

# ***Materiali e metodi***

## 2. Modello sperimentale: *Mesocricetus auratus*

Il criceto dorato è un piccolo mammifero roditore il cui genere, *Mesocricetus*, comprende specie diffuse nelle steppe pianeggianti e montuose dell'Asia Minore, del Caucaso e della parte inferiore del bassopiano danubiano (Fig. 12). La specie più importante è quella del criceto dorato, sia balcanico che orientale: in qualità di roditore, questo costituisce un gruppo che per alcuni versi è rimasto ad uno stadio primitivo, solo il cranio e la dentatura hanno raggiunto un livello di sviluppo adeguato e di adattamento specializzato. Non possiede premolari e canini, mentre gli incisivi sono molto pronunciati ed a crescita continua (ipsodonti). L'olfatto e l'udito sono i sensi più sviluppati, ma lo è adeguatamente anche la vista, infatti, a differenza di altri Roditori, il criceto dorato percepisce anche i colori. Il cranio possiede archi zigomatici molto evidenti e bolle timpaniche molto sviluppate; il cervello è strutturalmente semplice con superficie liscia: la loro capacità di apprendimento aumenta proporzionalmente alla massa corporea. È un animale molto docile, solitario, crepuscolare e notturno, ma capace di essere in piena attività anche di giorno. È frequentemente scelto come animale domestico di compagnia e largamente utilizzato negli studi sperimentali di laboratorio.



**Fig. 12** Modello sperimentale utilizzato (*Mesocricetus auratus*)

Il criceto dorato rappresenta un ottimo esempio di mammifero ibernante facoltativo a breve termine, con periodi d'ibernazione che vanno dai tre giorni alle tre settimane per anno. La temperatura è dunque un fattore molto importante nell'esistenza di questo piccolo animale, soprattutto perché non essendo dotato di ghiandole sudoripare è a rischio in

condizioni di ipertermia. La sua temperatura ideale è compresa fra i 18 ed i 21 °C con un'umidità del 40-70%. Generalmente a 5-7 °C entra in uno stato di letargia che può evolversi in un vero e proprio letargo se una simile condizione ambientale persiste; in questi casi il criceto è in grado di ad abbassare la sua temperatura corporea a 1-2 °C al di sopra di quella ambientale.

L'ibernazione è uno stato fisiologico caratterizzato da drastiche riduzioni della temperatura corporea, del metabolismo, del flusso sanguigno, del ritmo cardiaco e respiratorio, del peso corporeo, del flusso sanguigno (Tab. 1), della funzionalità delle membrane, che si instaura in particolari condizioni ambientali non favorevoli, come temperature rigide, scarsità di cibo e/o mancanza di ossigeno. Il cervello dell'animale ibernante si trova in una condizione di profonda depressione elettrofisiologia (Sallmen et al., 2003) in cui la sua integrità funzionale viene mantenuta; infatti il SNC ibernante garantisce il controllo posturale e la sensibilità agli stimoli interni ed esterni. Il periodo di ibernazione viene interrotto dagli animali da piccoli intervalli di eutermia (24-48 ore), durante i quali si risvegliano, considerati una transizione fra due distinti stati dell'omeostasi del SNC che sono lo stato non ibernante (stato eutermico) e quello ibernante. Sia l'ingresso che il risveglio dalla fase di torpore sono processi regolati controllati dai nuclei ipotalamici e da altre strutture cerebrali come l'HIP.

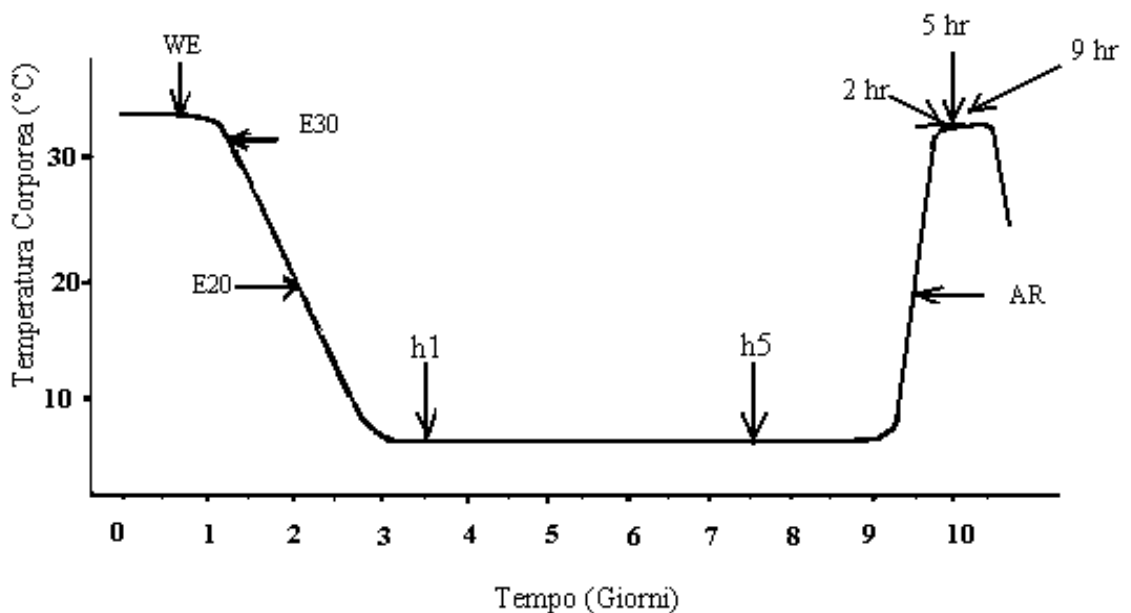
<b>Parametri valutati</b>	<b>Controllo</b>	<b>Ibernante</b>
<b>Peso corporeo (gr)</b>	<b>161±4.8</b>	<b>101±2.7</b>
<b>Ritmo cardiaco (Batt/min)</b>	<b>438±48</b>	<b>8.4±1.2</b>
<b>Ritmo respirat. (respiri/min)</b>	<b>88±14</b>	<b>1.75±0.5</b>
<b>Temperat.rettale (°C)</b>	<b>34.5±0.2</b>	<b>9.8±0.6</b>
<b>Flusso sanguigno perif. (unità LDF)</b>	<b>25.9±0.49</b>	<b>3.28±0.17</b>

**Tab. 1** Valutazione quantitativa dei principali parametri variabili durante l'ibernazione nel criceto dorato. Le misure sugli ibernanti sono fatte dopo 4-6 settimane dalla fase di ingresso (da Saito et al., 2001).

Un tipico ciclo stagionale di ibernazione è costituito da almeno sei diverse fasi (Fig. 13):

1. fase eutermica invernale con una temperatura corporea ( $T_c$ ) di  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .
2. Primo ingresso (E) con  $T_c$  di  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (E30).
3. Secondo E con  $T_c$  di  $20\text{ }^\circ\text{C}$  (E20).
4. Primo giorno di ibernazione con  $T_c$   $7\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$  (h1).
5. Quinto giorno di ibernazione con  $T_c$  di  $7\text{ }^\circ\text{C}$  (h5).
6. Fase di risveglio (AR), avviene generalmente un'ora dopo dal ristabilimento della normale  $T_c$  a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ .

L'ibernazione è dunque una strategia adattativa il cui obiettivo principale é garantire la sopravvivenza dell'organismo in condizioni ambientali estreme, attraverso l'alterazione fisiologica di diversi parametri che al momento opportuno vengono ristabiliti entro i limiti della normalità. Negli animali ibernanti, molte delle variazioni osservate sembrano avere lo scopo ultimo di ridurre al massimo il dispendio energetico.

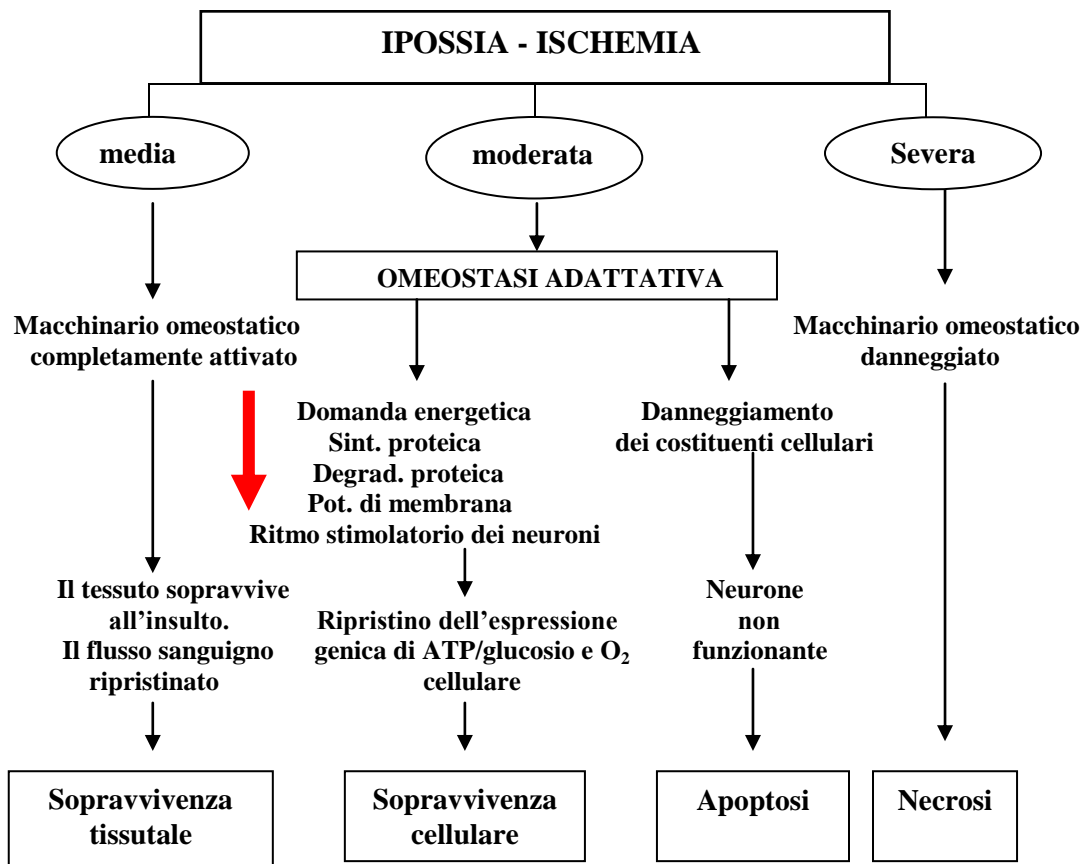


**Fig. 13** Rappresentazione schematica di un ciclo di ibernazione stagionale. WE: stato eutermico invernale ( $T_c$   $37\text{ }^\circ\text{C}$ ); E30: ingresso ( $T_c$   $30\text{ }^\circ\text{C}$ ); E20: ingresso ( $T_c$   $20\text{ }^\circ\text{C}$ ); h1: primo giorno di ibernazione ( $T_c$   $7\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$ ); h5: cinque giorni di ibernazione ( $T_c$   $7\text{ }^\circ\text{C}$ ); AR: risveglio ( $T_c$   $20\text{ }^\circ\text{C}$ ); 2hr, 5hr, 9hr: tempi successivi al risveglio ( $T_c$  quasi  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) (da O'Hara et al., 1999).

In condizioni normali la profonda riduzione del rifornimento ematico, soprattutto a livello encefalico, porterebbe ad una rapida distruzione del tessuto; nel caso dell'ibernazione, grazie all'attuarsi di tutta una serie di adattamenti e meccanismi fisiologici, l'animale non è

soggetto ad alcuna alterazione patologica. Questo è il principale motivo per cui il fenomeno dell'ibernazione ha sempre affascinato il mondo della scienza, purtroppo poco si conosce riguardo agli specifici meccanismi che lo controllano. Grazie alla capacità con cui gli animali ibernanti riescono ad affrontare situazioni estreme, l'ibernazione viene vista come uno tra i più efficaci modelli naturali di tolleranza ad insulti cerebrali come quelli tipici dell'ischemia caratterizzata da stati di pronunciate fluttuazioni del flusso sanguigno a livello encefalico durante il quale il tessuto cerebrale non può essere intaccato da nessun tipo di danno. L'ischemia è un meccanismo neurodegenerativo molto comune che include fenomeni di eccitotossicità, perturbazioni dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$ , eventi infiammatori e stress ossidativi (Nagayama et al., 2000; Vila et al., 2000). Eventi patologici riscontrati nell'Alzheimer e nella demenza ad esordio tardivo potrebbero essere scatenati o esasperati da un alterato rifornimento sanguigno nel microcircolo associato ad infiammazione e stress ossidativi (Shi et al., 2000). A livello encefalico, in risposta agli eventi di ipossia ed ischemia, il destino è determinato, in parte, dalla severità dell'insulto iniziale: nel caso in cui il fenomeno ischemico sia di media o breve durata vengono attivati meccanismi compensatori di origine cellulare (meccanismi omeostatici) (Fig. 14) (Fisher e Ratan, 2003) tra cui l'attivazione o l'inibizione di proteine pre-esistenti. Lo scopo finale è garantire la vitalità del tessuto e facilitare la normalizzazione del flusso sanguigno durante il momento destabilizzante; in ogni caso il recupero del tessuto non avviene completamente. Nei neuroni che hanno subito un danno irreparabile vengono attivati processi apoptotici, considerati omeostatici per il fatto di interrompere il ciclo vitale di cellule non più funzionanti. La presenza di neuroni con alterata funzionalità potrebbe causare nel tessuto l'insorgere di risposte aberranti o l'incapacità di reagire attivando gli opportuni meccanismi (epilessia o dolore); l'inibizione dell'apoptosi non è sempre un adeguato intervento terapeutico. Nel caso di grave ischemia-ipossia possono aversi casi di infarto ed il tessuto muore per fenomeni necrotici a causa dell'obliterazione dei meccanismi omeostatici o apoptotici. Gli aspetti potenzialmente neuroprotettivi della fisiologia dell'ibernazione si basano sulla valutazione di alterazioni fisiologiche come la leucocitopenia, l'immunosoppressione, la riduzione della sintesi proteica, la maggiore difesa antiossidante e la riduzione metabolica (Drew et al., 1999). In accordo con l'ipotesi di neuroprotezione, Frerichs e Hallonbeck (1998) evidenziano, *in vitro*, una maggiore tolleranza alla condizione di ipossia e di profonda ipoglicemia nell'HIP dello scoiattolo. Accanto a questi studi ci sono quelli di Zhou e colleghi (2001) che mostrano, *in vivo*, come

gli scoiattoli ibernanti siano protetti, rispetto a quelli eutermici, da traumi cerebrali causati dall'inserzione di cannule guida e sonde da microdialisi.



**Fig. 14** Rappresentazione schematica dell'attivazione del meccanismo omeostatico nei fenomeni di ipossia-ischemia (Fisher e Ratan, 2003).

Generalmente questo tipo di traumi è associato al rilascio di interleuchina-1 $\beta$  (una citochina infiammatoria), ad infiltrazione di granulociti ed alla degenerazione neuronale (Clapp-Lylli et al., 1999). Al momento dell'inserimento delle sonde, la temperatura corporea degli eutermici è di circa 36 °C e quella degli ibernanti è di circa 4 °C e rimane sempre molto bassa (< 5 °C) per tutto il periodo della dialisi. La conta dei globuli bianchi mostra una diminuzione di queste cellule, passando da un valore di circa 6357/mm<sup>3</sup> che è quello degli eutermici ad uno di 456/mm<sup>3</sup> negli ibernanti. L'esame istologico tramite colorazione Ematossilina-Eosina evidenzia la presenza di chiare differenze nella reazione tissutale fra i due gruppi di animali: negli ibernanti si rintraccia solo un piccolo spazio circondato da parenchima debolmente pallido; negli eutermici possono contarsi un certo numero di cambiamenti istologici inclusi presenza di astrociti reattivi, attivazione di microglia, infiltrato macrofagico e rigonfiamento assonale. Gli astrociti rappresentano la più ampia popolazione di cellule gliali nel SNC e diventano reattivi in seguito ad un

fenomeno perturbativo nel tessuto nervoso. La microglia che ospita in un cervello normale i macrofagi passa da uno stato di riposo, in cui ha un aspetto ramificato, ad uno attivato, seguente al trauma, con forma ameboide. Il rilascio di neurotossine dalle cellule gliali attivate contribuisce alla neurodegenerazione ed aumenta la neurotossicità portando alla morte cellulare. Nello STR degli eutermici la misura della traccia lasciata dalla sonda è considerevolmente ampia ed il tessuto ad essa adiacente sembra essere in necrosi a differenza di quanto si osserva negli ibernanti. Il significativo grado di protezione che si ha durante l'ibernazione è sicuramente il risultato della combinazione di più fattori tra i quali la temperatura, infatti una sua leggera riduzione in un cervello ischemico riduce l'estensione del danno neuronale, la leucocitopenia e la diminuita formazione di anticorpi come anche l'aumento delle concentrazioni di acido ascorbico nel fluido cerebrospinale e nel plasma (Drew et al., 1999) che potenzia il sistema di difesa antiossidante.

### **2.1 Trattamento stereotassico, sostanze farmacologiche e studio comportamentale**

La tecnica stereotassica è stata impiegata per studiare il ruolo dell'AMY, in particolare del BLA e Ce, nella modulazione delle principali attività comportamentali del criceto, associate al feeding, al drinking ed agli stati ansiosi attraverso l'azione combinata dei sistemi ORXergico e GABA/Gluergico sia in condizioni di eutermia che di ibernazione. Da quanto è stato presentato nella sezione precedente, si evince che l'AMY occupi un ruolo di primo piano nel controllo dei comportamenti animali associati al feeding behavior, non solo singolarmente ma anche attraverso la possibile realizzazione di interazioni nervose che potrebbero controllare eventi più articolati e complessi. In un simile contesto, le connessioni ipotalamiche con l'AMY, nell'encefalo di un ibernante facoltativo come il criceto, potrebbero essere fondamentali nel regolare un momento critico del ciclo di ibernazione, come il risveglio, attraverso l'attivazione o l'inibizione di stimoli associati all'assunzione di cibo e/o di acqua.

L'applicazione della chirurgia stereotassica, richiede un corretto posizionamento dell'animale nello strumento per poter effettuare una ricerca precisa del punto encefalico da analizzare. I punti di riferimento di solito utilizzati per la misura delle coordinate stereotassiche sono il *bregma* ed il *lambda*: il primo rappresenta il punto di incontro, sul cranio, delle suture coronale e sagittale, il secondo è il punto di unione delle suture sagittale e lambdoidea. La localizzazione delle specifiche aree cerebrali può essere determinata in un piano tridimensionale, in termini di distanza dal punto di riferimento (*bregma* o *lambda*), in senso antero-posteriore (AP), mediolaterale (ML) e dorso-ventrale

(DV). Una volta individuato il sito specifico, si può effettuare l'ablazione completa dell'area encefalica o eseguire in essa la somministrazione dei farmaci dei quali si vuole studiare gli effetti (Tab. 2). In questo lavoro sperimentale è stato utilizzato il secondo procedimento mediante l'utilizzo di una cannula stereotassica, che ha permesso di iniettare piccolissime quantità di sostanza dell'ordine di  $\mu\text{g}$  e  $\mu\text{l}$ . Gli interventi sono stati eseguiti con strumentazione sterile e in condizioni asettiche per prevenire l'insorgere di setticemie; l'animale viene anestetizzato con uretano (1,3gr/Kg-2,5gr/12,5ml di NaCl 0,9%), in modo da bloccare i pathways dolorifici e proteggere l'organismo nel corso dell'operazione. L'animale anestetizzato viene posizionato nello strumento stereotassico fissando la testa parallelamente al piano della base dello strumento con un morsetto dentale e tenuta *in loco* mediante l'inserimento di due barre d'acciaio nelle orecchie (Fig. 15).



**Fig. 15** Strumento stereotassico adatto al trattamento di roditori da laboratorio

Bisturi sterili sono usati per effettuare un taglio sulla cute dagli occhi alle orecchie in posizione mediale. Dopo aver esposto in maniera adeguata la superficie del cranio, si



individua il  $\lambda$  e da esso si determinano le coordinate AP ed ML, che per BLA sono 3,4mm e 3mm e per Ce 3,6mm e 3,6mm, rispettivamente. Nel punto così individuato si effettua un foro con un trapano adeguato ed in esso si inserisce la cannula dalla quale verrà rilasciata la sostanza specifica. La suddetta cannula è agganciata ad uno specifico supporto stereotassico che ne favorisce il movimento esclusivamente in senso dorso-ventrale in modo da effettuare il trattamento nel punto esatto. Nel caso specifico delle aree considerate la coordinata DV è pari a -5,1mm per il BLA e -5,4mm per il Ce ed indica fino a che punto l'estremità della cannula può scendere nell'encefalo. Eseguita la somministrazione, il foro viene richiuso con cemento dentale e la cute accuratamente ricucita con ago e filo da sutura.

Per questo studio, sono stati utilizzati diversi esemplari (n=5 per ogni gruppo di trattamento) maschi adulti (Charles River, Como-Italy) della stessa età, alloggiati in singole gabbie in locali con temperatura (25 °C) ed umidità controllate e con fotoperiodo costante (14:10 h luce-buio). Il cibo (*pellet*) e l'acqua sono stati misurati in modo da poter fare una stima del consumo giornaliero di entrambi. La cura degli animali ed ogni procedura sperimentale sono state condotte in accordo con la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" della direttiva della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) per cercare in ogni modo di impedire la sofferenza degli animali e ridurre al minimo il numero di esemplari sacrificati.

Le sostanze utilizzate per effettuare i trattamenti farmacologici sono state l'ORX-A, l'ORX-B per i recettori ORXergici, l'NMDA per l'attivazione dell'omonimo recettore Gluergico, zolpidem e flunitrazepam per la rispettiva attivazione delle subunità  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$  del recettore GABA<sub>A</sub>. Queste sostanze sono state scelte in virtù del ruolo che le subunità encefaliche da esse attivate svolgono nella complessità dell'attività encefalica soprattutto nel contesto dei fenomeni analizzati. Inoltre, se a questo si aggiunge la volontà di caratterizzare l'attività dei tre sistemi recettoriali nell'encefalo di un roditore ibernante come il criceto, si comprende l'utilità di servirsi di suddette sostanze per la realizzazione di questo studio sperimentale. Agonisti ORXergici e GABA/Gluergici, sono stati utilizzati per valutare sia gli effetti che hanno sul comportamento del criceto quando sono somministrate singolarmente, che per evidenziare le possibili interazioni esistenti tra i diversi sistemi di neurotrasmissione quando si effettuano delle somministrazioni combinate. Le concentrazioni degli agonisti sono state scelte nell'intento di determinare l'attivazione del sistema di neurotrasmissione ma senza innescare reazioni collaterali, in particolare, le concentrazioni dell'NMDA (Ishida et al., 2005; Wigren et al., 2007) sono

tali da impedire il verificarsi di effetti eccitotossici che porterebbero alla morte cellulare; la concentrazione ottimale di zolpidem (Fedele et al., 2000) e flunitrazepam è quella che non esplica effetti eccessivamente sedativi.

Il trattamento con suddetti agonisti a livello delle specifiche aree encefaliche individuate (BLA e Ce) è avvenuto con le modalità stereotassiche indicate e con combinazioni e concentrazioni diverse a seconda del trattamento voluto, come indicato in Tabella 2. In genere, gli animali sottoposti al trattamento vengono confrontati con animali controllo ai quali viene iniettata unicamente una soluzione fisiologica di NaCl 0,9%, in quanto essendo la stereotassia una tecnica invasiva, è necessario valutare se tutte le alterazioni osservate siano causate dal trattamento con la sostanza iniettata, oppure dal trauma meccanico, anche se minimo, causato dal passaggio dell'ago.

Denominazione dei gruppi di trattamento	Tipo di trattamento (n=5 animali per trattamento)	Area di trattamento
Cri CTRL BLA	NaCl 0.9%	BLA
Cri ORX-A BLA	ORX-A	“
Cri ORX-B BLA	ORX-B	“
Cri $\alpha_1$ BLA	zolpidem	“
Cri ORX-A+ $\alpha_1$ BLA	ORX-A+zolpidem	“
Cri ORX-B+ $\alpha_1$ BLA	ORX-B+zolpidem	“
Cri NMDA BLA	NMDA	“
Cri ORX-A+NMDA BLA	ORX-A+NMDA	“
Cri ORX-B+ NMDA BLA	ORX-B+NMDA	“
Cri CTRL Ce	NaCl 0.9%	Ce
Cri ORX-A Ce	ORX-A	“
Cri ORX-B Ce	ORX-B	“
Cri $\alpha_2$ Ce	flunitrazepam	“
Cri ORX-A+ $\alpha_2$ Ce	ORX-A+flunitrazepam	“
Cri ORX-B+ $\alpha_2$ Ce	ORX-B+flunitrazepam	“
Agonisti	Concentrazioni	Quantità iniettate
ORX-A	20 nM	1 $\mu$ l
ORX-B	60 nM	1 $\mu$ l
Zolpidem	100 nM	1 $\mu$ l
Flunitrazepam	100 nM	1 $\mu$ l
NMDA	0,1mM	1 $\mu$ l

**Tab. 2** La tabella riporta le denominazioni associate ai gruppi di trattamento, il tipo di trattamento effettuato, l'area encefalica interessata e le concentrazioni degli agonisti somministrati.

Dopo circa un giorno dall'intervento, alla ripresa completa del criceto, possono essere avviate le osservazioni comportamentali effettuate con l'ausilio di una videocamera

(Canon XM-2). Inizialmente, in seguito alla valutazione delle eventuali variazioni nel normale feeding e drinking behavior del criceto eutermico, si effettua lo stesso tipo di analisi durante l'ibernazione, indotta all'animale dopo averlo trasferito in un ambiente opportuno, alla temperatura di 7-10 °C e con un fotoperiodo 8:16-h luce/buio in modo da innescare il torpore (Madeo et al., 2006); le condizioni fisiologiche degli animali vengono controllate secondo il metodo sawdust (Ueda et Ibuka, 1995). Nella seconda parte del lavoro di dottorato, gli animali sono stati testati all'interno di opportuni apparati (Elevated-plus-Maze (EPM) e Light-Dark-test (LDT)), in seguito a trattamento stereotassico, per valutare l'eventuale modifica nel comportamento ansioso.

Prima del sacrificio gli animali vengono nuovamente sottoposti a chirurgia stereotassica perché alla fine del periodo di osservazione, la sostanza iniettata è stata sicuramente metabolizzata dall'organismo dell'animale e gli eventuali effetti, sui livelli espressivi delle proteine neuronali considerate, meno evidenti. Dopo un tempo opportuno, necessario a far agire l'agonista somministrato, il criceto viene sacrificato tramite ghigliottina e l'encefalo prelevato, congelato in ghiaccio secco e tagliato al criostato in sezioni di 20-12 µm. Le fettine così ottenute verranno utilizzate sia per studi neuroanatomici che biomolecolari; nel primo caso, l'applicazione di colorazioni istologiche opportune, con cresil violetto o con tionina, permetterà di verificare il punto esatto di iniezione ed inoltre tecniche quali l'ACS permetteranno di evidenziare l'eventuale neuro degenerazione dovuta alla somministrazione i.c.v.. Nel secondo caso, attraverso tecniche di ibridazione *in situ* si valuterà il livello espressivo degli mRNA per i sottotipi recettoriali presi in esame, in particolare ORX2R.

## **2.2 Test comportamentali d'ansia (EPM e LDT)**

L'ansia può essere considerata come una forma particolare di inibizione comportamentale che si manifesta in risposta ad eventi ambientali che risultano nuovi, non appaganti o punitivi. Negli animali l'ansia fa sì che tale inibizione si evidenzia in una marcata inattività esplorativa e disinteresse verso tutto ciò che non rassicura l'animale nella situazione nuova in cui si viene a trovare. E' proprio sulla base di questi parametri che sono stati messi a punto dei test comportamentali che valutano lo stato di ansietà nei roditori.

L'EPM viene definito un test comportamentale di emersione che si basa sul conflitto provato dagli animali tra la curiosità di esplorare un ambiente nuovo e la riluttanza all'esplorazione a causa delle sue caratteristiche avversive. Esso consiste in uno strumento di metallo grigio costruito come specificato nei Current Protocols in Neuroscience (2004).

L'apparecchio, sollevato 50 cm dal pavimento, è costituito da una piattaforma centrale quadrata di 10 cm per lato dalla quale si dipartono 4 bracci disposti a croce: 2 bracci opposti aperti (50 cm x 10 cm) e gli altri due, della stessa misura, chiusi sul perimetro da pareti (50 cm x 10 cm x 40 cm). Il perimetro della piattaforma è stato contrassegnato da linee che indicano il passaggio dalla stessa verso i bracci. Il labirinto è posto in una stanza (3m x 4m) illuminata da una luce al neon (circa 30 lux), priva di riferimenti visivi che possano influenzare il comportamento degli animali (Fig. 16).

Un'ora prima dell'inizio dell'esperimento gli animali sono stati portati nella stanza dove saranno sottoposti al test per favorirne l'ambientamento e lasciarli in condizioni di tranquillità per valutare nel migliore dei modi il loro comportamento. Gli animali sono stati assegnati random ai diversi gruppi sperimentali e le iniezioni dei farmaci in esame sono state realizzate ad intervalli appropriati in modo che ogni animale venga sottoposto al test 30 minuti dopo l'iniezione dei farmaci utilizzati. All'inizio del test ogni criceto è stato posizionato con delicatezza al centro della piattaforma del labirinto, con il muso rivolto verso uno dei due bracci aperti.



**Fig. 16** EPM, utilizzato per valutare il comportamento ansioso di diversi roditori

Da questo momento, gli animali sono stati lasciati liberi di esplorare il labirinto per 5 minuti e il loro comportamento è stato osservato da due sperimentatori situati all'interno della stanza dell'esperimento in una posizione tale da non influenzare la spontanea attività dell'animale e da una telecamera posizionata sopra l'apparato che ha permesso di registrare l'intero test. I parametri convenzionali registrati sono stati i seguenti:

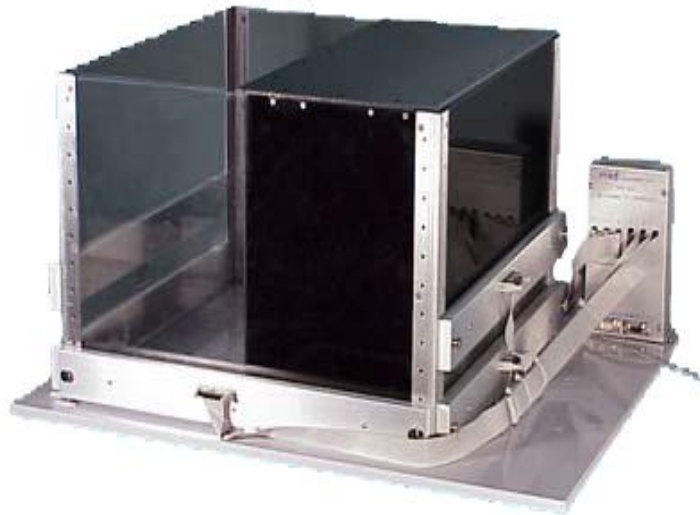
- Tempo trascorso nei bracci aperti;
- Tempo trascorso nei bracci chiusi;
- Tempo trascorso in piattaforma centrale;
- Numero di entrate nei bracci aperti;
- Numero di entrate nei bracci chiusi;
- Numero di entrate totali.

Sono state inoltre calcolate le percentuali di tempo trascorso nei bracci aperti ( $[\text{tempo nell'aperto}/\text{tempo totale}] \times 100$ ), nei bracci chiusi ( $[\text{tempo nel chiuso}/\text{tempo totale}] \times 100$ ) e nella piattaforma ( $[\text{tempo nella piattaforma}/\text{tempo totale}] \times 100$ ) e la percentuale di entrate nei bracci aperti ( $[\text{entrate nell'aperto}/\text{entrate totali}] \times 100$ ) e nei bracci chiusi ( $[\text{entrate nel chiuso}/\text{entrate totali}] \times 100$ ).

Come convenzionalmente stabilito, è stata considerata ogni entrata in un braccio l'attraversamento dell'animale della linea che indica il passaggio dalla piattaforma ai bracci con tutte e quattro le zampe; è stata invece considerata un'uscita dal braccio l'attraversamento con solo due zampe della linea che delimita il passaggio dai bracci alla piattaforma. Al termine di ogni test, il labirinto è stato pulito con acqua contenente 0.1% di acido acetico in modo da eliminare ogni traccia dell'animale precedentemente sottoposto al EPM.

Il secondo apparato utilizzato è stato l'LDT che si basa su un'innata avversione dei roditori verso un'area molto illuminata e su uno spontaneo comportamento esplorativo in risposta a lievi fattori di stress quali ad esempio un ambiente nuovo e luminoso. Una naturale situazione di conflitto si verifica quando un animale è esposto ad una situazione o ambiente non familiare o ancora ad un oggetto sconosciuto; il conflitto avviene tra la tendenza ad esplorare e la tendenza iniziale di evitare una situazione non familiare (neofobia). L'LDT viene quindi utilizzato per valutare l'attività ansiolitica o ansiogena di un farmaco. Le transizioni tra le due camere del LDT rappresentano un indice dell'attività di esplorazione mentre il tempo trascorso in ogni compartimento riflette la repulsione, ma la più importante misurazione sembra essere la percentuale di tempo trascorso e il numero di transizioni. Un aumento delle transizioni senza un aumento di una spontanea attività

locomotoria riflette un'attività ansiolitica. L'LDT consiste in una scatola (21x42x25 cm) divisa in due sezioni di uguale dimensioni separate da "porta" e una delle quali è illuminata mentre l'altra è buia. L'apparecchio è posto in una stanza (3m x 4m) illuminata da una luce al neon (circa 30 lux), priva di riferimenti visivi che possano influenzare il comportamento degli animali (Fig. 17).



**Fig. 17** LDT, apparato utilizzato per valutare eventuali variazioni negli stati d'ansia dei criceti testati

Mezz'ora prima dell'inizio dell'esperimento gli animali sono stati portati nella stanza dove verranno sottoposti al test per favorirne l'ambientamento e lasciarli in condizioni di tranquillità per valutare nel migliore dei modi il loro comportamento. All'inizio del test ogni criceto è stato posizionato con delicatezza nella camera buia e da questo momento gli animali sono lasciati liberi di esplorare la scatola per 5 minuti e il loro comportamento è stato osservato da due sperimentatori situati all'interno della stanza in una posizione tale da non influenzare la spontanea attività dell'animale. I parametri convenzionali registrati sono stati i seguenti:

- numero totali di transizioni;
- Tempo trascorso nella camera buia;
- Tempo trascorso nella camera illuminata.

Al termine di ogni test, l'apparecchio è stato pulito con acqua contenente 0.1% di acido acetico in modo da eliminare ogni traccia dell'animale precedentemente sottoposto all'LDT.

### 2.3 Analisi istologica: Tionina

In seguito al trattamento stereotassico, al fine di verificare l'esatto sito di iniezione, le fettine di tessuto encefalico destinate agli studi neuroanatomici vengono colorate utilizzando la tecnica di colorazione con la tionina. In questo studio, per verificare l'esatto sito di iniezione nell'AMY è stata utilizzata la tecnica di colorazione con la tionina che mediante l'utilizzo di questo colorante in grado di legare le proteine basiche e gli acidi nucleici andando, quindi, a colorare il DNA ed il reticolo endoplasmatico rugoso (quando si trova sottoforma di aggregati detti sostanza di Nissl).

La soluzione colorante di tionina 1,3 % viene preparata sciogliendo 13 g di tionina in un litro di acqua distillata a 18°C per circa un'ora fino alla scomparsa del colore. A questa soluzione si aggiunge un buffer contenente acido acetico glaciale 1 M ed un buffer di NaOH 1 M ottenendo una soluzione di colorazione con tionina forte 1% (Fig. 18). Terminato lo studio comportamentale, gli stessi esemplari di criceto adulto trattati sono stati sottoposti ad ultimo passaggio con queste stesse sostanze nella modalità descritta nel precedente capitolo e sono stati poi sacrificati tramite ghigliottina poco dopo l'iniezione. Successivamente sono stati prelevati gli encefali i quali sono stati immediatamente conservati a -20°C fino al momento del taglio al criostato. Alcune sezioni encefaliche di 20 µm di spessore sono state sottoposte al seguente protocollo di colorazione con la tionina:

**Reidratazione:** le sezioni sono state idratate mediante tre passaggi di 1 min ciascuno in EtOH a concentrazione decrescente (dal 95% al 50% passando per il 70%) e poi immerse per 2 passaggi in acqua distillata di 5 min ciascuno.

**Colorazione:** le sezioni sono state immerse per circa 20 min nella soluzione di tionina forte all'1%.

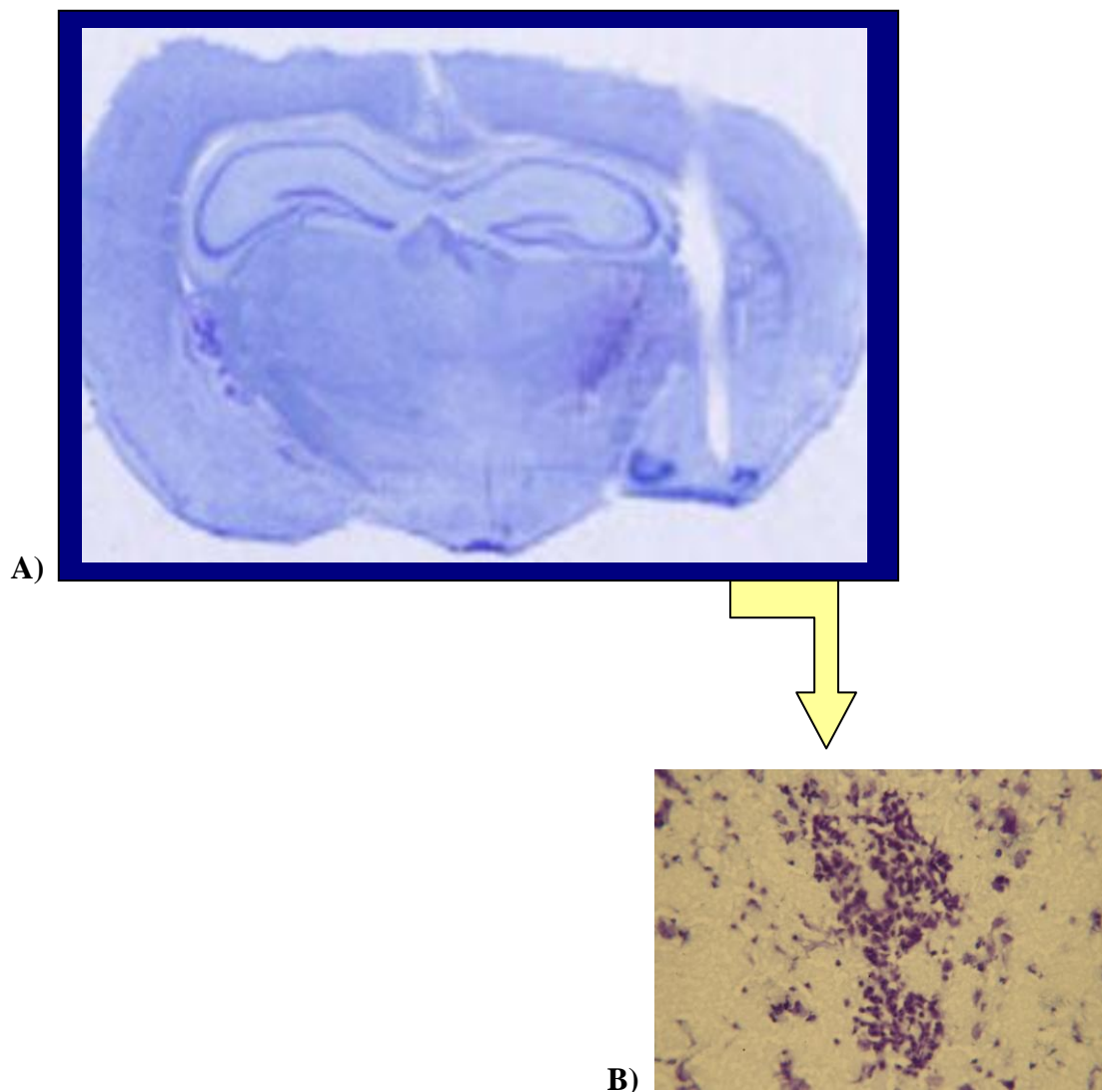
**Sciacquo:** le sezioni sono state sottoposte a 2 immersioni veloci in acqua distillata.

**Disidratazione:** le sezioni sono state disidratate mediante 3 passaggi di un minuto ciascuno in EtOH al 50%, 70% e 95%.

**Differenziazione:** le sezioni sono state immerse per circa 1 min in una soluzione costituita da etanolo al 95% e due gocce di acido acetico, in modo da eliminare l'eccesso di colorante.

**Disidratazione:** le sezioni sono state trasferite in EtOH 95% per 30 sec e poi in EtOH 100% per 1 min.

**Chiarificazione:** le sezioni sono state immerse in xylene per 5 min e poi per semplice immersione.



**Fig. 18** Colorazione di Nissl su encefalo di criceto trattato a livello del BLA. A):passaggio cannula stereotassica; B):scompaginamento tessutale a livello del punto di rilascio della sostanza farmacologica (300X).

Al termine di tale procedura le sezioni cerebrali hanno assunto una colorazione finale blu che dalla successiva valutazione al microscopio ottico Leitz Dialux EB 20 ha evidenziato l'esattezza del sito di iniezione effettuato mediante lo strumento stereotassico nel nucleo Ce dell'AMY .

#### **2.4 Amino cupric silver stain (ACS)**

L'ACS è una tecnica di colorazione in grado di mettere in evidenza il profilo morfologico e strutturale dei neuroni degenerati. E' una tecnica d'impregnazione basata sulla capacità dei neuroni di reagire con i sali d'argento che, depositandosi, vengono poi ridotti ad argento metallico. La tecnica consente non solo di evidenziare la degenerazione a livello dei corpi cellulari, dei dendriti, degli assoni e delle loro terminazioni assoniche, ma anche



la localizzazione di altri compartimenti neuronali nonché le varie connessioni tra un gruppo e l'altro dei neuroni e dei loro diverso orientamento.

In questo lavoro alcune sezioni cerebrali di 30 µm degli stessi esemplari di criceto dei gruppi CTRs, ORX-A, ORX-B e FLU ottenute al criostato sono state conservate a 4°C e poi sottoposte alle seguenti fasi (De Olmos et al., 1994):

**Preimpregnazione:** le sezioni sono state trattate con la soluzione P (nitrato d'argento, acqua distillata, dl-alanina, nitrato di rame 0,5%, nitrato di cadmio 0.5%, nitrato di lantanio 0.5%, rosso neutro 0.5%, piridina, trietanolammina, isopropanolo) e poste ad incubare a 50°C per 50 minuti e poi raffreddate a T ambiente per 2-3 ore.

**Impregnazione:** le sezioni sono state risciacquate in acetone per 30 secondi ed immerse poi nella soluzione I (nitrato d'argento, acqua distillata, etanolo 100%, acetone, idrossido di litio 0.4%, idrossido d'ammonio) per 45 minuti.

**Riduzioni:** le sezioni sono state trasferite in 200 ml di soluzione R (formalina 10%, acido citrico monoidrato 1%, etanolo 100%, acqua distillata) ed incubate a 32°C per 25 minuti; agitate di continuo per i primi 2 minuti; dopo i primi 5 minuti è stata aggiunta ad intervalli di 5 minuti per 4 volte 0.3 ml per volta della soluzione I. Successivamente sono state trasferite in acqua distillata per 1,5 minuti e poi in acido acetico 0.5% per i 1,5 minuti. Sciacquate in acqua per 1 ora con 2 passaggi di cui il primo di 15 minuti e conservare in una nuova vaschetta in acqua distillata *overnight*.

**Chiarificazione:** le sezioni sono state ricoperte con la soluzione C1 (ferrocianuro di potassio 6%, clorato di potassio 4%, acido lattico) per 90 secondi a T ambiente; sciacquate in acqua distillata e ricoperte per 90 secondi in soluzione C2 (permanganato di potassio 0.06%, acido solforico 6%); trasferite in acqua distillata (2 cambi) per 3 minuti a T ambiente.

**Stabilizzazione:** le sezioni sono state trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2% agitando per 2 minuti e risciacquate in acqua distillata per 3 minuti. Trasferite poi in Rapid Fixer (Kodak) per 5 minuti; sciacquate in acqua distillata ed immerse per 20 minuti in rosso neutro 0.5% (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy) sciolto in acqua; sciacquate due volte in acqua distillata ed immerse per 20 secondi in alcol 50%, 70%, 95%, 100%; e differenziate in alcol-xylene (1:1) e 2 volte in xylene puro.

I danni cellulari derivanti dal trattamento chimico nelle diverse aree encefaliche sono stati valutati mediante microscopio ottico Leitz Dialux EB 20 (Wetzlar, Germany), in accordo con l'atlante encefalico del criceto (Morin et al., 2000).

## 2.5 Ibridazione *in situ* con Digossigenina

La tecnica dell'ibridazione *in situ* (ISH) permette di individuare sequenze specifiche di acidi nucleici (DNA e/o RNA) in cellule e tessuti morfologicamente conservati mediante l'impiego di sonde geniche marcate con traccianti di diversa natura. Queste tecniche associano la possibilità di localizzazione, a livello microscopico e ultramicroscopico, di porzioni genomiche di origine cellulare o esogena conservando pressochè inalterata la morfologia cellulare. La tecnica richiede l'impiego di sonde geniche marcate radioattivamente oppure con molecole rilevabili mediante reazioni citochimiche di affinità (es: reazioni aptene-anticorpo). A tal riguardo sono disponibili numerose molecole aptenizzate, in grado di reagire con specifici anticorpi e tra le più utilizzate citiamo la biotina (una vitamina) e la digossigenina (un aptene derivato da un alcaloide vegetale). Queste molecole *reporter* sono evidenziabili nell'ibrido sonda-bersaglio mediante anticorpi specifici coniugati con enzimi. Gli enzimi più utilizzati a tale riguardo sono la fosfatasi alcalina e la perossidasi che, in presenza di un opportuno substrato colorimetrico, producono un precipitato colorato che si deposita stabilmente nel sito di localizzazione dell'enzima.

L'ISH che utilizza la digossigenina, da noi prescelta per il nostro lavoro, ha il vantaggio di non essere radioattiva e nel contempo di produrre risultati apprezzabili nell'esame della distribuzione spazio-temporale dell'espressione genica nel tessuto.

Le fasi cruciali del protocollo di questo tipo di ISH consistono in una **preibridazione-ibridazione** in cui le sezioni adese a vetrini polisistati (Carlo Erba), dopo essere state fissate in paraformaldeide e trattate con HCl (questo trattamento contribuisce all'estrazione delle proteine cellulari che, altrimenti, ostacolerebbero il legame tra sonda e bersaglio), vengono ricoperte con la sonda marcata ed incubate *overnight* a 50 °C. Segue nella **post-ibridazione** una serie di lavaggi in *buffers* e tra l'altro il trattamento con *Blocking Reagent* (Roche), uno *step* di blocco per prevenire un elevato *background*; la fase della **rilevazione immunologica** prevede l'incubazione dei vetrini, precedentemente esposti all'anticorpo anti-digossigenina coniugato alla fosfatasi alcalina, con il substrato enzimatico specifico che per PA vale a dire una soluzione di BCIP/NBT (5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato/nitroblu di tetrazolio) il cui prodotto di reazione è un precipitato di colore blu-viola; la reazione con il substrato enzimatico e con il colorante viene bloccata dopo almeno 72 ore dall'incubazione e l'intensità della colorazione sulle sezioni viene valutata al m.o. a luce visibile.

Per il lavoro sperimentale proposto in questo lavoro l'ISH con la digossigenina è stata utilizzata per valutare variazioni nell'espressione genica dell'ORX2R che sembra avere uguale affinità sia per l'ORX-A che per L'ORX-B. Le sonde oligonucleotidiche utilizzate sono tutte specifiche per il criceto, avendole disegnate sulle sequenze nucleotidiche parziali ottenute dal sequenziamento dei rispettivi prodotti di PCR nei tratti nucleotidici di perfetta omologia con la corrispondente sequenza di *Rattus norvegicus*. L'analisi dei risultati della ISH è stata realizzata attraverso il programma Scion Image, che è ha permesso di valutare la densità ottica (OD) di specifici nuclei encefalici, che è poi stata rielaborata attraverso l'utilizzo di test statistici (ANOVA e Newman-Keuls test).