



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PSICOBIOLOGIA E  
NEUROSCIENZE COGNITIVE**

**EFFETTI DELL'INATTIVAZIONE DI NPY/1R IN AREA LIMBICA SU  
COMPORTAMENTO, RIPRODUZIONE E RISPOSTA ALLO STRESS DI  
TOPI KO CONDIZIONALI IN RELAZIONE ALL'AMBIENTE MATERNO  
PRECOCE**

**Relatore:**

*Chiar.ma Prof.ssa PAOLA PALANZA*

**Controrelatore:**

*Dott.ssa LAURA GIOIOSA*

**Laureando:**

*ALESSANDRO MARRAZZO*

**ANNO ACCADEMICO 2016 - 2017**



# Indice

<b>1.</b>	<b>Introduzione</b>	
1.1.	Fenotipo: il risultato dell'interazione tra geni e ambiente.....	4
1.1.1.	Studio degli effetti dell'ambiente precoce tramite modelli animali.....	6
1.1.2.	Effetti del comportamento materno di cura della prole su fenotipo.....	7
1.2.	Comportamento materno e sistema NPY.....	8
1.3.	Il neuropeptide Y – NPY.....	9
1.4.	NPY e comportamento alimentare.....	10
1.5.	NPY e comportamento simil-ansioso in risposta a stress.....	13
1.6.	NPY e comportamento sessuale e riproduttivo .....	14
<b>2.</b>	<b>Scopo della tesi.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Materiali e metodi</b>	
3.1.	Modello animale sperimentale.....	17
3.1.1.	Modello murino KO condizionale per NPY1R .....	17
3.1.2.	Sistema tet-off doxiciclina dipendente.....	17
3.1.3.	Sistema CRE-loxP.....	18
3.1.4.	Generazione del KO condizionale.....	19
3.2.	Trattamento con doxiciclina e procedura di adozione.....	21
3.3.	Monitoraggio della crescita corporea e svezzamento.....	22
3.4.	Genotipizzazione.....	23
<b>4.</b>	<b>Esperimento 1</b>	
4.1	Materiali e metodi.....	26
4.1.1	Test dell'anedonia.....	26
4.1.2	Marble test.....	28
4.1.3	Test dell'Elevated Plus Maze (EPM) .....	29
4.1.4	Test dell'Open Field Classico (OPF) .....	30
4.1.5	Test dell'Open Field Sociale.....	31
4.1.6	Test del Resident/Intruder.....	33
4.2	Risultati.....	36
4.2.1	Analisi della crescita corporea post-svezzamento.....	36
4.2.2	Valutazione del comportamento anedonico nei maschi.....	38
4.2.3	Livelli di impulsività e neofobia misurati mediante il test del marble.....	38
4.2.4	Analisi del comportamento ansioso: test dell'Elevated Plus Maze.....	44
4.2.5	Valutazione del comportamento simil-ansioso: test dell'Open Field.....	52
4.2.6	Valutazione di evitamento/preferenza sociale: test del Social Open Field....	55
4.2.7	Analisi del comportamento sociale (RI) maschi.....	61
4.3	Discussione.....	63
<b>5.</b>	<b>Esperimento 2</b>	
5.1	Materiali e metodi.....	66
5.1.1	Stress psico-sociale cronico (CPS) .....	66
5.1.2	Protocollo.....	68
5.1.3	Analisi del comportamento anedonico: test dell'anedonia.....	69
5.1.4	Analisi del comportamento ansioso: Open Field classico.....	69

5.1.5	Test di tolleranza al glucosio (GTT) .....	69
5.1.6	Sacrificio e prelievo dei campioni biologici.....	70
5.2	Risultati.....	71
5.2.1	Valutazione dei comportamenti anedonici.....	71
5.2.2	Valutazione del comportamento simil-ansioso (test dell'Open Field).....	71
5.2.3	Crescita corporea a dieta STD.....	73
5.2.4	Food-Intake.....	75
5.2.5	Attività locomotoria.....	76
5.2.6	Valutazione della tolleranza al glucosio: GTT.....	77
5.2.7	Analisi del tessuto adiposo viscerale (WAT), tessuto adiposo bruno (BAT), grasso sottocutaneo (SC) .....	77
5.3	Discussione.....	79
<b>6.</b>	<b>Esperimento 3</b>	
6.1	Materiali e metodi.....	81
6.1.1	Ciclo estrale.....	81
6.1.2	Accoppiamento, separazione e isolamento.....	83
6.1.3	Valutazione del comportamento anedonico in gravidanza: test dell'anedonia.....	83
6.1.4	Valutazione del comportamento ansioso in gravidanza: Open Field classico.....	84
6.1.5	Test del nido.....	84
6.1.6	Successo riproduttivo e osservazione del comportamento materno.....	85
6.1.7	Ultrasuoni.....	87
6.2	Risultati.....	88
6.2.1	Analisi del ciclo estrale.....	88
6.2.2	Analisi del comportamento anedonico in gravidanza.....	89
6.2.3	Analisi del comportamento ansioso: Open Field classico.....	90
6.2.4	Valutazione Test del nido.....	92
6.2.5	Giorni dall'accoppiamento al parto.....	92
6.2.6	Numero e peso dei piccoli alla nascita.....	93
6.2.7	Percentuale di sopravvivenza dei piccoli.....	94
6.2.8	Analisi del comportamento materno.....	95
6.2.9	Analisi degli USVs.....	96
6.3	Discussione.....	97
<b>7.</b>	<b>Discussione generale.....</b>	<b>100</b>
7.1.	Conclusioni.....	103
	Bibliografia.....	105

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Fenotipo: il risultato dell'interazione tra geni e ambiente

Il fenotipo indica tutto il complesso delle caratteristiche di un organismo che risulta dall'interazione dei geni con l'ambiente. Ovvero, tutto il complesso delle caratteristiche comportamentali e/o fisiche presenti in un individuo che sono determinate sia dai geni, sia dall'ambiente in cui l'organismo vive. Da un lato, dunque, si riconosce l'importanza dei fattori genetici, che costituiscono un background forte e pervasivo nel determinare un particolare fenotipo (basti pensare a tutte le patologie ad eziologia genetica), d'altro canto, è ormai ampiamente noto come l'ambiente (inteso come tutte le influenze che non dipendono da fattori ereditari) sia determinante nell'influenzare i tratti comportamentali.

A conferma del fatto che i geni costituiscano la base di un individuo con determinate caratteristiche, fisiche, comportamentali etc., e quindi contribuiscono a produrre un determinato fenotipo, vi sono diverse evidenze. Ad esempio, si possono citare le razze canine, selezionate accuratamente affinché individui della stessa razza esprimano caratteristiche fisiche simili e comportamenti simili in situazioni simili (la controprova di ciò si ha dal fatto che incrociando due razze diverse tali caratteristiche vengono, almeno parzialmente, perse). Un altro esempio è spiegato dall'eziologia di disturbi psichiatrici come la schizofrenia. Infatti, è stato dimostrato un aumento significativo del rischio di sviluppare la malattia fra i parenti dei soggetti affetti (soprattutto se di primo grado) rispetto alla popolazione generale. Inoltre, se entrambi i genitori sono affetti da schizofrenia, il rischio per il figlio di sviluppare la malattia cresce fino al 50%, mentre il 60-84% di gemelli omozigoti condivide la diagnosi (Gottesman & Erlenmeyer-Kimling, 2001; Tsuang, 2000). In aggiunta ai fattori genetici, vi sono anche fattori ambientali per la schizofrenia, soprattutto nei periodi prenatali e perinatali, che includono fattori biologici e psicosociali come l'influenza materna, la rosolia, la malnutrizione, il diabete mellito, complicanze al parto, etc. (Dean & Murray, 2005)

L'ambiente, quindi, può risultare di fondamentale importanza, soprattutto nei periodi critici dello sviluppo (e.g., prenatale, perinatale, prima infanzia, adolescenza, etc.), e determinare importanti cambiamenti non solo nel modo di essere dell'individuo, ma anche nella possibilità che questo possa essere affetto o meno da disordini del comportamento, nel caso di un ambiente inadeguato o avverso. In particolare, è ormai noto come traumi nell'età infantile possono essere la causa di un più elevato rischio di insorgenza di disordini emotivi (Heim & Nemeroff 2001; Holmes et al., 2005). Altre evidenze scientifiche dimostrano che, oltre ai traumi infantili, anche il *neglect* (inteso come mancanza di cure) può esercitare una profonda e pervasiva influenza sul comportamento emozionale e sull'abuso di sostanze (de Wilde et al., 1992; Dube et al., 2001; Johnson et al., 2002; Kendler et al., 1995). Inoltre, i traumi dell'infanzia precoce possono non solo incrementare il rischio di questi disturbi in età adulta, ma possono anche accelerare l'insorgenza di malattie e aumentare la comorbidità tra i disturbi ed alterare l'efficacia dei trattamenti per queste condizioni (Brodsky et al., 2001; Friedman et al., 2002; Gladstone et al., 1999, 2004; Matza et al., 2003; McHolm et al., 2003; Nemeroff et al., 2003; Romans et al., 1995; Roy, 2002; Zlotnick et al., 1995).

Possono avvenire sostanziali modifiche a circuiti e regioni cerebrali in relazione alle esperienze ambientali. In particolare, anche che i traumi infantili possono produrre anomalie in regioni cerebrali implicate nei disordini emozionali. Pazienti depressi con una storia di abusi infantili hanno mostrato un'iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), un componente maggiore del sistema di risposta allo stress (Heim & Nemeroff, 2001). Alcuni studi, ma non tutti, hanno mostrato come pazienti con depressione o disturbo post-traumatico da stress, i quali erano stati esposti a traumi infantili, avevano un volume ippocampale minore rispetto ai controlli non depressi o a pazienti che non avevano la stessa storia d'abuso (Bremner et al., 1997; Stein et al., 1997; Vythilingam et al., 2002). Queste evidenze di anomalie neuronali conseguenti ad abusi nell'infanzia erano già state riscontrate nella corteccia prefrontale di pazienti con disturbi d'ansia (Carrion et al., 2001; De Bellis et al., 2000; Mathew et al., 2004). Nonostante la grande mole di dati epidemiologici, i meccanismi neurali sottostanti e le anomalie emozionali derivanti dalle avversità dei primi anni di vita rimangono scarsamente compresi (Holmes et al., 2005).

### **1.1.1 Studio degli effetti dell'ambiente precoce tramite modelli animali**

I modelli animali possono essere strumenti utili per comprendere le conseguenze dei traumi infantili sul comportamento emotivo e di risposta allo stress nell'adulto (Holmes et al., 2005), poiché, soprattutto nel caso dei roditori, essi possono essere allevati in condizioni ambientali strettamente controllate e testati per profili comportamentali, fisiologici e neuroendocrini mediante l'uso di procedure già ampiamente validate. I roditori (nella maggioranza dei casi ratti e topi), in quanto mammiferi caratterizzati da breve tempo generazionale ma intense cure materne, forniscono un modello altamente versatile per studiare gli effetti delle esperienze pre- e post-natali nello sviluppo dei sistemi neurali che elaborano i comportamenti di, emozioni, risposta allo stress e difesa. Infatti, evidenze recenti suggeriscono come l'esposizione a eventi e/o stimoli stressanti durante il periodo post-natale precoce o nella fase post-svezzamento può alterare permanentemente gli indici neurali e comportamentali di emotività e dipendenza (Holmes et al., 2005). In aggiunta, studi su modelli animali e su umani indicano che condizioni avverse nelle cure precoci possono produrre modificazioni epigenetiche nel sistema comportamentale di risposta allo stress (Provenzi et al., 2015; Kantake et al., 2014; Chau et al., 2014).

Gli studi pionieristici di Levine, Denenberg, Meaney hanno dimostrato che anche sottili alterazioni nell'esperienza durante il periodo precoce post-natale nei ratti possono avere conseguenze a lungo termine per i comportamenti di difesa, emozionali e di risposta allo stress (per sintesi: Champagne et al., 2003; Cirulli et al., 2003; Fleming et al., 1999, 2002; Francis and Meaney, 1999; Heim and Nemeroff, 2001; Hofer, 1994; Meaney, 2001; Newport et al., 2002; Sanchez et al., 2001; Weaver et al., 2001). Nello specifico, la separazione dei piccoli di ratti dalla loro madre durante il periodo precoce post-natale (da 1 a 24 ore e da PND1 a PND14) produce incrementi permanenti nei comportamenti correlati all'ansia, quando la prole è testata da adulta (Caldji et al., 2000a,b; Francis et al., 1999; Francis and Meaney, 1999; Huot et al., 2001, 2002, 2004; Liu et al., 2000a,b; Matthews et al., 1996a,b; McIntosh et al., 1999; Menard et al., 2004; Ogawa et al., 1994; Patchev et al., 1997; Pryce et al., 2001a,b). In aggiunta, mentre l'asse HPA è relativamente inattivo durante il primo periodo post-natale (Levine, 1967; Pihoker et al., 1993; Schmidt et al., 2004), la separazione materna post-natale può causare una iperattività della risposta dell'asse HPA allo stress per tutta la vita (Huot et al., 2002; Ladd et al., 2000; Lehmann et al., 2002a,b; Liu et al., 2000a,b; Ogawa et al., 1994;

Patchev et al., 1997; Plotsky and Meaney, 1993; Pryce et al., 2001a,b; Rosenfeld et al., 1992; Rots et al., 1996; Sutanto et al., 1996; Vazquez et al., 1996). In ultimo, vi sono sempre più evidenze che lo stress nella prima infanzia compromette lo sviluppo dei sistemi neurali che mediano i comportamenti correlati alla ricompensa. Particolare attenzione merita l'evidenza che la separazione materna incrementa il consumo volontario di alcool (Huot et al., 2001; Ploj et al., 2003a,b; Roman et al., 2004; Vazquez et al., 2002), esagera le risposte comportamentali e dopaminergiche agli psicostimolanti, e altera la segnalazione di dopamina e oppioidi nelle regioni correlate alla ricompensa come la corteccia frontale e il nucleus accumbens (Campbell and Spear, 1999; Matthews et al., 1996a,b, 1999, 2001; Matthews and Robbins, 2003; Meaney et al., 2002; Ploj and Nylander, 2003; Ploj et al., 2003a,b; Rots et al., 1996).

In contrasto con questa aumentata sensibilità allo stress, evidenze scientifiche suggeriscono che brevi periodi di separazione materna possono attenuare nei ratti la reattività emozionale nell'età adulta (Holmes et al., 2005). I ratti esposti a brevi separazioni materne (15 minuti), oppure a "manipolazione" (*handling*) da parte di uno sperimentatore, mostravano una riduzione dei comportamenti simil-ansiosi e risposte attenuate dell'asse HPA quando venivano testati da adulti (Bhatnagar and Meaney, 1995; Denenberg et al., 1962, 1969; Francis and Meaney, 1999; Levine, 1957, 1967; McIntosh et al., 1999; Meaney, 2001; Meaney et al., 1985, 1989; Meerlo et al., 1999; O'Donnell et al., 1994; Panagiotaropoulos et al., 2004).

### **1.1.2 Effetti del comportamento materno di cura della prole su fenotipo**

Gli effetti positivi della manipolazione ("*handling*") sembrano essere collegati alle alterazioni qualitative dell'interazione madre-piccolo, in particolare all'incremento dei comportamenti di *licking*, *grooming*, e *arched-back* e *nursing* (LG-ABN) (Caldji et al., 1998; Francis et al., 1999; Levine, 1994; Stern, 1997), e questo sembra essere predittivo della successiva emotività e risposta allo stress nella prole. Infatti, madri che mostrano bassi livelli di LG-ABN tendono a produrre una prole che presenta un comportamento simil-ansioso più elevato, e risposte esagerate allo stress, relativamente alle madri con alti livelli di LG-ABN (Caldji et al., 1998, 2000a,b; Liu et al., 1997). La trasmissione di questi effetti non è da attribuire a fattori ereditari, poiché attraverso le adozioni incrociate si è notato che i piccoli nati da madri con alti livelli di



LG-ABN, ma cresciuti da madri con bassi livelli di LG-ABN, mostravano alti livelli di reattività allo stress, e vice versa (Francis et al., 1999).

## **1.2 Comportamento materno e sistema NPY**

Come abbiamo visto il comportamento materno può influenzare il fenotipo nella prole adulta. In uno studio sul comportamento alimentare e ansioso di topi knock-out condizionale per il recettore Y1 di NPY in area limbica dati in adozione alla nascita a femmine di ceppi diversi (FVB e C57), Bertocchi e colleghi (2011) hanno osservato che i maschi KO sono più ansiosi e pesano di meno rispetto ai controlli (WT) solo nel caso fossero stati allevati dalle madri FVB. Andando poi a valutare le differenze individuali nel diverso grado di cure materne fornito dalle madri adottive, attraverso l'osservazione diretta dell'interazione delle madri con i piccoli nei primi sette giorni di vita della prole, questi ricercatori hanno rilevato una maggior cura della prole da parte delle madri adottive FVB, rispetto alle madri C57. Infatti le madri FVB trascorrevano più tempo sui piccoli nella posizione "arched-back" (considerata una posizione ottimale, che consente di allattare i piccoli ed allo stesso tempo di riscaldarli), mentre le madri C57 adottavano più frequentemente una posizione di allattamento sdraiata senza riscaldare necessariamente la prole (Bertocchi et al., 2011). Di conseguenza le differenze comportamentali e fisiologiche tra topi KO e i WT emergevano solo quando gli animali erano allevati da madri adottive FVB (ad alto grado di cure materne) e non da quelle del ceppo C57 (a basso grado di cure materne). L'analisi dell'espressione di NPY1r in ippocampo ha rivelato che la prole di controllo allevata da FVB presentava una maggiore espressione del recettore rispetto alla prole allevata da femmine C57; l'inattivazione condizionale del gene nei maschi KO si rifletteva quindi in una riduzione significativa del recettore solo nel caso dell'adozione a madri FVB. Tale riduzione condizionale dei recettori Y1 ippocampali si riflette in un aumento del comportamento ansiogeno ed fornisce evidenze genetiche sperimentali del fatto che i recettori Y1 limbici sono necessari per la regolazione del peso corporeo. Tali dati, indicano, infine che le vie neuronali NPY/ Y1R nel sistema limbico sono importanti target della programmazione di ansia e omeostasi energetica, indotta dalle cure materne.

### **1.3 Il neuropeptide Y - NPY**

Il neuropeptide Y (NPY) è un peptide formato da 36 aminoacidi, che fa parte, unitamente al peptide YY e al polipeptide pancreatico (PP), della famiglia dei peptidi pancreatici (Tatemoto et al., 1982). Studi di immunoistochimica e di ibridazione in situ hanno mostrato come NPY sia uno dei peptidi più abbondanti e largamente distribuiti nel sistema nervoso centrale (SNC) di molte specie animali, particolarmente nell'uomo e nei roditori (Eva et al., 2006). NPY, nei roditori, è altamente distribuito 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 et al., 1986; Dumont et al., 1992).

NPY svolge un ruolo nel controllo e nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche, quali il comportamento alimentare, il consumo di acqua, l'apprendimento e la memoria, la locomozione, il comportamento sessuale, il comportamento emozionale, la regolazione della temperatura corporea, il comportamento emozionale, l'eccitabilità neuronale, l'omeostasi cardiovascolare, la secrezione ormonale e i ritmi circadiani (Baraban et al., 1997; Colmers et al., 1994; Grundemar et al., 1992; Hokfelt et al., 1998; Inui et al., 1999; Munglani et al., 1996; Stanley et al., 1993; Vezzani et al., 1999; Wahlestedt et al., 1993). E' stato inoltre ipotizzato che il neuropeptide Y svolge un ruolo molto importante in disordini psichiatrici che includono depressione, disordini alimentari, ansia ed epilessia (Baraban et al., 1997; Colmers et al., 1994; Hokfelt et al., 1998; Munglani et al., 1996; Wahlestedt et al., 1993).

NPY interagisce con una famiglia di recettori accoppiati a proteine-G, che includono i sottotipi Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6 (Michel et al., 1998). Tra questi, il recettore Y1 (Y1R), che è espresso in molti nuclei talamici, ipotalamici, dell'amigdala e dell'ippocampo di topi e ratti ed è localizzato principalmente a livello post-sinaptico (Eva et al., 2006), ha ricevuto particolare attenzione per la capacità di stimolare il comportamento alimentare (Kanatani et al., 2000; Kask et al., 1998; Mullins et al., 2001; Wisialowski et al., 2000), inibire la nocicezione (Naveilhan et al., 2001; Zhang et al., 1994), regolare la secrezione ormonale (Besecke et al., 1994; Kalra et al., 1992), e modulare il comportamento emozionale e la risposta allo stress (Broqua et al., 1995; Heilig, 1995) e l'assunzione di alcool (Schroeder et al., 2003; Sparta et al., 2004; Thiele et al., 2003, 2004).

Gli effetti fisiologici di Y1R sono stati scoperti attraverso studi farmacologici, utilizzando agonisti e antagonisti selettivi per questo sottotipo di recettore, ma il grande numero dei recettori di NPY da un lato, e la scarsa disponibilità di agonisti e antagonisti selettivi dall'altro, hanno reso difficile delineare chiaramente le funzioni di Y1R. L'utilizzo di modelli animali knock-out per Y1R ha fornito una valida alternativa agli studi farmacologici, sebbene i due approcci abbiano mostrato risultati conflittuali (Lin et al., 2004). Queste discrepanze tra studi farmacologici e approcci utilizzando modelli animali knock-out sono state attribuite alla ridondanza di sistemi che controllano funzioni differenti, come l'omeostasi energetica, che possono portare a cambiamenti compensatori durante lo sviluppo. In accordo a questo Whitmann et al. (2005) hanno mostrato un incremento di Y2R nell'espressione dell'mRNA nell'ippocampo e nell'amigdala di topi knock-out per Y1R, che suggerisce come questa plasticità (?) contribuisca al fenotipo alterato dei topi mutati. Pertanto, sono stati proposti e utilizzati modelli animali che presentavano un knock-out di tipo condizionale, vale a dire controllato nel tempo e nello spazio, tale da permettere in evidenza le funzioni specifiche di tale recettore.

#### **1.4 NPY e comportamento alimentare**

Uno dei ruoli cruciali del recettore Y1 è la regolazione del comportamento alimentare e dell'omeostasi energetica, mediante la segnalazione neuronale, metabolica ed endocrina, che è integrata dall'ipotalamo. In particolare, vi è una segnalazione a breve termine che controlla la quantità di cibo assunta ed è mediata da segnali ormonali e neurali derivanti dal tratto gastrointestinale, in particolare colecistochinina (Cck), polipeptide pancreatico (PP) e grelina, mentre la regolazione a lungo termine delle riserve energetiche è controllata da ormoni quali insulina e leptina. Tutti questi segnali convergono nell'ipotalamo, un'area che contiene un gran numero di neurotrasmettitori anabolici e catabolici e di neuropeptidi, tra cui NPY (Eva et al., 2006). Nell'ipotalamo, NPY viene sintetizzato soprattutto in neuroni i cui corpi cellulari sono situati nei nuclei della porzione mediale del nucleo arcuato (ARC) o nei nuclei dorsomediali ipotalamici (DMH) e che proiettano ad aree adiacenti, come PVN, ipotalamo perifornicale (PHF), VMH, e area ipotalamica laterale (LH). Questa trasmissione di informazioni ormonali

viene inviata all'ipotalamo, ed è regolata, sostanzialmente, da specifici recettori espressi in due tipi di neuroni nell'ARC:

Anoressigeni (POMC/Cart), i quali sono stimolati da segnali di sazietà (mediati da insulina e leptina), inibiscono l'assunzione di cibo e aumentano la spesa energetica;

Oressigeni (NPY/AgRP), che sono attivati da segnali di fame (e quindi inibiti da insulina e leptina), stimolano l'assunzione di cibo e la riduzione della spesa energetica.

NPY è il prototipo di ormone che stimola il comportamento alimentare, inducendo, in particolare, l'assunzione di carboidrati (Stanley et al., 1985; Welch et al., 1994). Recenti studi hanno dimostrato che NPY iniettato nei ventricoli cerebrali o nell'ipotalamo, esercita un importante effetto stimolatorio sull'assunzione di cibo, anche in ratti sazi, portando ad obesità (Clark et al., 1984; Levine and Morley, 1984; Stanley et al., 1985, 1993; Vettor et al., 1994; Welch et al., 1994). Successivamente, l'evidenza di un ruolo fisiologico di NPY nel controllo del comportamento alimentare e del peso corporeo è stata ottenuta dalla dimostrazione che esiste una stretta relazione tra l'assunzione di cibo e i livelli di NPY espressi nell'ipotalamo. In aggiunta a ciò, il bloccaggio degli effetti di NPY, attraverso immuno-neutralizzazione o deplezione di NPY, sopprime l'alimentazione e riduce l'obesità (Dube et al., 1994; Erickson et al., 1996a; Segal-Lieberman et al., 2003). Studi in vivo hanno dimostrato che la leptina inibisce la sintesi e il rilascio di NPY (Schwartz et al., 1999), controbilanciando l'effetto di quest'ultimo sul comportamento alimentare, mentre NPY si oppone all'effetto anoressizzante della leptina. In modelli roditori di obesità genetica, dovuta a una carenza di leptina, c'è una sovrapproduzione di NPY nell'ipotalamo che è stata dimostrata essere parzialmente responsabile dell'iperfagia e del diminuito dispendio di energia riscontrati in questi topi (Beck et al., 1993; Jang & Romsos, 1998; McKibbin et al., 1991; Sanacora et al., 1990; Schwartz et al., 1996; Williams et al., 1992). In aggiunta, l'ablazione del gene NPY diminuisce l'obesità in topi bo/ob, e incrementa la sensibilità all'effetto anoressigenico della leptina, come osservato in topi carenti per l'espressione di NPY (Erickson et al., 1996a e b).

Tutti questi dati raccolti suggeriscono che NPY sia un trasduttore dell'appetito, e che rappresenti un target ipotalamico per molti segnali metabolici e ormonali (Eva et al., 2006), come dimostrato da studi farmacologici, in cui la somministrazione ICV nei ratti di analoghi peptidici di NPY che legano selettivamente Y1R stimola allo stesso modo l'appetito (Mullins et

al., 2001), e induce iperinsulinemia (e quindi senso di fame) indipendentemente dall'assunzione di cibo (Gao et al., 2004). Al contrario, la somministrazione periferica di un antagonista altamente selettivo per Y1R inibisce l'assunzione di cibo indotta da NPY, e lo stesso composto risulta privo di effetto se somministrato in topi KO per Y1R (Kanatani et al., 2001); fermo restando che, agonisti o antagonisti di Y1R svolgono più o meno la loro funzione in proporzione alla loro specificità e affinità per il recettore (Kanatani et al., 1996).

La dimostrazione che la segnalazione di NPY- Y1R riveste un ruolo cardine nella stimolazione dell'appetito e nell'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.

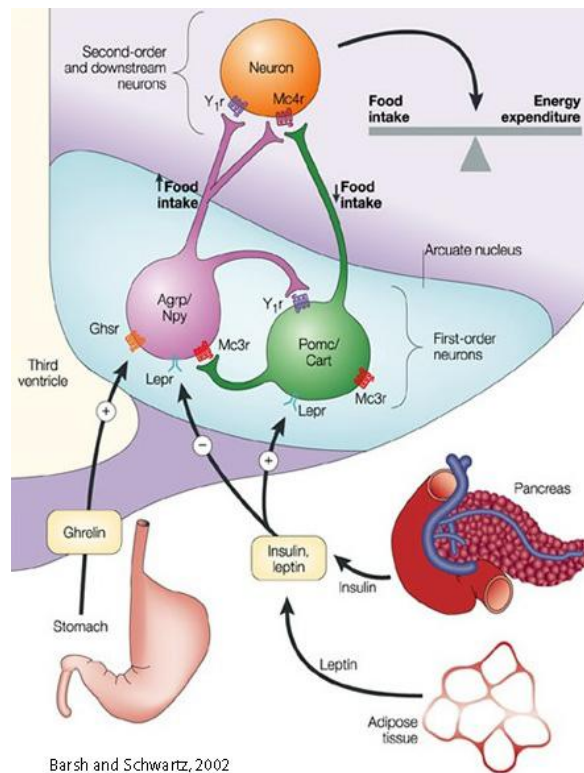


Figura 1 Circuiti ipotalamici oressizzante (NPY/ AgRP) e anoressizzante (Pomc/ Cart) mediati da Y1R.

## **1.5 NPY e comportamento simil-ansioso in risposta a stress**

NPY è il neuropeptide coinvolto nella regolazione del comportamento emozionale e nella risposta comportamentale a stimoli stressanti. Come dimostrato da precedenti studi, esiste un articolato network di strutture cerebrali contenenti il peptide, in particolare amigdala e ippocampo, che giocano un ruolo importante nella regolazione di tali risposte (Heilig, 2004). Broqua et al. (1995) hanno dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare (ICV) di NPY produce un forte effetto ansiolitico in diversi modelli comportamentali, e che topi knock-out per NPY mostrano un fenotipo ansiogeno (Bannon et al., 2000). L'azione ansiolitica di NPY è mediata dall'attivazione del recettore Y1R, di conseguenza la somministrazione di antagonisti diretti contro tale recettore favorisce la comparsa di comportamenti ansiogeni negli animali trattati (Heilig, 2004). Difatti la somministrazione di tali antagonisti di Y1R produce effetti comportamentali opposti, rispetto a quelli ottenuti con la somministrazione intracerebroventricolare di NPY, nell'EPM (Elevated Plus Maze), a causa della riduzione della densità dei recettori Y1R (Heilig et al., 1995).

Inoltre è stato dimostrato un antagonismo funzionale tra il fattore di rilascio delle corticotropine (CRF) e NPY in ippocampo (Thorsell et al., 2000), ipotalamo (Hastings et al., 2001), locus coeruleus (Charney, 2004), sostanza grigia periacqueduttale (Kask et al., 1998) e complesso settale (Kask et al., 2001). Come evidenziato da studi precedenti, dal momento che il CRF induce un potente effetto ansiogeno che si traduce in una serie di stati comportamentali e fisiologici correlati a paura e stress, e che la somministrazione di antagonisti del CRF blocca molti degli effetti comportamentali dello stress (Kalin et al., 1988; Liang et al., 1992), e siccome NPY inibisce l'effetto simil-ansigeno di CRF (Britton et al., 2000), ciò suggerisce che quest'ultimo possa fungere da agente endogeno in grado contrastare il rilascio di CRF indotto da stress nell'amigdala (Davis, 1998; Rogan & LeDoux, 1996). Questo è confermato anche dal fatto che è stato dimostrato un effetto neuromodulatorio sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), responsabile della risposta allo stress. In altre parole, la risposta allo stress sarebbe mediata da NPY, con amigdala e ippocampo che fungono da elementi centrali di una rete di circuiti che agisce come un sistema di allarme endogeno. Nello specifico questo sistema sembra attivarsi quando l'organismo si trova ad affrontare situazioni che comportano stress, andando a compensare gli effetti comportamentali inizialmente messi in atto per far fronte allo stimolo minaccioso. Questo suggerisce che, in un'ottica a lungo termine, la risposta

mediata da NPY possa fungere da meccanismo per l'adattamento delle risposte individuali allo stress cronico e che, conseguentemente, il malfunzionamento di questo sistema possa fornire una base biologica per l'insorgere di meccanismi di eziopatogenesi di disordini psichiatrici come depressione e ansia (Heilig, 2004).

Uno studio di Karl et al. (2004) ha dimostrato come il sistema NPY abbia un ruolo prominente sulle attività fisiologiche nella regolazione delle emozioni, nella misura in cui l'ablazione del gene per il recettore Y1 comporti un significativo aumento del comportamento aggressivo territoriale. Ciò evidenzia come NPY regoli i circuiti serotoninergici, agendo sui recettori Y1, effettuando, di fatto, una sorta di coordinamento fra i processi fisiologici di sopravvivenza.

### **1.6 NPY e comportamento sessuale e riproduttivo**

Sono diverse le tesi che supportano l'ipotesi che NPY giochi un ruolo cruciale nella modulazione delle funzioni riproduttive, tra cui la regolazione del rilascio di GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) e di ormone luteinizzante (LH), la regolazione metabolica della riproduzione, la pubertà, il comportamento sessuale (Eva et al., 2006; Crowley et al., 1987a, 1987b; Kalra et al., 1984), attraverso meccanismi pre- e post-sinaptici. Infatti, NPY può essere secreto anche nella circolazione portale ipofisaria, modulando così il responso delle cellule gonadotrope nei confronti dell'azione stimolatoria del GnRH, amplificandone la sua capacità di innescare l'ondata pre-ovulatoria dell'LH (Eva et al., 2006). In sostanza, la presenza del neuropeptide nei vasi sanguigni che alimentano ipotalamo e ipofisi può potenziare la capacità dell'ormone di rilascio delle gonadotropine, il quale attiva l'ormone luteinizzante, che innescerà poi l'ovulazione. In aggiunta, l'abilità di NPY di suscitare il rilascio di GnRH risulta aumentata immediatamente prima del proestro (Besecke et al., 1994); infatti il suo effetto sulla secrezione del GnRH non può spiegarsi senza prendere in considerazione il contesto ormonale che si associa a questa fase del ciclo estrale. La sintesi e il rilascio di NPY, però, possono risultare aumentati anche in risposta a delle richieste metaboliche, come la fame o un elevato dispendio energetico, che portano, in questo caso, all'inibizione del rilascio di LH (Kalra et al., 1991; Lewis et al., 1993). E' stato poi dimostrato da studi farmacologici che la facilitazione o l'inibizione della secrezione di GnRH da parte di NPY è mediata da recettori differenti: in particolare, Y1R è responsabile dell'aumento del rilascio di LH (Jain et al., 1999;

Kalra et al., 1992; Leupen et al., 1997). In dimostrazione di ciò, è stato osservato che NPY e altri peptidi simili favoriscono il rilascio di LH, mentre l'uso di antagonisti specifici per Y1R inibisce le ondate di LH in fase di proestro nei ratti (Eva et al., 2006).



## Capitolo 2

### Scopo della tesi

Il lavoro alla base di questa tesi è stato svolto sulla base di una serie di studi effettuati in precedenza dal laboratorio di Psicobiologia del comportamento del dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Parma, in collaborazione con il laboratorio della prof.ssa C. Eva presso il dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino, che ha utilizzato il modello murino knock-out condizionale per NPY1R allo scopo di ampliare le conoscenze sulle funzioni del recettore Y1R in area limbica e dei suoi effetti sulla regolazione del metabolismo, del comportamento alimentare, emozionale, nonché sociale e riproduttivo in relazione al sesso e all'ambiente materno precoce. Gli animali sperimentali utilizzati per questo studio, a differenza dello studio di Bertocchi et al. del 2011, sono stati dati in adozione a madri del ceppo BALB/c (considerato un ceppo che fornisce un basso grado di cure materne) per evitare eventuali variazioni fenotipiche causate da un diverso grado di cure materne fornite da diversi ceppi di madri adottive.

Lo studio effettuato presso il laboratorio di Psicobiologia del comportamento si è articolato in tre fasi:

1. Somministrazione di test condotti su topi di entrambi i sessi in condizioni basali, allo scopo di contribuire allo studio degli effetti della delezione del recettore Y1R in area limbica su comportamento alimentare, ansioso e sociale.
2. I topi maschi sono stati sottoposti a una procedura di stress psicosociale cronico per studiare la risposta metabolica e comportamentale.
3. I topi femmina sono state sottoposte a un evento riproduttivo, che potrebbe rappresentare un *challenge* metabolico e/o psicologico tale da mettere in evidenza eventuali alterazioni fenotipiche, che potrebbero influire sul comportamento riproduttivo delle stesse.

## Capitolo 3

### Materiali e Metodi

#### 3.1 Modello animale sperimentale

##### 3.1.1 Modello murino KO condizionale per NPY1R

Come già accennato, per la valutazione degli effetti fisiologici mediati da Y1R nel sistema limbico (e quindi in tutte quelle regioni deputate al controllo dei fenomeni legati a comportamento sociale, emozionale, etc.) i gruppi di ricerca dell'Università degli Studi di Torino e del Max Planck Institute di Heidelberg hanno generato un modello murino knock-out condizionale per il recettore Y1R, in cui la delezione genica è controllata nello spazio e nel tempo attraverso il sistema doxiciclina-dipendente della CRE ricombinasi. La delezione è ristretta selettivamente ai neuroni di alcune regioni del proencefalo che esprimono la subunità alpha della calcio-calmodulina chinasi di tipo II ( $\alpha$ CamKII), quali amigdala, ippocampo, striato e nucleo arcuato ipotalamico. Inoltre, la delezione viene limitata al proencefalo post-natale e controllata a partire dal PND 40, per evitare possibili effetti indotti dall'inattivazione del gene durante lo sviluppo del topo (Bertocchi et al., 2011).

##### 3.1.2 Sistema tet-off doxiciclina dipendente

Poiché l'espressione cronica di un transgene potrebbe causare anomalie nello sviluppo o fenomeni compensativi in grado di mascherare il ruolo della proteina di interesse, è consigliabile utilizzare un controllo sull'espressione del transgene. Sono disponibili numerosi sistemi inducibili con caratteristiche comuni, come ad esempio il tetracycline- regulatory system (Gossen and Bujard, 1992; Shockett et al., 1995), regolato da un antibiotico della famiglia delle Tetracicline (Tet), in cui è richiesta la presenza del tTA (tetracycline transactivator) e del promotore tTA-dipendente che controlla l'espressione del gene CRE a valle. Il tTA è un fattore di trascrizione, costituito dal repressore dell'operone di resistenza alla tetraciclina del trasposone Tn10 di *Escherichia coli* (tet) e dalla porzione carbossi-terminale della proteina 16 dell'herpes simplex virus (VP16) (Furth et al., 1994). In *E. coli*, la trascrizione del gene che media la resistenza per la tetraciclina è regolata negativamente dalla presenza del

repressore (tetR) sull'operatore del gene: in presenza dell'antibiotico, tetR non lega più l'operatore, situato nella regione del promotore dell'operone, permettendo così la trascrizione. Ricombinando tetR con la porzione C-terminale di VP16, nota per la sua essenzialità nella trascrizione delle proteine virali precoci (Triezenberg et al., 1988), è stato ottenuto un trans-attivatore ibrido capace di stimolare promotori ricombinati con l'operatore della tetraciclina (tetO).

Nel modello animale descritto sopra, il costrutto genico che porta all'espressione del transattivatore tTA presenta il promotore dell' $\alpha$ CamKII: questo permette l'espressione del transattivatore e di conseguenza della CRE ricombinasi solo nelle aree del cervello di interesse. L'inducibilità del sistema Tet dipende dalla presenza di una tetraciclina, come ad esempio la Doxyciclina (Dox). Nel sistema "Tet-off", la Tet inibisce l'interazione tra tTA e la ricombinasi Cre, che quindi rimane inattiva.

### **3.1.3 Sistema CRE-loxP**

Gli studi effettuati negli anni sul batteriofago P1 hanno messo in luce la presenza nel genoma dello stesso di un sistema di ricombinazione sito-specifico, definito sistema CRE-loxP. Esso è composto da due componenti: la sequenza "loxP" presente nel DNA del fago che rappresenta il sito in cui avviene la ricombinazione e la proteina CRE che effettua la ricombinazione del DNA compreso tra due sequenze loxP (Sternberg and Hamilton, 1981). Il sito loxP consiste in una sequenza di 34 bp contenente due ripetizioni invertite di 13 bp separate da una regione spaziatrice di 8 bp (Hoess et al., 1982). Quando i due siti loxP risultano di senso invertito la CRE ricombinasi è in grado di riconoscerli ed effettuare un'inversione del DNA frapposto tra i due siti; invece, quando i due siti loxP risultano essere nello stesso senso la CRE ricombinasi è in grado di riconoscerli e tagliare il DNA compreso tra i due siti.

Nel modello animale in questione, il costrutto genico che esprime la CRE ricombinasi presenta un promotore tTA dipendente, così che in assenza del tTA non possa essere espressa. In assenza di doxyciclina, il trans attivatore tTA può interagire con il proprio target e indurre la trascrizione del gene CRE. La ricombinasi CRE taglia poi il filamento del DNA in corrispondenza dei due siti loxP, che nel modello animale in questione fiancheggiano gli esoni 2 e 3 del gene di Y1R, determinando la delezione selettiva del gene stesso.

Per la generazione del modello animale (NPY1R<sup>fl</sup>) utilizzato nello studio di Bertocchi e colleghi, sono state utilizzate tre linee di topi geneticamente modificati:

- NPY1R2lox: linea contenente il gene NPY1R “floxato”
- Tg $\alpha$ CamKII-tTA: linea che esprime il tTA
- TgLC1: linea in cui è presente il gene Cre e il gene reporter Luciferasi

Dall'incrocio delle prime due linee si ottiene la linea NPY1R2lox/Tg $\alpha$ CamKII-tTA, che esprime il transattivatore regolato della tetraciclina (tTA), fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni a valle della sua sequenza promotrice (Ptet), localizzato a sua volta sotto il controllo del promotore  $\alpha$ -Ca<sup>2+</sup>/calmodulina chinasi II ( $\alpha$ -CaMKII). Dall'incrocio di NPY1R2lox e TgLC1 si genera NPY1R2lox/TgLC1, che contiene il gene reporter Luciferasi e il gene per la ricombinasi Cre a valle di Ptet, composto da 7 siti di legame per il repressore Tet (tetraciclina-dipendente), oltre al gene Y1r floxato. Trattandosi di un sistema Tet-off in assenza della tetraciclina regolatrice, in questo caso la Doxyciclina, il tTA induce la trascrizione del gene Cre, a valle di Ptet, che a sua volta taglia il frammento genico in cui è presente NPY1R.

Per mantenere inattiva la ricombinasi Cre le madri vengono sottoposte al trattamento con Doxyciclina (Dox) dal giorno del concepimento al giorno della nascita; dopodiché i piccoli vengono affidati a madri allattanti Dox-naïve, in modo tale che nella linea modello si attivi Cre approssimativamente tra i 35 e i 50 giorni dopo la nascita.

### **3.1.4 Generazione del KO condizionale**

Il gruppo di animali sperimentali utilizzati per lo svolgimento del mio lavoro di tesi è stato ottenuto a partire da tre diverse linee genotipiche di topi, due necessarie per l'ottenimento della linea sperimentale, ovvero **Topi NPY1R<sup>2lox</sup>/Tg<sup>LC1</sup>** e **Topi NPY1R<sup>2lox</sup>/Tg <sup>$\alpha$ CaMKII-tTA</sup>**, e una necessaria per il mantenimento della linea NPY1R <sup>$\alpha$ CaMKII-tTA</sup> in emizigosi (l'omozigosi è incompatibile con la vita), ovvero **Topi NPY1R<sup>2lox</sup>**;

Il KO condizionale per NPY1R è stato pertanto ottenuto seguendo il protocollo descritto nello studio di Bertocchi et al. (2011): sono stati incrociati topi appartenenti alle due linee NPY1R2lox/TgLC1 e NPY1R2lox/Tg $\alpha$ CaMKII-tTA, al fine di realizzare un controllo spazio-

temporale della ricombinasi CRE, attraverso il promotore specifico  $\alpha$ CaMKII e il sistema tet-off. Questo sistema consente in presenza di un antibiotico (nella fattispecie doxiciclina) di impedire la trascrizione della ricombinasi e di conseguenza consente l'espressione di NPY1R; al contrario, in assenza dell'antibiotico, il trans-attivatore (tTA) può legare il Tre (Tet Responsive Element), e ciò consente la trascrizione della ricombinasi e la mancata espressione di NPY1R. Seguendo lo specifico protocollo di accoppiamento, sono stati ottenuti quattro differenti genotipi (figura 5):

- $NPY1R^{2lox} / Tg^{LC1}$ ;
- $NPY1R^{2lox}$ ;
- $NPY1R^{2lox} / Tg^{\alpha CaMKII-tTA}$ ;
- $NPY1R^{2lox} / Tg^{\alpha CaMKII-tTA/LC1}$ .

Il gruppo  $NPY1R^{2lox} / Tg^{\alpha CaMKII-tTA/LC1}$  rappresenta il modello knock-out condizionale ( $NPY1R^{rfb}$ ), in cui l'inattivazione del gene per il recettore Y1 è causata dall'attività di delezione della Cre- ricombinasi; mentre le restanti tre linee, rappresentano i controlli ( $NPY1R^{2lox}$ ), ovvero i topi wild-type in cui non è presente l'inattivazione. La prole ottenuta andrà successivamente genopitizzata.

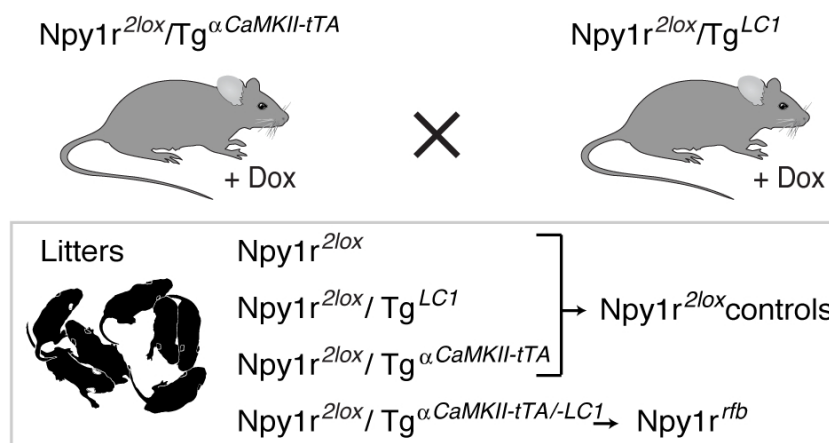


Figura 2 Schema degli accoppiamenti tra diverse linee murine per ottenere il KO condizionale.

Per massimizzare le probabilità di concepimento, ogni animale maschio è stato accoppiato con due femmine in un'unica gabbia per un periodo di 10 giorni, al termine del quale il maschio è stato tolto dalla gabbia e le due femmine sono state isolate in due gabbie separate e lasciate

indisturbate fino al momento del parto. Contemporaneamente sono stati accoppiati maschi e femmine del ceppo BALB/ c, in modo tale che al momento della nascita dei topi sperimentali ci fosse un numero sufficiente di madri adottive.

L'intera procedura ha previsto la stabulazione degli animali in gabbie di plexiglass (42 cm x 26.5 cm x 15 cm) con fornitura di cibo in pellet (4RF21, Mucedola, Milano, Italia) ed acqua *ad libitum*. La stanza di allevamento è stata mantenuta ad una temperatura di 22°C ± 2°C e con un ciclo di luce-buio di 12 ore (11:00-23:00). Tutte le procedure sperimentali sugli animali sono state effettuate secondo il DDL26/2014.

### **3.2 Trattamento con doxiciclina e procedura di adozione**

A partire dal primo giorno di accoppiamento, alle femmine è stato sostituito il beverino dell'acqua con uno contenente una soluzione zuccherina (1% di saccarosio), in cui è stata diluita doxiciclina (50mg/l; Sigma-Aldrich). Per evitare la sedimentazione dell'antibiotico, ogni giorno i beverini sono stati agitati, e ogni due giorni la soluzione è stata ripreparata e sostituita. Inoltre, a causa delle proprietà chimiche fotosensibili della doxiciclina, i beverini contenenti tale soluzione devono necessariamente essere scuri.

Il trattamento con questo antibiotico è stato poi interrotto alla nascita dei piccoli (Post Natal Day 0, PND 0) (figura 6), i quali entro 12 ore dal parto sono stati distinti per genere, pesati tramite l'utilizzo di una bilancia digitale e dati in adozione a madri dox-naïve (ovvero mai esposte a doxiciclina) di ceppo BALB/ c, al fine di permettere la completa eliminazione dell'antibiotico in circolo nell'organismo dei piccoli, che generalmente avviene in maniera completa intorno al PND 40, e per valutare successivamente l'effetto dell'ambiente precoce sul modello NPY1R<sup>rfb</sup>.

Durante la procedura di adozione, le madri adottive sono state temporaneamente allontanate dalle proprie gabbie per permettere la sostituzione della propria prole con quella sperimentale. Alle nidiatae con un numero di piccoli inferiore a 6 sono stati aggiunti piccoli appartenenti alla madre adottiva al fine di rendere quanto più omogeneo possibile il numero di piccoli per nidiata.



*Figura 3 Piccoli a poche ore dal parto.*

### **3.3 Monitoraggio della crescita corporea e svezzamento**

Tutti i piccoli sono stati pesati a PND10 e a PND27. Quest'ultimo coincide con il giorno dello svezzamento, in cui ciascuna nidiata è stata separata dalla madre adottiva, e i fratelli dello stesso sesso sono stati stabulati nella stessa gabbia. Come forma di riconoscimento è stata posta una targhetta metallica sull'orecchio dell'animale contenente un numero identificativo (National Band Tag Co., New Port KY-USA). Inoltre, durante la procedura è stato prelevato dalla coda di ciascun animale un quantitativo di tessuto (2 mm circa), che è stato posto in provette eppendorf contenenti etanolo e conservato a -20°C, al fine di consentire successivamente la genotipizzazione dell'animale per discriminare i KO dai WT. Al termine di tale procedura tutti i piccoli, in gruppi di fratelli dello stesso sesso, sono stati stabulati in gabbie di plexiglass seguendo le condizioni standard di temperatura, ciclo di luce-buio, cibo e acqua.

Dallo svezzamento fino all'età adulta (PND 90) i topi sono stati pesati settimanalmente in corrispondenza del giorno dello svezzamento allo stesso orario, al fine di monitorare la crescita corporea dell'animale.

### **3.4 Genotipizzazione**

Gli animali sono stati caratterizzati dal punto di vista genomico, in modo da distinguere i topi KO dai WT (Wilde type), in cui non è avvenuta la delezione del gene di nostro interesse. Quest'ultimi sono stati quindi utilizzati come gruppo di controllo. L'operazione avviene attraverso il processo di *estrazione* del DNA da tessuto solido e il processo di analisi tramite *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

#### **1. Processo di Estrazione del DNA**

La procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico da tessuti solidi è stata effettuata utilizzando il Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), che prevede diversi passaggi:

- Lisi cellulare: a circa 5-10 mg di campione viene aggiunta la soluzione di lisi (300 µl) per lisare le membrane cellulari e liberare gli acidi nucleici, coadiuvata dalla Proteinasi K (1.5µl-20 mg/ml) che denatura le proteine;
- Trattamento con RNAsi: successivamente ad una incubazione overnight a 55°C nel termomixer, viene aggiunto alla soluzione l'enzima RNAsi (1.5 µl-4 mg/ml), con lo scopo di rimuovere l'RNA presente, si incuba a 65°C per 45 minuti;
- Precipitazione delle proteine: si fanno precipitare le proteine e i lipidi mediante l'uso della Protein Precipitation Solution (100 µl). Segue una centrifugazione che porta alla formazione del sovrantante, nel quale risiedono gli acidi nucleici, e un deposito di pellet, nel quale risiedono elementi di scarto cellulare;
- Precipitazione del DNA: il sovrantante ottenuto viene prelevato e trattato con l'uso di alcoli, quali Isopropanolo al 100% nella prima fase (300 µl) e Etanolo al 70% nella seconda fase. Ad ogni passaggio viene effettuata una centrifugazione, per fissare il DNA alla base della provetta, seguita dall'eliminazione dell'alcol rimanente;
- Idratazione del DNA: in seguito all'evaporazione dell'alcol in eccesso, viene aggiunta al DNA l'Hydration Solution (30-50 µl). Il tutto viene incubato a 65°C per circa un'ora. Il DNA così ottenuto può essere quindi conservato a temperature comprese tra -20° e -4°C.



## 2. Analisi genetiche tramite PCR

L'applicazione della Reazione di Polimerizzazione a Catena (PCR) consente la selezione e l'amplificazione di una specifica sequenza di DNA. Nel caso in questione, l'elemento discriminante tra topi KO e topi WT (controlli) è stato il trans-attivatore tTA: la sua presenza indica l'avvenuta delezione del gene di nostro interesse. Per effettuare la reazione di PCR, sono stati utilizzati primer specifici per la sequenza scelta. Come controllo interno positivo è stata amplificata una regione del gene VGF, tramite l'utilizzo di primer specifici per tale regione. Il DNA genomico è stato sottoposto a 30 cicli di PCR in un volume di reazione di 20  $\mu$ l, impiegando 1U di GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), dNTPs 0.2 mM, 8 pmol di ciascun primer, in una soluzione a 1X di Reaction Buffer. In seguito ad una iniziale denaturazione a 94°C per 10 min, i successivi cicli hanno previsto una denaturazione a 94°C per 45 sec, un processo di annealing a 56°C per 45 sec ed un'estensione della catena a 72°C per 45 sec. L'ultimo ciclo di PCR ha previsto, infine, un allungamento della catena a 72°C per 10 minuti. La presenza degli amplificati per il gene tTA e per il gene VGF è stata valutata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2.5%. Tale procedura prevede la migrazione, all'interno di una cella elettroforetica, in presenza di un campo elettrico, del DNA di interesse insieme al Blu di Bromofenolo (il cui scopo è quello di coadiuvare la precipitazione del DNA). Oltre al DNA di interesse è stato sottoposto a tale procedura anche un marker di peso molecolare di circa 600 paia di basi (bp). Il gel, ancora liquido, è stato fatto percolare all'interno della cella elettroforetica e tramite l'uso di un apposito pettine, sono stati creati i pozzetti all'interno del quale successivamente sono stati apposti i campioni di DNA. Una volta solidificato il gel e rimosso il pettine, è stato posto all'interno della cella il tampone TAE1X, il cui scopo è quello di permettere la formazione del campo elettrico. Successivamente all'apposizione dei campioni all'interno dei pozzetti, è stata applicata una corrente di circa 50 mV per un tempo di 15-20 minuti. Tale carica elettrica ha consentito la migrazione del DNA (carico negativamente) verso il polo positivo della cella, in relazione a quelle che sono le caratteristiche di peso molecolare e carica di ciascun frammento di DNA. Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato posto in Etidio Bromuro, intercalante delle basi azotate del DNA, il quale ha la capacità di rendere i campioni fluorescenti se illuminati ai raggi UV (figura 7). Questo ha consentito, infine, di analizzare l'eventuale avvenuta del KO condizionale negli animali di interesse.

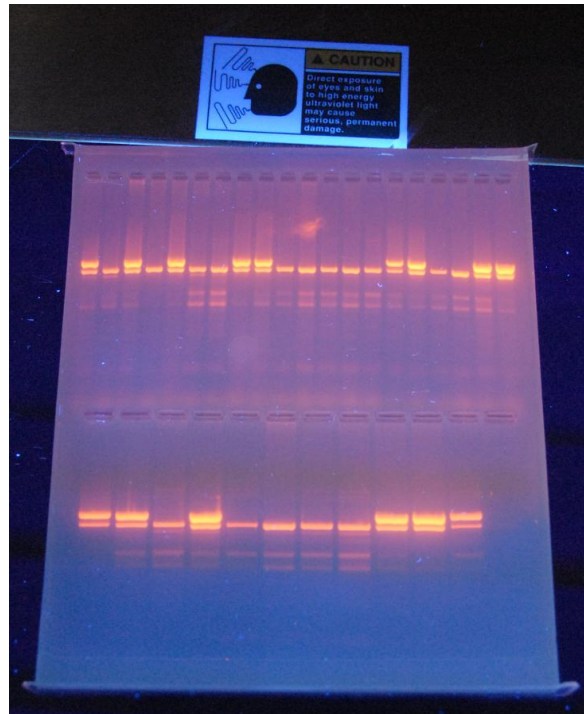


Figura 4 Immagine dell'elettroforesi su gel di Agarosio del DNA genomico; le bande indicano rispettivamente la presenza del gene VGF (sempre presente) e tTA, presente solo negli animali della linea  $NPY1R^{fb}$  ( $NPY1R^{2lox}/Tg^{\alpha-CaMKII-tTA}$ ).

## Capitolo 4

### ***ESPERIMENTO 1: caratterizzazione del comportamento ansioso e sociale in topi maschi e femmine allevati da madri di ceppo BALB/c***

#### **4.1 Materiali e metodi**

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di analizzare il fenotipo comportamentale degli animali sperimentali in condizioni basali, in relazione a stimoli ambientali e sociali, per contribuire alla comprensione del ruolo del sistema NPY/Y1R nella regolazione dell'ansia e delle interazioni sociali.

Per lo svolgimento di questo esperimento, è stata utilizzato un gruppo di animali sperimentali, che al momento della nascita sono stati dati in adozione a madri di ceppo BALB/c dox-naïve. Tale gruppo è costituito da un totale di 26 animali, distribuiti nel seguente modo:

	<b>KO</b>	<b>WT</b>
<b>MASCHI</b>	8	10
<b>FEMMINE</b>	3	5

Tutti questi animali hanno seguito il normale protocollo di monitoraggio della crescita corporea (come descritto nel paragrafo “monitoraggio della crescita corporea e svezzamento”) fino al raggiungimento dell'età adulta, e successivamente sono stati sottoposti a differenti test comportamentali. I topi maschi sono stati isolati a PND 95, prima dell'inizio dei test, mentre le femmine sono rimaste stabulate all'interno delle gabbie con le sorelle.

##### **4.1.1 Test dell'anedonia**

Il termine anedonia descrive un'insensibilità patologica a provare piacere, anche in circostanze e attività normalmente piacevoli, come dormire o nutrirsi, ed è propria di alcune malattie psichiatriche, come disturbi dell'umore e depressione.

Adattando la definizione di anedonia al topo, possiamo dire che, valutare i comportamenti di tipo anedonico significa trovare una attività piacevole per l'animale, che sia quantificabile, al fine di misurare esattamente tale comportamento di ricerca del piacere; generalmente si usa a questo scopo la naturale propensione dell'animale a preferire l'acqua nella quale è disciolto dello zucchero, piuttosto che acqua semplice.

Nello specifico, il test è stato effettuato sui topi maschi KO e WT a PND 96. Sono state preparate due serie di beverini, una con acqua (A) e una con soluzione zuccherina (Z) al 1% (Figura 8). Prima dell'inizio del test tutti i beverini e gli animali sono stati pesati; a questo punto i due differenti beverini sono stati inseriti simultaneamente in ogni gabbia. È inoltre importante posizionare i beverini in maniera random, quindi evitare che tutti quelli contenenti solo acqua siano a inseriti a destra e quelli con soluzione zuccherina a sinistra, o viceversa, in modo tale che si possa escludere che il risultato di una preferenza sia dovuto all'abitudine dell'animale di bere a destra o a sinistra. Dopo 24 ore i beverini sono stati rimossi e pesati nuovamente, in modo da conoscere il quantitativo di acqua e di acqua e zucchero bevuto dall'animale. Allo stesso modo vengono pesati i topi. Il consumo di acqua e soluzione zuccherina è stato stimato pesando i beverini e calcolando la differenza di peso con il giorno precedente. I risultati verranno mostrati come % di preferenza della soluzione zuccherina rispetto alla soluzione totale.



*Figura 5 Beverini contenenti acqua (A) e soluzione zuccherina (Z).*

### **4.1.2 Marble test**

Il Marble test, o test delle biglie, permette di studiare il comportamento neofobico o simil-compulsivo nei roditori (De Wet et al., 2016). Seppellire e scavare fanno parte del normale comportamento dei roditori, sia in natura che in laboratorio (Deacon, 2006b). Si tratta di comportamenti volti alla ricerca di cibo, a seppellire oggetti nuovi, nocivi e non, e a costruire adeguati nidi per difendersi dai predatori. Quindi, questi comportamenti si presentano sia in situazioni normali, come la ricerca di cibo, sia in circostanze di stress e ansia.

Il test prevede che venga preparata una gabbia (42 cm x 26.5 cm x 15 cm) contenente 5 cm di segatura, appiattita e uniformata. Su questa si posiziona un pattern regolare di 12 biglie di vetro, distanziate ugualmente tra loro e si introduce l'animale, che ha la possibilità di esplorare l'ambiente per 30 minuti. Sono da considerarsi seppellite, le biglie che alla fine del test sono coperte per almeno 2/3 dalla segatura (figura 9). Un elevato numero di biglie seppellite è indice di neofobia e impulsività, mentre un'elevata attività locomotoria è sintomo di irrequietezza.



*Figura 6 Marble test*

In particolare, il marble test è stato condotto su tutti gli animali sperimentali, sia maschi che femmine, rispettivamente a PND 99 e PND 114.

Ciascun animale, a turno, è stato posizionato all'angolo di una gabbia ed è stata effettuata una registrazione per 30 minuti con una videocamera posizionata a 2 metri dalla gabbia. Alla fine del test, il topo è stato rimosso con attenzione, e sono state contate le biglie scoperte.

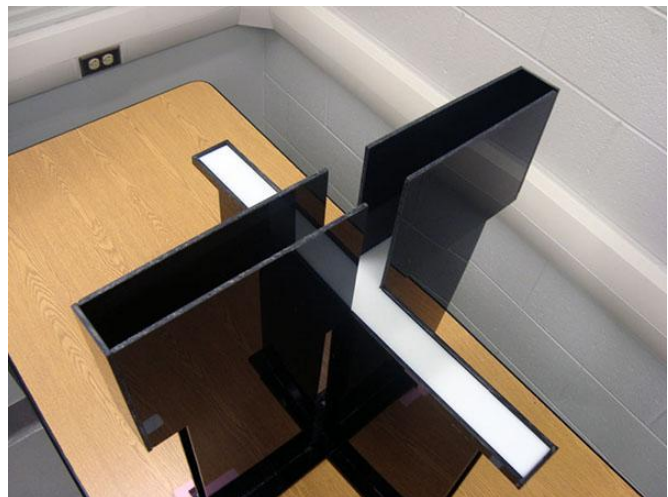
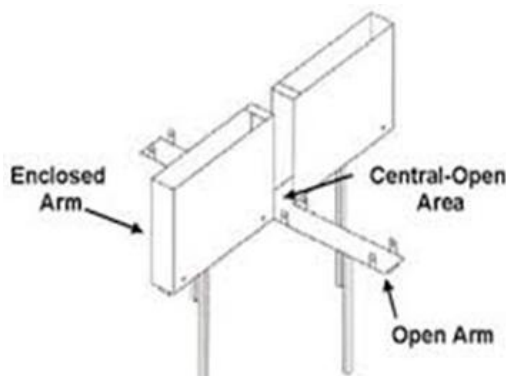
Successivamente, i video sono stati analizzati con il software “Ethovision” (Noldus, Olanda), che ha permesso di valutare attività locomotoria, velocità media e durata dell’immobilità, sia in intervalli della durata di 5 minuti l’uno, che nei 30 minuti totali.

#### **4.1.3 Test dell’Elevated Plus Maze (EPM)**

L’elevated plus maze (EPM) è un test comportamentale semplice ed efficace che è stato ampiamente validato per studiare il comportamento ansioso nei roditori (Walf and Frye, 2007). Il test analizza la tendenza di questi animali ad esplorare nuovi ambienti, contrapposta a quella di evitare aree aperte non protette e molto luminose (Montgomery, 1955).

Comportamenti considerati indicativi dello stato emozionale dell’animale sono: latenza, frequenza e durata delle visite nei bracci aperti e chiusi; inoltre il numero totale di ingressi nei bracci chiusi è utilizzato come indice generale di attività, mentre il tempo speso nei bracci aperti è impiegato come indicatore dei livelli d’ansia del soggetto sperimentale.

In particolare, è stato utilizzato un apparato sperimentale in Plexiglas a forma di croce, montato su un supporto di 40 cm, costituito da due bracci chiusi delimitati da pareti scure, con una altezza di 20 cm, e due bracci aperti, con dimensioni di 30 cm x 5 cm (Figura 10). L’animale può, quindi, muoversi nei bracci chiusi, rimanendo al riparo, oppure può camminare nei bracci aperti, sospeso nel vuoto.



*Figura 7 Elevated plus maze*

Il test è stato condotto su tutti gli animali sperimentali, sia maschi che femmine, rispettivamente a PND 101 e PND 115. Ogni topo, a turno, è stato posizionato al centro dell'apparato, nello spazio quadrato tra i quattro bracci, con il muso rivolto verso un braccio aperto, con possibilità di esplorare l'ambiente circostante per un tempo totale di 5 minuti.

I movimenti e comportamenti di ogni animale sperimentale sono stati registrati con una videocamera, posizionata su un cavalletto a circa due metri dall'apparato. Tutti i video sono stati successivamente analizzati con il software "The Observer" (Noldus, Olanda), che ha permesso di calcolare il tempo che i singoli topi hanno trascorso nei bracci chiusi e aperti, rispetto alla durata totale del test (5 minuti), la durata del walking nei diversi bracci, e infine, la frequenza di ingresso nei due ambienti, indici della quantità di attività locomotoria, e quindi dell'irrequietezza dell'animale.

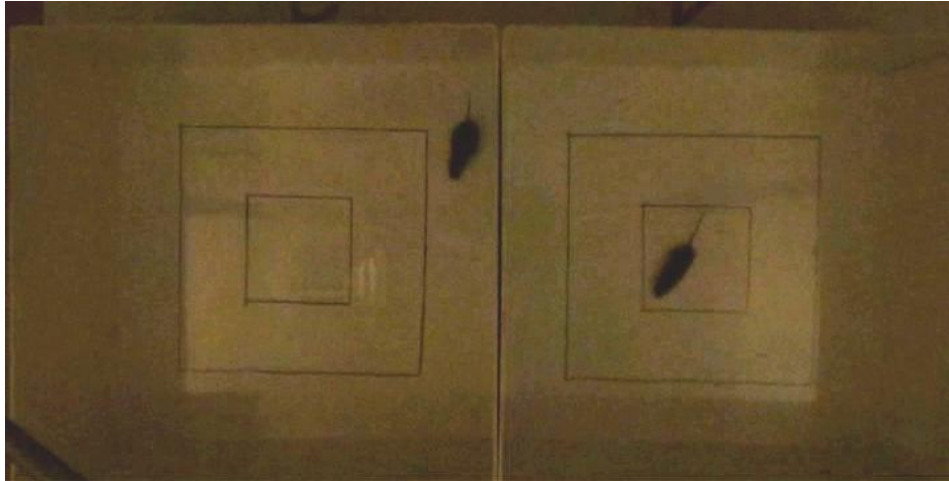
#### **4.1.4 Test dell'Open Field classico (OPF)**

L'Open Field è uno dei test maggiormente utilizzati per lo studio del comportamento ansioso nei roditori (Crawley, 1985). Il comportamento viene valutato a seconda del tempo speso e della distanza percorsa all'interno delle zone dell'arena; infatti lo stato d'ansia è strettamente correlato a movimenti limitati in frequenza e ad una maggiore durata di tempo trascorso nell'area centrale.

L'apparato sperimentale per lo svolgimento del test è costituito da un'arena quadrata (53 x 53 cm), con pareti laterali alte 40 cm, che presenta al suo interno due suddivisioni tracciate con delle linee nere sul pavimento, non distinguibili dai topi. In questo modo sono state ricavate tre aree quadrate concentriche (figura 11):

- ❖ un'area periferica delimitata dalle pareti esterne dell'arena (53 x 53 cm);
- ❖ un'area mediana (35 x 35);
- ❖ un'area centrale definita dal quadrato più interno (15 x 15 cm).

Sono state realizzate due arene identiche, in modo tale da registrare due animali contemporaneamente, illuminate con una luce fioca.



*Figura 8 Arene dell'open field classico*

Il test è stato condotto su tutti gli animali sperimentali, sia maschi che femmine, rispettivamente al PND 102 e PND 116. Ogni topo, a turno, è stato posizionato in un angolo dell'arena, con il muso rivolto verso la parete, e ha avuto la possibilità di esplorare l'ambiente circostante per un tempo totale di 5 minuti, al termine del quale, l'animale è stato riposto nella sua gabbia.

I movimenti e comportamenti di ogni animale sperimentale sono stati registrati con una videocamera, posizionata su un cavalletto a circa due metri dall'apparato. Tutti i video sono stati successivamente analizzati con il software "Ethovision" (Noldus, Olanda). Per la lettura dei video, tale programma costruisce un'arena virtuale suddivisa in più zone, le stesse ottenute dalla suddivisione dell'arena tramite le linee tracciate sul pavimento, denominate bordo, zona mediana e centro. In questo modo è stato possibile calcolare il tempo trascorso in ogni area e la distanza totale percorsa nell'arena (per definire la presenza del topo all'interno di una delle tre aree si è deciso di tenere conto di tutte le zampe dell'animale all'interno delle stessa area).

#### **4.1.5 Test dell'Open Field Sociale**

Il test dell'open field sociale è utilizzato per valutare l'evitamento sociale e il ridotto interesse di contatto, caratteristiche tipiche della depressione maggiore (Stein et al., 2001). Si tratta di una versione modificata del test dell'Open Field classico, e prevede la comparazione tra l'esplorazione libera di un campo aperto (open field) e l'esplorazione dello stesso in presenza di un animale intruso.

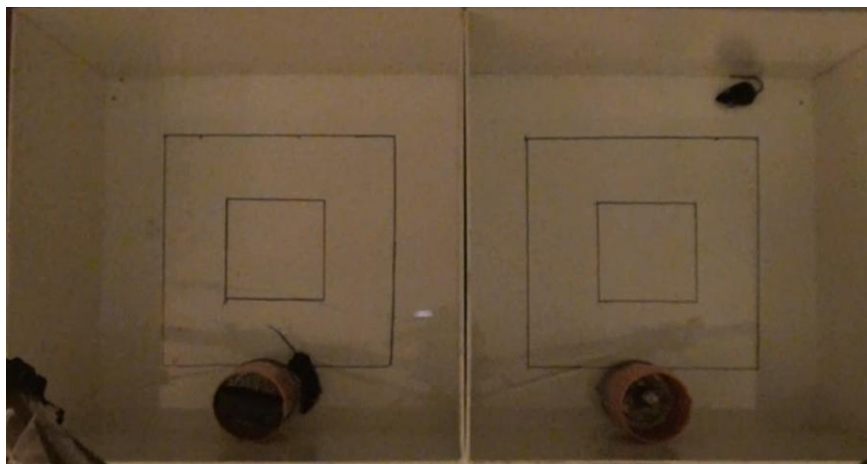


L'apparato sperimentale utilizzato è costituito dalle stesse aree dell'open field classico, ovvero bordo, mediana e centro, ma con l'aggiunta di una zona sociale, in cui viene collocata una gabbietta di rete metallica (10 cm di diametro).

Il test è costituito da due diverse sessioni:

- ❖ Sessione T1, in cui l'arena contiene la gabbietta di rete metallica vuota, localizzata in prossimità di una delle pareti dell'arena, e tenuta ferma da un peso posto sulla sommità;
- ❖ Sessione T2, in cui le condizioni sono identiche alla prima sessione, con l'aggiunta di un animale intruso, dello stesso sesso ed età, nella gabbietta metallica. In questo modo si può verificare interazione olfattiva, visiva e tattile tra i due animali, ma la gabbietta impedisce le interazioni di tipo violento o sessuale.

Sono state realizzate due arene identiche, in modo tale da registrare due animali contemporaneamente (figura 12).



*Figura 9 Test dell'Open Field sociale*

Il test è stato condotto su tutti gli animali sperimentali, sia maschi che femmine, rispettivamente al PND 102 e PND 116, in seguito al test dell'open field classico. All'inizio di ogni sessione ciascun topo, a turno, è stato posizionato in uno dei due angoli opposti alla gabbietta dell'intruso, con il muso rivolto verso la parete dell'arena. Dopo la prima sessione, l'animale sperimentale è stato rimosso dall'arena e posto nella sua gabbia di stabulazione per il

tempo necessario ad inserire il topo intruso nella gabbietta metallica. Le due sessioni consecutive hanno avuto una durata di 5 minuti ciascuna.

I movimenti e i comportamenti degli animali sperimentali sono stati registrati con una videocamera, posta su un cavalletto a 2 metri di altezza dall'apparato. I video sono stati analizzati mediante il software "Ethovision" (Noldus, Olanda), che ha permesso di calcolare il tempo trascorso nelle diverse zone dell'arena e l'attività locomotoria totale.

Una maggiore quantità di tempo trascorso in prossimità della zona sociale è indice di una spiccata socialità, mentre l'attività locomotoria permette di valutare i livelli di ansia e irrequietezza.

#### **4.1.6 Test del Resident/ Intruder**

Il test del Resident Intruder è molto spesso utilizzato come paradigma sperimentale della sconfitta sociale per l'induzione di stress cronico. Tale test di per sé permette di valutare comportamenti aggressivi, sociali e di difesa. Da un punto di vista biologico l'istinto aggressivo ha la funzione di garantire la sopravvivenza dell'individuo e della specie, ed è considerato una forma di comunicazione sociale volta al controllo dell'ambiente. Nei topi, l'aggressione può essere aperta, tipica della madre che difende il nido da un intruso, dove l'obiettivo è eliminare l'avversario, per cui i morsi saranno diretti alle zone vulnerabili (muso, ventre e testicoli); oppure può essere ritualizzata, tipica di due maschi che si attaccano per un territorio, per cui i morsi saranno diretti a zone non vulnerabili, quali fianchi, dorso, coda e zampe.

Il test permette di valutare l'espressione spontanea e naturale dell'aggressività offensiva e il comportamento difensivo nei roditori: all'interno di una gabbia in cui è presente un animale residente (R) viene posto un intruso (I). In una prima fase, gli animali si attivano e cominciano ad esplorare la gabbia in cui avviene il test e si possono osservare i seguenti comportamenti:

- ❖ Rearing: esplorazione verticale dell'ambiente; l'animale si solleva sulle due zampe, appoggiandosi o meno alle pareti della gabbia con le zampe anteriori;
- ❖ Walking: l'animale cammina;
- ❖ Sniffing: l'animale annusa l'ambiente stando fermo sulle quattro zampe;
- ❖ Immobility: l'animale rimane fermo;

- ❖ Self- grooming: l'animale si toeletta.

In una seconda fase, gli animali si avvicinano e cominciano a mostrare interesse per l'avversario, i comportamenti tipici sono:

- ❖ Investigazione sociale: si annusano reciprocamente, generalmente in zona ano-genitale;
- ❖ Following: un animale segue l'altro mantenendo il contatto fisico;
- ❖ Allogrooming: uno toeletta l'altro in maniera più o meno frenetica;
- ❖ Allogrooming aggressivo: allogrooming molto frenetico, che può sfociare in un attacco.

Da questo punto in poi, i comportamenti diventano sempre più frenetici e agonistici (figura 13):

- ❖ Scavo (digging): l'animale scava schiacciando l'addome sul pavimento della gabbia, forse per marcare il territorio;
- ❖ Tail-rattling: minaccia effettuata sbattendo velocemente la coda sulla segatura;
- ❖ Attacco;
- ❖ Monta;
- ❖ Circling: il topo che attacca corre in modo circolare attorno all'altro topo;
- ❖ Chasing: l'animale insegue l'altro tenendo con la bocca il pelo della schiena;
- ❖ Upright: l'animale sconfitto si siede sulle zampe posteriori, alzando quelle anteriori, mostrando all'attaccante tutte le zone vulnerabili, in segno di resa.



*Figura 10 Attacco durante test del Residenti/ Intruder*

Il test è stato condotto su tutti gli animali sperimentali maschi, a PND 106. I topi maschi sperimentali KO e WT sono stati utilizzati come residenti, mentre gli intrusi utilizzati erano topi maschi del ceppo C57BL/6J. All'interno della gabbia di ciascun residente, è stato introdotto l'intruso per 10 minuti. L'interazione tra i due animali è stata sia osservata sia dal vivo, in modo da poter valutare la latenza del primo attacco e i morsi differenziati in base alle zone vulnerabili e non, che registrata mediante una videocamera, per consentire successivamente l'analisi dei comportamenti esplorativi e sociali dei due soggetti.

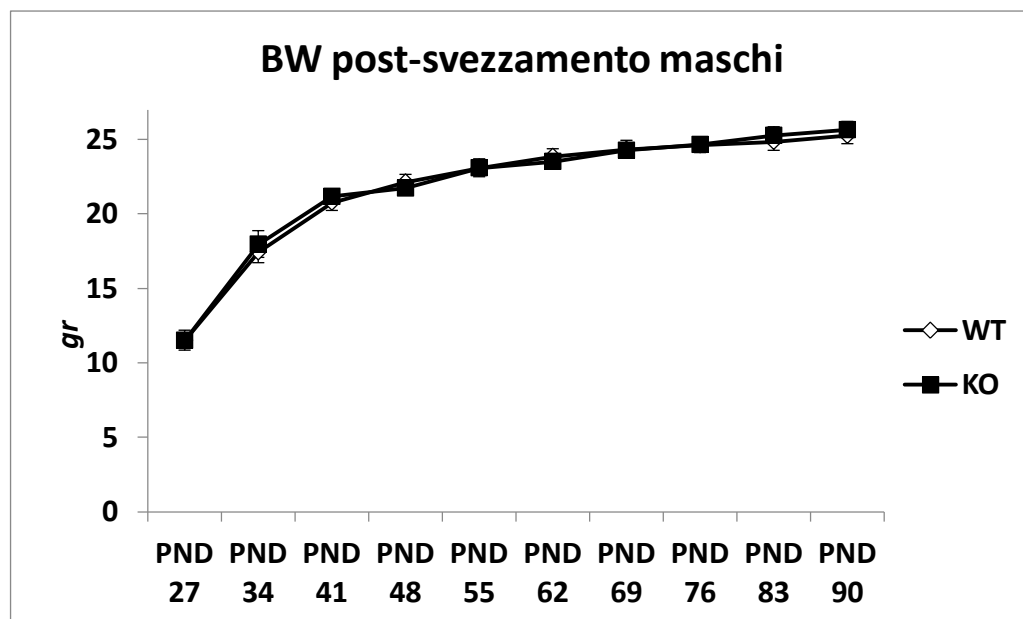
I video sono stati analizzati mediante il software "The Observer" (Noldus, Olanda), che ha permesso di valutare la durata e la frequenza di tutti i diversi comportamenti sopracitati. Alti livelli di aggressività sono associati a bassa latenza del primo attacco ed elevato numero di attacchi. Inoltre è stata valutata la durata totale dei comportamenti aggressivi, ovvero monta, attacco, circling, chasing e rattling.

Tutti i test comportamentali sono stati condotti nella fascia oraria tra le 16 e le 19. Gli animali sono stati trasportati due ore prima dell'inizio del test nella stanza sperimentale, per consentire loro di tranquillizzarsi dopo lo stress del trasporto e abituarsi al nuovo ambiente e alla diversa illuminazione. Tra una sessione e l'altra di ciascun test, gli apparati sono stati puliti accuratamente con acqua, etanolo denaturato al 50%, e di nuovo acqua, per evitare che eventuali odori influenzassero il comportamento degli animali testati successivamente.

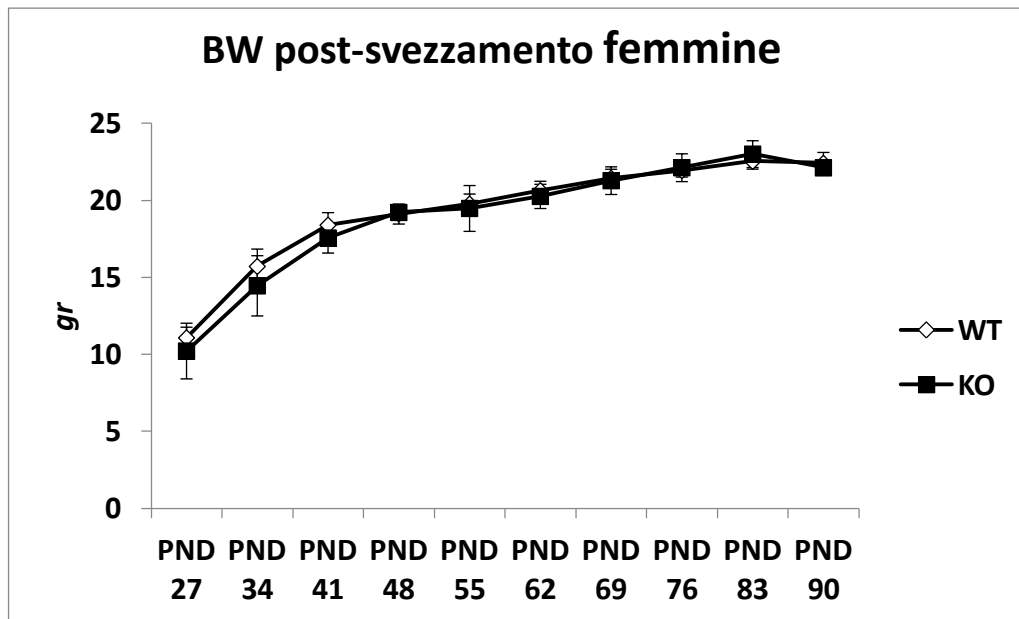
## **4.2 Risultati**

### **4.2.1 Analisi della crescita corporea post-svezzamento**

In seguito al monitoraggio della crescita corporea dallo svezzamento (PND 27) all'età adulta (PND 90) degli animali sperimentali KO e WT, sia maschi che femmine, è stata condotta un'analisi statistica (ANOVA per misure ripetute a tre vie: sesso, genotipo e giorni), che ha mostrato un effetto significativo del sesso ( $F_{(1,22)} = 16,37$ ,  $p < 0.001$ ), per cui, indipendentemente dal genotipo, si è osservato un maggiore peso corporeo dei topi maschi rispetto alle femmine. Per questo motivo, sono state svolte analisi statistiche separate per maschi e femmine (ANOVA a misure ripetute a due vie: genotipo e giorni). Tali analisi separate non hanno evidenziato differenze significative tra topi WT e KO dovute al genotipo, né nei maschi né nelle femmine (Grafico 14).



(a)



(b)

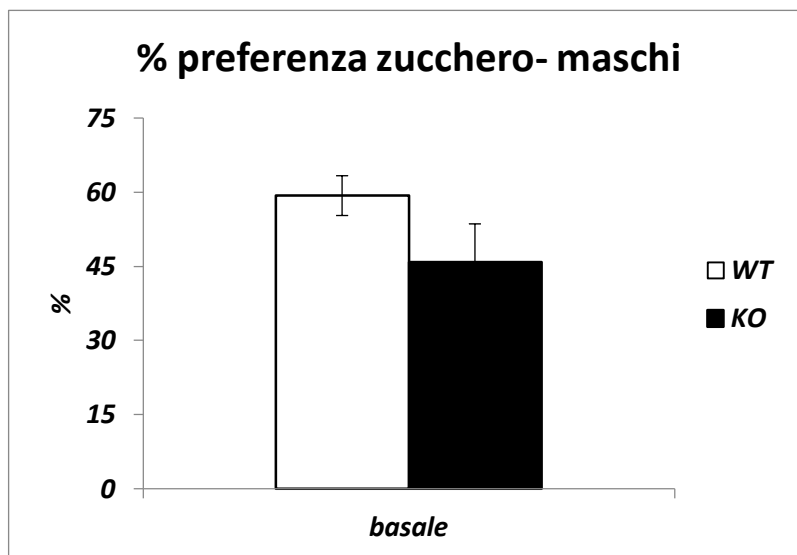
Grafico 11 (a) Curva di crescita corporea di maschi WT e KO da PND 27 a PND 90;

(b) Curva di crescita corporea di femmine WT e KO da PND 27 a PND 90.

I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### 4.2.2 Valutazione del comportamento anedonico nei maschi

L'analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) effettuata sulla percentuale della preferenza alla soluzione zuccherina rispetto alla soluzione totale non ha mostrato alcuna differenza significativa tra animali KO e WT in condizioni basali (Grafico 15).



*Grafico 12 Percentuale di preferenza della soluzione zuccherina in maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.*

### 4.2.3 Livelli di impulsività e neofobia misurati mediante il test del marble

Separatamente per maschi e femmine, ho condotto una ANOVA per misure ripetute a due vie (genotipo e intervalli di tempo) su distanza percorsa (attività locomotoria), tempo passato in immobilità e velocità media, mentre ad una sola via (genotipo) per distanza percorsa totale (attività locomotoria totale), tempo totale passato in immobilità e numero di biglie lasciate scoperte.

I maschi WT hanno mantenuto livelli significativamente alti di attività locomotoria nei primi 25 minuti di test per poi diminuire drasticamente nell'ultimo intervallo, mentre i KO hanno mostrato un andamento più irregolare con un incremento nel secondo intervallo e il decremento nell'ultimo intervallo già mostrato dai WT (tendenza alla significatività dell'effetto di interazione tra genotipo e intervalli di tempo sull'attività locomotoria:  $F_{(5,80)} = 2,18$ ;  $p < 0.10$ , grafico 16). Generalmente, indipendentemente dal genotipo, i topi maschi hanno mostrato un

calo significativo della attività locomotoria (in termini di distanza percorsa nella gabbia) e della velocità media negli ultimi cinque minuti di test (rispettivamente, intervalli di tempo:  $F_{(5;80)}=8,19, p<0.001$ ;  $F_{(5;80)}=7,09, p<0.001$ ), ad indicare probabilmente una abitudine a questo nuovo ambiente (grafici 16 e 17).

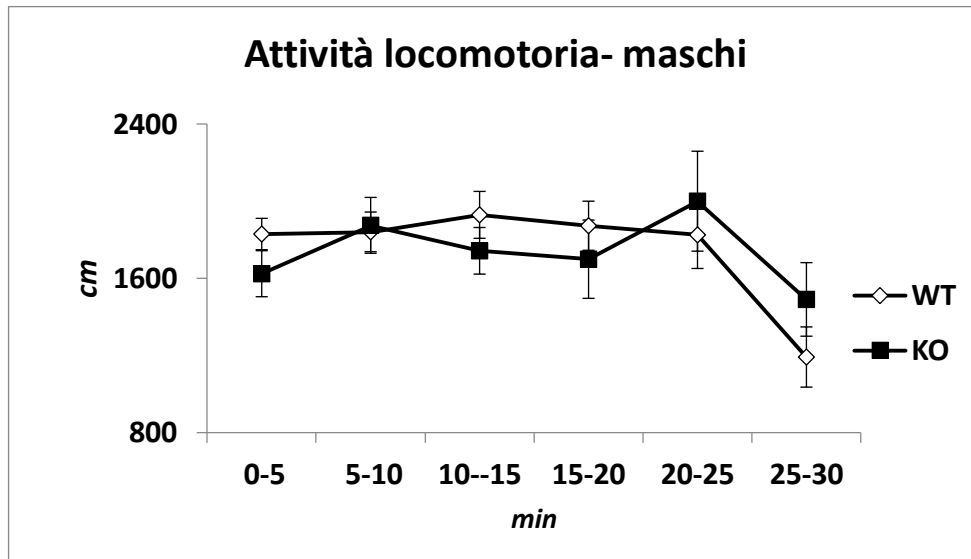


Grafico 13 Attività locomotoria negli intervalli durante il Marble test di maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

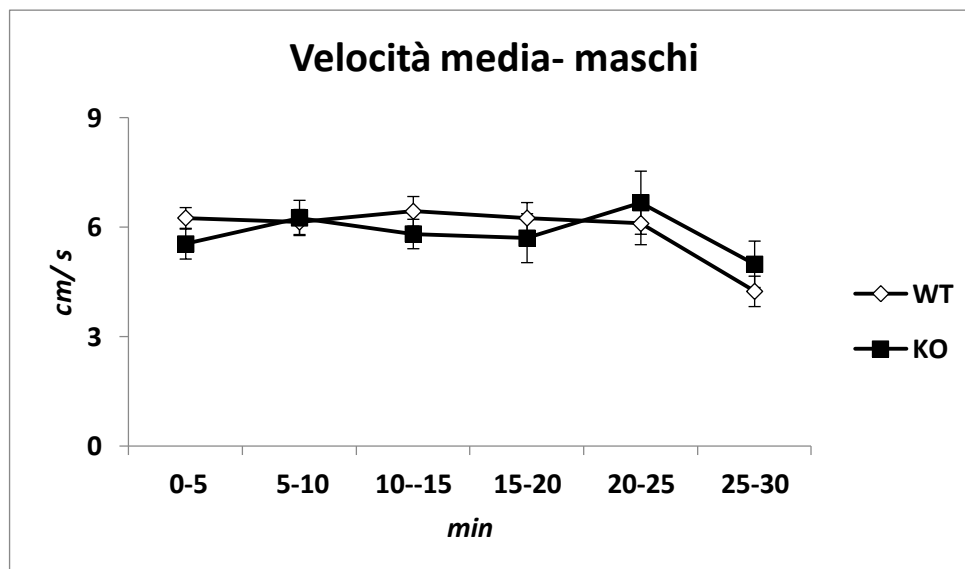
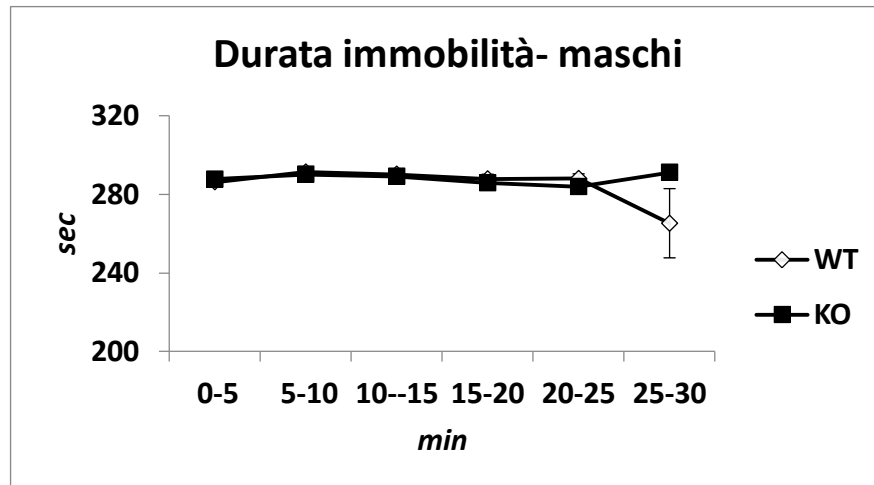


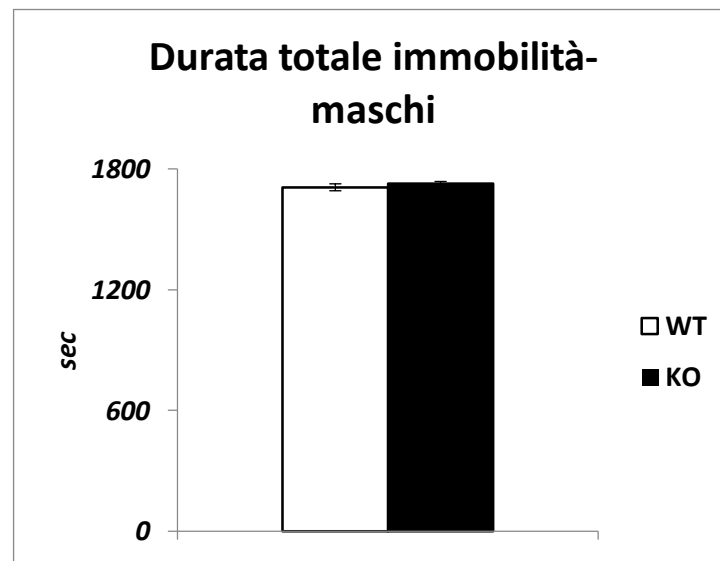
Grafico 14 Velocità media negli intervalli durante il Marble test di maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.



Il tempo passato in immobilità nei vari intervalli di tempo, come anche il tempo totale passato in immobilità, la distanza totale percorsa (attività locomotoria totale) ed il numero di biglie lasciate scoperte non sono stati influenzati significativamente dal genotipo (grafici 18, 19, 20).



(a)



(b)

Grafico 15 Durata immobilità durante il Marble Test di topi maschi WT e KO: a) negli intervalli; b) totale. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

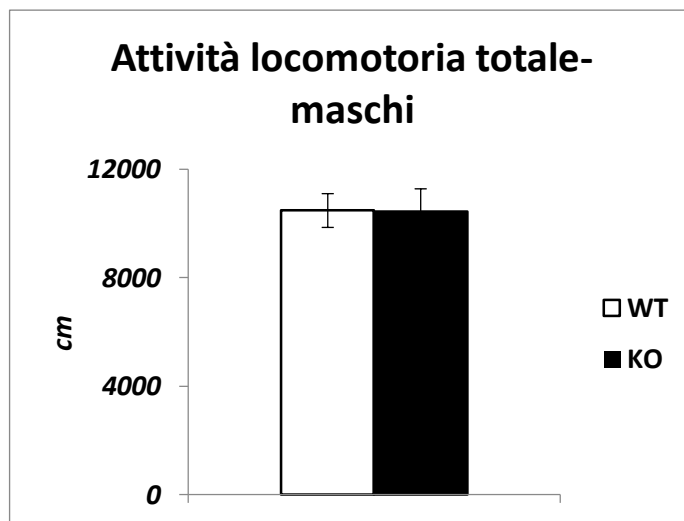


Grafico 16 Attività locomotoria totale durante il Marble Test di topi maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

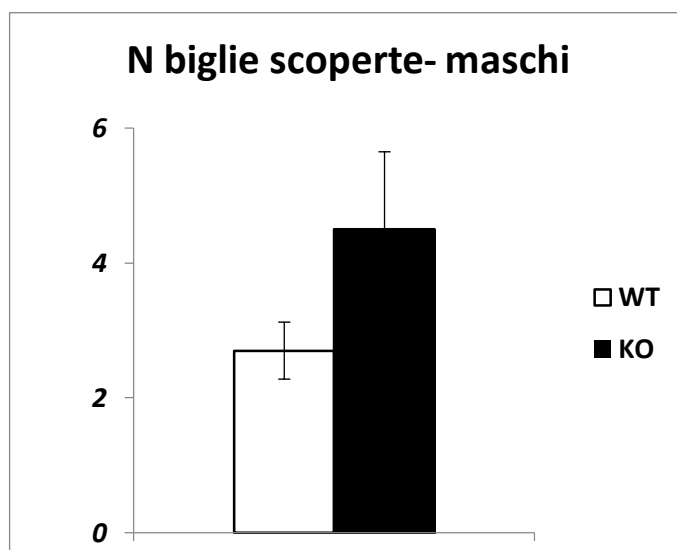


Grafico 17 Numero di biglie scoperte alla fine dei 30 min di Marble Test di topi maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Indipendentemente dal genotipo, le femmine hanno mostrato una costante e significativa riduzione dell'attività locomotoria e della velocità media durante i trenta minuti di test (rispettivamente, intervalli di tempo:  $F_{(5;30)} = 13,16$   $p < 0.001$ , grafico XX;  $F_{(5;30)} = 13,95$   $p < 0.001$ , grafici 21 e 22).

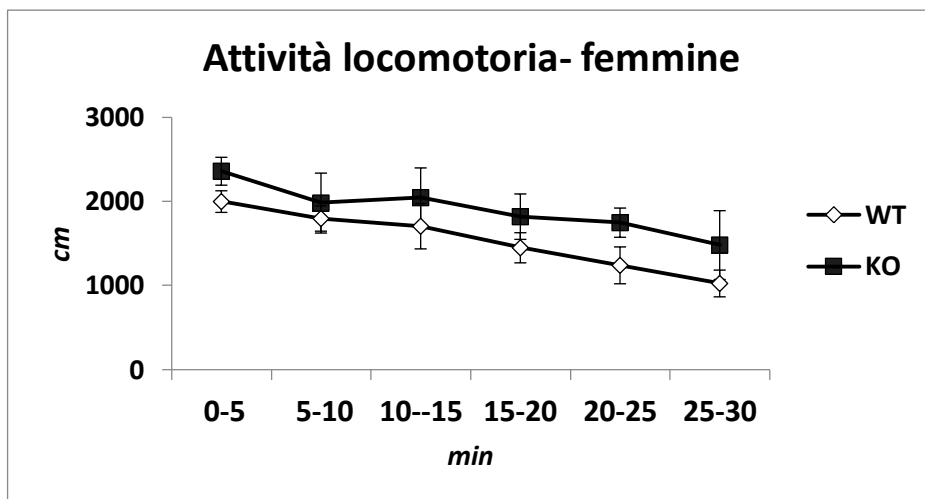


Grafico 18 Attività locomotoria negli intervalli di tempo durante il Marble test di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

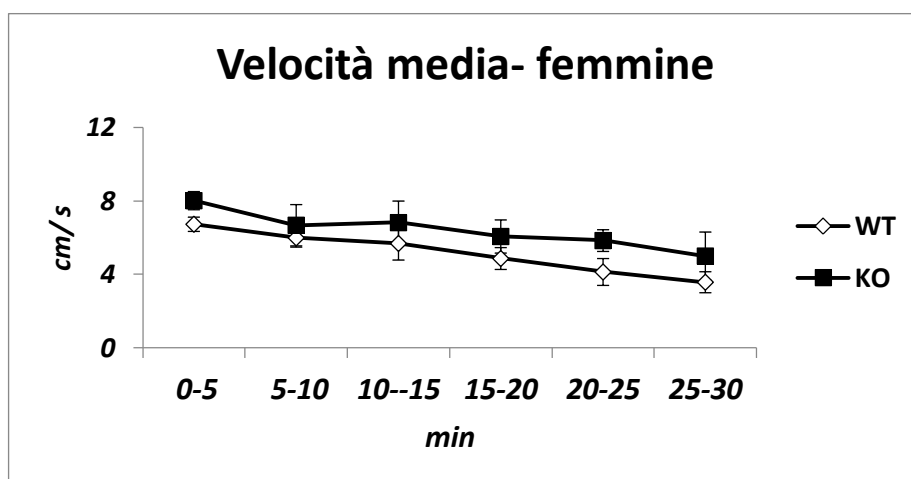
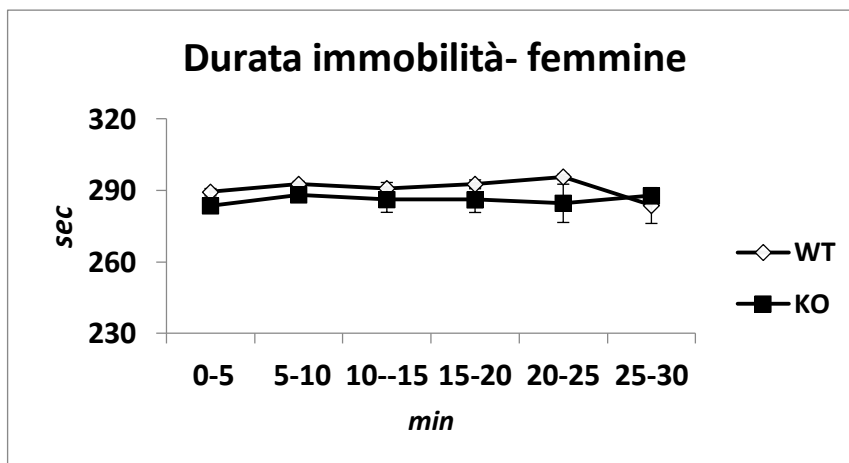
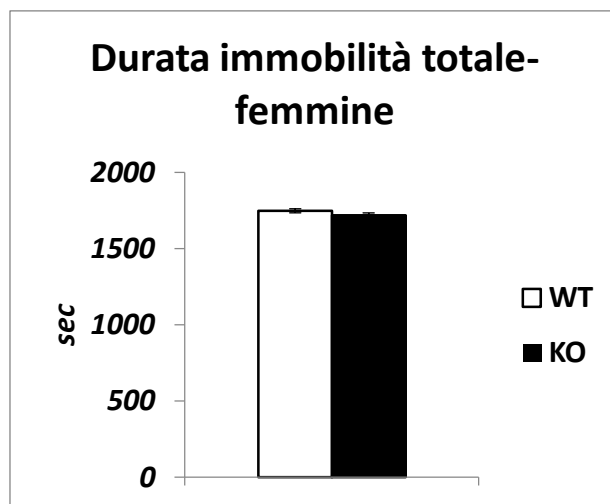


Grafico 19 Velocità media negli intervalli di tempo durante il Marble test di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Il tempo passato in immobilità nei vari intervalli di tempo, così come il tempo totale passato in immobilità, la distanza totale percorsa (attività locomotoria totale) ed il numero di biglie lasciate scoperte non sono stati influenzati significativamente dal genotipo (grafici 23, 24, 25).



(a)



(b)

Grafico 20 Durata immobilità durante il Marble Test di femminei WT e KO: a) negli intervalli; b) totale. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

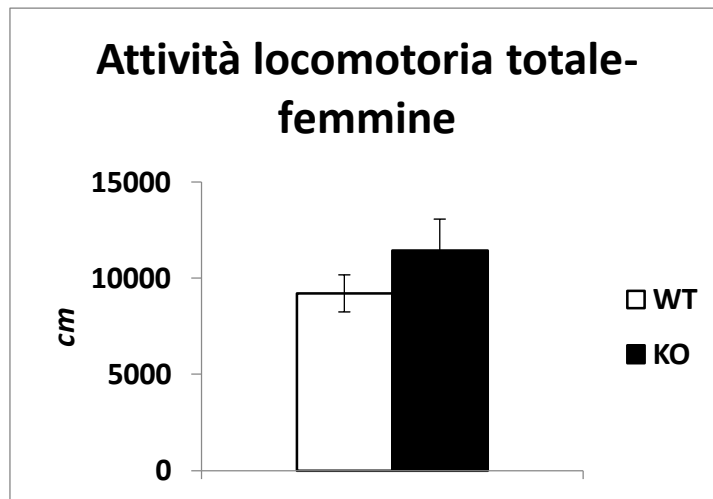


Grafico 21 Attività locomotoria totale durante il Marble Test di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

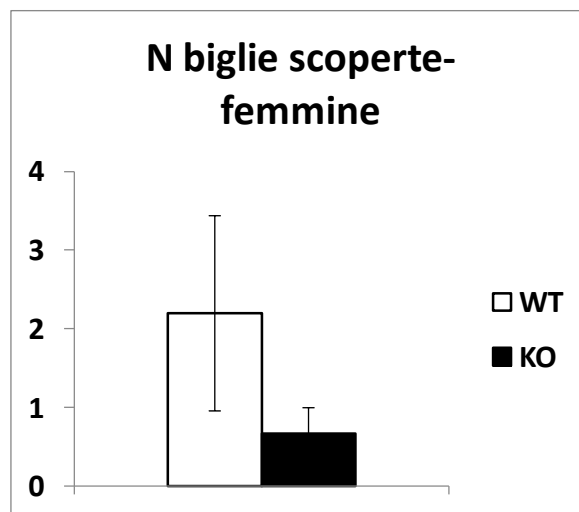


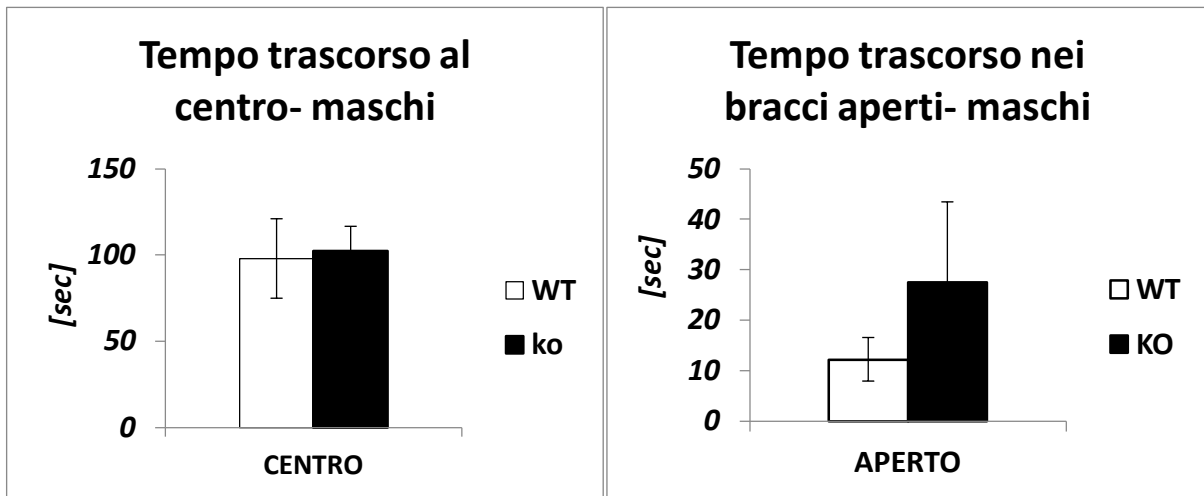
Grafico 22 Numero di biglie scoperte alla fine dei 30 min di Marble Test di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard

#### **4.2.4 Analisi del comportamento ansioso: test dell'Elevated Plus Maze (EPM)**

Per la valutazione del comportamento ansioso relativo ai dati ottenuti con il test dell'EPM, ho condotto analisi statistiche separate per topi maschi e femmine.

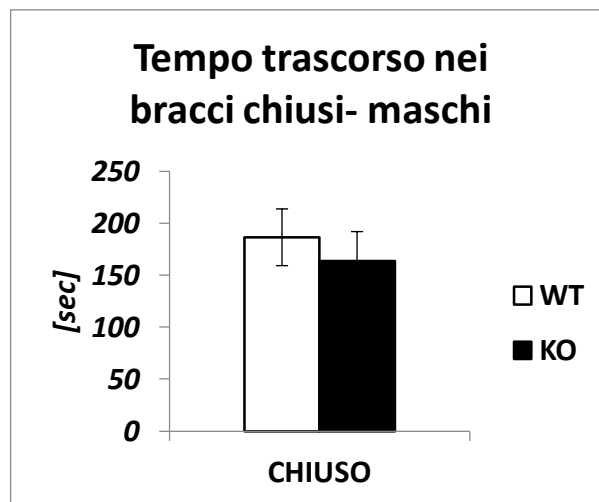
Nei topi maschi l'analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) condotta sul tempo trascorso dagli animali sperimentali nelle tre diverse zone dell'apparato (bracci chiusi, centro e

bracci aperti) e sulle relative frequenze d'ingresso ha evidenziato che questi valori non sono stati influenzati significativamente dal genotipo (grafici 26 e 27).



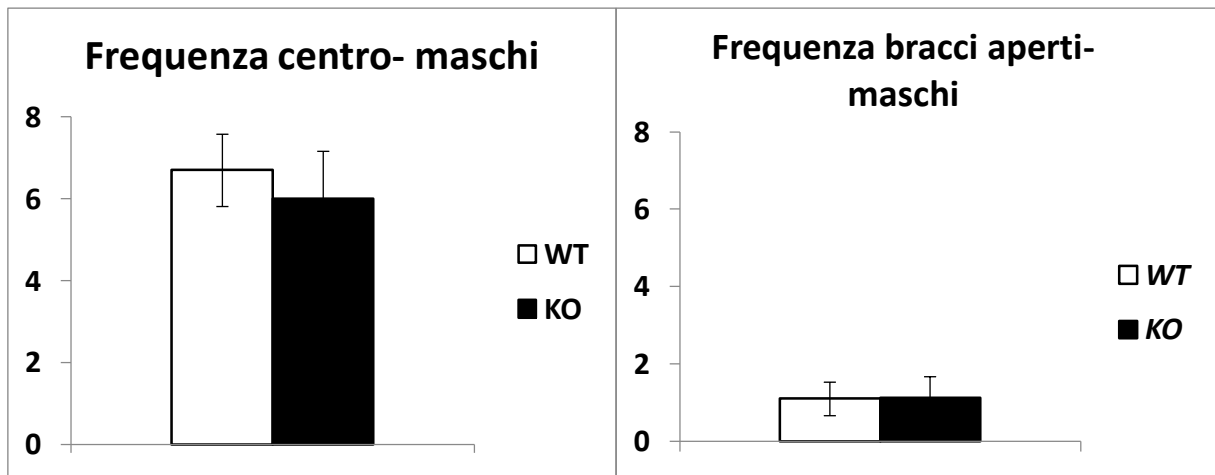
(a)

(b)



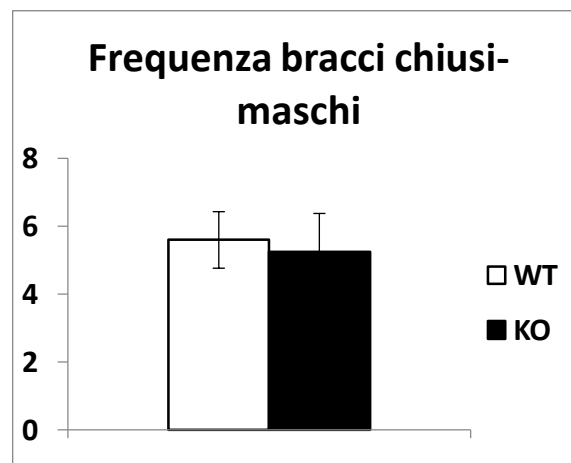
(c)

Grafico 23 Tempo che i topi maschi WT e KO hanno trascorso durante il test dell'EPM: a) nel centro, b) nei bracci aperti, c) nei bracci chiusi. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.



(a)

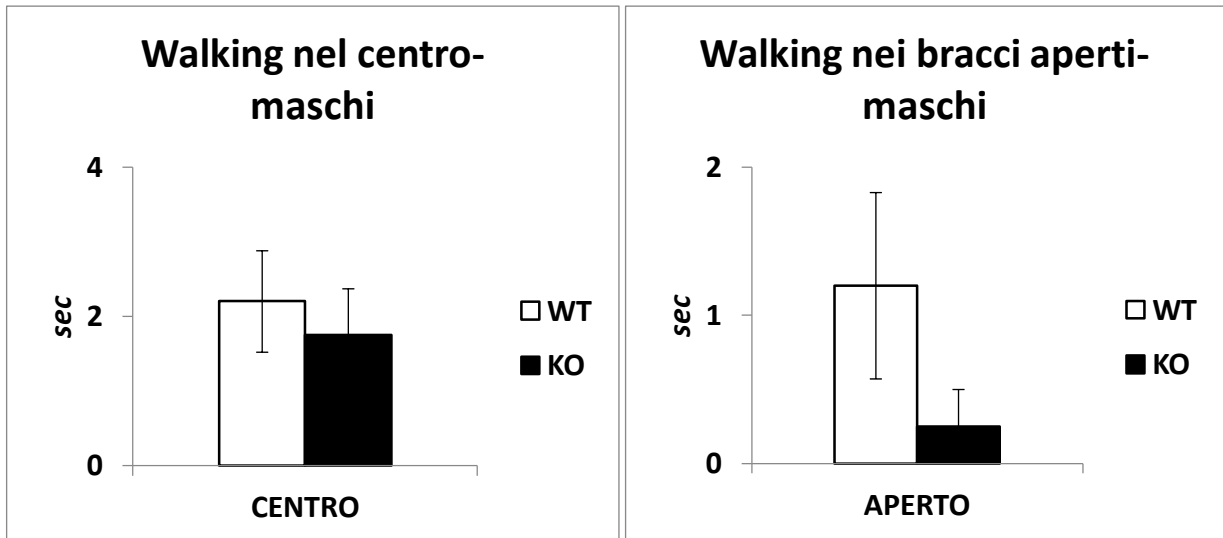
(b)



(c)

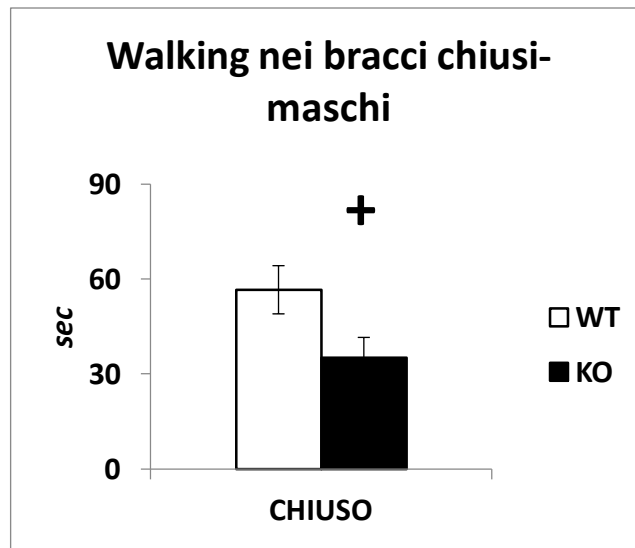
Grafico 24 Frequenza d'ingresso di topi maschi WT e KO durante il test dell'EPM: a) nel centro, b) nei bracci aperti, c) nei bracci chiusi. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Successivamente è stata condotta un'ANOVA ad una via (genotipo) sul tempo che i topi maschi KO e WT hanno trascorso camminando. L'analisi non ha mostrato differenze dovute al genotipo relativamente al walking nel centro e nei bracci aperti (grafici 28a e 28b), mentre ha evidenziato un effetto tendente alla significatività nel ridurre il tempo trascorso in walking nei bracci chiusi e nell'intero apparato nei topi maschi KO rispetto ai topi maschi WT (rispettivamente, genotipo:  $F_{(1,16)} = 4,35$   $p < 0.10$ , grafico XX;  $F_{(1,16)} = 4,49$   $p < 0.10$ ; grafici 28c e 29).



(a)

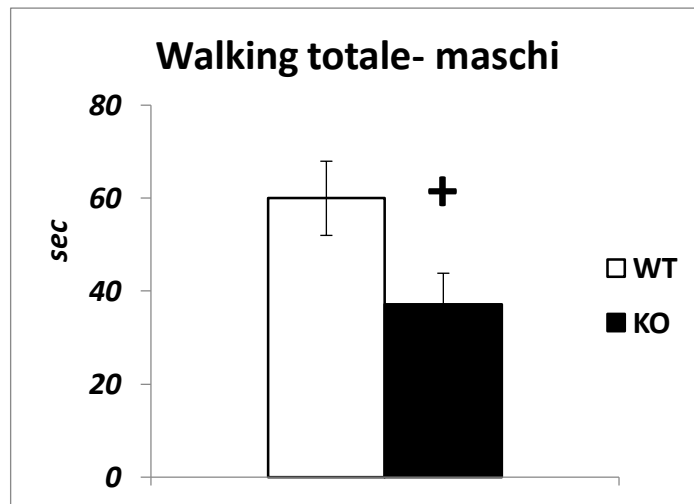
(b)



(c)

Grafico 25 Tempo che i topi maschi WT e KO hanno trascorso camminando a) nel centro, b) nei bracci aperti, c) nei bracci chiusi. (+ $p < 0.01$  vs WT nei bracci chiusi) I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.





*Grafico 26 Tempo totale passato dai topi maschi WT e KO in walking. (+  $p < 0.10$  vs WT) I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.*

Nelle femmine è stata condotta una analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) sul tempo che gli animali hanno trascorso nel centro, nei bracci chiusi e in quelli aperti dell'apparato e per le relative frequenze d'ingresso (grafici 30 e 31). Si evidenzia un effetto del genotipo tendente alla significatività solo nell'aumento della frequenza d'ingresso nel centro dell'apparato dei topi KO rispetto ai topi WT (genotipo:  $F_{(1;6)}=15,41$   $p<0.10$ ) (grafico 31a).

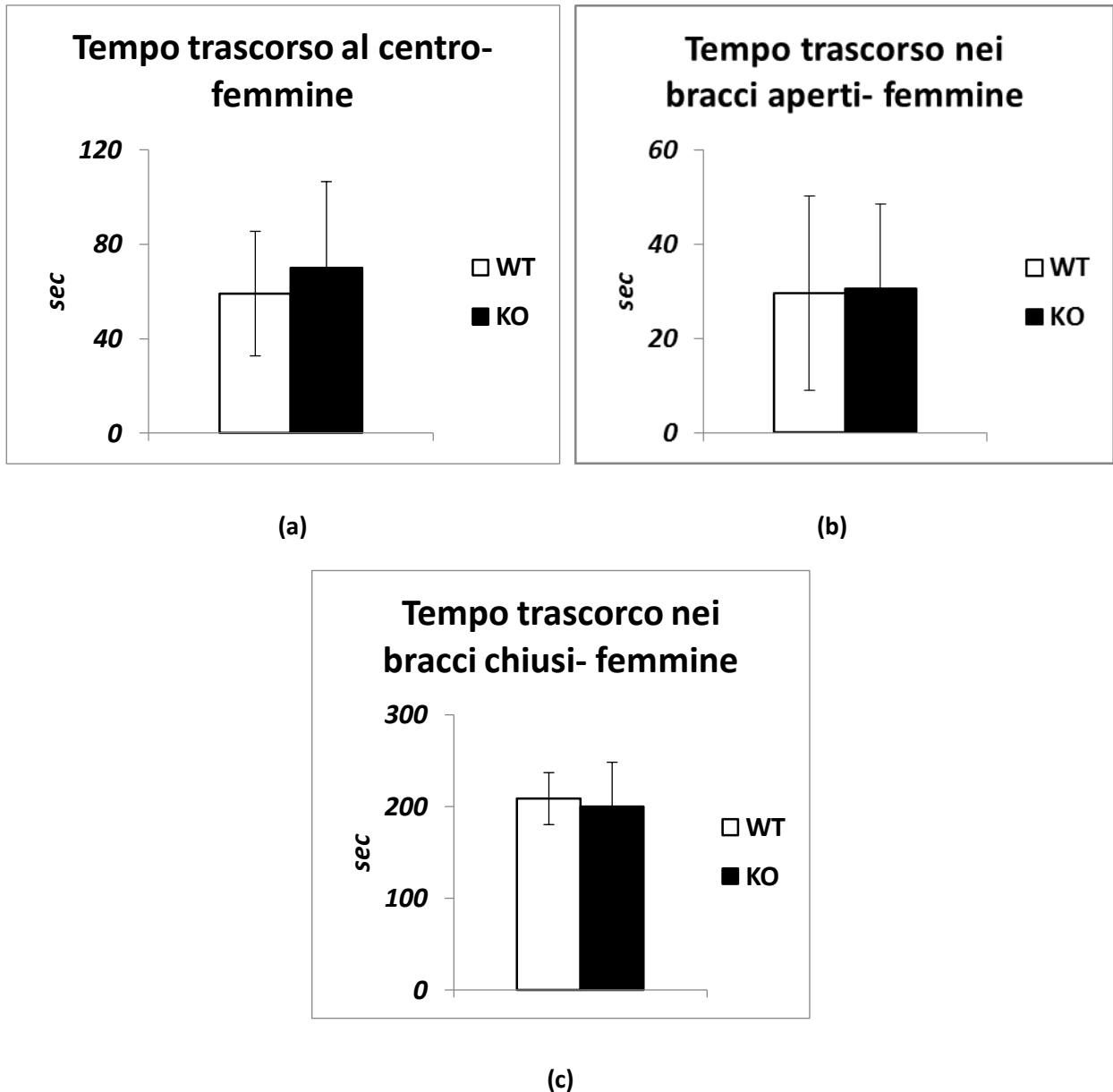
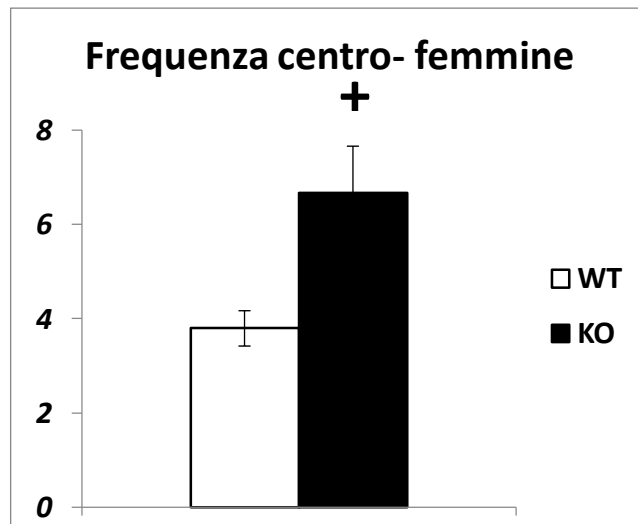
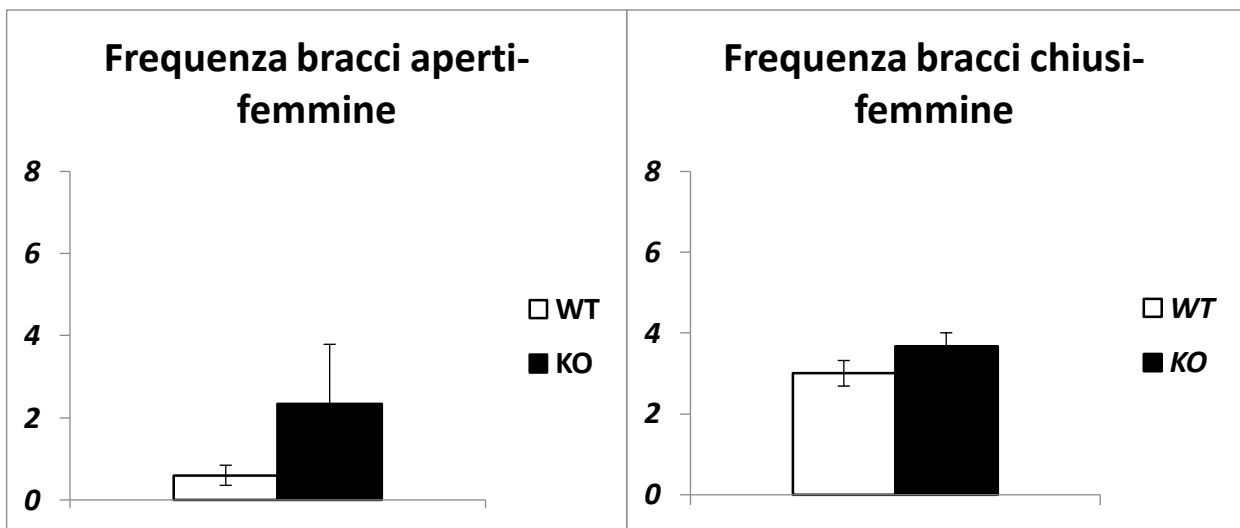


Grafico 27 Tempo trascorso dalle femmine WT e KO durante il test dell'EPM: a) nel centro, b) nei bracci aperti, c) nei bracci chiusi. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.



(a)



(b)

(c)

Grafico 28 Frequenza d'ingresso durante l'EPM di femmine WT e KO: a) nel centro, b) nei bracci aperti c) nei bracci chiusi. (+  $p < 0.10$  vs WT per frequenza d'ingresso nel centro). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Inoltre, una ANOVA a una via (genotipo) sulla durata del walking nelle diverse zone dell'apparato ha mostrato nelle femmine KO rispetto alle femmine WT un aumento tendente alla significatività di questo comportamento nel centro dell'arena (genotipo:  $F_{(1;6)} = 4,83$   $p < 0.10$ , grafico 32).

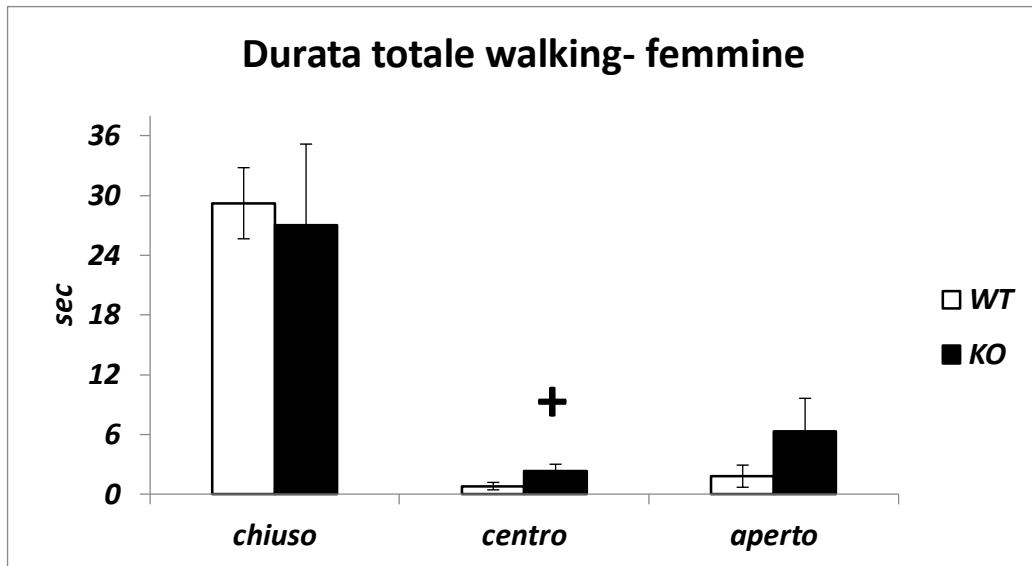
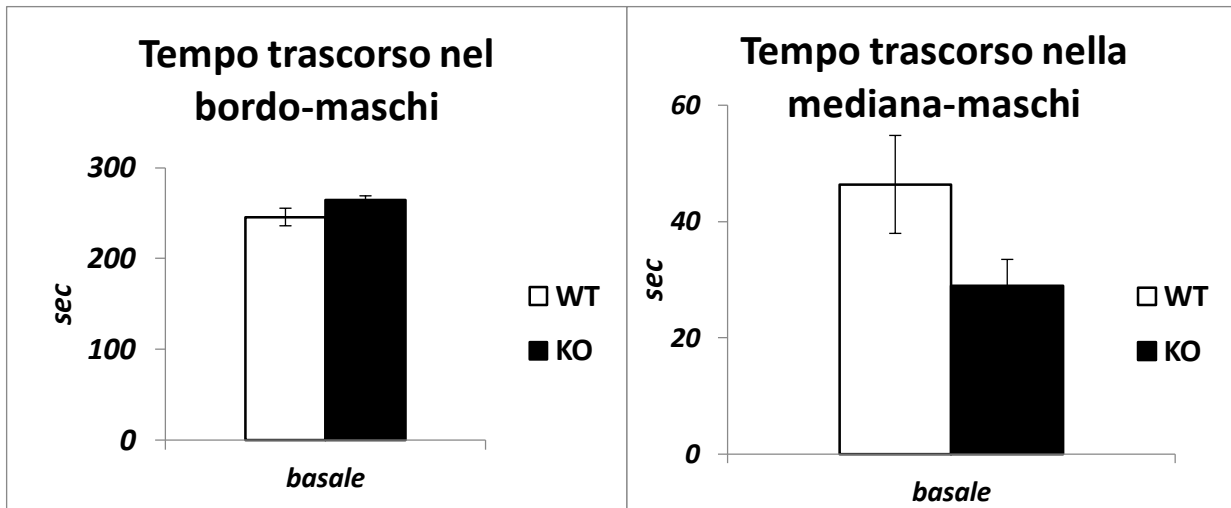


Grafico 29 Tempo totale trascorso dalle femmine WT e KO in walking, nelle diverse aree dell'apparato. (+  $p < 0.10$  vs WT per durata totale nel centro). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

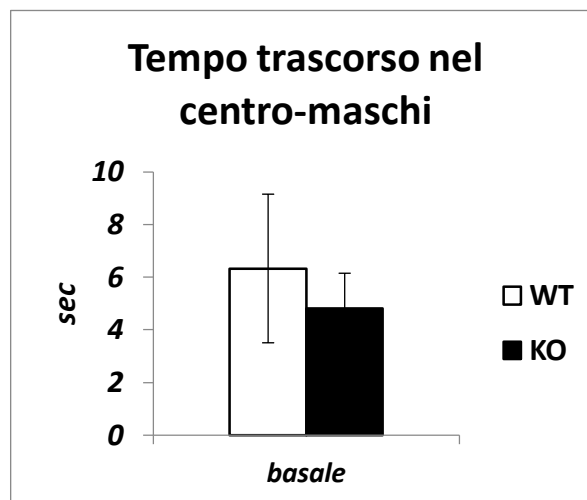
#### **4.2.5 Valutazione del comportamento simil-ansioso (test dell'Open Field).**

L'analisi statistica (ANOVA ad una via: genotipo) effettuata sui dati ottenuti dall'analisi del test dell'Open Field, svolto in condizioni basali, non mostra differenze significative tra topi KO e WT, sia maschi che femmine. In particolare abbiamo valutato il tempo che il topo trascorre nelle diverse aree dell'arena, quali bordo, zona mediana e centro, e la distanza che percorre (attività locomotoria totale) durante il test (grafici 33, 34, 35, 36).



(a)

(b)



(c)

Grafico 30 Tempo trascorso dai topi maschi WT e KO durante il test dell'Open Field: a) nel bordo, b) nella zona mediana, c) nel centro. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

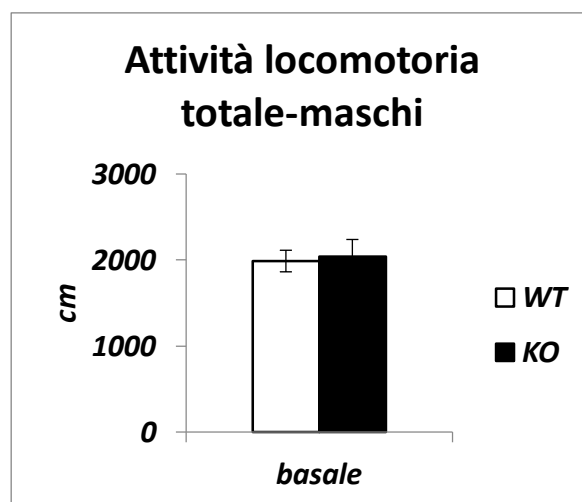
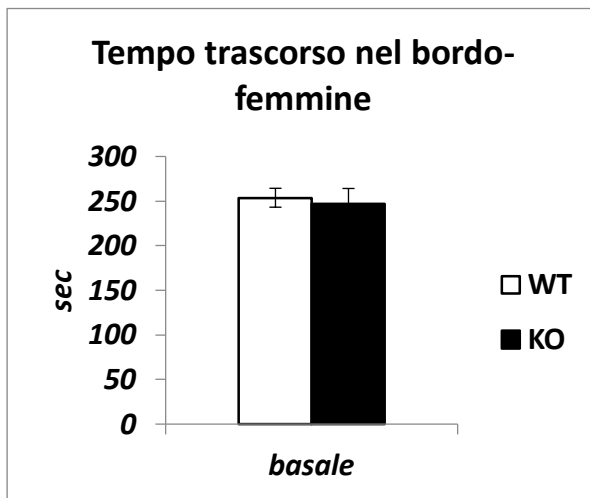
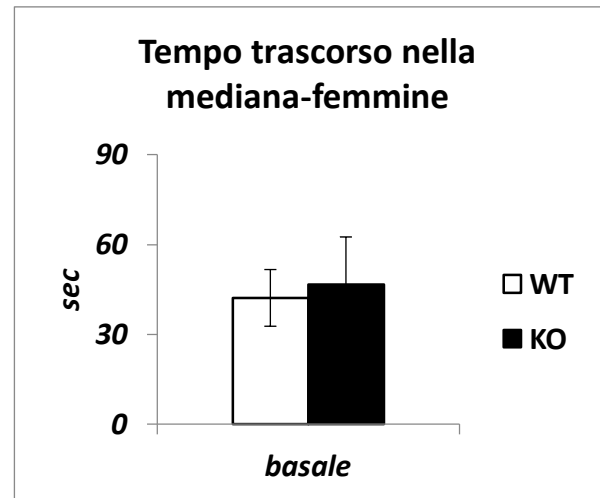


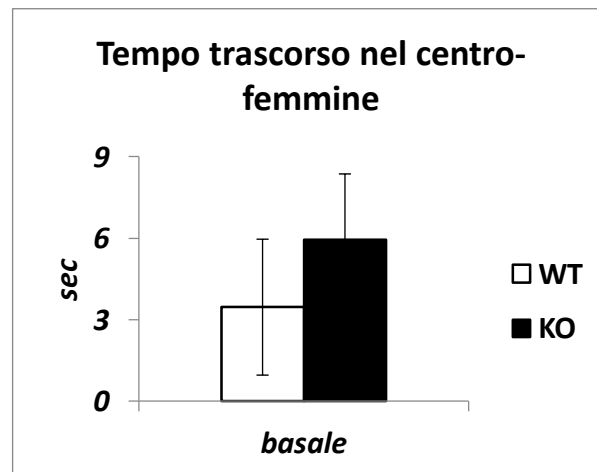
Grafico 31 Attività locomotoria totale di maschi WT e KO durante il test dell'Open Field. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.



(a)



(b)



(c)

Grafico 32 Tempo che le femmine WT e KO hanno trascorso durante il test dell'Open Field: a) nel bordo b) nella zona mediana, c) nel centro. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

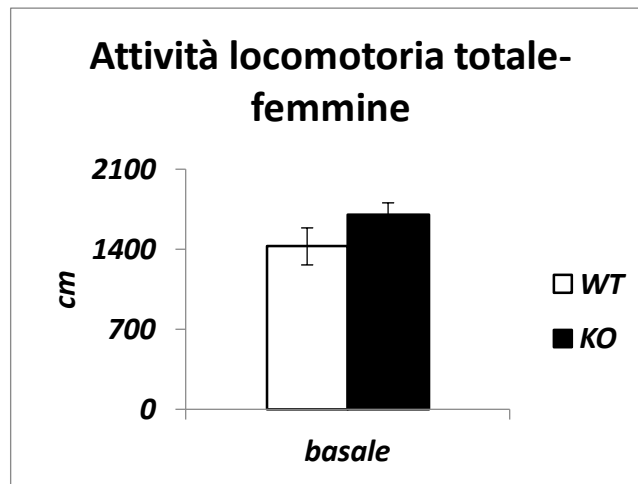


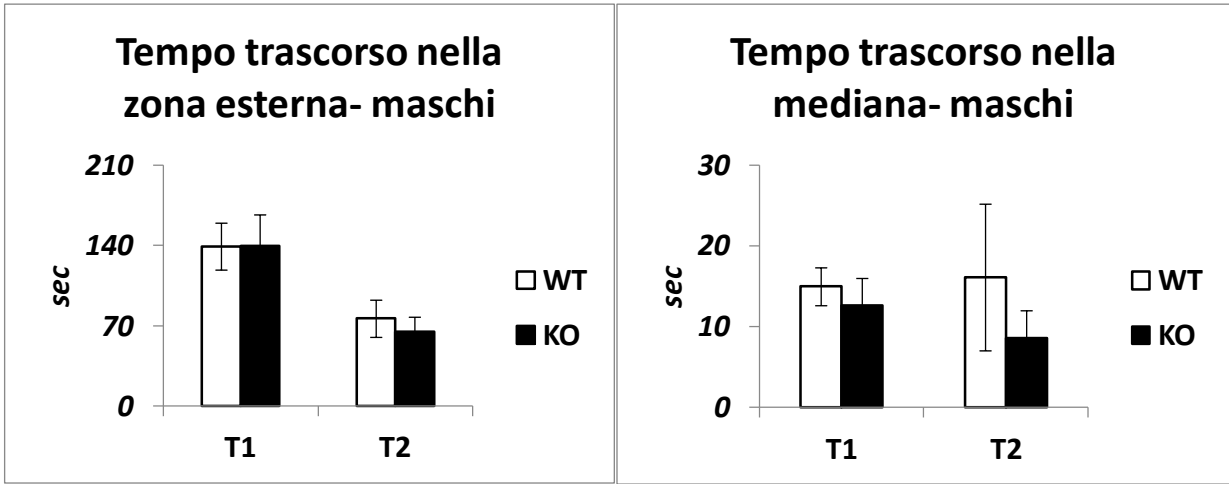
Grafico 33 Attività locomotoria totale di femmine WT e KO durante il test dell'Open Field. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

#### **4.2.6 Valutazione di evitamento/preferenza sociale: test del Social Open Field**

Separatamente per maschi e femmine, ho condotto una ANOVA per misure ripetute a due vie (genotipo e sessione) sul tempo trascorso dagli animali nella zona esterna dell'arena, nella zona mediana, nel centro, nella zona sociale dell'apparato, cioè l'anello intorno alla gabbietta (grafico 37) e, infine, sull'attività locomotoria totale (grafico 38).

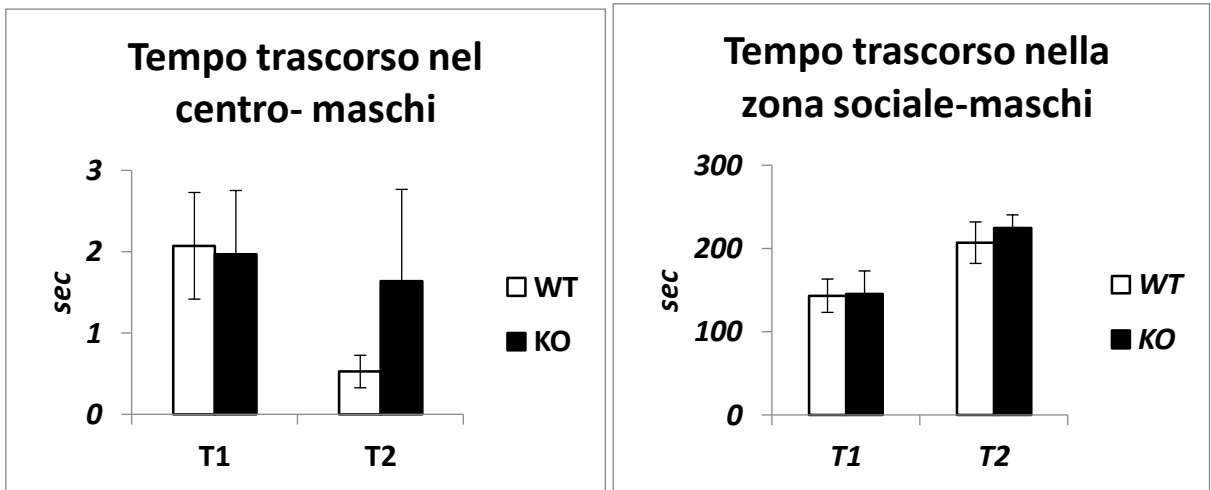
Indipendentemente dal genotipo, come atteso, i topi maschi hanno trascorso significativamente meno tempo nella zona esterna e ridotto l'attività locomotoria totale durante la sessione T2 rispetto alla sessione T1 (rispettivamente, sessione:  $F_{(1;16)}= 50,37$   $p<0.0001$ , grafico 37a;  $F_{(1;16)}=24,86$   $p<0.001$ , grafico 38 ), mentre hanno aumentato in modo significativo il tempo trascorso nella zona sociale, sempre durante la sessione T2 rispetto alla T1 (sessione:  $F_{(1;16)}=49,83$   $p<0.0001$ , grafico 37d). Il tempo trascorso nel centro e nella zona mediana non è risultato essere influenzato significativamente né dal genotipo né dalla sessione (grafici 37b e c).





(a)

(b)



(c)

(d)

Grafico 34 Tempo trascorso da topi maschi WT e KO durante il test del Social Open Field: a) nella zona esterna, b) nella zona mediana, c) nel centro, d) nella zona sociale. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

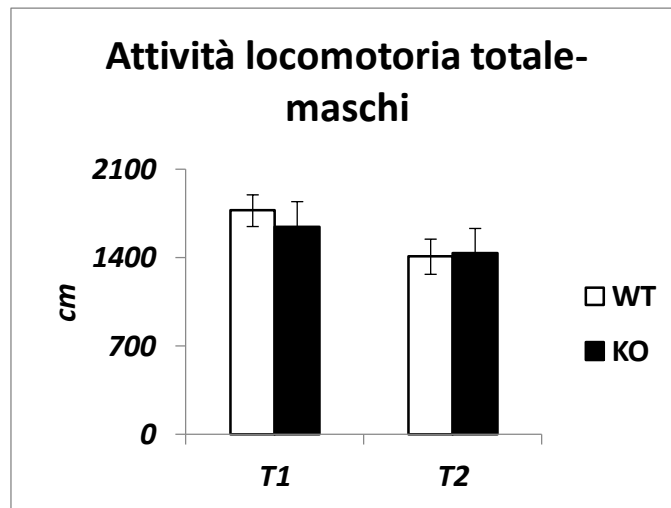


Grafico 35 Attività locomotoria totale di topi maschi WT e KO durante il test del Social Open Field. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Nelle femmine l'analisi statistica (ANOVA a misure ripetute a due vie: genotipo e sessione) sull'attività locomotoria totale ha mostrato che i topi KO riducono significativamente la distanza totale nella sessione T2 rispetto alla sessione T1 ( $p < 0.01$ ), mentre l'attività locomotoria dei topi WT è rimasta pressoché simile nelle due sessioni (interazione sessione genotipo:  $F_{(1,6)} = 12,58$   $p < 0.05$ , grafico 39), benché la statistica rilevi che indipendentemente dal genotipo tutte le femmine si siano abituate all'apparato mostrando una riduzione dell'attività locomotoria nella seconda sessione rispetto alla prima (sessione:  $F_{(1,6)} = 18,83$   $p < 0.05$ , grafico 39).

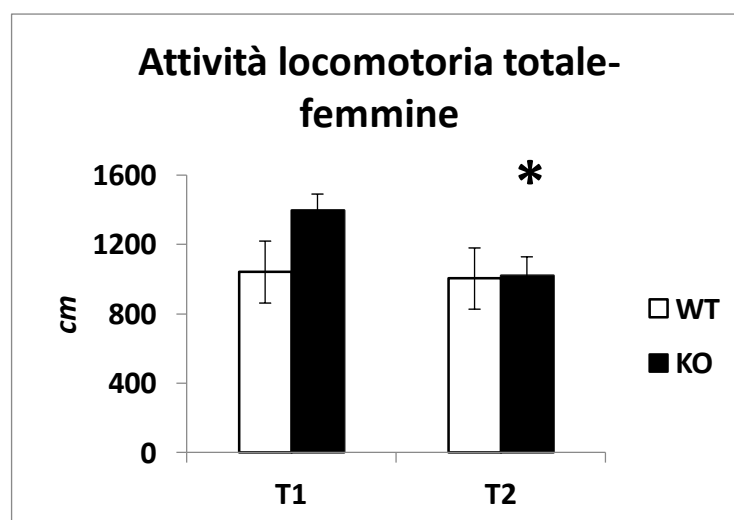


Grafico 36 Attività locomotoria totale durante il test di open field sociale di femmine WT e KO. (\* $p < 0.01$  vs KO durante la prima sessione). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Durante la seconda sessione, quando è stato introdotto il topo intruso nella retina, tutti i topi femmina hanno passato significativamente meno tempo nella zona esterna indipendentemente dal genotipo (sessione:  $F_{(1,6)}=8,92$   $p<0.05$ , grafico 40). Benché l'interazione tra sessione e genotipo non sia risultata significativa, le femmine KO hanno trascorso meno tempo nella zona esterna rispetto alle WT durante la prima sessione dell'open field sociale ( $p<0.10$ ).

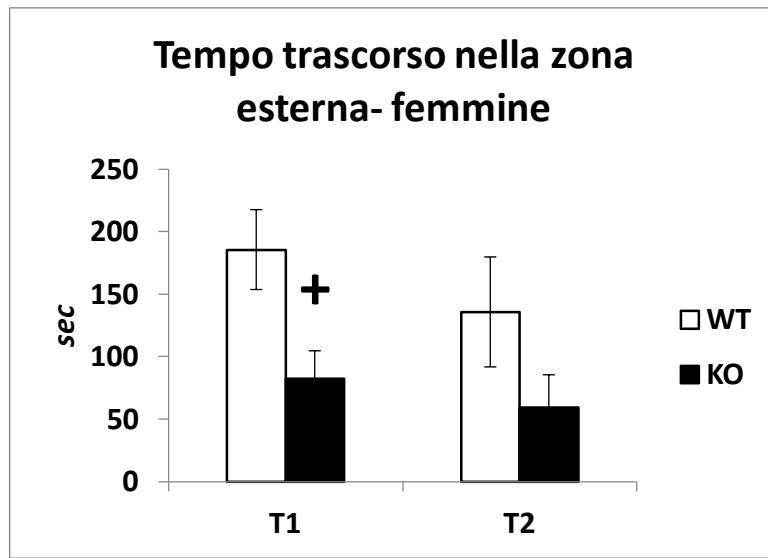


Grafico 37 Tempo trascorso nella zona esterna durante il test di open field sociale di femmine WT e KO. (+ $p<0.10$  vs WT durante la prima sessione). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

In modo simile, nella seconda sessione si riduce significativamente anche il tempo che le femmine hanno trascorso nella zona mediana (sessione:  $F_{(1,6)}=10,88$   $p<0.05$ , grafico 41). Inoltre l'analisi statistica ha evidenziato una tendenza alla significatività dell'effetto di interazione tra sessione e genotipo ( $F_{(1,6)}=4,48$   $p<0.10$ , grafico 41), per cui durante la prima sessione del test le femmine KO hanno passato più tempo nella zona mediana rispetto alle WT.

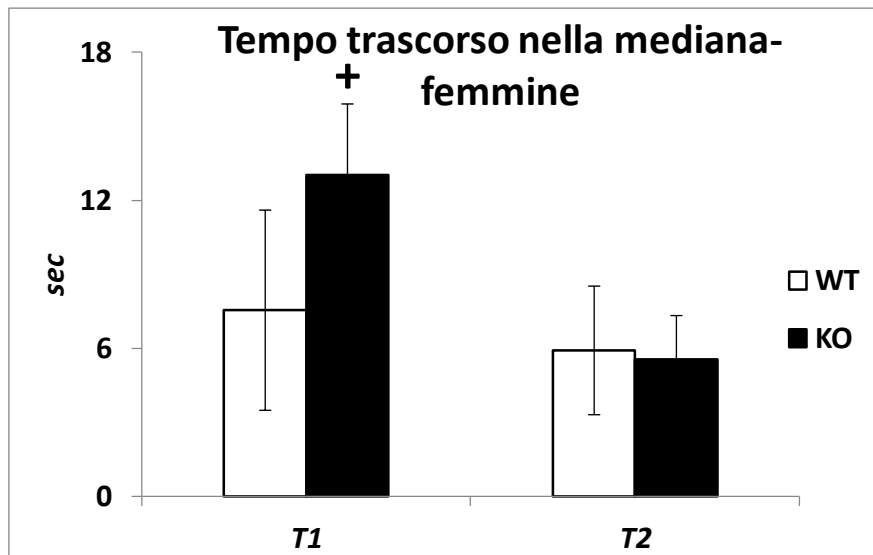


Grafico 38 Tempo trascorso nella zona mediana durante il test di open field sociale di femmine WT e KO. (+ $p < 0.10$  vs WT durante la prima sessione). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Il tempo che le femmine hanno trascorso nel centro non risulta essere significativamente influenzato né dal genotipo né dalla sessione, benché ci sia una tendenza nell'interazione tra sessione e genotipo ( $F_{(1,6)} = 4,02$   $p < 0.10$ , grafico 42), per cui le femmine KO trascorrono più tempo in questa zona durante la prima sessione del test rispetto a T2, mentre le femmine WT passano più tempo in quest'area durante la seconda sessione del social open field rispetto alla prima.

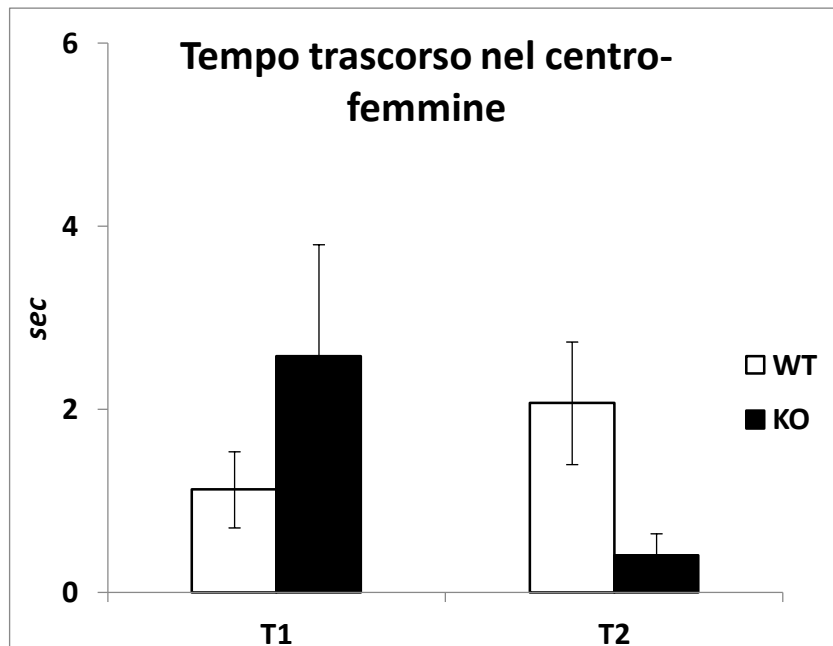


Grafico 39 Tempo trascorso nel centro durante il test di open field sociale di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Infine, l'analisi statistica ha mostrato un incremento significativo del tempo che le femmine trascorrono nella zona sociale durante la seconda sessione del test, indipendentemente dal genotipo (sessione:  $F_{(1,6)}=9,63$   $p<0.05$ , grafico 43.).

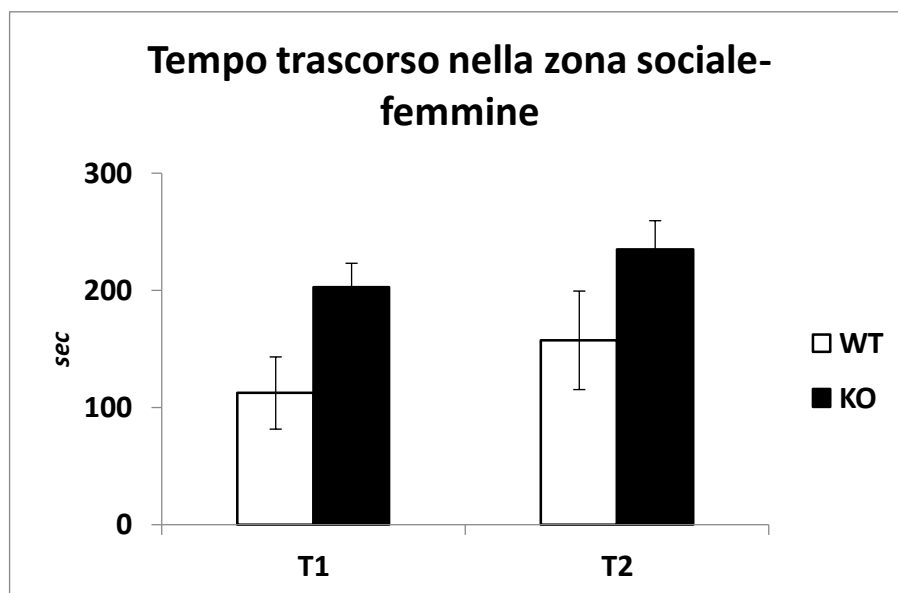


Grafico 40 Tempo trascorso nella zona sociale durante il test di open field sociale di femmine WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

#### 4.2.7 Analisi del comportamento sociale (RI) maschi

L'ANOVA a una via (genotipo) sulla latenza d'attacco del residente nei confronti dell'intruso (grafico 44a), sul numero totale di attacchi (grafico 44b) e sulla durata complessiva dei comportamenti aggressivi (grafico 44c) non ha evidenziato nessuna differenza significativa tra topi maschi KO e maschi WT: indipendentemente dal genotipo, le latenze di attacco sono molto elevate e gli animali sperimentali non sono molto aggressivi.

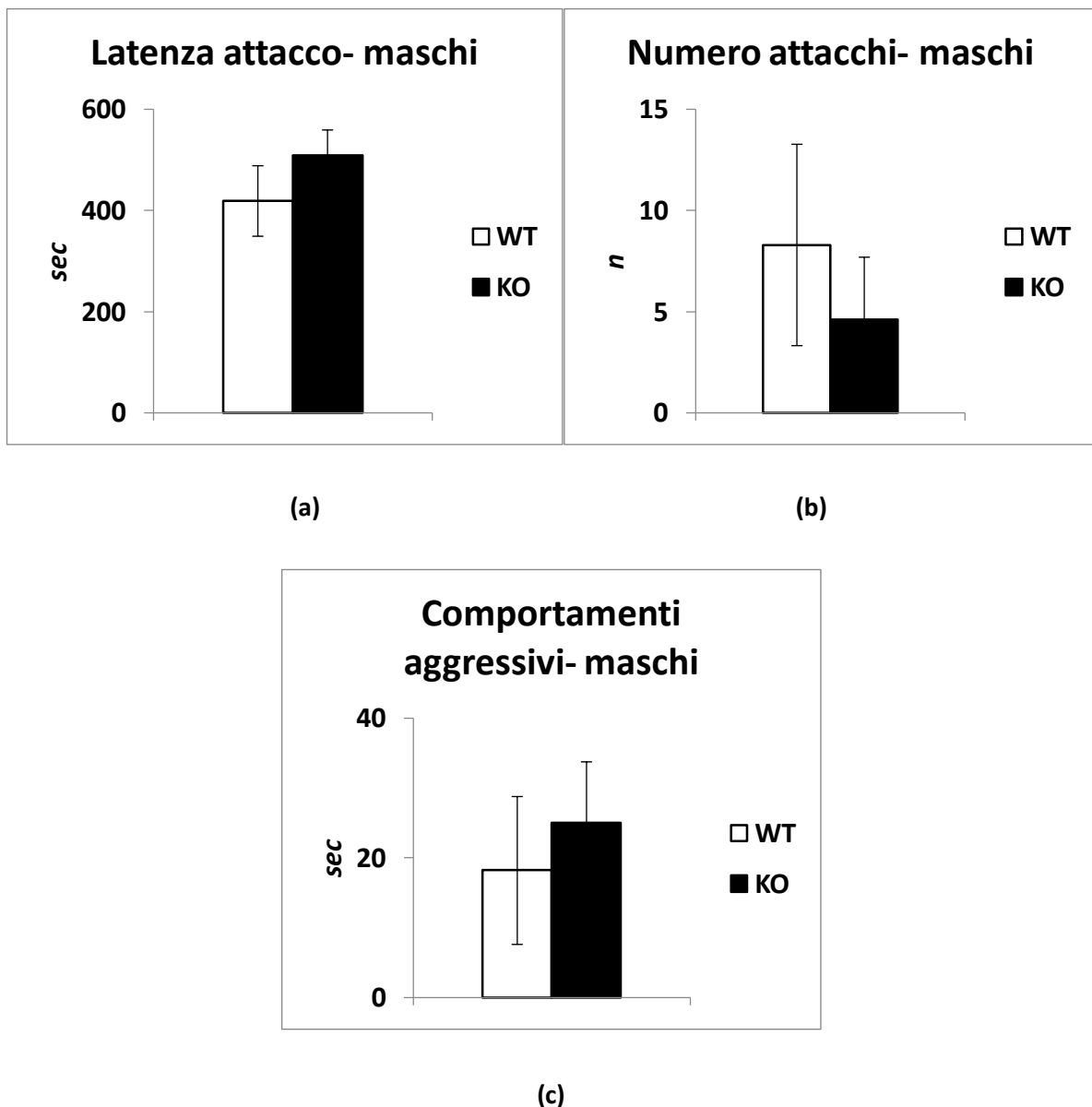


Figura 41 Test del resident/ intruder in topi maschi WT e KO: a) latenza del primo attacco, b) numero di attacchi, c) durata comportamenti aggressivi. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

Inoltre, ho condotto un'analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) sui diversi comportamenti osservati durante il test, che ha mostrato una tendenza dei topi maschi KO a trascorrere più tempo in comportamenti di monta e walking, rispetto ai maschi WT (rispettivamente, genotipo:  $F_{(1;16)}=3,91$   $p<0,10$ , grafico 45;  $F_{(1;16)}=3,52$   $p<0.10$ , grafico 46).

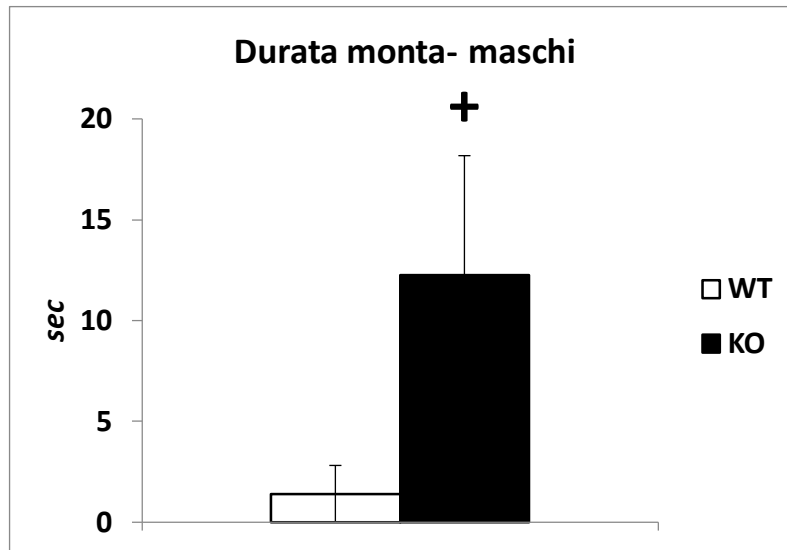


Grafico 42 Durata della monta nel test del resident/ intruder di topi maschi WT e KO. (+  $p<0.10$  vs WT). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

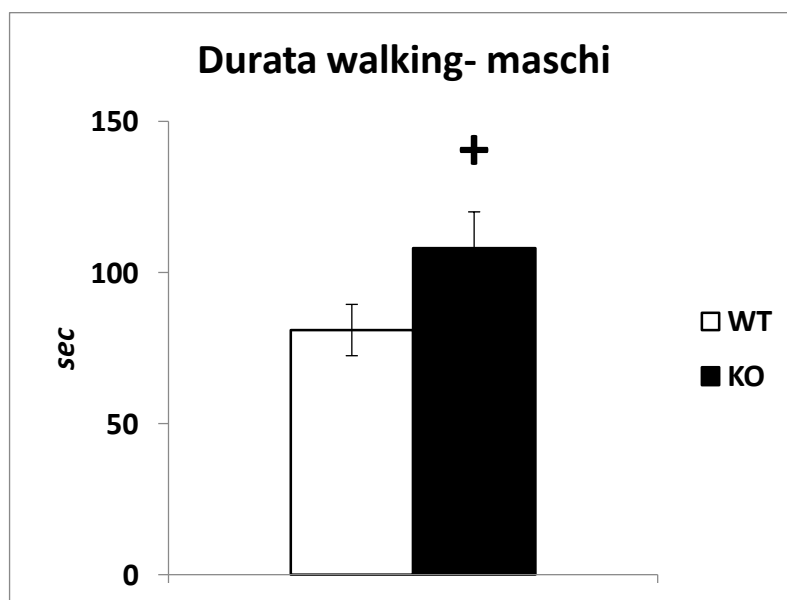


Grafico 43 Durata del walking nel resident/ intruder di topi maschi WT e KO. (+  $p<0.10$  vs KO). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

L'effetto del genotipo non risulta essere significativo per l'analisi degli altri comportamenti sociali ed esplorativi (ANOVA a una via: genotipo) (grafico 47).

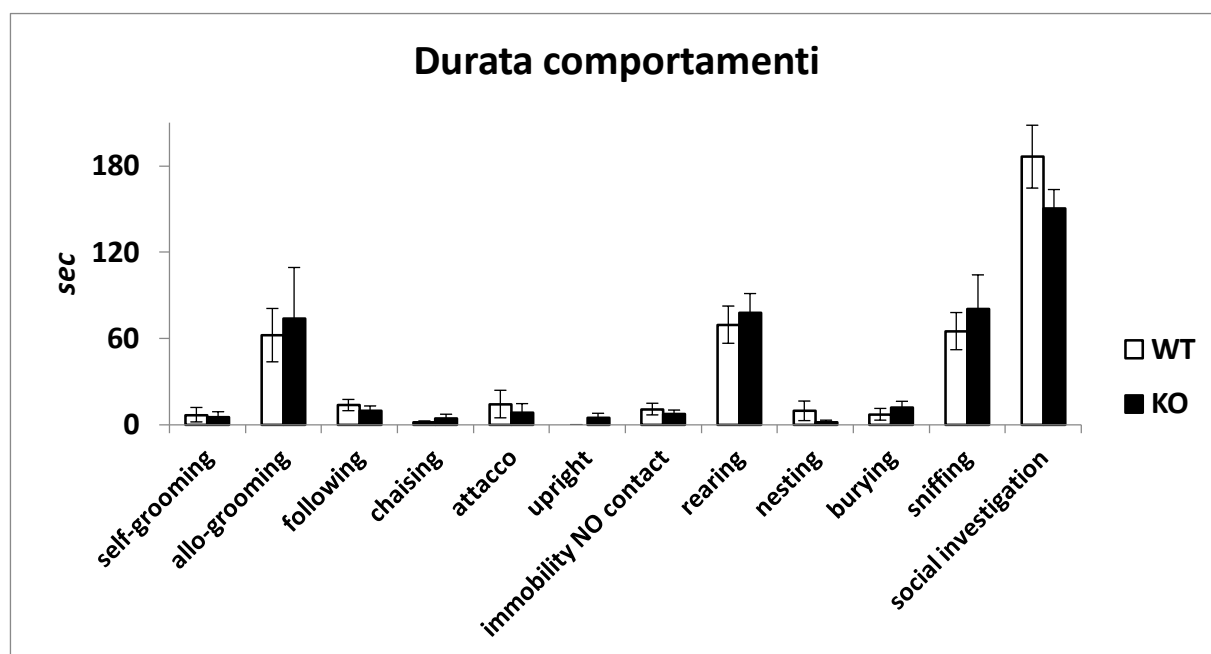


Grafico 44 Durata dei diversi comportamenti attuati durante il test del resident/ intruder di topi maschi WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### 4.3 Discussione

In questo primo esperimento ho condotto una fenotipizzazione del comportamento ansioso e sociale in topi KO condizionali per NPY1R adottati da femmine del ceppo BALB/c. Perciò i topi sono stati monitorati nella loro curva di crescita corporea da svezzamento ad età adulta e sottoposti a vari test: anedonia, marble, EPM, OPF classico, OPF sociale e resident/ intruder.

La prima analisi ha riguardato lo studio della curva di crescita corporea di tutti gli animali sperimentali, dal giorno dello svezzamento (PND 27) all'età adulta (PND 90): i dati hanno mostrato che non esistono differenze dovute al genotipo tra topi WT e KO, né nei maschi né nelle femmine. Questo risultato conferma quanto ottenuto dagli studi di Bertocchi et al. (2011), che hanno dimostrato che le differenze sulla crescita corporea risultano evidenti solo in



topi maschi allevati da madri con elevato grado di cure materne (ceppo FVB/ J), mentre non sono visibili in animali allevati da madri con minore grado di cure materne (ceppo C57Bl/6J).

Anche l'analisi del comportamento simil-depressivo (test dell'anedonia), così come i risultati ottenuti dallo studio del comportamento neofobico e impulsivo mediante il Marble test, non hanno mostrato nessuna differenza tra gli animali KO e WT, sia maschi che femmine. Gli animali sperimentali hanno passato la maggior parte del tempo in immobilità e hanno sepolto un elevato numero di biglie, ad indicare un alto grado di neofobia e irrequietezza.

Nell'Elevated Plus Maze si è osservato un effetto diverso del genotipo su maschi e femmine per quanto riguarda il walking nell'apparato: è stata evidenziata una tendenza dei topi maschi KO a camminare meno dei topi maschi WT, mentre nelle femmine KO si è riscontrata una tendenza ad una maggiore frequenza d'ingresso e di walking nel centro dell'apparato, rispetto alle femmine WT. Comunque, tutti gli animali, indipendentemente dal genotipo e dal sesso, hanno mostrato un fenotipo ansioso caratterizzato da un alto livello di ansia di tratto, quando sottoposti a questo test, indicando che, in questa coorte di animali allevati da madri a basso grado di cure materne, la delezione di Y1R non ha indotto effetti sul comportamento simil-ansioso, coerentemente con altri studi condotti precedentemente in questo laboratorio e con lo studio di Bertocchi et al. (2011)

In accordo con quanto descritto da Bertocchi et al. (2011), nel test dell'Open Field classico non sono stati osservati effetti indotti dal genotipo e quindi differenze nel comportamento, tra topi KO e WT, sia maschi che femmine. Tutti gli animali sperimentali, indipendentemente dal genotipo, hanno trascorso più tempo nel bordo, indice di livelli di ansia elevati.

L'Open Field sociale ha permesso di verificare se gli animali fossero socialmente evitanti o meno. Durante la seconda sessione del test, tutti gli animali sperimentali hanno trascorso più tempo nella zona sociale, mostrando interesse per l'intruso nella retina. Un dato interessante è relativo all'attività locomotoria che si è ridotta in modo significativo durante la sessione T2 in tutti i maschi, indipendentemente dal genotipo, e nelle femmine KO. Questi risultati sono in linea con quanto osservato in precedenti studi condotti nel nostro laboratorio su animali allevati da madri adottive del ceppo C57, mentre dati su topi allevati da madri FVB hanno rilevato una maggiore attività locomotoria in tutta l'arena, indice di ansietà e irrequietezza, e

assenza di differenza nella quantità di tempo trascorso in prossimità della zona sociale tra T1 e T2.

Infine, l'analisi del comportamento aggressivo mediante il test del Resident/ Intruder ha mostrato che la delezione del recettore in area limbica non influenza l'aggressività intramaschio: indipendentemente dal genotipo, questi animali sperimentali hanno mostrato essere poco aggressivi, sia per la latenza del primo attacco, che per il numero totale di attacchi. Un dato interessante è dato dalla tendenza dei topi maschi KO a trascorrere più tempo in comportamenti quali monta e walking. Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che solo i maschi KO allevati da madri ad alto grado di cure materne presentano latenze al primo attacco maggiori, minore frequenza di attacco e, di conseguenza, trascorrono meno tempo in comportamento agonistico rispetto agli animali WT.

Nel complesso tutti questi risultati confermerebbero l'ipotesi per cui differenze significative nel fenotipo molecolare, fisiologico e comportamentale tra i topi KO e quelli controllo siano evidenti solo quando gli animali di entrambi i genotipi sono stati allevati da madri adottive ad alto grado di cure materne (Bertocchi et al., 2011). I dati relativi al comportamento sociale e aggressivo hanno mostrato delle differenze tendenti alla significatività tra i topi WT e KO, per cui è necessario condurre altri studi per confermare quanto osservato.

## Capitolo 5

### ***ESPERIMENTO 2: effetti dello stress psico-sociale cronico in maschi KO e WT allevati da madri di ceppo BALB/c***

#### **5.1 Materiali e metodi**

Lo scopo di questo esperimento era quello di contribuire alla caratterizzazione del fenotipo di topi knock-out condizionali per NPY1R, valutando gli effetti dello stress psicosociale cronico sia sul comportamento (emozionale e simil-depressivo) che sul metabolismo.

Per lo svolgimento di questo esperimento è stato utilizzato il gruppo di maschi dato in adozione a madri del ceppo BALB/ c dox-naïve, così distribuiti:

- ❖ 8 maschi KO;
- ❖ 10 maschi WT.

Si tratta dello stesso gruppo di maschi utilizzato nell'esperimento 1, che, quindi, dopo aver effettuato i diversi test comportamentali, è stato sottoposto a quest'ulteriore protocollo.

##### **5.1.1 Stress psico-sociale cronico (CPS)**

Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione ad eventi stressanti può portare ad un aumento del rischio di sviluppare disturbi psichiatrici, come la depressione maggiore (Risch et al, 2009; McEwen, 2007; de Kloet et al, 2005). La comprensione e l'identificazione dei fattori di rischio genetici che contribuiscono all'aumento della suscettibilità allo stress o all'incapacità di fronteggiare una situazione stressante, potrebbero suggerire nuovi approcci terapeutici per questi disturbi (Caspi and Moffitt, 2006; Lesch, 2004). Come abbiamo visto nel paragrafo "Y1R e comportamento emozionale", 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 questi effetti.

Per testare la risposta allo stress cronico negli animali sperimentali ci siamo serviti di un modello di stress psicosociale cronico (CPS), basato sulla competizione di tipo residente-intruso. Il test residente-intruso è un paradigma comportamentale classificato come social defeat, in cui un animale "intruso" viene inserito nella gabbia di un altro animale o gruppo di animali della stessa specie, "residenti". Ciò genera normalmente una reazione violenta da parte del/degli animali "residenti" per la difesa del proprio territorio. Se agli animali è permesso combattere in una singola occasione, questo è da considerarsi un modello di stress acuto. Lo scopo del nostro protocollo è stato invece quello di valutare la risposta comportamentale, fisiologica e metabolica alla coabitazione forzata, a lungo termine, tra due animali, inducendo di conseguenza non uno stress di tipo acuto, bensì cronico. Il test è basato sulla naturale propensione dei topi maschi a combattere per la conquista ed il mantenimento del territorio 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).

La procedura utilizzata in questo esperimento è una versione modificata del paradigma standard di stress cronico da subordinazione (Bartolomucci et al., 2001, 2004): il maschio CD1 viene posto precedentemente in una gabbia pulita, in modo da stabilirvi il proprio territorio (residente) e solo successivamente viene inserito nella sua gabbia un maschio intruso, che gli usurperà la dominanza sul territorio (Bartolomucci et al., 2010). I due animali coabitano nella stessa gabbia divisa in due ambienti per mezzo di una paratia, che permette un continuo contatto sensoriale, mentre l'interazione aggressiva è consentita solo per un tempo massimo di 10 minuti al giorno (Figura 48).

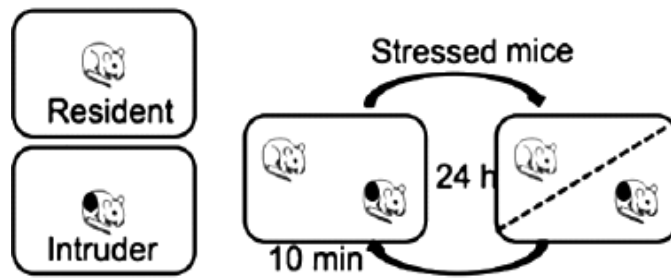


Figura 45 Stress psicosociale cronico (CPS)

### **5.1.2 Protocollo**

Il protocollo di CPS al quale sono stati sottoposti i topi maschi KO condizionali per NPY1R e WT è durato per un periodo totale di quattro settimane, durante le quali è stata valutata la risposta comportamentale e metabolica degli animali sperimentali. Come animali residenti e dominanti sono stati utilizzati maschi adulti del ceppo Swiss CD1, i quali, prima dell'inizio del protocollo di CPS sono stati allenati per mostrare un comportamento territoriale aggressivo nei confronti di un animale intruso dello stesso sesso. L'allenamento è consistito in una serie di scontri, per diversi giorni consecutivi, tra maschi CD1 residenti e maschi C57 di peso inferiore, intrusi.

A PND 110 i nostri animali sperimentali sono stati pesati, isolati all'interno di una gabbia divisa a metà mediante una paratia, e sono stati forniti loro 10/15 pellet, di cui è stato misurato il peso. Sono inoltre stati attivati i sensori ad infrarossi per la registrazione dell'attività locomotoria. Ogni due giorni, fino a PND 116, è stato registrato il peso corporeo degli animali e il consumo di cibo. Questi dati hanno permesso di definire il periodo basale.

Il primo giorno di CPS (CPS 0), corrispondente al PND 116, ogni animale sperimentale è stato pesato, inserito all'interno della gabbia di un maschio CD1 dominante, permettendo l'interazione per un massimo di 10 minuti tra i topi, che sono stati poi separati inserendo la paratia. Da questo momento, fino alla fine del CPS, i due animali hanno coabitato nella stessa gabbia e ogni giorno, alla stessa ora è stata rimossa la paratia per consentire ai topi di

interagire fisicamente. Durante l'interazione sociale, sono stati registrati su una griglia la latenza del primo attacco e i comportamenti offensivi e difensivi, al fine di determinare il tipo di comportamento sociale e la segregazione comportamentale. Durante queste settimane di protocollo è stato valutato l'effetto dello stress sul comportamento anedonico ed emozionale (Test dell'Open Field Classico), e durante tutta la durata dell'esperimento è stato registrato il peso corporeo degli animali sperimentali e il loro consumo di cibo ogni due giorni, servendoci di una bilancia digitale (Bilancia Kern and Sohn GmbH, Germania) in modo da mantenere monitorata la crescita corporea in relazione alla quantità di cibo assunta.

### **5.1.3 Analisi del comportamento anedonico: Test dell'Anedonia**

A PND 128, tutti i topi maschi, sia KO che WT, sono stati sottoposti nuovamente al test dell'anedonia, il cui scopo è quello di valutare la propensione degli animali nella ricerca di un piacere, nel caso specifico di una bevanda zuccherata rispetto alla semplice acqua potabile. È stato seguito un normale protocollo (come descritto nel paragrafo "Test dell'anedonia"), allo scopo di verificare se la condizione di stress psico-sociale cronico potesse influire sullo sviluppo di un comportamento simil-depressivo nel modello animale utilizzato.

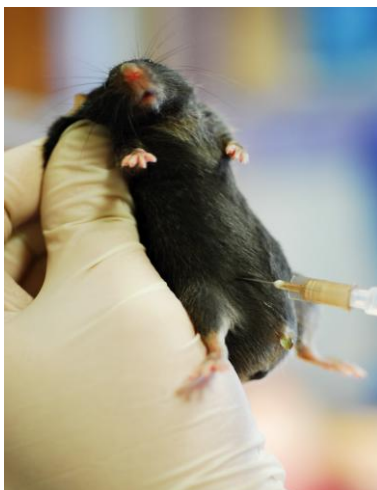
### **5.1.4 Analisi del comportamento ansioso: Open Field classico**

Il test dell'open field classico (il cui protocollo è stato descritto nel paragrafo "Test dell'Open Field classico (OPF)") è stato condotto su tutti i maschi, oltre che a PND 102, anche al PND 134, per valutare il comportamento ansioso sia nel periodo basale che durante il protocollo di stress psico-sociale cronico.

### **5.1.5 Test di tolleranza al glucosio (GTT)**

Il test di tolleranza al glucosio è un test clinico che viene utilizzato per controllare se un paziente ha un metabolismo del glucosio normale o alterato. Permette, infatti, di valutare come la concentrazione di glucosio (e di insulina nel caso in cui venga associato a dosaggio dell'insulina) cambia nel sangue dopo l'assunzione di una dose nota di glucosio. Il suo significato funzionale è determinare quanto veloce è la clearance del glucosio dal sangue ed è utilizzato in diagnostica per lo studio di patologie come il diabete o l'insulino-resistenza.

Nel nostro studio, ce ne siamo serviti per valutare l'impatto del protocollo di stress psicosociale cronico (CPS) sul nostro animale sperimentale. Il test è stato condotto su tutti i topi maschi KO e WT a PND 137, dopo un digiuno overnight di almeno 12 ore. È stata valutata la glicemia basale, misurando i livelli ematici di glucosio a digiuno. A questo punto, è stata effettuata una iniezione intraperitoneale di 0.1 cc ogni 10 gr di peso corporeo di D-glucosio al 10% (figura 49). I livelli ematici di glucosio sono stati rimisurati dopo 30 (T30), 60 (T60) e 120 (T120) minuti dall'iniezione. Tutte le misurazioni di glucosio ematico sono state fatte utilizzando il glucometro "Accucheck Aviva" (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Il kit è composto da una striscia (Sanamed, Modena, Italia) che viene bagnata ad una estremità con una goccia di sangue e posta a contatto, attraverso l'estremità opposta, con un glucometro per la misura della glicemia.



*Figura 46 Iniezione intraperitoneale di 0.1cc/10gr peso corporeo di D-glucosio al 10%.*

### **5.1.6 Sacrificio e prelievo dei campioni biologici**

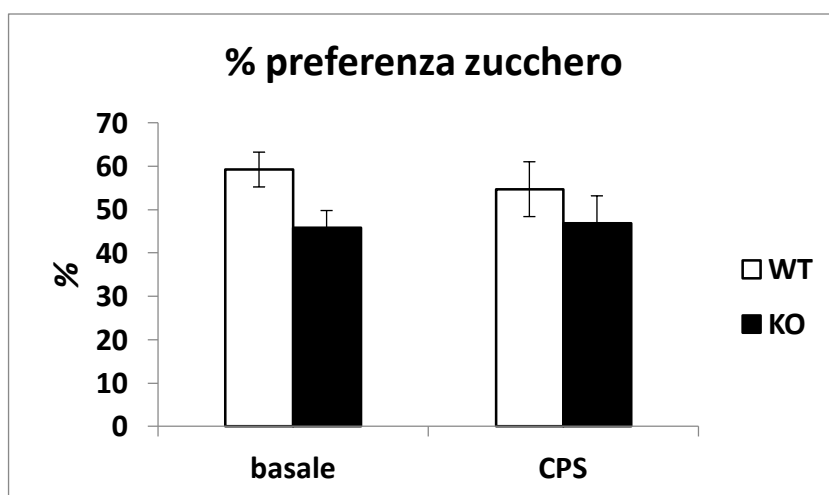
Al termine del CPS, corrispondente a PND 145, i topi maschi NPY sono stati sacrificati al fine di raccogliere campioni biologici, necessari alle analisi biochimiche. Sono stati prelevati cervello, sangue, tessuto adiposo bruno (BAT), tessuto adiposo sottocutaneo (SC) e tessuto adiposo viscerale (WAT), i quali sono stati pesati come misura metabolica. Il sangue raccolto dal tronco, è stato conservato in una provetta tipo "Eppendorf" con anticoagulante eparina (Sarstedt, Italia) e centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C per analisi successive.

## **5.2 Risultati**

### **Effetti dello stress sul comportamento**

#### **5.2.1 Valutazione del comportamento anedonico.**

L'ANOVA a misure ripetute a due vie (genotipo e ripetizione del test) effettuata per valutare le variazioni indotte dallo stress psicosociale cronico sul comportamento anedonico, rispetto al periodo basale, ha mostrato che lo stress non influisce sul comportamento simil-depressivo di animali maschi KO e WT (grafico 50).



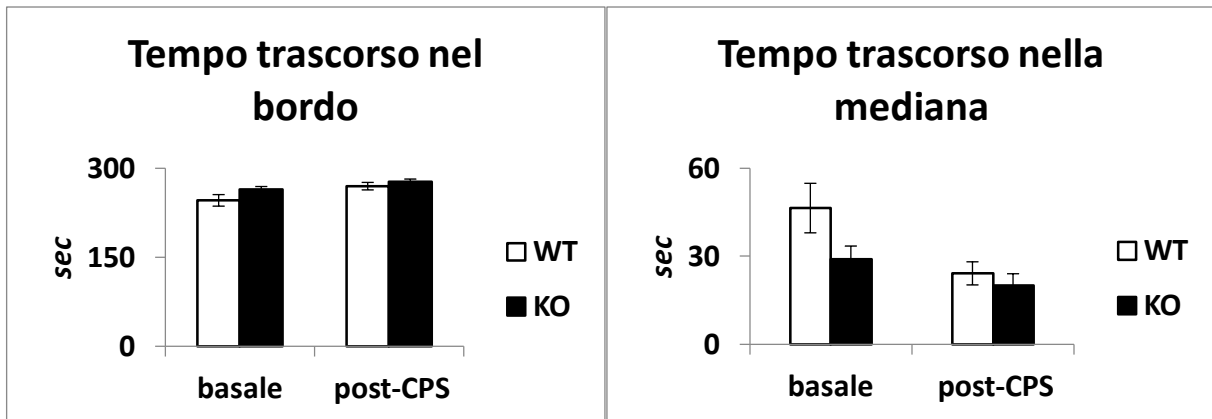
*Grafico 47 Percentuale di preferenza della soluzione zuccherata in maschi WT e KO, in periodo basale e durante il CPS. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.*

#### **5.2.2 Valutazione del comportamento simil-ansioso (test dell'Open Field).**

Ho condotto un'analisi statistica per valutare la variazione del comportamento simil-ansioso (ANOVA a misure ripetute a due vie: stress e genotipo) dopo 18 giorni dall'inizio del CPS, considerando nuovamente il tempo trascorso dagli animali sperimentali nelle diverse zone dell'arena (grafico 51) e l'attività locomotoria totale (grafico 52). Indipendentemente dal genotipo, lo stress ha determinato un aumento significativo del tempo trascorso dagli animali nella zona esterna dell'apparato e una significativa riduzione del tempo passato nella zona

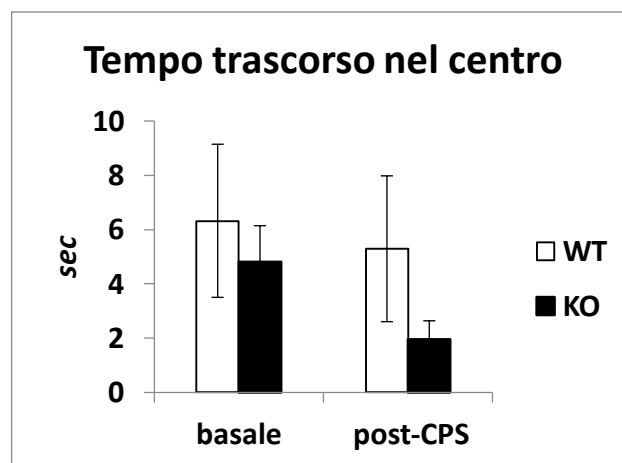


mediana (rispettivamente, stress:  $F_{(1;16)} = 7,28$   $p < 0,05$ , grafico 51a;  $F_{(1;16)} = 8,94$   $p < 0,01$ , grafico 51b). Il tempo trascorso nel centro e l'attività locomotoria totale non sono risultati essere significativamente influenzati né dal genotipo né dallo stress.



(a)

(b)



(c)

Grafico 48 Tempo trascorso dai topi maschi WT e KO durante il test dell'Open Field nel periodo basale e durante CPS a) nel bordo, b) nella zona mediana, c) nel centro. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

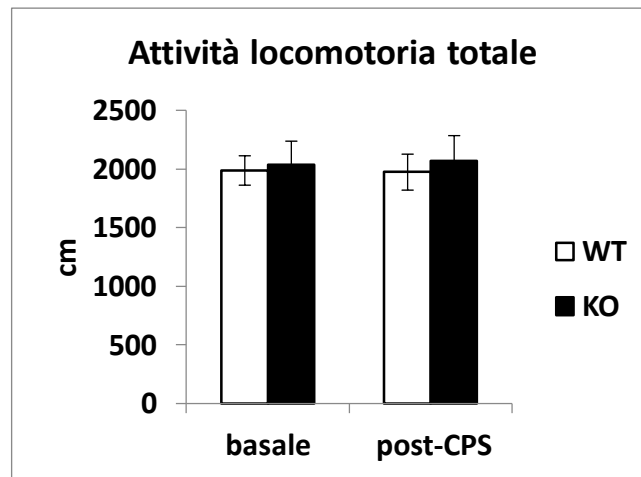


Grafico 49 Attività locomotoria totale di topi maschi WT e KO durante il test dell'Open Field nel periodo basale e durante il CPS. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### **Effetti dello stress sul metabolismo**

#### **5.2.3 Crescita corporea a dieta STD**

L'ANOVA a misure ripetute a due vie (genotipo e giorni) mostra che gli animali sperimentali sottoposti a CPS, indipendentemente dal genotipo, sono soggetti ad un incremento significativo del peso corporeo dal periodo basale all'ultimo giorno di stress psico-sociale (giorni:  $F_{(16;256)} = 67,81$   $p < 0,001$ , grafico 53). Il guadagno di peso corporeo durante il periodo di stress psico-sociale cronico con l'analisi della varianza a due fattori (genotipo e tempo) ha mostrato lo stesso tipo di incremento della crescita corporea degli animali nel corso dei diversi giorni (giorni:  $F_{(14;224)} = 54,64$   $p < 0,001$ , grafico 54).

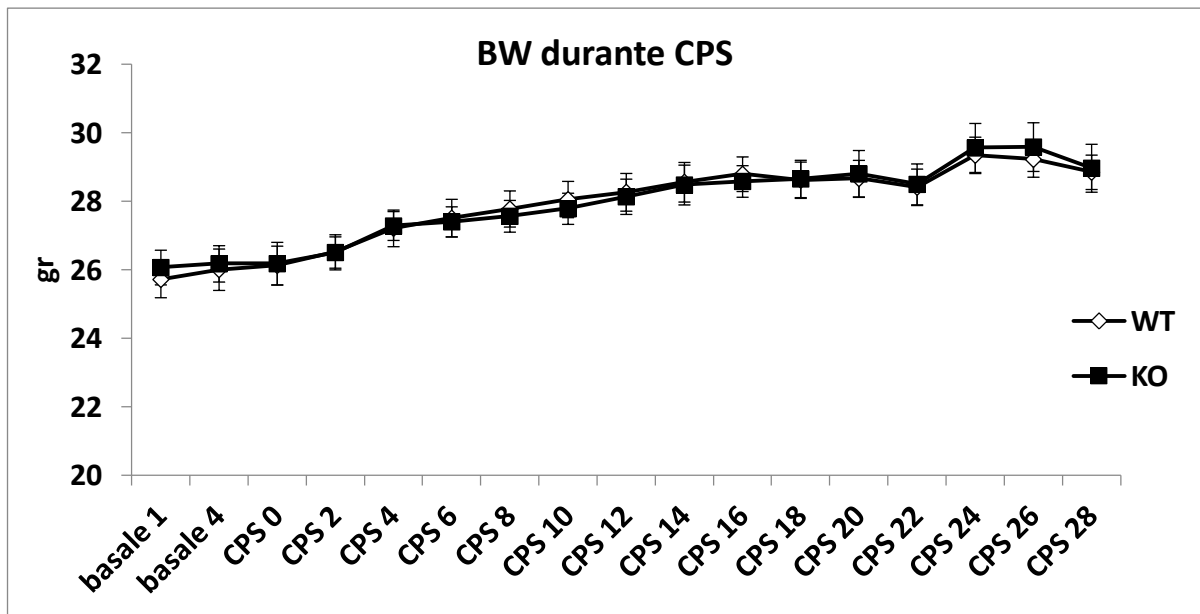


Grafico 50 Peso corporeo di topi maschi WT e KO sottoposti a stress psico-sociale cronico. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

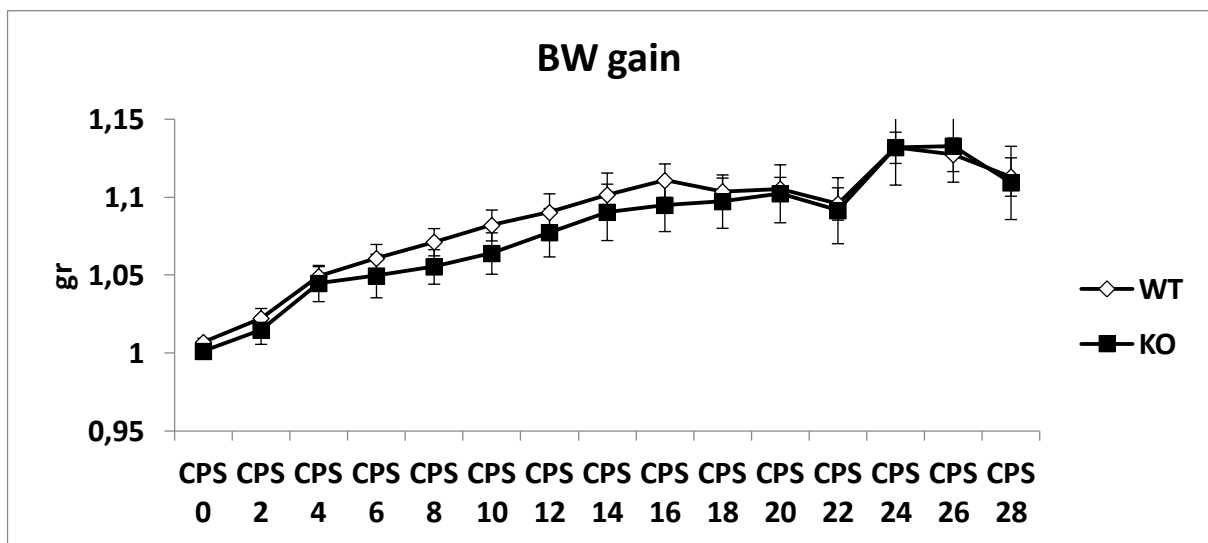


Grafico 51 Variazione del peso corporeo di topi maschi WT e KO durante CPS. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### 5.2.4 Food-intake

L'analisi statistica (ANOVA a misure ripetute a due vie: giorni e genotipo) sulla variazione del food-intake durante il CPS, ha mostrato un effetto significativo dei giorni sull'incremento del consumo di cibo (giorni:  $F_{(14;224)}= 32,04$ ;  $p<0.001$ , grafico 55). Si osserva un picco di food intake, dovuto al digiuno prima del GTT (CPS-21).

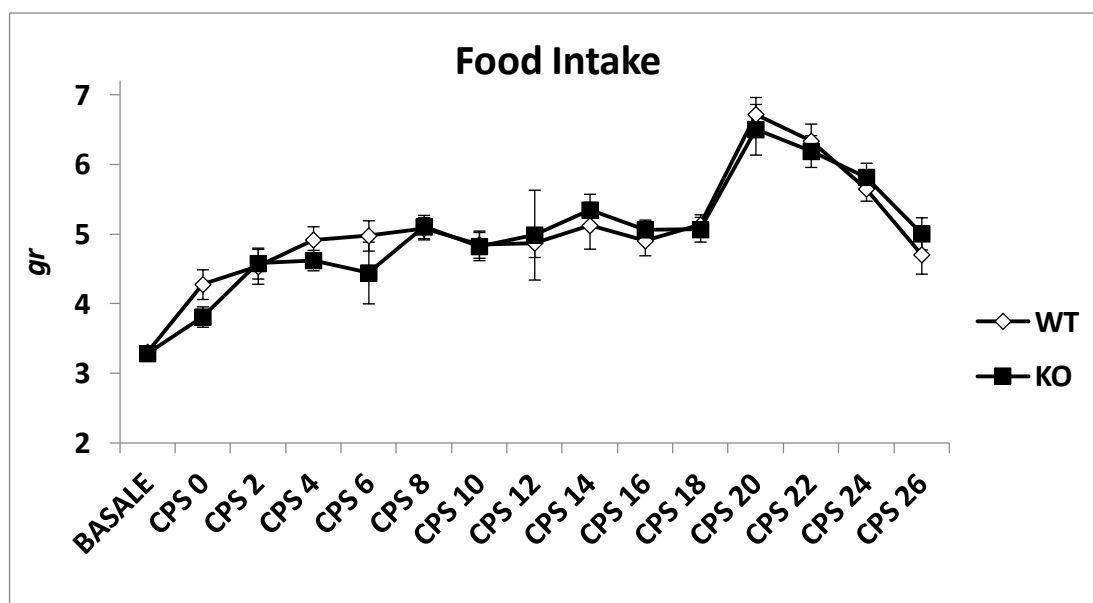


Grafico 52 Variazione del Food Intake in topi maschi WT e KO durante CPS. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### 5.2.5 Attività locomotoria

L'analisi statistica (ANOVA a misure ripetute a tre vie: genotipo, tempo e fasi luce/buio) condotta su dati relativi all'attività locomotoria dei topi maschi KO e WT, registrata durante il periodo basale e il CPS, ha mostrato un effetto significativo del tempo ( $F_{(4;64)}= 9,08$ ,  $p<0.001$ ) e delle fasi luce/buio ( $F_{(1;16)}=102,08$ ,  $p<0.001$ ). I topi, indipendentemente dal genotipo, si muovono maggiormente nella fase di buio rispetto a quella di luce. In entrambe le fasi si osserva un picco dell'attività locomotoria nel passaggio dal periodo basale alla prima settimana di CPS (grafico 56).

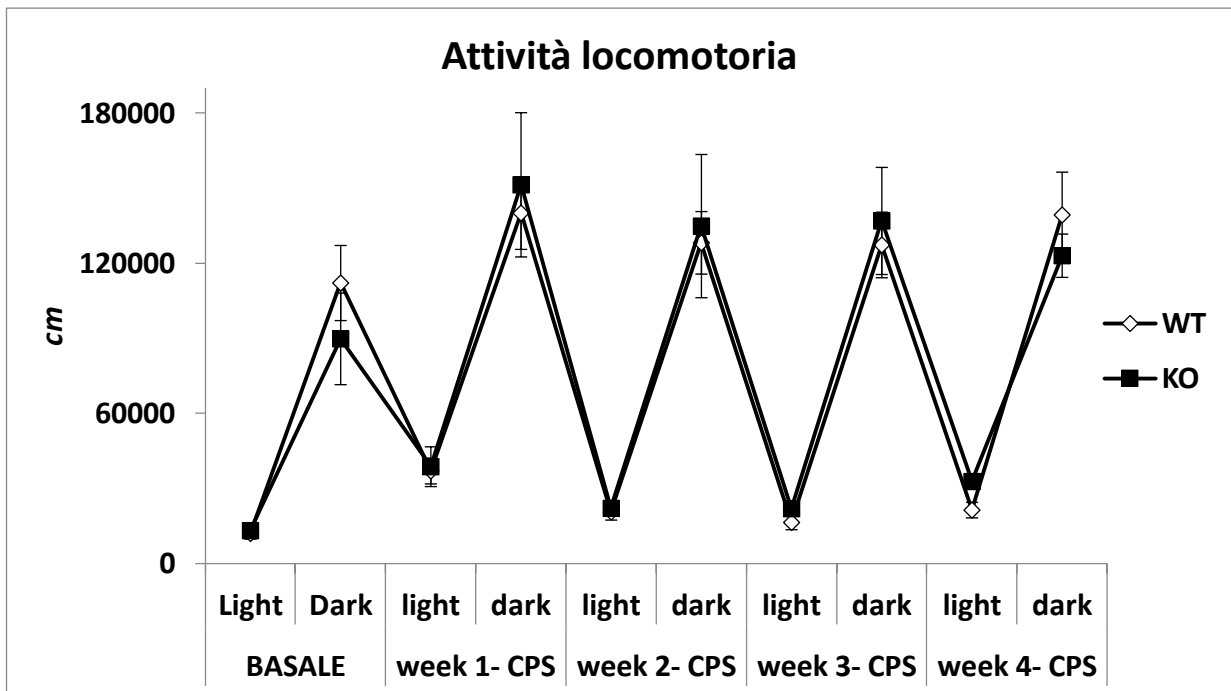


Grafico 53 Attività locomotoria di topi maschi WT e KO registrata durante il protocollo di CPS, suddivisa in fase di buio e fase di luce. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### **5.2.6 Valutazione della tolleranza al glucosio: GTT**

L'analisi statistica (ANOVA a misure ripetute a due vie: genotipo e tempo) sui livelli di glicemia misurati in seguito alla iniezione intraperitoneale di D-glucosio al 10% non ha mostrato alcun effetto significativo del genotipo. Tuttavia è evidente una significativa differenza a T120 dovuta al genotipo, che implica una persistenza di maggiori livelli di glucosio nei topi KO rispetto ai WT (ANOVA a una via, genotipo:  $F_{(1;16)} = 5,11$ ;  $p < 0.05$ , grafico 57).

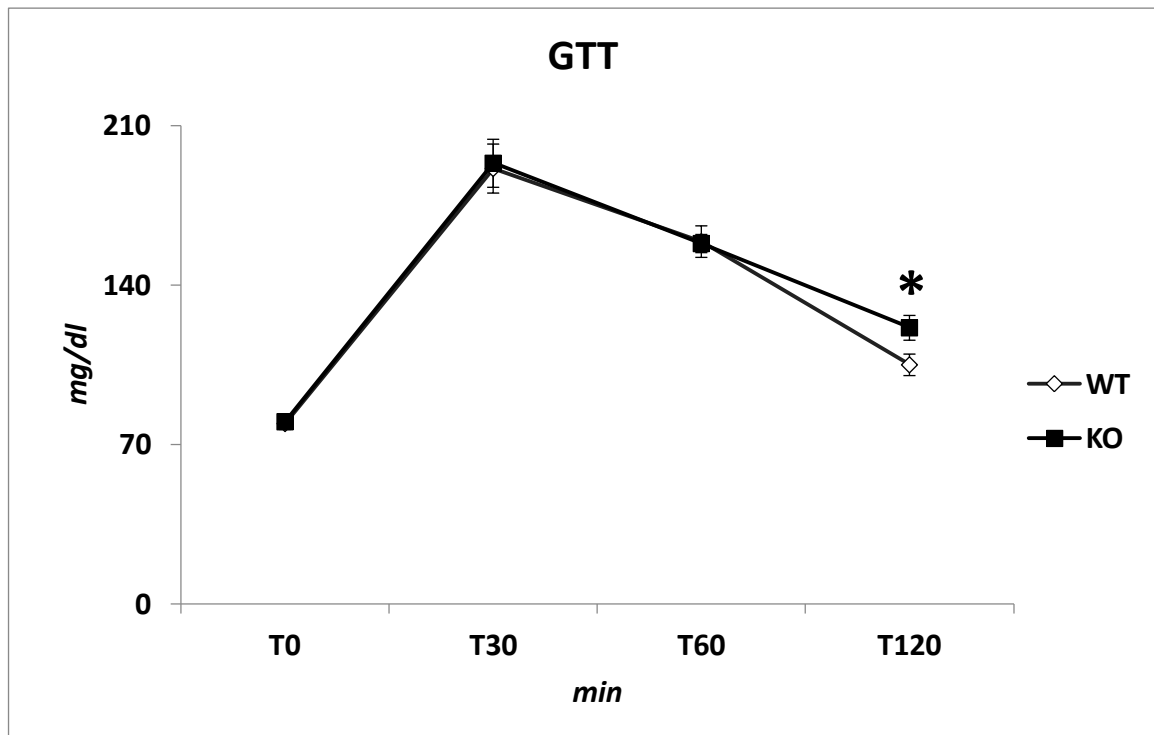
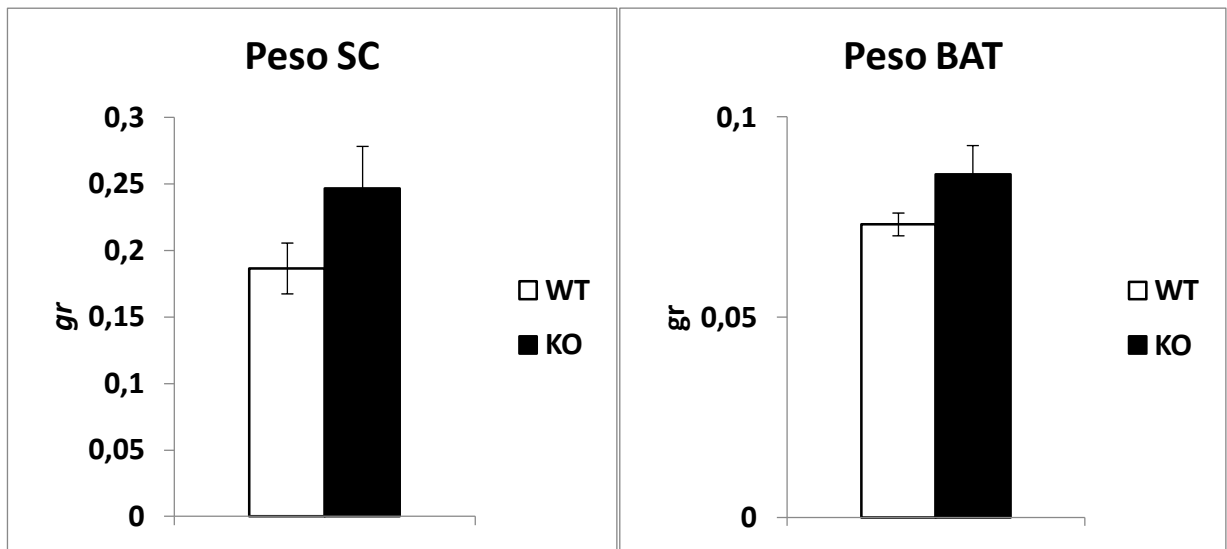


Grafico 54 Curva di assorbimento del glucosio in topi maschi WT e KO. (\*  $p < 0.05$  vs WT in T120) I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

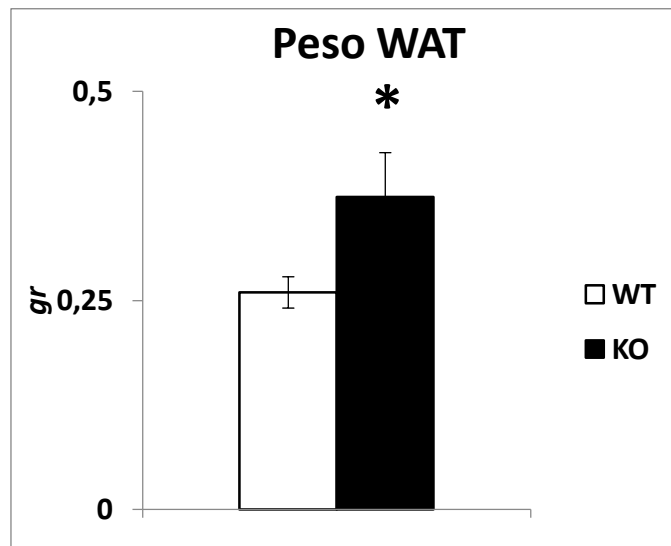
### **5.2.7 Analisi del tessuto adiposo viscerale (WAT), tessuto adiposo bruno (BAT), grasso sottocutaneo (SC).**

L'ANOVA a una via (genotipo) effettuata per tutti e tre i tipi di grasso prelevati al sacrificio ha evidenziato che sul peso del tessuto adiposo viscerale (WAT) si ha un effetto significativo del genotipo ( $F_{(1;16)} = 4,87$ ;  $p < 0.05$ , grafico 58c), per cui i topi maschi KO mostrano valori più alti rispetto agli animali WT. Il peso di BAT e SC prelevati al sacrificio non è influenzato dal genotipo (grafici 58a e b).



(a)

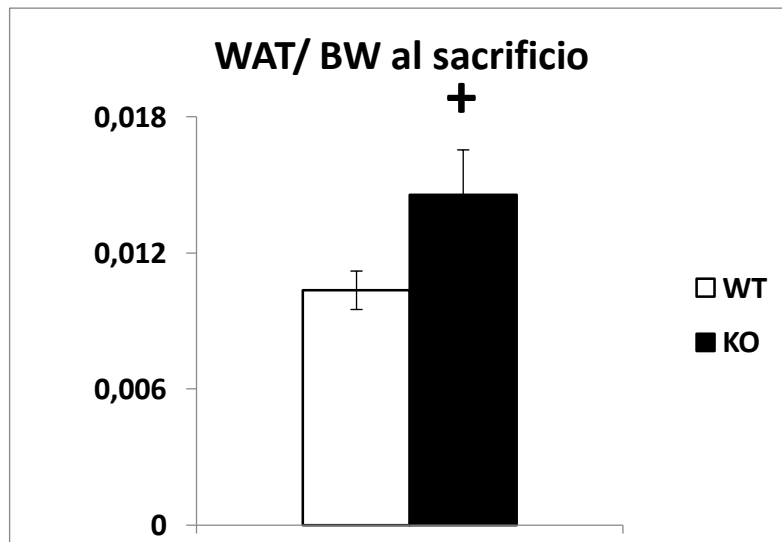
(b)



(c)

Grafico 55 Peso del tessuto adiposo di topi maschi WT e KO a) sottocutaneo b) bruno, c) viscerale. (\*  $p < 0.05$  vs WT) I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

L'analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) su dati relativi al peso del WAT/ BW del topo al sacrificio ha mostrato un effetto del genotipo tendente alla significatività ( $F_{(1;16)} = 4,44$ ;  $p < 0.10$ , grafico 59), per cui i topi maschi KO hanno valori maggiori rispetto ai topi WT.



*Grafico 56 Variazione del tessuto adiposo viscerale in base al peso di topi maschi WT e KO al sacrificio. (+  $p < 0.10$  vs WT) I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.*

### **5.3 Discussione**

L'obiettivo di questo esperimento è stato quello di verificare gli effetti dello stress psico-sociale cronico sul metabolismo e sul comportamento nei topi maschi KO condizionali per NPY1R allevati da madri del ceppo BALB/ c. Il protocollo sperimentale è stato modificato e introdotto recentemente 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).

Nel corso del protocollo sperimentale sono stati condotti il test dell'anedonia e quello dell'open field classico, che non hanno evidenziato differenze significative tra topi maschi WT e KO, dimostrando che lo stress psico-sociale cronico non influisce sul comportamento simil-depressivo e su quello simil-ansioso degli animali di entrambi i genotipi allevati da madri BALB/c.

Durante tutta la durata dell'esperimento è stato registrato il peso corporeo degli animali sperimentali e il loro consumo di cibo: la differenza corporea tra KO e CTRL durante le 4 settimane di CPS è rimasta costante e si è rilevato che in condizioni di stress si è verificato un incremento dell'assunzione di cibo, che può essere interpretato come una "ricerca di conforto"



– *comfort food hypothesis*. L'attività locomotoria totale, registrata mediante sensori a infrarossi, non è risultata essere influenzata dal genotipo.

In seguito al challenge della tolleranza al glucosio, i topi maschi KO hanno raggiunto livelli di glicemia maggiori rispetto ai topi maschi WT in corrispondenza di T 120. Infine, il prelievo dei tessuti ha permesso di rilevare che i topi maschi KO sono caratterizzati da quantità maggiori di tessuto adiposo viscerale rispetto ai topi WT, un dato che non è verificato da una significativa differenza di peso e che per questo richiede ulteriori analisi.

L'assenza di differenze comportamentali e metaboliche tra topi WT e KO allevati da madri del ceppo BALB/ c, a basso grado di cure materne, è stata riscontrata anche in esperimenti precedenti del nostro laboratorio, sia nei topi allevati da madri ad elevato grado di cure materne (FVB/ J) che in animali allevati da madri C57/ 6J. Tuttavia, i campioni degli studi sono sempre stati ridotti, per cui ci si ripropone di ripetere l'esperimento, per aumentare la numerosità del campione.

## Capitolo 6

### ***ESPERIMENTO 3: analisi del comportamento riproduttivo di femmine KO e WT allevate da madri di ceppo BALB/c***

#### **6.1 Materiali e metodi**

La valutazione del comportamento riproduttivo delle femmine è stata effettuata per verificare se la condizione di gravidanza e allattamento potesse determinare differenze metaboliche e/o comportamentali tra femmine WT e KO, al fine di evidenziare gli effetti dell'inattivazione condizionale di Y1R.

Per lo svolgimento di questo esperimento è stato utilizzato solamente il gruppo di femmine dato in adozione a madri del ceppo BALB/ c dox-naïve, così distribuite:

- ❖ 3 femmine KO;
- ❖ 5 femmine WT.

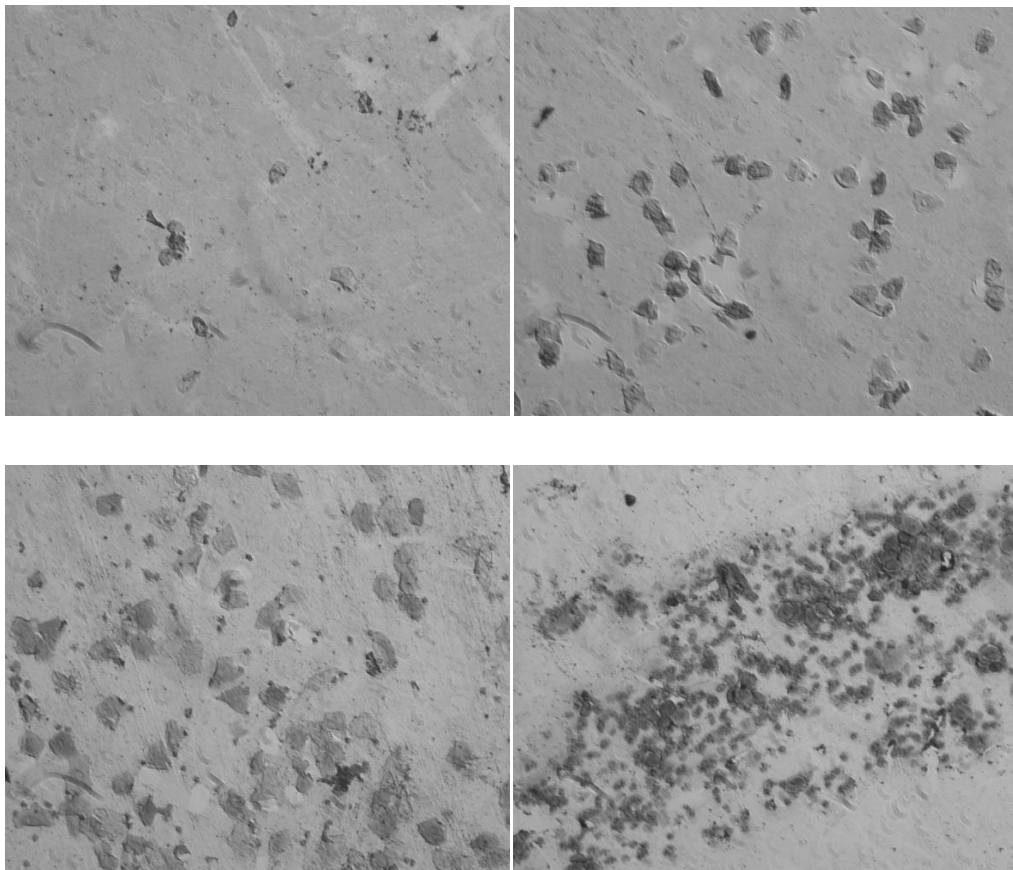
Si tratta dello stesso gruppo di femmine utilizzato nell'esperimento 1, che, quindi, dopo aver effettuato i diversi test comportamentali, è stato sottoposto a quest'ulteriore protocollo, che ha previsto l'accoppiamento di due femmine con un maschio da PND 126 a PND 132. L'isolamento delle femmine in singole gabbie di stabulazione è avvenuto a PND 141.

Il numero estremamente esiguo di campioni è quello di uno studio pilota che, sulla base dei risultati, eventualmente richiederà di effettuare ulteriori studi ed esperimenti.

##### **6.1.1 Ciclo estrale**

Il ciclo estrale nel topo ha una durata di circa 4-5 giorni, durante i quali si assiste a una modificazione ciclica della mucosa vaginale: all'inizio della fase follicolare, sono presenti cellule epiteliali nucleate, che, in seguito all'aumento dei livelli di estrogeni, maturano e vanno incontro a degenerazione, diventando cheratinizzate; inoltre, negli stadi finali del ciclo, si osserva un numero sempre maggiore di leucociti. Sulla base di ciò il ciclo estrale viene suddiviso in quattro fasi, che vengono evidenziate istologicamente sulla base delle cellule presenti nello striscio vaginale (figura 60):

- a) Proestro: prevalgono le cellule epiteliali nucleate, mentre ci sono poche cellule cheratinizzate e i granulociti sono assenti. Questa fase corrisponde all'estro comportamentale;
- b) Estro: caratterizzato da cellule epiteliali cheratinizzate, di forma irregolare e prive di nucleo:
- c) Metaestro: presenza di un mix di cellule, in cui si possono ritrovare anche granulociti; è una fase molto rapida;
- d) Diestro: prevalgono i granulociti, ma si possono trovare ancora cellule cheratinizzate, alcune cellule nucleate epiteliali di nuova formazione e filamenti di muco.



*Figura 57 Fasi del ciclo estrale di un topo: proestro, estro, metaestro e diestro.*

Il protocollo di collezione delle cellule epitaliali vaginali prevede l'utilizzo di cotton-fioc leggermente inumiditi con acqua, che vengono utilizzati come tamponi per la raccolta delle cellule della mucosa vaginale. Durante il prelievo, la femmina viene posta in una posizione tale

da simulare la monta del maschio e da indurre una sorta di lordosi. Successivamente, lo striscio vaginale si ottiene appoggiando direttamente il cotton-fioc su un vetrino, e ruotandolo sulla superficie, in modo da far depositare il maggior numero possibile di cellule; si ripete lo striscio tre o quattro volte sul medesimo vetrino. A questo punto, il materiale raccolto viene fissato e colorato utilizzando la miscela May-Grunwald Giemsa, che viene stesa sul vetrino mediante una pipetta; il campione viene lasciato essiccare all'aria e risciacquato dopo dieci minuti circa. Questa colorazione permette di mettere in evidenza il dettaglio nucleare e il materiale extracellulare, per facilitare l'analisi al microscopio.

In particolare, a partire dal PND 120, le gabbie delle femmine sono state spostate in una stanza sperimentale, il cui ciclo di luce-buio di 12 ore prevedeva una fase di luce dalle 11.00 alle 23.00. Ogni giorno, fino al PND 125, alla stessa ora, sono stati eseguiti degli strisci vaginali per favorire l'entrata in estro delle femmine prima dell'accoppiamento. I vetrini così collezionati sono stati suddivisi in modo tale da avere campioni ordinati per ciascuna femmina.

### **6.1.2 Accoppiamento, separazione e isolamento**

A PND 126, le femmine sono state pesate e messe in accoppiamento con maschi del ceppo C57/6J: ogni maschio è stato messo in accoppiamento con due femmine nella stessa gabbia. Dopo 7 giorni, ovvero a PND 132, il maschio è stato rimosso, mentre le due femmine sono rimaste nella stessa gabbia di stabulazione fino a PND 141, quando sono state isolate.

### **6.1.3 Valutazione del comportamento anedonico in gravidanza: Test dell'Anedonia**

Al momento dell'isolamento, PND 141, tutte le femmine presumibilmente gravide, sia KO che WT, sono state sottoposte al test dell'anedonia, il cui scopo è quello di valutare l'interesse degli animali nella ricerca di una bevanda zuccherata rispetto alla semplice acqua potabile. È stato seguito un normale protocollo (come descritto nel paragrafo "Test dell'anedonia"), allo scopo di verificare se la condizione di gravidanza potesse influire sullo sviluppo di un comportamento simil-depressivo nel modello animale utilizzato.

#### **6.1.4 Valutazione del comportamento ansioso in gravidanza: Open Field classico**

Il test dell'open field classico (il cui protocollo è stato descritto nel paragrafo "Test dell'Open Field classico (OPF)) è stato condotto su tutte le femmine sia al PND 116 che al PND 143, per valutare il comportamento ansioso sia nel periodo pre-accoppiamento che in gravidanza.

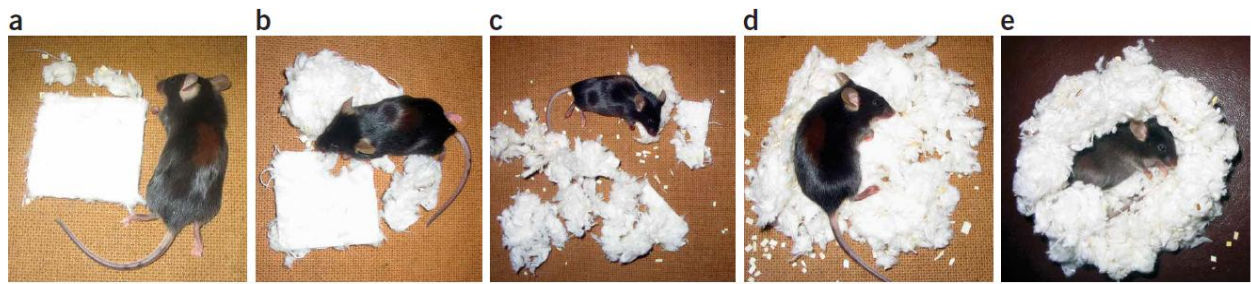
#### **6.1.5 Test del nido**

L'ultimo test effettuato su queste femmine, prima dell'inizio dei parti è il test della costruzione del nido. La costruzione del nido o nest building rappresenta una complessa interazione tra animale e ambiente esterno, e può perciò risultare molto variabile.

Studi precedenti dimostrano come il nest building sia influenzato sia da fattori ormonali (Koller, 1952; Lisk et al., 1969), sia da mutazioni genetiche (Lijam et al., 1997), e, quindi, potrebbe permettere di identificare eventuali differenze fenotipiche nel comportamento riproduttivo delle femmine.

Il protocollo, semplice ed economico, prevede l'utilizzo di nidi di cotone pressurizzato di 5 cm<sup>2</sup>, denominati "Nestlets", di circa 2-3 grammi ciascuno. Si stima, quindi, la tipologia del nido costruito, utilizzando una scala di valutazione da 1 a 5 (Figura 61), come previsto dal protocollo descritto da Deacon (2006a), dove:

1. Nestlet intatto (per più del 90%);
2. Nestlet parzialmente lacerato (dal 50-90% rimane intatto);
3. Nestlet per la maggior parte lacerato (meno del 50% rimane intatto), ma non è possibile identificare un nido centrale, il materiale è sparso per la gabbia;
4. Nestlet lacerato (per più del 90%), il nido è piatto: ha pareti più alte rispetto all'altezza del topo solo per il 50% della circonferenza totale;
5. Nido perfetto (nestlet lacerato per più del 90%), ha una forma a cratere, le pareti sono più alte rispetto all'altezza del topo per più del 50% della circonferenza totale del nido;



*Figura 58 Tipologie di nido costruito*

Il test è stato condotto su tutte le femmine a PND 144, a partire dalle ore 9.00, quando da ogni gabbia contenente una femmina gravida è stato rimosso il nido costruito in precedenza (a partire da un pezzo di carta), ed è stato inserito un Nestlet. Successivamente sono stati effettuati tre controlli, rispettivamente alle ore 11.30, 13.30 e 15.30, durante i quali è stato assegnato un punteggio, in una scala da 1 a 5, alla tipologia di nido costruita da ciascun animale.

Per semplificare l'analisi statistica dei dati raccolti, sono stati utilizzati solamente tre indici:

- 0= corrispondente alle tipologie di nido 1 e 2
- 1= corrispondente alla tipologia 3
- 2= corrispondente alle tipologie 4 e 5

### **6.1.6 Successo riproduttivo e osservazione del comportamento materno**

Tutte le femmine sperimentali sono state pesate all'accoppiamento, alla separazione dal maschio, all'isolamento in singole gabbie trasparenti di plexiglass e al parto. Il giorno del parto (PND 0) è stato registrato il peso e il sesso di ogni piccolo della nidata.

A partire dal PND 1 e fino al PND 6 dei piccoli, sono state condotte osservazioni sul comportamento materno spontaneo. Poiché precedenti esperimenti dimostrano che i topi risultano più attivi durante la fase di buio (Palanza et al., 2002), le osservazioni sono state effettuate durante la fase di buio, in particolare dalle ore 9.00 alle ore 11.00. Sono state utilizzate delle luci rosse di 25 W (Philips), cosicché i topi, non essendo in grado di vedere questo colore, non alterassero il normale ciclo di attività. Ogni madre è stata osservata ogni 4 minuti, per un totale di 30 osservazioni in due ore. I comportamenti che sono stati registrati durante le osservazioni sono:

- ❖ *In nest*: la femmina si trova nel nido, indipendentemente dal comportamento assunto nel momento dell'osservazione;
- ❖ *Out of nest*: la femmina si trova fuori dal nido, indipendentemente dal comportamento assunto nel momento dell'osservazione;
- ❖ *Nursing*: la femmina allatta i piccoli (non necessariamente tutti);
- ❖ *Arched-back (AB)*: la femmina allatta i piccoli assumendo la tipica postura ad "arco", con duplice funzione di allattamento e riscaldamento dei piccoli;
- ❖ *Licking-pups*: la femmina lecca o pulisce i piccoli;
- ❖ *Nest building*: la femmina è impegnata a costruire o sistemare il nido, da fuori o da dentro il nido stesso;
- ❖ *Eating*: la femmina mangia;
- ❖ *Drinking*: la femmina beve;
- ❖ *Grooming*: la femmina si pulisce o si gratta;
- ❖ *Resting*: la femmina giace immobile fuori dal nido, senza svolgere nessun'altra attività;
- ❖ *Active*: la madre è attiva all'interno della gabbia, senza mostrare nessun comportamento specifico.

Infine, al PND7 è stata valutata la percentuale di sopravvivenza dei piccoli.

### **6.1.7 Ultrasuoni**

L'emissione di ultrasuoni è un meccanismo usato per modulare il comportamento materno, ed è stato descritto non solo nei roditori ma anche in uccelli, cani e primati (Branchi et al., 2001). Gli USVs (ultrasonic vocalisations) dei piccoli di topo sono caratterizzati da frequenze comprese tra 30 e 90 kHz, durata di 10-200 ms e pressione di 60-100 dB (Bell et al, 1972; Branchi et al., 1998; Nyby and Whitney, 1978). Per la maggior parte dei ceppi murini il tasso di USVs aumenta nei primi 5-6 giorni di vita, raggiunge un picco intorno al PND 6-7, e successivamente diminuisce, fino a scomparire verso la fine della seconda settimana (Elwood and Keeling, 1982). Questo parametro è strettamente ceppo-specifico. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato che le condizioni ambientali come la temperatura, gli stimoli tattili e olfattivi e l'isolamento influenzano il numero di ultrasuoni emessi dall'animale (Allin and Banks, 1971).

In particolare, gli USVs inducono nella madre risposte comportamentali, come la localizzazione, la ricerca e il retrieving dei piccoli che si trovano fuori dal nido (Ehret and Bernecker, 1992; Ehret and Haack, 1984).

Per comprendere meglio i meccanismi di interazione madre-figlio, è stato deciso di condurre un'analisi dell'emissione di ultrasuoni da parte della prole sia delle madri con genotipo WT che KO. Le registrazioni sono state effettuate a partire da PND 1 ogni due giorni, fino a PND 11, nella stessa fascia oraria, su quattro piccoli (due per genere) di ciascuna nidata. Ogni piccolo è stato prelevato dal nido ed è stata misurata la temperatura corporea a livello della spalla sinistra e sulla parte bassa della schiena. Successivamente l'animale è stato posizionato all'interno di una scatola costruita con materiale isolante e munita di microfono collegato al PC ed è stata effettuata una registrazione per 5 minuti. Prima di essere riposizionato all'interno della gabbia di appartenenza, all'animale è stata misurata nuovamente la temperatura.

Le registrazioni sono state analizzate mediante il software "Ultravox XT" (Noldus, Olanda), che ha permesso di analizzare lo spettro della frequenza degli ultrasuoni e il relativo spettrogramma. Sono stati così calcolati gli USVs totali emessi da ogni piccolo giornalmente.



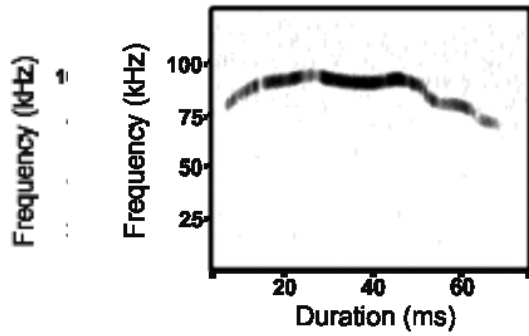
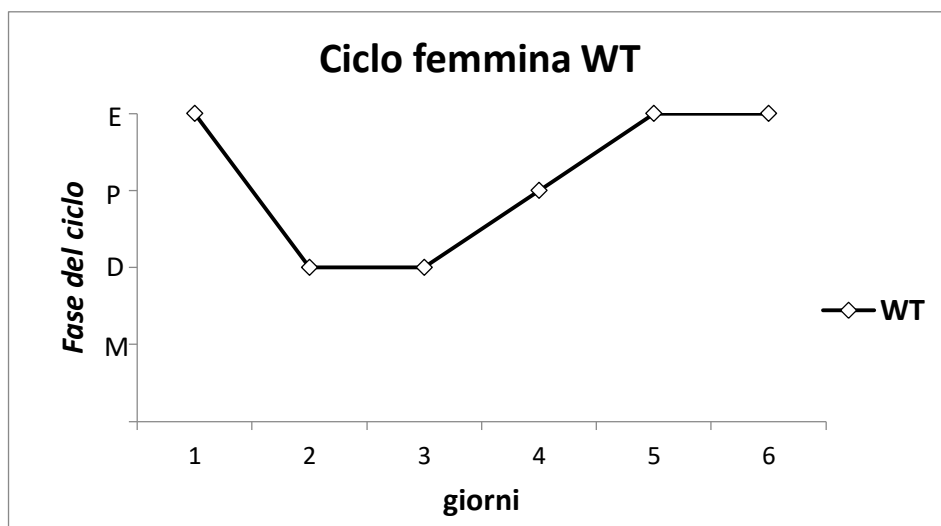


Figura 59 USVs emessi dai piccoli delle madri WT analizzati mediante "Ultravox"

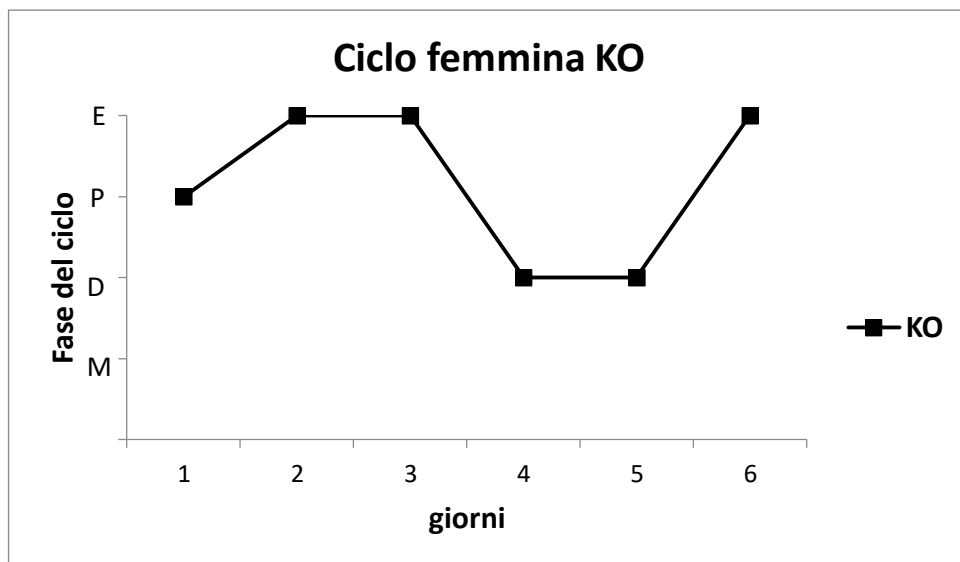
## 6.2 Risultati

### 6.2.1 Analisi del ciclo estrale

L'analisi del ciclo estrale delle femmine stabulate tra sorelle non ha mostrato differenze significative tra KO e WT. Nonostante ciò, nelle femmine da noi analizzate, il 60 % (3/5) delle WT e tutte le 3 femmine KO sono risultate avere un ciclo regolare (Grafico 63).



(a)



(b)

Grafico 60 Esempi di ciclo estrale regolare, in una femmina WT (a) e in una femmina KO (b) [M: Metaestro; D: Diestro; P: Proestro; E: Estro]

### 6.2.2 Analisi del comportamento anedonico in gravidanza

L'analisi del comportamento anedonico (ANOVA a una via: genotipo), effettuata attraverso il calcolo della percentuale di consumo di soluzione zuccherata (acqua + zucchero all'1%) rispetto al totale di soluzione consumata (acqua e soluzione zuccherata), non ha mostrato nessuna differenza significativa tra femmine KO e WT (Grafico 64).

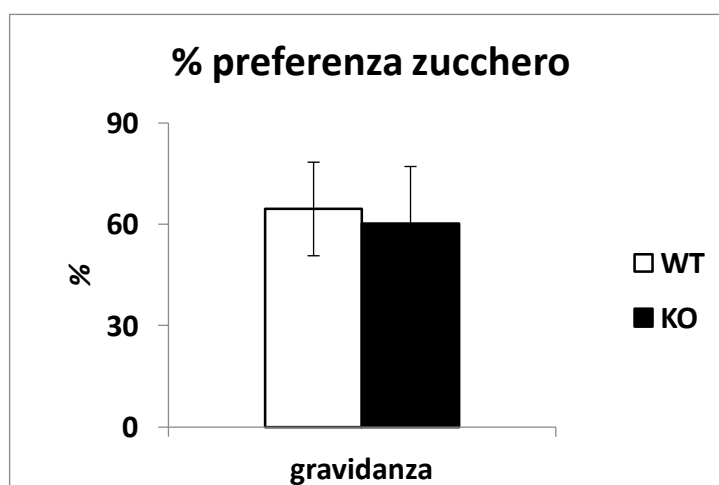


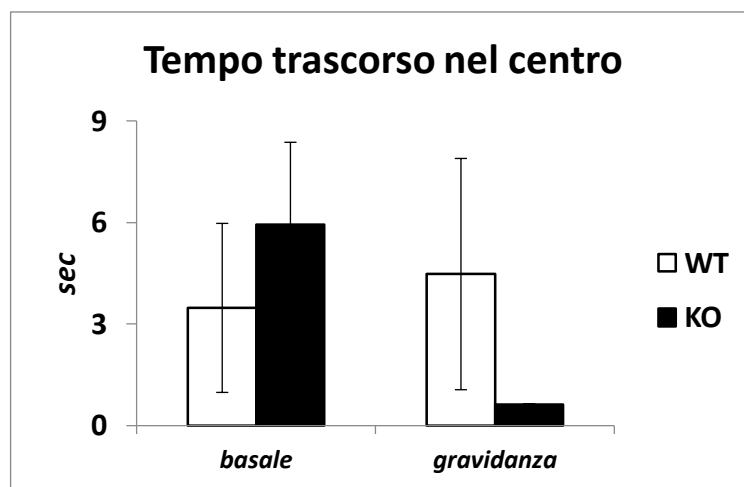
Figura 61 Percentuale di preferenza della soluzione zuccherata, in femmine WT e KO durante la gravidanza. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

### **6.2.3 Analisi del comportamento ansioso: Open Field classico**

La ripetizione dell'open field classico nel periodo della gravidanza è servita a valutare l'effetto che la gravidanza stessa ha avuto sul comportamento degli animali sperimentali.

Ho condotto una ANOVA per misure ripetute a due vie (genotipo e ripetizione del test) sull'attività locomotoria totale e sul tempo che gli animali sperimentali hanno trascorso nel bordo, nella zona mediana e nel centro dell'arena. L'interazione tra genotipo e ripetizione del test influenza significativamente la durata di tempo che questi animali passano nel centro dell'arena ( $F_{(1,6)}=7,67$ ;  $p<0.05$ , grafico 65): in particolare le femmine KO trascorrono più secondi al centro durante il test effettuato in condizioni basali (pre-gravidanza) rispetto al test condotto in gravidanza, mentre nelle femmine WT non si riscontra questa differenza nei due test.

Invece, il tempo trascorso nella zona mediana e nel bordo non sono influenzati né dal genotipo né dalla ripetizione del test (grafico 66).



*Grafico 62 Tempo trascorso al centro dell'apparato dagli animali sperimentali durante il test dell'Open Field, nel periodo basale (pre-accoppiamento) e durante la gravidanza. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.*

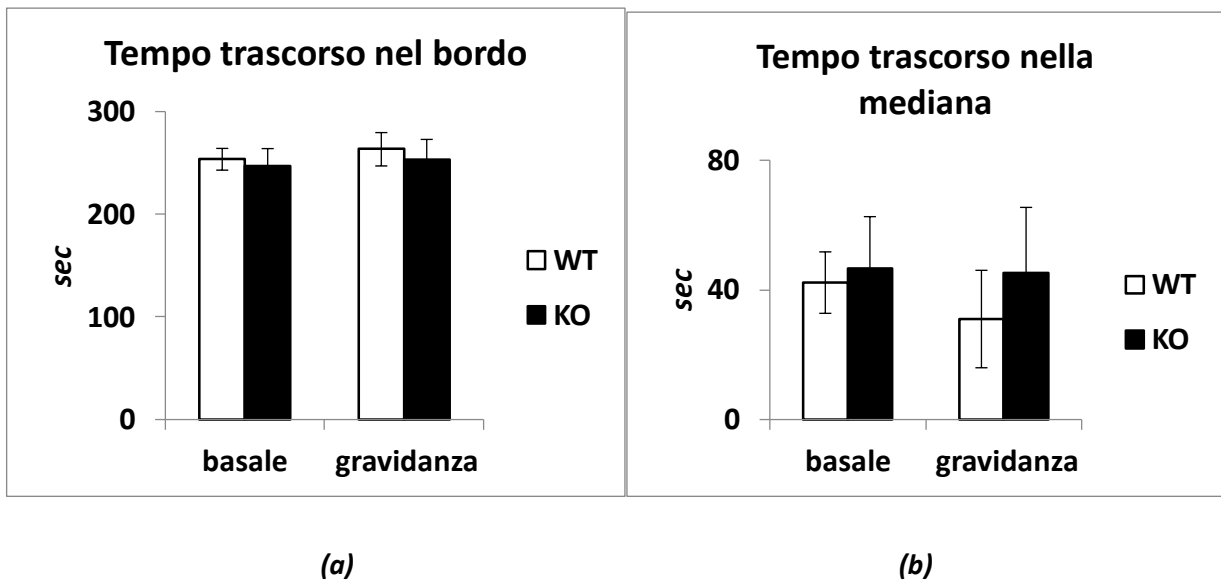


Grafico 63 Tempo trascorso dagli animali sperimentali durante il test dell'Open Field nel periodo basale (pre-accoppiamento) e durante la gravidanza a) nel bordo; b) nella zona mediana. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

L'analisi statistica ha evidenziato che l'attività locomotoria si è ridotta significativamente e indipendentemente dal genotipo durante l'open field effettuato in gravidanza rispetto alle condizioni basali (ripetizione del test:  $F_{(1;6)}=10,38$ ;  $p<0.05$ , grafico 67).

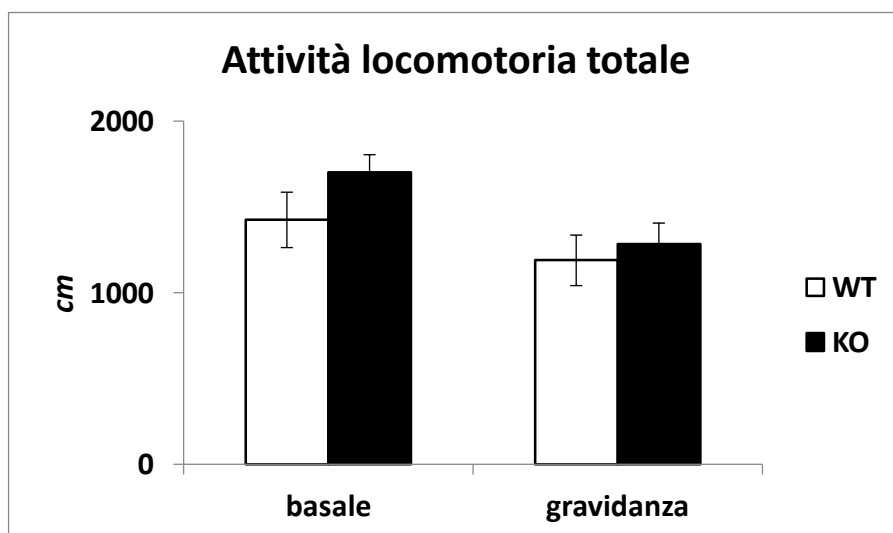
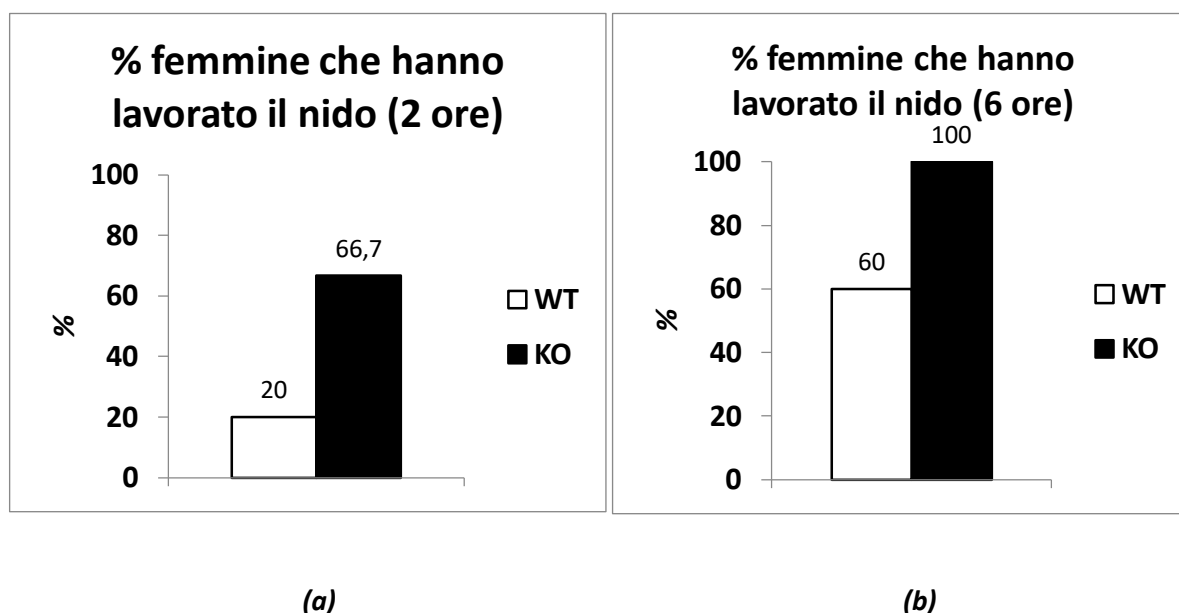


Grafico 64 Distanza totale percorsa dagli animali sperimentali durante il test dell'Open Field nel periodo basale (pre-accoppiamento) e nel periodo della gravidanza. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

## **6.2.4 Valutazione Test del nido**

L'analisi effettuata sulla % di femmine che hanno lavorato il nido ("Nestlet") (Test del chi-quadrato) non ha mostrato nessuna differenza significativa tra i due genotipi nella lavorazione del nido durante gli intervalli di osservazione (3 osservazioni in 6 ore). Nonostante ciò, si può comunque notare che dopo due ore dall'inserimento del Nestlet, il 66,7% delle femmine KO (2/3 femmine) presentava un nido completamente lavorato mentre nelle femmine WT, solo il 20% (1/5 femmine) ha lavorato il nido (Grafico 68a). Tuttavia, all'ultima osservazione (6 ore), la maggior parte delle femmine WT e KO presentava nidi completamente lavorati (60% femmine WT; 100% femmine KO) (Grafico 68b).



*Figura 65 Percentuale di femmine WT e KO che presentano un nido lavorato: a) dopo 2 ore; b) dopo 6 ore.*

## ***Successo riproduttivo***

### **6.2.5 Giorni dall'accoppiamento al parto**

L'analisi statistica effettuata sui giorni trascorsi dall'accoppiamento al parto (ANOVA a una via: genotipo) non ha mostrato differenze significative tra femmine KO e femmine WT, anche a causa del basso numero di campioni (grafico 69).

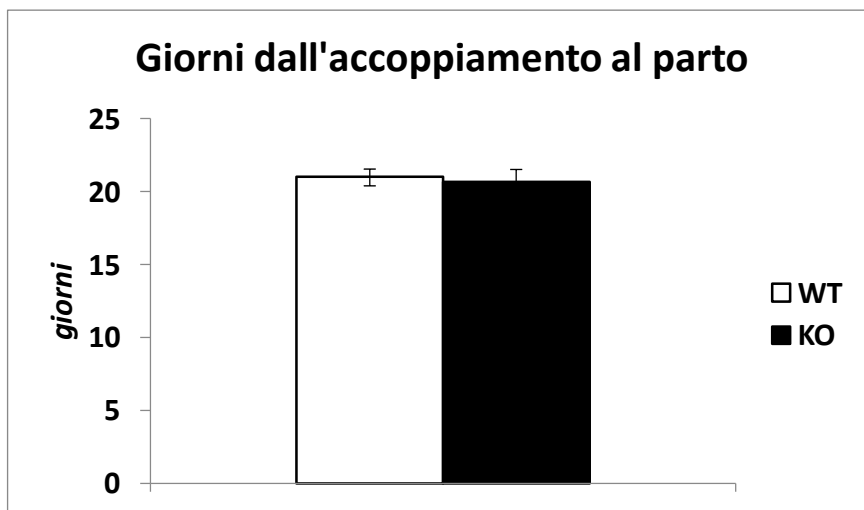


Grafico 66 Giorni trascorsi dal momento dell'accoppiamento al momento del parto in madri WT e KO.

### **6.2.6 Numero e peso dei piccoli alla nascita**

E' stato verificato se il numero di piccoli all'interno delle diverse nidiate di madri WT e KO fosse influenzato dal genotipo delle stesse: l'analisi statistica (ANOVA a una via: genotipo) non ha mostrato nessuna differenza significativa nel numero di piccoli tra madri WT e KO (grafico 70), e nessuna differenza nel numero di maschi e femmine.

Anche l'ANOVA a una via (genotipo) effettuata sul peso medio delle nidiate non ha mostrato differenze significative tra madri KO e WT (grafico 71).

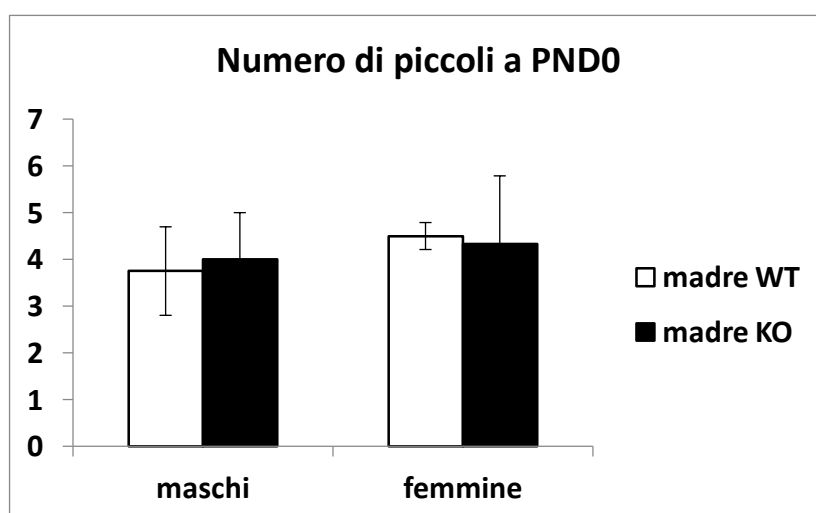


Grafico 67 Numero medio di piccoli delle nidiate di madri WT e madri KO, divisi in maschi e femmine. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

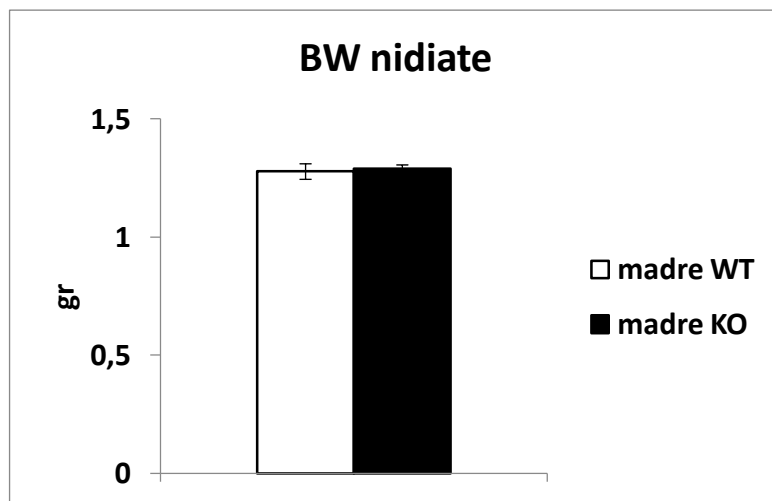


Grafico 68 Peso medio delle nidiate a PND 0 delle madri WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

A questo punto è stata verificata l'eventuale presenza di differenze nel peso dei piccoli tra madri WT e KO in relazione al sesso dei piccoli stessi. L'analisi effettuata tramite un'ANOVA a due vie (genotipo e sesso), non ha mostrato nessuna differenza significativa tra il peso dei maschi e delle femmine in entrambi i genotipi (Grafico 72).

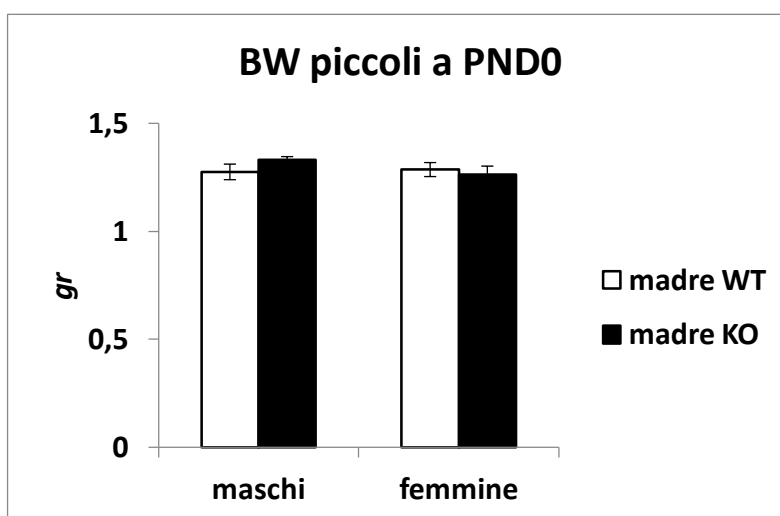


Grafico 69 Peso dei piccoli di sesso maschile e femminile a PND 0 di madri WT e KO. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  errore standard.

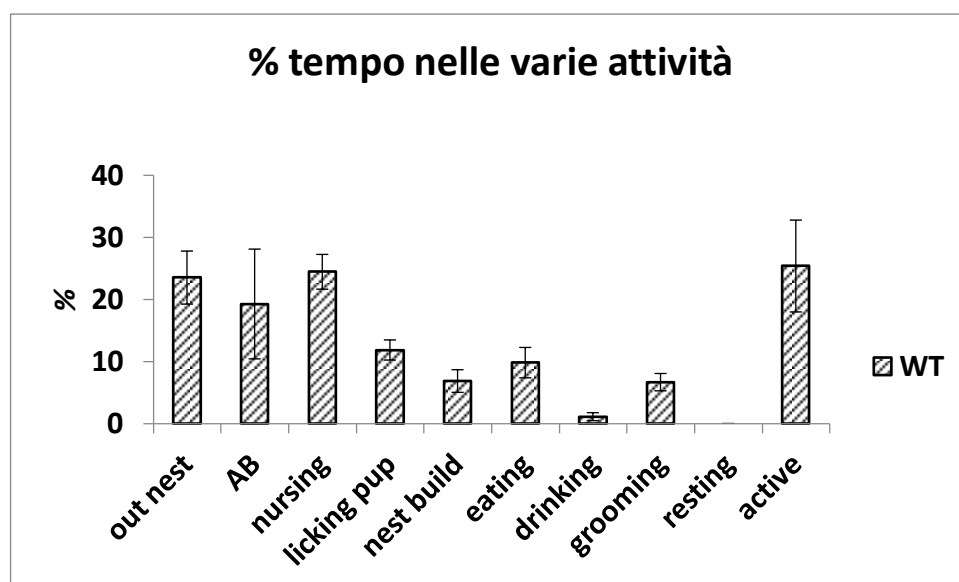
### **6.2.7 Percentuale di sopravvivenza dei piccoli**

A causa del ridotto numero di campioni non è stato possibile condurre un'analisi statistica relativa alla percentuale di sopravvivenza dei piccoli fino a PND 7. Ad ogni modo, nella prole

allevata da madri WT la sopravvivenza ha raggiunto il 75%, mentre dei piccoli allevati da femmine KO nessuno è sopravvissuto fino a PND 7.

### **6.2.8 Analisi del comportamento materno**

Il numero troppo esiguo di campioni e il fatto che i piccoli delle madri KO non siano sopravvissuti fino a PND 6, non ha consentito di svolgere un'analisi statistica sui dati delle osservazioni relative al comportamento materno. È stato possibile analizzare esclusivamente le osservazioni condotte dal PND 1 al PND 6, relative all'interazione tra madri WT e piccoli, ed in particolare la percentuale di tempo che queste madri WT hanno spesi per ciascun comportamento (grafico 73): si osserva che questi topi hanno trascorso molto tempo in comportamenti pup-related, in particolare nursing e nella posizione ad arco.



*Grafico 70 Percentuale di tempo spesa dalle madri WT nei diversi comportamenti materni.*

Analizzando i comportamenti pup-related, che includono la posizione ad arco, l'allattamento, leccare i piccoli e la costruzione del nido, si evince che il comportamento dominante in tutte le osservazioni successive è il nursing (grafico 74, 75), che raggiunge un picco durante il PND6. Le femmine WT nei primi giorni passano molto tempo anche nella posizione ad arco, ma questo comportamento si riduce di molto a partire dal PND4 (grafico 73).



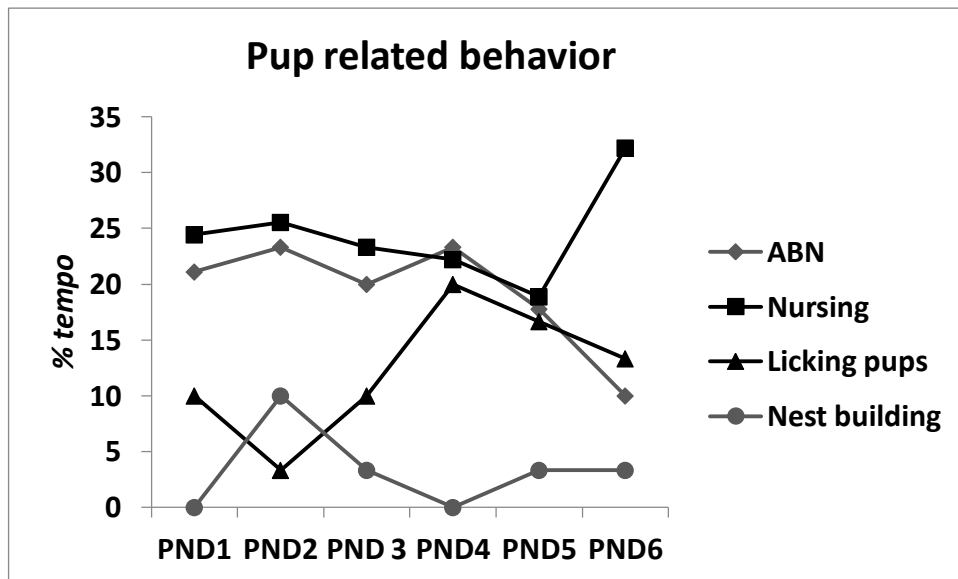


Grafico 71 Percentuale di tempo spesa dalle madri WT nei diversi comportamenti pup-related.

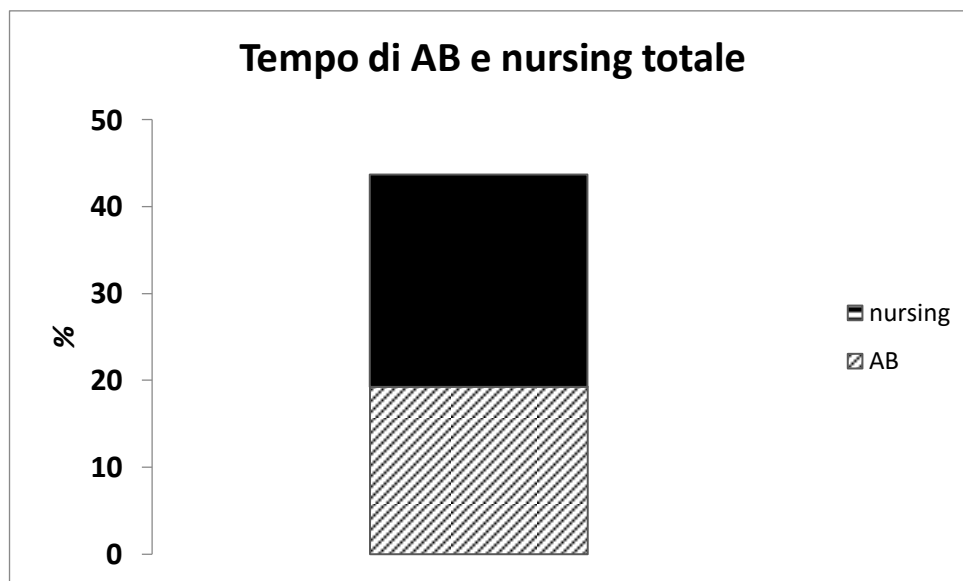


Grafico 72 Percentuale di tempo spesa dalle madri WT nella posizione ad arco e nell'allattamento.

### 6.2.9 Analisi degli USVs

A causa del ridotto numero di campioni non è stato possibile condurre un'analisi statistica relativa all'emissione degli USVs da parte dei piccoli delle madri WT e KO. Ad ogni modo è possibile osservare che per quanta riguarda i piccoli allevati da madri KO, che non sono

sopravvissuti oltre PND 3, l'analisi ha evidenziato assenza di USVs in entrambi i giorni analizzati (PND 1 e PND 3).

Invece, i piccoli allevati da madri WT hanno mostrato assenza di emissione al PND 1 e successivamente un andamento atteso con picco di emissione a PND 3 per i maschi e PND 5 per le femmine. È stato inoltre osservato che a PND 11 la frequenza di emissione di ultrasuoni ha raggiunto valori vicini allo zero per tutti i piccoli, indipendentemente dal genere.

In generale, è emerso che i piccoli di sesso maschile hanno una frequenza di emissione maggiore rispetto alle femmine (grafico 76).

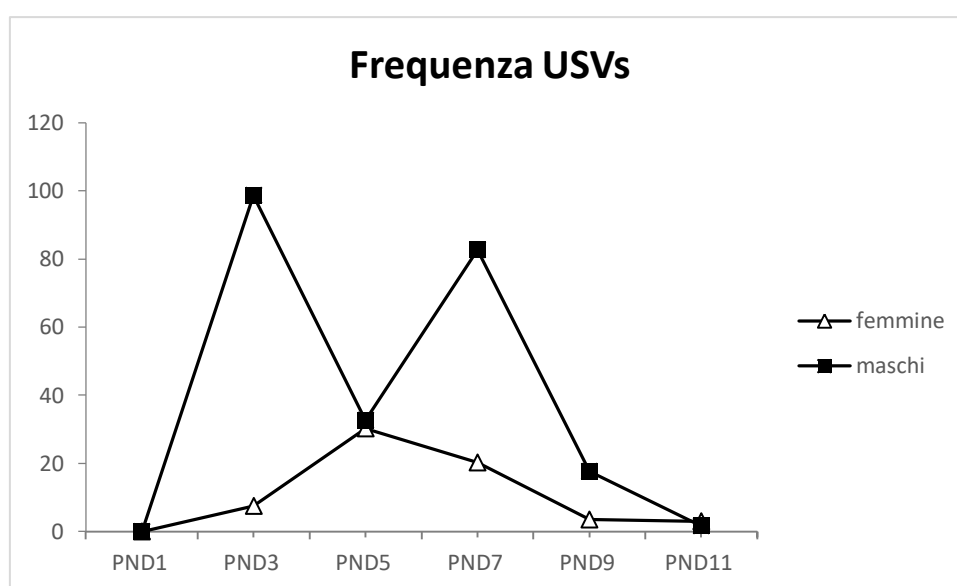


Grafico 73 Frequenza USVs emessi dai piccoli delle madri WT da PND 1 a PND 11, distinti in maschi e femmine.

### **6.3 Discussione**

L'ultima parte del mio lavoro di tesi ha riguardato gli effetti della ridotta espressione del recettore Y1 nell'area limbica del cervello sul comportamento riproduttivo delle femmine; in particolare è stato investigato come la condizione di gravidanza e allattamento potesse influire sul comportamento emozionale e materno delle femmine.

I risultati ottenuti sullo studio del comportamento simil-depressivo (test dell'anedonia) e sulla costruzione del nido nel periodo finale della gravidanza non hanno mostrato nessuna

differenza tra gli animali KO e WT. Al contrario, i risultati ottenuti mediante il test dell'Open Field, hanno mostrato che, al seguito della gravidanza, gli animali di entrambi i genotipi mostrano una ridotta attività esplorativa e locomotoria, cioè percorrono una distanza minore in ciascuna delle tre aree dell'arena. Questa riduzione potrebbe essere dovuta in parte o alla condizione di gravidanza, che ovviamente determina una ridotta mobilità nelle femmine, o alla ripetizione del test, per cui le femmine non sono interessate all'esplorazione dell'ambiente già noto. Inoltre, durante la gravidanza, si è verificata, rispetto al periodo basale, una riduzione del tempo trascorso al centro dell'arena da parte delle madri KO, che quindi risultano essere caratterizzate da maggiori livelli di ansia rispetto alle WT. Questi stessi risultati sono stati ottenuti anche in un esperimento precedente, condotto su femmine adottate da madri del ceppo CD1, considerato uno dei ceppi in grado di fornire un elevato grado di cure materne. Da quanto detto, risulta evidente che la gravidanza in sé comporta un aumento dei livelli di ansia degli animali, soprattutto nelle femmine con genotipo KO, indipendentemente dall'adozione. Pertanto, si può ipotizzare che la condizione di gravidanza possa accentuare l'effetto della delezione del gene Y1R sui livelli d'ansia delle femmine che, sia negli studi precedenti che in condizioni basali, non hanno mostrato alcuna differenza nel comportamento simil-ansioso rispetto alle WT.

Relativamente al successo riproduttivo, i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative tra madri KO e WT, in relazione ai giorni trascorsi dall'accoppiamento al parto, al numero e peso medio di piccoli per nidiata, separati in maschi e femmine. Questi dati differiscono da quanto è stato osservato nello studio del successo riproduttivo di femmine adottate da madri del ceppo CD1, in cui si è riscontrato che i giorni trascorsi dall'accoppiamento al parto sono significativamente inferiori nelle femmine KO rispetto alle WT, suggerendo che il genotipo KO si sottoponga prima al maschio rispetto a quello WT; inoltre, in questo studio era stato rilevato che, nonostante non vi fossero differenze nel numero dei piccoli partoriti (sia maschi che femmine), alla nascita (PND 0), i piccoli delle femmine KO pesavano meno rispetto ai piccoli delle femmine WT.

Successivamente, nel nostro esperimento abbiamo riscontrato che gli effetti della delezione del recettore si riflettono sulla capacità di mantenere in vita almeno un piccolo ad una settimana dal parto (PND 6). I dati ottenuti hanno mostrato che nessuna delle madri KO è stata in grado di mantenere in vita almeno un piccolo fino a PND 6, percentuale che,

confrontata con il 75 % mostrata dalle madri WT, riflette un evidente deficit delle capacità materne del genotipo KO.

Questi risultati suggeriscono che la delezione del gene per NPY1R influenzi la sopravvivenza dei piccoli, inducendo alterazioni nel comportamento della madre o alterazioni tali da impedire una corretta interazione madre-piccolo, come ad esempio una minore risposta agli stimoli materni, o un minor riconoscimento da parte dei piccoli nei confronti della madre. Un'ipotesi è quella per cui una mancata o alterata emissione di ultrasuoni possa influenzare le cure materne e inficiare la sopravvivenza della prole, per cui è stata condotta un'analisi sui piccoli, che ha evidenziato assenza di USVs a PND 1 e PND 11 in tutti gli animali. Inoltre si è osservato che il sesso dei piccoli allevati da madri WT influenza la frequenza di emissione: infatti, i maschi hanno emesso più ultrasuoni durante tutta la durata dell'esperimento, rispetto alle femmine. Sicuramente, per avere una visione più chiara e dettagliata dei meccanismi che intercorrono tra gli USVs e la sopravvivenza dei piccoli allevati da madri KO sono necessari ulteriori studi.

## Capitolo 7

### Discussione Generale

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di contribuire all'analisi degli effetti della delezione di NPY1r nell'area limbica, in particolare sulla regolazione del metabolismo, del comportamento emozionale, sociale e riproduttivo, in relazione al sesso e all'ambiente materno precoce, in un modello murino KO condizionale.

Il neuropeptide Y (NPY) è un neuropeptide implicato in numerose funzioni fisiologiche, quali il metabolismo, il consumo di acqua, l'apprendimento e la memoria, la locomozione, il comportamento sessuale, la regolazione della temperatura corporea, il comportamento emozionale, l'eccitabilità neuronale, l'omeostasi cardiovascolare, la secrezione ormonale e i ritmi circadiani (Baraban et al., 1997; Colmers et al., 1994; Grundemar et al., 1992; Hokfelt et al., 1998; Inui et al., 1999; Munglani et al., 1996; Stanley et al., 1993; Vezzani et al., 1999; Wahlestedt et al., 1993). Inoltre, è dimostrato che NPY svolge un ruolo molto importante in disordini psichiatrici, inclusi depressione, disordini alimentari, ansia ed epilessia (Baraban et al., 1997; Colmers et al., 1994; Hokfelt et al., 1998; Munglani et al., 1996; Wahlestedt et al., 1993).

Recentemente, l'utilizzo di un modello murino KO condizionale per NPY1r nei neuroni eccitatori del cervello ha permesso di comprendere il ruolo del recettore Y1 nella regolazione dell'omeostasi energetica e del comportamento correlato all'ansia (Bertocchi et al., 2011): l'inattivazione condizionale di NPY1r nell'ippocampo ha indotto nei topi maschi una minore crescita corporea e livelli di ansia maggiori. Inoltre, è stato scoperto che le cure materne svolgono un ruolo cruciale nel regolare gli effetti e l'espressione limbica di NPY1r (Bertocchi et al., 2011).

Nell'attività di laboratorio alla base di questa tesi, gli animali sperimentali appena nati sono stati dati in adozione a madri di ceppo BALB/c, considerato uno dei ceppi in grado di fornire un basso grado di cure materne (Calatayud et al., 2004; Carola et al. 2006). Il monitoraggio e la successiva analisi della curva di crescita corporea di tutti gli animali sperimentali, a partire dal giorno dello svezzamento (PND 27) fino all'età adulta (PND 90), non ha evidenziato differenze dovute al genotipo tra topi WT e KO per quanto riguarda il genere,

confermando il risultato ottenuto dagli studi di Bertocchi e colleghi (2011), ovvero che la differenza nell'aumento di peso risulta evidente solo nei topi maschi allevati da madri FVB (ad elevato grado di cure materne), mentre non è visibile negli animali allevati da madri C57 (con minore grado di cure materne).

Successivamente, i test comportamentali, di anedonia, marble, EPM, OPF classico, OPF sociale e resident/ intruder, hanno permesso l'indagine a livello della sfera del comportamento ansioso e sociale. Anche in questo caso i risultati confermerebbero l'ipotesi secondo cui differenze significative nel fenotipo molecolare, fisiologico e comportamentale tra i topi KO e quelli WT siano evidenti solo quando gli animali di entrambi i genotipi sono stati allevati da madri adottive ad alto grado di cure materne (Bertocchi et al., 2011). I dati relativi al comportamento sociale e aggressivo hanno, invece, mostrato una tendenza dei maschi KO ad un numero maggiore di episodi di monta e maggiori livelli di *walking* per cui sarà necessario condurre ulteriori indagini per confermare quanto osservato.

Al fine di verificare gli effetti della delezione dei recettori Y1 per NPY sul metabolismo e sulla risposta comportamentale in risposta ad eventi avversi è stata condotta una procedura di stress psico-sociale cronico (CPS) nei topi maschi. Dai rilievi effettuati, non sono state riscontrate differenze significative tra topi WT e KO né sul comportamento simil-depressivo (test dell'anedonia) né su quello simil-ansioso (test dell'open field). Inoltre, nonostante l'incremento di peso individuale, la differenza di peso corporeo tra KO e WT durante le 4 settimane di CPS è rimasta costante, ma si è rilevato un incremento dell'assunzione di cibo, che può essere interpretato come una "ricerca di conforto" – confort food hypothesis (Dallman et al., 2003). Questa assenza di differenze comportamentali e metaboliche tra topi WT e KO allevati da madri del ceppo BALB/c, a basso grado di cure materne, è stata riscontrata anche in esperimenti precedenti del nostro laboratorio in animali allevati da madri C57, che dimostrano bassi livelli di cura materna. Inoltre lavori precedenti nel nostro laboratorio dimostrano una maggiore vulnerabilità dei maschi KO condizionali allevati da madri FVB o CD1, ad alta cura materna, all'obesità indotta dalla dieta ipercalorica ad alto tenore di grassi e allo stress cronico (Paterlini et al., in preparation). Tuttavia, la ridotta numerosità dei campioni degli studi precedenti, rende necessari ulteriori studi per incrementare la numerosità del campione.

Studi precedenti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che, indipendentemente dal tipo di adozione, l'inattivazione condizionale di NPY1r nelle femmine non influenza né il metabolismo né il comportamento. Per questa ragione, è stata effettuata l'indagine sugli effetti della ridotta espressione del recettore Y1 in area limbica del cervello sul comportamento delle femmine in riproduzione. In particolare è stato studiato se e come le condizioni di accoppiamento, gravidanza e allattamento potessero influire sul comportamento emozionale e materno delle femmine. I risultati ottenuti dal test dell'Open Field indicano che le femmine KO mostravano un livello d'ansia maggiore (meno tempo al centro dell'arena) in gravidanza rispetto al periodo basale non riproduttivo.

Inoltre, nel nostro esperimento abbiamo riscontrato che gli effetti della delezione del recettore (e quindi su una minore espressione delle cure materne) si riflettono sul successo riproduttivo (inteso qui come la capacità di mantenere in vita almeno un piccolo ad una settimana dal parto). I dati ottenuti hanno mostrato che nessuna delle madri KO è stata in grado di mantenere in vita almeno un piccolo fino a PND 6, percentuale che, confrontata con il 75% mostrata dalle madri WT, riflette un evidente deficit delle capacità materne del genotipo KO. Questi risultati suggeriscono che la delezione del gene per NPY1r influenzi la sopravvivenza dei piccoli in maniera indiretta, poichè potrebbe o indurre alterazioni nella fisiologia e/o nel comportamento della madre rispetto ai piccoli (tali da impedire una corretta interazione madre-piccolo), oppure una minore risposta agli stimoli materni, o un minor riconoscimento da parte dei piccoli nei confronti della madre oppure entrambe le cose. Infatti, è noto che nel ratto occorre una complessa sequenza di interazione madre-piccolo per indurre il comportamento materno in due fasi principali, sostenute dalla presenza di ormoni in circolo in seguito al parto: inizialmente la madre lecca i piccoli e solo successivamente li allatta (Hood et al., 2003).

I nostri dati suggeriscono quindi che la possibilità che la minore espressione del recettore NPY1r in area limbica (ippocampo) possa in qualche modo indurre nella madre una riduzione della motivazione materna, della capacità di rispondere adeguatamente agli stimoli dei piccoli o una ridotta produzione di latte dovuta ad alterazioni del metabolismo; in alternativa potrebbe essere ipotizzata una minore capacità dei piccoli di stimolare le madri. Non siamo in grado di comprendere, per il momento, quale sia la causa del ridotto successo riproduttivo delle femmine KO condizionali. Ulteriori ricerche sono necessarie per comprendere quale

meccanismi siano implicati in questo fenomeno. Tuttavia questi dati dimostrano che il sistema NPY1R limbico e' coinvolto anche nella modulazione del comportamento riproduttivo e materno.

Il sistema NPY1R limbico potrebbe essere quindi coinvolto nei disordini post-partum anche nella donna. E' ormai riconosciuto anche nella specie umana che la minore espressione di emotività e cura verso i piccoli, e quindi una ridotta espressione dell'interazione madre-bambino, è correlata ad alterazioni tipiche più o meno gravi del periodo immediatamente successivo alla nascita dei piccoli, ad esempio: maternity blues, depressione post-partum o psicosi post partum (Beck, 1995; Grace et al., 2003). Dal momento che il sistema NPY gioca un ruolo importante nel contrastare le conseguenze comportamentali dovute a stress (Heilig, 2004), si potrebbe ipotizzare che la carenza della stimolazione di NPY mediata dai recettori Y1 limbici nelle madri KO risulti in un ridotto adattamento di queste allo stress emotivo e metabolico costituito dalla gravidanza. Ciò non avviene nelle femmine WT poiché l'espressione di NPY1R non è in queste compromessa.

Inoltre, poiché l'interazione tra madre e prole potrebbe essere innescata dall'emissione di ultrasuoni, è stata condotta una prima analisi sugli USVs emessi dai piccoli, che però richiede ulteriori studi, sia perché questa indagine è ancora in fase di studio, e anche perché è stato possibile registrare solamente la prole delle madri WT a causa della mancata sopravvivenza della prole delle femmine KO.

## **7.1 Conclusioni**

In conclusione, i risultati di questo studio pilota confermano quanto emerso dallo studio di Bertocchi et al. (2011), secondo cui l'ambiente materno precoce può influenzare l'espressione del gene *Npy1r*, probabilmente attraverso meccanismi epigenetici, e dimostrano che gli effetti dell'implicazione di NPY1R in area limbica nella regolazione del metabolismo e del comportamento sono dipendenti da sesso e cure materne. In particolare, la delezione del gene in area limbica induce effetti solo nei maschi e solo quando questi vengono allevati da madri con alto grado di cure materne. Infatti, negli animali sperimentali, utilizzati in questo



studio, adottati da madri BALB/c a basso grado di cure materne non sono state evidenziate differenze nella crescita corporea, né nel comportamento ansioso.

Dal momento che gli effetti dell'inattivazione genica potrebbero divenire evidenti solo in determinate situazioni o *challenge*, abbiamo sottoposto gli animali ad una procedura di stress psicosociale cronico. Lo studio ha dimostrato che lo stress psico-sociale cronico non induce gli effetti causati dalla delezione del gene e non si riscontrano differenze significative tra topi maschi WT e KO.

Infine, i risultati ottenuti con questo lavoro pongono le basi per ipotizzare che il sistema NPY/Y1r, forse agendo sull'omeostasi energetica, possa essere coinvolto nei processi che modulano la riproduzione nelle femmine del modello animale utilizzato. Infatti, situazioni che sottopongono le femmine a condizioni di stress (come ad esempio la gravidanza) potrebbero accentuare gli effetti causati da deficit a carico del network NPY/Y1R. Tutto ciò potrebbe spiegare la causa della morte prematura dei piccoli. In ogni caso, resta ancora da chiarire se il motivo della minore efficienza nell'ambito della riproduzione mostrata dalle madri KO sia dovuta ad una minore risposta agli stimoli da parte dei piccoli. Sono in corso ulteriori studi volti all'approfondimento delle interazioni madre-piccolo mediante la registrazione delle vocalizzazioni ultrasoniche (USV) emesse dal piccolo nei confronti della madre. Una delle direzioni da seguire è quindi quella di approfondire questo aspetto caratterizzando il pattern di emissione di USV dei piccoli nati da madri KO e WT. Inoltre, al fine di poter escludere eventuali alterazioni genetiche nella prole di madri KO e WT, il proposito è quello di studiare anche la funzione riproduttiva nei maschi del modello animale.

Le prospettive future di questo lavoro riguardano l'ampliamento delle ricerche verso studi che comprendano l'utilizzo di ceppi con diverso grado di cure materne come madri adottive per gli animali sperimentali (FVB/J e CD1 – alto grado di cure materne; C57BL/6J– basso grado di cure materne, con particolare attenzione per i BALB/c), allo scopo di valutare come tale variabile possa influire sul fenotipo del modello animale in età adulta e per confermare o smentire quanto finora scoperto.

## **Bibliografia**

- **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". *Science* 221(4613): 877-879.
- **Allin J.T., Banks E.M.** (1971) "Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats". *Dev. Psychobiol.* 4: 149– 56.
- **Asakawa A, Inui A, Ueno N, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M.** (1999). "Mouse pancreatic polypeptide modulates food intake, while not influencing anxiety in mice". *Peptides* 20: 1445-1448.
- **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". *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". *J. Neurosci.* 17: 8927–8936.
- **Bard J. A., Walker M. W., Branchek T. A., Weinshank R. L.** (1995). "Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY". *Biol. Chem.* 270: 26762-26765.
- **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". *Physiol. Behav.* 73(3): 401-410.
- **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". *Psychoneuroendocrinology* 29(7): 899-910.
- **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". *Dis. Model Mech.* 3(7-8): 459-470.
- **Bartolomucci A., Palanza P., Sacerdote P., Panerai A. E., Sgoifo A., Dantzer R., Parmigiani S.** (2005). "Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure". *Neurosci. Biobehav. Rev* 29(1): 67-81.
- **Bartolomucci A.** (2007). "Social stress, immune functions and disease in rodents". *Front Neuroendocrinol.* 28(1): 28-49.
- **Bartolomucci A.** (2005). "Resource loss and stress-related disease: is there a link?". *Med. Sci. Monit.* 11(5): 147-154.
- **Batterham R. L., Cowley M. A., Small C. J., Herzog H., Cohen M. A., Dakin C. L, Wren A. M., Brynes A. E., Low M. J., Ghatei M.A., Cone R. D., Bloom S. R.** (2002). "Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake". *Nature* 418: 650-654.
- **Batterham R. L., Cohen M. A., Ellis S. M., Le Roux C. W., Withers D. J., Frost G. S., Ghatei M. A., Bloom S. R.** (2003). "Inhibition of food intake in obese subject by peptide YY3-36". *N. Engl. J. Med.* 349: 941-948.

- **Beck, C. T.** (1995). The effects of postpartum depression on maternal-infant interaction: a meta-analysis. *Nursing research*, 44(5), 298-305;
- **Bell R.W., Nitschke W., Zachman T.A.** (1972). "Ultra-sounds in three inbred strains of young mice". *Behav. Biol.* 7: 805–14.
- **Berglund M. M., Schiber D. A., Esterman M. A., Gehlert D. R.** (2003). "Neuropeptide Y Y4 receptor homodimers dissociate upon agonist stimulation". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 1120-1126.
- **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". *PNAS* 48: 19395-19400.
- **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". *Endocrinology* 135(4): 1621-1627.
- **Bhatnagar, S., Meaney, M.J.** (1995). "Hypothalamic–pituitary–adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats." *J. Neuroendocrinol.* 7, 97–108.
- **Billington C. J., Briggs J. E., Grace M., Levine A. S.,** (1991). "Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism". *Am. J. Physiol.* 260: R321-R327.
- **Branchi I., Santucci D., Vitale A., Alleva E.** (1998) "Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions". *Dev. Psychobiol.* 33: 249–56
- **Branchi I., Santucci D., Alleva E.,** (2001). "Ultrasonic vocalization emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development". *Behavioural brain research* 125: 49-56.
- **Bremner, J.D., Randall, P., Vermetten, E., Staib, L., Bronen, R.A., Mazure, C., Capelli, S., McCarthy, G., Innis, R.B., Charney, D.S.** (1997). "Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report". *Biol. Psychiatry* 41, 23–32.
- **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". *Peptides* 21: 37-44.
- **Brodsky, B.S., Oquendo, M., Ellis, S.P., Haas, G.L., Malone, K.M., Mann, J.J.** (2001). "The relationship of childhood abuse to impulsivity and suicidal behavior in adults with major depression". *Am. J. Psychiatry* 158, 1871–1877.
- **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". *Behav. Pharmacol.* 6(3): 215-222.
- **Calatayud F1, Coubard S, Belzung C** (2004). Emotional reactivity in mice may not be inherited but influenced by parents. *Physiol Behav.* 80(4):465-74.

- **Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J.** (1998). “Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 5335–5340.
- **Caldji, C., Diorio, J., Meaney, M.J.** (2000a). “Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity”. *Biol. Psychiatry* 48, 1164–1174.
- **Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J.** (2000b). “The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat”. *Neuropsychopharmacology* 22, 219–229.
- **Campbell R. E., Smith M. S., Allen S. E., Grayson B. E., Ffrench-Mullen J. M., Grove K. L.** (2003). “Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor”. *J. Neurosci.* 23: 1487-1497.
- **Campfield L. A., Smith F. J., Guisez Y., Devos R., Burn P.** (1995). “Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks”. *Science* 269: 546-549.
- **Carvajal C., Dumont Y., Quiron R.** (2006). “Neuropeptide Y: role in emotion and alcohol dependence”. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5: 181-195.
- **Caspi A. and Moffitt T.E.** (2006). “Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience”. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 583–590.
- **Charney D. S.** (2004). “Psychobiological mechanism of resilience and vulnerability: implication for successful adaptation to extreme stress”. *Am. J. Psychiatry* 161: 195-216.
- **Chau C.M.Y., Ranger M., Sulistyoningrum D., Devlin A.M., Oberlander T.F., Grunau R.E.** (2014): “Neonatal pain and COMT Val158Met genotype in relation to serotonin transporter (SLC6A4) promoter methylation in very preterm children at school age”. *Front. Behav. Neurosci.*, 8:12.
- **Choleris E., Thomas A. W., Kavaliers M., Prato F. S.** (2001). “A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field”. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25: 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 neuro peptide-Y- containing neurons in rat brain”. *Neuroscience* 15: 1159-1181.
- **Cirulli, F., Berry, A., Alleva, E.** (2003). “Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology”. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 73–82.
- **Clark J. T., Kalra P. S., Crowley W. R., Kalra S. P.** (1984). “Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats”. *Endocrinology* 115: 427-429.
- **Colmers W.F., Bleakman D.** (1994). “Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons”. *Trends Neurosci.* 17: 373–379.

- **Crawley J. N.** (1985). "Exploratory behavior models of anxiety in mice". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9 (1): 37-44.
- **Crowley W. R., Kalra S. P.** (1987a). "Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones". *Neuroendocrinology* 46: 97-103.
- **Crowley W. R., Hassid A., Kalra S. P.** (1987b). "Neuropeptide Y enhances the release of luteinizing hormone (LH) induced by LH-releasing hormone". *Endocrinology* 120: 941-945.
- **Darby K., Eyre H. J., Lapsys N., Copeland N. J., Gilbert D. J., Couzens M.** (1997). Assignment of the Y4 receptor gene (PPYR1) to human chromosome 10q11.2 and mouse chromosome 1.4". *Genomics.* 46: 513-515.
- **Davis M.** (1998). "Are different parts of the extended amygdale involved in fear versus anxiety?". *Biol. Psychiatry* 44: 1239-1247.
- **Deacon R. M.** (2006a). "Assessing nest building in mice". *Nat. Protoc.* 1 (3): 1117-1119.
- **Deacon R.M.** (2006b). "Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts". *Nat. Protoc.* 1 (1): 122-4.
- **Dean K., Murray R.M.** (2005). "Environmental risk factors for psychosis". *Dialogues Clin Neurosci.* 7(1): 69-80.
- **De Bellis, M.D., Keshavan, M.S., Spencer, S., Hall, J.** (2000). "Nacetylaspartate concentration in the anterior cingulate of maltreated children and adolescents with PTSD". *Am. J. Psychiatry* 157, 1175–1177.
- **De Kloet E.R., Joëls M., Holsboer F.** (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease". *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463–475.
- **De Quidt M. E., Emson, P. C.** (1986). "Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system-II. Immunohistochemical analysis". *Neuroscience* 18(3): 545-618.
- **de Wilde, E.J., Kienhorst, I.C., Diekstra, R.F., Wolters, W.H.** (1992). "The relationship between adolescent suicidal behavior and life events in childhood and adolescence". *Am. J. Psychiatry* 149, 45–51.
- **Denenberg, V.H., Ottinger, D.R., Stephens, M.W.** (1962). "Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat". *Child Dev.* 33, 65–71.
- **Denenberg, V.H., Rosenberg, K.M., Paschke, R., Zarrow, M.X.** (1969). "Mice reared with rat aunts: effects on plasma corticosterone and open field activity". *Nature* 221, 73–74.
- **Dinger M. C., Bader J. E., Kobor A. D., Kretzschmar A. K., Beck-Sickingher A. G.** (2003). "Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells". *J. Biol. Chem.* 278: 10562-10571.
- **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". *Brain Res.* 646: 341-344.
- **Dube, S.R., Anda, R.F., Felitti, V.J., Chapman, D.P., Williamson, D.F., Giles, W.H.** (2001). "Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout

the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study". *JAMA* 286, 3089–3096.

- **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". *Prog. Neurobiol.* 38(2): 125-167.
- **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". *J. Comp. Neurol.* 402(3): 372-384.
- **Ehret G., Bernecker C.** (1992) "Categorical perception of mouse-pup ultrasounds in the temporal domain". *Anim. Behav.* 43: 409– 16.
- **Ehret G., Haack B.** (1984) "Motivation and arousal influence sound-induced maternal pup-retrieving behavior in lactating house mice". *Z. Tierpsychol.* 65: 25–39.
- **Elwood R.W., Keeling F.** (1982) "Temporal organization of ultrasonic vocalizations in infant mice". *Dev. Psychobiol.* 15: 221–7.
- **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". *FEBS Lett.* 271(1-2): 81-84.
- **Eva C., Serra M., Mele P., Panzica G., Oberto A.** (2006). "Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor". *Front Neuroendocrinol.* 27(3): 308-339.
- **Fleming, A.S., O'Day, D.H., Kraemer, G.W.** (1999). "Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 673–685.
- **Fleming, A.S., Kraemer, G.W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., Melo, A.** (2002). "Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 61–75.
- **Francis, D.D., Meaney, M.J.** (1999). "Maternal care and the development of stress responses". *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 128–134.
- **Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M.J.** (1999). "Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat". *Science* 286, 1155–1158.
- **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". *Peptides* 14: 941-948.
- **Friedman, S., Smith, L., Fogel, D., Paradis, C., Viswanathan, R., Ackerman, R., Trappler, B.** (2002). "The incidence and influence of early traumatic life events in patients with panic disorder: a comparison with other psychiatric outpatients". *J. Anxiety Disord.* 16, 259–272.
- **Furth P. A., St. Onge L., Boger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H., Hennighausen L.** (1994). "Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter". *Biochem.* 91: 9302-9306.

- **Gao J., Ghibaudi L., Hwa J. J.** (2004). "Selective activation of central NPY Y1 vs. Y5 receptor elicits hyperinsulinemia via distinct mechanisms". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287(4): 706-711.
- **Gerald C., Walker M. W., Criscoine L., Gustafson E. L., Batzl-Hartmann C., Smith K. E., Vaysse P., Durkin M. M., Laz T. M. Linemeyer D. L., Schaffhauser A. O., Whitebread S., Hofbauer K. G., Taber R. I., Branchek T. A., Weinshank R. L.** (1996). "A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake". *Nature* 382: 168-171.
- **Gladstone, G., Parker, G., Wilhelm, K., Mitchell, P., Austin, M.P.** (1999). "Characteristics of depressed patients who report childhood sexual abuse". *Am. J. Psychiatry* 156, 431–437.
- **Gladstone, G.L., Parker, G.B., Mitchell, P.B., Malhi, G.S., Wilhelm, K. Austin, M.P.** (2004). Implications of childhood trauma for depressed women: an analysis of pathways from childhood sexual abuse to deliberate self-harm and revictimization. *Am. J. Psychiatry* 161, 1417–1425.
- **Gossen M. and Bujard H.** (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5547-5551.
- **Gottesman II, Erlenmeyer-Kimling L** (2001). Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr Res.* 51(1):93-102.
- **Grace, S. L., Evindar, A., & Stewart, D. E.** (2003). The effect of postpartum depression on child cognitive development and behavior: a review and critical analysis of the literature. *Archives of women's mental health*, 6(4), 263-274;
- **Grundemar L., Jonas S. E., Morner N., Hogestatt E. D., Wahlestedt C., Hakanson R.** (1992). "Characterization of vascular neuropeptide Y receptors". *Br. J. Pharmacol.* 105: 45-50.
- **Halaas J. L., Gajiwala K. S., Maffei M., Cohen S. L., Chait B. T., Rabinowitz D., Lannone R. L., Burley S. K., Friedman J. M.** (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene". *Science* 269: 543-546.
- **Hastings J. A., Clure-Sharp J. M., Morris M. J.** (2001). "NPY Y1 receptors exert opposite effects on corticotrophin releasing factor and noradrenaline overflow from the rat hypothalamus in vitro". *Brain Res.* 890: 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". *Regul. Pept.* 59(2): 201-205.
- **Heilig M.** (2004). "The NPY system in stress, anxiety and depression". *Neuropeptides* 38: 213-224.
- **Heim, C., Nemeroff, C.B.** (2001). "The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies". *Biol. Psychiatry* 49, 1023–1039.
- **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". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(13): 5794-5798.

- **Hoess R. H., Ziese M., Sternberg N.** (1982). "P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining site". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (11): 3398-3402.
- **Hofer, M.A.** (1994). "Early relationships as regulators of infant physiology and behavior". *Acta Paediatr. Suppl.* 397, 9–18.
- **Hokfelt T., Broberger C., Zhang X., Diez M., Kopp J., Xu Z., Landry M., Bao L., Schalling M., Koistinaho J., DeArmond S. J., Prusiner S., Gong J., Walsh J. H.** (1998). "Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system". *Brain Res. Rev.* 26: 154-166.
- **Holmes, A., le Guisquet, A.M., Vogel, E., Millstein, R.A., Leman, S., Belzung, C.** (2005). "Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents". *Neuroscience and Biobehavioural Rev.* 29, 1335–1346.
- **Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Meaney, M.J., Plotsky, P.M.** (2001). "Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment". *Psychopharmacology (Berl.)* 158, 366–373.
- **Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., McNamara, R.K.** (2002). "Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats". *Brain Res.* 950, 52–63.
- **Huot, R.L., Gonzalez, M.E., Ladd, C.O., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P. M.** (2004). Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 29, 279–289.
- **Inui A.** (1999). "Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved?". *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 43-46.
- **Jain M. R., Pu S., Kalra P. S., Kalra S. P.** (1999). "Evidence that stimulation of two modalities of pituitary luteinizing hormone release in ovarian steroid-primed ovariectomized rats may involve neuropeptide Y Y1 and Y4 receptor". *Endocrinology* 140: 5171-5177.
- **Johnson, J.G., Cohen, P., Gould, M.S., Kasen, S., Brown, J., Brook, J.S.** (2002). "Childhood adversities, interpersonal difficulties, and risk for suicide attempts during late adolescence and early adulthood". *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 741–749.
- **Kalin N. H., Sherman J., Takahashi L.** (1988). "Antagonism of endogenous CRH system attenuates stress-induced freezing behavior in rats". *Brain Res.* 457: 130-135.
- **Kalra S. P., Dube M. G., Sahu A., Phelps C. P., Kalra P. S.** (1991). "Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10931-10935.
- **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". *Endocrinology* 130(6): 3323-3330.
- **Kalra S. P., Crowley W. R.** (1984). "Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat". *Life Sci.* 35: 1173-1176.



- **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". *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-de\_cient, and Y5 receptor-de\_cient mice". *Endocrinology* 141(3): 1011-1016.
- **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". *Mol. Pharmacol.* 59: 501-505.
- **Kantake, M., Yoshitake, H., Ishikawa, H., Araki, Y., Shimizu, T.** (2014). "Postnatal epigenetic modification of glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a prospective cohort study". *BMJ Open*, 4:7.
- **Karl T., Lin S., Schwarzer C., Sainsbury A., Couzens M., Wittmann W., Boey D., von Horsten S., Herzog H.** (2004). "Y1 receptors regulate aggressive behavior by modulating serotonin pathways". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12742-7.
- **Kask A., Rago L., Harro J.** (1998). "Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226". *BR. J. Pharmacol.* 124: 1507-1515.
- **Kask A., Nguyen H. P., Pabst R., von Hoersten S.** (2001). "Neuropeptide Y Y1 receptor-mediated anxiolysis in the dorsocaudal lateral septum: functional antagonism of corticotropi-releasing hormone-induced anxiety". *Neuroscience* 104: 799-806
- **Katsuura G., Asakawa A., Inui A.** (2002). "Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake". *Peptides* 23 (2): 323-9.
- **Kendler, K.S., Kessler, R.C., Walters, E.E., MacLean, C., Neale, M.C., Heath, A.C., Eaves, L.J.** (1995). "Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women". *Am. J. Psychiatry* 152, 833–842.
- **Koller A.** (1952). "Effect of ACTH on the rat vaginal cycle". *Arch. Gynakol.* 182 (2-3): 277-280.
- **Krause J., Eva, C., Seeburg P. H., Sprengel R.** (1992). "Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor". *Mol. Pharmacol.* 41(5): 817-821.
- **Ladd, C.O., Huot, R.L., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Meaney, M. J., Plotsky, P.M.** (2000). "Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience". *Prog. Brain Res.* 122, 81–103.
- **Larhammar D., Wraith A., Berglund M. M., Holmberg S. K. S., Lundell I.** (2001). "Origins of the multiple NPY-family receptors in mammals". *Peptides* 22: 295-307.
- **Larhammar D., Salaneck E.** (2004). "Molecular evolution of NPY receptor subtypes". *Neuropeptides* 38: 11-151.

- **Larhammar D., Fredriksson R., Larson E. T., Salaneck E.** (2004). "Phylogeny of NPY-family peptides and their receptors". Michel M. C. (Ed.). *Neuropeptide Y and Related Peptides*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg pp. 75-100.
- **Larhammar D., Blomqvist A. G., Yee F., Jazin E., Yoo H., Wahlested C.** (1992). "Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type". *J. Biol. Chem.* 267: 10935-10938.
- **Lehmann, J., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Stohr, T., Pothuizen, H.H., Feldon, J.** (2002a). "Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats". *Neurobiol. Aging* 23, 457–466.
- **Lehmann, J., Russig, H., Feldon, J., Pryce, C.R.** (2002b). "Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 141–145.
- **Lesch K.P.** (2004). "Gene-environment interaction and the genetics of depression". *J Psychiatry Neurosci.* 29: 174–184.
- **Leupen S. M., Besecke L. M., Levine J. E.** (1997). "Neuropeptide Y Y1-receptor stimulation is required for physiological amplification of preovulatory luteinizing hormone surges". *Endocrinology* 138: 2735-2739.
- **Levine, S.** (1957). "Infantile experience and resistance to physiological stress". *Science* 126, 405.
- **Levine, S.** (1967). "Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats". *Science* 156, 258–260.
- **Levine, S.** (1994). "The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors". *Ann. NY Acad. Sci.* 746, 275–288.
- **Levine A. S., Morley J. E.** (1984). "Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats". *Peptides* 5: 1025-1029.
- **Lewis D. E., Shellard L., Koeslag D. G., Boer D. E., McCarthy H. D., McKibbin P. E., Russel J. C., Williams G.** (1993). "Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats". *Am. J. Physiol.* 264: E279-E284.
- **Liang K. C., Melia K., Miserendino M., Falls W., Campeau S., Davis M.** (1992). "Corticotrophin-releasing factor: long lasting facilitation of the acoustic startle reflex". *J. Neurosci.* 12: 2303-2312.
- **Lijam N., Paylor R., McDonald M. P., Crawley J. N., Deng C. X., Herrup K., Stevens K. E., Maccaferri G., McBain C. J., Sussman D. J., Wynshaw-Boris A.** (1997). "Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1". *Cell.* 90 (5): 895-905.
- **Lin S., Boey D., Herzog H.** (2004). "NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models". *Neuropeptides* 38(4): 189-200.
- **Lisk R. D., Pretlow R. A. 3rd, Friedman S. M.** (1969). "Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*)". *Anim. Behav.* 17 (4): 730-737.
- **Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J.** (1997). "Maternal care, hippocampal

glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary– adrenal responses to stress”. *Science* 277, 1659–1662.

- **Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J.** (2000a). “Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus”. *J. Neuroendocrinol.* 12, 5–12.
- **Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., Meaney, M.J.** (2000b). “Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats”. *Nat. Neurosci.* 3, 799–806.
- **Lopez-Valpuesta F. J., Nyce J. W., Griffin-Biggs T. A., Ice J. C., Myers R. D.** (1996). “Antisense to NPY-1R demonstrate that Y1 receptor in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats”. *Proc. Biol. Sci.* 263: 881-886.
- **Lundell I., Blomqvist A. G., Berglund M. M., Schober D. A., Johnson D., Statnick M. A., Ganski 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”. *J. Biol. Chem.* 270(49): 29123-29128.
- **Mannon P. J., Mele J. M.** (2000). “Peptide YY Y1 receptor activates mitogen-activated protein kinase and proliferation in gut epithelial cells via the epidermal growth factor receptor”. *Biochem. J.* 350 (Pt 3): 655-661.
- **Marsh D.J., Hollopeter G., Kafer K.E., Palmiter R.D.** (1998). “Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity”. *Nat. Med.* 4: 718-721.
- **Mathew, S.J., Mao, X., Coplan, J.D., Smith, E.L., Sackeim, H.A., Gorman, J.M., Shungu, D.C.** (2004). “Dorsolateral prefrontal cortical pathology in generalized anxiety disorder: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study”. *Am. J. Psychiatry* 161, 1119–1121.
- **Matthews, K., Hall, F.S., Wilkinson, L.S., Robbins, T.W.** (1996a). “Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in adult rats following repeated early maternal separation: effects of prefeeding, D-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine”. *Psychopharmacology (Berl.)* 126, 75–84.
- **Matthews, K., Wilkinson, L.S., Robbins, T.W.** (1996b). “Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood”. *Physiol. Behav.* 59, 99–107.
- **Matthews, K., Robbins, T.W., Everitt, B.J., Caine, S.B.** (1999). “Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine selfadministration in adult rats”. *Psychopharmacology (Berl.)* 141, 123–134.
- **Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H., Robbins, T.W.** (2001). “Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain”. *Synapse* 40, 1–10.
- **Matza, L.S., Revicki, D.A., Davidson, J.R., Stewart, J.W.** (2003). “Depression with atypical features in the National Comorbidity Survey: classification, description, and consequences”. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 817–826.
- **McEwen B.S.** (2007). “Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain”. *Physiol Rev.* 87: 873–904

- **McHolm, A.E., MacMillan, H.L., Jamieson, E.** (2003). "The relationship between childhood physical abuse and suicidality among depressed women: results from a community sample". *Am. J. Psychiatry* 160, 933–938.
- **McIntosh, J., Anisman, H., Merali, Z.** (1999). "Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects". *Brain Res. Dev. Brain Res.* 113, 97–106.
- **Meaney, M.J.** (2001). "Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations". *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1161–1192.
- **Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bodnoff, S.R., Iny, L.J., Tatarewicz, J.E., Sapolsky, R.M.** (1985). "Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions". *Behav. Neurosci.* 99, 765–770.
- **Meaney, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S., Sarrieau, A.** (1989). "Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat". *Neuroendocrinology* 50, 597–604.
- **Meaney, M.J., Brake, W., Gratton, A.** (2002). "Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse?" *Psychoneuroendocrinology* 27, 127–138.
- **Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., Koolhaas, J.M.** (1999). "The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity". *J. Neuroendocrinol.* 11, 925–933.
- **Menard, J.L., Champagne, D.L., Meaney, M.J.** (2004). "Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test". *Neuroscience* 129, 297–308.
- **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". *Pharmacol. Rev.* 50: 143-150.
- **Montgomery, K. C.** (1955). "The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior". *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48(4): 254-260.
- **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". *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". *Drugs* 52: 371-389.
- **Naveilhan P., Hassani H., Lucas G., Blakeman K. H., Hao J. X., Xu X. J., Wiesenfeld-Hallin Z., Thorén P., Ernfors P.** (2001). "Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor". *Nature* 409(6819): 513-517.
- **Nemeroff, C.B., Heim, C.M., Thase, M.E., Klein, D.N., Rush, A.J., Schatzberg, A.F., Ninan, P.T., McCullough Jr., J.P., Weiss, P.M., Dunner, D.L., Rothbaum, B.O., Kornstein, S., Keitner, G., Keller, M.B.** (2003). "Differential responses to psychotherapy versus

pharmacotherapy in patients with chronic forms of major depression and childhood trauma". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 14293–14296.

- **Newport, D.J., Stowe, Z.N., Nemeroff, C.B.** (2002). "Parental depression: animal models of an adverse life event". *Am. J. Psychiatry* 159, 1265–1283.
- **Nie M., Selbie L. A.** (1998). "Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity". *Regul. Pept.* 75-76: 207-213.
- **Nyby J., Whitney G.** (1978) "Ultrasonic communication of adult myomorph rodents". *Neurosci. Biobehav.* 2: 1–14.
- **O'Donnell, D., Larocque, S., Seckl, J.R., Meaney, M.J.** (1994). "Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats". *Brain Res. Mol. Brain Res.* 26, 242–248.
- **Ogawa, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K.J., Takahashi, K.** (1994). "Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 961–967.
- **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". *Environmental Health Perspectives Supplements* 110(S3): 415-422.
- **Panagiotaropoulos, T., Pondiki, S., Papaioannou, A., Alikaridis, F., Stamatakis, A., Gerozissis, K., Stylianopoulou, F.** (2004). "Neonatal handling and gender modulate brain monoamines and plasma corticosterone levels following repeated stressors in adulthood". *Neuroendocrinology* 80, 181–191.
- **Parker R. M., Herzog H.** (1999). "Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain". *Eur. J. Neurosci.* 11: 1431-1448.
- **Parmigiani S., Palanza P., Rogers J., Ferrari P. F.** (1999). "Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23(7): 957-969.
- **Patchev, V.K., Montkowski, A., Rouskova, D., Koranyi, L., Holsboer, F., Almeida, O.F.** (1997). "Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events". *J. Clin. Invest.* 99, 962–966.
- **Pihoker, C., Owens, M.J., Kuhn, C.M., Schanberg, S.M., Nemeroff, C.B.** (1993). "Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor". *Psychoneuroendocrinology* 18, 485–493.
- **Ploj, K., Nylander, I.** (2003). "Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats". *Neurosci. Lett.* 345, 195–197.
- **Ploj, K., Roman, E., Nylander, I.** (2003a). "Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats". *Neuroscience* 121, 787–799.

- **Ploj, K., Roman, E., Nylander, I.** (2003b). "Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats". *Neuropeptides* 37, 149–156.
- **Plotsky, P.M., Meaney, M.J.** (1993). "Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats". *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18, 195–200.
- **Pronchuk N., Beck-Sickinger A.G, Colmers W.F.** (2002). "Multiple NPY receptors inhibit GABA (A) synaptic responses of rat medial parvocellular effector neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus". *Endocrinology* 143: 535-543.
- **Provenzi, L., Fumagalli, M., Sirgiovanni, I., Giorda, R., Pozzoli, U., Morandi, U., Beri, S., Menozzi, G., Mosca, F., Borgatti, R., Montirosso, R.** (2015). "Pain-related stress during the Neonatal Intensive Care Unit stay and SLC6A4 methylation in very preterm infants". *Front. Behav. Neurosci.* 2015, 9:99.
- **Pryce, C.R., Bettschen, D., Bahr, N.I., Feldon, J.** (2001a). "Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat". *Behav. Neurosci.* 115, 71–83.
- **Pryce, C.R., Bettschen, D., Feldon, J.** (2001b). "Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat". *Dev. Psychobiol.* 38, 239–251.
- **Risch N., Herrell R., Lehner T., Liang K.Y., Eaves L., Hoh J., Griem A., Kovacs M., Ott J., Merikangas K.R.** (2009). "Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a metaanalysis". *JAMA* 301: 2462–2471.
- **Rogan M. T., LeDoux J. E.** (1996). "Emotion: systems, cells, synaptic plasticity". *Cell* 85: 469-475.
- **Roman, E., Ploj, K., Nylander, I.** (2004). "Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats". *Alcohol* 33, 31–39.
- **Romans, S.E., Martin, J.L., Anderson, J.C., O’Shea, M.L., Mullen, P.E.** (1995). "Factors that mediate between child sexual abuse and adult psychological outcome". *Psychol. Med.* 25, 127–142.
- **Roman, E., Ploj, K., Nylander, I.** (2004). "Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats". *Alcohol* 33, 31–39.
- **Romans, S.E., Martin, J.L., Anderson, J.C., O’Shea, M.L., Mullen, P.E.** (1995). "Factors that mediate between child sexual abuse and adult psychological outcome". *Psychol. Med.* 25, 127–142.
- **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". *J. Biol. Chem.* 270(48): 29038-29038.
- **Sahu A., White J. D., Kalra P. S.** (1992). "Hypothalamic neuropeptide Y gene expression in rats on scheduled feeding regimen". *Mol. Brain Res.* 15: 15-18.
- **Sanchez, M.M., Ladd, C.O., Plotsky, P.M.** (2001). "Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models". *Dev. Psychopathol.* 13, 419–449.

- **Schmidt, M., Enthoven, L., van Woezik, J.H., Levine, S., de Kloet, E.R., Oitzl, M.S.** (2004). "The dynamics of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis during maternal deprivation". *J. Neuroendocrinol.* 16, 52–57.
- **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". *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 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 based toward weight gain?" *Diabetes* 52: 232-238.
- **Segal-Liberman 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". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E1131- E1139.
- **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". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(14): 6522-6526.
- **Smith M. S., Grove K. L.** (2002). "Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model". *Front. Neuroendocrinol.* 23: 225-256.
- **Sorensen G., Lindberg C., Wortwein G., Bolwig T.G.,Woldbye D.P.** (2004). "Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation". *J. Neurosci. Res.* 77: 723-729.
- **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)". *Brain Res.* 604: 304-317.
- **Starbäck P., Wraith A., Eriksson H., Larhammar D.** (2000). "Neuropeptide Y receptor gene *y6*: multiple deaths or resurrections?" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1): 264-269.
- **Stein, M.B., Koverola, C., Hanna, C., Torchia, M.G., McClarty, B.** (1997). "Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse". *Psychol. Med.* 27, 951–959.
- **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". *Arch. Gen. Psychiatry* 58(3): 251-256.
- **Stern, J.M.** (1997). "Offspring-induced nurturance: animal–human parallels". *Dev. Psychobiol.* 31, 19–37.
- **Sternberg N., Hamilton D.** (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites". *J. Mol. Biol.* 150 (4): 467-486.
- **Sutanto, W., Rosenfeld, P., de Kloet, E.R., Levine, S.** (1996). "Long-term effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors". *Brain Res. Dev. Brain Res.* 92, 156–163.
- **Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V.** (1982). "Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide". *Nature* 296: 659-660.
- **Thorsell A., Michalkiewicz M., Dumont Y., Quirion R., Caberlotto L., Rimondini R., Mathe A. A., Heilig M.** (2000). "Behavioral insensitivity to restrain stress, absent fear suppression

- of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12852-12857.
- **Triezenberg S. J., Kingsbury R. C., McKnight S. L.** (1988). "Functional dissection of VP15, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression". *Genes Dev.* 2 (6): 718-29.
  - **Tsuang M** (2000). Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry.* 47(3):210-20.
  - **Vazquez, D.M., Van Oers, H., Levine, S., Akil, H.** (1996). "Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat". *Brain Res.* 731, 79–90.
  - **Vazquez, D.M., Eskandari, R., Zimmer, C.A., Levine, S., Lopez, J.F.** (2002). Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology* 27, 245–272.
  - **Vezzani A., Sperk G., Colmers W. F.** (1999). "Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation". *Trends Neurosci.* 22: 25-30.
  - **Vythilingam, M., Heim, C., Newport, J., Miller, A.H., Anderson, E., Bronen, R., Brummer, M., Staib, L., Vermetten, E., Charney, D.S., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D.** (2002). "Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression". *Am. J. Psychiatry* 159, 2072–2080.
  - **Wahlestedt C., Reis D. J.** (1993). "Neuropeptide Y-related peptides and their receptors – are the receptors potential therapeutic drug targets?" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 309-352.
  - **Wahlested C., Yanaihara N., Håkanson R.** (1986). "Evidence for different pre- and post-junctional receptor for neuropeptide Y and related peptides". *Regul. Peptides* 13: 307-318.
  - **Walf A. A., Frye C. A.** (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents". *Nat. Protoc.* 2(2): 322-328.
  - **Weaver, I.C., La Plante, P., Weaver, S., Parent, A., Sharma, S., Diorio, J., Chapman, K.E., Seckl, J.R., Szyf, M., Meaney, M.J.** (2001). "Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites". *Mol. Cell Endocrinol.* 185, 205–218.
  - **Weinberg D. H., Sirinathsinghji 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". *Journal of Biological Chemistry* 271(28): 16435-16438.
  - **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". *The Journal of Clinical Investigation* 105(9): 1253-1259.
  - **Wolmarans D.W., Stein D.J., Harvey B. H.** (2016). "Of Mice and marbles: Novel perspectives on burying behavior as screening test for psychiatric illness". *Behav. Neurosci.* 16: 551-560.



- **Yan H., Yang J., Marasco J., Yamaguchi K., Brenner S., Collins F.** (1996). "Cloning and functional expression of cDNA encoding human and rat polypeptide receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4661-4665.
- **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". *Eur J Neurosci* 6(1): 43-57.
- **Zlotnick, C., Ryan, C.E., Miller, I.W., Keitner, G.I.** (1995). "Childhood abuse and recovery from major depression". *Child Abuse Negl.* 19, 1513–1516.

## **RINGRAZIAMENTI**

Il raggiungimento di questo traguardo è stato colmo di non poche difficoltà, dalle quali sono scaturite altrettante soddisfazioni. Ogni anno accademico, però, ogni semestre, ogni esame, e in particolar modo l'ultimo periodo, hanno avuto come denominatore comune tutte quelle persone su cui ho avuto sempre la certezza di contare, e che vorrei citare nelle poche righe che seguono:

Papà, mamma ed Eliana, perché anche a mille chilometri di distanza sono il faro che mi guida e che segnala la presenza di un porto sicuro. Spero di poter in qualche modo ripagare i tanti sacrifici che hanno fatto per portarmi fin qui. Assieme a loro i nonni, gli zii e i cugini che mi hanno sempre supportato nei traguardi raggiunti, e confortato quando sopraggiungeva lo sconforto per un fallimento.

Caterina, la persona che più di tutti ha vissuto al mio fianco questa avventura, che ha sempre creduto in me, che ha sofferto con me i miei fallimenti, gioito con me per i piccoli successi, spronato quando avrei voluto mollare tutto e sopportato più di una volta i miei tanti, troppi difetti. A lei va gran parte del merito. Con lei Giuseppe, Maria e Michela, che mi hanno accolto nella loro vita dal primo giorno come membro della famiglia, e che io, allo stesso modo ho accolti nella mia.

La Prof.ssa Paola Palanza, che mi ha permesso di intraprendere il tirocinio e frequentare il laboratorio di Psicobiologia, rendendosi sempre disponibile quando ho chiesto aiuto e consigli.

Le dottoresse Laura, Silvia e Giada, che fino all'ultimo sono state guide autorevoli e pazienti, che mi hanno seguito durante tutta la fase di tirocinio e scrittura tesi e, non da ultimo, hanno sopportato i miei ritardi cronici.

Tutti gli amici di Parma: Alessia e Francesco, Giada e Giuseppe, Rosa e Vincenzo, Carmine e Isabella, Luigi, Nicoletta, Gennaro, Salvatore, Giuseppe F, Domenico e Rosario, Enzo, Daniel, Alfonso che sono diventati una seconda famiglia con i quali ho condiviso gran parte dei momenti al di fuori dello studio.

Mariano e Stefania, i colleghi ma soprattutto gli amici che hanno condiviso con me parte del percorso di studi, ma anche i momenti di spensieratezza e di ansia, ed è soprattutto grazie a loro se sono qui, oggi, alla fine di questo percorso.

Mattia, Pasqualino e Vincenzo, gli amici d'infanzia che, anche se distanti, riesco a sentire sempre vicini.

Giuseppe, Mattia, Emanuele e Nicola, i coinquilini con i quali ogni sera, alla fine di una giornata di lavoro/studio mi sono fermato a cenare e chiacchierare, che hanno reso più leggera la mia vita da studente fuorisede.

Un doveroso grazie anche a tutti quelli che, per ovvi motivi, non riuscirò a riportare fra queste righe, ma che hanno fatto parte di tutti quei piccoli momenti ben impressi nella mia mente.

*...Vataz morghulis...*