



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

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

**Rimodellamento cardiaco avverso e modificazioni
epigenetiche nella femmina di ratto esposta a stress sociale
vicario**

Relatore:

Prof. Andrea Sgoifo

Correlatore:

Prof. Luca Carnevali

**Laureando:
CAROLA CERRI**

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

1. Abstract	4
2. Abbreviazioni	8
3. Introduzione	9
3.1 Lo stress sociale come fattore di rischio per depressione e problemi cardiovascolari	9
3.2 Stress, stressors e anatomia della stress response	10
3.2.1 Stress cronico e risposta (mal)adattativa dell'organismo	11
3.3 Il paradigma di sconfitta sociale (Social Defeat)	12
3.3.1 Le conseguenze della sconfitta sociale: rimodellamento cardiaco avverso e modificazioni epigenetiche	12
3.4 Vicarious Social Defeat come modello per lo studio dello stress sociale nelle femmine di ratto	14
3.4.1 Il Sex Bias nella ricerca neuroscientifica e biomedica	16
4. Obiettivo della ricerca	17
5. Materiali e metodi	17
5.1 Animali	17
5.2 Disegno sperimentale	18
5.3 Vicarious Social Defeat stress e condizione di controllo	19
5.4 Esperimento 1	20

5.4.1 Chirurgie	21
5.4.2 Telemetria cardiovascolare	21
4.4.4 Isolamento dei cardiomiociti	22
5.4.5 Proprietà meccaniche e transienti del calcio	23
5.5 Esperimento 2	25
5.5.1 Processo di purificazione dell'RNA	25
5.5.2 Analisi RT-PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) per miR-34a e mtRNA.....	26
5.5.3 Analisi del corticosterone plasmatico	27
5.5.5 Misure comportamentali.....	27
5.6 Analisi statistiche	28
6. Risultati	28
6.1. Heart Rate e Heart Rate Variability (HRV)	28
6.2 Attività locomotoria.....	31
6.3 Proprietà meccaniche dei cardiomiociti	32
6.4 Transienti del calcio	34
6.5 Analisi comportamentale	35
6.6 Valutazione del corticosterone plasmatico e del peso delle ghiandole surrenali.....	36
6.7 Analisi dei miR-34a e dei target mitocondriali	37

7. Discussione	38
Bibliografia.....	42

1. Abstract

Exposure to stressful events, especially of the chronic type, is considered a key variable for the development of cardiovascular and neuropsychiatric disorders. Women would seem to be affected more than twice when compared to males, from the beginning of puberty until the menopause. Despite this, neuroscientific and biomedical research has been based on the study of the male sex (in animal as in humans) leading to a generalization of the results, regardless of any gender differences (“Sex Bias”).

In this study the Vicarious Social Defeat paradigm (VSD) was used for two weeks, which involved the presence of a female rat “observer” forced to witness the agonistic fight between two male rats (Social Defeat), which could to induce, through emotional contagion, a condition of social stress. Female rats were divided and randomly assigned to the VSD condition or to the control condition (in this case, the female was placed inside an empty cage, without the presence of the two male rats in agonistic interaction).

Initially, in order to document chronic stress in VSD females, data on heart rate and behavior during VSD episodes were recorded and the quantification of plasma corticosterone and the weight of the adrenal glands assessed twenty-four hours after the last stress episode. Afterwards, we investigated whether episodes of repeated social stress could induce adverse cardiac and epigenetic alterations in the animals. For this purpose, the contractile properties of cardiomyocytes and calcium transient were analyzed and the expression of cardiac microRNA-34a evaluated as well as the mitochondrial efficiency of apoptotic markers (BCL2, BAX, AKT) involved in stress response.

The results showed that two weeks of VSD induce in female rats increased heart rate and the display of anxiety-like and hypervigilant behaviors, during VSD exposure, with a larger secretion of plasma corticosterone and an increased weight of the adrenal

glands, at the end of the paradigm, in female rats exposed to VSD condition compared to controls. Furthermore, a lower contractile efficiency of isolated cardiomyocytes and an imbalance in the calcium transient in experimental animals compared to control emerged. No significant findings were observed in microRNA-34a expression and in apoptotic markers, although an appreciable trend of miR-34a increase in stressed females was observed.

Overall, the results suggest that the VSD paradigm is a valid model for the study of cardiac alterations resulting from repeated social stress in female rats, and it could be used to study the mechanisms underlying the development of stress-related cardiovascular disease in the female, allowing a greater consideration of gender differences in biomedical research.

L'esposizione ad eventi stressanti, soprattutto di tipo cronico, viene considerata una variabile cardine per lo sviluppo di disordini cardiovascolari e neuropsichiatrici e sembrerebbe che le donne ne siano interessate più del doppio degli uomini, dall'inizio della pubertà fino alla menopausa. Nonostante questo, la ricerca neuroscientifica e biomedica si è basata prevalentemente sullo studio del sesso maschile (nell'animale come nell'uomo) portando ad una generalizzazione dei risultati che non tiene conto di eventuali differenze di sesso ("Sex Bias").

In questo studio è stato utilizzato per due settimane il paradigma di Vicarious Social Defeat (VSD), il quale prevede la presenza di una femmina di ratto "osservatrice" dell'interazione agonistica tra due ratti maschi (Social Defeat), al fine di indurre in essa, tramite contagio emotivo, una condizione di stress sociale. Le femmine di ratto sono state, quindi, divise ed assegnate casualmente alla condizione di VSD o a quella di controllo (in questo caso la femmina veniva posta all'interno di una gabbia vuota senza, quindi, la presenza dei due ratti maschi in interazione agonistica). Inizialmente, per documentare una condizione di stress cronico nelle femmine esposte a VSD, sono stati registrati i dati relativi alla frequenza cardiaca e al comportamento durante gli episodi di VSD, insieme alla quantificazione della concentrazione di corticosterone plasmatico e del peso delle ghiandole surrenali valutate, in questo caso, 24h dopo l'ultimo episodio di stress.

Dopodiché, si è cercato di indagare se ripetuti episodi di VSD potessero indurre negli animali delle modificazioni cardiache avverse ed epigenetiche. A tal fine, sono state analizzate le proprietà contrattili dei cardiomiociti e dei transienti del calcio ed è stata valutata l'espressione dei microRNA-34a cardiaci così come l'efficienza mitocondriale di alcuni marker apoptotici (BCL2, BAX, AKT) che sembrerebbero coinvolti nella risposta di stress.

I risultati dello studio indicano che due settimane di VSD provocano, nelle femmine di ratto, una maggior frequenza cardiaca e la manifestazione di comportamenti simil-ansiosi e di ipervigilanza, durante gli episodi di VSD, insieme ad una maggior produzione di corticosterone plasmatico e ad un incremento del peso delle ghiandole surrenali, al termine del protocollo, nelle femmine esposte a VSD rispetto ai controlli. È emersa, inoltre, una minor efficienza contrattile dei cardiomiociti isolati e uno squilibrio nei transienti del calcio nelle femmine VSD rispetto ai controlli. Non sono state osservate differenze significative nell'espressione dei miR-34a e nei marker apoptotici, sebbene emerga una tendenza apprezzabile all'aumento di miR-34a nelle femmine stressate.

In conclusione, l'insieme dei risultati suggerisce che il paradigma di VSD è un valido modello per lo studio delle alterazioni cardiache derivanti da stress sociale ripetuto nelle femmine di ratto e che potrebbe essere utilizzato per studiare i meccanismi sottostanti allo sviluppo di patologie cardiovascolari stress-indotte nella femmina, consentendo quindi una maggiore considerazione delle differenze di genere all'interno della ricerca biomedica.

2. Abbreviazioni

CVD	problemi cardiovascolari
HPA	asse ipotalamo-ipofisi-corticosurrene
SAM	sistema simpatico-midollare del surrene
PNV	nucleo paraventricolare dell'ipotalamo
CRF	fattore di rilascio della corticotropina
ACTH	ormone adrenocorticotropo
VSD	vicarious social defeat
CTR	condizione di controllo
HR	heart rate
HRV	heart rate variability

3. Introduzione

3.1 Lo stress sociale come fattore di rischio per depressione e problemi cardiovascolari

“I fattori di stress più comuni negli esseri umani sono di tipo psicologico o di natura sociale” (Page et al., 2016).

Nel 2011 il National Institute of Mental Health (Maryland, U.S.) e il National Heart, Lung, and Blood Institute (Maryland, U.S.) hanno evidenziato, basandosi su un decennio di ricerca, il forte legame presente tra depressione e disturbi cardiovascolari (CVD) e, da questo momento in poi, sono state raccolte numerose prove precliniche a sostegno di questa comorbidità (Carnevali et al., 2017).

I CVD sono disturbi del sistema cardiocircolatorio e vengono classificati come problema epidemico globale. Risultano essere la principale causa di mortalità negli uomini con età superiore ai 45 anni e nelle donne al di sopra dei 65 anni, e sembrano avere un notevole impatto nell'insorgenza e nello sviluppo della depressione. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2020 la depressione occupava il secondo posto nei problemi di salute pubblica, accanto ai CVD; risulta evidente, quindi, come questo disordine psichiatrico si presenti più frequentemente nei pazienti con CVD rispetto alla popolazione generale, con una prevalenza nei primi intorno al 20%-45% e, allo stesso tempo, come i pazienti depressi mostrino il doppio del rischio di sviluppare CVD; per questo motivo, le due condizioni potrebbero essere correlate bidirezionalmente e molto spesso coesistere nello stesso momento (Raič, 2017).

L'esposizione ad eventi di vita stressanti viene considerata una variabile cardine per lo sviluppo di entrambe le problematiche e diversi processi biologici sembrano esservi coinvolti come l'iperattività degli assi (i) ipotalamo-ipofisi-corticosurrene (HPA) e (ii)

simpatico-midollare del surrene (SAM) e la disfunzione del sistema nervoso autonomo (SNA) (Carnevali et al., 2017).

Sembrerebbe perciò evidente che, all'origine di entrambe, vi possa essere l'esposizione a fattori di stress sociale (M. Osborn. et al., 2020).

3.2 Stress, stressors e anatomia della stress response

Il termine “stress” viene definito come uno stato di minaccia, reale o percepita, dell'equilibrio omeostatico interno. Nonostante questo, tutti gli organismi hanno sviluppato, nel corso del tempo, la capacità di rispondere a eventi imprevisti (estrinseci o intrinseci) chiamati “stressors”, i quali minacciano costantemente questo equilibrio (Nicolaidis et al., 2015).

Il mantenimento dell'omeostasi di fronte a stimoli avversi richiede l'attivazione di un complesso e sofisticato sistema, detto “stress system”, il quale provvede a mantenere l'equilibrio dell'organismo attraverso una vasta gamma di risposte da parte dei sistemi endocrino, nervoso e immunitario, i quali contribuiscono alla formazione della cosiddetta “stress response” (Smith et al., 2006). L'asse HPA comprende tre strutture principali reattive agli stressors: (1) il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN), il quale integra e genera input neurali con il fine di attivare un gruppo di cellule specializzate nella (2) parte anteriore dell'ipofisi (adenoipofisi) per la produzione del fattore di rilascio della corticotropina (CRF); esso, a sua volta, stimola la produzione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) il quale, raggiunto il flusso sanguigno, stimola nella (3) parte corticale delle ghiandole surrenali -ed in particolare dalla zona fascicolata- la sintesi dei glucocorticoidi, ormoni steroidei che si legano ai recettori mineralcorticoidi (MR) e glucocorticoidi (GR) per promuovere un'appropriata risposta all'evento stressante. La

secrezione di questi ormoni viene regolata attraverso un meccanismo di “feedback negativo”, esercitato per lo più dal cortisolo/corticosterone (Oyola et al., 2017). Oltre all’asse HPA, anche il sistema SAM contribuisce alla stress response attraverso l’attivazione dei neuroni noradrenergici presenti nel Locus Ceruleus (LC) e le fibre simpatiche di Sistema Nervoso Autonomo (SNA) che sollecitano la parte midollare delle ghiandole surrenali al rilascio di catecolamine (adrenalina e noradrenalina).

Catecolamine e glucocorticoidi rappresentano la principale manifestazione ormonale della risposta di stress (Smith et al., 2006).

3.2.1 Stress cronico e risposta (mal)adattativa dell’organismo

Spesso siamo chiamati a rispondere a eventi stressanti in modo ripetuto e prolungato e questo provoca marcati cambiamenti nella funzione degli assi SAM e HPA, tanto a riposo quanto in presenza di sollecitazioni acute (Herman et al., 2016). L’impatto dello stress cronico sull’organismo dipende da caratteristiche degli stressors come prevedibilità, controllabilità e intensità le quali possono essere la chiave per lo sviluppo di varie forme di patologie stress-correlate (Koolhass et al., 2011).

Lo stress cronico viene considerato un processo di tipo cumulativo, osservabile per mezzo di cambiamenti come (1) l’ipertrofia delle ghiandole surrenali, data dalla maggiore esposizione all’ACTH, oppure (2) l’aumento del rilascio di glucocorticoidi in condizioni basali (Nicolaidis et al., 2015). Tuttavia, in seguito alla ripetuta esposizione ad uno stesso tipo di stressor (detto, in questo caso, omotipico) si può osservare un fenomeno di abitudine, caratterizzato da una secrezione diminuita nel tempo della quantità di glucocorticoidi (Herman et al., 2016).

3.3 Il paradigma di sconfitta sociale (Social Defeat)

Nei roditori, in particolare nei ratti, il paradigma di Social Defeat è un robusto modello che, attraverso uno o diversi episodi di sconfitta sociale, viene utilizzato per studiare le conseguenze di tali eventi avversi a livello comportamentale, immunitario, neurobiologico e cardiovascolare. La sconfitta sociale può provocare nel ratto sintomi depressivi, anedonia, ansia ed evitamento sociale e, per questo motivo, viene impiegato come modello animale per lo studio di malattie stress-correlate (Munshi et al., 2022).

Il paradigma, chiamato anche “residente-intruso”, si basa sulla difesa del territorio di un maschio detto “residente” da altri maschi non familiari detti “intrusi”. Più specificatamente, viene introdotto il maschio intruso all’interno della gabbia dove è presente stabilmente il maschio residente per 15 minuti; quest’ultimo, di conseguenza, difenderà il territorio mostrando la sua aggressività attaccando l’intruso fino a sottometterlo, affermandosi così come maschio dominante. Dopo questo periodo di tempo, in cui gli animali sono stati in stretta interazione fisica, vengono separati da una paratia di plexiglass trasparente, la quale permette un contatto non più fisico ma bensì psicologico attraverso lo scambio, tra i due, di segnali olfattivi, uditivi e visivi. Episodi di questo tipo provocano negli animali intrusi effetti autonomici e neuroendocrini a breve termine che interessano la frequenza cardiaca, la pressione sanguigna, la temperatura insieme a robuste attivazioni degli assi dello stress (HPA e SAM) ma anche effetti comportamentali e fisiologici di lunga durata legati all’attività esplorativa, all’assunzione di cibo e alla temperatura corporea (Sgoifo et al., 1999).

3.3.1 Le conseguenze della sconfitta sociale: rimodellamento cardiaco avverso e modificazioni epigenetiche

Paradigmi di stress cronico come la sconfitta sociale richiamano eventi stressanti della vita quotidiana e sono, di gran lunga, i più utilizzati per indagare i meccanismi sottostanti a patologie quali la depressione e i CVD (Carnevali et al., 2017). Durante l'esposizione allo stress gli animali "intrusi", e quindi sottomessi, mostrano una disregolazione del sistema nervoso autonomo (con una marcata prevalenza della branca simpatica su quella vagale), una ridotta variabilità della frequenza cardiaca (HRV), una maggiore suscettibilità alle aritmie ventricolari e un'alterata stabilità elettrica del miocardio (Carnevali et al., 2013). È stato inoltre osservato che la sconfitta sociale può provocare gravi perturbazioni dei ritmi circadiani della frequenza cardiaca, le quali sembrerebbero persistere fino a 15 giorni dopo l'ultimo episodio di sconfitta sociale nel ceppo wild-type Groningen rats (Meerlo et al., 1999).

Recentemente, è stata fatta un'indagine più approfondita dell'impatto dello stress da sconfitta sociale a livello cellulare e subcellulare cardiaco con il fine di chiarire i potenziali meccanismi fisiopatologici che portano ai CVD stress-correlati. Il rimodellamento cardiaco avverso in ratti maschi esposti a ripetuti episodi di sconfitta sociale è stato associato a RNA non codificante (in particolare ad una sovraesposizione a microRNA-34a) ed a un'efficienza mitocondriale compromessa (Barbetti et al., 2022). I mitocondri influenzano la fisiologia dei cardiomiociti regolandone la bioenergetica, la gestione del calcio, le proprietà contrattili e l'apoptosi; diversi studi suggeriscono che lo stress cronico può portare ad una progressiva compromissione della loro funzione, favorendo la morte cellulare attraverso la segnalazione apoptotica (Manoli et al., 2007). Le attivazioni causate da ripetuti episodi di sconfitta sociale potrebbero, quindi, influenzare le prestazioni contrattili dei cardiomiociti causando uno squilibrio a livello

dei canali del Ca^{2+} , della respirazione mitocondriale e del contenuto dell'ATP (Barbetti et al., 2022).

Per questo motivo, determinati modulatori epigenetici potrebbero costituire un percorso aggiuntivo per spiegare il rimodellamento cardiaco avverso in condizioni di stress sociale ripetuto, contribuendo alla nascita di malattie stress-correlate e all'identificazione di nuovi bersagli per la loro prevenzione e trattamento (Andolina et al., 2021).

3.4 Vicarious Social Defeat come modello per lo studio dello stress sociale nelle femmine di ratto

Uno dei principali limiti della letteratura riguardante il paradigma di sconfitta sociale è la mancanza di dati rispetto alle differenze di sesso, dato che la stragrande maggioranza degli studi che indaga questa tipologia di stressors sono condotti su ratti maschi, nonostante le donne abbiano una maggior probabilità di soffrire d'ansia e depressione rispetto agli uomini e mostrino un rischio più elevato di sviluppare CVD dall'inizio della pubertà fino alla menopausa (Page et al., 2016). Inoltre, le differenze di sesso riscontrate nei disordini stress-correlati dipenderebbero dalla presenza, nelle donne, di alcuni ormoni ovarici che svolgerebbero un ruolo cruciale nella maggiore sensibilità allo stress (Finnell et al., 2018).

Un'ulteriore limitazione presente nel paradigma di sconfitta sociale riguarda l'aspetto dell'aggressività: i ratti maschi non mostrano aggressività nei confronti delle femmine e le femmine di ratto mostrano un ridotto livello di aggressività rispetto ai conspecifici maschi (caratteristica, di fatto, necessaria per la buona riuscita del

paradigma) e solamente in alcuni casi le femmine di ratto attaccano un conspecifico del proprio sesso (ad es. nei periodi di gravidanza o di allattamento) (Page et al., 2016).

Vari studi hanno però dimostrato come i ratti possano soffrire di uno stato di disagio (come quello conseguente a ripetuti episodi di stress sociale) in modo indiretto, ovvero attraverso l'osservazione di altri conspecifici che vengono direttamente coinvolti nella situazione di stress (Atsak et al., 2011). Nonostante questa capacità, detta “contagio emotivo¹”, sia stata a lungo considerata unicamente umana, diversi studiosi hanno dimostrato che potrebbe essere presente anche nei roditori per mezzo di meccanismi neurali alla base della condivisione sociale delle emozioni, i quali si attiverebbero sia nel momento in cui si sta vivendo una certa emozione e/o situazione, sia quando si osservano gli altri provarla (Ferrari e Rizzolatti, 2014).

Per questo motivo, ricerche più recenti hanno aggiunto un ulteriore componente al paradigma di sconfitta sociale ed elaborato un modello detto “Vicarious Social Defeat”, “Witness Stress” o “Sconfitta Sociale Vicaria”, in cui un ratto viene costretto ad assistere ad un'interazione agonistica tra due maschi conspecifici (il “residente” e “l'intruso” del precedente paradigma) al di là di una paratia forata di plexiglass trasparente posta all'interno della gabbia del maschio residente (Carnevali et al., 2020).

In questo modo, anche i ratti femmina potrebbero contribuire allo studio delle alterazioni provocate da stress sociale ripetuto, oltre che allo studio dei disordini stress-correlati, nonché colmare l'ancor presente “Sex Bias” presente nella ricerca, in particolare in quella neuroscientifica.

¹ Termine coniato da Elaine Hatfield la quale definisce il contagio emotivo come quel meccanismo automatico nella quale vengono colti alcuni aspetti dello stato motivazionale di chi si ha davanti, riproducendo risposte affettive e fisiologiche simili attraverso la semplice osservazione (Hatfield et al., 1993).

3.4.1 Il Sex Bias nella ricerca neuroscientifica e biomedica

“Alle donne vengono diagnosticati disturbi d’ansia 2.25 volte più spesso rispetto agli uomini ma, nonostante questo, la maggior parte degli studi animali sull’ansia e sui farmaci ansiolitici si concentrano su ratti maschi” (Beery and Zucker, 2011).

La ricerca neuroscientifica ha storicamente dimostrato la presenza di un “Sex Bias” favorendo l’utilizzo di animali maschi, ma non solo: sembra essere presente anche la “Sex Omission”, ossia la mancanza di segnalazione del sesso degli animali all’interno delle ricerche. Nonostante questo, le neuroscienze non sembrerebbero l’unica disciplina biomedica interessata a questo problema: farmacia, psicologia ed endocrinologia sembrano anch’esse favorire l’utilizzo di animali maschi nelle loro ricerche (Will et al., 2017). Nella ricerca biomedica tendono a non essere utilizzati ratti o topi femmine a causa della potenziale variabilità dei dati legata alle fluttuazioni ormonali associate al ciclo riproduttivo della femmina. A questo proposito, una recente meta-analisi ha esaminato 26 studi che includono ratti maschi e ratti femmine in specifiche fasi del loro ciclo estrale dimostrando come, in realtà, le femmine non siano più variabili dei maschi in molte delle caratteristiche studiate (Becker et al., 2016).

Il Sex Bias non è, però, presente unicamente nell’utilizzo del modello animale: studi epidemiologici e clinici su uomini spesso generano risultati diversi rispetto a quelli eseguiti sulle donne ma, nonostante questo, il sesso maschile tende comunque a prevalere all’interno delle ricerche e spesso i risultati ottenuti su campioni di soli uomini vengono applicati e generalizzati alle donne, senza adeguate giustificazioni (Beery and Zucker., 2011).

L’esclusione delle femmine in gran parte della ricerca animale necessita, quindi, di essere corretta in quanto esse possono essere studiate indipendentemente dallo stato

del ciclo estrale senza un sostanziale aumento della varianza dei risultati per alcuni tratti. Per questo motivo, potrebbero essere testati un numero simile di animali per genere all'interno dello stesso studio al fine di osservare la presenza di diversi outcomes comportamentali e/o fisiologici, essendo già nota questa differenza nell'essere umano.

4. Obiettivo della ricerca

Gli obiettivi di questa ricerca sono principalmente due: (1) valutare se l'esposizione a ripetuti episodi di sconfitta sociale vicaria è in grado di indurre una condizione di stress cronico nella femmina di ratto e eventuali alterazioni della funzionalità cardiaca a livello di organo e cellulare; (2) indagare se tali alterazioni sono associate a cambiamenti nell'espressione dei microRNA-34a cardiaci e di alcuni marker anti-apoptotici (BCL2, AKT) e pro-apoptotici (BAX).

5. Materiali e metodi

5.1 Animali

Femmine di ratto del ceppo wild-type Groningen (3 mesi, 200g) sono state utilizzate per gli esperimenti. Questo ceppo di ratto, attualmente allevato presso l'Università di Parma e originario dell'Università di Groningen (Paesi Bassi), è stato scelto in quanto mostra potenti risposte cardiovascolari in risposta allo stress (Sgoifo et al., 2005). I ratti sperimentali vengono posti individualmente in una gabbia una settimana prima dell'inizio delle procedure sperimentali. Ratti maschi del ceppo wild-type Groningen sono stati utilizzati come residenti e intrusi nel paradigma di Vicarious Social Defeat (VSD). In particolare, maschi più vecchi (8-9 mesi, 500-600g) sono stati utilizzati

come residenti e collocati all'interno di una gabbia con la presenza di una partner femmina, e maschi più giovani (4 mesi, 400g) sono stati utilizzati come intrusi. Tutti i ratti sono stati alloggiati all'interno di ambienti climatizzati, con un ciclo luce/buio di 12 ore (luce 7 pm; buio 19 pm) con cibo e acqua *ad libitum*. Le procedure sperimentali sono state eseguite in conformità della Direttiva del Consiglio della Comunità Europea 2010/63 UE e approvate dalla Legislazione Italiana per la sperimentazione animale (D.L. 04/04/2014, n. 26, autorizzazione n. 473/2022-PR).

5.2 Disegno sperimentale

Sono stati eseguiti due esperimenti per verificare che le femmine di ratto esibiscono effetti comportamentali, ormonali e cardiovascolari causati dalla condizione di stress durante i 9 episodi di VSD. È stato poi indagato se l'esposizione al paradigma di VSD potesse causare effetti cardiaci ed epigenetici (Figura 1).

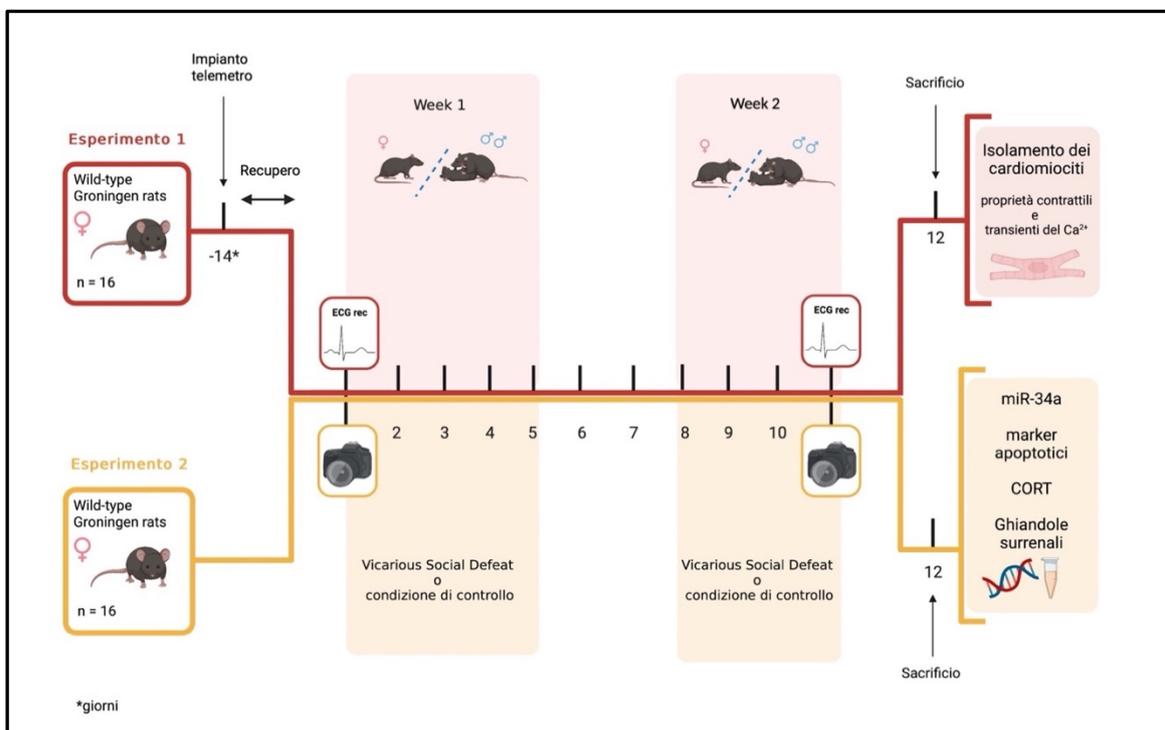


Figura 1. Timeline del protocollo sperimentale raffigurante la procedura dell'esperimento 1 sulle femmine di ratto con telemetro impiantato e la procedura dell'esperimento 2 sulle femmine di ratto senza telemetro.

I ratti utilizzati per il primo esperimento sono stati impiantati con un trasmettitore radiotelemetrico (TA11CTA-F40, Data Sciences International, St. Paul, MN) per la registrazione del segnale ECG (frequenza di campionamento 1000 Hz) e dei parametri relativi all'attività locomotoria. Sono stati esposti a 9 episodi di stress sociale vicario (VSD, n=8) o alla condizione di controllo (CTR, n=8) durante due settimane e il primo e l'ultimo giorno di protocollo sono state eseguite le registrazioni ECG e dei parametri radiotelemetrici attraverso l'attivazione dei telemetri. Al momento del sacrificio, avvenuto 24h dopo l'ultimo episodio di VSD/CTR, è stato estratto il cuore degli animali sperimentali e sottoposto all'isolamento dei cardiomiociti per la valutazione delle proprietà contrattili delle cellule e dei transienti del calcio.

I ratti utilizzati per il secondo esperimento (VSD=8; CTR=8) sono stati sottoposti anch'essi a 9 episodi di VSD/CTR durante due settimane. Al momento del sacrificio, avvenuto 24h dopo l'ultimo episodio, è stato estratto dagli animali il sangue, il cervello, il cuore e infine le ghiandole surrenali. All'interno di questo esperimento sono state eseguite le procedure per la quantificazione del corticosterone (CORT) plasmatico, dei microRNA-34a e dei target pro-apoptotici (BAX) e anti-apoptotici (BCL2, AKT). Infine, durante i 15 minuti di stress del primo e ultimo giorno di protocollo sono state videoregistrate alcune femmine (VSD=5; CTR=3) al fine di quantificare i comportamenti di burying, freezing e rearing.

5.3 Vicarious Social Defeat stress e condizione di controllo

Le femmine di entrambi gli esperimenti sono state sottoposte alla condizione di VSD/CTR ogni giorno, per nove giorni consecutivi, durante due settimane. In ogni sessione di VSD, la femmina viene posizionata al di là di una paratia forata di plexiglass

trasparente posta all'interno della gabbia del maschio residente, in seguito alla rimozione della sua partner. Subito dopo l'inserimento della femmina sperimentale, il maschio intruso veniva collocato dalla stessa parte del residente, dando inizio all'interazione agonistica tra i due e ai 15 minuti di test. Questo paradigma consente alla femmina di osservare la Social Defeat dei maschi e di essere esposta oltre che a stimoli visivi, anche a quelli olfattivi e uditivi. Durante i nove giorni di VSD sono state mantenute sempre le stesse coppie femmina-intruso che però venivano esposte a rotazione a un residente diverso, in modo da prevenire un possibile effetto di abitudine tra questi e per esporre i maschi intrusi a diversi livelli di aggressività dei maschi residenti. Prima dell'inizio degli esperimenti, i maschi residenti sono stati sottoposti ad un allenamento per raggiungere un livello appropriato di aggressività: i residenti che non attaccavano l'intruso venivano esclusi dall'esperimento. Le femmine sottoposte alla condizione di controllo, nei 15 minuti di test, venivano collocate in una gabbia identica a quella utilizzata nella condizione di VSD ma vuota, senza quindi la presenza dei due maschi in interazione agonistica.

5.4 Esperimento 1

Il primo esperimento prevede l'analisi della frequenza cardiaca (HR), della variabilità della frequenza cardiaca (HRV) e del comportamento durante gli episodi di VSD, insieme allo studio delle proprietà contrattili dei cardiomiociti e dei transienti del calcio avvenuto 24h ore dopo l'ultimo episodio di stress.

5.4.1 Chirurgie

Due settimane prima dell'inizio del protocollo di VSD/CTR, gli animali sono stati impiantati con un trasmettitore radiotelemetrico in anestesia con Isoflurano (2% in ossigeno al 100%) (Zoetis, Italia). Il corpo del trasmettitore è stato posto nella cavità addominale, un elettrodo è stato fissato alla superficie dorsale del processo xifoideo e un altro elettrodo è stato invece posizionato nel mediastino anteriore vicino all'atrio destro, secondo una procedura precedentemente descritta (Sgoifo et al., 1996). In seguito alla chirurgia, agli animali è stato iniettato un analgesico (Meglufen, Izo, Italy, 0.2 mL/kg, s. c.) e sono stati posti individualmente nelle proprie gabbie di residenza per le restanti due settimane di recupero.

5.4.2 Telemetria cardiovascolare

Il segnale ECG e i parametri di attività locomotoria (espressa in counts per minute, cpm) e temperatura (in °C) sono stati rilevati in corrispondenza del primo e dell'ultimo episodio di stress e acquisiti attraverso il software ART-Gold (Data science Int, St. Paul, MN, USA). Nel dettaglio, le registrazioni avvenivano: un'ora prima dell'episodio di VSD/CTR quando gli animali erano a riposo nelle loro gabbie; nei 15 minuti di VSD/CTR quando venivano spostati nella gabbia del residente (VSD) o in quella vuota (CTR) e, infine, durante l'ora di recupero successiva a quando gli animali venivano riportati nelle loro gabbie (Figura 2). I segnali ECG sono stati analizzati per garantire che tutte le onde R fossero rilevate correttamente. Tutte le parti delle registrazioni che hanno mostrato artefatti e aritmie sono stati scartati ed esclusi da ulteriori analisi utilizzando il software ChartPro 5.0 (ADInstruments, Sydney, Australia). Il segnale ECG è stato successivamente trasformato in tacogramma, inteso come l'andamento nel tempo

degli intervalli tra battiti successivi (intervalli R-R), per consentire l'analisi dell'Heart Rate Variability.

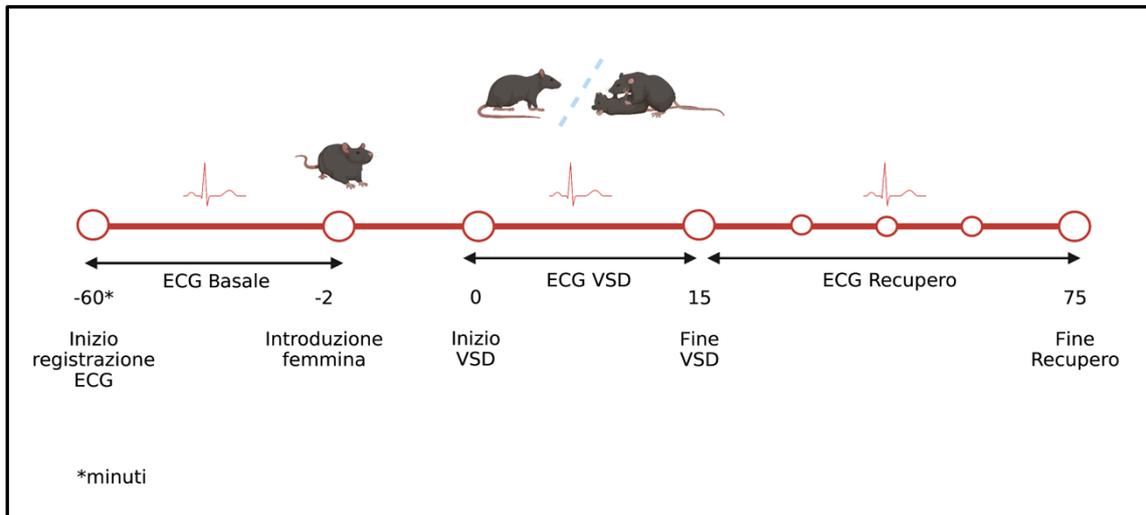


Figura 2. Timeline raffigurante i periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) eseguite al primo e ultimo giorno di VSD.

5.4.3 Analisi dell'Heart Rate Variability (HRV)

L'analisi dell'HRV è stata condotta nel dominio delle frequenze per determinare la potenza spettrale all'interno delle basse frequenze (LF, ms^2), indice non specifico di attività simpatica e parasimpatica, la potenza delle alte frequenze (HF, ms^2), indice specifico dell'attività vagale la Total Power (ms^2), misura di variabilità generale che informa della potenza totale dello spettro. È stato analizzato anche il rapporto LF/HF (ms^2) il quale informa dell'attività della bilancia simpato-vagale. Inoltre, è stata effettuata un'analisi nel dominio del tempo (intervallo R-R) prendendo in considerazione il parametro vagale rMSSD (ms) che quantifica la variabilità presente tra battiti adiacenti.

4.4.4 Isolamento dei cardiomiociti

Gli animali (VSD=6; CTR=6) sono stati sottoposti a ripetute sessioni di VSD/CTR come descritto prima. 24 h dopo l'ultimo episodio di VSD/CTR, i ratti sono

stati decapitati sotto anestesia con isoflurano. I cuori sono stati rapidamente asportati attraverso sternotomia mediana e montati su un apparato di Langerdorff, modello in vitro per la perfusione cardiaca isolata. I singoli miociti del ventricolo sinistro sono stati enzimaticamente isolati mediante perfusione di collagenasi secondo la procedura descritta precedentemente (Bocchi et al., 2019). In breve, il cuore è stato perfuso a 37°C per mezzo di una cannula aortica con: (1) una soluzione priva di calcio per 5 minuti, utilizzata per rimuovere il sangue (126 mM NaCl, 22 mM dextrose, 5.0 mM MgCl₂, 4.4 mM KCl, 20 mM taurine, 5 mM creatine, 5 mM Na pyruvate, 1mM NaH₂PO₄, and 24 mM HEPES; pH 7.4, adjusted with NaOH); (2) una soluzione a basso contenuto di calcio (0,1 nM) più 1 mg/ml di collagenasi di tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) e 0,1 mg/ml proteasi di tipo XIV per circa 15 minuti e (3) una proteasi priva di enzimi, soluzione a basso contenuto di calcio, per 5 minuti. Tutte le soluzioni sono state gasate con ossigeno al 100%. Tutti i prodotti chimici, ove non fosse diversamente indicato, sono stati acquistati da Merck KGaA, Darmstadt, Germania. Il ventricolo sinistro è stato quindi tagliato e agitato per 10 minuti. I cardiomiociti sono stati filtrati con un nylon e una parte di questi è stata risospesa in soluzione a basso contenuto di calcio per 20 minuti e portata gradualmente a 1 mM Ca²⁺ in circa 80 minuti. I cardiomiociti rimanenti sono stati sospesi in una soluzione a basso contenuto di calcio (0,1mM); una parte di questi è stata conservata a -80°C per la successiva valutazione dell'ATP.

5.4.5 Proprietà meccaniche e transienti del calcio

Le proprietà meccaniche e i transienti del calcio sono stati valutati utilizzando i sistemi di fluorescenza e contrattilità IonOptix (IonOptix, Milton, MA, USA) come

precedentemente descritto (Savi et al., 2021). Il miociti del ventricolo sinistro sono stati collocati in una camera sul palco di un microscopio invertito (Nikon-Eclipse TE2000-U, Nikon Instruments, Florence, Italy) e perfusi (1 ml/min a 37°C) con una soluzione di Tyrodo contenete: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 5.5 mM di glucosio, e and 1.8 mM CaCl₂ (pH 7.4, adjusted with NaOH) (tutte le sostanze chimiche sono state acquistate da Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Solo i miociti a forma di bastoncino con bordi chiari e lunghezza media del sarcomero >1,7 µm sono stati selezionati per le analisi. Le cellule sono state stimulate ad una frequenza di 0,5 Hz e 1Hz mediante impulsi di corrente costante (2 ms di durata e il doppio della soglia diastolica in intensità; MyoPacer Field Stimulator, IonOptix). La frequenza di campionamento è stata fissata a 1kHz. Un totale di 96 celle CTR 123 celle VSD sono stati analizzati in n=6 ratti per gruppo. È stata calcolata: la media diastolica della lunghezza del sarcomero, la frazione di accorciamento (FS; %), i tassi massimi di accorciamento (-dl/dt_{max}; µm/s) e di ri-allungamento (+dl/dt_{max}; µm/s), e il tempo del ciclo totale (T-cycle; s) misurato al 10%, 50% e 90% di ri-allungamento. In un sottogruppo di 86 cellule CTR e 94 cellule RSD, i transienti del Ca²⁺ sono stati determinati mediante epifluorescenza dopo aver caricato i miociti con 5 µM fluo 3-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), precedentemente miscelato con Pluronic™ F-127 (10% final concentration; Thermo Fisher Scientific) per 20 minuti. La lunghezza di eccitazione era di 480 nm, con emissione di raccolta a 535 nm, utilizzando una lente obiettivo ad olio 40x (NA 1.3). Lo stato stazionario della contrazione dei miociti è stato raggiunto prima della registrazione dei dati mediante una stimolazione condizionata di 10s. La frequenza di campionamento è stata fissata a kHz. I segnali Fluo-3 sono stati espressi come fluorescenza normalizzata (f/f₀). È stato descritto l'andamento temporale del decadimento del segnale di

fluorescenza da una singola equazione esponenziale, la cui costante di tempo (τ) è stata usata come misura del tasso di eliminazione del calcio intracellulare (Bassani et al., 1994). È stato anche misurato il tempo al picco dei transienti del calcio.

5.5 Esperimento 2

Il secondo esperimento è stato eseguito per valutare l'effetto di 9 episodi di VSD sul comportamento e sulla concentrazione di corticosterone plasmatico, misurata 24h dopo l'ultimo giorno di VSD. Sono stati inoltre valutati i cambiamenti indotti dal protocollo di stress nell'espressione dei microRNA-34a cardiaci e nei marker anti-apoptotici (BCL2, AKT) e pro-apoptotici (BAX).

5.5.1 Processo di purificazione dell'RNA

Punches del ventricolo sinistro sono stati sezionati utilizzando tubi in acciaio inossidabile (diametro interno: 2mm). L'RNA totale è stato estratto utilizzando il Kit di purificazione dell'RNA totale (NorgenBiotek, Thorold, Canada) secondo i protocolli del produttore. La quantità di RNA è stata determinata mediante assorbanza a 260 nm utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis NanoDrop. Gli stessi campioni di RNA sono stati utilizzati sia per la trascrizione inversa che per la quantificazione dei miR-34a e mRNA mitocondriale (BCL2, AKT, BAX) tramite l'analisi PCR quantitativa in tempo reale.

5.5.2 Analisi RT-PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) per miR-34a e mtRNA

10 ng di RNA totale da ciascun campione sono stati retrotrascritti in cDNA per miR-34a e per il controllo endogeno sno135 (Taqman ID 000426 and 001230, rispettivamente). Per quanto riguarda l'analisi sugli mRNA mitocondriali, sono stati trascritti 100ng di RNA totale (Invitrogen™ random primers). Entrambe le reazioni sono state eseguite utilizzando il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Taqman Assay ID 000426 and 001230, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). I livelli di espressione di miR34-a sono stati determinati mediante RT-qPCR (Taqman fast advance master mix), utilizzando l'apparato termocircolatore Thermo Fisher QuantStudio 3 dotato del software SDS versione 2.3 (Applied Biosystems) per la raccolta dei dati. I valori di soglia del ciclo (C_T) miR-34a sono stati normalizzati a sno 135 valori di C_T . I livelli di espressione della codifica del mtRNA per BCL2, BAX, AKT sono stati determinati mediante RT-qPCR. I modelli di cDNA (circa 2,5 ng per campione) sono stati amplificati utilizzando un PowerUp SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™) FastStart DNA Master plus SYBR Green 1 kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). La miscela di reazione conteneva la sonda SYBR® Green 1, cDNA (10 ng), forward e reverse primer (50 ng/ μ l ciascuno) e acqua priva di nucleasi fino a un volume finale di 10 μ l. Tutte le reazioni sono state eseguite utilizzando un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR con le seguenti condizioni di termociclaggio: 95°C per 10 minuti, seguiti da 95°C per 15 secondi e 60°C per 60 secondi per un totale di 40 cicli. Tutti i dati sono stati eseguiti in triplicato e normalizzati ai valori C_T del controllo endogeno TBP, quindi espressi come cambiamenti nel ripiegamento secondo il metodo $\Delta\Delta C(t)$ (Schmittgen & Livak, 2008).

5.5.3 Analisi del corticosterone plasmatico

Al sacrificio sono stati raccolti, in provette eparinizzate, campioni di sangue dal tronco encefalico e sono stati immediatamente centrifugati a 1200 g per 10 minuti a 4°C. I campioni di plasma sono stati successivamente conservati a -80°C fino alle analisi. Il corticosterone plasmatico (pCort) è stato misurato in duplicato in 5 µl di plasma utilizzando il kit Invitrogen Corticosterone Competitive ELISA (Thermo Fisher Scientific). Tutti i reagenti e i materiali sono stati portati a temperatura ambiente prima del loro uso e i campioni sono stati scongelati.

5.5.5 Misure comportamentali

Alcune femmine (VSD=5; CTR=3) sono state videoregistrate durante il primo e l'ultimo giorno di VSD/CTR. I comportamenti di burying, freezing e rearing sono stati quantificati retrospettivamente da uno sperimentatore utilizzando il programma Boris 7.13.9. I risultati sono stati poi validati da un secondo sperimentatore. Nel dettaglio, i comportamenti vengono definiti secondo i seguenti criteri: il burying viene inteso come lo scavare frenetico dell'animale nella lettiera, in assenza di comportamento esplorativo; il freezing è osservabile come una completa immobilità dell'animale fatta eccezione per i movimenti respiratori e le vocalizzazioni, nella quale generalmente mantiene sia le zampe anteriori che posteriori appoggiate sulla lettiera; nel rearing l'animale estende il corpo verso l'alto sollevando entrambe le zampe anteriori dalla lettiera, in assenza di grooming, mangiare o bere. Le analisi includono la durata (intesa come tempo cumulativo) dei tre comportamenti descritti nei 15 minuti di VSD/CTR.

5.6 Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student per la valutazione dell'area sotto alla curva (AUCg) raffigurante l'HR complessivo durante il primo e l'ultimo giorno di registrazione, per la misurazione del corticosterone plasmatico e del peso delle ghiandole surrenali in rapporto al peso corporeo degli animali, entrambe avvenute 24h dopo l'ultimo episodio di VSD/CTR e infine per la valutazione delle proprietà meccaniche dei cardiomiociti isolati e dei transienti del calcio. Per le analisi riguardanti l'andamento dell'HR e dell'attività locomotoria al primo e ultimo giorno di protocollo nei tre periodi di registrazione è stato utilizzato il modello dell'ANOVA a due vie per misure ripetute e sono stati utilizzati i posthoc con correzione di Bonferroni per i confronti a coppie tra i gruppi. Per entrambi i modelli la soglia di significatività è stata fissata a $p=0,05$ (nel caso delle analisi riguardanti le proprietà contrattili dei cardiomiociti e dei transienti del calcio la soglia è stata fissata a $p=0,01$) e i dati vengono rappresentati come $\text{media} \pm \text{errore standard (SE)}$.

6. Risultati

6.1. Heart Rate e Heart Rate Variability (HRV)

L'HR, espressa in battiti per minuto (bpm), è stata calcolata dalle registrazioni ECG per la costruzione di grafici a linee tenendo conto del valore medio assoluto e di grafici a barre considerando l'area al di sotto della curva (AUC).

La Figura 3 (A) riporta l'andamento, al primo giorno di protocollo, dell'HR durante i 60 minuti di registrazione basale, nei 15 minuti di VSD/CTR e infine nei restanti 60 minuti di recupero. Quello che si osserva è che durante i 60 minuti di registrazione in

basale l'HR delle femmine VSD e CTR sembra equivalersi; nei 15 minuti di VSD/CTR l'HR delle femmine VSD risulta statisticamente maggiore rispetto ai controlli e, infine, anche nel periodo di recupero si può osservare una differenza significativa nella curva di ritorno ai valori basali in cui le femmine sottoposte a VSD riportano valori maggiori di HR rispetto alle femmine CTR, che invece sembrano raggiungere i livelli basali iniziali di HR nel corso dei 60 minuti di recupero (effetto del tempo: $F=38$, $p<0,05$; effetto del gruppo: $F=9,3$, $p<0,05$). Anche il grafico B raffigurante l'area sottesa alla curva (AUC) riporta questa differenza tra i gruppi, mostrando un valore statisticamente maggiore di HR complessiva nel gruppo VSD rispetto al gruppo di controllo ($t=2,1$, $p<0,05$).

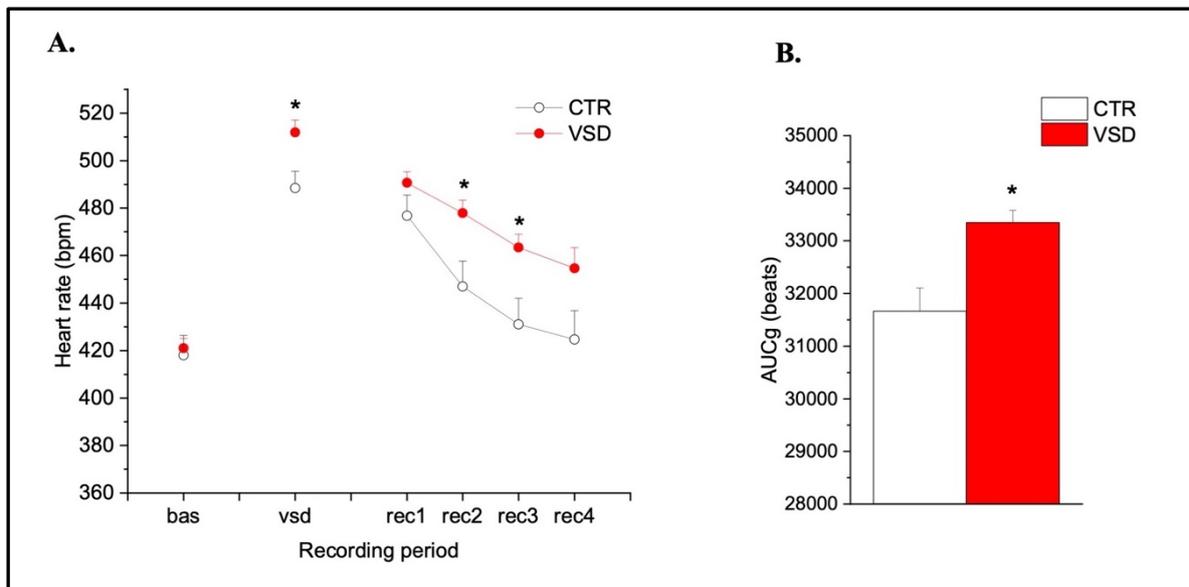


Figura 3. (A) Heart Rate (bpm) al primo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR); (B) Heart Rate rappresentato come area sottesa alla curva AUCg (beats) raffigurante l'HR complessiva al primo giorno di registrazione nel gruppo delle femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR). $*=p<0.05$

La Figura 4 (A) riporta l'andamento dell'HR durante l'ultimo giorno di paradigma e anche in questo caso durante la registrazione basale nei due gruppi sembrano riportare una HR simile mentre viene mantenuta una differenza significativa tra i gruppi durante la condizione di VSD/CTR, dove le femmine VSD mostrano una HR significativamente

maggiore rispetto alle femmine CTR (effetto del tempo: $F=25,9$, $p<0,05$; effetto del gruppo: $F=4,08$, $p=0,06$). I gruppi mostrano, anche all'ultimo giorno di esposizione allo stress, una differenza nell'HR durante i 60 minuti di recupero, nonostante non risulti significativa. Durante l'ultimo giorno di VSD/CTR si può notare, in entrambi i casi, una riduzione significativa dell'HR complessiva ($t=2,1$, $p<0,05$) raffigurata dall'istogramma B.

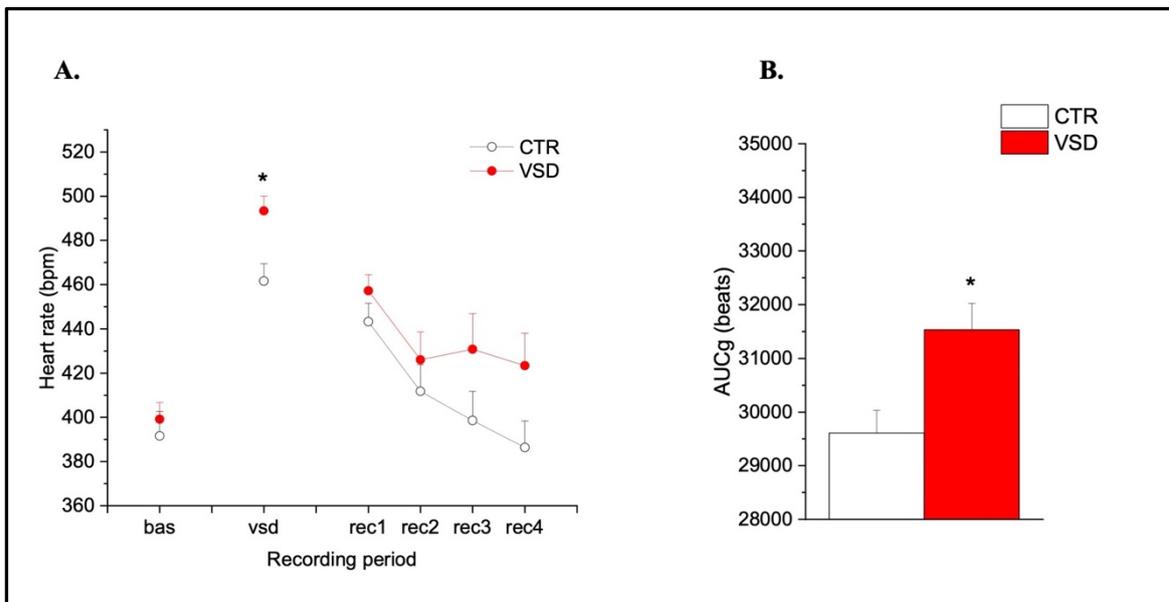


Figura 4. (A) Heart Rate (bpm) all'ultimo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR); (B) Heart Rate rappresentato come area sottesa alla curva AUCg (beats) raffigurante l'HR complessivo all'ultimo giorno di registrazione nel gruppo delle femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR). * $p<0,05$

La Figura 5 presenta l'andamento, al primo (A) e ultimo giorno (B) di registrazione del rMSSD espresso in millisecondi (ms), indice di HRV dell'attività parasimpatica/vagale. Si può osservare che sia al primo che all'ultimo giorno di protocollo non sono presenti differenze significative tra i gruppi (VSD e CTR).

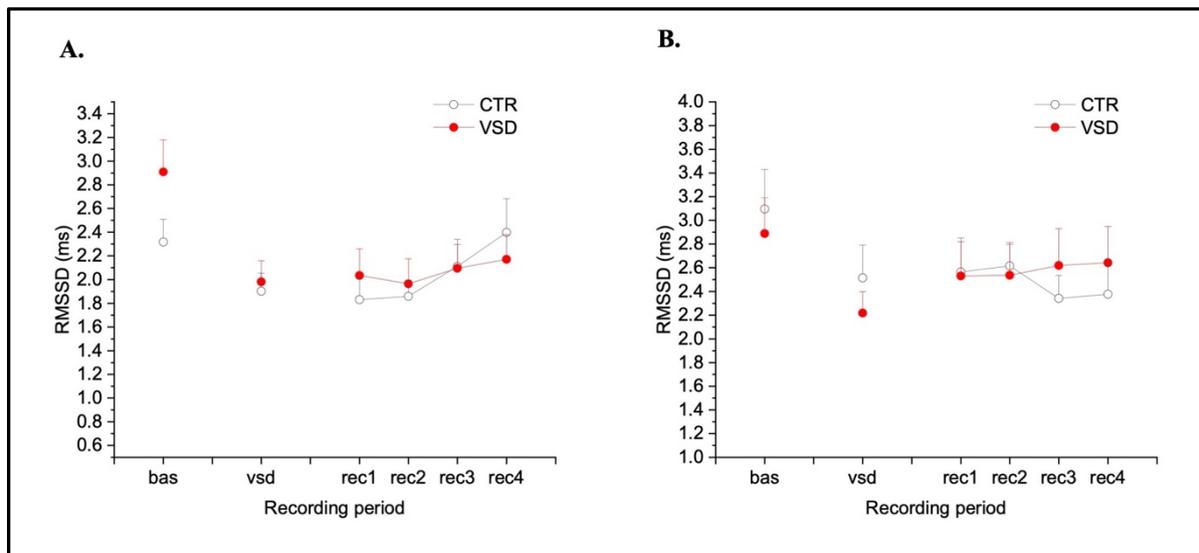


Figura 5. (A) rMSSD (ms) al primo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR); (B) rMSSD (ms) all'ultimo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR).

6.2 Attività locomotoria

La Figura 6 mostra l'andamento dell'attività locomotoria media, misurata in counts per minute, nei due gruppi durante il primo e l'ultimo giorno di VSD/CTR. Al primo giorno di registrazione (A) non sembrano esserci differenze tra i due gruppi dell'attività locomotoria durante l'ora di registrazione basale. Nella condizione di VSD/CTR e nell'ora successiva di recupero emerge però una differenza significativa tra i gruppi: le femmine esposte a VSD mostrano livelli statisticamente minori di attività locomotoria rispetto alle femmine CTR nei 15 minuti di test mentre durante i 60 minuti di recupero le prime esibiscono un'attività locomotoria statisticamente maggiore rispetto alle seconde (effetto del tempo: $F=55,4$, $p<0,05$; effetto del gruppo: $F= 8,3$, $p<0,05$; effetto tempo x gruppo: $F=10,6$, $p<0,05$). Nell'ultimo giorno di registrazione (B) non sembrano emergere differenze tra i gruppi, né durante l'ora di registrazione basale né durante la condizione di VSD/CTR. Sarebbe presente una differenza tra i

gruppi durante l'ora di recupero in cui le femmine VSD mostrano una attività locomotoria maggiore rispetto alle femmine CTR sebbene il dato non risulti significativo.

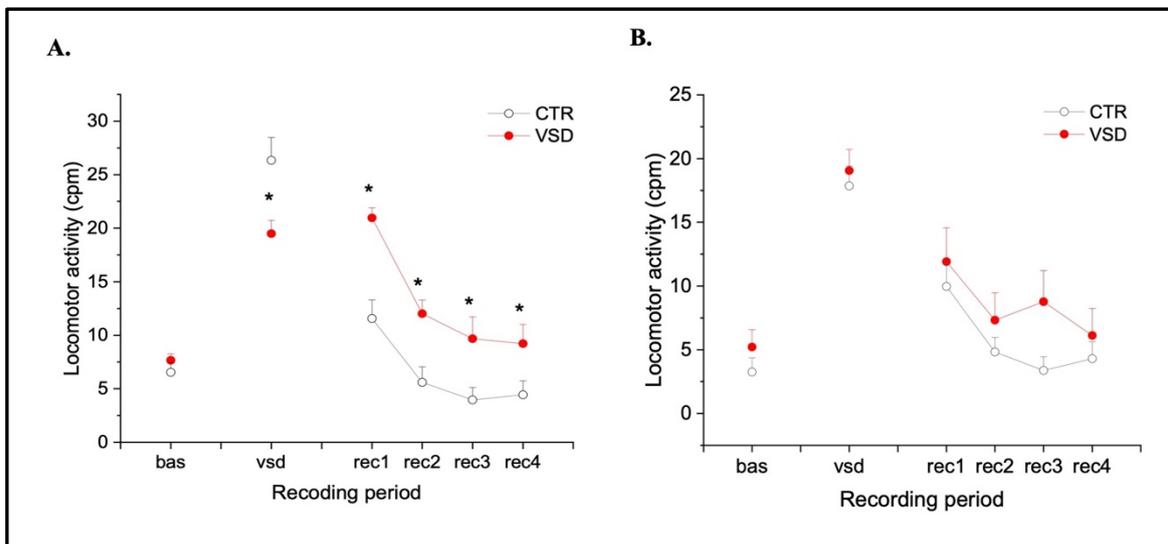


Figura 6. (A) attività locomotoria (cpm) al primo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR); (B) attività locomotoria (cpm) all'ultimo giorno di VSD nei tre periodi di registrazione (basale, vsd, recupero) nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR). * $p < 0.05$

6.3 Proprietà meccaniche dei cardiomiociti

Per le analisi riguardanti le proprietà meccaniche dei cardiomiociti sono state utilizzate n=12 femmine (VSD=6; CTR=6). Negli animali VSD sono stati analizzati 123 cardiomiociti mentre negli animali di controllo 96. Nella figura 7 l'istogramma A riporta la lunghezza media del sarcomero a riposo in micrometri (μm) e non sembrerebbe mostrare differenze significative tra il gruppo VSD e il gruppo di controllo. La figura B riporta la frazione di accorciamento (FS) del sarcomero espressa in percentuale e, in questo caso, è presente una differenza significativa tra i gruppi, dove le femmine VSD riportano una FS minore rispetto ai controlli. Gli istogrammi C e D riportano, rispettivamente, il tasso di rilassamento e il tasso di contrazione in micrometri per secondo ($\mu\text{m/s}$) e indicano la velocità massima con la quale i cardiomiociti si accorciano, nel primo

caso, o si allungano, nel secondo caso. In entrambi i parametri emerge una differenza significativa tra i gruppi in cui le femmine sottoposte alla condizione di VSD mostrano un tasso di rilassamento e di contrazione significativamente più basso rispetto ai controlli. Il grafico E raffigura il T-cycle in secondi (s), ovvero quanto tempo impiega il sarcomero, dopo la contrazione, a riprendere la sua lunghezza iniziale del 10%, 50% e del 90%. Non sembrano esservi differenze significative tra i gruppi, ma bensì una tendenza per le cellule del gruppo VSD a riacquisire più lentamente la loro lunghezza iniziale dopo essere state stimulate. Infine, l'istogramma F riporta il T-from Time-to-pick (TTP) espresso in secondi (s) che raffigura quanto tempo impiega il sarcomero a ritornare della sua lunghezza iniziale del 10%, 50% e 90% dopo che il Ca^{2+} ha raggiunto il suo massimo valore. Le cellule studiate nel gruppo VSD sembrano riacquistarla più lentamente rispetto ai controlli in tutte e tre le percentuali indagate sebbene non emergano differenze significative tra i gruppi.

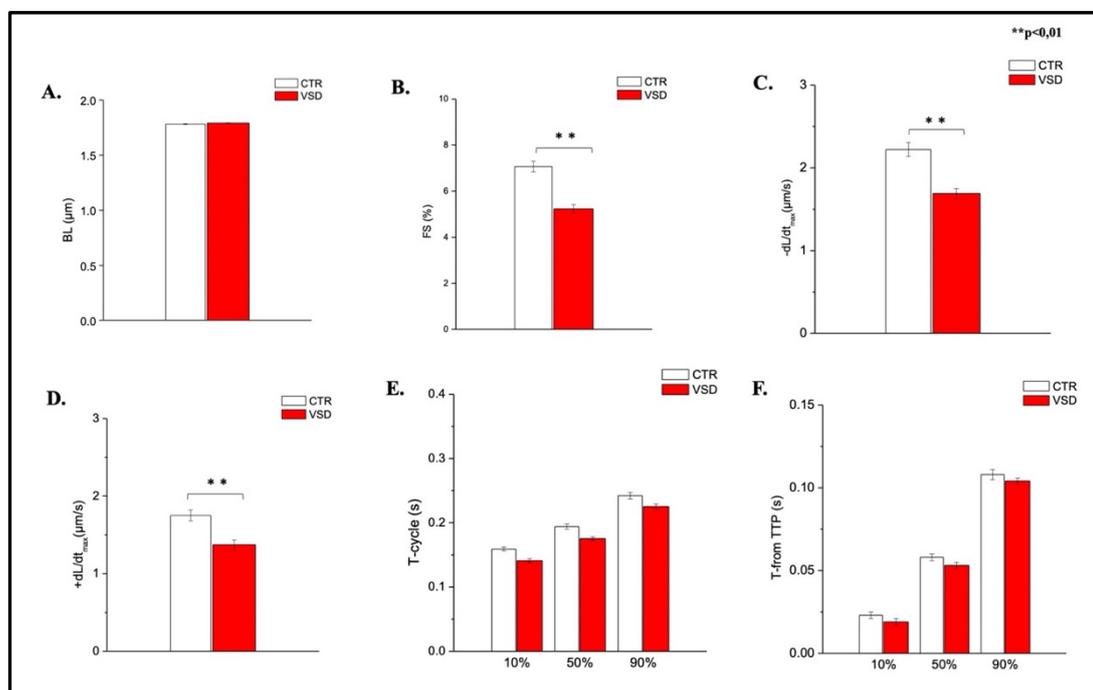


Figura 7. Grafici raffiguranti le proprietà contrattili dei cardiomiociti nel gruppo di femmine stressate (STR) e di controllo (CTR). (A) Lunghezza media del sarcomero a riposo; (B) frazione di accorciamento; (C) tasso massimo di accorciamento; (D) tasso massimo di allungamento; (E) T-cycle del 10%, 50% e 90%; (F) T-from TTP del 10%, 50%, 90%. I valori vengono riportati come media \pm ES. **** $p < 0.01$**

6.4 Transienti del calcio

Per le analisi riguardanti i transienti del Ca^{2+} sono stati utilizzati lo stesso numero di animali (VSD=6;CTR=6) come nelle precedenti misure. In questo caso, per le femmine VSD sono state analizzate 94 cellule mentre per le femmine CTR 86, e i risultati sono riportati nella figura 8. Il grafico A riporta il valore medio della frequenza di fluorescenza (f/f_0) espressa in secondi (s) che raffigura l'ampiezza del transiente del calcio, ovvero quanto Ca^{2+} viene rilasciato all'interno del citoplasma e, in questo caso, non emergono differenze significative tra i due gruppi. Il grafico B riporta il parametro Tau (τ) il quale indica il tempo, espresso in secondi (s), necessario affinché il Ca^{2+} venga rimosso dal citoplasma e sembrerebbe che per le femmine VSD il tempo di rimozione dello ione sia significativamente maggiore rispetto ai controlli. Infine, il grafico C indica il parametro Time-to-peak (TTP) in secondi (s) il quale riporta il tempo impiegato dal Ca^{2+} a raggiungere la sua concentrazione massima all'interno del cardiomiocita e, in questo caso, non sembrerebbero esservi differenze significative tra le femmine VSD e le femmine di controllo.

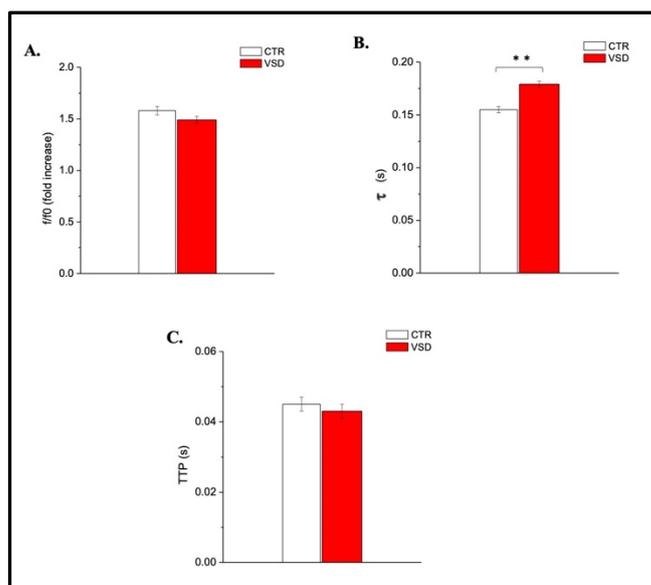


Figura 8. Grafici relativi alle analisi dei canali del Ca^{2+} dei cardiomiociti nel gruppo di femmine stressate (STR) e nel gruppo di controllo (CTR). (A) rapporto di fluorescenza; (B) Parametro Tau; (C) Time-to-peak (TTP). I valori vengono riportati come media \pm ES. ** $p < 0.01$

6.5 Analisi comportamentale

Per le analisi comportamentali è stato utilizzato un campione di n=8 femmine (STR=5; CTR=3). Nella figura 12 sono riportati i grafici relativi alla durata del comportamento di burying e rearing al primo e all'ultimo giorno di protocollo. Al primo giorno di esposizione allo stress (o alla condizione di controllo) si osserva una durata maggiore del comportamento di burying (A1) nelle femmine VSD rispetto ai controlli; la durata del comportamento di rearing (B1) risulta essere minore nelle femmine di VSD rispetto ai controlli. All'ultimo giorno di VSD viene mantenuto lo stesso andamento per quanto riguarda la durata del comportamento di burying (A2) che risulta essere maggiore nelle femmine VSD rispetto ai controlli; la durata del comportamento di rearing (B2) sembra, in questo caso, equivalersi nelle femmine VSD e nei controlli, escludendo qualche variazione tra i gruppi. La durata del comportamento di freezing non è stata rappresentata in quanto si presentava con una media di 5 secondi nelle femmine VSD in entrambi i giorni di registrazione mentre nei controlli questo comportamento non è stato osservato.

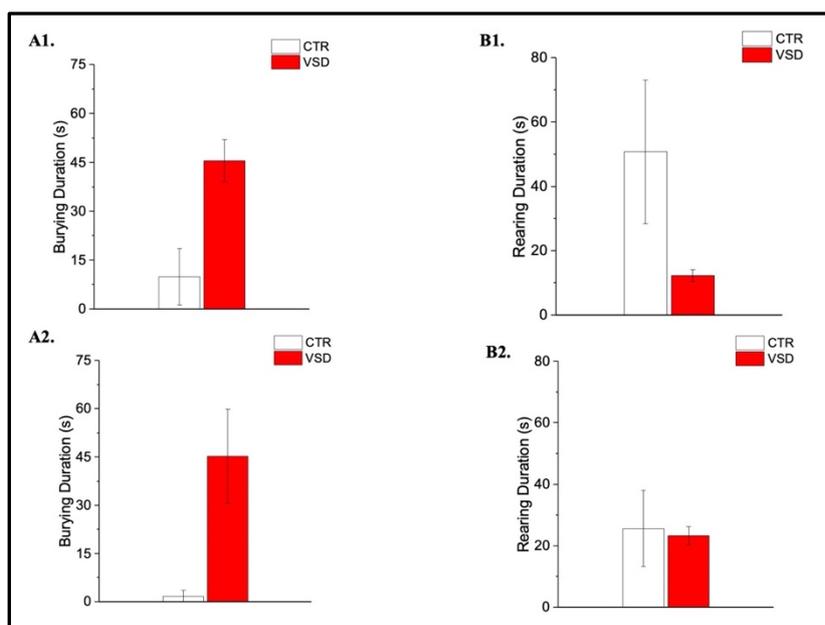


Figura 12. Durata del comportamento di burying (A1) e rearing (B1) al primo giorno di protocollo nelle femmine stressate (STR) e nelle femmine di controllo (CTR); durata del comportamento di burying (A2) e rearing (B2) all'ultimo giorno di protocollo nelle femmine stressate (STR) e nelle femmine di controllo (CTR).

6.6 Valutazione del corticosterone plasmatico e del peso delle ghiandole surrenali

Nella figura 10 sono rappresentati i risultati riguardanti la quantificazione del corticosterone plasmatico e del peso delle ghiandole surrenali in rapporto al peso degli animali. Il grafico A mostra una differenza significativa tra le femmine sottoposte a VSD e le femmine CTR, dove le prime presentano una concentrazione di corticosterone plasmatico significativamente maggiore rispetto alle seconde ($t=2,1$, $p<0,05$).

Il primo e l'ultimo giorno di protocollo è stato registrato il peso degli animali sperimentali e, al momento della decapitazione, sono state estratte e pesate le ghiandole surrenali. Il grafico B mostra il peso delle ghiandole surrenali in rapporto al peso corporeo delle femmine VSD e CTR. Risulta una differenza significativa tra i gruppi ($t=2,14$, $p<0,05$) osservabile da un incremento del peso delle ghiandole surrenali nelle femmine VSD in rapporto al loro peso, fenomeno non osservabile nelle femmine CTR.

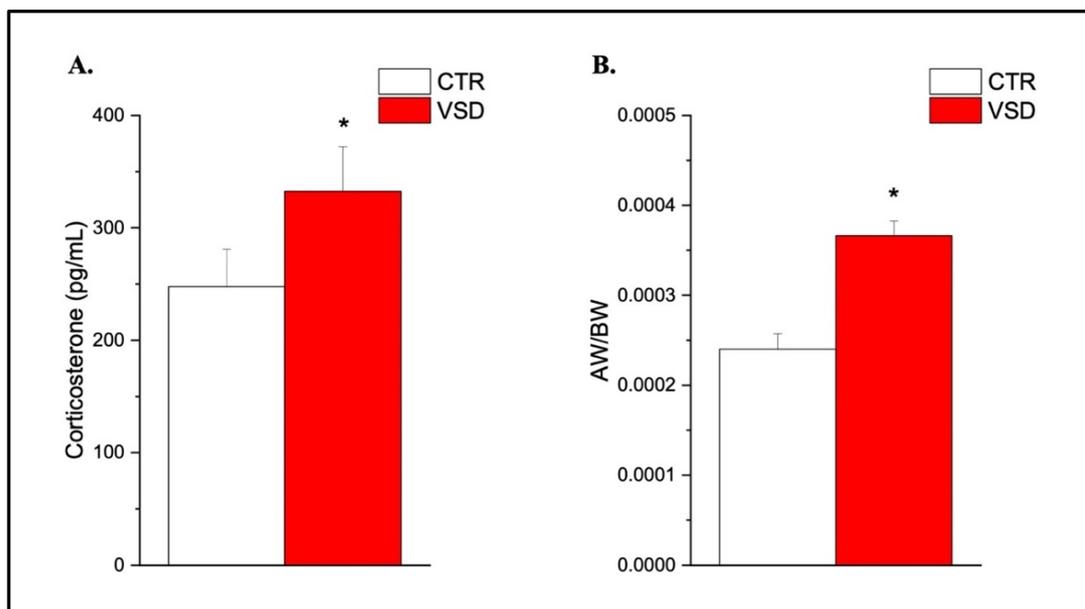


Figura 10. (A) concentrazione di corticosterone plasmatico 24h dopo l'ultimo episodio di VSD nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR); (B) peso delle ghiandole surrenali corretto per il peso degli animali (VSD e CTR) all'ultimo giorno di protocollo. * $p<0,05$

6.7 Analisi dei miR-34a e dei target mitocondriali

Nella figura 9 il primo grafico è relativo all'espressione di miR-34a cardiaci nei due gruppi e sembrerebbe che essa sia maggiore nelle femmine VSD rispetto alle femmine di controllo, sebbene il dato non risulti significativo. Per quanto riguarda l'espressione dei target anti-apoptotici (BCL2 e AKT) e pro-apoptotici (BAX) in tutti e tre i casi non sembrerebbero emergere differenze significative tra i gruppi. In particolare, i target BCL2 e AKT sembrano essere maggiormente espressi nelle femmine VSD rispetto ai controlli e il target BAX sembra, al contrario, risultare espresso in misura minore nelle femmine VSD rispetto ai controlli.

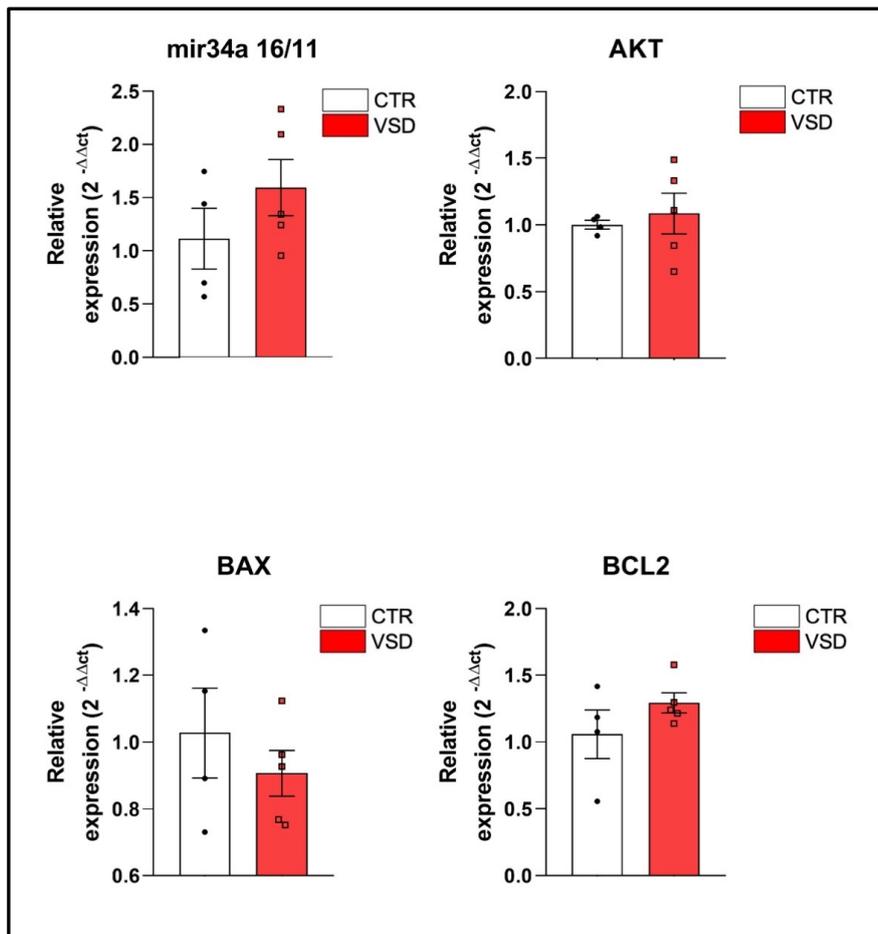


Figura 9. Espressione dei miR-34a e dei marker apoptotici (rispettivamente AKT, BAX, BCL2) valutata 24h dopo l'ultimo episodio di VSD nel gruppo di femmine stressate (VSD) e nel gruppo di controllo (CTR).

7. Discussione

L'applicazione del protocollo di VSD si è rivelata una procedura efficace per la valutazione della condizione di stress e per lo studio delle modificazioni cardiache ed epigenetiche nelle femmine di ratto.

Le femmine stressate esibiscono una HR complessiva maggiore rispetto ai controlli durante il primo e l'ultimo giorno di protocollo riportando, in entrambi i casi, una maggiore difficoltà nei 60 minuti di recupero nel ritorno ai valori basali rispetto ai controlli, effetto dovuto ad una prevalente attività del sistema simpatico su quello vagale. L'attività del sistema parasimpatico è risultata molto simile tra le femmine VSD e quelle di controllo. La maggior HR delle prime durante i due giorni di registrazione sembrerebbe, quindi, essere determinata da una maggiore attività del sistema simpatico dovuta all'esposizione allo stress sociale vicario. Un ulteriore aspetto riscontrato riguarda il fenomeno di abitudine alla risposta di stress: nell'ultimo giorno di protocollo le femmine VSD, sebbene mantengano una certa differenza nella magnitudo della risposta rispetto ai controlli, mostrano una minor attivazione complessiva della frequenza cardiaca.

La minore attività locomotoria al primo giorno di registrazione riscontrata nelle femmine VSD durante i 15 minuti di stress rispetto ai controlli potrebbe essere il riflesso di comportamenti stress-correlati (quali burying e freezing) che potrebbero portare ad una maggiore staticità dell'animale che li esibisce (intesa come una minor tendenza al comportamento esplorativo), soprattutto in una situazione di allerta come quella indotta dal paradigma di VSD. La situazione, però, si inverte durante i 60 minuti di recupero, dove le femmine VSD presentano una maggior attività locomotoria rispetto ai controlli. Il ritorno degli animali nella loro gabbia di residenza, potrebbe aver causato una maggior

agitazione nell'animale determinando così un incremento dell'attività locomotoria nelle femmine VSD rispetto ai controlli. Nell'ultimo giorno di registrazione si riscontra più questa differenza tra i gruppi in quanto il meccanismo di abitudine allo stress avrebbe coinvolto anche questo aspetto.

A sostegno di questi ultimi dati, anche le analisi comportamentali suggeriscono l'impatto significativo della condizione di stress come suggerito dalla maggior durata del comportamento di burying al primo giorno di registrazione nelle femmine VSD. Le femmine di controllo, non trovandosi in un ambiente instabile e minaccioso come invece accade per le femmine VSD, esibiscono maggiormente comportamenti di esplorazione, come il rearing (Figura 12.A1, 12.A2). All'ultimo giorno di registrazione, sebbene sia mantenuta una sostanziale differenza nella durata del comportamento di burying tra i gruppi, l'uguale durata del comportamento di rearing nelle femmine VSD e nei controlli potrebbe dipendere dall'instaurazione di un maggior grado di controllo e previsione degli eventi da parte delle femmine VSD in seguito all'esposizione ripetuta al medesimo fattore di stress.

Dalle analisi riguardanti la concentrazione di corticosterone plasmatico e la grandezza delle ghiandole surrenali emerge che la concentrazione dell'ormone, al termine del protocollo di stress, era significativamente maggiore nelle femmine VSD rispetto ai controlli così come il peso delle ghiandole surrenali, ad indicare una sostenuta attivazione dell'asse HPA. Tali risultati potrebbero dipendere dal processo cumulativo derivante dall'esposizione ripetuta allo stressor, il che porterebbe ad una elevata e ricorrente produzione di ACTH (Nicolaidis et al., 2015).

Gli aspetti appena discussi sembrano suggerire lo sviluppo di una condizione di stress nella femmina di ratto esposta a ripetuti episodi di VSD che si traduce tanto durante

il trattamento (maggior attivazione in termini di frequenza cardiaca, risposte comportamentali indicative di allerta), quanto al termine dello stress (maggior produzione di corticosterone plasmatico e ipertrofia peso delle ghiandole surrenali).

A questa condizione, si associano a livello cardiaco alterazioni delle proprietà meccaniche dei cardiomiociti e dei transienti del Ca^{2+} . Quello che emerge dai cardiomiociti isolati delle femmine sottoposte a stress (Figura 7) è che sia la frazione di accorciamento (FS) che i tassi di rilassamento e contrazione ($-\text{dl}/\text{dt}_{\text{max}}$; $+\text{dl}/\text{dt}_{\text{max}}$) del sarcomero risultano essere meno efficienti rispetto ai controlli. Ciò potrebbe dipendere da un'alterazione a livello mitocondriale, cellule fortemente reclutate in situazioni che richiedono la preparazione di risposte di attacco e fuga (Barbetti et al., 2022).

Per quanto riguarda i transienti del Ca^{2+} , i dati risultano simili nei due gruppi, suggerendo una uguale mobilitazione dello ione in entrambe le condizioni sperimentali. Tuttavia, i valori riguardanti il parametro Tau (τ) indicano, invece, che il tempo impiegato dallo ione ad essere rimosso dal citoplasma è significativamente maggiore nelle femmine stressate rispetto ai controlli. Sembrerebbe quindi che il Ca^{2+} permanga più a lungo all'interno del citoplasma, fatto probabilmente dovuto ad un malfunzionamento nel meccanismo di rimozione dello ione, aumentando così il tempo necessario per la contrazione della cellula. Dalle alterazioni presenti a livello dei transienti del Ca^{2+} potrebbero dipendere le alterazioni delle proprietà contrattili dei cardiomiociti, essendo la contrazione delle cellule cardiache fortemente condizionata dal livello di Ca^{2+} presente all'interno del citoplasma (Endo et al., 2016).

Per quanto riguarda le modificazioni epigenetiche, alcuni studi suggeriscono che l'esposizione ad episodi di stress sociale ripetuto potrebbe contribuire ad una maggior espressione dei miR-34a cardiaci e, di conseguenza, ad un'efficienza mitocondriale

compromessa e ad un'aumentata sintesi di proteine legate all'apoptosi (BCL2, BAX, AKT) (Andolina et al., 2021). Nel nostro caso è risultata una maggior espressione di miR-34a nelle femmine sottoposte a stress, sebbene il dato non risulti significativo. Inoltre, il marker pro-apoptotico BAX dovrebbe, anch'esso, figurare maggiormente espresso nelle femmine VSD, favorendo la morte cellulare, ma i risultati ottenuti non supportano ancora questa ipotesi. Viceversa, i marker anti-apoptotici, quali AKT e BCL2, dovrebbero conservare l'omeostasi e l'efficienza mitocondriale risultando, quindi, maggiormente espressi nelle femmine di controllo ma, in questo caso, entrambi i marker sembrano essere maggiormente espressi nelle femmine VSD. Tali risultati potrebbero dipendere da un'esposizione allo stress non sufficientemente prolungata nel tempo tale da indurre questo tipo di modificazioni all'interno delle cellule cardiache oltre che dalla numerosità campionaria ancora limitata.

In conclusione, tutti gli aspetti indagati sembrano suggerire che il protocollo di VSD può essere utilizzato come valido modello per lo studio delle alterazioni cardiache conseguenti a stress sociale ripetuto nella femmina di ratto, contribuendo all'analisi dei meccanismi sottesi alle patologie cardiovascolari stress-correlate. A questo proposito, essendo già note nell'essere umano le molteplici differenze di genere (comportamentali e fisiologiche) nella risposta di stress, si pensa che questo modello possa contribuire alla correzione del "Sex Bias" presente nella ricerca, ovviando almeno in parte alla tendenza a generalizzare al sesso femminile le evidenze sperimentali ottenute nel genere maschile, permettendo così di indagare i meccanismi fisiopatologici alla base dei CVD stress-correlati in modo che siano sesso-specifici e che possano indirizzare allo sviluppo di terapie mirate.

Bibliografia

Andolina D., Savi M., Ielpo D., Barbetti M., Bocchi L., Stilli D., Ventura R., Lo Iacono L., Sgoifo A., Carnevali L. Elevated miR-34a expression and altered transcriptional profile are associated with adverse electromechanical remodeling in the heart of male rats exposed to social stress. *Stress* 2021; 24:5, 621-634;

Atsak P., Orre M., Bakker P., Cerliani L., Roozendaal B., Gazzola V., Moita M., Christian Keyzers C., 2011. Experience modulates vicarious freezing in rats: a model for empathy. *PLoS One* 6, e21855;

Barbetti M., Vilella R., Dallabona C., Gerra M. C., Bocchi L., Ielpo D., Andolina D., Sgoifo A., Savi M., Carnevali L. Decline of cardiomyocyte contractile performance and bioenergetic function in socially stressed male rats. *Heliyon* 2022; e11466;

Bassani J. W. M., Bassani R. A., Berris D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology* 1994; 476.2;

Becker J. B., Prendergast B. J., Liang J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences* 2016; 7:34;

Beery A. K., Zucker I. Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011; 35(3): 565-572;

Bocchi L., Motta B. M., Savi M., Vilella R., Meraviglia V., Rizzi F., Galati S., Buschini A., Lazzaretti M., Pramstaller P. P., Rossini A., Stilli D. The Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Restores

Cardiomyocyte Contractility in a Rat Model of Early Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; Vol. 20, Fasc.8;

Carnevali L., Mastorci F., Graiani G., Razzoli M., Trombini M., M.A. Pico-Alfonso M.A., Arban R., Grippo A.J., Quaini F., Sgoifo A. Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alteration in wild-type rats. *Physiology & Behavior* 2012; 142-150;

Carnevali L., M. Trombini., Rossi S., Graiani G., Manghi M., Koolhaas J.M., Quaini F., Macchi E., Nalivaiko e., Sgoifo A. Structural and Electrical Myocardial Remodeling in a Rodent Model of Depression. *Psychosomatic Medicine* 2013; Vol. 75 - Issue 1 - p 42-51;

Carnevali L., Montano N., Statello R., Sgoifo A. Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity: Bridging the know to the new. *Neuroscienze and Biobehavioral Reviews* 2017; 144-153;

Carnevali L., Montano N., Tobaldini E., Thayer J. F., Sgoifo A. The contagion of social defeat stress: Insight from rodent studies. *Neuroscienze and Biobehavioral Reviews* 2020; 12-18;

Ferrari P.F., Rizzolatti G. Mirror neuron research: the past and the future. *Philosophical Transaction of the Royal Society* 2014, B, 369;

Finnel J. E., Muniz B. L., Padi A. R., Lombard C. M., Moffitt C. M., Wood C. S., Wilson L. B., Reagan L. P., Wilson M. A., Wood S. K. Essential Role of Ovarian Hormones in Susceptibility to the Consequences of Witnessing Social Defeat in Female Rats. *Biological Psychiatry* 2018; 84: 372-382;

Hatfield E., Cacioppo J., Rapson R., 1993. Emotional Contagion. Cambridge University Press;

Herman H. J., McKleeven J. M., Ghosal S., Kopp B., Wulsin A., Makinson R., Scheimann J., Myers B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology* 2016; 6(2): 603-621;

Koolhaas J. M., Bartolomucci A., Buwalda B., de Boer S.F., Flügge G., Kortei S.M., Meerlo P., Murisong R., Olivieri B., Palanza P., Richter-Levine G., Sgoifo A., Steimer T., Stiedl O., van Dijk G., Wohr M., Fuchs E. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011; 35:1291-1301;

Makoto E. Calcium Ion as a Second Messenger With Special Reference to Excitation. Contraction Coupling. *Journal of Pharmacological Science*. 2006: 619-524;

Manoli I., Alesci S., Blackman M. R., Su Y. A., Rennert O. M., Chrousos G. P. Mitochondria as key component of stress response. *Endocrinology and Metabolism* 2007: Vol.18 No.5;

Meerlo P., Sgoifo A., De Boer S. F., Koolhaas J. K. Long-Lasting Consequences of a Social Conflict in Rats: Behavior During the Interaction Predict Subsequent Changes in Daily Rhythms of Heart, Temperature, and Activity. *Behavioral Neuroscience* 1999: Vol. 113, No 6; 1283-1290;

Munshi S., Ritger A., Rosenkranz J. A. Induction of Repeated Social Defeat Stress in Rats. *Bio-protocol* 12(03): e4306;

Nicolaides N. C., Kyratzy E., Lamprokostopoulou A., Chrousos G. P., Charmandari E. Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 2015; 22: 6-19;

Oyola M., Handa R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 2017; 20(5): 476-949;

Osborne M. T., Shin L. M., Mehta N. N., Pitman R. K., Fayad Z., Tawakol A. Disentangling the Links between Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 2020; 13(8);

Page G. G., Opp M. R., Kozachik S.L. Sex difference in sleep, anhedonia, and HPA axis activity in a rat model of chronic social defeat. *Neurobiology of stress* 2016; 105-113;

Raič M. Depression and heart diseases: leading health problems. *Medicina Academica Mostariensia* 2017; Vol. 5, No. 1-2, pp 52-59;

Savi M., Bocchi L., Cacciani F., Vilella R., Buschini A., Perotti A., Galati S., Montalbano S., Pinelli S., Corradini E., Quaini F., Ruotolo R., Stilli D., Zaniboni M. Cobalt oxide nanoparticles induce oxidative stress and alter electromechanical function in rat ventricular myocytes. *Particle and Fibre Toxicology* 2021; 18:1;

Sgoifo A., Stilli D., Medici D., Gallo P., Aimi B., Musso E. Electrode Positioning for Reliable Telemetry ECG Recordings During Social Stress in Unrestrained Rats 1996. *Physiology & Behavior* 1996; Vol. 60, No. 6, pp. 1397-1401;

Sgoifo A., Koolhaas J., De Boer S., Musso E., Stilli D., Buwalda B., Meerlo P. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1999; 915-923;

Sgoifo A., Costoli T., Meerlo P., Buwalda B., Pico'-Alfonso M. A., De Boer S., Musso E., Koolhaas J. Individual differences in cardiovascular response to social challenge. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005; 59-66;

Sgoifo A., Carnevali L., Grippo A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neuroscienze and Biobehavioral Reviews* 2014; 51-60;

Will T. R., Proano S. B., Thomas A. M., Kunz L. M., Thompson K. C., Ginnari L. A., Jones C. H., Lucas S. C., Reavis E. M., Dorris D. M., Meitzen J. Problems and Progress regarding Sex Bias and Omission In Neuroscience Research. *eNeuro* 2017; 4(6) e0278-17.2017 1-10;