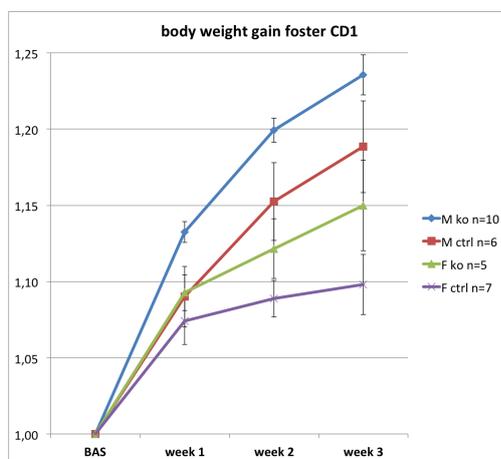
Femmine

Per quanto riguarda le femmine si evidenzia solo un effetto primario dell'adozione ($F_{(2,23)}=6,80$, $p<0.05$), da cui si può notare come le femmine allevate da madri CD1 abbiano un incremento maggiore rispetto a quelle allevate da FVB e C57; coerentemente, una successiva analisi dell'interazione fra genotipo e adozione mostra



(a) Incremento di peso corporeo, rispetto al periodo basale, in animali allevati da madri del ceppo C57

(b) Incremento di peso corporeo, rispetto al periodo basale, in animali allevati da madri del ceppo FVB



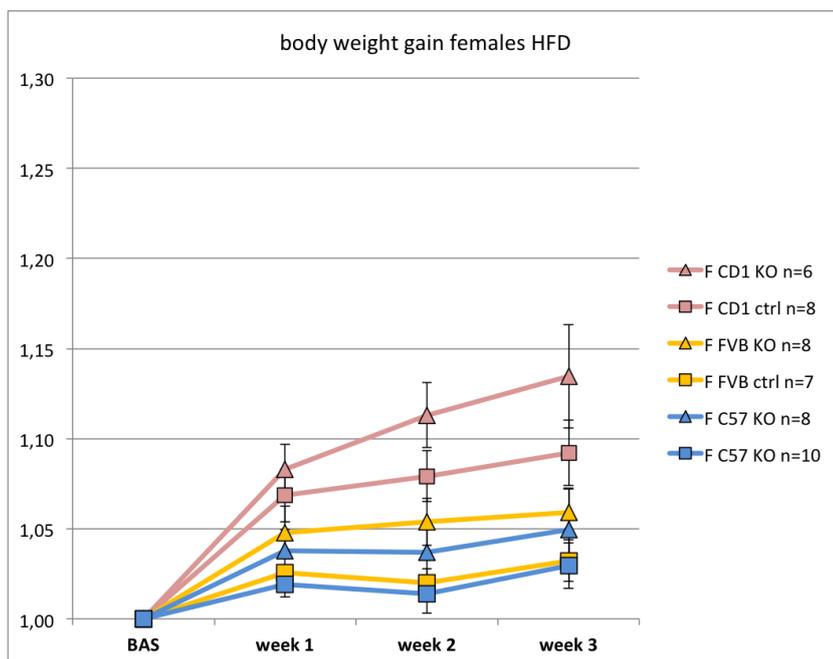
(c) Incremento settimanale del peso corporeo, rispetto al periodo basale, di tutti gli animali allevati da madri del ceppo CD1

Figura 4.9: Confronto fra l' incremento nel peso corporeo rispetto al periodo basale di animali $NPY1R^{rfb}$ e loro controlli allevati da madri dei ceppi CD1, FVB e C57

4.2. VULNERABILITÀ AD OBESITÀ INDOTTA DA UNA DIETA IPERCALORICA



(a) Incremento settimanale del peso corporeo, rispetto al periodo basale, di tutti i maschi: i maschi KO ingrassano più dei controlli (adozione: $F_{(2,35)}=3,71$, $p<0.05$) e la curva di crescita più ripida è quella dei CD1 (interazione fra giorni e adozione: $F_{(4,70)}=5,55$, $p<0.001$); solo negli allevati da C57 la differenza fra i KO e i controlli nel guadagno di peso non è significativa



(b) Incremento di peso corporeo, rispetto al periodo basale, di tutte le femmine: a guadagnare più peso sono le femmine di entrambi i genotipi allevate da madri CD1 (adozione: $F_{(2,23)}=6,80$, $p<0.05$); solo nelle CD1 la differenza fra femmine KO e controllo raggiunge la significatività nella terza settimana ($p=0.05$)

Figura 4.10: Confronto fra l' incremento nel peso corporeo rispetto al periodo basale fra maschi e femmine

come solo le femmine allevate da questo ceppo raggiungano nella terza settimana una differenza significativa fra KO e controlli ($p=0.05$).

4.2.3 Consumo di cibo (*food intake*)

L'analisi della varianza a 4 fattori (sesso, genotipo, adozione e giorni) sull'incremento della quantità di cibo consumata durante la somministrazione di HFD ha rilevato un effetto significativo sia del sesso ($F_{(1,64)}=6,66$, $p<0.05$) che del genotipo ($F_{(1,64)}=16,23$, $p<0.001$), che del tipo di adozione ($F_{(2,64)}=4,18$, $p<0.05$); rispettivamente: l'incremento nella quantità di cibo consumata dai maschi è maggiore rispetto a quella delle femmine, quella dei KO maggiore rispetto a quella dei controlli e quella degli animali allevati da CD1 maggiore rispetto agli allevati FVB e C57. Si nota anche un effetto di interazione fra giorni e sesso ($F_{(2,128)}=4,74$, $p=0.01$), che ci mostra una differenza significativa nei valori dell'incremento di cibo fra maschi e femmine nelle tre settimane, soprattutto nella prima di HFD. Visto il forte effetto della variabile sesso e anche la sua partecipazione all'effetto di interazione coi giorni, ho svolto successive analisi separate per sesso.

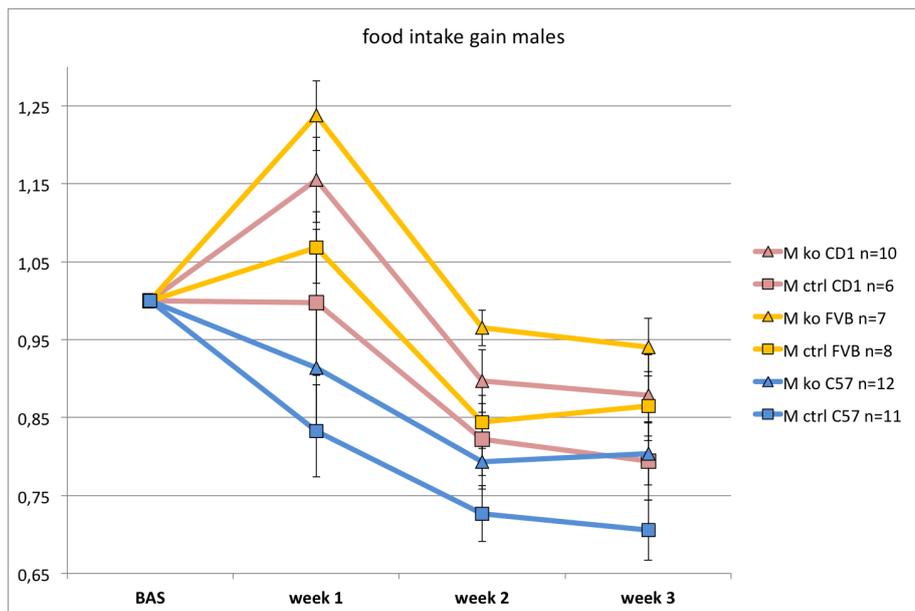
Maschi

Per quanto riguarda i maschi si evidenziano effetti significativi del genotipo ($F_{(1,70)}=6,04$, $p<0.05$), con i KO che mangiano in genere più cibo rispetto ai controlli, indipendentemente dalla settimana e dell'adozione ($F_{(2,42)}=10,14$, $p<0.001$) che ci mostra come gli allevati da madri C57 siano quelli che mangiano in assoluto meno rispetto a CD1 ed FVB. Una analisi successiva mediante post-hoc rivela come la differenza fra KO esista solo negli allevati da CD1 ($p=0.05$) ed FVB ($p<0.05$) e solo nella prima settimana di dieta, dove gli animali devono confrontarsi con un nuovo cibo estremamente palatabile ed estremamente calorico.

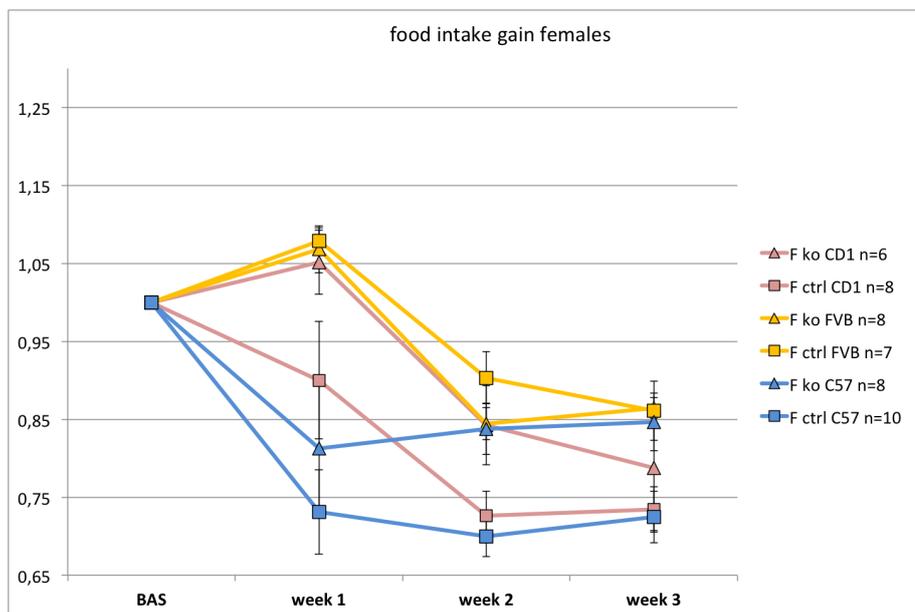
Femmine

Per le femmine invece troviamo effetti significativi sia per il genotipo ($F_{(1,29)}=12,74$, $p<0.01$) che per l'adozione ($F_{(2,29)}=4,33$, $p<0.05$) che mostrano rispettivamente come le KO mangino di più rispetto alle controllo e le C57 siano quelle che mangiano significativamente di meno rispetto a CD1 ed FVB; la successiva analisi mediante post-hoc ci mostra come la differenza fra KO e controllo sia significativa solo nelle allevate da CD1 ($p<0.05$ per tutte le settimane) e C57 ($p<0.05$ solo nelle ultime due settimane) e come questa differenza tenda a diminuire nel tempo nelle prime e ad aumentare nelle seconde. Nessuna differenza significativa si riscontra fra femmine KO e controllo allevate da FVB.

4.2. VULNERABILITÀ AD OBESITÀ INDOTTA DA UNA DIETA IPERCALORICA



(a) Incremento della quantità di cibo durante la somministrazione di dieta ipercalorica in tutti i maschi: i KO consumano sempre più cibo rispetto ai loro controlli (genotipo: $F_{(1,70)}=6,04$, $p<0.05$); nella fattispecie questa differenza raggiunge la significatività solo negli allevati da CD1 ($p=0.05$) ed FVB ($p<0.05$) e solo nella prima settimana di dieta



(b) Incremento della quantità di cibo durante la somministrazione di dieta ipercalorica in tutte le femmine: le KO consumano più cibo rispetto alle controllo (genotipo: $F_{(1,29)}=12,74$, $p<0.01$) e le C57 sono quelle che mangiano meno (adozione: $F_{(2,29)}=4,33$, $p<0.05$); la differenza fra KO e controllo raggiunge la significatività solo nelle allevate da CD1 ($p<0,05$ per tutte le settimane) e C57 ($p<0.05$ solo nelle ultime due settimane). Nessuna differenza significativa si riscontra fra femmine KO e controllo allevate da FVB

Figura 4.11: Confronto fra l'incremento nella quantità di cibo consumata settimanalmente, rispetto al basale, fra maschi e femmine durante il periodo di dieta ipercalorica

4.2.4 Glucose Tolerance Test

Per analizzare i dati riguardanti i livelli di glicemia nei topi transgenici in seguito ad una iniezione intraperitoneale di glucosio, ho condotto una ANOVA per misure ripetute a 4 vie (sesso, genotipo, adozione e tempo). Si evidenzia per prima cosa una differenza fortemente significativa fra maschi e femmine nell'andamento della curva glicemica in risposta al GTT (sesso: $F_{(1,40)}=35,12$, $p<0.0001$); si nota anche un'interazione fra sesso e adozione ($F_{(1,40)}=4,13$, $p<0.05$), con gli animali adottati da madri FVB che presentano valori glicemici più bassi di quelli adottati da C57 nel caso delle femmine, e più alti nel caso dei maschi. Per quanto riguarda l'andamento nel tempo delle curve glicemiche ho notato un'interazione molto significativa fra tempo e sesso ($F_{(3,120)}=9,48$, $p<0.0001$), con i maschi che raggiungono valori più alti a T30 e li mantengono più alti fino a T120, fra tempo e genotipo ($F_{(3,120)}=2,89$, $p<0.05$), con i Ko che raggiungono valori più alti a T30 per poi tornare a decrescere come i controlli, e fra tempo e ceppo della madre adottiva ($F_{(3,120)}=3,06$, $p<0.05$), che evidenzia due andamenti diversi nella curva glicemica fra animali allevati da madri FVB e C57.

Visto il forte effetto primario della variabile sesso, ho condotto ANOVA successive separate per maschi e femmine.

Maschi

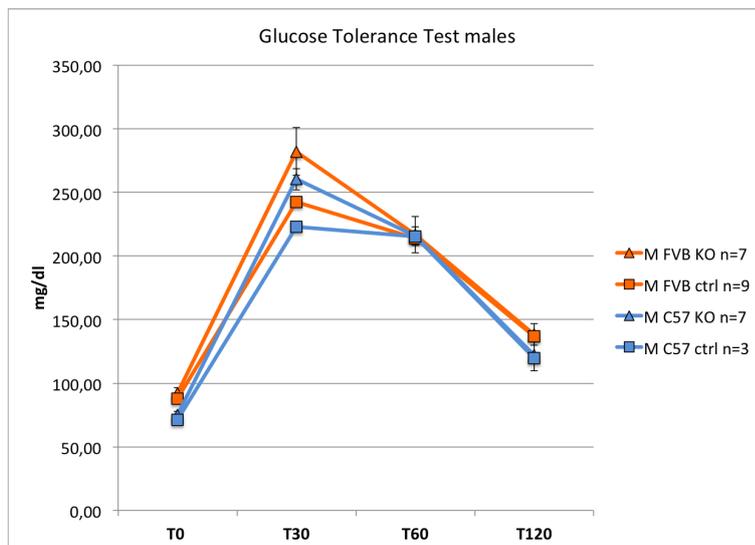
Per quanto riguarda i maschi, l'ANOVA a 3 fattori (genotipo, adozione e tempo) ha evidenziato un forte effetto di interazione fra genotipo e tempo ($F_{(3,66)}=4,12$, $p<0.05$), che evidenzia come i maschi KO raggiungano valori più alti a T30 se confrontati coi rispettivi controlli ($p=0.05$ per i C57 e $p<0.05$ per gli FVB), per poi rientrare, decrescendo, nello stesso intervallo dei controlli.

Femmine

Per quanto riguarda le femmine, l'ANOVA a 3 fattori (genotipo, adozione e tempo) ha evidenziato un forte effetto di interazione fra adozione e tempo ($F_{(3,66)}=4,12$, $p<0.05$), che evidenzia come la curva glicemica delle femmine allevate da FVB e quelle allevate da C57 differiscano nell'andamento con queste ultime che mostrano livelli glicemici più alti, anche se la successiva analisi mendicante post-hoc mostra come siano in realtà le femmine controllo C57 ad avere livelli più alti a T60 ($p<0.01$).

4.2.5 Quantità di tessuto adiposo bianco (WAT)

L'analisi della varianza per misure ripetute a 3 fattori (sesso, genotipo e adozione) sulla quantità di grasso corporeo dopo l'esposizione ad una dieta ipercalorica, ha evidenziato per prima cosa una differenza fortemente significativa fra maschi e femmine (sesso: $F_{(1,66)}=98,89$, $p<0.0001$) e fra animali allevati da madri CD1, FVB o C57 (adozione: $F_{(2,66)}=16,92$, $p=0.05$). Si nota anche un forte effetto di interazione fra sesso e ceppo della madre adottiva ($F_{(2,66)}=4,90$, $p=0.01$), con maschi e femmine che presentano andamenti diversi nella quantità di grasso bianco perigonadico in base al tipo di adozione. Visto il forte effetto primario della variabile sesso, ho condotto ANOVA successive separate per maschi e femmine.

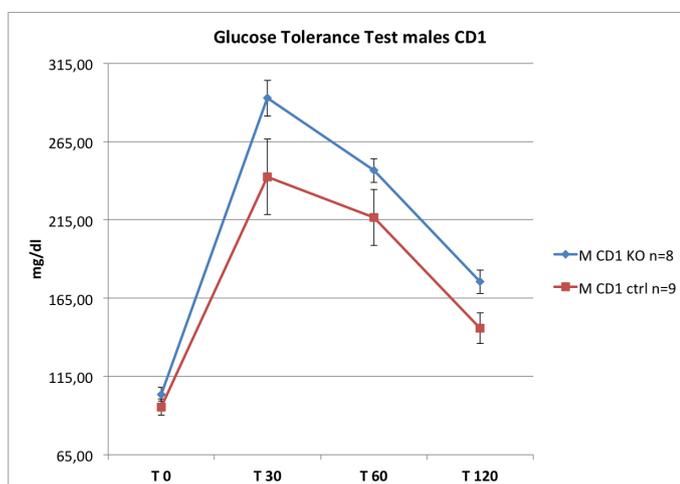


(a) Andamento GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica nei maschi allevati da madri del ceppo FVB e C57; i KO hanno valori più alti a T30 rispetto ai loro controlli in entrambi i ceppi di adozione ($p=0.05$ per i C57 e $p<0.05$ per gli FVB)

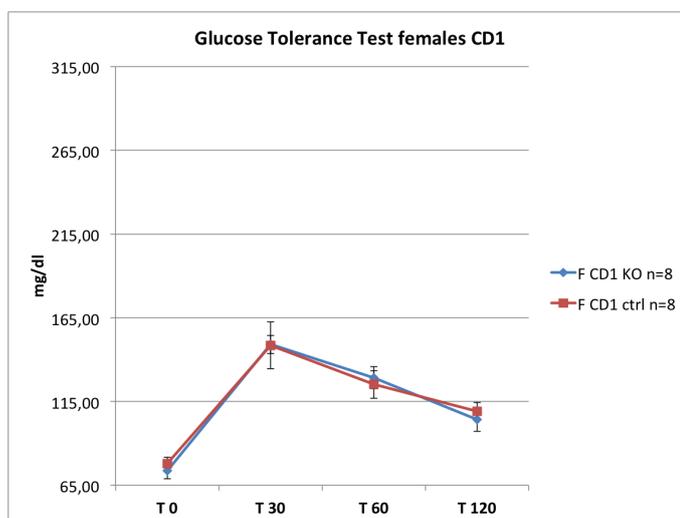


(b) Andamento GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica nelle femmine allevate da madri del ceppo FVB e C57; le uniche femmine che si discostano dall'andamento generale sono quelle controllo allevate da C57, che hanno valori differenti da tutte le altre (tendenti alla significatività a T30 in confronto alle femmine FVB, $p=0.08$ e significativi a T60, $p<0.01$)

Figura 4.12: Confronto fra l'andamento del GTT dopo tre settimane di esposizione a dieta ipercalorica in animali allevati da madri dei ceppi FVB e C57; per l'andamento del GTT in animali allevati da madri CD1, si vedano i grafici dell' esperimento di confronto fra diete a diverso apporto calorico (figura 4.13)



(a) Andamento GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica nei maschi allevati da madri del ceppo CD1; si nota un effetto statisticamente significativo del genotipo ($F_{(1,15)}=4,48$, $p=0.05$) nell'andamento della curva glicemica



(b) Andamento GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica nelle femmine allevate da madri del ceppo CD1

Figura 4.13: Confronto fra l'andamento del GTT in animali allevati da madri CD1; i grafici si riferiscono ai dati dell' esperimento di confronto fra diete a diverso apporto calorico (capitolo 4.3)

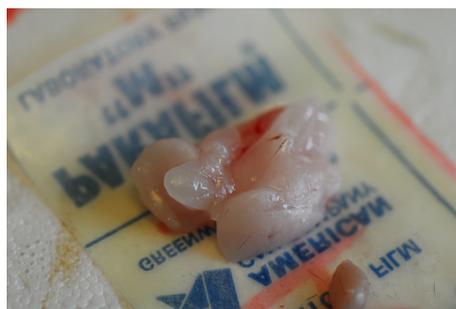


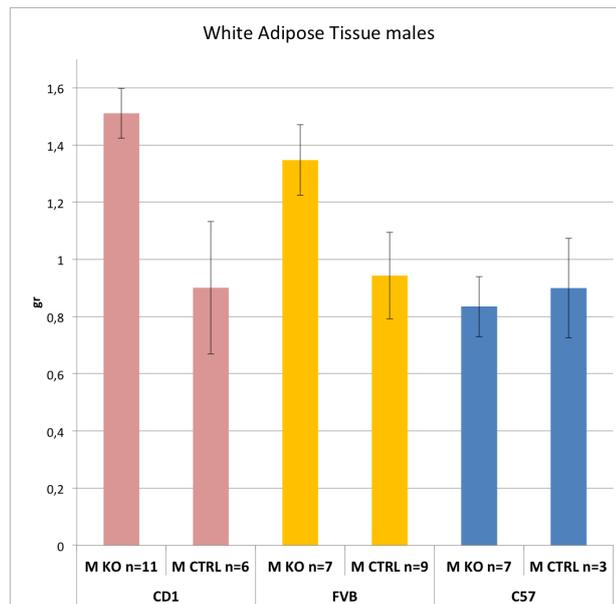
Figura 4.14: Tessuto adiposo perigonadico bianco appena prelevato e pesato

Maschi

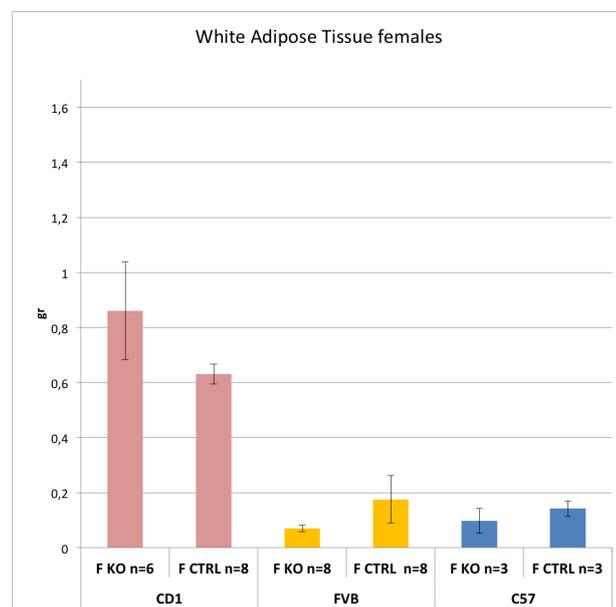
Per quanto riguarda i maschi, l' ANOVA a 2 fattori (genotipo, adozione) ha evidenziato un forte effetto del genotipo ($F_{(1,37)}=5,18$, $p<0.05$), che evidenzia come i maschi KO abbiamo più adiposo bianco al sacrificio rispetto ai controlli, e del ceppo di adozione ($F_{(2,37)}=3,28$, $p<0.05$), che mostra come i maschi allevati da CD1 ed FVB abbiamo più adiposo rispetto a quelli allevati da C57; una successiva analisi dell' interazione fra genotipo e adozione rivela come la differenza fra maschi KO e controllo sia presente sia negli allevati da CD1 ($p<0.05$) che da FVB ($p<0.05$), ma non negli allevati da C57.

Femmine

Per quanto riguarda le femmine, l' ANOVA a 2 fattori (genotipo, adozione) ha evidenziato un forte effetto dell' adozione ($F_{(2,29)}=33,49$, $p<0.0001$), che evidenzia come le femmine allevate da CD1 abbiano significativamente più adiposo bianco rispetto a quelle allevate da C57 e FVB; una successiva analisi dell' interazione fra genotipo e adozione rivela come vi sia una tendenza alla significatività nella differenza fra femmine KO e controllo nelle sole femmine allevate da CD1 ($p=0.06$).



(a) Peso tessuto adiposo bianco peridogadico (WAT) al sacrificio dopo la somministrazione di dieta ipercalorica in tutti i maschi: si nota un effetto significativo nella differenza fra maschi KO e controllo sia negli allevati da CD1 ($p < 0.05$) che da FVB ($p < 0.05$), ma non negli allevati da C57



(b) Peso tessuto adiposo bianco perigonadico (WAT) al sacrificio dopo la somministrazione di dieta ipercalorica in tutte le femmine: si nota una tendenza alla significatività nella differenza fra femmine KO e controllo nelle sole femmine allevate da CD1 ($p = 0.06$)

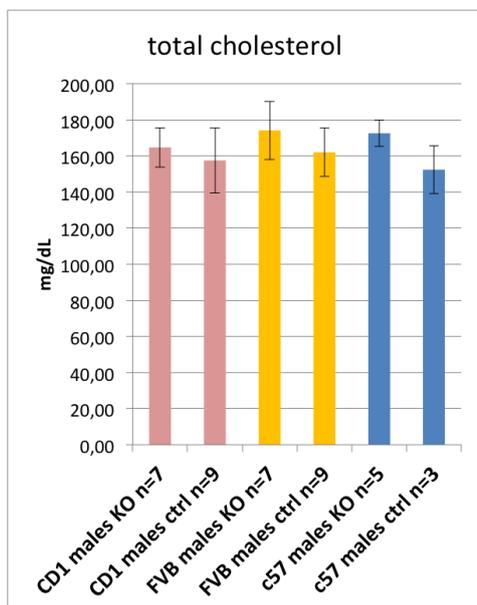
Figura 4.15: Confronto fra sesso ed adozione nella quantità di tessuto adiposo bianco perigonadico WAT

4.2.6 Parametri ematici

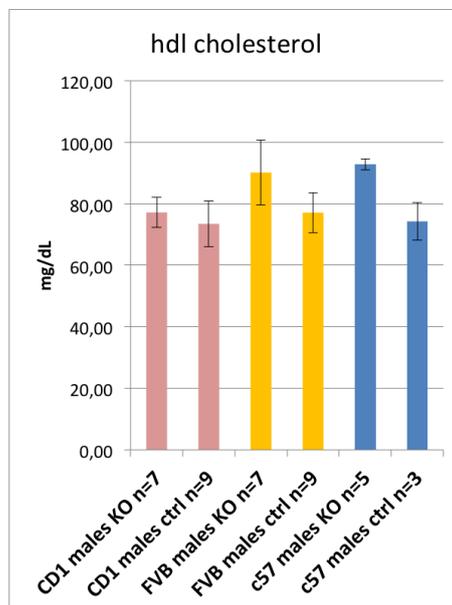
Per quanto riguarda i livelli totali di colesterolo, l'analisi della varianza a 4 fattori (sesso, genotipo, fenotipo e adozione) ha evidenziato un effetto significativo del sesso ($F_{(1,77)}=46,66$, $p<0.0001$) e dell'interazione fra sesso e genotipo ($F_{(1,77)}=5,50$, $p<0.05$), che evidenzia come nei maschi il livello sia più alto che nelle femmine in genere, con un effetto opposto se vi guardano maschi e femmine Ko rispetto ai controlli: nelle femmine le KO hanno livelli di colesterolo inferiore alle controllo, mentre nei maschi i KO hanno meno colesterolo rispetto ai controlli. Se andiamo poi a scomporre il colesterolo nelle sue due forme, HDL e LDL, si rileva un forte effetto in entrambi della variabile sesso ($F_{(1,76)}=79,16$, $p<0.0001$ e $F_{(1,77)}=12,41$, $p<0.001$ rispettivamente). Inoltre, per quanto riguarda i livelli di HDL, si nota un'interazione fra sesso e genotipo ($F_{(1,76)}=5,04$, $p<0.05$), con i Ko che hanno livelli più alti rispetto ai controlli nei maschi ma non nelle femmine, mentre per l' LDL, c'è un effetto significativo del tipo di adozione ($F_{(2,77)}=13,00$, $p<0.0001$) che mostra come gli allevati da CD1, senza distinzione di sesso, abbiano livelli di LDL più alti. Anche nell' analisi dei livelli ematici di trigliceridi, si nota un effetto significativo del sesso ($F_{(1,78)}=23,05$, $p<0.0001$), dell' adozione ($F_{(2,78)}=17,52$, $p<0.0001$) e di interazione fra sesso e adozione ($F_{(2,77)}=4,03$, $p<0.05$), da cui si evince rispettivamente che: in generale i maschi hanno livelli più alti delle femmine, gli animali allevati da CD1 più alti di C57 e FVB e che la differenza fra maschi e femmine è minima negli allevati da madri C57, media negli allevati da CD1, e massima negli allevati da madri FVB. Visto il forte effetto del sesso ho deciso di compiere ulteriori analisi separate per maschi e femmine.

Maschi

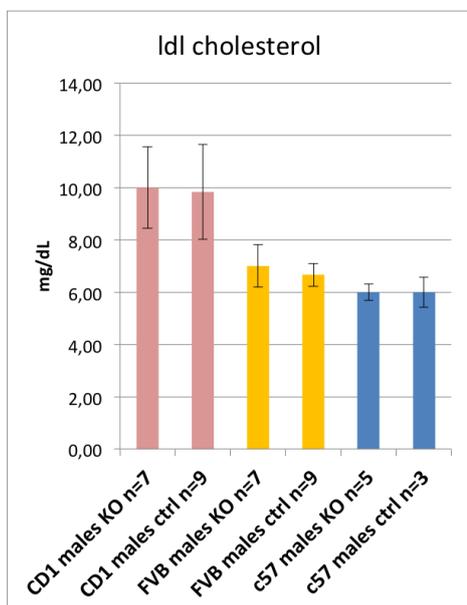
L' analisi della varianza a 3 fattori (genotipo, fenotipo e adozione) sul profilo ematico dei maschi non ha rilevato differenze statisticamente significative per quanto riguarda la quantità totale di colesterolo, mentre evidenzia un effetto del genotipo per quanto riguarda i livelli di colesterolo HDL ($F_{(1,35)}=4,27$, $p<0.05$), con i maschi KO che hanno livelli più alti dei controlli. Un fenomeno particolarmente rilevante per quanto riguarda il colesterolo LDL è una massiccia influenza della variabile fenotipo, che interagisce sia in interazione con il genotipo ($F_{(1,36)}=4,04$, $p=0.05$), che con genotipo e adozione ($F_{(2,36)}=3,37$, $p<0.05$), rivelando rispettivamente come le differenze fra KO e controlli siano esattamente opposte fra maschi agouti e maschi black (dati non mostrati), e come l' andamento di KO e controlli sia in realtà altamente influenzato anche dalla variabile fenotipo, oltre che dal tipo di adozione. Per quanto riguarda i trigliceridi, si rileva un effetto significativo del tipo di adozione ($F_{(2,37)}=12,02$, $p<0.0001$), che ci mostra come gli animali allevati da CD1 abbiano in genere livelli più alti, nonché un effetto di interazione fra genotipo e fenotipo ($F_{(1,37)}=4,62$, $p<0.05$) che rivela anche in questo caso un andamento opposto dei livelli di controlli e KO in base al fenotipo, e di interazione fra genotipo, fenotipo e adozione ($F_{(2,37)}=3,20$, $p=0.05$), che conferma l'andamento visto nel colesterolo LDL.



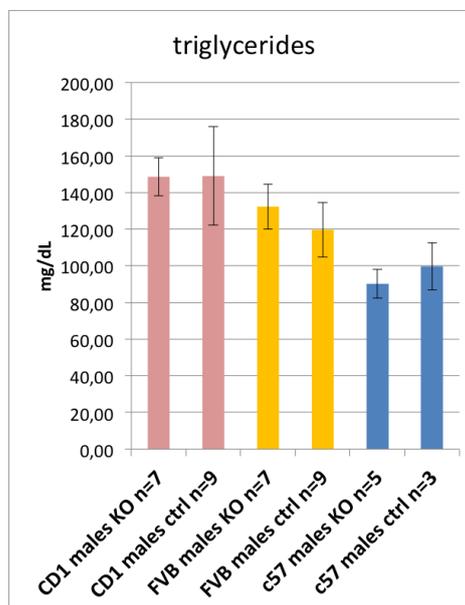
(a) Livelli di colesterolo totale nei maschi



(b) Livelli di colesterolo HDL nei maschi; si rileva solo una tendenza alla significatività nella differenza fra KO e controlli negli allevati da C57 ($p=0,06$)



(c) Livelli di colesterolo LDL nei maschi

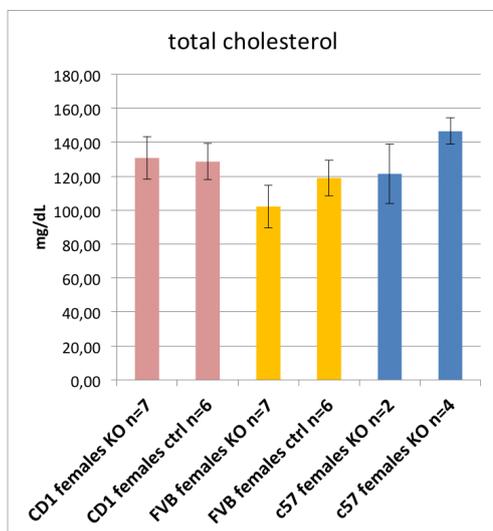


(d) Livelli di trigliceridi nei maschi

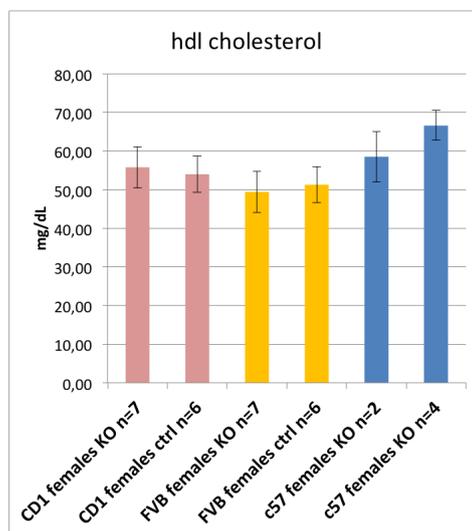
Figura 4.16: Profilo ematico dei maschi di tutte le adozioni

Femmine

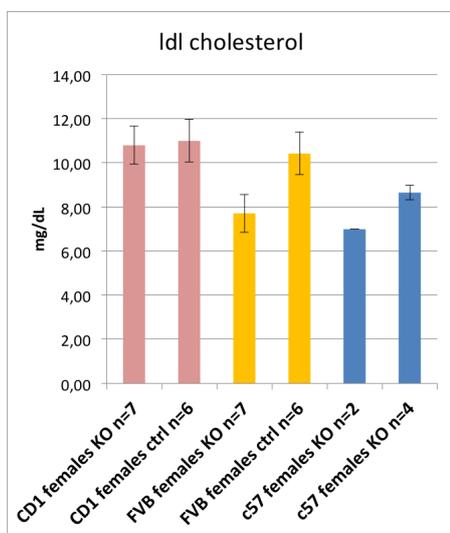
L'analisi della varianza a 3 fattori (genotipo, fenotipo e adozione) sul profilo ematico delle femmine rivela un effetto significativo del genotipo per quanto riguarda i livelli di colesterolo totale ($F_{(1,35)}=5,52$, $p<0.05$), con le femmine KO che hanno livelli più bassi rispetto alle controllo; ad una successiva analisi mediante post-hoc questa differenza è significativa esclusivamente nelle C57 ($p<0.05$). Andando a vedere nel dettaglio le due forme, troviamo che sia per l' HDL che per l' LDL c'è un effetto significativo del tipo di adozione ($F_{(2,35)}=4,62$, $p<0.05$), da cui si vede come le femmine C57 abbiamo livelli più alti di HDL rispetto alle CD1 e alle FVB, mentre per quanto riguarda l' LDL come siano le femmine CD1 ad avere valori più alti rispetto alle C57 ed FVB (foster: $F_{(2,35)}=4,76$, $p<0.05$); una analisi più dettagliata mediante post-hoc mostra come in realtà sia presente una differenza nei livelli di LDL fra KO e controlli, ma solo negli FVB ($p<0.05$) e C57, anche se per questi ultimi l' esiguità del campione fa sì che questa differenza non raggiunga la significatività. Troviamo l' effetto del tipo di adozione anche per quanto riguarda i livelli di trigliceridi ($F_{(2,35)}=19,55$, $p<0.05$), con le femmine CD1 che hanno valori più alti rispetto alle C57 ed FVB, ma troviamo anche un effetto significativo di interazione fra adozione e genotipo, che ci mostra come nelle CD1 sia il genotipo KO ad innalzare le medie dei valori di trigliceridi, che solo in questo ceppo adottivo di femmine è significativamente più elevato rispetto alle controllo ($p< 0.01$).



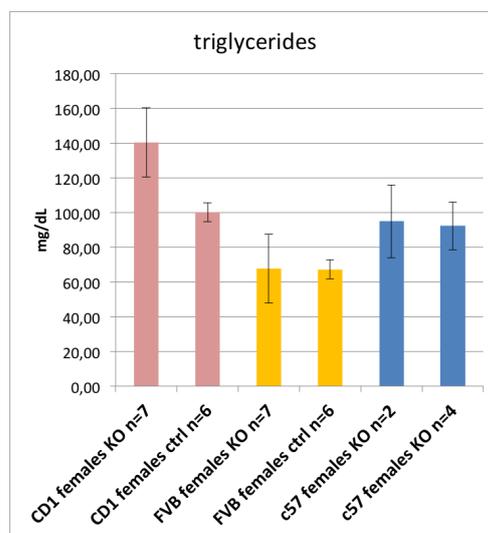
(a) Livelli di colesterolo totale nelle femmine; si nota un effetto significativo fra le femmine KO e controllo allevate da C57 ($p < 0.05$)



(b) Livelli di colesterolo HDL nelle femmine



(c) Livelli di colesterolo LDL nelle femmine; si nota una differenza nei livelli fra femmine KO e controllo, ma non in quelle allevate da madri CD1



(d) Livelli di trigliceridi nelle femmine; al contrario, qui possiamo notare che è solo nelle femmine allevate da CD1 che esiste una differenza fra femmine KO e controllo ($p < 0.01$)

Figura 4.17: Profilo ematico delle femmine di tutte le adozioni

4.3 Confronto fra effetti dieta ricca in grassi e dieta standard

Oltre all' esperimento di vulnerabilità alla dieta ricca in grassi che abbiamo appena visto, ho condotto anche un esperimento analogo analizzando contemporaneamente due gruppi di animali, uno in dieta standard (STD) e l'altro in dieta ricca in grassi (HFD). Al fine di misurare con più esattezza la quantità di cibo consumata, abbiamo triturato entrambe le diete, ed utilizzato delle gabbie speciali provviste di mangiatoie esterne, così da non perdere quella parte di cibo che gli animali normalmente sbriciolano. Contemporaneamente è stata anche monitorata l'attività locomotoria degli animali mediante un sistema automatizzato di sensori ad infrarosso.

4.3.1 Materiali e metodi

Monitoraggio del peso corporeo

I soggetti sperimentali erano: 33 femmine (17 KO e 16 controlli) e 34 maschi (17 KO e 17 controlli), tutti allevati da madri CD1; gli animali sono stati inizialmente mantenuti in gruppi unisessuali di 2-4 topi per gabbia di plexiglass (42 cm x 26.5 cm x 15 cm) con cibo in pellet standard (STD, 4RF21, Mucedola, Italia) con un apporto calorico di 3,9 Kcal/gr di cui il 6,5% derivante da grassi. La temperatura della stanza sperimentale è stata mantenuta intorno ai $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ e l'illuminazione è stata regolata con un ciclo di luce-buio di 12 ore, con luce dalle 11:00 alle 23:00. Tutti gli animali sono stati pesati una volta alla settimana dallo svezzamento (PND 27) fino a PND 97 per ottenere una curva di crescita corporea tramite una bilancia digitale (Bilancia KERN AND SOHN GMBH, Germany). A PND 104 gli animali sono stati isolati in gabbie di plexiglass (42 cm x 26.5 cm x 15 cm), con cibo in pellet ed acqua ad libitum per 21 giorni per permettere la valutazione individuale della quantità di cibo ingerita e dell'attività locomotoria spontanea in relazione alla crescita corporea.

Procedure per la misura dell'attività locomotoria

Durante il periodo di isolamento ho registrato quotidianamente l'attività locomotoria di tutti gli animali sperimentali mediante l'utilizzo di un sistema di sensori ad infrarosso (Actimeter, TECHNO SMART, Roma) posti al di sopra di ciascuna gabbia. L'attività locomotoria è stata monitorata, sia durante la fase di luce (con una interruzione al mattino, dalle ore 9:00 fino alle ore 12:00, per lo svolgimento delle quotidiane misure sperimentali) sia in quella di buio per la durata dell'intero periodo.

Effetti dell'esposizione a diete sfarinate con diverso apporto calorico sulla crescita corporea

Ho valutato il comportamento alimentare di base e/o in presenza di diete specifiche. Somministrando dieta grassa (HFD), si è voluta analizzare la vulnerabilità a sviluppo di obesità indotta da dieta ad aumentato apporto calorico. A PND 125 gli



Figura 4.18: Gabbie speciali con mangiatoie esterne

animali vengono posti individualmente in gabbie di plexiglass (42 cm x 26.5 cm x 15 cm) fornite di due mangiatoie di policarbonato in cui veniva posto il cibo in polvere. Queste mangiatoie consentono la misurazione precisa del cibo consumato. La polvere è stata preferita al pellet perché consente una migliore misura della quantità giornaliera assunta dal topo. I soggetti sperimentali erano: 33 femmine (17 KO e 16 controlli) e 33 maschi (16 KO e 17 controlli) sottoposti ad una fase di abitudine al cibo in polvere standard (STD, 4RF21 6,5% di grassi) per 5 giorni, chiamato periodo basale. Il giorno dopo la fine del basale, metà degli animali è stato assegnato alla dieta ad alto apporto calorico (HFD, 45% Kcal di grasso e 5.2% Kcal/g, Mucedola, Milano). In tale dieta è stata modificata la formula della dieta standard 4RF21 di Mucedola. I restanti soggetti sperimentali hanno continuato ad assumere dieta STD in polvere. Di conseguenza le categorie sperimentali erano le seguenti: 9 controlli maschi alimentati con HFD, 8 controlli femmine con HFD, 8 KO maschi con HFD, 8 KO femmine con HFD, 8 controlli maschi con STD, 8 controlli femmine con STD, 8 KO maschi con STD e 9 KO femmine con STD. Per motivi sperimentali, l'esposizione alle due diverse diete è stata diversa in maschi e femmine. I maschi sono stati esposti a dieta grassa per 6 settimane, mentre le femmine per 5 settimane. Quantità di cibo giornaliero consumato e peso corporeo sono stati monitorati sempre allo stesso orario per evitare stress nei soggetti sperimentali. Il peso veniva misurato ogni due giorni. Inoltre, le gabbie erano collegate ad un sistema automatico di monitoraggio dell'attività locomotoria come descritto nella sezione precedente.

Il test di tolleranza al glucosio (GTT) è stato effettuato in seguito ad una notte di digiuno (12 h). I livelli ematici di glucosio sono stati monitorati a 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 120 (T120) minuti dopo iniezione intraperitoneale di 0.1cc/10gr peso corporeo di D-glucosio al 10%, tramite il sangue fuoriuscito da un taglietto effettuato sulla coda. Tutte le misurazioni di glucosio ematico sono state fatte utilizzando il glucometro Accucheck Aviva (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Prelievo e peso del tessuto adiposo bianco (WAT) perigonadico

Al termine delle procedure sperimentali gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati chirurgicamente gli organi: tessuto adiposo, fegato, pancreas, cervello. In particolare tra le masse grasse viscerali prelevate, riveste particolare importanza il tessuto adiposo bianco (WAT) perigonadico del quale, per ogni topo sperimentale, è stato rilevato il peso mediante bilancia di precisione.

Analisi statistica

I dati su peso corporeo e quantità giornaliera di cibo ingerito sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute a tre fattori: genotipo (controlli, KO), sesso (maschi, femmine) e giorni. Nell'esperimento sull'effetto delle diete, i dati su peso corporeo e quantità giornaliera di cibo ingerito sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a 4 fattori: genotipo (controlli, KO), sesso (maschi, femmine), dieta (STD, HFD) e giorni. I dati su livelli di glicemia in seguito alla somministrazione di glucosio per via peritoneale sono stati analizzati tramite ANOVA a 3 fattori: genotipo (controlli, KO), sesso (maschi, femmine) e dieta (STD, HFD). Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Tukey per i confronti binari.

4.3.2 Risultati

L'analisi della varianza a tre fattori (sesso, genotipo e giorni) condotta sui pesi corporei misurati da PND 104 a PND 124 ha evidenziato che controlli e KO tendevano a presentare curve di crescita differenti (effetto d'interazione tra giorni e genotipo: $F_{(10,630)}=1,74$, $p<0.10$), per cui i KO partivano da livelli più bassi all'inizio dell'isolamento rispetto ai controlli per poi arrivare ai livelli dei controlli col passare dei giorni (fig. 4.19). Come previsto, lo stesso tipo di ANOVA ha evidenziato che i maschi pesavano in modo altamente significativo più delle femmine (sesso: $F_{(1,63)}=136,62$, $p<0,0001$) e che maschi e femmine presentavano curve di crescita significativamente differenti (interazione tra giorni e sesso: $F_{(10,630)}=3,52$, $p<0,0001$), per cui i maschi durante il periodo considerato sono aumentati di peso più velocemente delle femmine indipendentemente dal genotipo.

Dato che l'ANOVA a tre fattori ha evidenziato che il fattore sesso e la sua interazione con i giorni hanno un effetto significativo sul peso, ho condotto un'ANOVA a due fattori separata per maschi e femmine. L'ANOVA a due fattori (genotipo, giorni) nei maschi come nelle femmine ha evidenziato che i pesi non sono influenzati dal genotipo durante la prima fase di isolamento, ma che nello stesso periodo sia i maschi che le femmine sono aumentati di peso in modo altamente significativo indipendentemente da genotipo (effetto principale dei giorni: $F_{(10,330)}=34,59$, $p<0.0001$ sia per i maschi che per le femmine, fig. 4.19). Per quanto riguarda il comportamento alimentare, ovvero la quantità giornaliera di cibo assunto durante l'isolamento, ho condotto una ANOVA a tre vie per misure ripetute (sesso, genotipo e giorni). Ho osservato una interazione significativa giorni per genotipo ($F_{(20,1260)}=1,69$, $p<0.02$) secondo la quale i KO mangiavano all'inizio più dei controlli indipendentemente dal

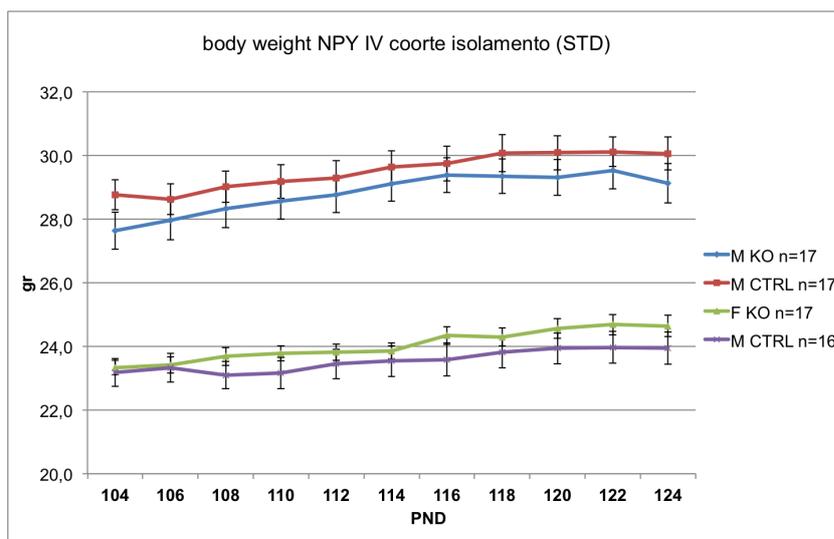


Figura 4.19: Peso dei topi KO e controlli durante il periodo di isolamento

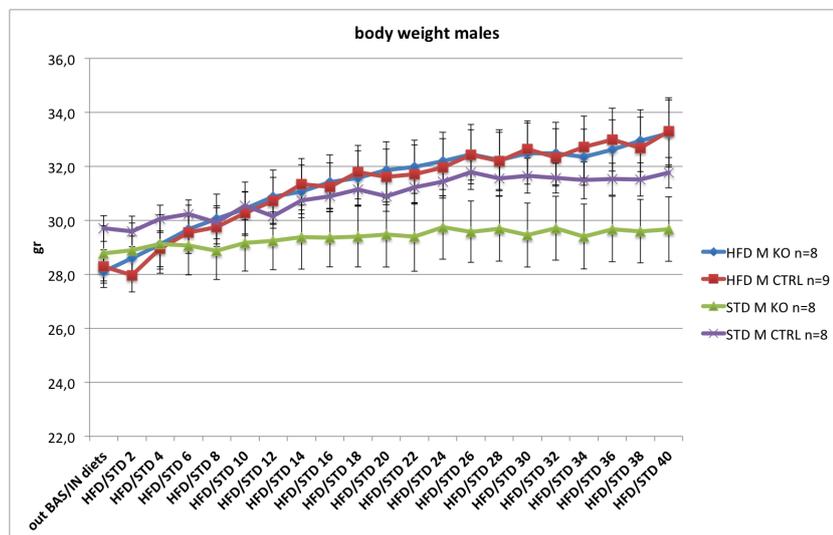
sesso e poi col passare dei giorni si uniformavano ai controlli perché questi ultimi tendevano a mangiare di più. In seguito ho condotto un'ANOVA separata per maschi e femmine dato l'effetto significativo del fattore sesso e della sua interazione con i giorni (rispettivamente, $F_{(1,63)}=7,75$, $p<0.01$; $F_{(1,1260)}=2,72$, $p<0.0001$), per cui i maschi mangiavano di più e con andamento più costante nel tempo rispetto alle femmine. Nei soli maschi, ho osservato una interazione significativa fra giorni e genotipo ($F_{(20,640)} = 1,57$ $p = 0.05$) secondo la quale i KO mangiavano di più dei controlli all'inizio dell'isolamento, mentre si uniformavano ai controlli verso la fine del periodo di osservazione dato che quest'ultimi aumentavano quantità giornaliera di cibo assunto. La quantità giornaliera di cibo assunto delle femmine non è stato influenzato dal genotipo.

Effetti del genotipo su crescita corporea e comportamento alimentare in seguito ad esposizione a diete con diverso apporto calorico

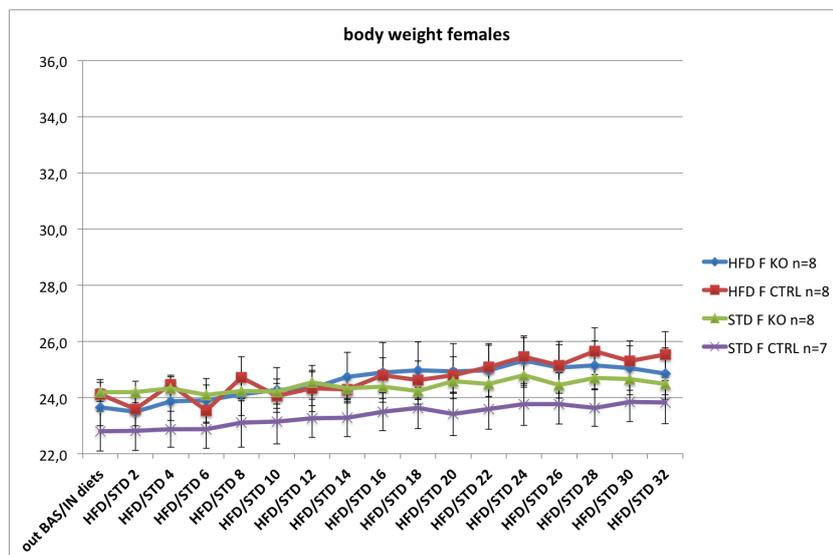
Ho analizzato i dati sul peso corporeo dell'esperimento sulle diete mediante un'ANOVA separata per maschi e femmine dato che maschi e femmine pesavano diversamente e che per motivi sperimentali le femmine hanno tre misure sul peso corporeo in meno rispetto ai maschi; i risultati sono mostrati in figura 4.20.

Ho condotto un'ANOVA a tre fattori (genotipo, dieta e giorni) sui soli maschi, come previsto, dopo un iniziale calo ponderale dovuto al passaggio da una dieta in pellet (maggiormente gradita) ad una in polvere, i topi sono aumentati significativamente di peso (giorni, $F_{(24,696)}=60.94$ $p<0.0001$). Inoltre ho osservato un aumento ponderale più marcato nei soggetti sottoposti a dieta grassa rispetto a quelli sottoposti a dieta standard (interazione tra giorni e dieta, $F_{(24,696)}=14,84$ $p<0.0001$). Ho potuto anche constatare un'interazione significativa tra giorni per genotipo per dieta: i soggetti KO alimentati con dieta grassa presentavano un aumento ponderale significativamente maggiore rispetto ai topi controllo alimentati con la stessa dieta ($F_{(24,696)}=1,58$ $p<0.05$), mentre quando alimentati con STD pesavano di meno dei

4.3. CONFRONTO FRA EFFETTI DIETA RICCA IN GRASSI E DIETA STANDARD



(a) Crescita ponderale nei topi transgenici maschi durante il periodo di esposizione a due diete con diverso apporto calorico



(b) Crescita ponderale nei topi transgenici femmine durante il periodo di esposizione a due diete con diverso apporto calorico

Figura 4.20: Confronto fra la crescita ponderale di maschi e femmine sotto dieta standard e sotto dieta ipercalorica

controlli. Mediante ANOVA sulle sole femmine, non ho osservato significatività. Sia i maschi che le femmine assegnati alle due diete avevano pesi di partenza differenti, per cui ho trasformato i dati riportandoli al peso corporeo del primo giorno di basale. Dall'ANOVA sui dati trasformati in questo modo dei soli maschi, ho osservato un'interazione altamente significativa tra giorni e dieta secondo la quale ad un iniziale aumento ponderale più marcato dei soggetti alimentati con dieta standard segue un aumento ponderale maggiore e più significativo nei soggetti alimentati con dieta grassa ($F_{(23,667)}=15,74$, $p<0.0001$), il cui grafico è visibile in figura 4.21.

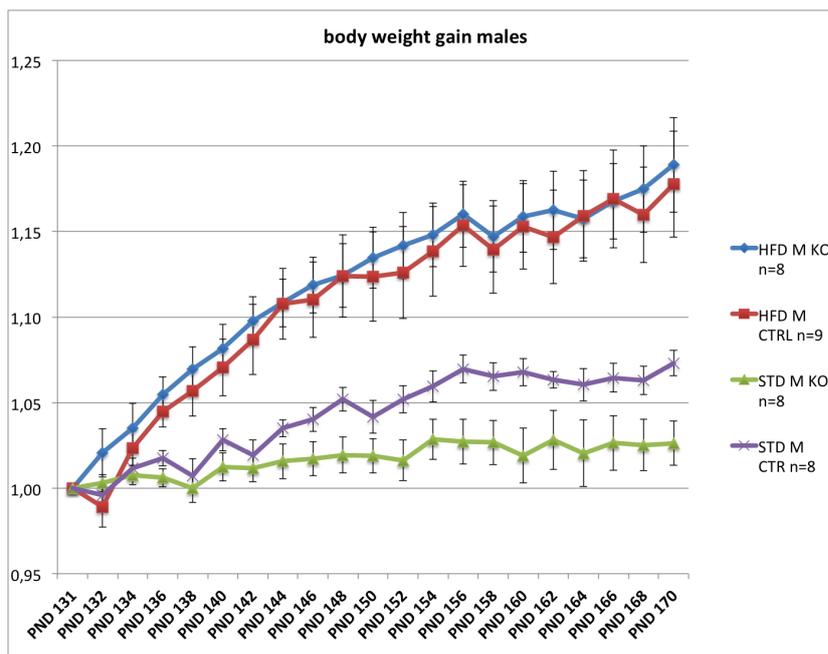


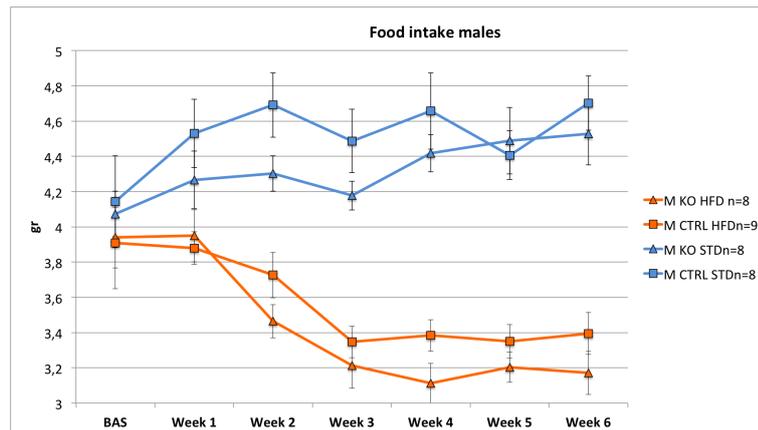
Figura 4.21: Guadagno di peso corporeo rapportato al periodo basale nei maschi; si nota un aumento ponderale maggiore nei soggetti alimentati con dieta grassa ($F_{(23,667)}=15,74$, $p<0.0001$)

Dall'ANOVA sui dati del peso corporeo rapportati al primo giorno di basale delle sole femmine, non ho osservato significatività, se non un aumento altamente significativo ponderale dovuto al passare dei giorni (effetto dei giorni, $F_{(23,667)}=67,42$ $p<0.0001$; dati non mostrati).

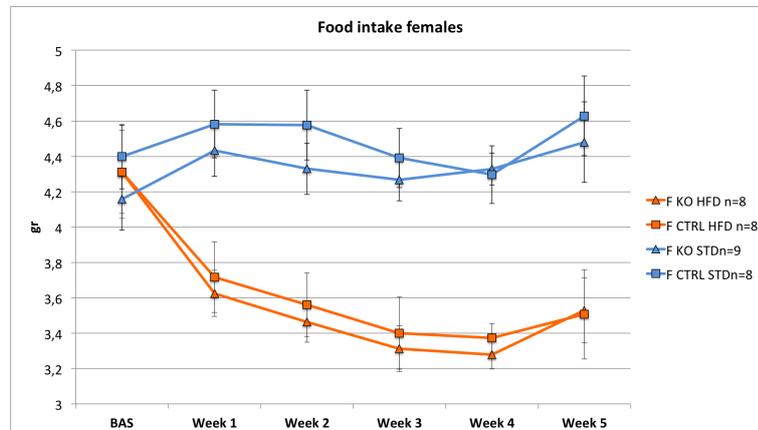
Per quanto riguarda il comportamento alimentare, ovvero la quantità giornaliera di cibo assunto durante l'isolamento, ho eseguito una ANOVA per misure ripetute a tre fattori (genotipo, dieta e giorni) sui dati dei soli maschi in base al tipo di dieta ed è emerso che esiste una interazione giorni per dieta ($F_{(49,1421)} = 6,71$ $p<0.0001$) secondo la quale tutti i topi indipendentemente da sesso e genotipo consumavano la stessa quantità di cibo durante il periodo di basale e che in seguito hanno consumato una quantità significativamente inferiore di dieta grassa rispetto alla standard (solo riferito al periodo di esposizione alle due diete (fig. 4.22), dalle quali si evidenzia, infatti, un maggior consumo di standard (meno calorica) rispetto alla HFD (più calorica) per effetto principale della dieta ($F_{(1,29)} = 60,38$ $p<0.0001$).

Il fattore giorni e la loro interazione con la dieta sono risultati significativi (rispettivamente, $F_{(49,1421)}=11,63$ $p<0.0001$; $F_{(49,1421)}=6,71$ $p<0.0001$). Questo in as-

4.3. CONFRONTO FRA EFFETTI DIETA RICCA IN GRASSI E DIETA STANDARD



(a) Comportamento alimentare nei maschi esposti a diete a diverso apporto calorico



(b) Comportamento alimentare nelle femmine esposte a diete a diverso apporto calorico

Figura 4.22: Confronto fra maschi e femmine nella quantità giornaliera di cibo consumata; si nota solamente un effetto di interazione di giorni e dieta ($F_{(49,1421)} = 6,71$ $p < 0.0001$)

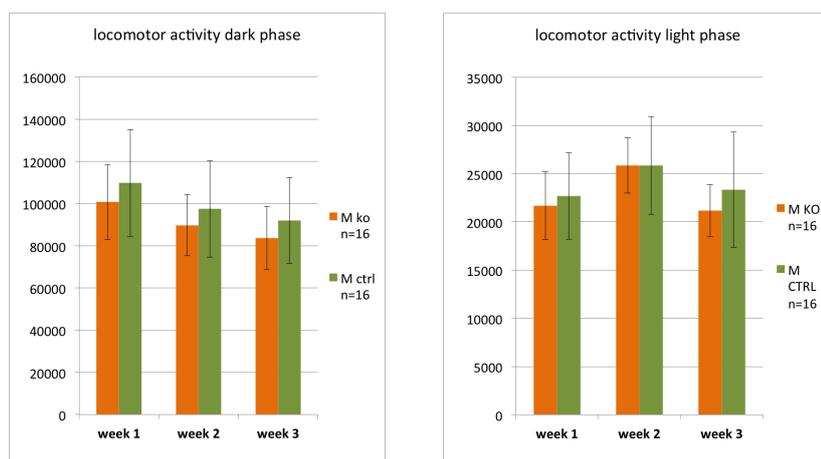
sociazione con la struttura dell'esperimento mi ha permesso di condurre ulteriori ANOVA separate sui dati del basale e del periodo di esposizione alle due diete dei soli maschi.

ANOVA sul periodo di basale non ha evidenziato significatività, se non quella dei giorni ($F_{(6,174)} = 23,106$; $p < 0.0001$) dato dal significativo aumento del consumo di cibo nei giorni conseguenza della novità ed abitazione al cibo nella nuova forma della polvere. L'ANOVA sul comportamento alimentare dei soli maschi durante il periodo di basale (quindi durante il periodo di sola dieta standard per tutti i soggetti sperimentali) non ha evidenziato significatività. L'ANOVA sui soli maschi nel periodo delle diete ha evidenziato un effetto altamente significativo della dieta ($F_{(1,29)} = 82,50$; $p < 0.0001$) in base alla quale c'è un consumo maggiore di standard rispetto alla HFD dato che HFD conferisce un maggiore apporto calorico. In generale, il consumo di cibo dei maschi cala leggermente nel tempo per poi tornare ai livelli iniziali dopo 43 giorni (due picchi verso il basso ai giorni 20 e 33 inspiegati; giorni: $F_{(42,1218)} = 6,97$; $p < 0.0001$). Nel gruppo dei maschi è da sottolineare che sorprendentemente esiste un'interazione altamente significativa tra giorni per genotipo ($F_{(42,1218)} = 1,39$; $p < 0.0001$) in base alla quale benché inizialmente i KO maschi consumassero più cibo dei controlli col passare dei giorni questi hanno mostrato un minor consumo di cibo rispetto ai controlli. Come previsto dato il differente apporto calorico, l'analisi dei dati del comportamento alimentare ha evidenziato una interazione altamente significativa tra giorni e dieta ($F_{(42,1218)} = 7,42$; $p < 0.0001$) in base alla quale si ha la dimostrazione che gli animali hanno cominciato a mangiare significativamente e costantemente meno cibo grasso nel periodo considerato rispetto alla dieta standard. Ho condotto, poi, un'ANOVA separata per diete sul comportamento alimentare dei soli maschi nel periodo di esposizione alle due diete, dato che l'effetto della dieta e la sua interazione con i giorni risultavano significative (rispettivamente, $F_{(1,29)} = 60,38$, $p < 0.0001$; $F_{(49,1421)} = 6,71$, $p < 0.0001$): i maschi esposti a HFD in generale mangiavano di meno rispetto ai maschi nutriti con dieta standard, in particolare i maschi ad HFD hanno cominciato a mangiare di meno dopo il periodo di basale.

L'ANOVA sui dati dei soli maschi esposti a dieta HFD ha evidenziato una interazione significativa tra giorni e genotipo ($F_{(42,630)} = 1,50$, $p = 0.02$) per cui i topi maschi KO presentano un calo più marcato nel consumo di cibo HFD nel tempo di osservazione rispetto ai controlli. Come previsto, la dieta STD non ha prodotto differenze significative nella quantità giornaliera di cibo assunto dai maschi KO e controlli. Ho condotto lo stesso tipo di analisi sui dati delle femmine. L'ANOVA a tre vie per il comportamento alimentare nelle femmine (giorni, genotipo e dieta) per tutto il periodo ha rivelato una interazione altamente significativa dei giorni per dieta ($F_{(40,160)} = 5,53$, $p < 0,0001$) ed un effetto significativo della dieta ($F_{(1,29)} = 23,25$, $p < 0,0001$) coerentemente con quanto già osservato nei maschi. Tali significatività hanno consentito così un'analisi separata in base alle diete. Queste ulteriori ANOVA separate in base alla dieta sui dati del comportamento alimentare degli femmine non hanno rivelato effetti significativi del genotipo.

Attività locomotoria

L'ANOVA sui dati ottenuti dall' apparato di sensori per il rilevamento dell' attività locomotoria non ha riscontrato alcuna differenza significativa nell'attività locomotoria tra maschi KO e maschi controlli, né durante il periodo di isolamento in dieta standard, né durante il periodo di esposizione alle diete. Le figure 4.23 e 4.24 si riferiscono solo ai maschi.



(a) Confronto fra l'attività locomotoria dei maschi KO e quella dei controlli durante l'isolamento in dieta standard, fase di buio

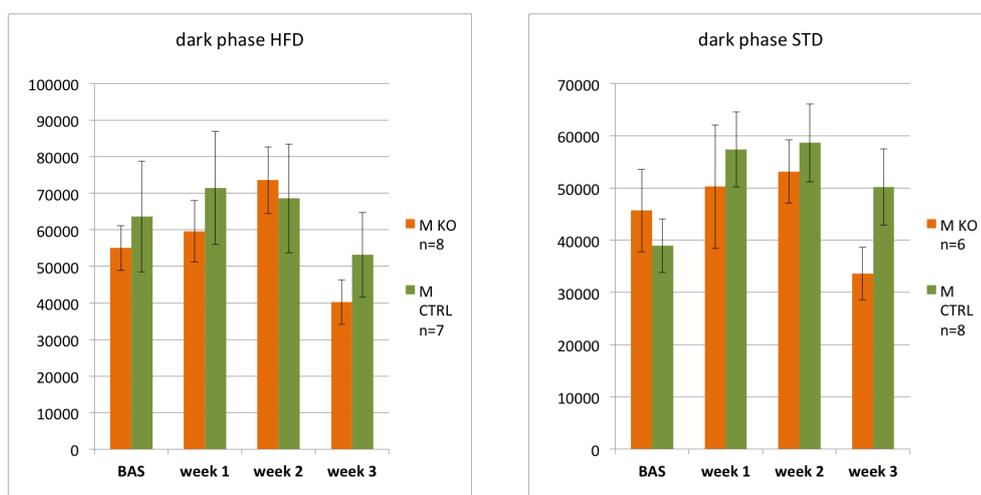
(b) Confronto, nei soli maschi, fra l'attività locomotoria dei KO e quella dei controlli durante l'isolamento in dieta standard, fase di luce

Figura 4.23: Confronto fra attività locomotoria basale di maschi KO e controlli

Test di tolleranza al glucosio (GTT)

Per analizzare i dati riguardanti i livelli di glicemia nei topi transgenici in seguito ad una iniezione intraperitoneale di glucosio, ho condotto una ANOVA a 4 vie (sesso, genotipo, dieta e tempi) dalla quale è risultato un effetto significativo d'interazione tra dieta e genotipo ($F_{(1,58)}=3,91$; $p=0.05$), come mostrato in figura 4.25. Secondo tale interazione, i topi controllo alimentati con HFD avevano una glicemia simile ai topi controllo alimentati con dieta STD, mentre è stato interessante constatare che fra i topi KO la glicemia risulta marcatamente più elevata nei soggetti alimentati con HFD rispetto a quelli alimentati con dieta STD. Inoltre, la glicemia è stata ovviamente influenzata dalla dieta in modo altamente significativo ($F_{(1,58)} = 6,92$; $p=0.01$): i soggetti alimentati con HFD avevano livelli più alti di glicemia e dal sesso ($F_{(1,58)} = 125,15$ $p<0.0001$) in quanto i maschi avevano livelli più alti di glicemia. Inoltre è da evidenziare un'interessante interazione tempi per sesso che ha evidenziato una glicemia significativamente più alta nei maschi rispetto alle femmine in seguito alla somministrazione di glucosio pur partendo da livelli simili di glicemia ($F_{(3,174)}=50,21$; $p<0.0001$).

Dato l'effetto significativo del sesso e della sua interazione con il tempo, ho deciso di esaminare più approfonditamente i dati sul GTT conducendo una ANOVA separata per i maschi e femmine. Per quanto riguarda i maschi, ANOVA ha effettiva-



(a) Confronto fra l'attività locomotoria dei maschi KO e quella dei controlli sottoposti a dieta ipercalorica

(b) Confronto fra l'attività locomotoria dei maschi KO e quella dei controlli sottoposti a dieta standard

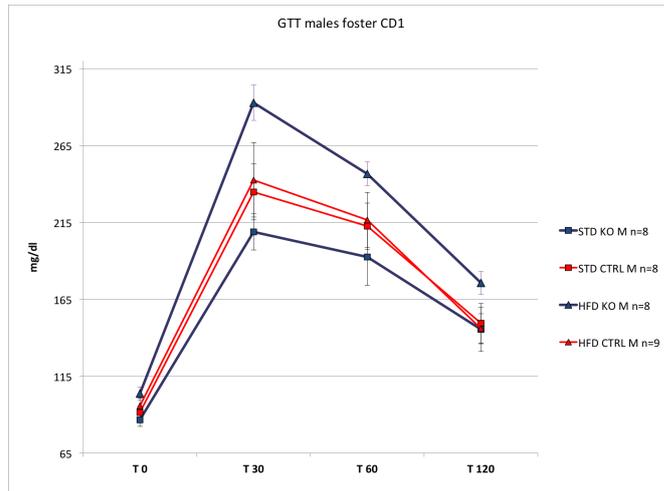
Figura 4.24: Confronto fra attività locomotoria durante la fase di buio

mente evidenziato un'interazione altamente significativa della dieta per il genotipo ($F_{(3,87)}=1,98$; $p=0.01$) in base alla quale, i maschi controllo alimentati con STD e HFD non differivano nei livelli di glicemia in seguito alla somministrazione di glucosio, mentre è da notare, nell'ambito dei KO, che la glicemia è più elevata nei topi alimentati con HFD rispetto a quelli alimentati con dieta STD. Ho poi deciso di condurre due ulteriori ANOVA separate in base alla dieta sui dati dei maschi. L'ANOVA condotta sui soli maschi alimentati con dieta STD, non ha evidenziato particolari significatività, se non un semplice aumento della glicemia seguito da un calo dovuto al passare del tempo ($F_{(3,42)} = 95,96$ $p<0.0001$). Mentre, l'ANOVA condotta sui soli maschi esposti a dieta HFD ha evidenziato un effetto significativo del genotipo nell'aumento della glicemia nei topi KO rispetto ai controlli ($F_{(1,15)}=4,48$; $p=0.05$). L'ANOVA condotta sulle sole femmine ha, inoltre, evidenziato un'interazione altamente significativa tra l'andamento della glicemia e il tempo trascorso ($F_{(3,87)} = 89,93$ $p<0.0001$) per effetto della somministrazione di glucosio i livelli di glicemia sono aumentati e poi diminuiti in funzione del tempo trascorso.

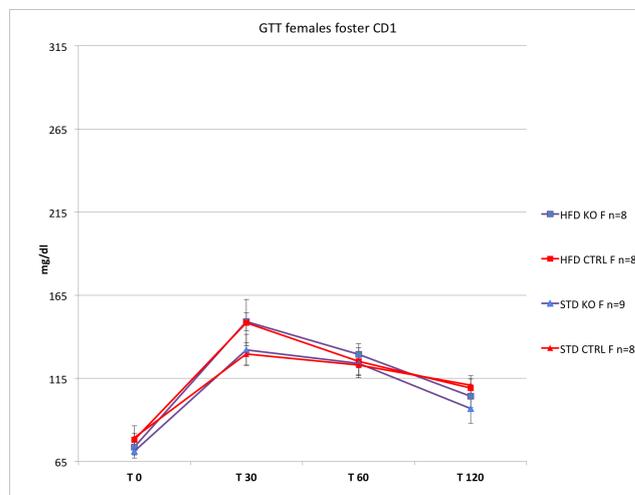
Effetto del genotipo sul peso del grasso perigonadico

I dati sul peso del grasso perigonadico negli animali transgenici esposti a due diete con diverso apporto calorico sono mostrati in figura 4.26. Ho condotto un'ANOVA a tre vie (dieta, sesso e genotipo) sui dati del peso del grasso bianco perigonadico prelevato da animali transgenici esposti alle due diete a diverso apporto calorico e ho rilevato un effetto significativo di dieta ($F_{(1,57)}=21,67$; $p<0,0001$) e sesso ($F_{(1,57)}=37,68$; $p<0,0001$), per cui gli animali esposti a HFD avevano un grasso bianco perigonadico significativamente più pesante degli animali nutriti con STD, così come i maschi indipendentemente dal genotipo rispetto alle femmine. Inoltre, i maschi nutriti a HFD avevano grasso bianco perigonadico più pesante rispetto ai maschi

4.3. CONFRONTO FRA EFFETTI DIETA RICCA IN GRASSI E DIETA STANDARD

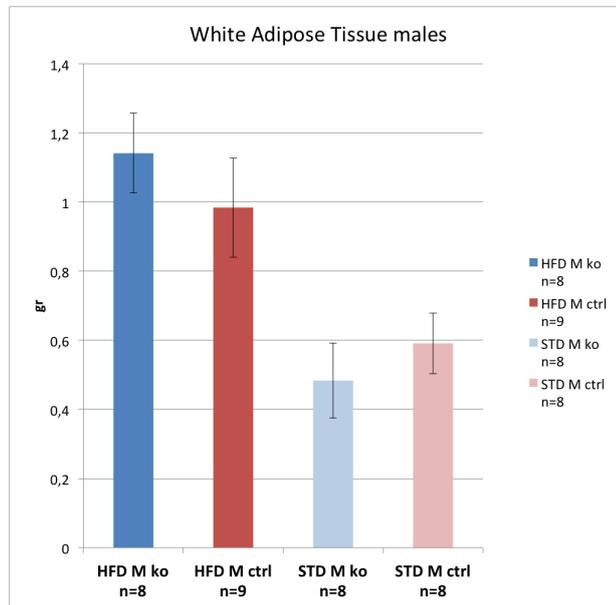


(a) Curve glicemiche nei topi transgenici maschi in seguito a somministrazione per via intraperitoneale di glucosio

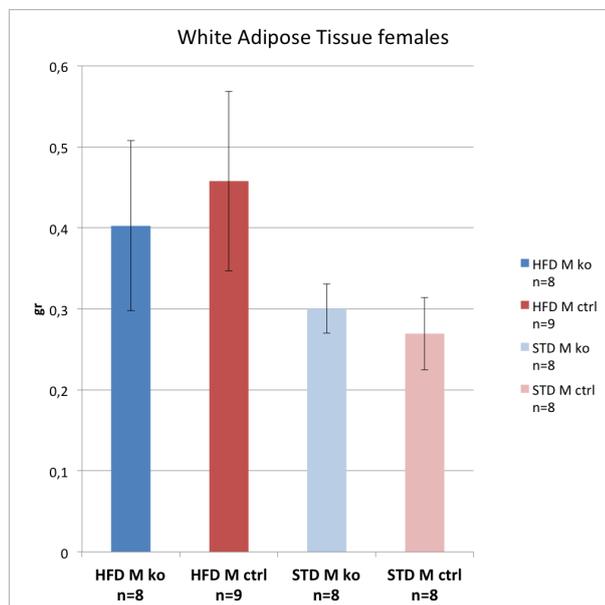


(b) Curve glicemiche nei topi transgenici femmine in seguito a somministrazione per via intraperitoneale di glucosio

Figura 4.25: Confronto fra GTT di maschi e femmine in entrambe le diete



(a) Quantità di grasso bianco nei maschi al sacrificio



(b) Quantità di grasso bianco nelle femmine al sacrificio

Figura 4.26: Confronto fra Wat al sacrificio in maschi e femmine

nutriti con STD, mentre non vi erano differenze tra le femmine nutrite con le due diete (interazione tra dieta e sesso: $F_{(1,57)}=6,95$; $p=0,01$).

Dato che il sesso aveva un effetto principale significativo e partecipava ad un'interazione significativa con la dieta nell'influenzare il peso del grasso, ho condotto due ulteriori ANOVA separate per maschi e femmine. Il grasso era significativamente più pesante nei maschi alimentati ad HFD che in quelli con STD (dieta: $F_{(1,29)}=19,75$; $p=0,0001$). Benché non vi sia un effetto significativo d'interazione tra genotipo e dieta, tramite l'analisi dei post hoc condotta con il test di Tukey, ho riscontrato che i maschi KO nutriti con HFD avevano significativamente grasso bianco più pesante dei KO maschi nutriti con STD ($p<0,005$). Nelle femmine, l'effetto della dieta tendeva alla significatività nell'influenzare il peso del grasso, per cui le femmine esposte ad HFD avevano un grasso che tendeva a pesare di più rispetto alle femmine alimentate con STD (dieta: $F_{(1,29)}=3,22$; $p<0,10$).

4.3.3 Discussione

In questo capitolo ho passato in rassegna prove e paradigmi sperimentali volti ad indagare il fenotipo metabolico del modello animale $NPY1R^{rfb}$, alla ricerca sia di una differenza fra animali KO e controlli, ma anche dell'interazione fra questa variabile genetica e l'ambiente postnatale precoce (stile di cura materna).

Dall'analisi delle curve di crescita corporea si è notato innanzitutto come le curve di crescita degli animali allevati da madri del ceppo CD1 siano diverse da quelle degli animali allevati da madri FVB e C57, coerentemente con la quantità di latte maggiore a disposizione delle cucciolate allevate da questo ceppo di madri; si nota infatti un maggiore peso alle svezzamento maggiore e di conseguenza curve di crescita meno ripide fino al raggiungimento dell'età adulta a 90 giorni di età. L'altro dato evidente è la flessione, in tutti i ceppi di adozione, della curva di crescita dei maschi KO rispetto ai controlli a partire dal 40° giorno di età, fenomeno evidente maggiormente nelle adozioni FVB e C57; questo fenomeno è meno netto nelle femmine, dove addirittura le KO possono pesare di più (adozione CD1), uguale (adozione FVB) o meno (adozione C57) delle controllo.

Un dato completamente inaspettato e che suscita particolare interesse per l'azione che il recettore Y1R svolge nel nucleo arcuato dell'ipotalamo (fig. 2.4) è la differenza nel peso corporeo dovuta al fenotipo degli animali $NPY1R^{rfb}$, variabile che interagisce con il sesso ed il genotipo in modo significativo. Per quanto riguarda i maschi questa interazione è significativa solo negli allevati da madri CD1, dove il fenotipo agouti sembra rafforzare la differenza di peso fra KO e controlli, mentre nelle femmine il fenomeno è ancora più complesso, con le femmine allevate da CD1 che mostrano un fenomeno speculare a quello dei loro fratelli: il fenotipo agouti rafforza anche qui le differenze fra le KO e le controllo, ma con le prime che pesano sempre di più delle seconde, esattamente al contrario rispetto ai maschi; nelle allevate da FVB si osserva un fenomeno per cui gli effetti sul peso del fenotipo sono opposti a seconda del genotipo: nelle black le KO hanno un peso inferiore alle controllo, mentre nelle agouti hanno un peso superiore. Nelle allevate da C57 non esistono invece questo tipo di differenze, con le KO che pesano meno delle controllo sempre, indipendentemente dal colore del manto.

Variando invece la dieta, con gli esperimenti sulla esposizione ad una dieta ipercalorica, sono andato alla ricerca di marcatori di una possibile sindrome metabolica; il

dato più lampante mostrato da questi esperimenti è che, sottoposti a questo nuovo tipo di dieta, i KO di tutte le adozioni ingrassano più dei loro controlli, in un rapporto coerente con quantità di latte e cure materne ricevute: nell'ordine gli animali che aumentano di più in massa corporea sono gli allevati da CD1, seguiti dagli FVB e infine dai C57. Anche la quantità di cibo consumata è coerente con questo tipo di crescita corporea, corrispondendo una maggiore quantità di cibo ipercalorico consumato ad un maggiore aumento di massa, salvo però nelle femmine allevate da FVB, dove KO e controllo consumato la stessa quantità di cibo, ingrassando però in modo diverso. Un dato molto interessante è che, sia in maschi che femmine, solo allevati da FVB di entrambi i genotipi e soli KO allevati da CD1 sviluppano iperfagia nella prima settimana di esposizione alla nuova dieta ipercalorica.

Indagando i livelli glicemici basali non si riscontrano differenze significative fra KO e controlli, differenze che però compaiono nei maschi nei primi 30 minuti del "glucose tolerance test" dove tutti i KO raggiungono un picco glicemico più alto rispetto ai controlli, e gli allevati da FVB in genere più alti rispetto ai C57. Queste differenze non si riscontrano nelle femmine, se non una tendenza alla significatività fra allevate da FVB e C57, sempre a T30.

La quantità di grasso bianco perigonadico rilevata al momento del sacrificio rispecchia le differenze ponderali già viste nelle curve di crescita durante le tre settimane di dieta speciale, con i maschi KO che hanno più grasso rispetto ai controlli, salvo negli allevati da C57 e le femmine dove invece questa differenza è riscontrabile solo nelle allevate da CD1.

Le analisi sui campioni di plasma prelevati al sacrificio degli animali rivelano come nei maschi non vi siano sostanziali effetti del genotipo se non una tendenza in allevati FVB e C57, mentre sicuramente notiamo un effetto del tipo di adozione per quanto riguarda i livelli di colesterolo LDL e di trigliceridi. Nelle femmine invece troviamo questa stessa tendenza in LDL e trigliceridi, ma qui si evidenziano anche differenze significative fra KO e controlli, con un curioso effetto inverso: le femmine allevate da CD1 sono le uniche dove non c'è discrepanza fra i due genotipi, mentre le uniche dove c'è nei trigliceridi.

Dall'esperimento di confronto fra dieta standard e dieta ipercalorica sfarinate, il fenomeno che più salta all'occhio è senz'altro il non gradimento agli animali di questo tipo di alimentazione "non rosicchiabile", come si nota dai food intake in figura 4.22, che resta praticamente invariato in dieta standard, per addirittura decrescere con la dieta ipercalorica; questo non ha comunque impedito ai maschi in regime ipercalorico di sviluppare iperglicemia nel GTT, così come una maggiore quantità di grasso bianco perigonadico al sacrificio; un dato particolarmente utile ricavato da questo esperimento è la misurazione dell'attività locomotoria, purtroppo monitorata solamente sui maschi, per via del limitato numero di sensori ad infrarosso a nostra disposizione.

Capitolo 5

Analisi comportamento ansioso e sociale

Durante il mio Dottorato ho inoltre esaminato il fenotipo comportamentale del modello animale in relazione a stimoli ambientali e sociali, mediante test validati in letteratura per la caratterizzazione del comportamento esplorativo, emozionale e sociale nei roditori.

Come ho illustrato nel capitolo 2, NPY riveste un ruolo fondamentale nella risposta allo stress e nella regolazione del comportamento emozionale. E' stato ampiamente dimostrato che topi knock-out per NPY mostrano un fenotipo caratterizzato da tratti tipici dell'ansia (Bannon *et al.*, 2000) e che la somministrazione ICV del neuropeptide produce un potente effetto ansiolitico in diversi modelli comportamentali (Broqua *et al.*, 1995). Si è inoltre visto come un incremento dei livelli di NPY nell'amigdala sia associato a una riduzione dei comportamenti legati all'ansia nel test dell' Elevated Plus Maze (Primeaux *et al.*, 2005). NPY svolge la sua azione ansiolitica attraverso il legame col recettore Y1R (Sajdyk *et al.*, 1999). Studi a questo proposito sono prima stati condotti con approccio farmacologico, per poi passare man mano a quelli su modelli animali knock-out germinali; tuttavia, queste due modalità hanno in più occasioni mostrato risultati contrastanti. Topi KO germinali per Y1R mostrano, ad esempio, un comportamento ansioso solo in condizioni di stress particolarmente elevato e in particolari fasi del ciclo circadiano (Karl *et al.*, 2006). Si pensa che ciò sia dovuto a dei meccanismi compensatori evolutisi durante lo sviluppo di questi animali, come sembra dimostrare la scoperta di un aumento dell'espressione di mRNA per il sottotipo recettoriale Y2R a livello di ippocampo e amigdala dei KO germinali (Wittmann *et al.*, 2005). Bisogna inoltre considerare che il fenotipo di questi knock-out deriva da tutte le funzioni perse con la delezione, la quale avviene in tutte le regioni cerebrali dove il gene viene normalmente espresso. Da qui è nata la necessità di lavorare con dei knock-out condizionali, in cui la delezione del gene fosse selettivamente ridotta ad alcune zone del cervello degli animali e partisse solo in fase post-natale (Herzog, 2003). Bertocchi *et al.* (2011) hanno effettuato degli studi su knock-out condizionali per NPY1R, allevati da madri adottive di ceppo diverso. Per quanto riguarda la rilevazione dell'ansia, dal test dell' Elevated Plus Maze è risultato che i topi NPY1R^{rfb} allevati da madri FVB mostravano frequenza d'entrata e tempo speso nei bracci aperti significativamente più bassi rispetto ai controlli. Nell' Open Field sociale, gli stessi animali erano meno attivi, con maggior immobilità nel centro. Al contrario, non sono emerse differenze comportamentali significative tra topi mutanti e controlli allevati da madri C57, sia nell' Elevated Plus Maze che nell' Open Field sociale. In particolare, i topi controllo allevati da questo ceppo murino

mostravano un maggior livello d'ansia rispetto ai controlli allevati da femmine FVB.

5.1 Valutazione dei comportamenti di tipo ansioso

L' elevated plus maze (EPM) è un test comportamentale semplice ed efficace, ormai ampiamente validato per lo studio del comportamento ansioso nei roditori (Walf e Frye, 2007), che sfrutta il conflitto naturale tra la loro tendenza a esplorare nuovi ambienti e quella ad evitare, invece, aree aperte e molto illuminate e non protette (Montgomery, 1955).

Nella fattispecie abbiamo utilizzato un apparato sperimentale di Plexiglas a forma di croce, montato su un supporto di 40 cm, costituito da due bracci chiusi da pareti scure, alte 20 cm e due aperti, ognuno con dimensioni di 30 cm x 5 cm (fig. 5.1). Si creano in questo modo due ambienti, i bracci chiusi dove l'animale può stare al "riparo" e quelli aperti, dove l'animale si trova sospeso nel vuoto. L'indice di quanto tempo l'animale passa in una zona piuttosto che nell'altra, e quindi di quanto la sua naturale propensione ad esplorare un ambiente sconosciuto viene soppressa dall'ansia di esplorare le braccia sospese nel vuoto, sta ad indicare quanto un animale sia o meno ansioso.

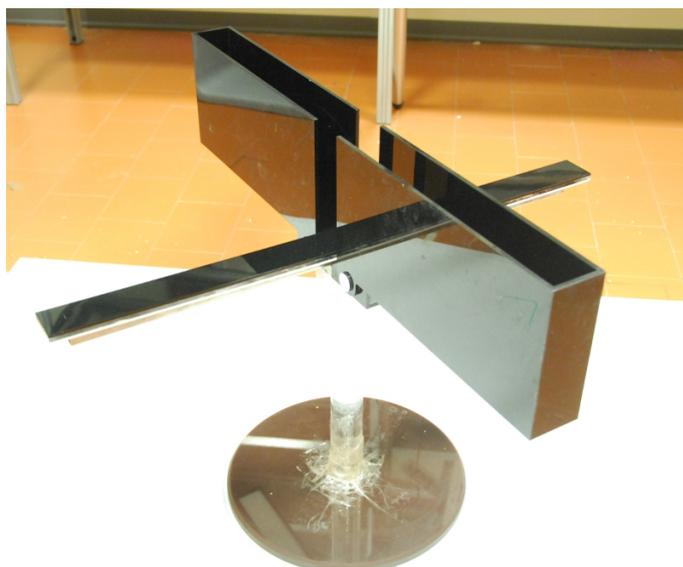


Figura 5.1: Elevated Plus Maze

Materiali e metodi

80 animali adottati da madri CD1, 32 da madri C57 ed 16 da FVB, tutti con età compresa fra 90 e 100 giorni, sono stati sottoposti al test tra le 16 e le 19, in una stanza in penombra, simulando così la fase di buio, che è quella di massima attività dei roditori. Gli animali sono stati trasportati nella stanza adibita al test

due ore prima del suo inizio, per consentire loro di adattarsi al nuovo ambiente e al diverso tipo di illuminazione, e di tranquillizzarsi dopo lo stress del trasporto. Ogni topo è stato poi, a turno, posizionato nello spazio quadrato al centro dei quattro bracci (5 cm x 5 cm), con il muso rivolto verso il braccio aperto, e gli è stato dato modo di esplorare l'ambiente circostante per un tempo totale di 5 minuti. Tra una sessione e l'altra, l'apparato è stato accuratamente pulito con acqua, alcool denaturato al 50% e quindi di nuovo acqua, per impedire che gli animali venissero influenzati dall'odore degli altri precedentemente testati e da quello dell'alcool stesso. Il comportamento e movimento di ogni topo è stato filmato con una videocamera posta su un cavalletto a circa 1,5 m dall'apparato. I video sono stati successivamente analizzati con il software "The Observer" (Noldus, Olanda), mediante il quale si è potuto conteggiare la percentuale di tempo speso nei bracci aperti e in quelli chiusi rispetto al tempo di durata totale del test, oltre alla frequenza di entrata nei due ambienti, indice anch'essoni della quantità di attività locomotoria, e quindi dell'irrequietezza dell'animale.

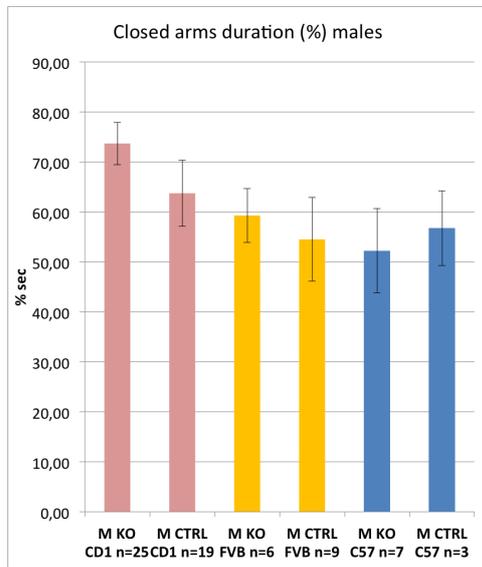
Analisi statistica

I dati delle percentuali di tempo trascorso in ogni ambiente sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a tre fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, KO) e adozione (CD1, FVB e C57). Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Duncan per i confronti binari.

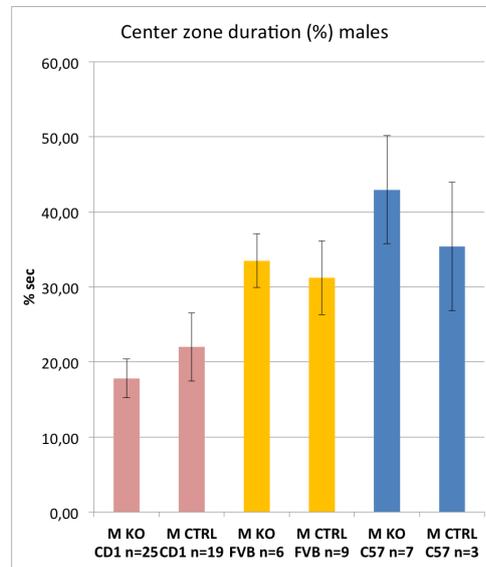
5.1.1 Risultati

Per analizzare i comportamenti nel test EPM, ho condotto un'analisi della varianza a tre fattori (sesso, genotipo, adozione) sulla percentuale di tempo trascorso in ognuno dei tre ambienti dell'apparato.

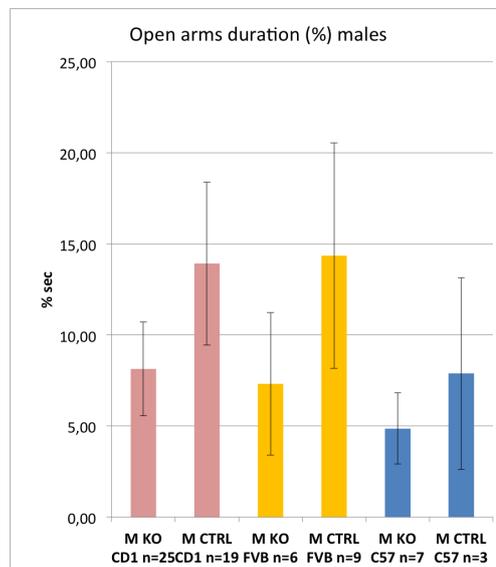
- *Closed arms:* per quanto riguarda il tempo trascorso nei bracci chiusi dell'apparato, nella zona quindi protetta, ANOVA ha individuato come fortemente significativo l'effetto dell'adozione ($F_{(2,116)}=15,35$, $p<0.0001$), con gli animali allevati da CD1 che vi trascorrono molto più tempo rispetto a FVB e C57, nonché un effetto di interazione tendente alla significatività di sesso e adozione ($F_{(2,116)}=2,48$, $p=0.08$) che, ad un'ulteriore analisi con post-hoc, rivela una quantità significativamente maggiore di tempo delle femmine CD1 rispetto alle altre femmine ($p=0.01$ verso le C57 e $p<0.0001$ verso le FVB).
- *Center zone:* per quanto riguarda il tempo trascorso nella zona centrale dell'apparato, di transizione fra gli altri due ambienti, ANOVA ha individuato come fortemente significativo l'effetto dell'adozione ($F_{(2,116)}=29,58$, $p<0.0001$), con gli animali allevati da CD1 che vi trascorrono meno tempo rispetto a FVB e C57, nonché un effetto di interazione significativo di sesso, genotipo e adozione ($F_{(2,116)}=3,29$, $p<0.05$) che mostra come ci siano differenze nell'andamento del tempo trascorso in questa zona fra maschi e femmine in base al genotipo e all'adozione, per esempio, negli adottati da C57, le femmine KO passano meno



(a) Tempo speso nei bracci chiusi dai maschi; non si rilevano effetti né di genotipo né di tipo di adozione

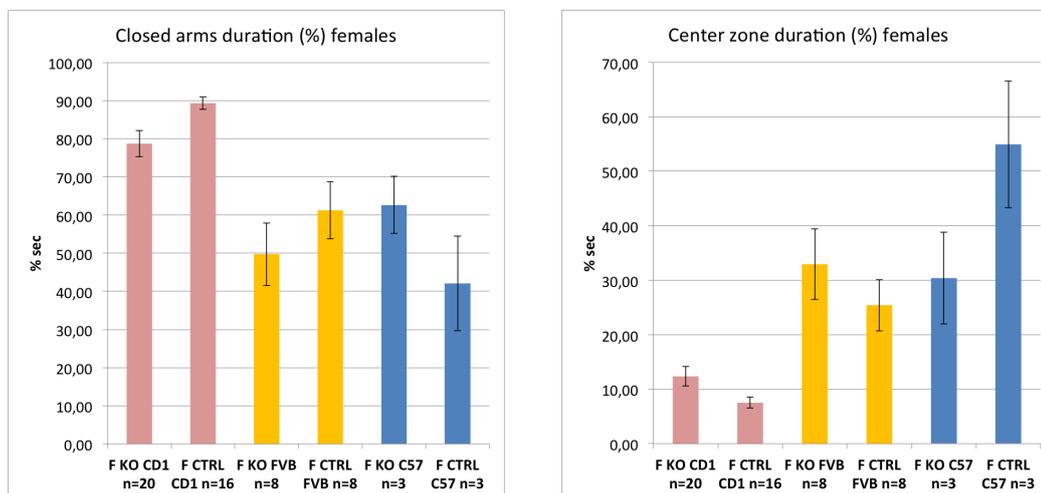


(b) Tempo speso nella zona centrale dai maschi; si rileva solo un effetto del tipo di adozione ($F_{(2,64)}=7,30$, $p<0,01$) con i maschi CD1 che trascorrono meno tempo degli altri ceppi in questa zona



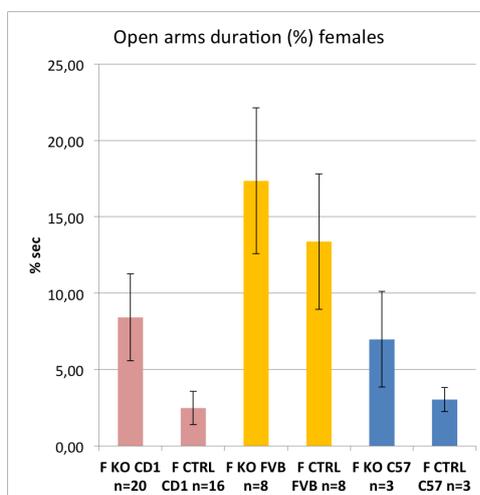
(c) Tempo speso nei bracci aperti; per quanto si noti una certa tendenza ad una minore quantità di tempo trascorso dai maschi KO nel braccio aperto, questa differenza non raggiunge la significatività statistica data l' ampia variabilità del dato

Figura 5.2: Percentuali di tempo speso dai maschi nei tre ambienti dell' EPM



(a) Tempo speso nei bracci chiusi; si nota un netto effetto del tipo di adozione ($F_{(2,52)}=23,10$; $p<0,0001$), nonché di genotipo nelle sole femmine allevate da C57 ($p<0,05$)

(b) Tempo speso nella zona centrale; esiste una differenza fra KO e controlli nelle sole allevate da C57 ($p<0,001$)



(c) Tempo speso nei bracci aperti; raggiunge la significatività solo la differenza fra tipo di adozione adozione ($F_{(2,52)}=5,14$; $p<0,001$)

Figura 5.3: Percentuali di tempo speso dalle femmine nei tre ambienti dell' EPM

tempo al centro rispetto alle controllo, a differenza di quello che succede negli altri ceppi, dove questa differenza non è significativa.

- *Open arms*: fra le percentuali di uscita nei bracci aperti, ovvero nella zona focale dell' esperimento, ANOVA individua solo una tendenza alla significatività nell'interazione fra sesso e genotipo ($F_{(1,116)}=2,73$, $p=0.10$), probabilmente per l'esiguità e la variabilità dei dati (è la zona dove gli animali trascorrono meno tempo in assoluto), dato che è però confermato dalla significatività nel numero di ingressi in questa zona per lo stesso effetto di interazione fra sesso e genotipo ($F_{(1,90)}=4,73$, $p<0.05$), dato che ci mostra come KO e controlli hanno un andamento esattamente opposto a seconda che siano maschi o femmine: nei primi, i KO escono meno rispetto ai controlli sui bracci aperti, nelle secondo, al contrario, le KO escono di più.

5.2 Valutazione evitamento/preferenza sociale

L' evitamento sociale ed il diminuito interesse di contatto sociale sono caratteristiche della depressione maggiore (Stein *et al.*, 2001). Per testare se gli animali sperimentali siano o meno evitanti dal punto di vista sociale, abbiamo condotto uno specifico test che prevede la comparazione fra l' esplorazione libera di un campo aperto (Open Field) e l' esplorazione della stessa arena in presenza di un altro animale intruso. Nella prima fase del test, infatti, nell' arena è situata una gabbietta di filo di ferro vuota, mentre nella seconda fase nella gabbietta viene posto un altro soggetto non familiare dello stesso sesso ed età; in questo modo la gabbietta permette che ci sia interazione visuo-olfattiva e tattile fra i due animali, impedendo però interazioni di tipo violento o sessuale.



Figura 5.4: Test di evitamento sociale/socialità

Materiali e metodi

Sono stati sottoposti a questo test 65 animali allevati da madri CD1, 16 animali allevati da madri FVB e 37 tutti di età compresa fra 90 e 100 giorni di età. Il test è

stato eseguito tra le ore 15:00 e le 19:00 in una arena quadrata di 54x54 centimetri, per due sessioni consecutive di 5 minuti, in accordo con Berton *et al.* (2006) con lievi modifiche. Durante la prima sessione (T1), il campo aperto conteneva una gabbietta di rete metallica (10 cm di diametro) vuota, collocato ad una estremità del campo e tenuta ferma da un peso appoggiato sulla sua sommità. Durante la seconda sessione (T2), le condizioni erano identiche tranne che un animale (non familiare e della stessa età e sesso) era stato introdotto nella gabbietta metallica. Tra le due sessioni, l'animale sperimentale è stato rimosso dall'arena e riposto nella sua gabbia di stabulazione per il tempo necessario ad inserire l'animale intruso (circa un minuto). All'inizio di ogni sessione il soggetto è stato introdotto nell'arena in uno dei due angoli opposti alla gabbietta dell'intruso, col muso rivolto verso la parete dell'apparato.

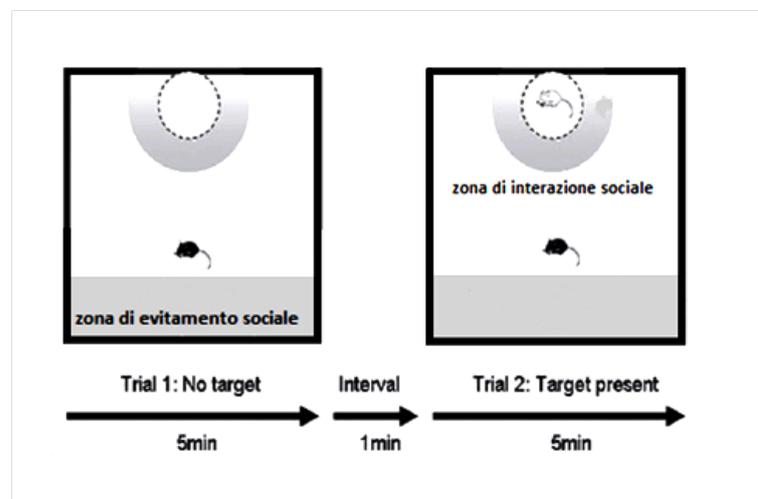


Figura 5.5: Protocollo per Open Field Sociale

Tra una sessione e l'altra, l'apparato è stato accuratamente pulito con acqua, etanolo al 50% e quindi di nuovo acqua, per impedire che gli animali venissero influenzati dall'odore degli altri precedentemente testati. I test sono stati registrati mediante telecamera digitale situata a circa 1,5 m sopra l'apparato sperimentale. Il comportamento di esplorazione del topo è stato analizzato poi con software EthovisionXT8 (Noldus, Olanda), identificando per le zone *target* (anello pari a 2,5 volte il diametro della gabbietta connettente l'intruso) e *avoidance* (la fascia di arena opposta al target, il più lontano possibile cioè dall'intruso) il tempo trascorso, la frequenza e latenza del primo "ingresso".

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a cinque fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, KO), fenotipo (agouti o black), adozione (CD1, FVB e C57) e tempo (ripetuta fra T1 e T2). Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Duncan per i confronti binari.

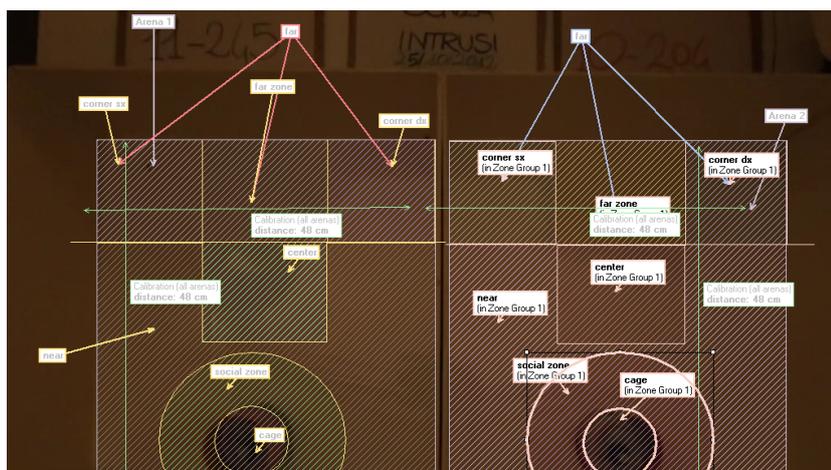


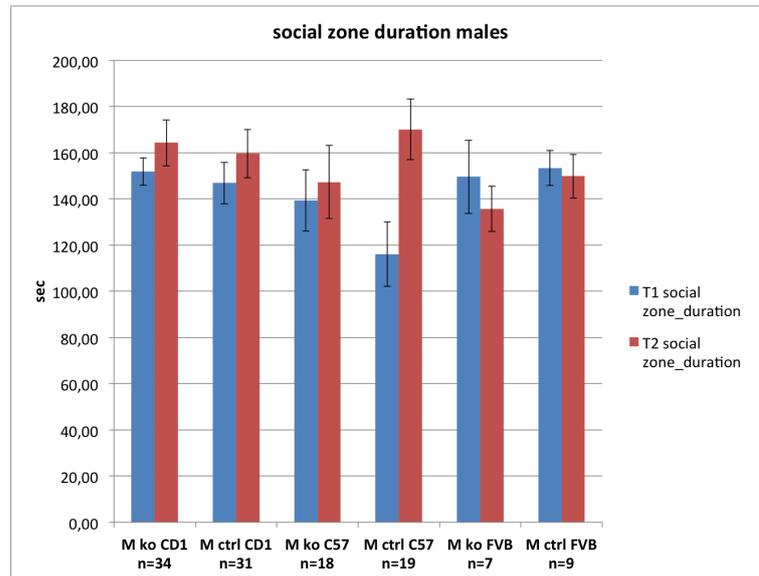
Figura 5.6: Analisi dei video mediante software Noldus Ethovision XT8

Per l'analisi dei risultati di questo test ho condotto analisi sui tempi trascorsi dagli animali nella zona target dell'apparato, cioè l'anello intorno alla gabbietta (social zone) e in quella opposta, detta zona di evitamento (*avoidance zone*), nonché sulla distanza entrambe in T1 e T2.

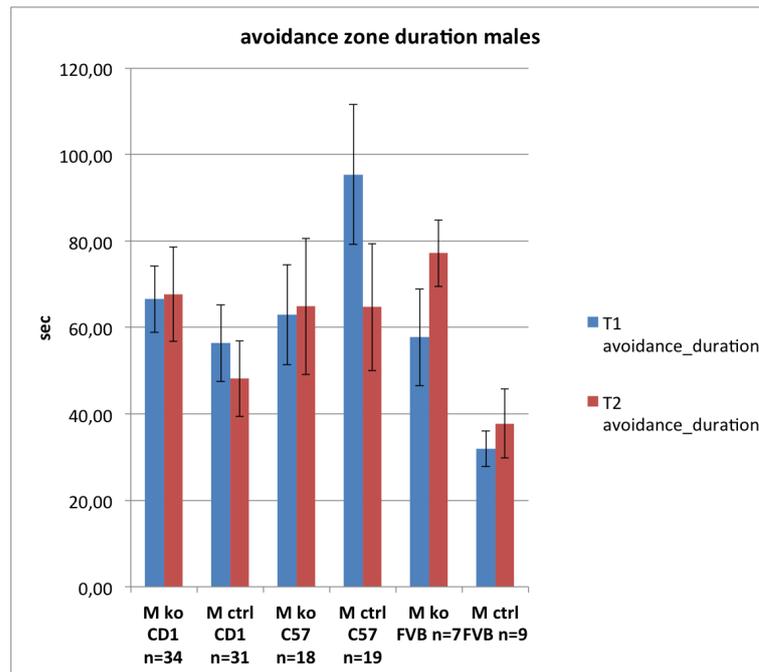
5.2.1 Risultati

L'analisi della varianza a cinque fattori (sesso, genotipo, fenotipo, adozione e tempo) per misuche hanno evidenziato quanto segue:

- Social zone:** sulla quantità di tempo trascorsa intorno al target, ANOVA rileva come significativa l'interazione fra tempo e adozione ($F_{(2,186)}=2,90$, $p=0.05$) che ci dice come sia diverso l'andamento nel tempo fra i ceppi: mentre gli allevati da C57 e CD1 passano più tempo in T2 in esplorazione della gabbietta con l'intruso, gli allevati da FVB non mostrano alcuna differenza. A questo punto ho effettuato una analisi separata fra maschi e femmine. Nei **maschi**: ANOVA rivela un effetto di interazione significativo fra tempo e adozione ($F_{(2,106)}=3,74$, $p<0.05$) ed una tendenza alla significatività sempre di interazione fra tempo, adozione e genotipo ($F_{(2,186)}=2,81$, $p=0.08$) da cui emerge, ad una successiva analisi mediante post-hoc, che esiste una differenza significativa fra KO e controlli solo negli allevati da madri C57 ($p<0.01$). Nelle **femmine** ANOVA rivela un effetto di interazione, ma ad una successiva analisi mediante post-hoc si nota come sia significativa la differenza di tempo trascorso in questa zona fra femmine KO e controllo allevate da C57 in T1 ($p<0.05$) e come questa differenza scompaia il T2.
- Avoidance zone:** sul tempo passato nella zona di evitamento, ANOVA ha rilevato come significativo l'effetto del genotipo ($F_{(1,186)}=5,42$, $p<0.05$) che ci mostra come i Ko in genere passino meno tempo in questa zona, e quelli di interazione fra sesso, genotipo e adozione ($F_{(2,186)}=2,97$, $p=0.05$) che mostra un andamento opposto fra KO e controlli nei C57 maschi o femmina, cosa che



(a) Tempo speso nella zona di interazione sociale; si nota una differenza significativa fra KO e controlli solo negli allevati da madri C57 ($p < 0.01$)



(b) Tempo speso nella zona di evitamento sociale; si nota solo una tendenza alla significatività fra KO e controlli negli allevati da madri C57 ($p = 0.06$)

Figura 5.7: Confronto fra il tempo trascorso dai maschi in T1 e T2

non avviene negli altri ceppi di adozione, con le sole femmine KO che trascorrono più tempo nella zona di evitamento.

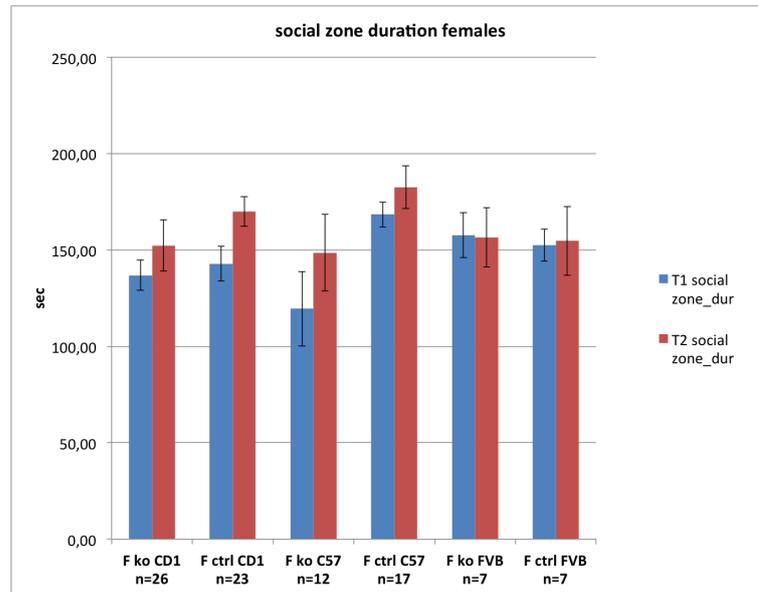
Effettuando una analisi separata fra maschi e femmine, nei **maschi** ANOVA ha rilevato come tendente alla significatività l'effetto di interazione fra tempo e genotipo ($F_{(1,106)}=2,89$, $p=0.09$), che ad una successiva analisi mediante post-hoc, risulta tendente alla significatività solo in T1 nei maschi allevati da C57 ($p=0.06$).

Per quanto riguarda le femmine, ANOVA ha rilevato come significativo l'effetto del genotipo ($F_{(1,80)}=3,72$, $p=0.05$), che evidenzia come le KO passino più tempo nella zona di evitamento rispetto allo controllo, indipendentemente dal tipo di adozione; ad una successiva analisi mediante post-hoc, si nota come vi sia una differenza significativa fra KO e controllo solo nelle femmine allevate da madri C57, sia in T1 che in T2 ($p<0.05$).

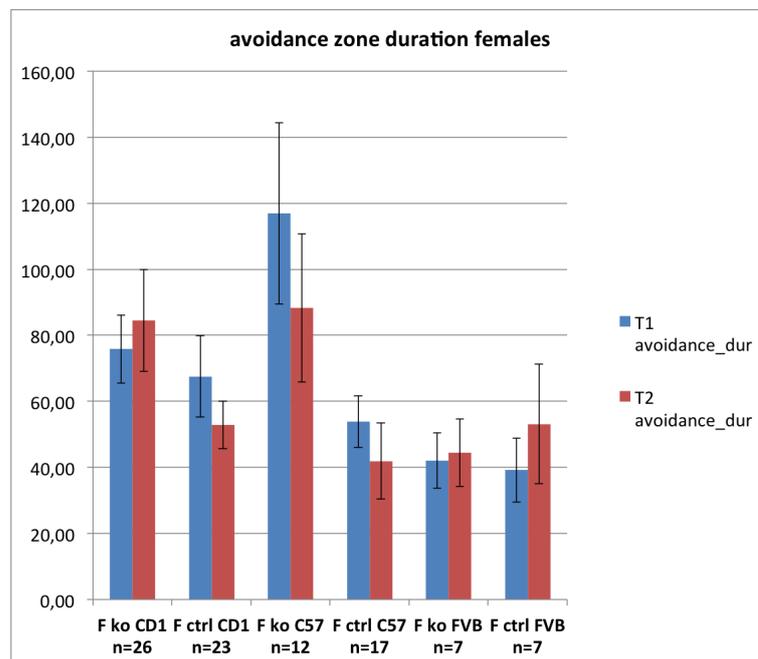
Ho inoltre svolto un'analisi, sempre con le stesse modalità, sulla distanza percorsa dagli animali all'interno dell'apparato durante il test, indice di ansia e di irrequietezza. L'ANOVA a cinque fattori ha rilevato per questa variabile un effetto significativo del genotipo ($F_{(1,186)}=13,76$, $p<0.001$) con i KO che si muovono significativamente di meno del controlli, ed un effetto dell'adozione ($F_{(2,186)}=8,56$, $p<0.001$) che mostra come gli FVB si muovano di più rispetto a C57 e CD1 e che questi ultimi presentino valori intermedi. Per quanto riguarda l'andamento nel tempo risulta significativo l'effetto di interazione di tempo e adozione ($F_{(2,186)}=3,68$, $p<0.05$) con tutti gli animali che si muovono di meno in T2, pur rimanendo gli FVB quelli con valori più alti.

Ad una analisi separata di maschi e femmine, nei **maschi** ANOVA ha rilevato come significativo l'effetto del genotipo ($F_{(1,106)}=3,88$, $p=0.05$), che mostra come in genere tutti i maschi KO si muovano meno rispetto a quelli controllo; si nota inoltre un effetto di interazione fra tempo e adozione ($F_{(2,106)}=3,76$, $p<0.05$), che mostra come a muoversi di più siano i maschi allevati da madri FVB, indipendentemente dal genotipo; una successiva analisi mediante post-hoc rileva come fra i maschi allevati da questo ceppo di madri sia significativa solo la differenza fra KO e controlli in T1 ($p<0.05$).

Per quanto riguarda le **femmine**, ANOVA ha rilevato come significativo l'effetto del genotipo ($F_{(1,80)}=8,78$, $p<0.01$) che mostra come le femmine KO si muovano meno rispetto alle controllo, indipendentemente da tempo e ceppo di adozione, nonché un effetto di quest'ultima variabile che tende alla significatività ($F_{(2,80)}=2,84$, $p=0.06$) che evidenzia come anche nelle femmine, le allevate da FVB siano quelle a muoversi di più durante il test.

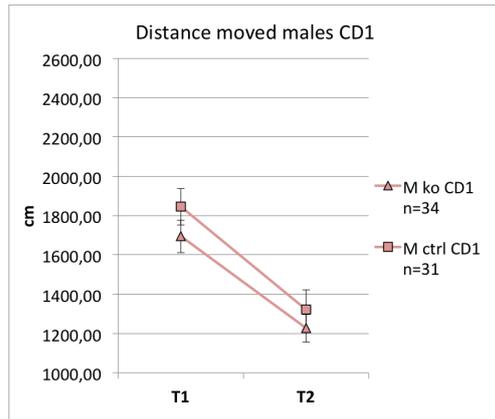


(a) Tempo speso nella zona di interazione sociale; si nota una significativa differenza di tempo trascorso in questa zona fra femmine KO e controllo allevate da C57 in T1 ($p < 0,05$) e come questa differenza scompare il T2

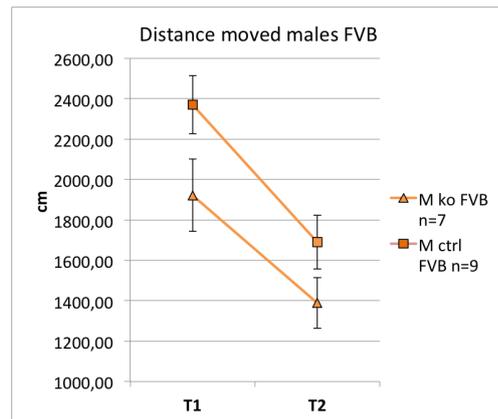


(b) Tempo speso nella zona di evitamento sociale; si nota come vi sia una differenza significativa solo fra le KO e controllo allevate da madri C57, sia in T1 che in T2 ($p < 0,05$)

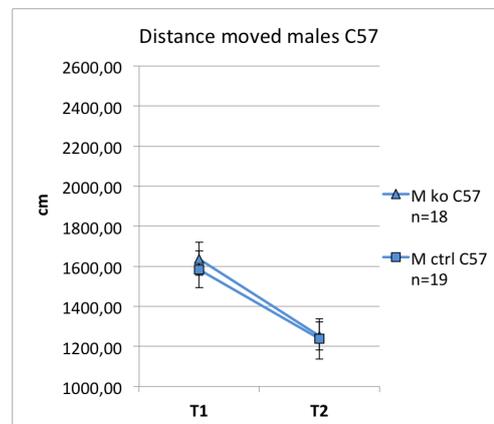
Figura 5.8: Confronto fra il tempo trascorso dalle femmine in T1 e T2



(a) Distanza totale percorsa dai maschi allevati da madri CD1

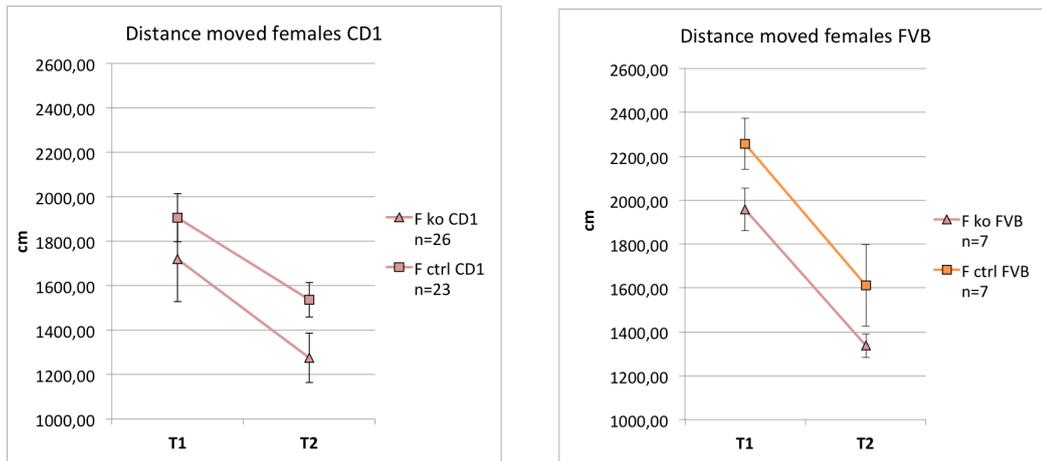


(b) Distanza totale percorsa dai maschi allevati da madri FVB; è significativa la differenza fra KO e controlli in T1 ($p < 0.05$)



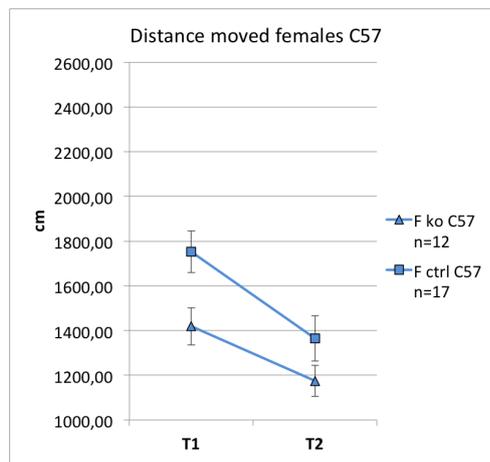
(c) Distanza totale percorsa dai maschi allevati da madri C57

Figura 5.9: Confronto fra la distanza totale percorsa all' interno dell' apparato in T1 e T2 dai maschi



(a) Distanza totale percorsa dalle femmine allevati da madri CD1

(b) Distanza totale percorsa dalle femmine allevati da madri FVB



(c) Distanza totale percorsa dalle femmine allevati da madri C57

Figura 5.10: Confronto fra la distanza totale percorsa all' interno dell' apparato in T1 e T2 dalle femmine

5.3 Ipofagia indotta da novità (NIH)

Questo test è volto a misurare l' ipofagia indotta da novità, ovvero la soppressione dell' assunzione di cibo dovuta all' esposizione ad un nuovo ambiente (Dulawa e Hen, 2005; Dulawa *et al.*, 2004). Il *Novelty Induced Hypophagia* (NIH) è una modifica recente di un vecchio test, il *Novelty Induced Suppression of Feeding* (NSF) (Bodnoff *et al.*, 1988; Merali *et al.*, 2003, 2004). E' uno dei pochi test su animali sensibili al trattamento cronico con antidepressivi (per una rassegna vedi Borsini *et al.* (2002)). Poiché il ritardo nella risposta dovuta agli antidepressivi in questo test è simile al ritardo necessario per ridurre l' ansia in pazienti psichiatrici, il NIH è particolarmente promettente per la comprensione di ciò che permette ad un antidepressivo di diventare efficace dopo il trattamento cronico.

Materiali e metodi

A 42 animali allevati da madri CD1 e 26 allevati da C57 di 120 giorni di età circa è stato presentato per quattro giorni consecutivi, all' interno della propria gabbia, un cibo sconosciuto, ma altamente appetibile, ovvero metà arachide posta in una capsula tipo Petri una volta al giorno per 4 giorni consecutivi; il test è stato effettuato tutti i giorni alle 11:00, per evitare il massimo circadiano di assunzione di cibo che si verifica nella prima fase di luce. Il giorno 4, quando la latenza di pressione e consumo del cibo appetibile avrebbe dovuto essere diminuita a causa dell' assuefazione alla novità, il test è stato condotto con le stesse modalità, ma subito dopo aver cambiato la lettiera (seguendo la logica precedentemente stabilita per il test NSF (Merali *et al.*, 2003)). La latenza di prensione e consumo dell' arachide è stato registrato con un limite di 10 minuti (600 s). Se i topi non mangiavano l' arachide entro questo tempo, questa veniva lasciata nella gabbia.



(a) Il cibo palatabile novità è costituito da una arachide (b) Modalità di presentazione del nuovo cibo

Figura 5.11: Modalità di svolgimento del test

Analisi statistica

I dati delle curve di risposta sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a cinque fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, Ko), fenotipo (agouti o black), adozione (CD1, FVB e C57) e tempo (ripetuta per i quattro giorni di test). Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel

determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Tukey per i confronti binari.

5.3.1 Risultati

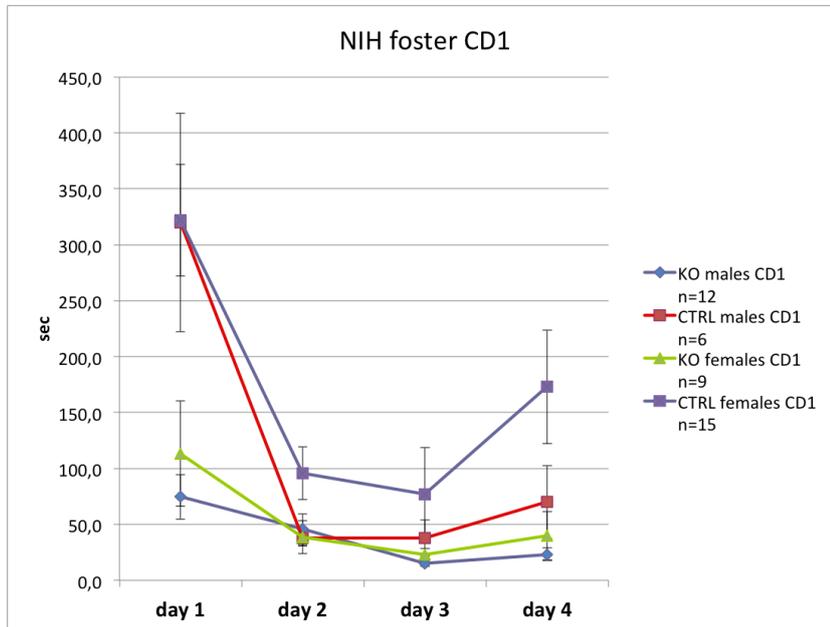
Ho condotto una analisi della varianza a cinque fattori (sesso, genotipo, fenotipo, adozione, giorni) per confrontare le curve di latenza alla prensione nel nuovo cibo palatabile che ha evidenziato come significativo l'effetto di genotipo ($F_{(1,52)}=15,32$, $p<0.001$) con i Ko che impiegano in genere un tempo minore, e l'effetto di interazione fra sesso e genotipo ($F_{(1,52)}=5,71$, $p<0.05$), che ci mostra come ci sia un diverso andamento delle curve fra Ko e controlli a seconda del sesso, con le femmine controllo che differiscono dalle Ko, cosa che invece non avviene nei maschi. Particolarmente interessante è l'effetto di interazione fra giorni e genotipo ($F_{(3,156)}=8,47$, $p<0.001$), che ci mostra come la curva della risposta dei Ko sia praticamente piatta, al contrario della consueta curva ad "U" attesa. Visto l'effetto primario e di interazione della variabile sesso, ho condotto successive analisi separate fra maschi e femmine.

Maschi

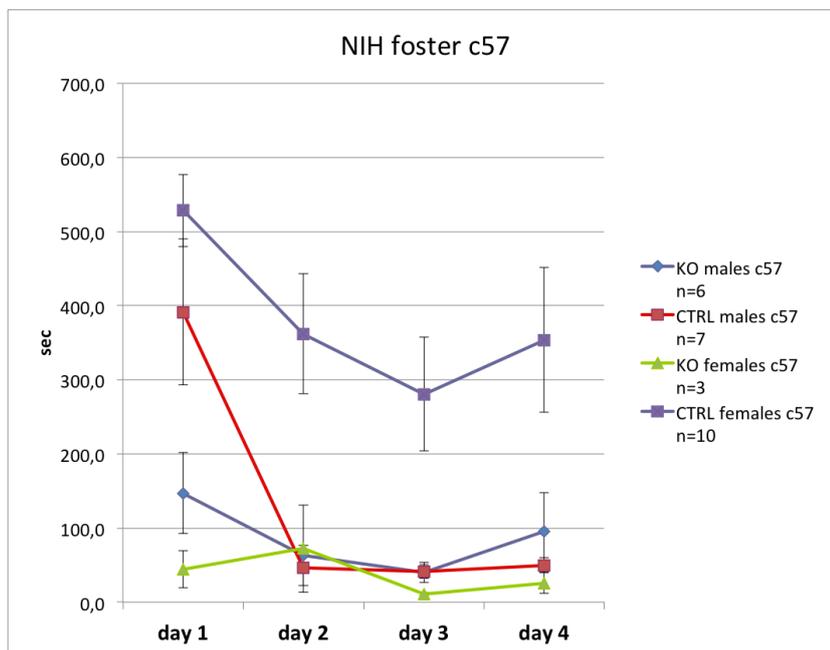
L'anova a 4 vie (genotipo, fenotipo, adozione e giorni) ha rivelato un chiaro effetto di interazione tra giorni e genotipo ($F_{(3,69)}=7,47$, $p<0.001$), che ad un successivo approfondimento mediante post-hoc rivela una differenza significativa fra Ko e controlli nel primo giorno di test ($p<0,001$).

Femmine

L'anova a 4 vie (genotipo, fenotipo, adozione e giorni) ha rivelato un chiaro effetto del genotipo ($F_{(1,29)}=12,97$, $p=0.001$), ed una tendenza alla significatività dell'interazione giorni per genotipo ($F_{(3,87)}=2,45$, $p=0.06$), che ad una successiva analisi mediante post-hoc, ha rilevato una differenza significativa fra Ko e controlli nel primo ($p<0.01$) e nell'ultimo giorno ($p<0.05$).

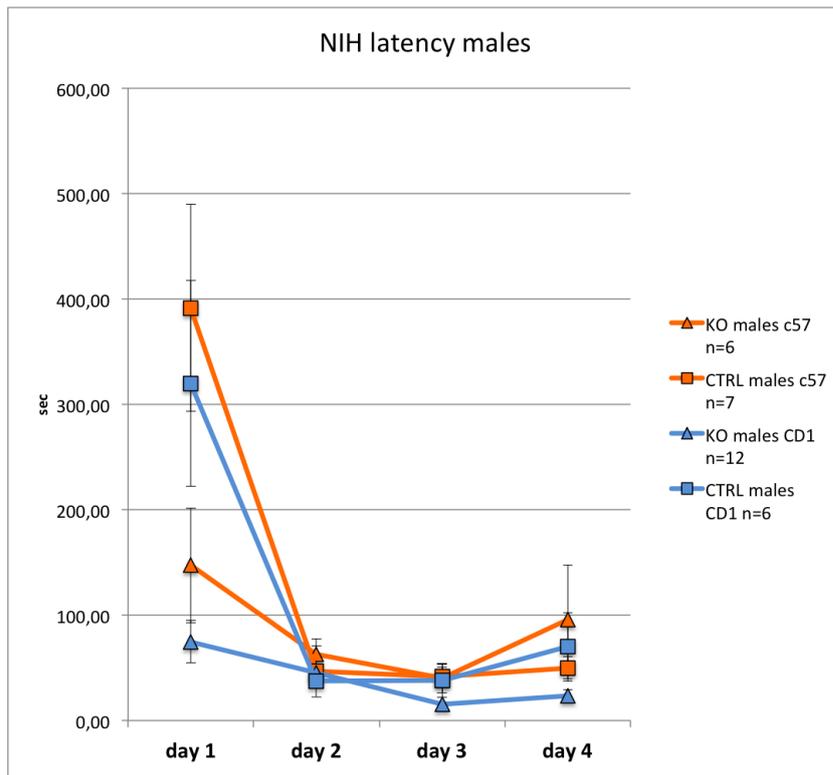


(a) Tempi di reazione ad un cibo nuovo

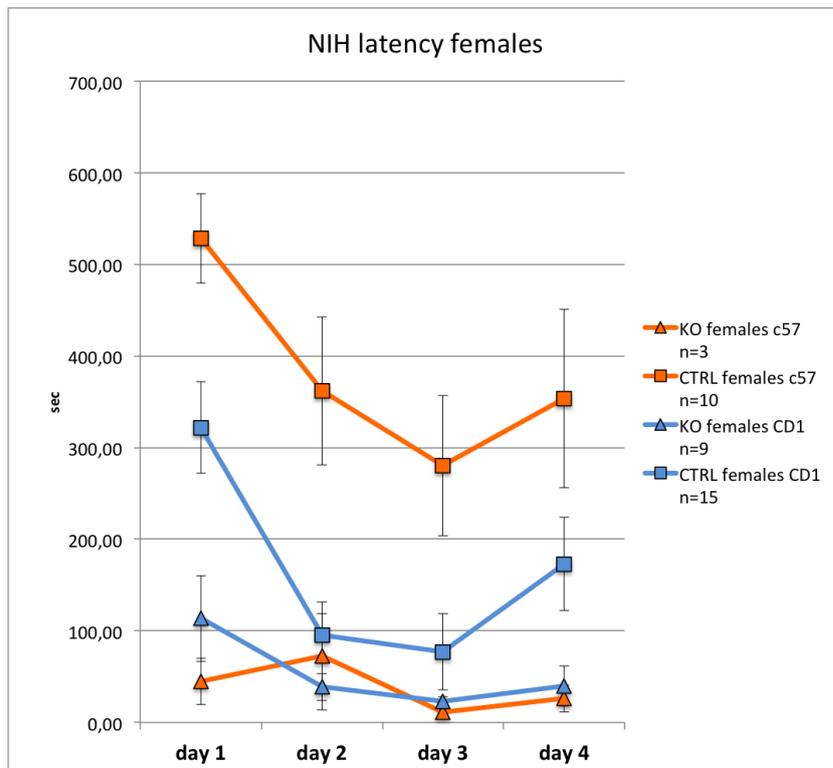


(b) Tempi di reazione ad un cibo nuovo

Figura 5.12: Confronto fra i tempi di reazione ad un cibo nuovo negli animali CD1 e C57



(a) Tempi di reazione ad un cibo nuovo nei maschi



(b) Tempi di reazione ad un cibo nuovo nelle femmine

Figura 5.13: Confronto fra maschi e femmine nei tempi di reazione ad un cibo nuovo

5.4 Comportamenti simil-autistici

Durante i numerosi test e studi su questo modello animale, ho avuto la sensazione, soprattutto osservando dal vivo le interazioni di tipo violento per la contesa del territorio che vedranno nel capitolo successivo, che vi fosse, negli animali KO, una qualche alterazione di quelli che sono i pattern ed i rituali standard della competizione territoriale fra maschi. Ciò mi ha portato a voler saggiare in modo più approfondito le competenze sociali di questi animali, nonché a voler testare se siano o meno presenti dei comportamenti riconducibili ai deficit nell' interazione sociale tipici dei disturbi dello spettro autistico.

5.4.1 I disturbi dello spettro autistico

L'autismo è un disordine dello sviluppo neurologico complesso con ereditabilità straordinariamente elevata. La concordanza tra gemelli monozigoti raggiunge il 90% per i disturbi dello spettro autistico (ASD), rispetto ad uno scarso 10% per i gemelli dizigoti e fratelli, e circa lo 0,6-1,0% nella popolazione generale, con un rapporto maschio-femmina di 4 a 1 (Abrahams e Geschwind, 2008; Happé e Ronald, 2008; Lintas e Persico, 2009; Kogan *et al.*, 2009). Il numero di casi di autismo è aumentato rapidamente negli ultimi dieci anni, in gran parte a causa di migliori strumenti diagnostici e di sensibilizzazione del pubblico, anche se le cause ambientali e le interazioni gene-ambiente sono anche da chiarire (Hertz-Picciotto e Delwiche, 2009). Notevoli sforzi sono ora concentrati sulla comprensione delle cause genetiche dell'autismo al fine di trovare trattamenti efficaci. Geni per la neurotrasmissione, tra cui il trasportatore della serotonina, ossitocina e vasopressina e recettori Gaba (γ -aminobutirrico), sono stati più volte associati con l'autismo o altamente implicati nei deficit a carico dei comportamenti sociali e affiliativi che si riscontrano nell' autismo (Abrahams e Geschwind, 2008; Chakrabarti *et al.*, 2009).

Come modellare test adatti a valutare i sintomi di autismo nei topi?

Progettare test comportamentali murini adeguati alla diagnosi di disturbi mentali umani rappresenta una sfida scoraggiante. I sintomi possono essere unicamente umani e sono spesso intrinsecamente variabili. La diagnosi di autismo è attualmente basata su criteri puramente comportamentali, in quanto marcatori biologici coerenti non sono stati ancora identificati (Happé e Ronald, 2008; Lord, 2000; Zwaigenbaum *et al.*, 2009). Fino ad ora, il DSM-IV, il manuale diagnostico della American Psychiatric Association, e l' ICD-10, il manuale diagnostico della Organizzazione Mondiale della Sanità, hanno richiesto la presenza di elementi di base in tre categorie specifiche: anormali reciproche interazioni sociali, che comprendono ridotto interesse per i coetanei e difficoltà a mantenere l' interazione sociale, e mancato uso dello sguardo degli occhi e le espressioni facciali per comunicare efficacemente, comunicazione alterata, che presenta generalmente come ritardi lingua, deficit di comprensione lingua e la risposta alle voci, uso stereotipato o letterale delle parole e frasi, pragmatica poveri (sapere come e quando usare il linguaggio) e la mancanza di prosodia, con conseguente modo di parlare monotono o esagerato, e comportamenti ripetitivi, che includono stereotipie motorie, l'uso ripetitivo di oggetti, compulsioni e rituali, ripetitività, suscettibilità al cambiamento, nonché limitatezza negli interessi o interessi

bizzarri. Proposte di revisione nel DSM-V tendono ad unire i primi due criteri in una più generale fattore di comunicazione sociale che comprende la mancanza di reciprocità sociale e deficit nella comunicazione verbale e non verbale, sin dalla prima infanzia. Basandosi su consulenze di esperti clinici di autismo, i neuroscienziati comportamentali sono impegnati nella creazione di nuovi paradigmi comportamentali nel topo e nella raffinazione di paradigmi esistenti dalla letteratura neuroscientifica comportamentale in grado di massimizzare la face validity dei test a ciascuno dei sintomi di base. Somiglianze genetiche, neuroanatomiche e biochimiche tra topo e uomo supportano l'uso di modelli murini per migliorare la nostra comprensione dei meccanismi biologici alla base delle manifestazioni comportamentali dell'autismo. Risposte simili a trattamenti farmacologici nei topi e nell'uomo incoraggiano l'uso di modelli murini ben convalidati nella scoperta di terapie efficaci per i disturbi dello spettro autistico (Silverman *et al.*, 2010).

5.4.2 Test delle tre camere

Questo test è composto da due diverse fasi consecutive: la **prima parte** del test è volta a misurare la socievolezza, definita come la quantità di tempo che un soggetto trascorre nella "camera" al cui interno si trova un suo simile, rispetto al tempo trascorso in quella dove si trova un oggetto inanimato. Dovendo impedire interazioni dirette fra l'animale sperimentale e quello "bersaglio" (intruso), questo è stato posto all'interno di una gabbietta di rete metallica alla cui sommità si trova un peso contenuto in un tubo saldato alla gabbietta stessa, al fine di non far salire l'animale sperimentale sulla gabbietta; in questo modo si permettono le interazioni di tipo olfattivo, visivo, uditivo e qualche contatto tattile, evitando interazioni aggressive e sessuali, garantendo così una misura del semplice avvicinarsi e rimanere in prossimità fisica con un simile. Il numero di transizioni tra i compartimenti fornisce una misura indipendente di attività locomotoria; la **seconda parte** del test, simile alla prima, viene svolta immediatamente dopo, lasciando l'intruso già utilizzato nella propria gabbietta, e inserendo nell'altra, finora rimasta vuota, un nuovo intruso. L'animale sperimentale si troverà quindi a scegliere con quale dei due interagire, se con quello già familiare, o con quello del tutto sconosciuto

Materiali e metodi

Sono stati sottoposti a questo test 23 animali allevati da madri CD1 e 12 animali allevati da madri C57. Ho realizzato l'apparato, un'arena di polycarbonato trasparente di 60 x 40 cm, suddivisibile in tre ambienti da 20 x 40 cm mediante paratie trasparenti, a partire dalla descrizione fornita in Crawley (2007a). Le porte scorrevoli ricavate sulle due pareti divisorie permettevano, quando aperte, il passaggio degli animali da un ambiente all'altro; in questo modo abbiamo ottenuto tre "stanze", una centrale e due laterali. La sessione di test inizia con 5 minuti di assuefazione sessione nella camera unico centro, seguito da 5 minuti di sessione assuefazione con accesso a tutte e 3 le camere vuote. Il tempo trascorso in ciascuna camera è stato conteggiato mediante analisi con il software Ethovision XT8 (NOLDUS, Olanda). Per l'analisi dei dati, inoltre, ho calcolato un indice costituito dal rapporto fra il tempo trascorso nella "camera" 1 e la somma totale del tempo trascorso in entrambe le camere: nel primo trial questo indice assume il nome di indice di "novità", nel

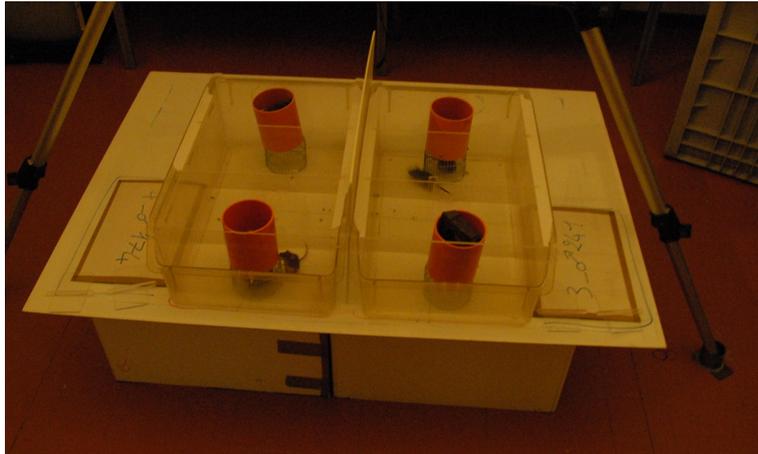


Figura 5.14: Esecuzione del test delle tre camere

secondo, di indice di “familiarità”. In questo modo è possibile misurare la maggiore o minore propensione dell’ animale a trascorrere tempo nella camera con l’ intruso sociale piuttosto che con la sola gabbietta vuota (trial 1), oppure nella camera con l’ intruso familiare piuttosto che in quella con l’ intruso non familiare (trial 2); l’ indice rivela una propensione a sostare nella “camera” 1 piuttosto che nella 2 se maggiore di 0,5, o il contrario se minore di questo valore.



Figura 5.15: Analisi del test delle tre camere

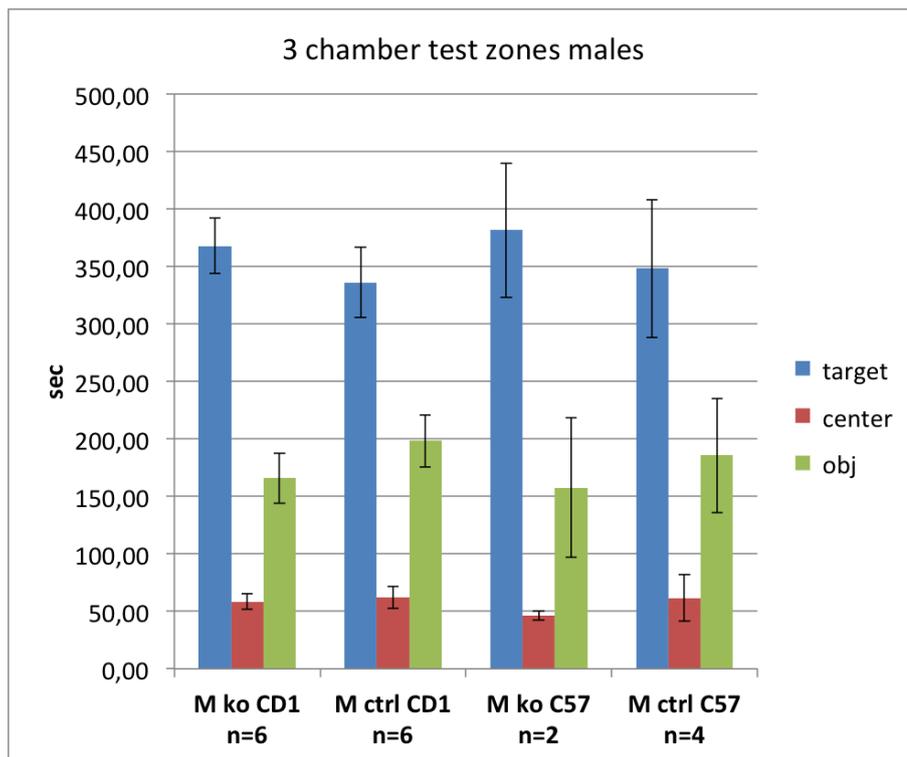
Analisi statistica

I dati sul tempo trascorso in ogni zona sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute a tre fattori: sesso (maschi, femmine), genotipo (controlli, KO) e adozione (CD1 o C57). Ogni volta che ho trovato un effetto significativo principale o dovuto a interazione, ho condotto ulteriori analisi della varianza separate in base a quel determinato effetto principale trovato significativo. Ho utilizzato il test di Duncan per i confronti binari.

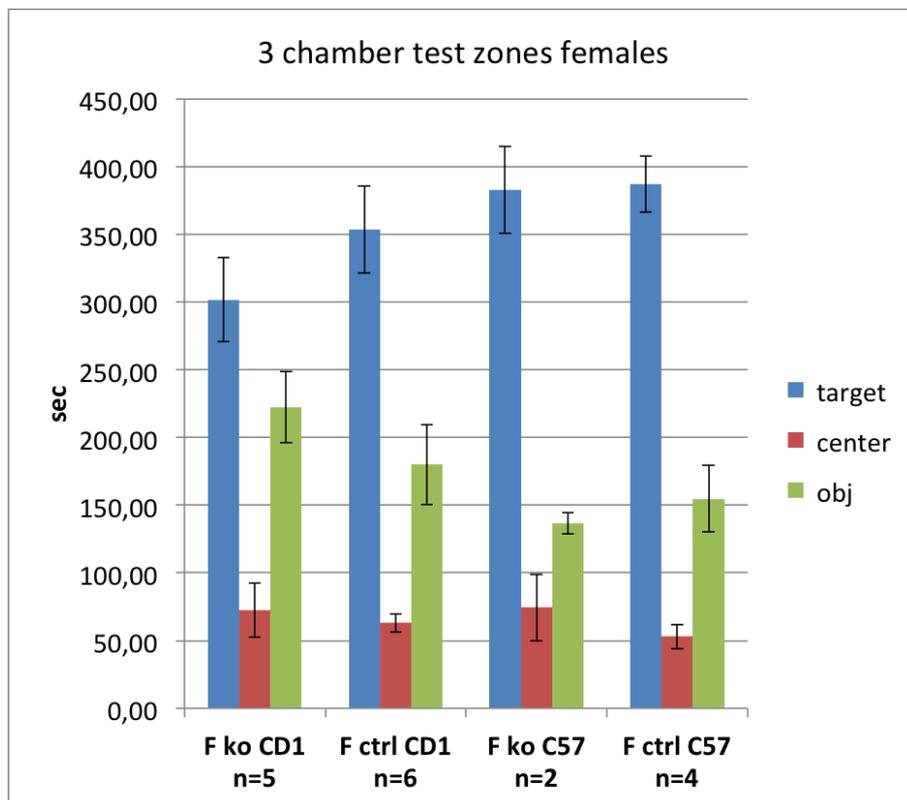
5.4.3 Risultati

- **Trial 1:** i risultati per questa parte del test sono visibili nelle figure 5.16 e 5.18; l'analisi della varianza sul tempo trascorso dagli animali in ciascuna delle tre zone non ha evidenziato effetti né del genotipo né del tipo di adozione, né nei maschi né nelle femmine; nessuna differenza significativa emerge anche eseguendo analisi per maschi e femmine separati.
- **Trial 2:** i risultati per questa parte del test sono visibili nelle figure 5.17 e 5.19; l'analisi della varianza sul tempo trascorso dagli animali in ciascuna delle tre zone ha evidenziato come significativa esclusivamente un effetto di interazione di sesso e genotipo ($F_{(1,27)}=7,65$; $p<0.05$) nella quantità di tempo trascorso nella zona centrale, senza interagire cioè né con l'intruso familiare che con quello sconosciuto; questo effetto ci mostra come, nelle femmine, non vi sia differenza fra le allevate da madri CD1 e quelle allevate da madri C57, mentre questa differenza sia statisticamente significativa nei maschi, con i maschi C57 che si comportano come le loro sorelle, a differenza dei maschi allevati da CD1 che trascorrono al centro un tempo inferiore alle femmine e ai maschi C57. Una ulteriore analisi mediante post-hoc ha rilevato come nell'interazione fra genotipo, sesso e adozione, la forte differenza fra maschi e femmine KO sussista solo negli allevati da madri C57 ($p<0.01$).

Andando a condurre l'analisi della varianza a due fattori (genotipo e adozione) sugli indici di novità e di familiarità sopra descritti, non si rilevano differenze significative di nessun tipo per l'indice di novità. Per quanto riguarda quello di familiarità, invece, pur non raggiungendo nessun fattore o interazione differenze statisticamente significative a causa dell'esigua ampiezza del campione, soprattutto per quanto riguarda i C57, si nota una certa tendenza dei maschi KO a non preferire il nuovo intruso rispetto a quello già conosciuto nel trial precedente (genotipo: $F_{(1,14)}=1,97$; $p=0.18$). Per quanto riguarda le femmine, al contrario, la tendenza alla significatività che salta all'occhio è quella della differenza dovuta al tipo di adozione, senza effetto del genotipo (genotipo: $F_{(1,13)}=3,28$; $p=0.09$). Pur non raggiungendo la significatività, questi risultati incoraggiano fortemente la prosecuzione di questo tipo di esperimenti, indicando una probabile non discriminazione fra intruso familiare e intruso sconosciuto nei solo maschi, proprio come la distribuzione dei disturbi dello spettro autistico nella popolazione.

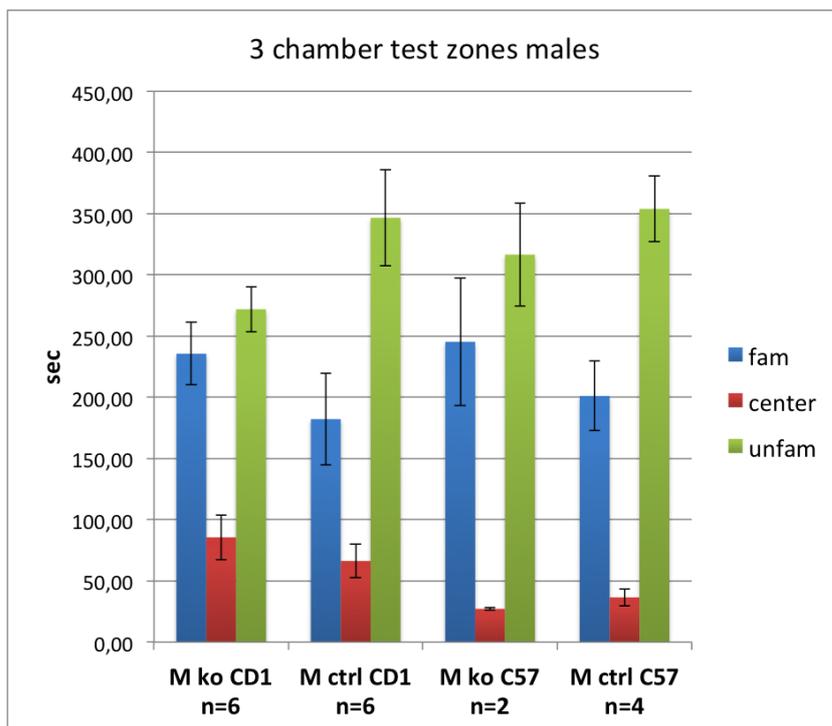


(a) Quantità di tempo trascorsa dai maschi in ognuna delle camere

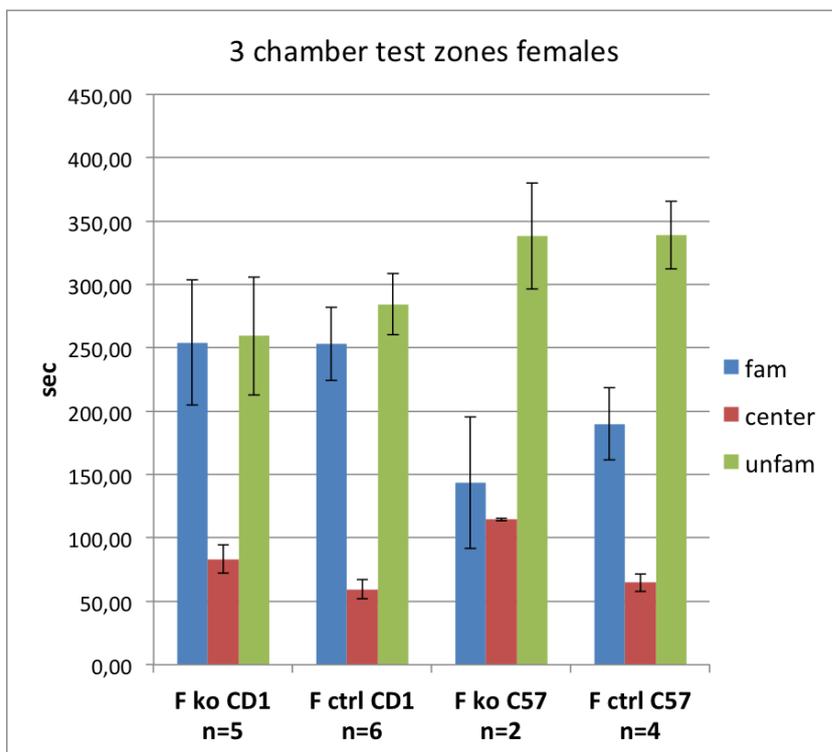


(b) Quantità di tempo trascorsa dalle femmine in ognuna delle camere

Figura 5.16: Confronto fra adottati da C57 e da CD1 per quanto riguarda la preferenza ad una novità sociale



(a) Quantità di tempo trascorsa dai maschi in ognuna delle camere



(b) Quantità di tempo trascorsa dalle femmine in ognuna delle camere

Figura 5.17: Confronto fra adottati da C57 e da CD1 per quanto riguarda la preferenza fra uno stimolo sociale familiare ed uno non familiare

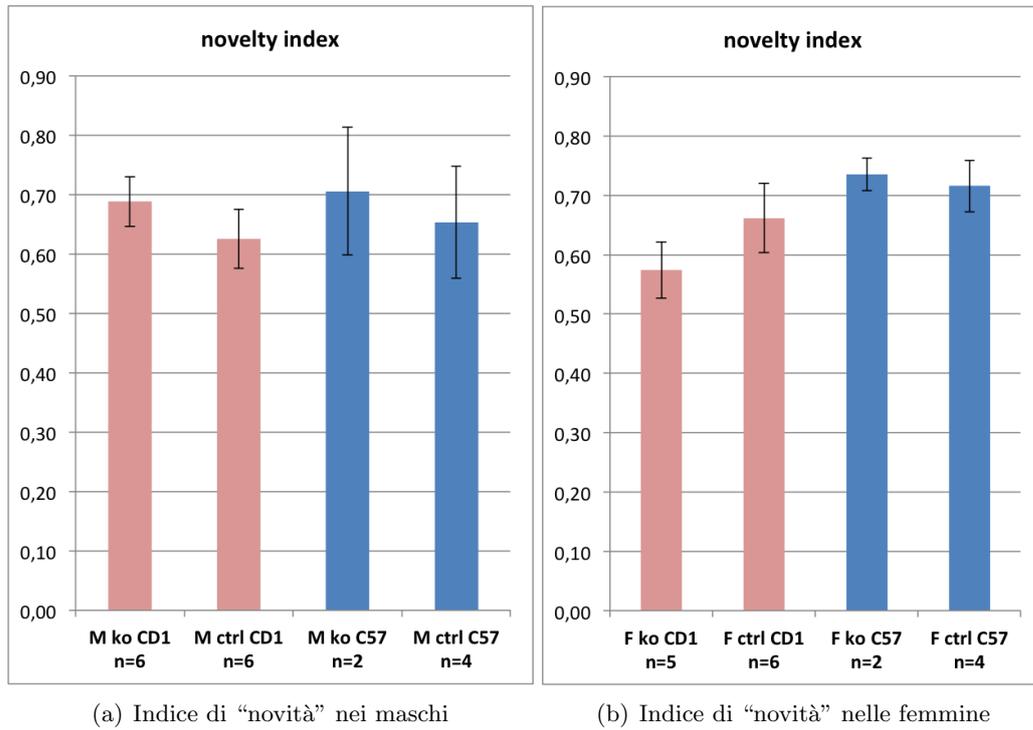


Figura 5.18: Confronto fra gli indici di "novità" di maschi e femmine

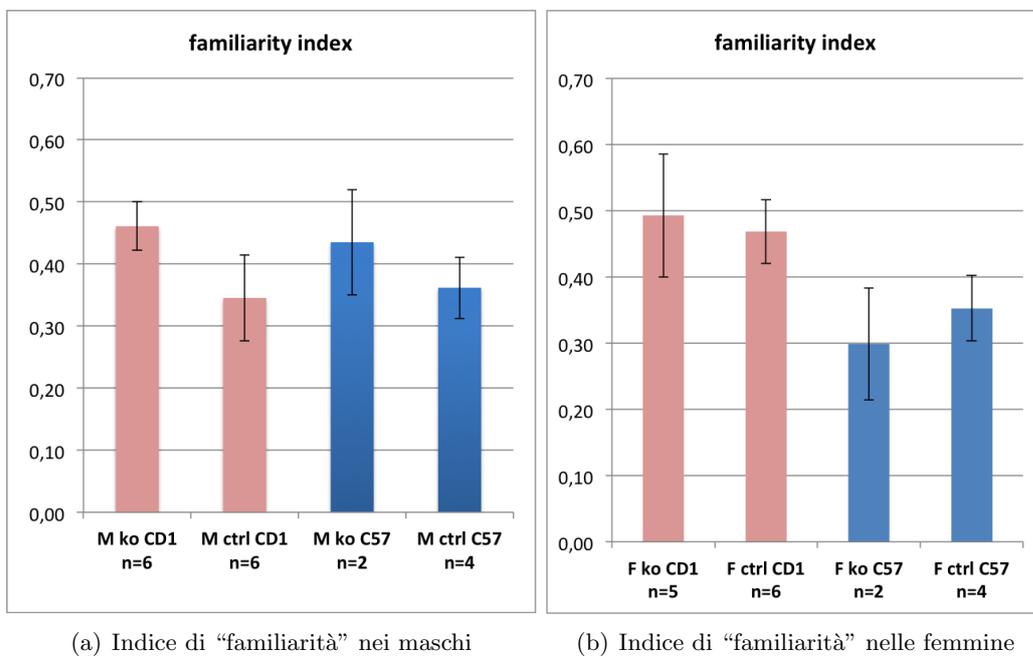


Figura 5.19: Confronto fra indici di "familiarità" di maschi e femmine

5.5 Discussione

In questo capitolo ho presentato i test svolti nell'ottica di caratterizzare il modello animale dal punto di vista comportamentale.

Nell' Elevated Plus Maze abbiamo visto come vi sia un effetto opposto del genotipo su maschi e femmine per quanto riguarda la frequenza di uscita sul braccio aperto, evento chiave di questo test: rispetto ai controlli, i KO maschi escono con minore frequenza sui bracci aperti, denotando un comportamento più ansioso, mentre nelle femmine le KO escono più frequentemente delle controllo. Non sembra esserci un effetto del tipo di adozione sulle prestazioni degli animali in questo test.

Nell' Open Field sociale sono andato a testare se questi animali siano socialmente evitanti o meno. Un dato interessante è la maggiore attività locomotoria nell'arena di tutti gli animali adottati da FVB, maschi e femmine, indice di ansietà e di irrequietezza, dato coerente con il fatto che, sempre in questi animali, non c'è differenza fra T1 e T2 nella quantità di tempo trascorso nella zona intorno alla gabbietta, cosa che invece avviene in maschi e femmine adottati da CD1 e C57. Un effetto sorprendente nei maschi è la differenza fra la quantità di tempo passata nella zona sociale e in quella di evitamento da maschi di fenotipo agouti e quelli di fenotipo black: una variabile apparentemente insignificante come il colore del manto sembra comportare invece un rafforzamento delle differenze fra KO e controlli spingendo i controlli verso una più spiccata socialità mentre al contrario i KO verso un disinteresse verso il target sociale. Per quanto riguarda le femmine questo effetto diversificato fra agouti e black si ha solamente nella distanza coperta all'interno dell' arena durante il test.

Per quanto riguarda il test di ipofagia indotta da novità, ho voluto testare in questo modo sia la neofobia nei confronti di un cibo nuovo, per quanto appetitoso, che per un ambiente nuovo (la lettiera pulita). In modo sorprendente e del tutto inaspettato, i KO, maschi e femmine che siano, di qualsiasi adozione, dimostrano un chiarissimo e netto abbassamento dei tempi di latenza, sia nel primo che nell'ultimo giorno, denotando un non "interesse" dei KO per la variabile ambiente o per l'effetto novità.

Questo risultato, unito alle osservazioni sul comportamento di tipo territoriale fra maschi che descriverò nel prossimo capitolo, mi hanno portato ad indagare sulla possibile presenza di comportamenti riconducibili a disturbi dello spettro autistico; andando infatti ad analizzare i dati risultanti dal test delle tre camere, si rileva una tendenza alla non discriminazione fra un intruso familiare ed uno non familiare solo negli animali maschi; questo risultato, che necessita sicuramente di essere ripetuto per ampliare la grandezza del campione, starebbe ad indicare proprio quei deficit nell'inizio di nuove interazioni sociali, che Crawley (2007b); Moy *et al.* (2004); Silverman *et al.* (2010) presentano come sintomi di disturbi dello spettro autistico.

Capitolo 6

Risposta a stress psicosociale cronico

L'ultimo capitolo di questo lavoro di Tesi riguarda l'analisi della risposta di $NPY1R^{rfb}$ allo stress. Come abbiamo visto nel capitolo 2 (par. 2.2.1), NPY riveste un ruolo centrale nella regolazione del comportamento emozionale e nella risposta a stimoli stressanti e diversi studi hanno dimostrato che un articolato network di elementi contenenti il peptide, tra cui, in particolare, amigdala ed ippocampo, gioca un ruolo importante nella regolazione di tali effetti (fig. 2.1 e 6.1).

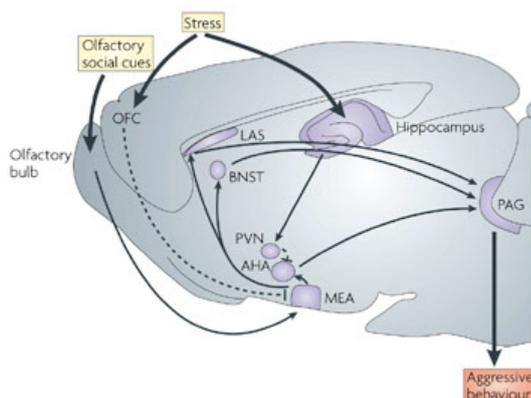


Figura 6.1: Effetto ippocampo su aggressività (tratto da *Nature Methods*)

È stato inoltre dimostrato un antagonismo funzionale tra NPY e il fattore di rilascio delle corticotropine (CRF) in vari nuclei del circuito di stress/ansia, come ippocampo (Thorsell *et al.*, 2000), ipotalamo (Hastings *et al.*, 2001), locus coeruleus (Charney, 2004), grigio periacqueduttale (Kask *et al.*, 1998b) e complesso settale (Kask *et al.*, 2001).

Secondo Karl *et al.* (2004), NPY è inoltre fondamentale nella coordinazione fra regolazione di assunzione di cibo, crescita e riproduzione, assicurando che la procreazione e la crescita si verifichino solo quando il cibo è abbondante e consentendo il risparmio energetico quando il cibo è scarso; per quanto sia noto come le risposte emotive e comportamentali superiori siano coinvolte in tutte queste funzioni, la comprensione del coordinato fisiologico della regolazione da parte delle emozioni sulle funzioni fisiologiche manca. In questo lavoro, infatti, Karl *et al.* (2004) dimostrano come il sistema NPY svolga un ruolo centrale in questo processo, in quanto

si è visto come l'ablazione del gene per il recettore Y1 porti ad un forte aumento del comportamento aggressivo territoriale. Questi risultati suggeriscono che NPY, agendo attraverso i recettori Y1, regoli i circuiti serotoninergici, consentendo quindi il coordinamento fra processi fisiologici di sopravvivenza quali l'assunzione di cibo, con l'attivazione del comportamento aggressivo di tipo territoriale.

Diversi studi hanno dimostrato che la segnalazione endogena di NPY (in particolare quella mediata da Y1R) è implicata in risposte neuronali allo stress, ad esempio si è osservato come l'espressione dell' mRNA per NPY e del peptide stesso sia dinamica e sensibile a stress da "restraint" acuti e ripetuti, in numerose regioni di proencefalo, ponte e midollo (Krukoff *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1999, 2000). Tuttavia, non è chiaro come l'esposizione al restraint possa alterare l'espressione cerebrale di NPY, dal momento che il restraint ripetuto o acuto può produrre aumento, diminuzione o non dare nessun cambiamento dell' mRNA per NPY e del peptide stesso, il che apparentemente varia da ceppo a ceppo di topo. Uno di questi studi ha mostrato che l'esposizione a restraint acuto riduce l' mRNA per NPY e la concentrazione della proteina in amigdala e corteccia nel ratto, mentre al contrario, l'osservazione che l'esposizione a restraint ripetuto, up-regola l'espressione del gene codificante per NPY, in amigdala e ARC, suggerisce che l'aumentata sintesi e liberazione di NPY potrebbe contribuire allo sviluppo dell'adattamento e che il peptide potrebbe agire da tampone degli effetti comportamentali di segnali in grado di suscitare stress, come CRF (Thorsell *et al.*, 1999). In accordo con ciò, è stato mostrato come l'esposizione acuta al restraint faccia aumentare l'espressione genica di Y1R nell'amigdala centrale e mediale e nel PVN di topi Y1R/LacZ, suggerendo che questa "up-regulation" potrebbe essere parte di un meccanismo compensatorio condotto dalla riduzione, indotta da stress, della trasmissione funzionale mediata da NPY nell'amigdala (Eva *et al.*, 2006b). Restraint ripetuti, invece, non hanno influito sull'espressione del transgene Y1R/LacZ nell'amigdala e nel PVN dei topi, e ciò potrebbe implicare che non sia richiesto un cambiamento nell'attività trascrizionale del promotore genico per Y1R per l'adattamento allo stress da restraint (Mele *et al.*, 2004).

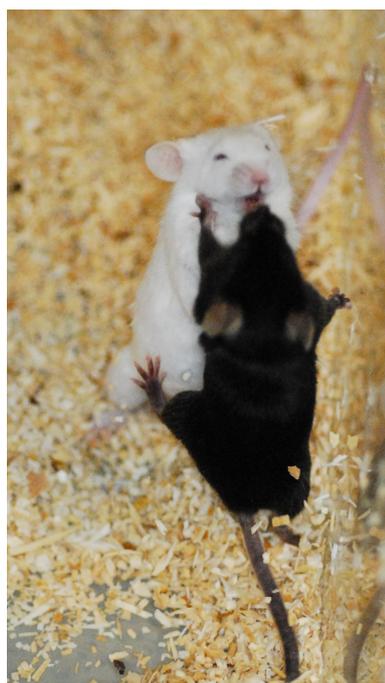
6.1 Il paradigma della sconfitta sociale: il test residente/intruso

L'utilizzo della sconfitta sociale (*social defeat*) come paradigma sperimentale ha origine da esperimenti su animali, come il resident/intruder test, in cui un animale "intruso" viene inserito nella gabbia di un altro animale o gruppo di animali della stessa specie. Ciò genera normalmente una reazione violenta da parte del/degli animali "residenti" per la difesa nel proprio territorio. Se agli animali è permesso di combattere in una singola occasione, allora è considerato un modello di stress acuto, se al contrario vengono lasciati combattere in diverse occasioni, allora è considerato come un modello di stress cronico. È stato proposto di usare i modelli animali di conflitto sociale per lo studio di una serie di disturbi mentali, compresa la depressione maggiore, il disturbo d'ansia generalizzato, il disturbo post traumatico da stress, l'abuso di droghe, i disturbi del comportamento alimentare e la schizofrenia, adattando questo modello anche all'uomo per lo studio di comportamenti aggressivi,

bullismo, aggressività relazionale e subordinazione cronica (Björkqvist, 2001; Rohde e Rohde, 2001). Nei modelli animali, ad esempio, si è visto come la sconfitta sociale sia un fattore di stress molto potente che può portare ad una serie di effetti come l'isolamento sociale (interazioni ridotte con i conspecifici), letargia (ridotta attività locomotoria), riduzione del comportamento esplorativo, anedonia (ridotta ricerca di stimoli piacevoli), riduzione dei comportamenti socio-sessuali, vari deficit motivazionali, diminuzione dei livelli di testosterone (a causa di un calo della funzionalità delle cellule Leydig dei testicoli), aumento tendenze a comportamenti stereotipati e di auto-somministrazione di droghe e alcool (Rygula *et al.*, 2005; Huhman, 2006).

6.1.1 Materiali e metodi

Al raggiungimento dell'età adulta (PND 90), a 10 maschi KO e 12 maschi controllo è stato inserito, nella propria gabbia di stabulazione, un intruso di ceppo outbred CD1 di età e peso equivalente; l'interazione è stata sia osservata ad occhio nudo che videoregistrata per successive analisi del comportamento competitivo dei due soggetti, ed interrotta a dopo 5 minuti dal primo attacco da parte del residente, oppure a 10 minuti se il residente non ha mai sferrato attacchi.



(a) Attacco dell' intruso (maschio CD1) al residente $Npy1r^{r.fb}$



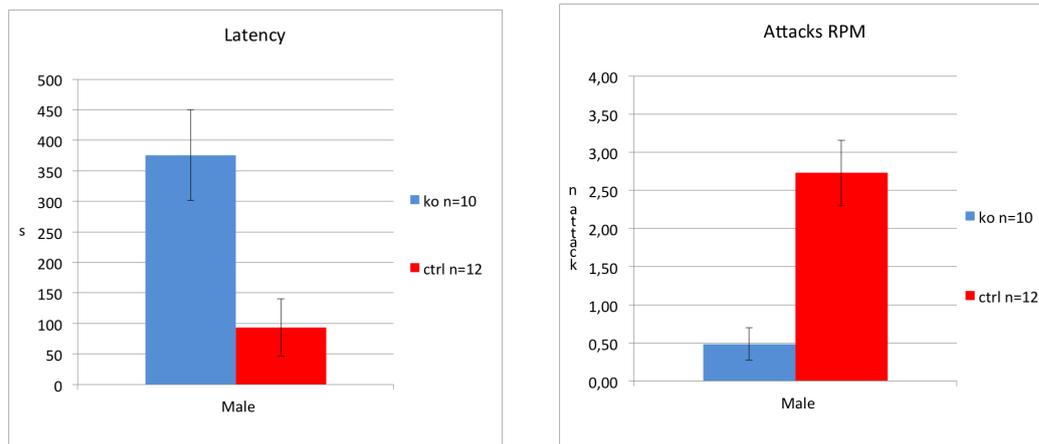
(b) Attacco dell' intruso (maschio CD1) al residente $Npy1r^{r.fb}$

Figura 6.2: Test resident/intruder

6.1.2 Risultati

Sui dati del resident/intruder test ho condotto una analisi a due vie (genotipo e fenotipo) sulle latenze del primo attacco e sul numero di attacchi al minuto sferrati da ogni animale. Per quanto riguarda le latenze, c'è un forte effetto del genotipo

($F_{(1,18)}=10,23$, $p<0,05$), che mostra come queste sia più alte rispetto ai controlli, ma esiste sorprendentemente anche una tendenza alla significatività del fattore fenotipo, ($F_{(1,18)}=4,05$, $p=0,06$) che evidenzia come gli animali agouti sembrano avere in genere tempi di latenza più lunghi rispetto ai black. Analizzando invece il numero di attacchi al minuto, ANOVA ci mostra un effetto fortemente significativo del genotipo ($F_{(1,18)}=16,95$, $p<0,001$), con i KO che attaccano significativamente meno rispetto ai controlli.



(a) Latenza del primo attacco nel test resident/intruder: si nota un forte effetto del genotipo ($F_{(1,18)}=10,23$, $p<0,05$)

(b) Numero di attacchi sferrati durante i 10 min del test resident/intruder: si nota un effetto fortemente significativo del genotipo ($F_{(1,18)}=16,95$, $p<0,001$)

Figura 6.3: Risultati test resident/intruder

6.2 Stress psicosociale cronico (CPS)

Per testare la risposta allo stress in maschi KO e controlli mi sono infatti servito di un modello di stress psicosociale cronico (CPS), basato su un modello di competizione di tipo “resident/intruder”, al fine di valutare la risposta a lungo termine della coabitazione con un intruso. La procedura utilizzata nel presente esperimento è una versione modificata del nostro paradigma standard di stress cronico da subordinazione (Bartolomucci *et al.*, 2001, 2004). La procedura modificata sperimentale è stata recentemente introdotta per indagare la vulnerabilità a stress di ceppi di topi inbred e/o transgenici (Bartolomucci *et al.*, 2010) che sono spesso caratterizzati da un fenotipo aggressivo inferiore rispetto ai maschi del ceppo CD1 outbred (Parmigiani *et al.*, 1999). La procedura modificata prevede che il topo sperimentale sia stabulato precedentemente nella gabbia sperimentale, in modo da stabilirvi il proprio territorio (residente) e solo successivamente sia inserito nella sua gabbia un maschio intruso CD1 che gli usurperà la dominanza sul territorio (Bartolomucci *et al.*, 2010), in modo da sperimentare così la perdita del territorio e la sconfitta sociale (*social defeat*) che, come dimostrato da precedenti studi del nostro laboratorio, è la condizione che più rafforza gli effetti dell’ esposizione ad uno stress cronico nei topi (Bartolomucci, 2005; Bartolomucci *et al.*, 2005; Bartolomucci, 2007).

6.2.1 Valutazione anedonia

In psicologia e psichiatria, il termine anedonia descrive l'incapacità di un paziente a provare piacere, anche in circostanze e attività normalmente piacevoli come dormire, nutrirsi, le esperienze sessuali e il contatto sociale. L'anedonia è considerata uno dei sintomi più indicativi dei vari disturbi e malattie mentali. In primo luogo i disturbi dell'umore e la depressione. Tale sintomo è uno di quelli maggiormente citati dai manuali per la diagnostica con criteri statistici (DSM e ICD) anche se in modo diverso (il DSM, per esempio, non lo associa alla depressione). L'anedonia è considerata un sintomo di carattere accessorio, ma comunque significativo, nella diagnosi della schizofrenia e di alcuni disturbi di personalità. Adattando la definizione di anedonia al topo, valutare comportamenti di tipo aneddótico significa trovare una attività, piacevole all'animale, quantificabile, al fine di misurare esattamente la "quantità" di tale comportamento di ricerca del piacere; generalmente si usa a tale scopo la naturale propensione del topo a preferire acqua nella quale è disciolto dello zucchero, piuttosto che acqua semplice. Ho condotto questo tipo di valutazione sugli animali sottoposti al paradigma sperimentale di stress psicosociale cronico sia prima che dopo il periodo di stress, alla ricerca di modificazioni nei livelli di anedonia legati alle modifiche psicofisiche che questo tipo di protocollo comporta.

6.2.2 Materiali e metodi

Valutazione anedonia

Inizialmente vengono preparate due serie di beverini, una con acqua e una con soluzione zuccherina al 10% (sucrose). Ogni beverino viene poi pesato. Ai fini di una buona riuscita del test, subito prima dell'inizio, ogni animale viene pesato e successivamente si inseriscono simultaneamente, in ogni gabbia, due beverini, uno con acqua e uno con il sucrose. Dopo 24 ore i beverini vengono tolti e pesati nuovamente, in modo da sapere il quantitativo di acqua e sucrose bevuto dall'animale. Infine vengono pesati anche gli animali.



Figura 6.4: Test di preferenza al sucrose

Durante questo test, ai topi è stata data, per 24 h, la possibilità di scegliere tra due bottiglie, una con una soluzione di saccarosio all'1% e un'altra con acqua di ru-

binetto. Il consumo di acqua e soluzione di saccarosio è stato stimato semplicemente pesando le bottiglie e calcolando la differenza di peso con il giorno precedente. La valutazione è avvenuta all’inizio ed alla fine del protocollo di stress cronico.

Stress psicosociale cronico

La procedura, originariamente descritta da Bartolomucci *et al.* (2001), e ampiamente validata in letteratura, è stata qui utilizzata con piccole modifiche per adattarsi ai requisiti del nostro studio. Il modello è costituito da un periodo basale di una settimana, seguito da 4 settimane di stress cronico (fase sperimentale) in cui due animali coabitano nella stessa gabbia (38 x 20 x 18 cm) divisa in due ambienti per mezzo di una paratia, che permette un continuo contatto sensoriale, ma nessuna interazione aggressiva, ed è basato sulla naturale propensione dei topi maschi a combattere per la conquista ed il mantenimento del territorio. Come animali residenti, abbiamo utilizzato 10 maschi KO e 12 maschi controllo dell’età di 100 giorni, tutti allevati da madri CD1 e alloggiati individualmente nella gabbia sperimentale dal momento dell’isolamento e quindi residenti nel loro territorio. All’inizio della fase di stress ogni topo residente ha ricevuto un intruso di peso simile al proprio, fino a quel momento stabulato individualmente. Ai due animali è stato permesso di interagire liberamente per 10 min al giorno (non oltre al fine di prevenire ferite troppo gravi). La partizione è stata rimossa ogni giorno, sempre alla stessa ora, per un massimo di 10 minuti per consentire topi interagire e stabilire un status sociale. Durante l’interazione sociale comportamenti offensivi e difensivi sono stati registrati e lo status sociale è stato determinato come segue: che attacca con maggiore frequenza e violenza è stato definito come “dominante” (Dom), mentre il topo che subisce maggiormente gli attacchi emettendo vocalizzazioni e mostrando la tipica postura di *upright* (fig. 6.6 (a)) è stato definito come “subordinato” (Sub), secondo quanto precedentemente descritto da Bartolomucci *et al.* (2001, 2004, 2009).

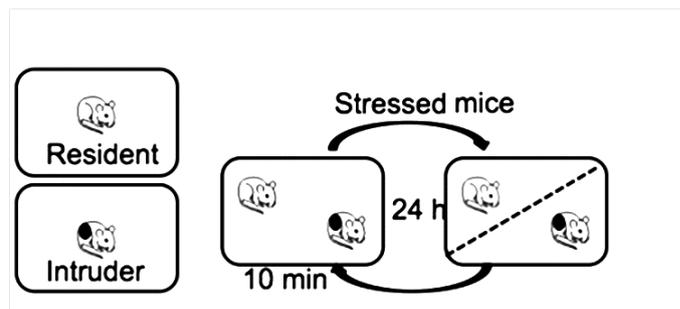


Figura 6.5: Chronic Psychosocial Stress (CPS)

E’ stato anche effettuato il monitoraggio dell’attività locomotoria dei soggetti sperimentali per tutto il periodo di stress, mediante il sistema di sensori ad infrarosso automatico già visto nel paragrafo 4.3. Quando la lotta deve essere interrotta prima i 10 minuti, il numero attacchi è stato calcolato in proporzione, rapportandolo ai dieci minuti totali. Dopo l’interazione, gli animali sono stati separati dalla paratia al fine di evitare comportamenti aggressivi, pur mantenendo il contatto sensoriale.



(a) Upright posture



(b) Gabbia per CPS con paratia



(c) Sistemazione gabbie durante CPS

Figura 6.6: Materiali e metodi per Chronic Psychosocial Stress (CPS)

Durante la fase di stress, il peso corporeo e l'assunzione di cibo è stata monitorata ogni tre giorni; cibo ed acqua erano ad libitum per tutti i topi sperimentali. In aggiunta, alla fine del protocollo di stress psicosociale cronico, agli animali è stata somministrata dieta ipercalorica per due settimane, al fine di verificare l'eventuale sviluppo di obesità indotta da stress.

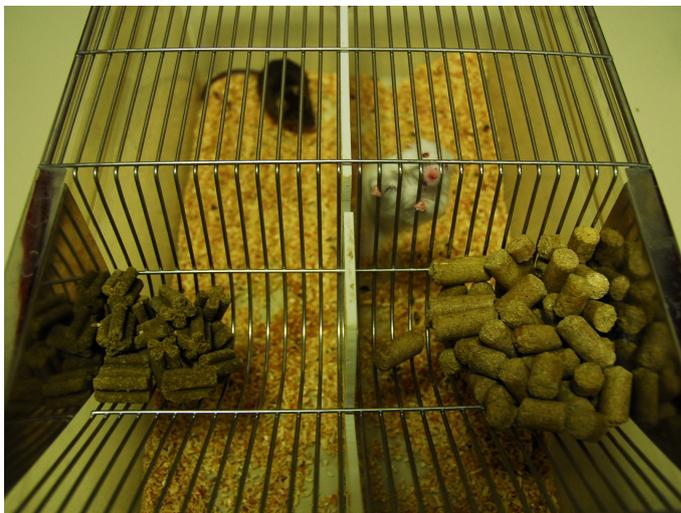


Figura 6.7: Somministrazione dieta ipercalorica alla fine del protocollo di CPS

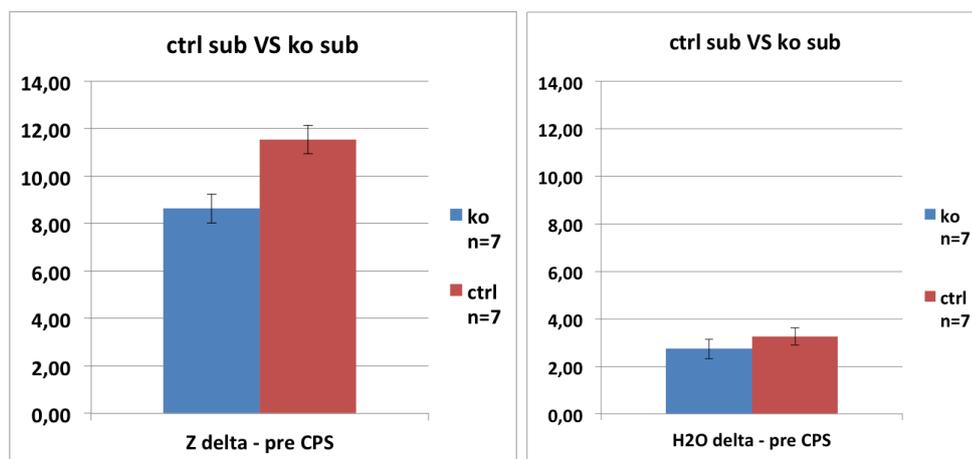
Ibridazione in situ di mRNA di Y1R

Al sacrificio, oltre ai tessuti adiposi bianco (WAT), bruno (BAT) e ai campioni di plasma, è stato anche prelevato il cervello, con lo scopo di quantificare, mediante ibridazione “in situ”, l' mRNA del recettore Y1R nei nuclei ipocampali CA1, CA3 e nel giro dentato (DG). L' ibridazione in situ per il recettore Y1R è stata effettuata secondo la metodica descritta da Wisden e Morris (2002) su sezioni di encefalo di topo. I cervelli sono stati prelevati al momento del sacrificio, congelati immediatamente in ghiaccio secco, conservati a -80°C e successivamente tagliati al criostato in sezioni coronali di $14\ \mu\text{m}$; L' ibridazione avviene con sonde oligonucleotidiche specifiche per Y1R marcate con 35S dATP; sono state utilizzate quattro sonde complementari allo stesso mRNA in posizioni diverse per aumentare la sensibilità del segnale. Dopo l' ibridazione le sezioni di encefalo sono state esposte a lastra fotografica per un periodo di settimane a temperatura ambiente. Per la quantificazione, le lastre fotografiche sono state osservate con uno stereomicroscopio (Stemi 2000-C, Nikon, Milano, Italia) dotato di una fotocamera digitale Nikon E-990; le sezioni del cervello sono state digitalizzate e l'analisi è stata effettuata con il software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA). L' area di interesse (AOI) dei nuclei chiaramente distinguibili è stata definita seguendo i confini della regione marcata (DG), mentre sono stati utilizzati 3-4 punti per ogni fetta in regioni poco contrastate (CA1, CA3). Sono state misurate la densità ottica e la media seguendo una calibrazione con standard ottici come suggerito dalle istruzioni del software. Per tutti i campioni è stata fatta la sottrazione del background: sono stati misurati da 3 punti (unità OD) nella

regione circostante la sezione di encefalo e, una volta in media, sottratti dal corrispondente valore di densità ottica del nucleo in esame. Le coordinate anatomiche dei nuclei rispetto alla linea di Bregma sono; DG, strato granulare -1,46 a -1,70 mm, CA1 e CA3 (strato piramidale) -1, da 58 a -1,94 mm.

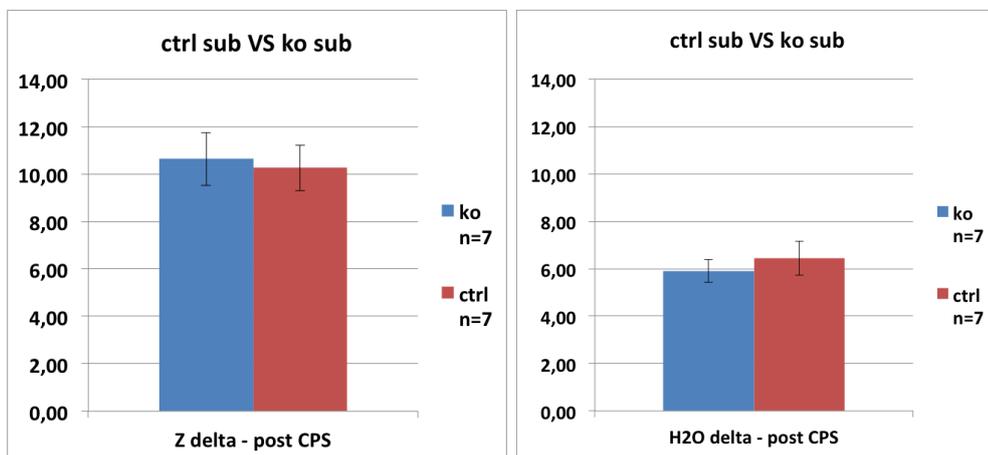
6.2.3 Risultati

Anedonia



(a) Risultati sul consumo di soluzione zuccherina nelle 24h precedenti l'inizio del protocollo CPS

(b) Risultati sul consumo di soluzione zuccherina nelle 24h precedenti l'inizio del protocollo CPS



(c) Risultati sul consumo di soluzione zuccherina nelle 24h successive la fine del protocollo CPS

(d) Risultati sul consumo di soluzione zuccherina nelle 24h successive la fine del protocollo CPS

Figura 6.8: Valutazione preferenza di una soluzione zuccherina rispetto alla semplice acqua prima e dopo il protocollo di stress psicosociale cronico; si nota un aumento del consumo di acqua generale fra prima o dopo il protocollo, mentre per quanto riguarda il consumo di zucchero si evidenzia un effetto dello stress opposto su KO e controlli ($F_{(1,17)}=31,46$, $p<0.01$): mentre i primi aumentano il consumo di zucchero, i secondi diminuiscono.

Sui consumi di acqua e soluzione zuccherina nei subordinati (fig. 6.8) ho condotto un'analisi della varianza per misure ripetute a due fattori (genotipo e tempo), che ha rilevato una differenza significativa nel consumo di zucchero fra subordinati KO e controlli già prima dello stress (genotipo: $F_{(1,17)}=6,66$, $p<0.05$), con i KO che consumano significativamente meno soluzione zuccherina rispetto ai controlli; non si rilevano invece differenze per quanto riguarda il consumo di acqua.

ANOVA ha rilevato inoltre un altro effetto molto forte, ovvero quello di interazione fra tempo (prima o dopo lo stress) ed il genotipo $F_{(1,17)}=31,46$, $p<0.01$), che mostra come la differenza iniziale fra KO e controlli scompare sotto l'effetto dello stress psicosociale cronico; gli andamenti del consumo di zucchero, infatti, convergono fino ad arrivare a livelli equivalenti. Il consumo di acqua, al contrario, aumenta in maniera identica fra KO e controlli.

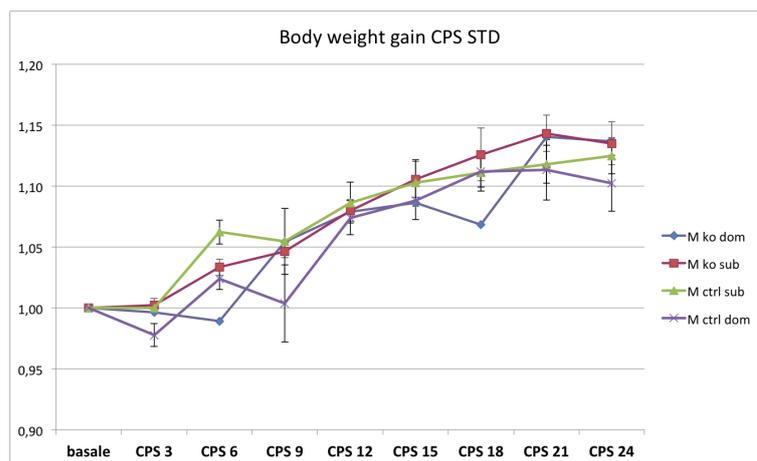
Stress psicosociale cronico (CPS)

Dopo i primi giorni di interazione violenta fra le diadi di animali, è risultato subito chiaro che la maggior parte degli animali KO avesse un bassissimo livello di aggressività, come già notato in un Resident/Intruder test effettuato preliminarmente al CPS (vedi fig. 6.3) introducendo maschi CD1 sconosciuti nelle gabbie di stabulazione degli NPY1R; infatti dei KO solo uno è divenuto dominante, mentre gli altri tutti subordinati, a differenza dei controlli che si sono ripartiti in modo più bilanciato (7 subordinati e 5 controlli).

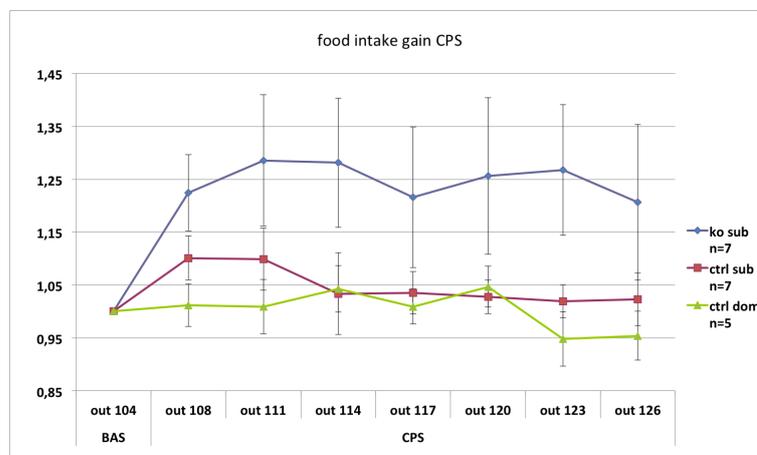
Ho analizzato sia l'accrescimento corporeo che il consumo di cibo, sia durante il periodo di stress cronico (fig. 6.9), sia durante la somministrazione di dieta ipercalorica dopo il protocollo di CPS (fig. 6.10). Tutte le analisi sono concentrate sui subordinati, categoria in cui le modificazioni psico-fisiche dovute allo stress sono maggiori. Per quanto riguarda il guadagno di peso corporeo durante le tre settimane di CPS l'analisi della varianza a due fattori (genotipo e tempo) non evidenzia differenze significative, con subordinati KO e controlli che aumentano di peso in modo lineare, con lo stesso tipo di incremento. Per quanto riguarda il consumo di cibo non si riscontrano differenze nell'incremento del *food intake* rispetto al basale che raggiungano la significatività statistica, questo a causa dell'esiguità del campione e della variabilità dei dati, ma si può notare una tendenza dei KO a mangiare più di KO dominanti e di controlli dominanti.

Somministrazione HFD dopo CPS

Per quanto riguarda il periodo di somministrazione di HFD successivo allo stress cronico, mentre non si riscontrano differenze fra subordinati KO e controlli nella quantità di cibo consumata (fig. 6.10), esiste un effetto fortemente significativo di interazione fra genotipo e tempo, con i KO che guadagnano molto più peso rispetto ai controlli sotto dieta ipercalorica ($F_{(10,130)}=4,20$; $p<0.0001$).

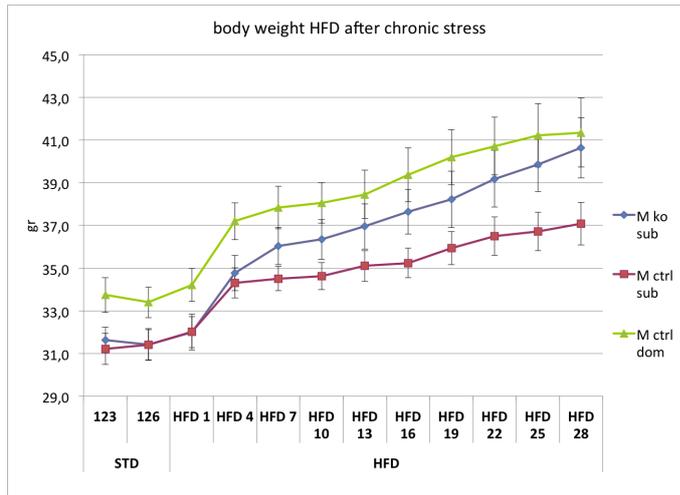


(a) Incremento peso corporeo durante il protocollo CPS

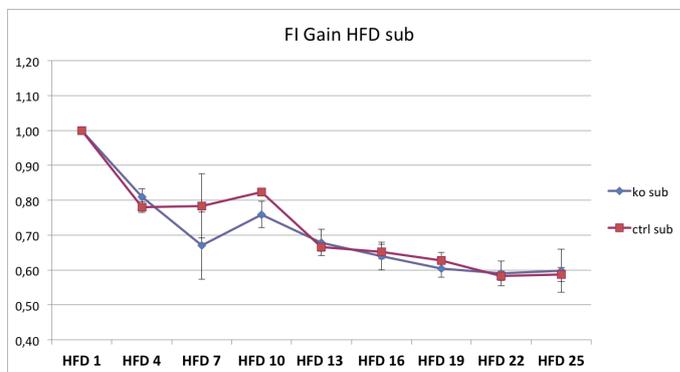


(b) Incremento del consumo di cibo durante il protocollo CPS

Figura 6.9: Incremento peso corporeo e consumo di cibo durante il protocollo di stress psicosociale cronico



(a) Incremento peso corporeo durante il protocollo CPS; si nota come i subordinati KO guadagnino molto più peso rispetto a quelli controllo, se alimentati con dieta ipercalorica ($F_{(10,130)}=4,20$; $p<0.0001$).



(b) Incremento del consumo di cibo durante il protocollo CPS

Figura 6.10: Parametri durante la somministrazione di HFD dopo lo stress psicosociale cronico

Glucose Tolerance Test

Per analizzare l'andamento delle curve glicemiche del GTT dopo la dieta ipercalorica ho eseguito una analisi della varianza a due fattori (sesso e tempi), da cui risulta un effetto primario del genotipo ($F_{(1,36)}=5,18$; $p<0.05$). Una successiva analisi mediante post-hoc ha rilevato come questa differenza sia significativa a T30 e T60 ($p=0.05$ e $p<0.05$ rispettivamente).

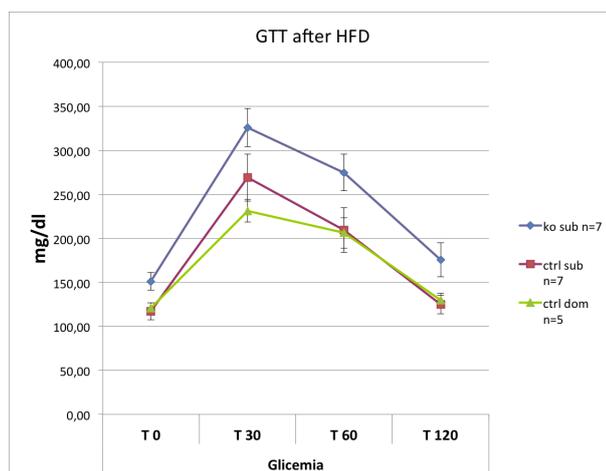
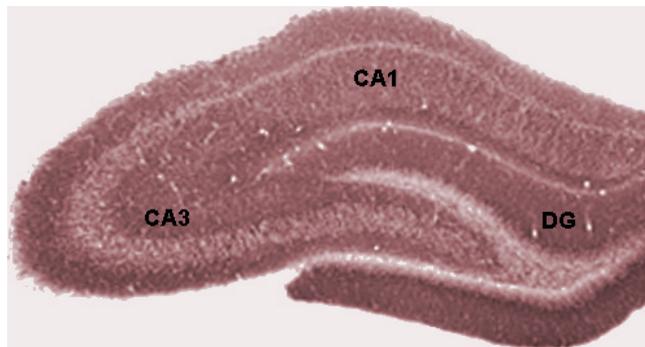


Figura 6.11: Valori del GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica in animali stressati cronicamente

Ibridazione in situ su cervelli

Ho inoltre condotto un'analisi sulla densità ottica dell'ibridazione in situ di mRNA di NPY1R nelle regioni ippocampali CA1, CA3 e DG effettuate sui cervelli dei subordinati, KO e controlli. L'ANOVA è stata condotta a due fattori, includendo anche il fenotipo, dato che il campione lo permetteva. Per nessuna delle regioni ho trovato effetti del fenotipo, mentre per quanto riguarda il genotipo, in CA1 e DG si ha una densità inferiore nei KO rispetto ai controlli; in CA1 si tratta di una tendenza alla significatività ($F_{(1,8)}=4,18$; $p=0.07$), mentre nel DG l'effetto del genotipo è fortemente significativo ($F_{(1,8)}=9,99$; $p<0.05$).



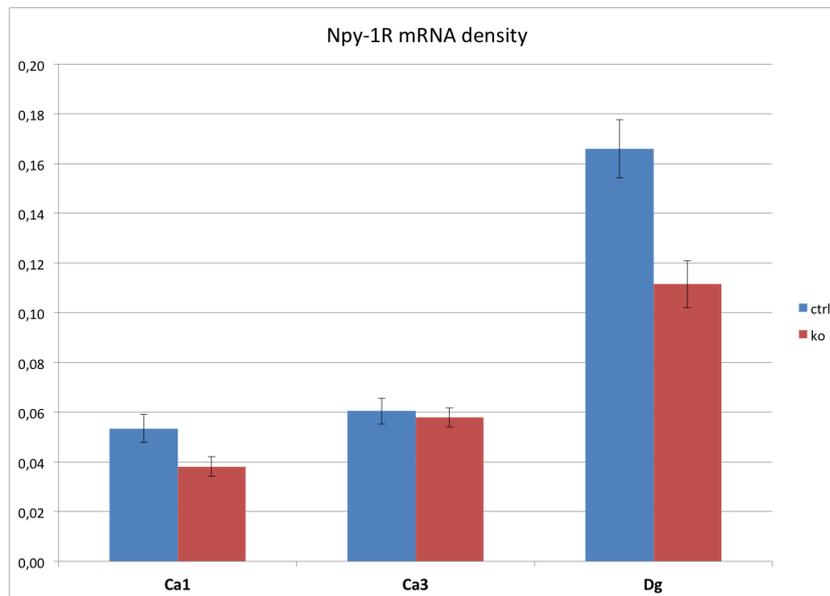
(a) Collocazione delle regioni ippocampali oggetto di studio



(b) Ibridazione in situ su cervello di un KO subordinato



(c) Ibridazione in situ su cervello di un controllo subordinato



(d) Densità ottica di mRNA per NPY-1R nei nuclei ippocampali CA1, CA3 e giro dentato; si rileva una tendenza alla significatività ($F_{(1,8)}=4,18$; $p=0,07$) in CA1, mentre nel DG l'effetto del genotipo è fortemente significativo ($F_{(1,8)}=9,99$; $p<0,05$)

Figura 6.12: Risultati ibridazione in situ

6.2.4 Discussione

Dai dati ricavati da questo esperimento di risposta allo stress posso concludere che c'è senz'altro uno sbilanciamento nei livelli di aggressività e di competizione per il territorio con i KO che presentano livelli senz'altro inferiori di questo tipo di comportamenti (vedi fig. 6.3). Un dato particolarmente interessante è la maggiore propensione dei KO, dopo uno stress psicosociale cronico, a sviluppare obesità se alimentati con una dieta ipercalorica. E' da notare che ciò avviene senza che vari la quantità di cibo consumata rispetto ai controlli, indice quindi di un disregolazione metabolica, confermata del resto anche da una diversa risposta ad un carico di glucosio, evidenziata dal G_{TT}. Queste differenze trovano riscontro anche nella densità dell' mRNA di NPY1R nei nuclei ippocampali, responsabili dell' azione inibitoria sull' asse HPA (vedi paragrafo 2.2.2).

Dai dati ottenuti dal test di valutazione dell'anedonia si nota che, mentre nei controlli avviene quello che normalmente ci si aspetta dopo un periodo di stress psicosociale cronico, ovvero una diminuzione del consumo di soluzione zuccherina, indice di anedonia, nei KO questo non avviene, mentre si ha addirittura un effetto opposto: sembra infatti che questi animali, anedonici in situazione basale, prima dello stress, ricerchino di più lo zucchero da stressati, dato che farebbe presagire una ricerca di "comfort food" consolatoria.

I dati dell'ibridazione in situ hanno mostrato come ci sia una effettiva differenza fra KO e controlli a livello di mRNA di Y1R riscontrato nell'ippocampo, che come abbiamo visto è una regione chiave nel ruolo che NPY esercita su stress e aggressività (fig. 6.1).

Sono ancora in elaborazione sia i dati sull'attività locomotoria durante il periodo di stress, sia le analisi del profilo ematico e dei livelli ematici di corticosteroidi.

Conclusioni

Nel lavoro di ricerca oggetto di questa Tesi svolto durante il mio Dottorato, ho esaminato un modello murino in cui è stata ottenuta una inattivazione condizionale spazio-temporale del recettore (Y1R) per il neuropeptide Y (NPY) nei neuroni del proencefalo di topo adulto che esprimono α CaMKII. Nel capitolo 2 ho esposto come questo neuropeptide, ed in particolare modo il suo sottotipo recettoriale Y1R siano implicati in numerosissimi circuiti e funzioni, sia sul piano più strettamente metabolico che su quello comportamentale/ansioso.

Nel capitolo 3 ho esposto le tecniche per la generazione e l'adozione di questo modello animale, nonché per l'analisi del comportamento materno; abbiamo così visto come madri diverse adottano comportamenti diversi verso la cucciolata e di come le cure materne siano in realtà la risultante di molti comportamenti diversi. Per quanto il campione necessiti senza dubbio di essere ampliato, si vede la tendenza della madri C57 ad effettuare una minore quantità di allattamento in postura "Arched back", fattore che rende questo ceppo quello dei tre con un peggiore stile di cura materna. FVB e CD1 si rivelano delle buone madri, ma il peso dei piccoli prima dello svezzamento (ed anche le curve di crescita successive allo svezzamento, hanno mostrato un'altra variabile fondamentale che distingue madri FVB e CD1: la quantità di latte prodotta e probabilmente la diversa composizione organolettica. In base a quanto affermato in Bertocchi *et al.* (2011), questa potrebbe essere una variabile più importante di quanto si pensi, essendo il latte materno in grado di modificare la responsività delle ghiandole surrenali di secernere corticosterone in risposta a stimolazione da parte dell'ormone adrenocorticotropo.

Andando in ordine abbiamo visto a tal proposito come la semplice crescita corporea dallo svezzamento all'età adulta sia diversa a seconda del tipo di madre adottiva avuta, e quindi a seconda delle esperienze precoci vissute, differenze ben visibili nei maschi, dove i KO hanno sempre curve di crescita più basse rispetto ai controlli, ma assai meno nelle femmine, dove questo effetto è addirittura opposto nel caso di adozione da parte di madri CD1 (le KO pesano più delle controlli), oppure non presente nelle adottate da madri FVB. Durante l'analisi dei dati ho trovato una correlazione inaspettata fra colore del manto e crescita corporea, che spiega anche la variabilità che si notava fra ogni coorte di animali allevata: la correlazione fenotipo agouti/genotipo KO massimizza l'effetto di divario ponderale fra KO e controlli, ma questo solo in combinazione con l'adozione da parte di madri CD1 e in modo differenziale fra maschi e femmine, mentre questa combinazione non ha effetti significativi sulle altre adozioni. Andando a ricercare possibili cause di questa interazione, merita di essere indagato in modo più approfondito il legame fra il circuito ipotalamico AGRP/NPY (fig. 2.3) ed il fenotipo agouti, codificando lo stesso gene sia per il colore del pelo "agouti", che per la proteina AGRP, ovvero Agouti Related Protein, che con

NPY abbiamo visto costituire il circuito oressizzante nel nucleo Arcuato (ARC) dell'ipotalamo.

Per quanto riguarda il consumo di cibo durante la dieta ipercalorica, KO e controlli, maschi e femmine, hanno per tutte e tre le settimane un consumo maggiore in confronto ai rispettivi controlli, per quanto il picco del consumo di cibo della prima settimana nei maschi KO sia ripidissimo rispetto alle femmine KO; non è stato possibile, dati i campioni, indagare se e come guadagno di peso e di consumo di cibo siano in qualche modo connessi al fenotipo, ma alla luce di quanto visto nelle curve ponderali di crescita, il fenomeno merita senz'altro di essere approfondito.

Il GTT a fine periodo di dieta ipercalorica rivela quanto atteso: tutti i maschi KO mostrano livelli glicemici a T30 superiori ai controlli, con valori che superano i 250 mg/dl; lo stesso effetto non si verifica nelle femmine dove i valori restano sempre inferiori ai 250 mg/dl e dove non si riscontrano differenze fra KO e controlli. Andando a vedere la quantità di grasso bianco perigonadico post mortem il dato è lampante: nei maschi FVB e CD1 i KO hanno più grasso dei controlli, mentre nelle femmine questo avviene solo nelle femmine allevate da CD1. Per quanto riguarda i livelli ematici di colesterolo totale non si riscontrano differenze fra KO e controllo nei maschi, mentre nelle femmine solo se allevate da madri C57; quello che però varia è la percentuale di colesterolo HDL ed LDL: mentre il primo varia in base al genotipo nei maschi, nelle femmine l'effetto principale sembra quello del tipo di adozione, fenomeno che si inverte nell'LDL, dove l'andamento è opposto. Per quanto riguarda i trigliceridi invece, l'effetto principale è quello del tipo di adozione.

In conclusione abbiamo quindi visto come, nel modello animale utilizzato, come dimostrato in precedenza da (Bertocchi *et al.*, 2011) la crescita corporea varia in relazione al genotipo, al sesso e al tipo di cura materna ricevuto nella prima settimana di vita. L'analisi settimanale del peso corporeo e del comportamento alimentare in topi maschi e femmine NPY1R^{rfb} e i controlli NPY1R^{2lox} ha confermato che la delezione del Y1R nel topo maschio adulto, dopo PND 40, induce un rallentamento della crescita corporea, in modo che i maschi KO pesano meno rispetto ai maschi controllo, nonostante la quantità in grammi di dieta standard consumata fosse uguale in entrambi i gruppi. E' importante osservare che la diminuzione del peso corporeo è riscontrabile solo nei topi di sesso maschile e questo dimostra che la delezione del Y1R nel proencefalo altera il peso corporeo in modo sesso dipendente. Studi condotti nel nostro e in altri laboratori dimostrano differenze relative al comportamento alimentare, legate al genere (Eva *et al.*, 2006a). Dal punto di vista metabolico quindi possiamo affermare che:

- è confermata la minore crescita corporea dei maschi con inattivazione condizionale di NPY1R in area limbica;
- si evidenzia una maggiore suscettibilità all'aumento di peso in seguito a dieta grassa degli animali maschi KO rispetto ai controlli;
- si hanno livelli di glicemia maggiori in maschi KO in seguito a somministrazione di glucosio esogeno rispetto ai controlli;
- vi è un aumento del tessuto adiposo perigonadico-viscerale in topi KO rispetto a maschi controlli nutriti con STD;

- il profilo ematico varia in base al tipo di adozione, ma anche in base all'interazione fra la variabile adozione ed il genotipo.

Questi risultati suggeriscono che il sistema NPY in aree limbiche rivesta un ruolo importante nella regolazione del metabolismo, del bilancio energetico e dell'efficienza calorica, vale a dire la capacità di un organismo di trasformare le calorie ingerite in massa corporea. Come conseguenza di un metabolismo energetico deregolato, possono infatti presentarsi condizioni fisiche responsabili della sindrome metabolica, una situazione clinica ad alto rischio cardiovascolare che comprende una serie di fattori di rischio e di sintomi che si manifestano contemporaneamente nell'individuo (Lakka *et al.*, 2002).

Tali condizioni nell'uomo sono:

- accumulo di grasso viscerale che fa misurare una circonferenza vita maggiore o uguale a 94 cm nell'uomo e 80 cm nella donna;
- elevati livelli di trigliceridi che superano i 150 mg/dl;
- bassi livelli di HDL (< 40 mg/dl negli uomini e < 50 mg/dl nelle donne);
- pressione arteriosa elevata (con una massima che supera i 130 mm Hg e una minima che supera gli 85 mm Hg);
- elevati valori di glicemia a digiuno (> 100 mg/dl).

Una vasta gamma di studi ha dimostrato che NPY, a livello di specifiche strutture cerebrali, tra cui amigdala e ippocampo, riveste un ruolo fondamentale nel regolare il comportamento emozionale e le risposte a stimoli stressanti, e ciò avviene attraverso il legame al recettore NPY1R. EPM e OF sono tra i test più usati per svolgere analisi in questo campo. Il test dell' EPM misura la propensione del topo ad abbandonare una zona più sicura (bracci chiusi) per entrare in una più esposta ed illuminata, per cui potenzialmente ansiogena (bracci aperti), e viceversa. Con il test dell' Open Field sociale, invece, si valutano il grado di esplorazione di un nuovo ambiente e il livello d'interazione sociale con un intruso aggiunto in un secondo momento.

Nel capitolo 5 ho presentato i risultati dei test svolti nell'ottica di caratterizzare il modello animale dal punto di vista comportamentale. Nell' Elevated Plus Maze abbiamo visto come vi sia un effetto opposto del genotipo su maschi e femmine per quanto riguarda la frequenza di uscita sul braccio aperto, evento chiave di questo test: rispetto ai controlli, i KO maschi escono con minore frequenza sui bracci aperti, denotando un comportamento più ansioso, a differenza delle KO femmine che escono più frequentemente delle controllo senza effetto del tipo di adozione se non una tendenza ad una maggiore uscita delle femmine FVB sia KO che controllo.

Nell' Open Field sociale sono andato a testare se questi animali siano socialmente evitanti o meno. Un dato interessante è la maggiore attività locomotoria nell' arena di tutti gli animali adottati da FVB, maschi e femmine, indice di ansietà e di irrequietezza. Per quanto riguarda il tempo trascorso nell'area di interesse sociale, si riscontrano differenze solo negli allevati da C57, ma in modo opposto fra maschi e femmine: nei maschi C57, infatti, i KO passano in T1 e T2 lo stesso tempo nella zona di interazione, denotando una scarsa propensione all' interazione sociale, che invece

è maggiore nei controlli; nelle femmine C57, sono le KO ad avere un più spiccato interesse per l'interazione sociale.

Un effetto interessante nei maschi è, indipendentemente dal ceppo della madre adottiva, la differenza fra la quantità di tempo passata nella zona sociale e in quella di evitamento da maschi di fenotipo agouti e quelli di fenotipo black. Una variabile apparentemente insignificante come il colore del manto sembra comportare invece un rafforzamento delle differenze fra KO e controlli spingendo i controlli verso una più spiccata socialità mentre al contrario i KO verso un disinteresse verso il target sociale. Per quanto riguarda le femmine questo effetto diversificato fra agouti e black si ha solamente nella distanza coperta all'interno dell'arena.

Per quanto riguarda il test di ipofagia indotta da novità, ho voluto testare in questo modo sia la neofobia nei confronti di un cibo nuovo, per quanto appetitoso, e per un ambiente nuovo (la lettiera pulita); sia i maschi che le femmine KO, di qualsiasi adozione, dimostrano un netto abbassamento dei tempi di latenza, sia nel primo che nell'ultimo giorno, denotando una sorta di non interesse per l'ambiente o la novità. Quanto appena detto mi ha indotto a pensare a questo modello animale come ad un modello con uno scarso interesse all'ambiente circostante e a stimoli di tipo sociale, tanto da indurmi a condurre nuovi test, alla ricerca di elementi che possano far presagire a disturbi dello spettro autistico. Ho infatti condotto uno studio atto a valutare la propensione ad iniziare relazioni di tipo sociale sia con un conspecifico conosciuto, sia con uno sconosciuto, dal quale è effettivamente emersa una tendenza, nei soli maschi, a non discriminare fra le due situazioni; data l'esiguità del campione questa è ancora solo una tendenza, che merita di essere ancora indagata in futuro. Contestualmente a questo ultimo test, ne ho condotto un altro, ad esso connesso, sulla discriminazione di odori conosciuti o sconosciuti, con valenza sociale o meno, dati che sono però ancora in corso di analisi.

Dai dati ricavati dalle procedure di stress cronico e dal test del residente/intruso, il modello animale KO è risultato presentare una scarsissima aggressività e competizione territoriale (vedi fig. 6.3), dato in contrasto con quanto descritto da Karl *et al.* (2004). Un altro dato particolarmente interessante è la maggiore propensione dei KO, dopo uno stress psicosociale cronico, a sviluppare obesità indotta da dieta ipercalorica. E' da notare che ciò avviene senza che vari la quantità di cibo consumata rispetto ai controlli, indice quindi di un disregolazione metabolica, confermata del resto anche da una diversa risposta ad un carico di glucosio, evidenziata dal GTT, dove i KO raggiungono livelli di glicemia superiori a 300 mg/dl a T30. Le differenze comportamentali fra KO e controlli trovano riscontro anche nella densità dell' mRNA di NPY1R nei nuclei ippocampali, responsabili dell'azione inibitoria sull'asse HPA (vedi paragrafo 2.2.2 e figura 6.1).

Il neuropeptide Y (NPY) è uno dei peptidi più ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale, sia negli umani che nei roditori ed infatti, come abbiamo visto, è coinvolto nel controllo di un'ampia serie di funzioni fisiologiche quali assunzione di acqua e cibo, apprendimento e memoria, locomozione, regolazione della temperatura corporea, comportamento sessuale ed emozionale, eccitabilità neuronale, omeostasi cardiovascolare, secrezione ormonale e ritmi circadiani (Baraban *et al.*, 1997; Colmers e Bleakman, 1994; Grundemar *et al.*, 1992; Inui, 1999; Munglani *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1993; Vezzani *et al.*, 1999; Wahlestedt e Reis, 1993).

Il sistema NPY svolge, tra gli altri, un ruolo fondamentale nel comportamento alimentare, il quale risulta molto importante per il mantenimento dell'omeostasi energetica ed è regolato da diversi segnali neuronali, metabolici ed endocrini, integrati a livello dell'ipotalamo. Segnali ormonali e neuronali con azione a breve termine che derivano dal tratto gastrointestinale, tra cui colecistochinina (CCK), polipeptide pancreatico (PP) e grelina, controllano la quantità di cibo assunta. La regolazione a lungo termine delle riserve energetiche è data, invece, dai principali ormoni circolanti, insulina e leptina. Tutti questi segnali agiscono attraverso pathways che convergono nell'ipotalamo, un'area che contiene un gran numero di neurotrasmettitori anabolici e catabolici, come anche neuropeptidi, tra i quali NPY è uno dei principali (Eva *et al.*, 2006b). NPY modula il comportamento alimentare inducendo, in particolare, l'assunzione di carboidrati (Stanley *et al.*, 1985). Nell'ipotalamo viene sintetizzato soprattutto in neuroni con corpi cellulari situati nei nuclei della porzione mediale dell'ARC o nei nuclei DMH, che proiettano ad aree adiacenti, come il PVN, l'ipotalamo perifornicale, i nuclei ipotalamici VMH e l'area ipotalamica laterale (LH), che è coinvolta nella regolazione giornaliera dell'appetito e del bilancio energetico. Ci sono anche brevi proiezioni che terminano nella porzione laterale dell'ARC, dove NPY regola negativamente sia l'attività di NPY stesso, sia l'attività anoressizzante dei neuroni prooppiomelanocortinici (POMC). NPY viene anche sintetizzato nel complesso dorsovagale del midollo, che riceve i nervi afferenti dal tratto gastrointestinale e proietta al PVN e al DMH (Eva *et al.*, 2006b).

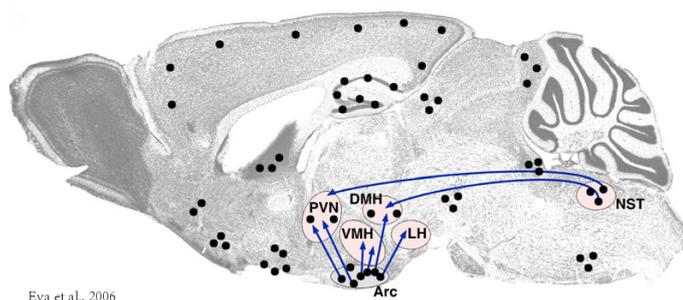


Figura 6.13: Le linee blu indicano il pathway ipotalamico di NPY coinvolto nel comportamento alimentare (tratto da Eva *et al.*, 2006b).

In modelli di obesità indotta tramite dieta si è visto che, quando è presente un bilancio energetico positivo, l'mRNA per NPY nell'ARC può aumentare, diminuire o rimanere inalterato, e questi cambiamenti compensatori sembrano dipendere dal background genetico delle diverse linee di roditori e dal tipo di trattamento (Bergen *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 1992; Leibowitz *et al.*, 2005). Inoltre, non sono state riscontrate variazioni significative nell'espressione dell'mRNA per Y1R nell'ARC di topi, predisposti e resistenti all'obesità, nutriti con una dieta ad alto apporto calorico, e ciò suggerisce che il sistema NPY-Y1R dell'ARC non giochi un ruolo fondamentale nell'indurre l'iperfagia associata a una dieta particolarmente appetibile (Huang *et al.*, 2004). Al contrario, un forte aumento dell'espressione di NPY è stato riscontrato in DMH e VMH di topi con obesità indotta da dieta, suggerendo che l'incrementata attività dei neuroni NPY in queste regioni cerebrali possa partecipare al mantenimento dell'omeostasi energetica (Yang *et al.*, 2008); infatti, si è scoperto

che l' aumentata attività neuronale nel DMH contribuisce allo sviluppo dell' obesità causata da ingestione della dieta ricca in grassi, mentre lesioni del DMH di ratto attenuano l' aumento di peso indotto da dieta grassa (Bellinger e Bernardis, 2002).

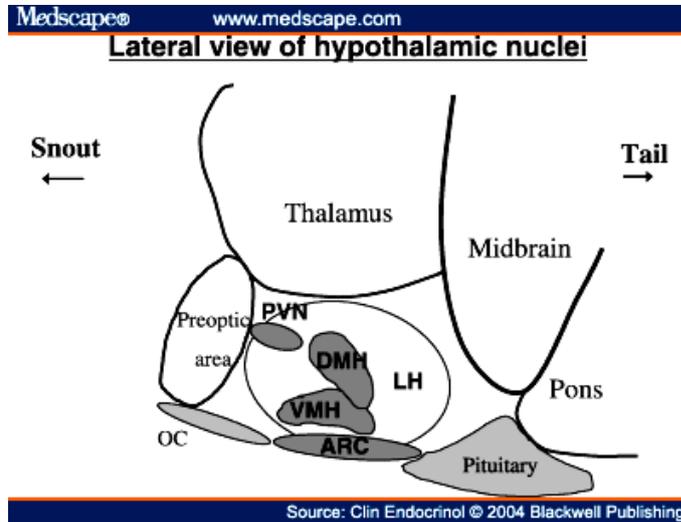


Figura 6.14: Nuclei ipotalami implicati nella regolazione dell' alimentazione

NPY riveste un ruolo centrale anche nella regolazione del comportamento emozionale e nella risposta a stimoli stressanti: diversi studi hanno dimostrato che un articolato network di elementi contenenti il peptide, tra cui, in particolare, amigdala ed ippocampo, gioca un ruolo importante nella regolazione di tali effetti (fig. 2.1). NPY inibisce diverse risposte metaboliche e comportamentali allo stress, tra cui le conseguenze gastrointestinali, il comportamento ansioso e la riduzione del sonno indotta da pentobarbital. E' stato inoltre dimostrato un antagonismo funzionale tra NPY e il fattore di rilascio delle corticotropine (CRF) in vari nuclei del circuito di stress/ansia, come ippocampo (Thorsell *et al.*, 2000), ipotalamo (Hastings *et al.*, 2001), locus coeruleus (Charney, 2004), grigio periacqueduttale (Kask *et al.*, 1998b) e complesso settale (Kask *et al.*, 2001). Secondo Karl *et al.* (2004), NPY è inoltre fondamentale nella coordinazione fra regolazione di assunzione di cibo, crescita e riproduzione, assicurando che la procreazione e la crescita si verifichino solo quando il cibo è abbondante e consentendo il risparmio energetico quando il cibo è scarso. In questo lavoro, infatti, Karl *et al.* (2004) dimostrano come il sistema NPY svolga un ruolo centrale in questo processo, in quanto si è visto come l' ablazione del gene per il recettore Y1 porta ad un forte aumento del comportamento aggressivo territoriale. Questi risultati suggeriscono che NPY agisce attraverso i recettori Y1 regola i circuiti serotoninergici, consentendo quindi il coordinamento fra processi fisiologici di sopravvivenza, come l'assunzione di cibo, con l'attivazione del comportamento aggressivo di tipo territoriale.

In aggiunta, si pensa che possa giocare un rilevante ruolo anche in diversi disordini psichiatrici, tra cui depressione, disordini alimentari, ansia, epilessia e assunzione di alcool (Baraban *et al.*, 1997; Colmers e Bleakman, 1994; Inui, 1999; Stanley *et al.*, 1993; Wahlestedt e Reis, 1993; Eva *et al.*, 2006a); interagisce con una famiglia di re-

cettori accoppiati a proteine G che include cinque sottotipi recettoriali (Michel *et al.*, 1998). Studi in ambito umano hanno riscontrato ad esempio come i livelli ematici di NPY siano significativamente in ridotti di guerra con disturbo post traumatico da stress (PTSD) (Mann, 2003) o in donne vittime di abuso (Seedat *et al.*, 2003).

In conclusione, la mia ricerca ha dimostrato come la delezione condizionale del gene per il recettore NPY-Y1 influisca sul comportamento alimentare ed il metabolismo in modo differente nei due sessi e in base al tipo di cure materne ricevute. Questi risultati mettono in evidenza come il bilancio energetico non venga controllato solamente dalle ormai conosciute vie ipotalamiche, ma anche da aree specifiche del proencefalo tramite il sistema NPY1R. La prosecuzione di questa ricerca potrebbe aprire nuove prospettive per la comprensione dei meccanismi di vulnerabilità alle disfunzioni metaboliche quali l'obesità e diabete di tipo II, a loro volta correlate a numerose altre patologie, e a trattamenti con target specifici nuovi e più efficaci. Numerose evidenze suggeriscono che un folto network di circuiti che utilizzano la segnalazione mediata da NPY, con amigdala e ippocampo come elementi centrali, agisca come un sistema endogeno in grado di attivarsi in situazioni stressanti per l'organismo. In una prospettiva a lungo termine, la regolazione dell'espressione di NPY pare servire come meccanismo per l'adattamento delle risposte comportamentali individuali allo stress cronico, e da questo si può dedurre che una disregolazione di questo sistema potrebbe facilmente contribuire alla patofisiologia di disordini depressivi e dell'ansia. In quest'ottica, come suggeriscono gli effetti di molecole correlate ad NPY su modelli animali farmacologicamente validati per l'azione di farmaci simil-ansiolitici e antidepressivi, si può pensare che i recettori del sistema NPY costituiscano dei validi target per lo sviluppo di nuovi composti da usare per il trattamento di ansia, depressione e dipendenza dall'alcool (Heilig, 2004).

I dati ottenuti dal test di valutazione dell'anedonia, dal resident/intruder e dall'osservazione diretta delle interazioni aggressive fra maschi, nonché dal test dell'ipofagia indotta da novità, suggeriscono un non "interesse" degli animali geneticamente modificati per la novità e per le regole sociali, evidenza che mi ha portato a supporre un comportamento di tipo autistico, che sono andato ad investigare con test specifici; i risultati incoraggiano ad andare avanti anche in questa direzione al fine di investigare in modo più completo questo aspetto di non scarsa rilevanza. Altro fenomeno sicuramente molto interessante che merita di essere maggiormente investigato è l'interazione a livello metabolico e comportamentale fra genotipo degli animali ed il colore del manto.

Alla luce di tutti i risultati visti, possiamo affermare che il modello NPY-Y1 è un buon modello per lo studio delle interazioni fra esperienze precoci e regolazione di ansia e reazione allo stress, nonché per lo studio del ruolo del neuropeptide Y in disturbi quali depressione, autismo e dipendenza da alcool.

Bibliografia

- ABRAHAMS, B. S., GESCHWIND, D. H. (2008). “Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology”. In: *Nat Rev Genet* 9(5): 341–355.
- ABREMSKI, K., HOESS, R. (1984). “Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein”. In: *J Biol Chem* 259(3): 1509–1514.
- AGUZZI, A., BRANDNER, S., MARINO, S., STEINBACH, J. P. (1996). “Transgenic and knockout mice in the study of neurodegenerative diseases”. In: *J Mol Med (Berl)* 74(3): 111–126.
- ALLEN, Y. S., ADRIAN, T. E., ALLEN, J. M., TATEMOTO, K., CROW, T. J., BLOOM, S. R., POLAK, J. M. (1983). “Neuropeptide Y distribution in the rat brain”. In: *Science* 221(4613): 877–879.
- BANNON, A. W., SEDA, J., CARMOUCHE, M., FRANCIS, J. M., NORMAN, M. H., KARBON, B., MCCALEB, M. L. (2000). “Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice”. In: *Brain Res* 868(1): 79–87.
- BARABAN, S. C., HOLLOPETER, G., ERICKSON, J. C., SCHWARTZKROIN, P. A., PALMITER, R. D. (1997). “Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y”. In: *J Neurosci* 17(23): 8927–8936.
- BARTOLOMUCCI, A. (2005). “Resource loss and stress-related disease: is there a link?” In: *Med Sci Monit* 11(5): 147–154.
- BARTOLOMUCCI, A. (2007). “Social stress, immune functions and disease in rodents”. In: *Front Neuroendocrinol* 28(1): 28–49.
- BARTOLOMUCCI, A., CABASSI, A., GOVONI, P., CERESINI, G., CERO, C., BERRA, D., DADOMO, H., FRANCESCHINI, P., DELL’OMO, G., PARMIGIANI, S., PALANZA, P. (2009). “Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress”. In: *PLoS One* 4(1).
- BARTOLOMUCCI, A., CAROLA, V., PASCUCCI, T., PUGLISI-ALLEGRA, S., CABIB, S., LESCH, K. P., PARMIGIANI, S., PALANZA, P., GROSS, C. (2010). “Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice”. In: *Dis Model Mech* 3(7-8): 459–470.
- BARTOLOMUCCI, A., PALANZA, P., GASPANI, L., LIMIROLI, E., PANERAI, A. E., CERESINI, G., POLI, M. D., PARMIGIANI, S. (2001). “Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent”. In: *Physiol Behav* 73(3): 401–410.

- BARTOLOMUCCI, A., PALANZA, P., SACERDOTE, P., PANERAI, A. E., SGOI-FO, A., DANTZER, R., PARMIGIANI, S. (2005). "Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure". In: *Neurosci Biobehav Rev* 29(1): 67–81.
- BARTOLOMUCCI, A., PEDERZANI, T., SACERDOTE, P., PANERAI, A. E., PARMIGIANI, S., PALANZA, P. (2004). "Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress". In: *Psychoneuroendocrinology* 29(7): 899–910.
- BELLINGER, L. L., BERNARDIS, L. L. (2002). "The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies". In: *Physiol Behav* 76(3): 431–442.
- BERGEN, H. T., MIZUNO, T., TAYLOR, J., MOBBS, C. V. (1999). "Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus". In: *Brain Res* 851(1-2): 198–203.
- BERTOCCHI, I., OBERTO, A., LONGO, A., MELE, P., SABETTA, M., BARTOLOMUCCI, A., PALANZA, P., SPRENGEL, R., EVA, C. (2011). "Regulatory functions of limbic Y1 receptors in body weight and anxiety uncovered by conditional knockout and maternal care." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(48): 19395–19400.
- BERTON, O., MCCLUNG, C. A., DILEONE, R. J., KRISHNAN, V., RENTHAL, W., RUSSO, S. J., GRAHAM, D., TSANKOVA, N. M., BOLANOS, C. A., RIOS, M., MONTEGGIA, L. M., SELF, D. W., NESTLER, E. J. (2006). "Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress". In: *Science* 311(5762): 864–868.
- BESECKE, L. M., WOLFE, A. M., PIERCE, M. E., TAKAHASHI, J. S., LEVINE, J. E. (1994). "Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells". In: *Endocrinology* 135(4): 1621–1627.
- BILLINGTON, C. J., BRIGGS, J. E., GRACE, M., LEVINE, A. S. (1991). "Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism". In: *Am J Physiol* 260(2 Pt 2): 321–327.
- BJÖRKQVIST, K. (2001). "Social defeat as a stressor in humans". In: *Physiol Behav* 73(3): 435–442.
- BODNOFF, S. R., SURANYI-CADOTTE, B., AITKEN, D. H., QUIRION, R., MEANEY, M. J. (1988). "The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety". In: *Psychopharmacology (Berl)* 95(3): 298–302.
- BORSINI, F., PODHORNA, J., MARAZZITI, D. (2002). "Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?" In: *Psychopharmacology (Berl)* 163(2): 121–141.

- BRITTON, K. T., AKWA, Y., SPINA, M. G., KOOB, G. F. (2000). "Neuropeptide Y blocks anxiogenic-like behavioral action of corticotropin-releasing factor in an operant conflict test and elevated plus maze". In: *Peptides* 21(1): 37–44.
- BRITTON, K. T., SOUTHERLAND, S., VAN UDEN, E., KIRBY, D., RIVIER, J., KOOB, G. (1997). "Anxiolytic activity of NPY receptor agonists in the conflict test". In: *Psychopharmacology (Berl)* 132(1): 6–13.
- BROBERGER, C., VISSER, T. J., KUCHAR, M. J., HÖKFELT, T. (1999). "Neuropeptide Y innervation and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse". In: *Neuroendocrinology* 70(5): 295–305.
- BROQUA, P., WETTSTEIN, J. G., ROCHER, M. N., GAUTHIER-MARTIN, B., JUNIEN, J. L. (1995). "Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures". In: *Behav Pharmacol* 6(3): 215–222.
- BUETTNER, R., SCHÖLMEIRICH, J., BOLLHEIMER, L. C. (2007). "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents". In: *Obesity (Silver Spring)* 15(4): 798–808.
- CHAKRABARTI, B., DUDBRIDGE, F., KENT, L., WHEELWRIGHT, S., HILL-CAWTHORNE, G., ALLISON, C., BANERJEE-BASU, S., BARON-COHEN, S. (2009). "Genes related to sex steroids, neural growth, and social-emotional behavior are associated with autistic traits, empathy, and Asperger syndrome". In: *Autism Res* 2(3): 157–177.
- CHARNEY, D. S. (2004). "Reviews and Overviews Psychobiological Mechanisms of Resilience and Vulnerability : Implications for Successful Adaptation to Extreme Stress". In: : 195–216.
- CHOLERIS, E., THOMAS, A. W., KAVALIERS, M., PRATO, F. S. (2001). "A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlor-diazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field". In: *Neurosci Biobehav Rev* 25(3): 235–260.
- CHRONWALL, B. M., DIMAGGIO, D. A., MASSARI, V. J., PICKEL, V. M., RUGGIERO, D. A., O'DONOHUE, T. L. (1985). "The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain". In: *Neuroscience* 15(4): 1159–1181.
- CLARK, J. T., KALRA, P. S., CROWLEY, W. R., KALRA, S. P. (1984). "Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats". In: *Endocrinology* 115(1): 427–429.
- COLMERS, W. F., BLEAKMAN, D. (1994). "Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons". In: *Trends Neurosci* 17(9): 373–379.
- COWLEY, M. A., SMART, J. L., RUBINSTEIN, M., CERDÁN, M. G., DIANO, S., HORVATH, T. L., CONE, R. D., LOW, M. J. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus". In: *Nature* 411(6836): 480–484.

- CRAWLEY, J. N. (2007a). "Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism". In: *Brain Pathol* 17(4): 448–459.
- CRAWLEY, J. N. (2007b). "Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism." In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17(4): 448–59.
- DAVIS, M. (1998). "Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety?" In: *Biol Psychiatry* 44(12): 1239–1247.
- DE QUIDT, M. E., EMSON, P. C. (1986). "Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system–II. Immunohistochemical analysis". In: *Neuroscience* 18(3): 545–618.
- DUBE, M. G., XU, B., CROWLEY, W. R., KALRA, P. S., KALRA, S. P. (1994). "Evidence that neuropeptide Y is a physiological signal for normal food intake". In: *Brain Res* 646(2): 341–344.
- DULAWA, S. C., HEN, R. (2005). "Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test". In: *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 771–783.
- DULAWA, S. C., HOLICK, K. A., GUNDERSEN, B., HEN, R. (2004). "Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression". In: *Neuropsychopharmacology* 29(7): 1321–1330.
- DUMONT, Y., JACQUES, D., BOUCHARD, P., QUIRION, R. (1998). "Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains". In: *J Comp Neurol* 402(3): 372–384.
- DUMONT, Y., MARTEL, J. C., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S., QUIRION, R. (1992). "Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues". In: *Prog Neurobiol* 38(2): 125–167.
- EVA, C., KEINÄNEN, K., MONYER, H., SEEBURG, P., SPRENGEL, R. (1990). "Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family". In: *FEBS Lett* 271(1-2): 81–84.
- EVA, C., MELE, P., COLLURA, D., NAI, A., PISU, M. G., SERRA, M., BIGGIO, G. (2008). "Modulation of neuropeptide Y and Y1 receptor expression in the amygdala by fluctuations in the brain content of neuroactive steroids during ethanol drinking discontinuation in Y1R/LacZ transgenic mice". In: *Journal of Neurochemistry* 104(4): 1043–1054.
- EVA, C., OBERTO, A., MELE, P., SERRA, M., BIGGIO, G. (2006a). "Role of brain neuroactive steroids in the functional interplay between the GABA(A) and the NPY-Y1 receptor mediated signals in the amygdala". In: *Pharmacol Biochem Behav* 84(4): 568–580.
- EVA, C., OBERTO, A., SPRENGEL, R., GENAZZANI, E. (1992). "The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression". In: *FEBS Lett* 314(3): 285–288.

- EVA, C., SERRA, M., MELE, P., PANZICA, G., OBERTO, A. (2006b). "Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor". In: *Front Neuroendocrinol* 27(3): 308–339.
- FRANKISH, H. M., MCCARTHY, H. D., DRYDEN, S., KILPATRICK, A., WILLIAMS, G. (1993). "Neuropeptide Y receptor numbers are reduced in the hypothalamus of streptozotocin-diabetic and food-deprived rats: further evidence of increased activity of hypothalamic NPY-containing pathways". In: *Peptides* 14(5): 941–948.
- FUNAHASHI, H., YADA, T., MUROYA, S., TAKIGAWA, M., RYUSHI, T., HORIE, S., NAKAI, Y., SHIODA, S. (1999). "The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus". In: *Neurosci Lett* 264(1-3): 117–120.
- GALTON, F. (1869). *Hereditary Genius*. London: Macmillan.
- GALVIN-PARTON, P. A., CHEN, X., MOXHAM, C. M., MALBON, C. C. (1997). "Induction of Galphaq-specific antisense RNA in vivo causes increased body mass and hyperadiposity". In: *J Biol Chem* 272(7): 4335–4341.
- GAO, J., GHIBAUDI, L., HWA, J. J. (2004). "Selective activation of central NPY Y1 vs. Y5 receptor elicits hyperinsulinemia via distinct mechanisms". In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(4): 706–711.
- GOSSEN, M., BUJARD, H. (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547–5551.
- GOZALI, M., PAVIA, J. M., MORRIS, M. J. (2002). "Involvement of neuropeptide Y in glucose sensing in the dorsal hypothalamus of streptozotocin diabetic rats - in vitro and in vivo studies of transmitter release". In: *Diabetologia* 45(9): 1332–1339.
- GRUNDEMAR, L., JONAS, S., MÖRNER, N., HÖGESTÄTT, E. D., WAHLESTEDT, C., HÅKANSON, R. (1992). "Characterization of vascular neuropeptide Y receptors". In: *British Journal of Pharmacology* 105(1): 45–50.
- GRUNDY, S. M., BARNETT, J. P. (1990). "Metabolic and health complications of obesity". In: *Dis Mon* 36(12): 641–731.
- HAHN, T. M., BREININGER, J. F., BASKIN, D. G., SCHWARTZ, M. W. (1998). "Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons". In: *Nat Neurosci* 1(4): 271–272.
- HAPPÉ, F., RONALD, A. (2008). "The 'fractionable autism triad': a review of evidence from behavioural, genetic, cognitive and neural research". In: *Neuropsychol Rev* 18(4): 287–304.
- HASTINGS, J. A., MCCLURE-SHARP, J. M., MORRIS, M. J. (2001). "NPY Y1 receptors exert opposite effects on corticotropin releasing factor and noradrenaline overflow from the rat hypothalamus in vitro". In: *Brain Res* 890(1): 32–37.

- HEILIG, M. (1995). "Antisense inhibition of neuropeptide Y (NPY)-Y1 receptor expression blocks the anxiolytic-like action of NPY in amygdala and paradoxically increases feeding". In: *Regul Pept* 59(2): 201–205.
- HEILIG, M. (2004). "The NPY system in stress, anxiety and depression". In: *Neuropeptides* 38(4): 213–224.
- HERMAN, J. P., MUELLER, N. K., FIGUEIREDO, H. (2004). "Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration". In: *Ann N Y Acad Sci* 1018: 35–45.
- HERTZ-PICCIOTTO, I., DELWICHE, L. (2009). "The rise in autism and the role of age at diagnosis". In: *Epidemiology* 20(1): 84–90.
- HERZOG, H. (2003). "Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models". In: *Eur J Pharmacol* 480(1-3): 21–29.
- HERZOG, H., HORT, Y. J., BALL, H. J., HAYES, G., SHINE, J., SELBIE, L. A. (1992). "Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 5794–5798.
- HOESS, R. H., ZIESE, M., STERNBERG, N. (1982). "P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(11): 3398–3402.
- HOGAN, B. L., HORSBURGH, G., COHEN, J., HETHERINGTON, C. M., FISHER, G., LYON, M. F. (1986). "Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse". In: *J Embryol Exp Morphol* 97: 95–110.
- HORVATH, T. L., BECHMANN, I., NAFTOLIN, F., KALRA, S. P., LERANTH, C. (1997). "Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations". In: *Brain Res* 756(1-2): 283–286.
- HUANG, X. F., XIN, X., MCLENNAN, P., STORLIEN, L. (2004). "Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression". In: *Diabetes Obes Metab* 6(1): 35–44.
- HUHMANN, K. L. (2006). "Social conflict models: can they inform us about human psychopathology?" In: *Horm Behav* 50(4): 640–646.
- IKEDA, J. P., HAYES, D., SATTER, E., PARHAM, E. S., KRATINA, K., WOOLSEY, M., LOWEY, M., TRIBOLE, E. (1999). "A commentary on the new obesity guidelines from NIH". In: *J Am Diet Assoc* 99(8): 918–919.
- INUI, A. (1999). "Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved?" In: *Trends Pharmacol Sci* 20(2): 43–46.
- JACOBS, G. H., FENWICK, J. A., WILLIAMS, G. A. (2001). "Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights". In: *J Exp Biol* 204(Pt 14): 2439–2446.

- KALIN, N. H., SHERMAN, J. E., TAKAHASHI, L. K. (1988). "Antagonism of endogenous CRH systems attenuates stress-induced freezing behavior in rats". In: *Brain Res* 457(1): 130–135.
- KALRA, S. P., FUENTES, M., FOURNIER, A., PARKER, S. L., CROWLEY, W. R. (1992). "Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats". In: *Endocrinology* 130(6): 3323–3330.
- KANATANI, A., HATA, M., MASHIKO, S., ISHIHARA, A., OKAMOTO, O., HAGA, Y., OHE, T., KANNO, T., MURAI, N., ISHII, Y., FUKURODA, T., FUKAMI, T., IHARA, M. (2001). "A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814". In: *Mol Pharmacol* 59(3): 501–505.
- KANATANI, A., ISHIHARA, A., ASAHI, S., TANAKA, T., OZAKI, S., IHARA, M. (1996). "Potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonist, 1229U91: blockade of neuropeptide Y-induced and physiological food intake". In: *Endocrinology* 137(8): 3177–3182.
- KANATANI, A., MASHIKO, S., MURAI, N., SUGIMOTO, N., ITO, J., FUKURODA, T., FUKAMI, T., MORIN, N., MACNEIL, D. J., VAN DER PLOEG, L. H., SAGA, Y., NISHIMURA, S., IHARA, M. (2000). "Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice". In: *Endocrinology* 141(3): 1011–1016.
- KARL, T., BURNE, T. H., HERZOG, H. (2006). "Effect of Y1 receptor deficiency on motor activity, exploration, and anxiety". In: *Behav Brain Res* 167(1): 87–93.
- KARL, T., LIN, S., SCHWARZER, C., SAINSBURY, A., COUZENS, M., WITTMANN, W., BOEY, D., VON HÖRSTEN, S., HERZOG, H. (2004). "Y1 receptors regulate aggressive behavior by modulating serotonin pathways." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34): 12742–7.
- KASK, A., NGUYEN, H. P., PABST, R., VON HÖRSTEN, S. (2001). "Neuropeptide Y Y1 receptor-mediated anxiolysis in the dorsocaudal lateral septum: functional antagonism of corticotropin-releasing hormone-induced anxiety". In: *Neuroscience* 104(3): 799–806.
- KASK, A., RÄGO, L., HARRO, J. (1996). "Anxiogenic-like effect of the neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBP3226: antagonism with diazepam". In: *Eur J Pharmacol* 317(2-3): 3–4.
- KASK, A., RÄGO, L., HARRO, J. (1998a). "Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226". In: *Br J Pharmacol* 124(7): 1507–1515.
- KASK, A., RÄGO, L., HARRO, J. (1998b). "NPY Y1 receptors in the dorsal periaqueductal gray matter regulate anxiety in the social interaction test". In: *Neuroreport* 9(12): 2713–2716.

- KISHI, T., ASCHKENASI, C. J., CHOI, B. J., LOPEZ, M. E., LEE, C. E., LIU, H., HOLLENBERG, A. N., FRIEDMAN, J. M., ELMQUIST, J. K. (2005). "Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor". In: *J Comp Neurol* 482(3): 217–243.
- KOGAN, M. D., STRICKLAND, B. B., NEWACHECK, P. W. (2009). "Building systems of care: findings from the National Survey of Children With Special Health Care Needs". In: *Pediatrics* 124 Suppl 4: 333–336.
- KRAUSE, J., EVA, C., SEEBURG, P. H., SPRENGEL, R. (1992). "Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor". In: *Mol Pharmacol* 41(5): 817–821.
- KRESTEL, H. E., SHIMSHEK, D. R., JENSEN, V., NEVIAN, T., KIM, J., GENG, Y., BAST, T., DEPAULIS, A., SCHONIG, K., SCHWENK, F., BUJARD, H., HVALBY, O., SPRENGEL, R., SEEBURG, P. H. (2004). "A genetic switch for epilepsy in adult mice". In: *J Neurosci* 24(46): 10568–10578.
- KRUKOFF, T. L., MAC TAVISH, D., JHAMANDAS, J. H. (1999). "Effects of restraint stress and spontaneous hypertension on neuropeptide Y neurons in the brainstem and arcuate nucleus". In: *J Neuroendocrinol* 11(9): 715–723.
- KUSHI, A., SASAI, H., KOIZUMI, H., TAKEDA, N., YOKOYAMA, M., NAKAMURA, M. (1998). "Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15659–15664.
- LAKKA, H. M., LAAKSONEN, D. E., LAKKA, T. A., NISKANEN, L. K., KUMPU-SALO, E., TUOMILEHTO, J., SALONEN, J. T. (2002). "The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men". In: *JAMA* 288(21): 2709–2716.
- LARHAMMAR, D., SALANECK, E. (2004). "Molecular evolution of NPY receptor subtypes". In: *Neuropeptides* 38(4): 141–151.
- LEIBOWITZ, S. F., ALEXANDER, J., DOURMASHKIN, J. T., HILL, J. O., GAYLES, E. C., CHANG, G. Q. (2005). "Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet". In: *Brain Res* 1047(2): 137–147.
- LEVINE, A. S., MORLEY, J. E. (1984). "Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats". In: *Peptides* 5(6): 1025–1029.
- LEVINE, S. (2001). "Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat." In: *Physiol Behav* 73(3): 255–260.
- LIANG, K. C., MELIA, K. R., CAMPEAU, S., FALLS, W. A., MISERENDINO, M. J., DAVIS, M. (1992). "Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex". In: *J Neurosci* 12(6): 2313–2320.

- LIN, S., BOEY, D., HERZOG, H. (2004). "NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models". In: *Neuropeptides* 38(4): 189–200.
- LINTAS, C., PERSICO, A. M. (2009). "Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist". In: *J Med Genet* 46(1): 1–8.
- LIPOSITS, Z. (1993). "Ultrastructure of hypothalamic paraventricular neurons". In: *Crit Rev Neurobiol* 7(2): 89–162.
- LORD, C. (2000). "Commentary: achievements and future directions for intervention research in communication and autism spectrum disorders". In: *J Autism Dev Disord* 30(5): 393–398.
- LUDOLPH, A. C. (1996). "Animal models for motor neuron diseases: research directions". In: *Neurology* 47(6 Suppl 4): 228–232.
- LUNDELL, I., BLOMQUIST, A. G., BERGLUND, M. M., SCHÖBER, D. A., JOHNSON, D., STATNICK, M. A., GADSKI, R. A., GEHLERT, D. R., LARHAMMAR, D. (1995). "Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY". In: *J Biol Chem* 270(49): 29123–29128.
- MAKINO, S., ASABA, K., NISHIYAMA, M., HASHIMOTO, K. (1999). "Decreased type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress". In: *Neuroendocrinology* 70(3): 160–167.
- MAKINO, S., BAKER, R. A., SMITH, M. A., GOLD, P. W. (2000). "Differential regulation of neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus and locus coeruleus by stress and antidepressants". In: *J Neuroendocrinol* 12(5): 387–395.
- MANN, J. J. (2003). "Neurobiology of suicidal behaviour." In: *Nature reviews. Neuroscience* 4(10): 819–828.
- MAYFORD, M., BACH, M. E., HUANG, Y. Y., WANG, L., HAWKINS, R. D., KANDEL, E. R. (1996). "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene". In: *Science* 274(5293): 1678–1683.
- MEANEY, M. J., SZYF, M., SECKL, J. R. (2007). "Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health". In: *Trends Mol Med* 13(7): 269–277.
- MELE, P., OBERTO, A., SERRA, M., PISU, M. G., FLORIS, I., BIGGIO, G., EVA, C. (2004). "Increased expression of the gene for the Y1 receptor of neuropeptide Y in the amygdala and paraventricular nucleus of Y1R/LacZ transgenic mice in response to restraint stress". In: *J Neurochem* 89(6): 1471–1478.
- MERALI, Z., KHAN, S., MICHAUD, D. S., SHIPPY, S. A., ANISMAN, H. (2004). "Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release". In: *Eur J Neurosci* 20(1): 229–239.

- MERALI, Z., LEVAC, C., ANISMAN, H. (2003). "Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice". In: *Biol Psychiatry* 54(5): 552–565.
- MICHEL, M. C., BECK-SICKINGER, A., COX, H., DOODS, H. N., HERZOG, H., LARHAMMAR, D., QUIRION, R., SCHWARTZ, T., WESTFALL, T. (1998). "XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors". In: *Pharmacol Rev* 50(1): 143–150.
- MONTGOMERY, K. C. (1955). "The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior". In: *J Comp Physiol Psychol* 48(4): 254–260.
- MORAES, J. C., COOPE, A., MORARI, J., CINTRA, D. E., ROMAN, E. A., PAULI, J. R., ROMANATTO, T., CARVALHEIRA, J. B., OLIVEIRA, A. L. R., SAAD, M. J., VELLOSO, L. A. (2009). "High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons". In: *PLoS ONE* 4(4): e5045.
- MOXHAM, C. M., HOD, Y., MALBON, C. C. (1993). "Gi alpha 2 mediates the inhibitory regulation of adenylylcyclase in vivo: analysis in transgenic mice with Gi alpha 2 suppressed by inducible antisense RNA". In: *Dev Genet* 14(4): 266–273.
- MOY, S. S., NADLER, J. J., PEREZ, A. (2004). "Sociability and preference for social novelty in five inbred strains : an approach to assess autistic-like behavior in mice". In: : 287–302.
- MOY, S. S., NADLER, J. J., YOUNG, N. B., PEREZ, A., HOLLOWAY, L. P., BARBARO, R. P., BARBARO, J. R., WILSON, L. M., THREADGILL, D. W., LAUDER, J. M., MAGNUSON, T. R., CRAWLEY, J. N. (2007). "Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains". In: *Behav Brain Res* 176(1): 4–20.
- MULLINS, D., KIRBY, D., HWA, J., GUZZI, M., RIVIER, J., PARKER, E. (2001). "Identification of potent and selective neuropeptide Y Y(1) receptor agonists with orexigenic activity in vivo". In: *Mol Pharmacol* 60(3): 534–540.
- MUNGLANI, R., HUDSPITH, M. J., HUNT, S. P. (1996). "The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihypertensive". In: *Drugs* 52(3): 371–389.
- NAVEILHAN, P., CANALS, J. M., VALJAKKA, A., VARTIAINEN, J., ARENAS, E., ERNFORS, P. (2001a). "Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y1-mediated mechanism". In: *Eur J Neurosci* 13(12): 2241–2246.
- NAVEILHAN, P., HASSANI, H., LUCAS, G., BLAKEMAN, K. H., HAO, J. X., XU, X. J., WIESENFELD-HALLIN, Z., THORÉN, P., ERNFORS, P. (2001b). "Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor". In: *Nature* 409(6819): 513–517.

- OBERTO, A., PANZICA, G. C., ALTRUDA, F., EVA, C. (2001). "GABAergic and NPY-Y(1) network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction". In: *Neuropharmacology* 41(5): 639–642.
- PALANZA, P., HOWDESHELL, K. L., PARMIGIANI, S., VOM SAAL, F. S. (2002). "Exposure to a low dose of Bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice". In: *Environmental Health Perspectives Supplements* 110(S3): 415–422.
- PARMIGIANI, S., PALANZA, P., ROGERS, J., FERRARI, P. F. (1999). "Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience". In: *Neurosci Biobehav Rev* 23(7): 957–969.
- PEDRAZZINI, T. (2004). "Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts". In: *Neuropeptides* 38(4): 267–275.
- PEDRAZZINI, T., SEYDOUX, J., KÜNSTNER, P., AUBERT, J. F., GROUZMANN, E., BEERMANN, F., BRUNNER, H. R. (1998). "Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor". In: *Nat Med* 4(6): 722–726.
- PLOMIN, R., DEFRIES, J., MCCLEARN, G. (2001). *Genetica del comportamento*. Raffaello Cortina.
- PRALONG, F. P., GONZALES, C., VOIROL, M. J., PALMITER, R. D., BRUNNER, H. R., GAILLARD, R. C., SEYDOUX, J., PEDRAZZINI, T. (2002). "The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions". In: *FASEB J* 16(7): 712–714.
- PRIMEAUX, S. D., WILSON, S. P., CUSICK, M. C., YORK, D. A., WILSON, M. A. (2005). "Effects of altered amygdalar neuropeptide Y expression on anxiety-related behaviors". In: *Neuropsychopharmacology* 30(9): 1589–1597.
- PU, S., JAIN, M. R., HORVATH, T. L., DIANO, S., KALRA, P. S., KALRA, S. P. (1999). "Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis". In: *Endocrinology* 140(2): 933–940.
- ROGAN, M. T., LEDOUX, J. E. (1996). "Emotion: systems, cells, synaptic plasticity". In: *Cell* 85(4): 469–475.
- ROHDE, K., ROHDE, P. P. (2001). "Fuzzy chaos: reduced chaos in the combined dynamics of several independently chaotic populations". In: *Am Nat* 158(5): 553–556.
- ROSE, P. M., FERNANDES, P., LYNCH, J. S., FRAZIER, S. T., FISHER, S. M., KODUKULA, K., KIENZLE, B., SEETHALA, R. (1995). "Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor". In: *J Biol Chem* 270(48): 29038–29038.
- RYGULA, R., ABUMARIA, N., FLÜGGE, G., FUCHS, E., RÜTHER, E., HAVEMANN-REINECKE, U. (2005). "Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress". In: *Behav Brain Res* 162(1): 127–134.

- SAHU, A., CROWLEY, W. R., KALRA, S. P. (1995). "Evidence that hypothalamic neuropeptide Y gene expression increases before the onset of the preovulatory LH surge". In: *J Neuroendocrinol* 7(4): 291–296.
- SAHU, A., SNINSKY, C. A., PHELPS, C. P., DUBE, M. G., KALRA, P. S., KALRA, S. P. (1992). "Neuropeptide Y release from the paraventricular nucleus increases in association with hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats". In: *Endocrinology* 131(6): 2979–2985.
- SAJDYK, T. J., VANDERGRIF, M. G., GEHLERT, D. R. (1999). "Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test". In: *Eur J Pharmacol* 368(2-3): 143–147.
- SCHROEDER, J. P., OLIVE, F., KOENIG, H., HODGE, C. W. (2003). "Intra-amygdala infusion of the NPY Y1 receptor antagonist BIBP 3226 attenuates operant ethanol self-administration". In: *Alcohol Clin Exp Res* 27(12): 1884–1891.
- SCHWARTZ, M. W., BASKIN, D. G., KAIYALA, K. J., WOODS, S. C. (1999). "Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system". In: *Am J Clin Nutr* 69(4): 584–596.
- SCHWARTZ, M. W., WOODS, S. C., SEELEY, R. J., BARSH, G. S., BASKIN, D. G., LEIBEL, R. L. (2003). "Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain?" In: *Diabetes* 52(2): 232–238.
- SEEDAT, S., STEIN, M. B., KENNEDY, C. M., HAUGER, R. L. (2003). "Plasma cortisol and neuropeptide Y in female victims of intimate partner violence". In: *Psychoneuroendocrinology* 28(6): 796–808.
- SEGAL-LIEBERMAN, G., TROMBLY, D. J., JUTHANI, V., WANG, X., MARATOS-FLIER, E. (2003). "NPY ablation in C57BL/6 mice leads to mild obesity and to an impaired refeeding response to fasting". In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(6): 1131–1139.
- SHOCKETT, P., DIFILIPPANTONIO, M., HELLMAN, N., SCHATZ, D. G. (1995). "A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6522–6526.
- SHULMAN, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance". In: *J Clin Invest* 106(2): 171–176.
- SILVERMAN, J. L., TOLU, S. S., BARKAN, C. L., CRAWLEY, J. N. (2010). "Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP". In: *Neuropsychopharmacology* 35(4): 976–989.
- SIPOLS, A. J., BASKIN, D. G., SCHWARTZ, M. W. (1995). "Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression". In: *Diabetes* 44(2): 147–151.
- SMITH, M. S., GROVE, K. L. (2002). "Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model". In: *Front Neuroendocrinol* 23(3): 225–256.

- SPARTA, D. R., FEE, J. R., HAYES, D. M., KNAPP, D. J., MACNEIL, D. J., THIELE, T. E. (2004). "Peripheral and central administration of a selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist suppresses ethanol intake by C57BL/6J mice". In: *Alcohol Clin Exp Res* 28(9): 1324–1330.
- ST-PIERRE, J. A., NOUEL, D., DUMONT, Y., BEAUDET, A., QUIRION, R. (2000). "Association of neuropeptide Y Y1 receptors with glutamate-positive and NPY-positive neurons in rat hippocampal cultures". In: *Eur J Neurosci* 12(4): 1319–1330.
- STANLEY, B. G., DANIEL, D. R., CHIN, A. S., LEIBOWITZ, S. F. (1985). "Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion". In: *Peptides* 6(6): 1205–1211.
- STANLEY, B. G., MAGDALIN, W., SEIRAFI, A., THOMAS, W. J., LEIBOWITZ, S. F. (1993). "The perifornical area: the major focus of (a) patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s)". In: *Brain Res* 604(1-2): 304–317.
- STARBÄCK, P., WRAITH, A., ERIKSSON, H., LARHAMMAR, D. (2000). "Neuropeptide Y receptor gene y6: multiple deaths or resurrections?" In: *Biochem Biophys Res Commun* 277(1): 264–269.
- STEIN, M. B., FUETSCH, M., MÜLLER, N., HÖFLER, M., LIEB, R., WITTCHEN, H. U. (2001). "Social anxiety disorder and the risk of depression: a prospective community study of adolescents and young adults". In: *Arch Gen Psychiatry* 58(3): 251–256.
- SULLIVAN, S. D., MOENTER, S. M. (2004). "Gamma-Aminobutyric Acid Neurons Integrate and Rapidly Transmit Permissive and Inhibitory Metabolic Cues to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons". In: *Endocrinology* 145(3): 1194–1202.
- SZYF, M., WEAVER, I., MEANEY, M. (2007). "Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior". In: *Reprod Toxicol* 24(1): 9–19.
- TATEMOTO, K., CARLQUIST, M., MUTT, V. (1982). "Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide". In: *Nature* 296(5858): 659–660.
- THIELE, T. E., BADIA-ELDER, N. E. (2003). "A role for neuropeptide Y in alcohol intake control: evidence from human and animal research". In: *Physiol Behav* 79(1): 95–101.
- THIELE, T. E., KOH, M. T., PEDRAZZINI, T. (2002). "Voluntary alcohol consumption is controlled via the neuropeptide Y Y1 receptor". In: *J Neurosci* 22(3).
- THORSELL, A., CARLSSON, K., EKMAN, R., HEILIG, M. (1999). "Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress". In: *Neuroreport* 10(14): 3003–3007.

- THORSELL, A., MICHALKIEWICZ, M., DUMONT, Y., QUIRION, R., CABERLOTTO, L., RIMONDINI, R., MATHÉ, A. A., HEILIG, M. (2000). “Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(23): 12852–12857.
- TSIEN, J. Z., CHEN, D. F., GERBER, D., TOM, C., MERCER, E. H., ANDERSON, D. J., MAYFORD, M., KANDEL, E. R., TONEGAWA, S. (1996). “Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain”. In: *Cell* 87(7): 1317–1326.
- TUCCI, V., TUCCI, G. (2009). *Genetica del comportamento*. Carocci.
- VEZZANI, A., SPERK, G., COLMERS, W. F. (1999). “Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation”. In: *Trends Neurosci* 22(1): 25–30.
- WAHLESTEDT, C., REIS, D. J. (1993). “Neuropeptide Y-related peptides and their receptors—are the receptors potential therapeutic drug targets?” In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 309–352.
- WALF, A. A., FRYE, C. A. (2007). “The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents”. In: *Nat Protoc* 2(2): 322–328.
- WEAVER, I. C. (2007). “Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let’s call the whole thing off”. In: *Epigenetics* 2(1): 22–28.
- WEINBERG, D. H., SIRINATHSINGHI, D. J. S., TAN, C. P., SHIAO, L.-L., MORIN, N., RIGBY, M. R., HEAVENS, R. H., RAPOPORT, D. R., BAYNE, M. L., CASCIERI, M. A., STRADER, C. D., LINEMEYER, D. L., MACNEIL, D. J. (1996). “Cloning and Expression of a Novel Neuropeptide Y Receptor”. In: *Journal of Biological Chemistry* 271(28): 16435–16438.
- WILDING, J. P., GILBEY, S. G., MANNAN, M., ASLAM, N., GHATEI, M. A., BLOOM, S. R. (1992). “Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats”. In: *J Endocrinol* 132(2): 299–304.
- WISDEN, W., MORRIS, B. (2002). “In situ hybridization with oligonucleotide probes”. In: “In Situ Hybridization Protocols for the Brain”, (curato da B. J. M. William Wisden), vol. 47 di *International Review of Neurobiology*. Academic Press, (pp. 3 – 59).
- WISIALOWSKI, T., PARKER, R., PRESTON, E., SAINSBURY, A., KRAEGEN, E., HERZOG, H., COONEY, G. (2000). “Adrenalectomy reduces neuropeptide Y-induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus”. In: *The Journal of Clinical Investigation* 105(9): 1253–1259.
- WITTMANN, W., LOACKER, S., KAPPELLER, I., HERZOG, H., SCHWARZER, C. (2005). “Y1-receptors regulate the expression of Y2-receptors in distinct mouse forebrain areas”. In: *Neuroscience* 136(1): 241–250.

- YANG, K., GUAN, H., ARANY, E., HILL, D. J., CAO, X. (2008). "Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor." In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(7): 2452–64.
- ZHANG, X., WIESENFELD-HALLIN, Z., HÖKFELT, T. (1994). "Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia". In: *Eur J Neurosci* 6(1): 43–57.
- ZWAIGENBAUM, L., BRYSON, S., LORD, C., ROGERS, S., CARTER, A., CARVER, L., CHAWARSKA, K., CONSTANTINO, J., DAWSON, G., DOBKINS, K., FEIN, D., IVERSON, J., KLIN, A., LANDA, R., MESSINGER, D., OZONOFF, S., SIGMAN, M., STONE, W., TAGER-FLUSBERG, H., YIRMIYA, N. (2009). "Clinical assessment and management of toddlers with suspected autism spectrum disorder: insights from studies of high-risk infants". In: *Pediatrics* 123(5): 1383–1391.

Elenco delle figure

1.1	Interazione fra le diverse discipline che si occupano di geni e comportamento	2
1.2	L'adozione è un esperimento genetico che crea dei parenti "genetici" e dei parenti "ambientali"	2
1.3	Come ottenere un topo transgenico	6
1.4	La Doxiciolina è un antibiotico della famiglia delle Tetracicline particolarmente efficace nel controllo di sistemi Tet	7
1.5	Il sistema Tet-off nel modello murino NPY <i>rfb</i>	7
1.6	Vari esempi di utilizzo di tecniche Cre-lox	8
2.1	Pathways di NPY che si pensa siano coinvolti in effetti di NPY correlati a stress e comportamento emozionale (basato su Heilig, 2004)	11
2.2	Le linee blu indicano il pathway ipotalamico di NPY coinvolto nel comportamento alimentare (tratto da Eva <i>et al.</i> , 2006b) . . .	12
2.3	Meccanismi, segnali e circuiti nervosi coinvolti nella regolazione dell'assunzione di cibo. NTS: nucleo del tratto solitario; ARC: nucleo arcuato; PVN: nucleo paraventricolare; PFA: area perifornicale; LHA: ipotalamo laterale; CCK: colecistochinina; NPY: neuropeptide Y; POMC: propriomelanocortina (tratto da Peres, 2011)	13
2.4	Circuiti ipotalamici orezzizzante (Npy-Agrp) e anoressizzante (Pomc-Cart) mediate da Y1R	14
2.5	Distribuzione di Y1R nel cervello di roditori. Abbreviazioni: Amy, amigdala; AON, nucleo olfattivo anteriore; ARC: nucleo Arcuato; BST: nucleo del letto della stria terminalis; Cb: cervelletto; DB: banda diagonale del Broca; DMH: nucleo ipotalamico dorsomediale; Hip: ippocampo; IC: collicolo inferiore; LC: locus coeruleus; LH: nucleo ipotalamico laterale; MPOM: nucleo preottico mediale; NST: nucleo del tratto solitario; PAG: grigio periacqueductale; PVN: nucleo paraventricolare; SC: collicolo superiore; VE: complesso vestibolare; VMH: nucleo ipotalamico ventromediale; VTA: area tegmentale ventrale (tratto da Eva <i>et al.</i> , 2006b).	16
2.6	Ibridazione in situ del mRNA di Y1R su animali wild type, eterozigoti ed omozigoti	21
2.7	Analisi dell'espressione di CRE mediante colorazione immunohistochemica. CeA: amigdala centrale; BLA: amigdala basolaterale; MeA: amigdala mediale	23
2.8	Distribuzione della β -Gal e di Y1R nei topi Rosa/tTALC	23

3.1	Ibridazione in situ di Y1R in ippocampo di animali NPY1R ^{rfb} e loro controlli allevati da madri dei ceppi FVB/J e C57BL/6J, tratto da Bertocchi <i>et al.</i> , 2011	26
3.2	Ceppi di madri adottiva utilizzati in questo studio	27
3.3	Immagine dell' elettroforesi su gel di Agarosio del DNA genomico estratto e purificato da campioni freschi; le bande indicano rispettivamente la presenza del gene VGF (sempre presente) e tTA (presente solo negli animali della linea NPY1R ^{rfb} (NPY1R ^{2lox} /Tg ^{α-CaMKII-tTA})	31
3.4	Riepilogo numero, genotipo, sesso e ceppo di adozione dei animali generati, allevati e testati.	32
3.5	Apparecchiatura per ripresa notturna e l' osservazione ad occhio nudo del comportamento materno	33
3.6	Madre adottiva in allattamento nella tipica postura ad arco (arched back)	35
3.7	Rapporto fra tempo passato in Arched Back e tempo in allattamento totale	35
3.8	Confronto fra le distribuzioni dell' "Indice materno" dei tre ceppi di madri	36
3.9	Confronto dell' andamento temporale della frequenza dei comportamenti più rilevanti delle madri rispetto ai cuccioli	37
3.10	Confronto tra i comportamenti assunti dalle madri adottive di ceppo nella prima settimana di vita della prole	38
3.11	Crescita corporea dei piccoli allevati da madri dei tre ceppi, con pesi rilevati a PND 0, PND 10 e PND 27	39
4.1	Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di tutti gli animali Npy1r ^{rfb} e loro controlli dallo svezzamento all' età adulta . .	43
4.2	Effetto differenziale del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di maschi e femmine dallo svezzamento all' età adulta (effetto di interazione fra adozione, sesso e giorni: (F _(16,3456) =7,20, p<0.0001) .	44
4.3	Fenotipi agouti e black a confronto	45
4.4	Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di animali maschi in relazione al colore del manto: gli animali black pesano significativamente di più rispetto agli animali agouti solo se adottati da femmine CD1 ma non da FVB e C57 (effetto di interazione fra fenotipo e adozione: F _(2,432) =4,15, p<0.05)	46
4.5	Effetto del diverso tipo di adozione sulla crescita corporea di animali femmina allevati in relazione al colore del manto: nelle femmine allevate da CD1, le femmine agouti pesano meno rispetto alle black, cosa che non avviene né nelle FVB, dove al contrario queste pesano di più, né nelle C57, dove pesano uguali alle black (interazione fra giorni, colore del manto ed adozione: F _(16,1744) =4,18, p<0.0001) . . .	47
4.6	Nuclei ipotalamici coinvolti nella regolazione dell' appetito	49
4.7	Dieta HFD (a destra) e STD (a sinistra) a confronto	50
4.8	Iniezione intraperitoneale di 0.1cc/10gr peso corporeo di D-glucosio al 10%	51

4.9	Confronto fra l' incremento nel peso corporeo rispetto al periodo basale di animali NPY1R ^{rfb} e loro controlli allevati da madri dei ceppi CD1, FVB e C57	53
4.10	Confronto fra l' incremento nel peso corporeo rispetto al periodo basale fra maschi e femmine	54
4.11	Confronto fra l'incremento nella quantità di cibo consumata settimanalmente, rispetto al basale, fra maschi e femmine durante il periodo di dieta ipercalorica	56
4.12	Confronto fra l'andamento del GTT dopo tre settimane di esposizione a dieta ipercalorica in animali allevati da madri dei ceppi FVB e C57; per l'andamento del GTT in animali allevati da madri CD1, si vedano i grafici dell' esperimento di confronto fra diete a diverso apporto calorico (figura 4.13)	58
4.13	Confronto fra l'andamento del GTT in animali allevati da madri CD1; i grafici si riferiscono ai dati dell' esperimento di confronto fra diete a diverso apporto calorico (capitolo 4.3)	59
4.14	Tessuto adiposo perigonadico bianco appena prelevato e pesato	60
4.15	Confronto fra sesso ed adozione nella quantità di tessuto adiposo bianco perigonadico WAT	61
4.16	Profilo ematico dei maschi di tutte le adozioni	63
4.17	Profilo ematico delle femmine di tutte le adozioni	65
4.18	Gabbie speciali con mangiatoie esterne	67
4.19	Peso dei topi KO e controlli durante il periodo di isolamento	69
4.20	Confronto fra la crescita ponderale di maschi e femmine sotto dieta standard e sotto dieta ipercalorica	70
4.21	Guadagno di peso corporeo rapportato al periodo basale nei maschi; si nota un aumento ponderale maggiore nei soggetti alimentati con dieta grassa ($F_{(23,667)}=15,74, p<0.0001$)	71
4.22	Confronto fra maschi e femmine nella quantità giornaliera di cibo consumata; si nota solamente un effetto di interazione di giorni e dieta ($F_{(49,1421)} = 6,71 p<0.0001$)	72
4.23	Confronto fra attività locomotoria basale di maschi KO e controlli	74
4.24	Confronto fra attività locomotoria durante la fase di buio	75
4.25	Confronto fra GTT di maschi e femmine in entrambe le diete	76
4.26	Confronto fra Wat al sacrificio in maschi e femmine	77
5.1	Elevated Plus Maze	82
5.2	Percentuali di tempo speso dai maschi nei tre ambienti dell' EPM	84
5.3	Percentuali di tempo speso dalle femmine nei tre ambienti dell' EPM	85
5.4	Test di evitamento sociale/socialità	86
5.5	Protocollo per Open Field Sociale	87
5.6	Analisi dei video mediante software Noldus Ethovision XT8	88
5.7	Confronto fra il tempo trascorso dai maschi in T1 e T2	89
5.8	Confronto fra il tempo trascorso dalle femmine in T1 e T2	91
5.9	Confronto fra la distanza totale percorsa all' interno dell' apparato in T1 e T2 dai maschi	92

5.10	Confronto fra la distanza totale percorsa all' interno dell' apparato in T1 e T2 dalle femmine	93
5.11	Modalità di svolgimento del test	94
5.12	Confronto fra i tempi di reazione ad un cibo nuovo negli animali CD1 e C57	96
5.13	Confronto fra maschi e femmine nei tempi di reazione ad un cibo nuovo	97
5.14	Esecuzione del test delle tre camere	100
5.15	Analisi del test delle tre camere	100
5.16	Confronto fra adottati da C57 e da CD1 per quanto riguarda la preferenza ad una novità sociale	102
5.17	Confronto fra adottati da C57 e da CD1 per quanto riguarda la preferenza fra uno stimolo sociale familiare ed uno non familiare . .	103
5.18	Confronto fra gli indici di "novità" di maschi e femmine	104
5.19	Confronto fra indici di "familiarità" di maschi e femmine	104
6.1	Effetto ippocampo su aggressività (tratto da <i>Nature Methods</i>)	107
6.2	Test resident/intruder	109
6.3	Risultati test resident/intruder	110
6.4	Test di preferenza al sucrose	111
6.5	Chronic Psychosocial Stress (CPS)	112
6.6	Materiali e metodi per Chronic Psychosocial Stress (CPS)	113
6.7	Somministrazione dieta ipercalorica alla fine del protocollo di CPS .	114
6.8	Valutazione preferenza di una soluzione zuccherina rispetto alla semplice acqua prima e dopo il protocollo di stress psicosociale cronico; si nota un aumento del consumo di acqua generale fra prima o dopo il protocollo, mentre per quanto riguarda il consumo di zucchero si evidenzia un effetto dello stress opposto su KO e controlli $F_{(1,17)}=31,46$, $p<0.01$): mentre i primi aumentano il consumo di zucchero, i secondi diminuiscono.	115
6.9	Incremento peso corporeo e consumo di cibo durante il protocollo di stress psicosociale cronico	116
6.10	Parametri durante la somministrazione di HFD dopo lo stress psicosociale cronico	117
6.11	Valori del GTT dopo somministrazione di dieta ipercalorica in animali stressati cronicamente	119
6.12	Risultati ibridazione in situ	120
6.13	Le linee blu indicano il pathway ipotalamico di NPY coinvolto nel comportamento alimentare (tratto da Eva <i>et al.</i> , 2006b). . .	124
6.14	Nuclei ipotalami implicati nella regolazione dell' alimentazione . . .	124

Finito di stampare il 6 marzo 2013 utilizzando L^AT_EX