



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute  
"G. D'Alessandro"

*Dottorato di Ricerca in*  
**NEUROSCIENZE E DISTURBI DEL COMPORTAMENTO**  
*XXII ciclo*

*Coordinatore Prof.ssa Carla Cannizzaro*

---

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ASSE IPOTALAMO-  
IPOFISI-SURRENE , IN SEGUITO ALL'ESPOSIZIONE IN  
UTERO A STRESS ACUTO E CRONICO NELLA PROGENIE DI  
RATTO ADULTA.

Tesi di Dottorato del:  
Dr. Marco La Barbera

BIO/14

*Tutor:*

Ch.ma Prof.ssa Carla Cannizzaro

*Coordinatore*

Ch.ma Prof.ssa Carla Cannizzaro

---

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

1. Introduzione	pag. 3
2. Scopo della Ricerca	pag. 13
3. Materiali e Metodi	pag. 14
4. Procedure Sperimentali	pag. 15
5. Risultati	pag. 25
6. Conclusioni	pag. 34
7. Bibliografia	pag. 38

# 1) INTRODUZIONE

## 1.1 STRESS ED ALLOSTASI

Lo stress è un fattore costante della vita moderna e assume oggi differenti significati. Il sistema neurobiologico di risposta allo stress è stato plasmato dai processi evolutivi per permettere all'individuo di rispondere in maniera efficace ed appropriata agli stimoli ambientali. La possibilità che essi abbiano un effetto positivo o negativo dipende dalle modalità di risposta del sistema neuroendocrino.

Per molti individui lo stress esprime una condizione di eccitamento e cambiamento "*good stress*" per altri riflette uno stato di fatica, frustrazione e preoccupazione "*bad stress*" (McEwen, 2005 F). La risposta allo stress è caratterizzata dall'integrazione di numerose modificazioni fisiologiche, neurochimiche, neuroendocrine, immunologiche e geniche conseguenti all'attivazione del Sistema Neuroendocrino (SNE), e in particolare dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) (Sterling et. al., 1988; Miller et al., 2002).

Si può definire stress ogni alterazione dell'omeostasi, ovvero della stabilità dei sistemi fisiologici necessari al mantenimento della vita. Il mantenimento dell'omeostasi in

risposta agli stimoli stressogeni, chiamati stressors, richiede costanti aggiustamenti di natura ormonale, comportamentale ed autonoma (Miller and O'Callaghan 2002).

È stato dunque introdotto un altro concetto, quello di "allostasi", per descrivere tutti quei processi adattativi che mantengono l'omeostasi mediante le variazioni di mediatori primari come l'adrenalina, il cortisolo e altri messaggeri chimici. Gli stati allostatici possono essere mantenuti solo per periodi limitati al fine di promuovere l'adattamento in seguito ad uno stress acuto; nel caso in cui lo stress diventi cronico, invece, la risposta si può tradurre in un "sovraccarico allostatico", che predispone l'individuo all'insorgenza di diverse patologie (McEwen and Wingfield 2003).

In altre parole, un individuo esposto ad uno stress acuto riesce solitamente a superare, senza particolari conseguenze, l'iniziale squilibrio dato dalla variazione dell'omeostasi; al contrario, se l'alterazione omeostatica si protrae nel tempo, l'individuo può arrivare ad esaurire i propri sistemi di adattamento, manifestando un squilibrio spesso irreversibile del sistema originario.

La cascata di eventi che generano la risposta allo stress inizia con la percezione da parte delle strutture centrali,

corteccia ed ippocampo, dell'evento stressogeno che a sua volta si traduce nella produzione dell'ormone rilasciante la corticotropina (CRH) dall'ipotalamo. Il CRH raggiunge quindi l'adenipofisi, da cui viene quindi secreto l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), il quale, a sua volta stimola la corteccia surrenalica a rilasciare glucocorticoidi e mineralcorticoidi (Miller et al., 2002; Bruijnzeel et. al., 2001; Meany et. al., 1996; Sapolsky, 1994) Fig. 1.

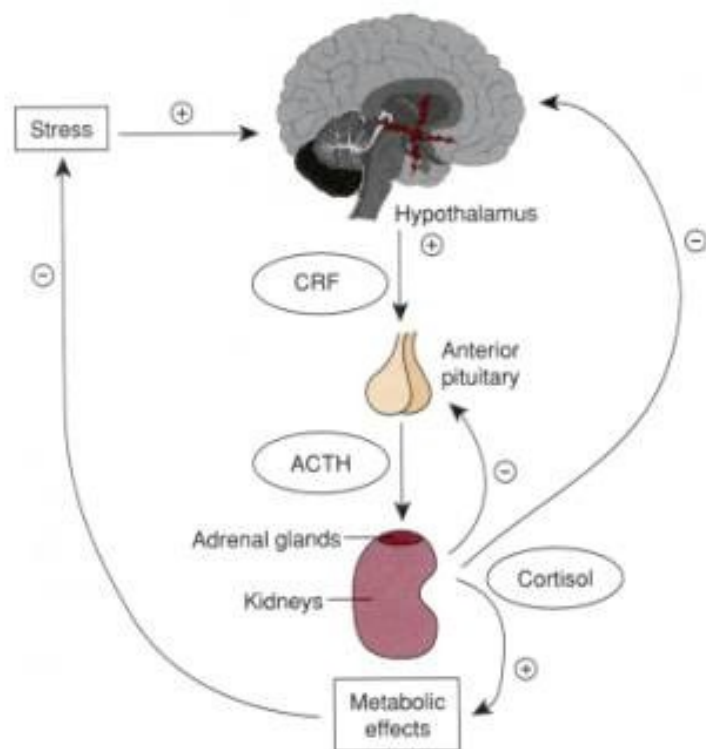


Fig. 1. Le cellule ipotalamiche producono CRF in risposta a differenti tipi di stressors. Il CRF si lega a specifici recettori posti sulla cellule della ghiandola pituitaria le quali, in seguito, rilasciano ACTH che stimola la corticale del surrene a produrre una serie di effetti metabolici che

contrastano gli effetti stress-correlati attraverso un meccanismo a feedback negativo.

Il CRH, oltre a controllare la risposta dell'asse IIS, agisce anche come neuromodulatore in varie strutture extra-ipotalamiche, quali la corteccia, l'amigdala, il nucleus accumbens, il nucleo dorsale del rafe e l'ippocampo, giocando un ruolo cruciale, insieme ai glucocorticoidi e alle catecolamine, nel determinare la componente fisica e la componente emozionale della risposta allo stress. Oltre a modulare il rilascio dei classici neurotrasmettitori noradrenalina e serotonina, il CRH sembra essere in grado di modulare i livelli di numerosi neuropeptidi.

## **1.2 INFLUENZE DEGLI STRESS PRENATALI**

Diversi studi epidemiologici hanno messo in evidenza come gli stili di vita materna, esposizione a diversi agenti neurotossici o infezioni, durante il periodo di gestazione, rappresentino un potenziale fattore di rischio per l'insorgenza di disturbi psichiatrici nella progenie (Brown et al., 1996; Watson et al., 1999; McEwen, 2000), i quali potrebbero essere dovuti a disturbi della funzionalità dell'asse ISS, e alla riduzione della plasticità neuronale. Inoltre, è stato dimostrato, come l'esposizione durante il

periodo di gestazione a stress sia fisici che psicologici (prenatali stress PS) possa influenzare il normale sviluppo della progenie (Stott, 1973; Huttunen and Niskanen, 1978; Mejie, 1985, Watson et al., 1999).

In studi animali il PS è stato associato con l'instaurarsi di varie modificazioni quali: riduzione del peso corporeo e incremento della mortalità alla nascita (Cabrera et al., 1999), disturbi nella regolazione dell'asse ISS (Welberg et al., 2001), incremento dell'ansia (Vallée et al., 1997), alterazioni del sonno (Dugovic et al., 1999), deficit di apprendimento e memoria (Vallée et al., 1990; Gue et al., 2004) e aumento delle sindromi simil-depressive in tarda età (Morley-Flecher et al., 2003).

Le risposte fisiologiche che sottostanno allo stress, sono direttamente correlate al tipo, durata e intensità dell'evento stressante (McEwen et al., 1995). Prolungati stress prenatali causano cambiamenti neurotossici nei neuroni fetali, mentre brevi e precoci stress facilitano lo sviluppo dei sistemi neuronali (Fujioka et al., 2003).

Stress prenatali o postnatali possono diminuire la capacità di legame dei recettori per i glucocorticoidi ippocampali e aumentare la risposta dei glucocorticoidi in presenza di successivi stress (Maccari et al., 2003), cambiamenti sono spesso associati ad alterazioni delle risposte di differenti

sistemi neurotrasmettitoriali quali il noradrenergico, dopaminergico e colinergico (Day et al., 1998; Kofman, 2002). Inoltre, l'influenza di fattori ambientali, durante il periodo di gestazione, può modificare il precoce sviluppo cerebrale alterando le connessioni sinaptiche e danneggiando specifiche funzioni del cervello, come suggerito da deficit di apprendimento associati alla riduzione della neurogenesi ippocampale (Lemaire et al., 2002; Coe et al., 2003).

L'asse IIS è il sistema neuroendocrino maggiormente interessato nella regolazione della risposta allo stress. Esso si sviluppa durante il periodo di vita intrauterina e viene programmato attraverso l'influenza dei glucocorticoidi materni che, attraversando la barriera placentare, si legano ai recettori per gli ormoni steroidei nel cervello del feto (Henry et al., 1994; Weinstock, 2001). È stato dimostrato come differenti tipi di manipolazione durante il periodo dello sviluppo, possono influenzare il normale funzionamento e la successiva capacità di risposta dell'asse IIS nei nuovi nati, nei giovani e negli adulti di molte specie di mammiferi. Esempi di manipolazioni prenatali sono: il prenatale stress, l'esposizione a glucocorticoidi di sintesi e la restrizione alimentare. Viceversa le manipolazioni postnatali sono: il neonatale handling e la separazione materna (Kapoor et al.,



2006). L'asse IIS inizia a svilupparsi, nel ratto, durante il periodo di vita intrauterina, in concomitanza con lo sviluppo dei recettori per i glucocorticoidi GRs. L'mRNA GRs è espresso per la prima volta nell'ippocampo, ipotalamo e pituitaria anteriore al tredicesimo giorno di gestazione e i livelli tendono a crescere durante gli ultimi giorni di gestazione (Diaz et al., 1998).

Numerose ricerche effettuate sul PS hanno messo in evidenza come gli effetti del PS sull'asse IIS causa un aumento dei livelli basali o stress-indotti di ormone adrenocorticotropo (ACTH) e di corticosterone plasmatici (Fride et al., 1986; Peters, 1982). Nei maschi, PS aumenta i livelli di corticosterone plasmatici stress-indotti attraverso la riduzione del feed-back negativo mediato da una riduzione del numero di recettori ippocampali di tipo I e II per il corticosterone (Henry et al., 1994).

L'area cerebrale maggiormente coinvolta nei processi di modificazione neuronali, indotte dagli ormoni placentari materni è l'ippocampo. Difatti, la formazione ippocampale è (i) critica per i processi di apprendimento e memoria, e (ii) costituisce un importante struttura target, coinvolta nei processi legati alla regolazione dell'attività funzionale dell'asse IIS.

Uno dei fattori maggiormente coinvolti nei processi di sviluppo neuronale è il BDNF (Fig 2). Esso è la chiave che contribuisce al normale sviluppo, sopravvivenza, mantenimento e plasticità del sistema nervoso centrale, è espresso, ad alte concentrazioni, sia nell'ippocampo che nella corteccia cerebrale ed è regolato, in particolare, dai livelli di corticosterone circolante (Schimidt-Kastner et. al., 1996). I livelli di corticosterone sono regolati dai recettori Ippocampali per i glucocorticoidi (GRs) e sono implicati nel feed-back negativo dell'asse IIS. È stato dimostrato che eventi prenatali stressanti causano effetti a lungo termine sullo sviluppo dell'asse IIS, attraverso il legame dei glucocorticoidi materni ai recettori per gli ormoni steroidei fetali.

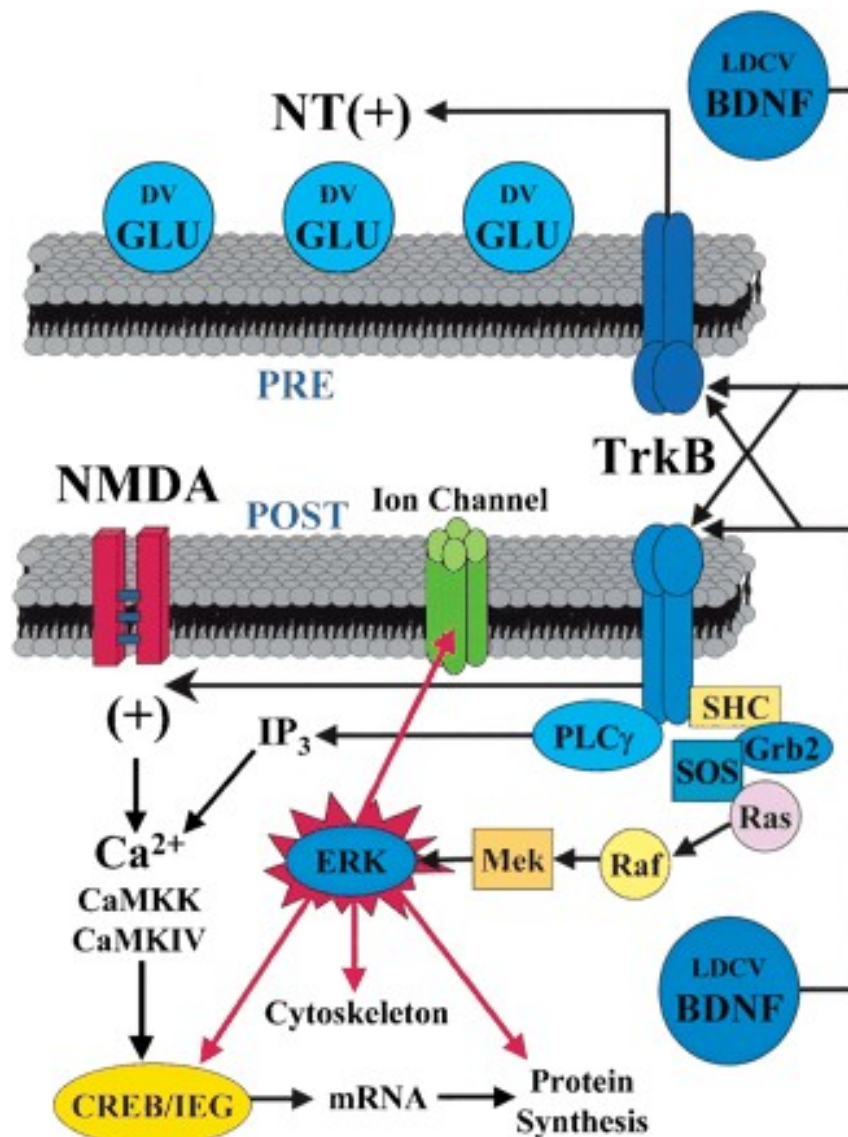


Fig. 2. Il legame BDNF/TrkB attiva la cascata delle MAP-chinasi implicate nei processi di plasticità sinaptica e di memoria e apprendimento (Sweatt, 2001). La figura riassume le evidenze che il BDNF rilasciato agisce sia a livello presinaptico che postsinaptico.

È stato dimostrato come il BDNF aumenti il rilascio nei terminali presinaptici di glutammato. Postsinapticamente il BDNF fosforila le subunità dei recettori NMDA. Il legame BDNF/TrkB attiva la cascata delle MAP-chinasi attraverso l'attivazione di ERK. La fosforilazione di ERK attiva differenti target come il CREB o l'espressione di altri geni precoci, il citoscheletro, la sintesi di proteine e i canali attivati da voltaggio e da ligando.

(LCDV) Large dense core vesicle; (BDNF) brain-derived neurotrophic factor; (DV) docked vesicle; (Glu) Glutamate; (NT) neurotrophin; (Pre) presynaptic terminal; (Post) postsynaptic spine; (NMDA) N-methyl-D-aspartate; (TrkB) tyrosine kinase B receptor; (IP3) inositoltriphosphate; (CaMKK) calcium calmodulin kinase kinase; (CaMKIV) calcium calmodulin kinase 4; (CREB) cyclic AMP response element-binding protein; (IEG) immediate early gene; (ERK) extracellular signal-regulated kinase; (MAPK) mitogen-activated protein kinase; (MEK) MAPK kinase; (PLC- $\gamma$ ) phospholipase C-gamma, (mRNA) messenger RNA); (Raf) proto-oncogenic serine/threonine protein kinase; (Ras) rat sarcoma proto-oncogenic G-protein; (Grb2) growth factor receptor-binding protein 2; (SH-2) src homology domain 2; (SHC) SH-2-containing protein; (SOS) nucleotide exchange factor son of sevenless.

## 2) SCOPO DELLA RICERCA

Partendo da queste osservazioni lo scopo di questo progetto di ricerca si propone di investigare gli effetti dell'esposizione materna ad un intenso stress acuto e cronico nella progenie di ratti maschi adulta su:

- Performance cognitiva: apprendimento, memoria a breve e a lungo termine, capacità visive-tattili-spaziali
- Reattività comportamentale
- Stato emozionale
- L'espressione dei recettori GRs ed MRs su ippocampo ed ipotalamo.

### **3) MATERIALI E METODI**

#### **Animali e gruppi sperimentali**

Sono stati usati ratti del ceppo Wistar (ditta Harlan, Udine, Italia). Gli animali sono stati mantenuti a temperatura costante ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidità relativa ( $55\pm 10\%$ ) e sono stati esposti ad un ciclo giornaliero di 12 ore luce / buio (8:00 - 20:00). Tutti i ratti hanno avuto libero accesso al cibo e all'acqua.

Coppie di ratti di sesso femminile di 120 giorni di età sono state poste in gabbie assieme ad un maschio di 150 giorni di età. È stato definito come primo giorno di gestazione quello in cui è stata osservata la presenza di sperma nel liquido vaginale. Il peso delle ratte, al 16° giorno di gravidanza, era approssimativamente di 300g. Diciotto cucciolate in totale sono state usate per il nostro studio e, in accordo con le condizioni sperimentali, i ratti maschi sono stati divisi in tre gruppi: controlli (C), prenatale stress acuto (sPS) e prenatale stress ripetuto (rPS). Non ci sono state differenze nel numero, nella mortalità e nell'aumento di peso nei ratti appartenenti ai tre gruppi sperimentali. Al 24 PND, i piccoli maschi sono stati rispettivamente posti in gruppi di 3 per gabbia e lasciati nel laboratorio, in condizioni standard, fino all'inizio degli esperimenti.

## **Procedura d'immobilizzazione**

Al 16° giorno di gestazione, le ratte gravide appartenenti al gruppo sPS, sono state immobilizzate per 120 minuti dalle 12:00 alle 14:00, fissando gli arti ad una piattaforma d'acciaio. Le ratte gravide appartenenti al gruppo rPS, sono state sottoposte alla medesima procedura dal 16° al 21° giorno di gestazione.

## **4) PROCEDURE SPERIMENTALI**

### ***4.1 Open field test***

L'attività locomotoria dei ratti maschi in età adulta, è stata misurata con un Opto-Varimex (Columbus Instruments USA). Tale apparecchiatura consiste di un box quadrato, 44 cm di lato e 20 cm di altezza, dotato sui due lati adiacenti perpendicolari di 15 emettitori ad infrarosso. Ogni fascio di luce infrarossa ha un diametro di 0,32 cm, tra di essi vi è una distanza di 2,54 cm. I movimenti e la posizione dell'animale sono indicati dal numero di fasci interrotti. Mediante un sistema computerizzato sono stati calcolati, la distanza totale percorsa (TDT) in cm dall'animale nell'arena, espressione dell'attività locomotoria; il numero di passaggi al centro dell'arena (NCT), la quantità di tempo totale spesa

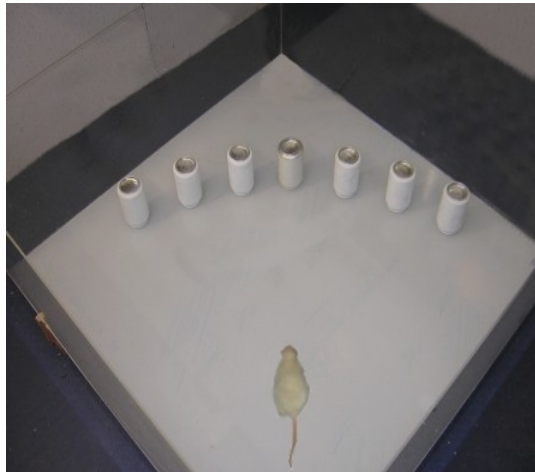
al centro dell'arena (ATC). Trascorso un minuto dall'introduzione del ratto nell'apparecchiatura, la durata di ogni sessione è stata di 5 minuti.

#### ***4.2 Elevated Plus Maze***

L'emozionalità dell'animale adulto è stata misurata tramite l'Elevated Plus Maze. Tale apparecchiatura è costituita da una piattaforma elevata dal pavimento tramite l'ausilio di un piedistallo di 70cm di altezza. L'apparecchio è costituito da due bracci aperti e due bracci chiusi (50cm x 10cm). Tutte e quattro le braccia sono connesse con una piattaforma centrale di 10x10 cm. All'inizio dell'esperimento l'animale viene posto nella piattaforma centrale con la faccia rivolta ad uno dei due bracci aperti. Durante i cinque minuti dell'esperimento, il numero delle entrate nel braccio aperto e in quello chiuso e il tempo trascorso nel braccio aperto e in quello chiuso vengono registrate. Una entrata è considerata tale quando tutte le quattro zampe dell'animale attraversano la linea che separa la piattaforma centrale dai quattro bracci. I risultati sono stati espressi come percentuale del numero delle entrate e del tempo speso nel braccio aperto diviso il totale delle entrate e del tempo speso sia nel braccio aperto, che nel braccio chiuso.



### ***4.3 Can Test***



I ratti, la settimana successiva all'esposizione ai precedenti test comportamentali, venivano gentilmente posizionati all'interno di un'arena, posta in una camera con media intensità di luce. All'interno dell'arena erano presenti 7 lattine poste sottosopra, questo consentiva di ricompensarle, 6 erano verniciate di bianco, mentre quella centrale era rivestita con un nastro isolante bianco. L'arena era di plexiglas (100 x 100 x 43 cm). Le lattine alte 14 cm di altezza, erano poste ad una distanza di 70cm dal punto di partenza del ratto e la distanza tra le lattine era di 7 cm. Il protocollo comportamentale consisteva di due distinte sessioni: shaping period e learning period.

### ***4.3.1 Shaping period***

Lo shaping period durava due giorni. Il primo giorno i ratti venivano posti nell'arena con 7 lattine. Tutte le lattine venivano ricompensate con 0,3 ml di acqua. I ratti venivano posti nell'arena per 20 minuti, durante i quali potevano esplorare l'ambiente e bere da tutte le lattine. Poi gli animali venivano rimossi e riposti nella loro gabbia. Il secondo giorno venivano riempite soltanto 3 lattine, (inclusa la lattina rivestita da nastro isolante bianco). I ratti avevano 10 minuti per esplorare e bere l'acqua. Dopo un intervallo di 15 secondi la procedura veniva ripetuta. Tutti i gruppi di ratti esploravano l'arena, le lattine e il loro contenuto durante lo shaping period.

### ***4.3.2 Learning period***

Il giorno dopo la fine dello shaping period, veniva realizzato il learning period.

Questo consisteva in 4 sessioni sperimentali, in 4 giorni consecutivi (dieci trials per giorno) durante i quali i ratti venivano posti nel compartimento dove la sola lattina rivestita di nastro isolante era riempita e posta in una posizione fissa tra le 6 lattine vuote. Il tempo massimo per

visitare e bere l'acqua in ciascun trial era di 3 minuti. I ratti che riconoscevano la lattina riempita venivano immediatamente rimossi dal compartimento e posti in una piccola gabbia di Plexiglas (50 x 30 x 30 cm). Quando, in ogni trial, il ratto visitava per prima la lattina ricompensata, la performance veniva registrata come risposta corretta (RC); se invece la prima lattina visitata non era quella ricompensata, la risposta veniva registrata come errore di memoria (EM). Per visita si intendeva quando il ratto si alzava sulle zampe posteriori e infilava il naso dentro la lattina. Un ratto veniva considerato attivo quando visitava una qualsiasi lattina. Il numero di trias, in cui il ratto visitava almeno una lattina, indica l'attività (A). Il numero delle risposte corrette veniva valutato in funzione dell'attività: numero delle risposte corrette totali/ numero totale dei trials attivi.

#### **4.4 Procedura dello shock elettrico**

Al termine di tutte le fasi di sperimentazione comportamentale, i ratti erano individualmente posti in una gabbia costituita da un pavimento a griglia, attraverso il quale può essere fatta passare una corrente elettrica di intensità stabilita dall'operatore. La sessione iniziava non

appena il ratto veniva posto all'interno della gabbia sopra citata. I ratti ricevevano uno shock, al quale non potevano sottrarsi, di intensità (0.6mA per 3 secondi) ogni 20 secondi per 1 minuto. Gli animali che servivano per la determinazione dei livelli di corticosterone basali erano posti all'interno della stessa gabbia ma non ricevevano alcun tipo di shock.

#### **4.5 Dosaggio del Corticosterone**

Sono stati effettuati dei dosaggi dei livelli di corticosterone plasmatico, su dei campioni ottenuti: in condizione basale, o dopo 30 minuti dall'esposizione allo shock elettrico. Dopo la decapitazione, il sangue del tronco era raccolto in provette eparinizzate. Dopo una centrifugazione a 3000 rpm a 4°C per 5 min, il plasma era separato e conservato a -80°C prima di effettuare il dosaggio. La concentrazione plasmatica di corticosterone era determinata con la tecnica RIA (IDS, Limited, Boldon, UK).

## 4.6 Espressione dei Recettori GR ed MR

Gli esperimenti relativi all'espressione recettoriale di MRs e GRs, per problemi logistici è stata performata solo sui ratti appartenenti al gruppo sPS e controllo.

Subito dopo la decapitazione, sono stati eseguiti dei prelievi di tessuti di ipotalamo ed ippocampo, i quali sono stati immediatamente congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , per essere poi analizzati secondo la metodica Western blot.

Il giorno del dosaggio, i tessuti sono stati omogeneizzati (Teflon-vetro) (1700 giri/min) a  $+4^{\circ}\text{C}$  in tampone di lisi contenente 10 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10% glicerolo, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoride, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina. Il dosaggio delle proteine è stato effettuato con il metodo Bradford, utilizzando il reattivo Comassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) (Biorad).

Questo reattivo cromoforo si lega ai residui aminoacidici aromatici sviluppando una colorazione tendente al blu (assorbanza massima: 595 nm), la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica presente nei campioni.

Per la costruzione della curva di taratura (range: 25-1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) è stata usata l'albumina di siero bovino (BSA,

frazione V). Prima del dosaggio dei campioni sperimentali, è stato effettuato un esperimento pilota al fine di scegliere la quantità opportuna di proteine totali da caricare in ciascun pozzetto del gel in modo da garantire un segnale finale ottimale. Utilizzando dei tessuti di controllo (ipotalamo e ippocampo) è stato eseguito un Western blot caricando nei pozzetti del gel quantità scalari di lisato proteico (40µg, 60µg, 80µg, 100µg, 120µg, 140 µg, 160 µg, 180 µg, 200 µg di proteina totale). Il segnale migliore è stato quello ottenuto con 60 µg di proteine totali per i recettori GR e 200 µg di proteine totali per i recettori MR. Conseguentemente, per i campioni sperimentali, tali quantità di proteine totali sono state risospese in tampone riducente SDS-blu di bromofenolo contenente 20 mM di Ditiotreitolo. Successivamente, l'elettroforesi è stata eseguita con un apparato "Protean Xi II Cell" (BioRad) usando un gel di SDS-poliacrilamide alla concentrazione del 8%. I campioni e lo standard (di peso molecolare noto) sono stati caricati all'interno dei pozzetti del gel di poliacrilammide e fatti migrare per 14-18 ore tramite una corrente costante di 10 mA. Il trasferimento delle proteine separate è stato effettuato su membrana di nitrocellulosa (BioRad), utilizzando un sistema electroblotting (BioRad, Transblot SD) ad una corrente di 450 mA per 4 ore a +4°C. Per poter

controllare l'efficienza del trasferimento, la membrana è stata colorata con rosso Ponceau (1%) in acido acetico (5%). Al fine di bloccare i siti aspecifici di legame, le membrane sono state incubate per 1 ora in tampone TTBS (10 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-20, pH 7.4), contenente il 2% di latte in polvere privo di lipidi. Le membrane sono state quindi incubate overnight a +4°C con l'anticorpo primario anti-MR (1:200 in TTBS) (Santa Cruz Biotechnology) e anti GR (1:500 in TTBS) (Santa Cruz Biotechnology). Le concentrazioni di anticorpi primari sono state preventivamente saggate su tessuti comparabili provenienti da ratti controllo. Le membrane sono state lavate due volte per 7 minuti in tampone TTBS e poi nuovamente incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario (Amersham Bioscience) diluito in TTBS (anti-rabbit 1:5000). Al fine di verificare l'esatto caricamento delle proteine nei diversi pozzetti, le stesse membrane sono state incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale anti- $\beta$ -actina (1:1000 in TTBS) (Sigma). In seguito, sono state lavate due volte per 7 min. in tampone TTBS e poi nuovamente incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario (Amersham Bioscience) diluito in TTBS (anti-mouse 1:5000).

L'immunomarcatura è stata rivelata mediante il sistema di analisi a chemiluminescenza (ECL, Amersham Bioscience).

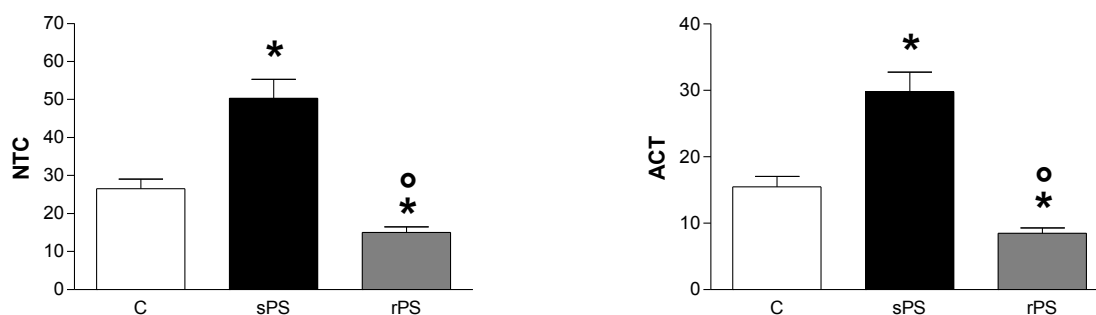
Le lastre fotografiche (Kodak) così ottenute, sono state esposte alla reazione di chemiluminescenza per un tempo pari a 15 min. (GR) e 45 min. (MR). Tale tempistica é stata scelta dopo aver effettuato delle prove preliminari. Nello specifico, le lastre sono state lasciate nelle camere di sviluppo per tempi diversi (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 minuti) al fine di valutare la migliore qualità del segnale (lo sviluppo della lastra non deve dare un segnale sovraesposto altrimenti risulterebbe impossibile valutarne eventuali incrementi o decrementi). La densità ottica delle bande é stata infine determinata utilizzando un software di densitometria ImageJ (National Institutes of Health).



## 5) RISULTATI

### *5.1 Open field test*

La (Fig. 3) mostra i risultati di un ANOVA a due vie performata sulla distanza totale percorsa, numero di transizioni al centro dell'arena e tempo speso al centro dell'arena come variabili dipendenti, e lo stress prenatale acuto e cronico, come variabili indipendenti indicano che: i fattori prenatale stress singolo e ripetuto sono significativi per il tempo speso al centro dell'arena e per il numero dei passaggi al centro dell'arena rispetto ai controlli, così come la loro interazione, non ci sono differenze significative nella totale distanza percorsa. L'analisi post-hoc mostra come un singolo stress prenatale incrementa la capacità esplorativa del ratto come mostrato da alti valori di passaggi e di tempo speso nel centro dell'arena rispetto sia al gruppo C che al gruppo rPS. Il fattore ripetuto stress prenatale determina invece una diminuzione del tempo speso e del numero dei passaggi al centro dell'arena quando confrontato con il gruppo C e con il gruppo sPS.

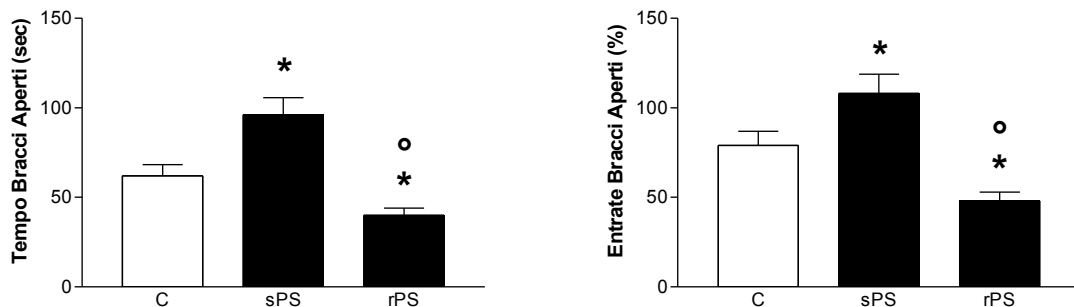


**Fig 3.** Dati di un post hoc Tukey's test performedo su: effetti del sPS e del rPS sul numero di transizioni al centro dell'arena (NTC) e sul tempo speso al centro dell'arena (ACT). Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D. di sei ratti. \* $p < 0.03$  vs. C; <sup>o</sup> $p < 0.03$  vs. sPS.

## ***5.2 Elevated Plus Maze***

I dati sono stati analizzati usando un ANOVA a due vie sulla percentuale del numero delle entrate nei bracci aperti / il numero delle entrate totali nei bracci aperti e chiusi e sulla percentuale del tempo speso nei bracci aperti / il tempo totale speso nei bracci aperti e chiusi come variabili dipendenti, e il singolo stress prenatale e ripetuto stress prenatale come variabili indipendenti (Fig. 4). L'analisi dei dati rivela che i fattori sPS e rPS sono significativi per i parametri esaminati, come la loro interazione. L'analisi statistica post-hoc in particolare indica che:

- il singolo stress prenatale aumenta significativamente la percentuale sia del numero dei passaggi che del tempo speso nei bracci aperti rispetto al gruppo C e rispetto al gruppo rPS
- un ripetuto stress prenatale riduce significativamente la percentuale sia del numero dei passaggi che del tempo speso nei bracci aperti rispetto al gruppo C e al gruppo sPS



**Fig 4** Dati ricavati da un post-hoc Tukey's test eseguito su: effetti del sPS e del rPS come singoli fattori sulla percentuale delle entrate e tempo speso nei bracci aperti confrontati con i ratti C. Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D di sei ratti. \* =  $p < 0,05$  vs. C;

° =  $p < 0,05$  vs. sPS.

### **5.3 Can Test**

I dati ottenuti da questo test sono stati analizzati statisticamente con il modello generale lineare per misure

ripetute, performato per l'intera durata dei giorni del test. Questi risultati, mostravano un significativo effetto nei ratti stressati prenatalmente, su attività, risposte corrette ed errori di memoria.

La (Fig. 5) mostra le performance di apprendimento durante i quattro giorni del "Can test". Il singolo stress prenatale induce un aumento delle performance di apprendimento, come mostrato da alti valori di A, RC e basso numero di EM, quando confrontato con il gruppo C. Inoltre, il gruppo rPS mostra un peggioramento delle performance di apprendimento come mostrato da bassi livelli di A, RC, quando confrontati con il gruppo C e un elevato numero di EM, quando confrontato con il gruppo sPS.

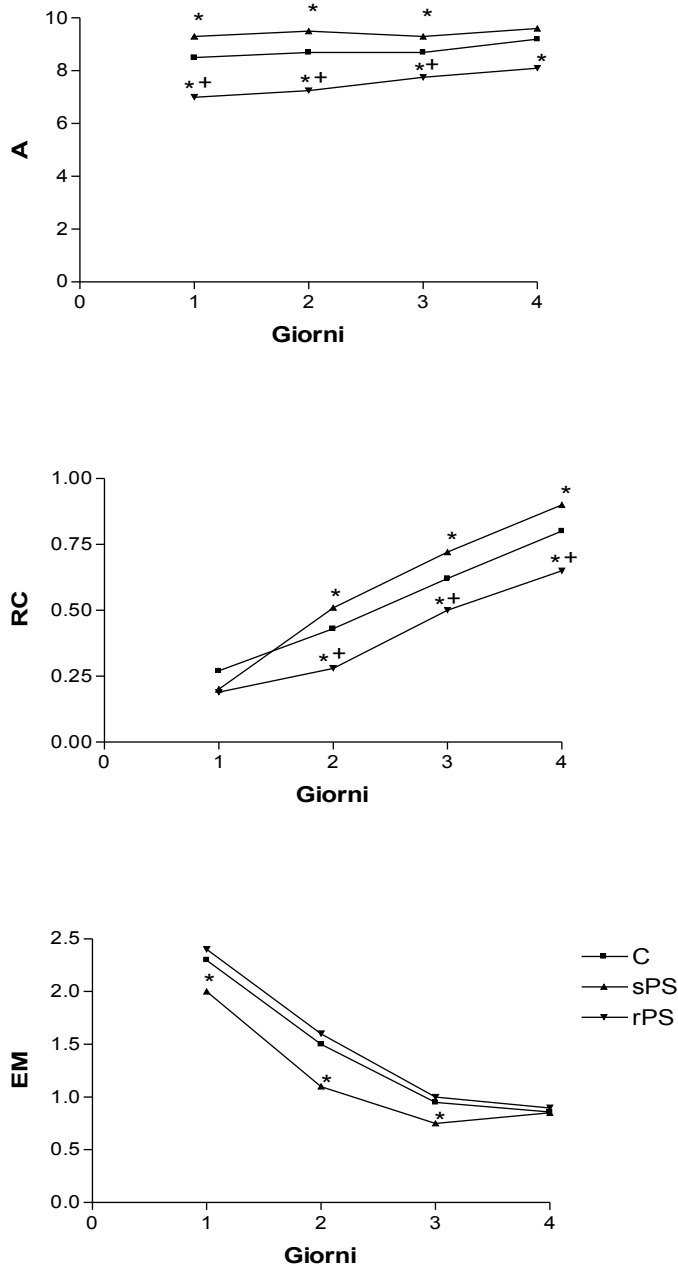


Fig. 5. Dati di un modello generale lineare per l'analisi di misure ripetute seguito da un post-hoc Student's t-test con la correzione di Bonferroni per dati accoppiati. Effetti del sPS e del rPS su Attività (A), Risposte corrette (RC) e errori di memoria (EM). Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D. di sei ratti. \* $p < 0.05$  vs. C; + $p < 0.05$  vs. sPS. C = Controllo; sPS = Singolo stress prenatale; rPS = Ripetuto stress prenatale

## **5.4 Corticosterone**

La (Fig. 6) mostra i dati ottenuti da una ANOVA a due vie performata sui livelli di corticosterone come variabile dipendente e il singolo stress prenatale e ripetuto stress prenatale come variabile indipendente. Le analisi indicano che il fattore singolo stress prenatale e ripetuto stress prenatale sono significativi sia per il rilascio di corticosterone basale sia per quello indotto dall'esposizione a shock, così come la loro interazione.

In particolare, in condizioni basali i livelli di corticosterone plasmatici risultavano:

- diminuiti nel gruppo sPS rispetto sia al gruppo C che al gruppo rPS
- aumentati nel gruppo rPS rispetto al gruppo C

I livelli di corticosterone plasmatico, in seguito all'esposizione a shock elettrico risultavano:

- aumentati nel gruppo C e nel gruppo rPS quando confrontati con i rispettivi livelli basali
- diminuiti nel gruppo sPS rispetto al gruppo C e al gruppo rPS
- aumentati nel gruppo rPS rispetto al gruppo C e al gruppo sPS

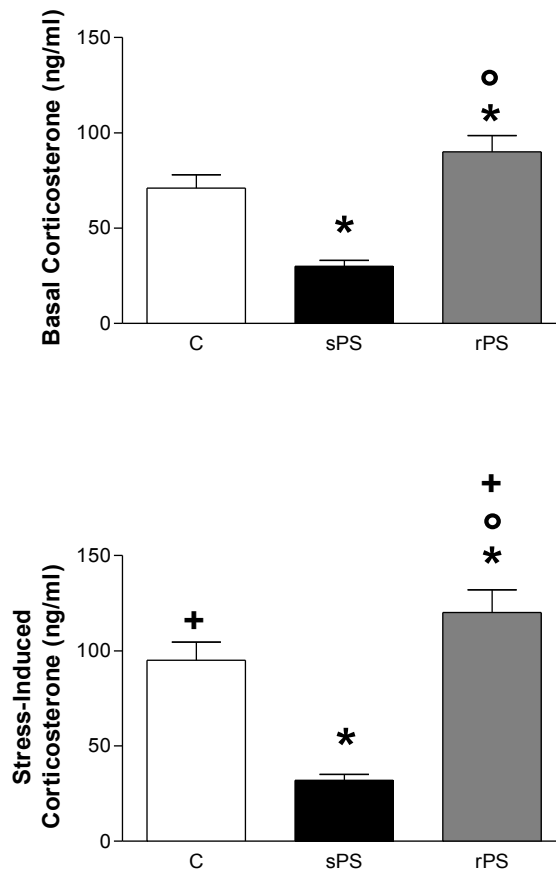


Fig. 6. Dati da un post hoc Tukey's test performed su: effetti del sPS e del rPS sui livelli basali di corticosterone. Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D. di 6 ratti. \* $p < 0.05$  vs. C; ° $p < 0.05$  vs. sPS. Effetti del sPS e del rPS sui livelli di corticosterone stress indotti. Ciascun valore rappresenta una significatività  $\pm$  S.D. di sei ratti. \* $p < 0.05$  vs. C; + $p < 0.05$  vs. i rispettivi livelli basali.

## 5.5 Espressione recettoriale MR, GR

L'analisi statistica dei dati ottenuti, ha mostrato che nell'ippocampo non vi sono differenze significative nell'espressione dei recettori GR tra il gruppo sPS e C; è stata riscontrata invece una differente espressione ippocampale dei recettori MR in seguito ad esposizione a

shock elettrico. In dettaglio, un aumento significativo dell'espressione recettoriale nel gruppo sPS ed un aumento molto significativo nel gruppo C, rispetto ai rispettivi valori basali di riferimento (Fig 7).

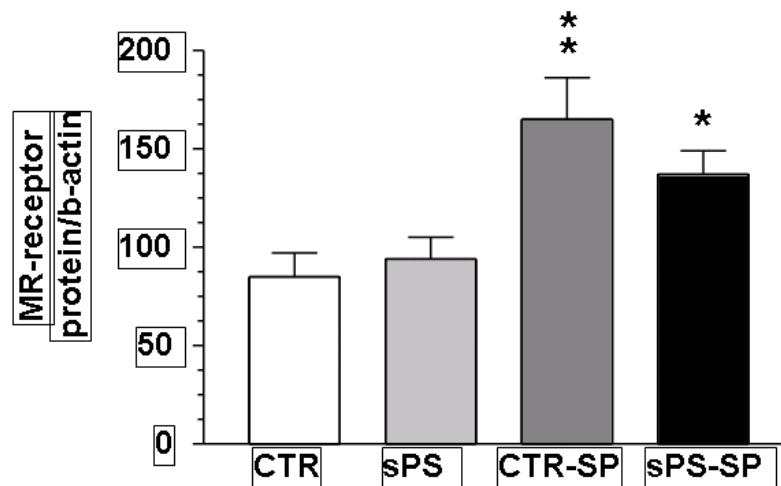
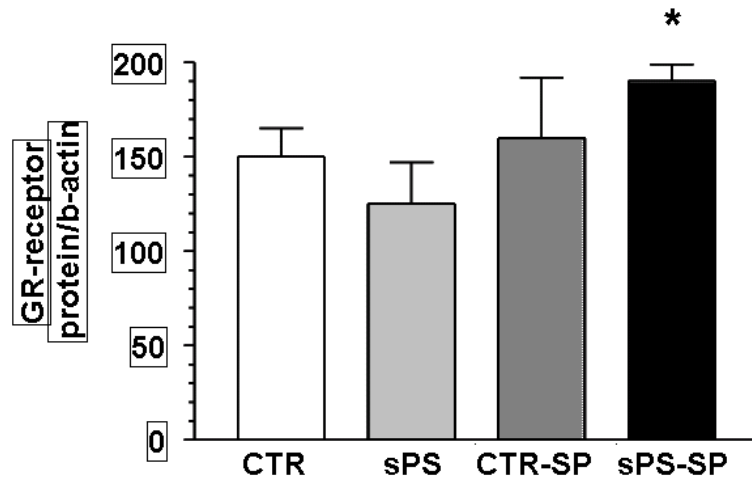


Fig. 7 Espressione dei recettori MR nell'ippocampo. Dati ricavati da un post hoc Tukey's test performed su: effetti del sPS sull'espressione dei recettori MR ippocampali in condizioni basali e shock-indotta. Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D. di 6 ratti. \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs. condizioni basali.

I risultati dell'analisi statistica, condotta sull'espressione recettoriale a livello ipotalamico, non hanno mostrato differenze significative nell'espressione dei recettori MR, al contrario è stata riscontrata una variazione significativa nell'espressione dei recettori GR. In particolare, in condizioni basali è emerso un trend di diminuzione del numero di recettori GR nel gruppo sPS rispetto al gruppo C, ed è stato inoltre riscontrato un aumento statisticamente



significativo nell'espressione dei GR shock-indotta nel gruppo sPS rispetto ai propri livelli basali (Fig 8).



**Fig 8** Espressione dei recettori GR nell'ipotalamo. Dati ricavati da un post hoc Tukey's test performedo su: effetti del sPS sull'espressione dei recettori GR ipotalamici in condizioni basali e shock-indotta. Ciascun valore rappresenta una significatività di  $\pm$  S.D. di sei ratti. \* $p < 0.05$  vs. condizioni basali.

## 6) CONCLUSIONI

I risultati indicano che: l'esposizione allo stress di immobilizzazione, al 16° giorno di gestazione, gruppo sPS, determina un aumento dell'attività esplorativa, una diminuzione dello stato emozionale e un miglioramento della performance di apprendimento; i livelli di corticosterone plasmatici basali e dopo esposizione a shock elettrico risultano più bassi rispetto ai controlli.

L'esposizione nei ratti, dal 16° al 21° giorno di gestazione, allo stress da immobilizzazione, gruppo rPS, causa:

- una diminuzione della reattività comportamentale e un peggioramento della performance di apprendimento;
- un aumento dei livelli di corticosterone basali e indotti dallo shock elettrico, quando confrontati con il gruppo C e con il gruppo sPS.

I meccanismi che sottostanno alle modificazioni comportamentali e neuroendocrine indotte dallo stress prenatale acuto, sebbene tuttora in corso di studio, sembrano rivelare un ruolo chiave giocato dall'attivazione dell'asse IIS nella madre. In particolare, lo stress acuto gestazionale indurrebbe un aumento del corticosterone materno che attraversando la barriera ematoencefalica del

feto, agirebbe su specifici recettori per i glucocorticoidi espressi nell'ippocampo durante l'ultima settimana di gestazione (Maccari et al., 2003), periodo in cui non è ancora completamente sviluppato l'asse IIS del feto. In questa fase, infatti, nel feto sono presenti i recettori MR e GR per i glucocorticoidi, sebbene non sia ancora rilasciato corticosterone. È pertanto ipotizzabile che la secrezione di corticosterone materno in seguito alla procedura di singola immobilizzazione possa promuovere e "imprimere" la maturazione dell'asse IIS fetale attivando gli MRs e i GRs fetali, senza esaurirne la capacità di feedback ippocampale. Il differente grado di sviluppo e di maturazione dell'asse IIS e dell'ippocampo nel gruppo sPS, è responsabile: della maggiore reattività comportamentale e ridotta emozionalità, dei ridotti livelli di corticosterone plasmatico basale e shock-indotti; che si traducono in un ipo-responsività dell'asse IIS e minor paura del nuovo ambiente, e quindi in un potenziamento dei processi di integrazione sensoriale e di attenzione selettiva.

L'incremento shock-indotto dei GRs ipotalamici nei ratti sPS, può ragionevolmente motivare la loro migliore capacità di adattamento alle situazioni stressanti.

L'incremento dei MRs ippocampali nel gruppo CTR rispetto al gruppo sPS sia in condizioni basali che in seguito a shock, probabilmente sottende la differente secrezione di

corticosterone e la diversa capacità di adattamento di questi animali agli stimoli ambientali (Korte 2001).

Al contrario per il gruppo per il gruppo rPS, la sovrastimolazione dei GRs e l'esaurimento degli MRs nei neuroni ippocampali fetali induce una disregolazione funzionale dell'asse IIS a causa della diminuzione del feedback, che determina minore reattività comportamentale ed un maggiore livello di emozionalità.

In definitiva nel gruppo rPS, la sensibilizzazione a lungo termine dell'asse IIS sottende una diminuita capacità di adattarsi agli stimoli ambientali, che determina inoltre una riduzione dei processi di integrazione sensoriale, come evidenziato dalla ridotta performance di apprendimento nel CAN test.

Questo dato, che conferma numerose osservazioni di altri gruppi di ricerca, potrebbe essere interpretato alla luce degli effetti peggiorativi esercitati da una continua attivazione dell'asse IIS materno con conseguente ipersecrezione di corticosterone. Ciò determinerebbe una "*down-regulation*" dei recettori MR fetali, con conseguente interruzione del feedback negativo attuato da questi recettori sull'asse IIS fetale, e ad un'aumentata espressione dei recettori GR fetali responsabili dell'incremento della liberazione di CRF nell'amigdala e nell'ipotalamo con un

meccanismo "*feed-forward*". La mancata inibizione dell'asse IIS, porta ad un aumento dei livelli di corticosterone circolante nella progenie di ratto come osservato nel mio studio, con conseguente peggioramento delle performance di apprendimento e memoria. Ciò assume una particolare rilevanza clinica, e dunque sociale, poiché potrebbe portare all'identificazione di specifici *targets* per la prevenzione delle psicopatologie stress-correlate.

In ultima analisi, questo studio dimostra come lo stress non è da intendere in senso assoluto come un "pericolo" ma, se in piccole "dosi" può fungere da stimolo per la sopravvivenza dell'individuo. Riflettendoci in effetti, la capacità adattativa è da sempre stata l'arma che gli esseri viventi hanno abilmente saputo sfruttare per rimanere in vita di fronte alle difficoltà, e come Darwin ci ha insegnato, risiede proprio in questo il segreto dell'evoluzione.

## 7) BIBLIOGRAFIA

Brown, A.S., Susser, E.S., Buthler, P.D., Richardson Andrews, R., Kaufmann, C.A. & Gorman, J.M. (1996) Neurobiological plausibility of prenatal nutritional deprivation as a risk factor for schizophrenia. *J. Nerv. Ment. Dis.* 184, 71-85.

Bruijnzeel, A.W., Stam, R., Compaan, C. J., Wiegant, M.V. (2001) Stress-induced sensitization of CRH-ir but not P-CREB-ir responsivity in the rat central nervous system. *Br. Res.* 908, 187-196.

Cabrera, R.J., Rodriguez-Echandia E.L., Jatuff, A.S., Foscolo, M. (1999) Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1229-1237.

Coe. C.L., Kramer. M., Czeh. B., Gould. E., Reeves. A.J., Kirschbaum. C. & Fuchs. E. (2003) Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol. Psychiatry.* 54, 1025-1034.

Day. J.C., Koehl. M., Deroche. V., Le Moal. M. & Maccari. S. (1998) Prenatal stress enhances stress- and corticotropin-releasing-factor-induced stimulation of hippocampal acetylcholine release in adult rats. *J. Neurosci.* 18, 1886-1892

Diaz. R., Brown. R.W. & Seckl. J.R. (1998) Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J. Neurosci.* 18, 2570-2580.

Dugovic, C., Maccari, S., Weibel, L., Turek, F.W., Van Reeth, O. (1999) High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alteration. *J. Neurosci.* 19, 8656-8664.

Fride. E., Dan. Y., Feldon. J., Halevy. G., Weinstock. M. (1986) Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav.* 37, 681-687.

Fujioka. T., Fujioka. A., Endoh. H., Sakata. Y., Furukawa. S. & Nakamura S. (2003) Maternal-foetal coordination of stress-induced Fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus during pregnancy. *Neurosci.* 118, 409-415.

Gue. M., Bravard. A., Meunier. J., Veyrier. R., Gaillet. S., Recasens. M., Maurice. T. (2004) Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behav. Brain. Res.* 150, 149-157.

Henry. C., Kabbaj. M., Simon. H., Le Moal. M., Maccari. S. (1994) Prenatal stress increases the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J. Neuroendocrinol.* 6, 341-345.

Huttunen, M.O., Niskanen, P. (1978) Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry.* 35, 429-431.

Kapoor. A., Dunn. E., Kostaki. A., Andrews. H.M. & Matthews. S.G. (2006) Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol.* 572, 31-44.

Korte, SM. (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci Biobehav Res.* 25, 117-142.

Kofman. O. (2002) The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 457-470.

Lemaire. V., Koehl. M., Le Moal. M. & Abrous. D.N. (2002) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97, 11032-11037.

Maccari. S., Piazza. P.V., Kabbaj. M., Barbazanges. A., Simon. H. & Le Moal. M. (2003) Prenatal stress and long-term consequences: implication of glucocorticoid hormones. *Neurosci. Biobehav.* 27, 119-127.

McEwen, B.S. & Sapolsky R.M. (1995) Stress and cognitive function. *Cur. Opin. Neurobiol.* 5, 205-216.

McEwen, B.S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172-189.

McEwen, B.S. and Wingfield, C.J. (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormon and Behav.* 43, 2-15.

McEwen, B.S. (2005) Stressed or Stressed out: What is the difference?. *J. Psychiatr. Neurosci.* 30(5), 315-318.

Meany. MJ., Bhatnagar. S., Larocque. S., McCormick. CM., Shanks. N., Sharma. S., Smythe. J., Viau., Plotsky. PM. (1996) Early environment and the development of



individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. In: Pfeffer CR, editor. *Severe stress and mental disturbance in children*. Washington, DC: American Psychiatric Press Inc; 85-127.

Mejie. A. (1985) Chil psychiatric sequelae of maternal war stress. *Acta. Psychiar. Scand.* 72, 505-511.

Miller, D.B. and O'Callaghan J.P. (2002) Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 51, 5-10.

Morley-Flecher. S., Darnaudery. M., Koehl. M., Casolini. P., Van Reeth. O., Maccari. S. (2003) Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianepine. *Brain. Res.* 989, 246-251.

Peters, D.A. (1982) Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 721-725.

Sapolsky, R.M. (1992) Neuroendocrinology of the stress-response. In: Becker J, Breedlove SM, Crews D, editors. *Behavioural Endocrinol.* Cambridge, MA: MIT Press; 287-324.

Schimdt-Kastner R, Wetmore C, Olson L. (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neurosci.* 74: 161-83.

Stott, D.H. (1973) Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev. Med. Child. Neurol.* 15, 770-787.

Selye, H. (1946) The general adaptation syndrom and the disease of adaptation. *J. of. Clinic. Endocrinol.* 6, 117-231.

Sterling, P., Eyer, J. (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology, in: S. Fisher, J. Reason (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, John Wiley & Sons, New York, 629-649.

Vallée, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal M., Simon, H., Maccari. S. (1997) Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17, 2626-2636.

Vallée, M., Maccari. S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal M., Mayo, W. (1999) Long term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2906-2916.

Watson, J.B., Mednick, S.A., Huttunen, M., Wang, X. (1999) Prenatal Teratogens and the development of adult mental illness. *Dev. Psychopathol.* 11, 457-466.

Weinstock. M. (2001) Alteration induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427-451.

Welberg, L.A., Seckl, J.R. (2001) Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J. Neuroendocrinol.* 13, 113-128.