



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



Università degli studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN

Neuroscienze

Ciclo XXVII

Effetto della separazione materna sulla plasticità dei neuroni nell'ippocampo delle mamme e della prole

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14

Dottorando: **Dott.ssa Valentina Maria Melis**

Coordinatore: **Prof. Walter Fratta**

Tutor: **Prof. Giovanni Biggio**

Relatore: **Prof. Enrico Sanna**

Anno Accademico:2013-2014

Indice

Stress	pag. 1
Obiettivi	pag. 28
Introduzione	pag. 32
Stress e neurogenesi	pag. 33
Immunomarcatura	pag. 43
Spine dendritiche	pag. 49
Materiali e Metodi	pag. 64
Risultati	pag. 81
Discussione	pag. 104
Bibliografia	pag. 113

Stress

Lo stress

Il termine stress è nato da uno studio di Hans Selye del 1936. Già l'anno prima lo stesso autore ne aveva fatto cenno, indicando con quel termine “...uno stato di tensione aspecifica della materia vivente....”, che si manifesta mediante trasformazioni morfologiche tangibili in vari organi, e particolarmente, nelle ghiandole endocrine che stanno sotto il controllo dell'ipofisi anteriore.

Oggi nel linguaggio comune, si parla di stress come di un evento negativo, ma in realtà è piuttosto un meccanismo di adattamento fisiologico a situazioni diverse dal normale, che ci permette di affrontare determinate condizioni. Esso è quindi una risposta adattativa che l'organismo mette in atto ogni qual volta riceve stimoli dall'ambiente esterno in grado di modificarne il normale equilibrio.

Il termine “stress” comprende una serie di eventi interni ed esterni di varia natura, che tendono ad alterare il normale equilibrio omeostatico dell'organismo (digiuno, dolore, traumi fisici, infezioni, forti emozioni, situazioni di pericolo, etc.). Il fine ultimo dell'organismo sottoposto allo stress è quello di mettere in atto delle risposte adattative per tentare di ristabilire l'omeostasi. Si tratta di risposte comportamentali (allerta, vigilanza, attenzione, etc.), vegetative (aumento dell'attività cardio-vascolare, dell'attività respiratoria, della diminuzione dell'attività del sistema gastrointestinale, della disponibilità di energia per il SNC (sistema nervoso centrale) e i centri coinvolti nelle risposte allo stress, etc.), ed endocrine (produzione di ormoni come corticosteroidi e catecolamine) che, attraverso un'estesa azione metabolica e vegetativa, rendono l'organismo più resistente e ne aumentano le prestazioni.

Si possono distinguere tre fasi di adattamento allo stress:

- nella **fase di allarme** l'organismo, sottoposto ad un evento stressante, si attiva con una reazione di stress acuto in cui vengono mobilitate le difese dell'organismo (si ha una iperattivazione corticosurrenale);

- nella **fase di resistenza** l'organismo è impegnato a fronteggiare lo stress e si continua ad avere una iperproduzione di cortisolo;
- la **fase di esaurimento** subentra quando l'esposizione allo stress si protrae, oppure si ha difficoltà a fronteggiare lo stesso. In questa fase la corteccia surrenale entra in uno stato di esaurimento funzionale e si creano danni dal punto di vista fisiologico, comportamentale e psicologico.

Se di breve durata, lo stress viene definito acuto, mentre se protratto nel tempo viene definito cronico. Se lo stress, che si presenta ripetutamente nel tempo, è sempre della stessa natura si parla di stress omotipico, altrimenti lo si definisce stress eterotipico. Quando un organismo è esposto a una situazione stressante, è necessaria un'azione immediata. L'attività di più sistemi in tutto il corpo e il cervello devono essere coordinati per sviluppare una risposta di adattamento all'evento stressante (risposta di lotta o fuga). In periferia questo si traduce in aumento del flusso sanguigno ai muscoli e al cuore, mentre il sistema immunitario è inibito. Nel cervello tutti i processi cognitivi devono essere rivolti a una risposta di adattamento alla situazione potenzialmente pericolosa, tutti i processi che non sono immediatamente necessari saranno inibiti. La maggior parte di queste azioni rapide di stress sono indotte attraverso il sistema nervoso autonomo, che coinvolge l'adrenalina e la noradrenalina. I meccanismi endocrini coinvolti nella risposta allo stress sono sotto il controllo dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (IIS), che con una risposta a tappe, partendo a livello centrale dall'ipotalamo e arrivando alla ghiandola surrenale, regola la secrezione di ormoni (tra i quali il più importante è il cortisolo nei mammiferi o corticosterone (CTS) nei roditori) coinvolti in queste risposte.

L'asse IIS rappresenta il principale coordinatore delle risposte metaboliche e comportamentali dell'organismo alle diverse situazioni di stress. L'ipotalamo, come risposta a segnali provenienti dai centri nervosi superiori, secreta nel circolo portale ipofisario l'ormone di rilascio per la corticotropina (CRH). Le cellule dell'adenoipofisi rispondono al CRH con la secrezione

dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) che, a sua volta, stimola la sintesi e la secrezione di corticosteroidi dalla ghiandola surrenale. La loro concentrazione è mantenuta costante da un meccanismo di regolazione a feed-back negativo: innalzamenti dei livelli circolanti di corticosteroidi, agendo a livello dell'ippocampo, dell'ipotalamo e dell'ipofisi, inibiscono la produzione di CRH e ACTH.

Stress e sviluppo cerebrale

Nei mammiferi, generalmente, l'infanzia e l'adolescenza costituiscono un periodo di alta plasticità del sistema nervoso centrale (*Greenough et al., 1987; O'Leary et al., 1995*). Molte evidenze sperimentali dimostrano che le situazioni stressanti, siano esse fisiche o psicologiche, che si presentano durante la vita prenatale e postnatale nella vita dell'animale, possono influenzare negativamente lo sviluppo del cervello e il successivo comportamento in età adulta (*Anisman et al., 1998; Wiess and Feldon, 2001*), così come nell'uomo le esperienze negative dell'infanzia e dell'adolescenza possono aumentare la probabilità che si manifestino disturbi psichiatrici come la schizofrenia, la depressione e i disturbi d'ansia (*Lewis and Niller, 1990; Weinberger, 1987; Heim and Nemeroff, 2001*).

L'infanzia è il periodo che va dalla nascita alla fase di pre-adolescenza e adolescenza. A 6 anni, un bambino ha un cervello di dimensioni che vanno dal 90 al 95% rispetto a quelle dell'adulto. Un dato acquisito è che si nasce forniti della maggioranza dei neuroni che il cervello potrà mai avere, ma questi sono meno di quelli che si avevano durante la vita intrauterina. Gli essere umani raggiungono la massima densità cerebrale fra il terzo ed il sesto mese di gestazione, cioè il periodo di culminazione dell'esplosiva crescita neuronale prenatale. Durante i mesi finali prima della nascita, il nostro cervello subisce una drammatica riduzione durante la quale le cellule cerebrali non necessarie sono eliminate. Alla nascita, il cervello umano è ben lontano dall'essere completamente formato. Sebbene lo sviluppo più intenso avvenga durante l'infanzia, il cervello continua comunque a forgiarsi per tutta la vita. Durante l'infanzia continua il processo noto come

“*pruning*” (potatura) in cui il cervello perde effettivamente le connessioni neuronali meno usate, formandone altre molto forti nei circuiti sinaptici più utilizzati (Figura 1A e 1B).

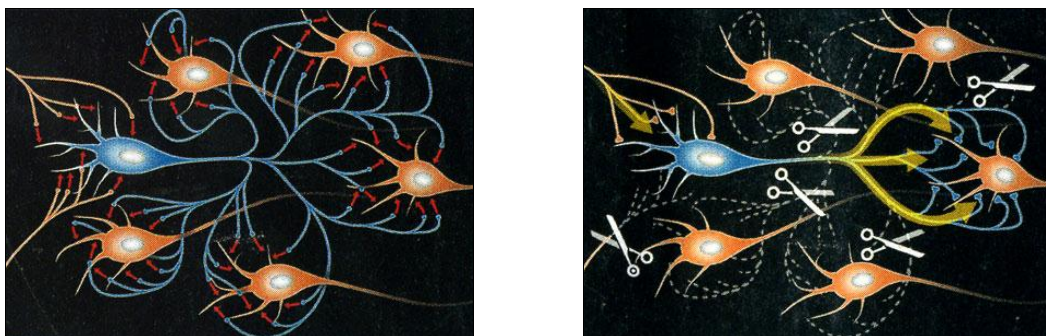


Figura 1. A) Processo di proliferazione neuronale durante l'infanzia. B) Processo di *pruning*.

Questi processi sono fondamentali per lo sviluppo del cervello nell'infanzia, infatti malattie come l'ADHD e la sindrome di Tourette, che si manifestano in età prescolare, possono essere correlate al periodo di proliferazione cerebrale. Sebbene entrambe le malattie abbiano radici genetiche, la rapida crescita del tessuto cerebrale nella prima infanzia, specialmente nelle regioni ricche di dopamina, può creare la base per l'aumento delle attività motorie e dei tic nervosi.

Tutti gli stimoli ambientali subiti durante l'infanzia giocano un ruolo fondamentale in quanto contribuiscono a modellare il cervello e questo è dimostrato dal fatto che i neonati apprendono velocemente durante i primi mesi di vita grazie a stimoli visivi, uditivi, tattili e olfattivi provenienti dall'ambiente in cui crescono. Quindi, un ambiente favorevole sembrerebbe essere un fattore predisponente per un corretto sviluppo del cervello.

Esperienze negative durante questo periodo, quali abusi subiti durante l'infanzia o privazione delle cure familiari, possono provocare alterazioni nello sviluppo del cervello che durano per tutta la vita, poiché alterano sia la funzionalità che la morfologia del cervello. Ci sono, infatti, evidenze di come il volume cerebrale di bambini che sono stati trascurati dalla madre sia ridotto

rispetto a bambini che hanno ricevuto maggiori cure materne. Queste alterazioni sembrano inoltre essere correlate all'insorgenza di psicopatologie in età adulta, quali schizofrenia, depressione e altri disturbi dell'umore.

L'adolescenza è l'altro periodo cruciale per lo sviluppo del cervello. E' difficile identificare con esattezza l'inizio e la fine di questo periodo perché non ci sono dei segnali evidenti che ne segnano l'esordio e la cessazione. Durante questo periodo, infatti, il cervello non solo è lontano dall'essere maturo, ma sia la sostanza grigia che quella bianca sono sottoposte ad estesi cambiamenti strutturali.

Queste differenze tra il cervello in via di sviluppo dell'adolescente e quello ormai maturo dell'adulto possano giustificare i comportamenti degli adolescenti: esplosioni emozionali, sfida temeraria del rischio, infrazione delle regole, ecc. Alcuni esperti ritengono che i cambiamenti strutturali individuati nel cervello degli adolescenti possano spiegare l'insorgenza di importanti malattie mentali come la schizofrenia ed il disordine bipolare. Queste malattie di solito iniziano nell'adolescenza e contribuiscono ad elevare il tasso di suicidi tra gli adolescenti.

Il comportamento incontrollato, un tempo attribuito alla "tempesta ormonale", inizia ad essere visto come l'effetto di due fattori: da una parte la produzione abbondante di ormoni e dall'altra la carenza di un controllo di tipo cognitivo necessari per un comportamento maturo.

Durante lo sviluppo cerebrale il cervello va incontro a diverse ondate di proliferazione e sfoltimento neuronale: al contrario dei cambiamenti prenatali, durante l'adolescenza questo incremento e decremento neurale non altera il numero delle cellule nervose, ma il numero delle connessioni tra di esse (fig 1A e 1B). Tra i 6 e i 12 anni di età i neuroni crescono più fitti, sviluppando diverse connessioni con altri neuroni e creando nuove vie per gli impulsi nervosi. Durante l'adolescenza quindi ci sono meno connessioni ma più veloci. Questi processi avvengono in tempi diversi nei due sessi, infatti nelle femmine questo processo raggiunge il culmine a 11 anni, nei maschi invece a 12 anni e mezzo.

La maggior parte dello sviluppo cerebrale sembra seguire un piano prestabilito dalla programmazione genica, ma altri cambiamenti del cervello sono influenzati oltre che dall'esperienza, anche dall'ambiente. Attraverso lo studio dei gemelli, che partono con una programmazione genetica identica ma che poi si differenziano poiché la vita li porta su strade diverse, è stato possibile sottolineare l'importanza che possono avere l'ambiente in cui un adolescente cresce e le esperienze di vita a cui va incontro nella maturazione del sistema nervoso.

Indipendentemente da come un determinato cervello si trasforma, il suo sviluppo procede a stadi; alcune delle regioni cerebrali che raggiungono per prime la maturità, attraverso le fasi di proliferazione e recisione, sono quelle della parte posteriore del cervello che mediano il contatto diretto con l'ambiente controllando le funzioni sensoriali come la vista, l'udito, il tatto ed i processi spaziali. L'ultima parte del cervello a subire la recisione sinaptica e ad essere conformata alle sue dimensioni adulte è la corteccia prefrontale, sede delle cosiddette funzioni esecutive e di pianificazione, individuazione delle priorità, organizzazione del pensiero, soppressione degli impulsi, valutazione delle conseguenze delle proprie azioni. In altre parole, l'ultima parte del cervello a crescere è la parte capace di decidere.

Questo è molto importante in quanto le differenze comportamentali degli adolescenti sono causate proprio da questa maturazione tardiva della corteccia: infatti, mentre negli adulti le informazioni decisionali sono elaborate dalla razionale corteccia prefrontale, nell'adolescente è l'amigdala (nucleo che regola emozioni come l'ansia, l'aggressività e l'impulsività che in questo periodo raggiunge il suo massimo spessore) l'area coinvolta nei processi emozionali, perché la corteccia non è ancora sviluppata.

Inoltre, questo sfoltoimento neuronale sembra essere correlato con l'insorgenza della schizofrenia che fa la sua comparsa durante il rimodellamento della corteccia prefrontale. Questo potrebbe essere dovuto ad un'anomalia nel processo di *pruning* oppure si pensa che la schizofrenia abbia

un'origine prenatale, ma si manifesta quando il cervello riduce le connessioni. Studi di risonanza magnetica hanno infatti dimostrato che, mentre l'adolescente medio perde circa il 15% della sua materia grigia corticale, quelli che sviluppano la schizofrenia ne perdono il 25%.

I differenti tempi di maturazione tra amigdala e corteccia prefrontale potrebbero spiegare perché gli adolescenti spesso reagiscono più impulsivamente degli adulti.

Diversi studi dimostrano, infatti, come l'impulsività dell'adolescente sia strettamente correlata all'uso di diverse sostanze d'abuso (nicotina, cannabis, alcool, ecstasy, cocaina, allucinogeni); l'utilizzo di queste sostanze potrebbe essere dovuto alla necessità dell'essere accettati dai coetanei o dare dimostrazioni di potere o ancora per compensare disagi familiari. Negli ultimi anni si è assistito ad un consumo di droghe in età sempre più precoce; la fase più critica sembrerebbe essere rappresentata dall'ingresso alla scuola media. Studi scientifici hanno dimostrato che l'utilizzo di sostanze stupefacenti in adolescenza è correlato ad una maggiore insorgenza di malattie psichiatriche, quali depressione maggiore, in età adulta.

Nonostante ci siano ancora molte domande senza risposta, possiamo affermare con sicurezza che l'infanzia e l'adolescenza sono periodi di grande vulnerabilità per il cervello e che situazioni stressanti vissute in questi periodi provocano dei cambiamenti che possono durare per tutta la vita.

Separazione materna e isolamento sociale come modelli sperimentali di stress cronico

Studi comportamentali nei roditori hanno dimostrato che le manipolazioni ambientali nelle diverse fasi della vita possono avere conseguenze profonde e durature sulla vulnerabilità e resilienza allo stress.

L'ambiente prenatale e neonatale nei mammiferi influenza fortemente lo sviluppo, e se compromesso può gravemente alterare le funzioni fisiologiche, comportamentali e cognitive in individui giovani e adulti. Nei roditori è noto come nel periodo prenatale, lo stress materno durante la gestazione, o l'attivazione immunologica causata da diversi agenti patogeni, aumentano il rischio di disturbi nello sviluppo neurologico e cerebrale durante la fase neonatale e la vita adulta (*Howerton e Bale, 2012; Laloux et al, 2012*). Lo stress prenatale influenza l'asse ipotalamo-ipofisi surrene (HPA), con una gravità che dipende dallo stadio gestazionale di esposizione allo stress, e dal sesso dell'animale. I meccanismi alla base coinvolgono complesse interazioni tra l'ambiente ormonale materno, la placenta e il feto in via di sviluppo. Anche lo stress neonatale è dannoso, in particolare nella prima infanzia, un periodo critico per lo sviluppo del cervello durante il quale la prole dipende quasi interamente da genitori o tutori. Infatti è stato accertato che il sistema nervoso centrale durante questo periodo, si trova in una fase di elevata plasticità neuronale (*Greenough et al., 1987; O'Leary et al., 1994*), e sono molti gli studi che dimostrano come situazioni stressanti (fisiologiche e patologiche) durante le prime esperienze di vita dell'animale, possono influenzare negativamente lo sviluppo neuronale e conseguentemente il comportamento in età adulta (*Anisman et al., 1998; Weiss et al., 2001*). Poiché nei roditori il ruolo paterno è marginale, la prole si affida completamente alla propria madre ed è notevolmente influenzata da qualunque cambiamento nella qualità, quantità e affidabilità delle cure materne. Elevati livelli di cure materne come licking–grooming e nursing hanno effetti benefici per tutta

la vita e in età adulta, mentre bassi livelli possono portare a sintomi depressivi, come, ansia e alterazioni della sfera cognitiva e dei comportamenti sociali (*Myers-Schulz e Koenigs, 2012*). Allo stesso modo negli esseri umani, l'attaccamento materno, l'ambiente affidabile e sicuro durante l'infanzia sono favorevoli a predisporre gli individui alla resilienza (*Jaffee, 2007*), al contrario la trascuratezza, l'abuso fisico e sessuale, o altri eventi traumatici aumentano il rischio di sviluppare disturbi dell'umore e dei rapporti affettivi nella vita adulta (*Dietz et al., 2011; Hulme, 2011*). Cambiamenti nelle qualità e quantità delle cure materne possono verificarsi a causa della variabilità naturale e individuale della maternità, ma possono anche essere indotti sperimentalmente nei roditori mediante specifiche manipolazioni.

Separazione materna

Le interazioni sociali e gli stimoli ai quali gli esseri umani, ma anche altre specie animali come ratti, topi e scimmie, vengono esposti in giovane età, influenzano in maniera profonda determinate componenti neurobiologiche e comportamentali ad esse associate. In particolare, le cure materne rivestono un ruolo importante nella formazione e nello sviluppo della prole e possono influenzare il lato psicobiologico del soggetto (*Harris, 1999*). La trasmissione transgenerazionale delle cure materne è dimostrabile nei roditori, i quali manifestano, nei confronti della propria prole, dei moduli comportamentali ben definiti e facilmente individuabili, come il *licking-grooming* (i piccoli vengono leccati nella zona ano-genitale e peri-orale) e l'*arched-back nursing* (allattamento in piedi con la schiena inarcata); tali atteggiamenti, secondo la letteratura scientifica, riflettono il "comportamento affettuoso" delle madri (*Myers e coll., 1989; Levine, 1994*), che regola le funzioni fisiologiche dei figli e ha effetti sullo sviluppo del sistema nervoso centrale (*Liu et al., 1997*).

Nei roditori le cure materne hanno inizio al momento della nascita dei piccoli, sotto la spinta del cambiamento delle condizioni endocrine che si verifica durante il parto, quando calano bruscamente i livelli di progesterone e aumentano quelli di prolattina ed estrogeni. Le variazioni ormonali da sole non sono però sufficienti a garantire il mantenimento delle cure materne. Infatti, è vero che i cambiamenti ormonali nell'ultima fase della gravidanza e durante tutto il periodo post-partum attivano il circuito neurale del comportamento materno che coinvolge diverse aree cerebrali (l'area preottica mediale dell'ipotalamo, il setto laterale, il nucleo accumbens e l'amigdala), ma è il comportamento degli stessi cuccioli e gli stimoli ad essi correlati, come odori, suoni e sensazioni tattili ma anche l'attivazione del sistema dopaminergico (quindi il sistema di gratificazione), ad indurre nella madre un forte stimolo motivazionale a continuare le cure materne, anche quando i livelli ormonali diminuiscono (*Clinton S.M. et al., 2007*).

Il periodo pre e postnatale è un'opportunità per la madre di influenzare, attraverso le interazioni madre-figlio, alcune caratteristiche della propria prole mediante diversi meccanismi. Durante la gestazione, infatti, le interazioni tra la madre ed il feto sono critiche per la crescita e lo sviluppo, per cui variazioni durante questo periodo possono modificare l'integrità fisiologica e psicologica dei piccoli. Allo stesso modo, le cure ricevute nella fase postnatale possono produrre una mutazione nello sviluppo del sistema neuronale che regola la risposta a nuovi stimoli e ai comportamenti sociali (*Meaney, 2001*). Lo stress precoce, come le ridotte cure materne o la separazione materna, sono la causa di incrementi della sensibilità del sistema noradrenergico e serotoninergico che persistono per tutta la vita (*Francis et al. 1999*), come l'aumento del turnover della noradrenalina nella corteccia prefrontale mediale (*Pei, Zatterström and Fillenz 1990*) e la riduzione dei livelli del recettore 5HT_{1B} nell'ippocampo (*Kikusui et al., 2005*). Considerata l'importanza del sistema serotoninergico e noradrenergico nell'eziologia delle malattie psichiatriche come ansia, depressione, schizofrenia e disturbo bipolare, queste evidenze

suggeriscono che un'alterazione di questi meccanismi durante i primi eventi vitali può rendere un individuo più vulnerabile alle patologie psichiatriche (Heim et al., 1997).

Per Liu e coll. (1997) gli effetti del primo ambiente sullo sviluppo delle risposte allo stress da parte dell'asse IIS riflettono una naturale plasticità che in epoca postnatale trova una programmazione nelle cure materne, le quali sono in grado di attivare le prime risposte biologiche a stimoli avversi. Tale plasticità permetterebbe agli animali di adottare sistemi difensivi alle richieste specifiche dell'ambiente, attraverso uno sviluppo di risposte del SNC allo stress nelle prime fasi della vita (Lichtman AH and Cramer CP, 1989; Shear, Brunelli and Hofer, 1983).

Il comportamento materno influenza quindi lo sviluppo comportamentale e le risposte endocrine allo stress della prole e quindi le variazioni delle cure materne sono alla base della trasmissione non-genomica delle differenze comportamentali individuali alla risposta allo stress (Francis et al., 1999; Liu et al., 1997) (Figura 2).

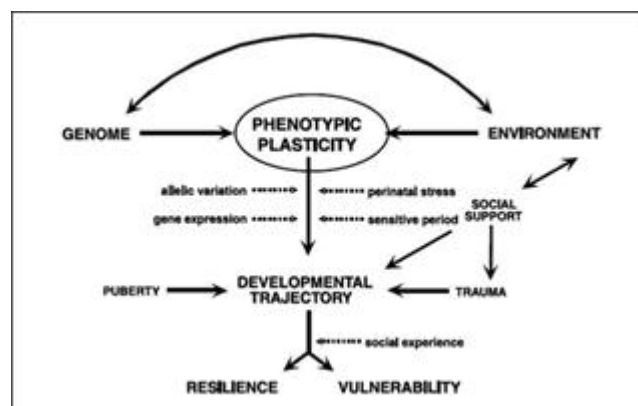


Figura 2. Meccanismi che influenzano la plasticità del cervello (Plotsky et al., 1998).

La separazione materna è un modello di stress cronico applicato nei primi giorni di vita dell'animale; i cuccioli vengono allontanati dalla madre, venendo così privati per alcune ore del contatto con questa, una o più volte al giorno per le prime settimane di vita.

Esistono diversi protocolli sperimentali della separazione materna, dove possono cambiare diverse variabili come il tempo di separazione o la modalità di separazione (ad esempio si può prelevare la madre e lasciare la cucciolata nel nido, oppure si può prelevare la cucciolata e lasciare la madre da sola nel nido, oppure ancora sia la madre che la cucciolata vengono lasciati nella stessa gabbia e separati da un pannello di plastica trasparente così da restare in contatto visivo e uditivo ma senza possibilità di alcun contatto fisico).

Tra questi, la *Early Maternal Separation* (EH) è una procedura che prevede la separazione dei cuccioli dalla madre per 15 minuti al giorno per alcuni giorni; esistono numerosi studi a riguardo che mostrano le conseguenze della separazione breve. Rispetto ai ratti di controllo che non hanno subito alcuna manipolazione, gli EH tendono ad essere meno reattivi (quindi più resistenti) in termini di attività dell'asse IIS se sottoposti ad uno stress acuto (ad es. l'elettroshock), sia durante l'infanzia che in età adulta (Meaney et al., 1993). Gli animali di controllo mostrano, in seguito ad uno stress, un aumento dei livelli di mRNA per il CRH nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo ed un aumento dei livelli di CRH e vasopressina nell'eminenza mediana; tale aumento non è presente negli EH (Plotsky and Meaney, 1993). Inoltre, i controlli mostrano un aumento dell'espressione del gene per il CRH più rapida rispetto agli EH, mentre i livelli di corticosterone e ACTH sono simili tra i due gruppi, così come i livelli di *corticosterone binding-protein*. Gli EH mostrano però un aumento della densità dei recettori per i glucocorticoidi (GR) nell'ippocampo (la densità dei recettori MR è simile tra i due gruppi sperimentali) (Gordon and Levine, 1999). Secondo alcuni ricercatori alcune di queste differenze potrebbero essere dovute, in parte, alla manipolazione subita in età precoce dagli EH (in quanto i controlli non sono mai stati manipolati) (Bhatnagar et al., 1996).

Bisogna inoltre sottolineare che le madri EH, quando vengono riunite ai cuccioli separati, mostrano un aumento dei comportamenti definiti "affettuosi" come il *licking*, il *grooming* e l'*arched-back nursing* (Smotherman et al., 1977) che sono correlati ad una ridotta attività

dell'asse IIS; questo porterebbe i cuccioli ad essere meno ansiosi; infatti, mediante studi di *Cross Fostering* è stato dimostrato che è l'intensità delle cure materne a rendere i piccoli più esplorativi e quindi, meno ansiosi. Questi dati dimostrano quindi che la *Early Maternal Separation* rende gli animali più adattabili e più resilienti allo stress.

Esiste, inoltre, un altro protocollo, la *Prolonged Maternal Separation* (MS). Rispetto alla *Early Maternal Separation* ciò che varia è la durata della separazione; infatti, in questa procedura la madre viene separata dalla cucciolata per 3 ore al giorno. Mentre gli effetti della *Early Maternal Separation* sono ben documentati, replicati e accettati dal mondo scientifico, gli effetti della *Prolonged Maternal Separation* sono controversi e spesso discordanti tra loro. Questo è dovuto alle differenti procedure di separazione utilizzate in alcuni studi (*Lehmann and Feldon, 2000*), alle differenze nella frequenza, durata ed età di inizio della procedura, o ancora a differenti ceppi di ratti studiati che non possono essere comparati tra loro, rendendo quindi quasi impossibile conciliare le differenze che appaiono in letteratura. Tuttavia, la preponderanza dei dati suggerisce che i ratti adulti sottoposti a MS in età precoce presentano un'iper-attività dell'asse IIS ed un aumento dei livelli di CRH nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e nell'eminenza mediana, tutti indici di uno stato ansioso, rispetto agli EH. Gli MS mostrano una riduzione dell'esplorazione se posti in nuovo ambiente, una riduzione del tempo speso nei bracci aperti nel test dell'Elevated Plus Maze, un aumento del *freezing behavior* in risposta ad uno stimolo acustico nell'Open Field ed un aumento dell'immobilità nel *Forced Swim test*; tutti indici, questi, di un comportamento non sociale, di paura, ansioso, disperato e depressivo (*Aisa et al., 2007; Plotsky and Meaney, 2000; Plotsky and Meaney, 2001; Plosky, 2002; MacQueen et al., 2003; Veenema et al., 2006; Wigger and Neumann, 1999*).

Mostrano, inoltre, un aumento dei livelli basali plasmatici di glucocorticoidi, ma dopo uno stimolo stressante questi livelli sono più bassi rispetto ai controlli non separati dalla madre (*Kikusui et al., 2005*). Ancora, le cure materne alterano l'espressione dei recettori per i

glucocorticoidi (GR) a livello dell'ippocampo; infatti, i ratti MS mostrano una riduzione dei livelli di questi recettori con conseguente riduzione della funzionalità del circuito a feedback negativo che si traduce in un aumento della secrezione di glucocorticoidi in risposta ad eventi stressanti (*Kikusui et al., 2005*).

Inoltre questi animali mostrano, oltre al comportamento ansioso, un aumento dell'aggressività sia da adolescenti che da adulti verso i conspecifici; sembrerebbe quindi che la MS promuova l'espressione del comportamento aggressivo nei ratti maschi (*Meaney and Stewart, 1979; Panksepp et al., 1984; Pellis et al., 1987; Vanderschuren et al., 1997; Veenema et al., 2006; Veenema et al., 2009*).

Gli effetti della MS in età precoce si vedono anche in relazione all'abuso di droghe: infatti studi condotti sui topi deprivati del contatto con la madre mostrano una maggiore vulnerabilità alla dipendenza da cocaina (*Kikusui et al., 2005*).

Altri studi ancora, dimostrano che i ratti privati delle cure materne per un lungo periodo mostrano una soppressione della neurogenesi ed una riduzione, a livello ippocampale, dei livelli del *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), una neurotrofina che promuove la sopravvivenza e la proliferazione neuronale, che sembrano essere mediate dall'aumento di corticosterone (*Liu et al., 2000; Mirescu et al., 2004*).

Tutti questi effetti dimostrati sugli animali sono evidenti anche nell'uomo. Infatti, questi cambiamenti neurochimici sono correlati a sintomi di psicopatologie come il disturbo post-traumatico da stress e la depressione (*Jacobs et al., 2000*). Ancora, alterazioni morfologiche del cervello sono state riscontrate anche in bambini che hanno subito abusi: questi mostrano una riduzione del volume dell'ippocampo e del corpo calloso e una dilatazione dei ventricoli (*Kikusui et al., 2005*).

Nel nostro dipartimento è stato dimostrato che la separazione dalla madre durante le prime due settimane di vita non altera nella prole adulta, la funzionalità e la reattività dell'asse IIS, ma

determina una protezione contro una successiva esperienza stressante a lungo termine nel ratto. Questo è dimostrato dall'effetto di due differenti tipi di stress, come la separazione materna ed uno stress cronico come l'isolamento sociale, sui livelli plasmatici di corticosterone negli animali adulti; l'isolamento sociale induce una drastica riduzione dei livelli corticosterone rispetto ai controlli ma questa riduzione risulta meno evidente negli animali isolati sottoposti alla separazione materna (Biggio *et al.*, 2014). Il risultato è ancora più evidente quando gli animali vengono sottoposti ad uno stress acuto come il foot-shock; infatti, l'incremento dei livelli di corticosterone negli animali isolati di controllo si riduce nei ratti isolati che sono stati esposti anche alla separazione materna (Biggio *et al.* 2014). E' stato inoltre valutato l'effetto della separazione materna e dell'isolamento sociale in condizioni basali e in seguito all'esposizione ad uno stress acuto sui livelli di AP. L'isolamento sociale riduce, come atteso, i livelli di plasmatici di AP; tale riduzione risulta meno marcata negli animali isolati sottoposti a separazione materna; coerentemente a quanto riscontrato sui livelli di CTS l'incremento dei livelli di allopregnanolone indotto dal foot-shock negli animali socialmente isolati soggetti a separazione materna è significativamente ridotto rispetto ai ratti isolati di controllo. Questo suggerisce che la condizione di stress vissuta nella prima infanzia possa svolgere un ruolo protettivo e consente l'adattamento ad uno stress cronico vissuto in un'altra fase critica dello sviluppo (Biggio *et al.* 2014).

Tuttavia le differenze tra gli MS e i controlli sono controverse (Plotsky and Meaney, 1993; Milde *et al.*, 2004). Questo probabilmente perché non esiste un'uniformità dei protocolli utilizzati. In conclusione possiamo dire che, mentre la *Early Maternal Separation* rende i ratti più resilienti allo stress e sembra quindi avere un effetto positivo su questi animali, i dati presenti finora in letteratura dimostrano come la *Prolonged Maternal Separation* sembra avere l'effetto opposto, rendendo gli animali più vulnerabili allo stress.

Basi molecolari sugli effetti della Maternal Separation

Il significato dell'impatto della MS è evidente su tutte le fasi della vita e su molte funzioni biologiche e comportamentali, che vanno dal sistema endocrino a risposte immunitarie allo stress in età adulta e a deficit cognitivi in età più avanzata (*Meaney, 2001; Levine, 2001; Anisman & Matheson, 2005*). Il modello sperimentale della maternal separation è utile per studiare il modello di risposta allo stress, che è caratterizzato da fasi distinte: una prima fase di attivazione catecolaminergica, seguita dal rilascio di glucocorticoidi coincidente con reazioni esplosive motorie che sono seguiti da uno stato emozionale di disperazione (*Smotherman et al., 1987*). Ad esempio, è stato visto che la reazione iniziale di cuccioli di macachi che erano stati separati dalla loro madre era caratterizzata da una intensa risposta di protesta seguita alla fine da comportamenti che sono stati denominati "comportamenti di disperazione" (*Hinde et al, 1966; Kaufman & Rosenblum, 1967; McKinney, & Bunney, 1969*). Come accennato precedentemente, una caratteristica fondamentale degli stress da separazione materna riguarda la durata di tali periodi di separazione cioè quando il cucciolo viene separato dalla nidiata. Gli effetti sono infatti strettamente connessi alla durata della separazione e vanno da positivi a profondamente negativi (*Levine, 1957, 2001; Meaney et al, 1996; Ladd et al., 1996*). La risposta allo stress a ripetuti episodi di separazione materna o le procedure di trattamento nei ratti devono essere valutate nel contesto del cosiddetto periodo di stress che inizia circa 3-4 giorni dopo il parto e si estende per circa 10 giorni (*Sapolsky & Meaney, 1986; Walker et al., 1986*). Tale periodo è caratterizzato da bassi livelli ematici di ACTH e corticosterone e una capacità di risposta attenuata a carico dell'asse IIS. E' stato dimostrato che le separazioni brevi comportano delle modificazioni comportamentali e neurobiologiche che sono state interpretate come risposte d'ansia (*Pryce et al., 2005*), mentre le separazioni più lunghe dal nido sono state studiate per la loro rilevanza nell'anedonia, un sintomo caratteristico della depressione (*Matthews & Robbins, 2003*).

Di straordinaria importanza per gli effetti della separazione materna sono gli stimoli ambientali che hanno un'azione marcata sulle cure materne (*Baroncelli et al., 2010*). Da un lato l'ambiente a cui il piccolo è esposto ha una grande influenza sul comportamento materno che lo stesso individuo esibirà una volta diventato adulto. Nei roditori e nei primati, infatti, lo stile materno si trasmette di generazione in generazione su base epigenetica (*Tamara B. Frankline et al., 2010*). E' interessante riportare che un'accresciuta stimolazione sensoriale e motoria ottenuta con l'allevamento in condizioni di arricchimento ambientale induce un completo recupero delle disfunzioni indotte dalla procedura di *maternal separation* (*Koehnle & Rinaman., 2010*). Anche i deficit di sviluppo dei bambini cresciuti negli orfanotrofi possono essere recuperati nel caso di adozione e di inserimento in un ambiente familiare idoneo, con effetti tanto più veloci e marcati quanto più l'adozione è stata precoce. L'arricchimento ambientale agisce anche da regolatore diretto dei livelli di cure materne (*Rizzi et al., 2011*). Piccoli di topo allevati fin dalla nascita in un ambiente arricchito ricevono livelli superiori di cure materne rispetto a piccoli mantenuti in ambienti poveri di stimoli (*Baroncelli et al., 2010*). Risulta pertanto chiaro che uno stress rappresentato dalla mancanza di cure materne a causa della separazione dei piccoli dalla madre in età perinatale rappresenti un forte stimolo negativo che si ripercuote sulla corretta funzionalità di determinati circuiti cerebrali coinvolti in innumerevoli processi cognitivi e di apprendimento (*Monroy et al., 2010*). Tali evidenze suggeriscono come la mancanza di cure materne rappresenti uno degli stimoli stressori di grande intensità in grado di condizionare l'intera vita di un individuo.

In generale lo stress rappresenta un fenomeno adattativo a situazioni avverse legate ad eventi di vita significativi. Tali eventi possono essere correlati a vari tipi di insulti come appunto la separazione e la scarsità di cure materne in età giovanile, brevi episodi di scontri causati da difficili interazioni sociali in età adulta, ciascuno con un proprio profilo comportamentale e fisiologico diverso. La differenza significativa che evidenzia i diversi tipi di stress risiede nei

diversi circuiti neuronali implicati nelle varie risposte associate agli stimoli stressori. Il circuito neurale comprendente la VTA-accumbens-PFC-amigdala può essere attivato da brevi episodi di stress sociale e risulta di fondamentale importanza per l'attivazione delle vie dopaminergiche nel controllo sia del comportamento che nell'aumento del consumo di sostanze d'abuso (Yap, Miczek., 2008). Un secondo circuito neurale comprendente il Raphe-PFC-ippocampo è attivato da vari tipi di stress cronico cioè persistente. In termini di sviluppo di terapie, lo stress indotto dalla separazione materna si è dimostrato utile per caratterizzare i composti che agiscono sui sottotipi recettoriali del recettore GABA_A, glutammato, serotonina e oppioidi con un potenziale ansiolitico, mentre forti aumenti di assunzione di alcol e l'assunzione di cocaina in età adulta sono stati osservati dopo prolungate esperienze di separazione materna durante le prime due settimane di vita del roditore (Miczek *et al.*, 2008). Comprendere la cascata intracellulare di eventi che porta alla comparsa di effetti indotti dallo stress in età perinatale è alla base dell'operato di sempre più affermati gruppi di ricerca (Figura 3).

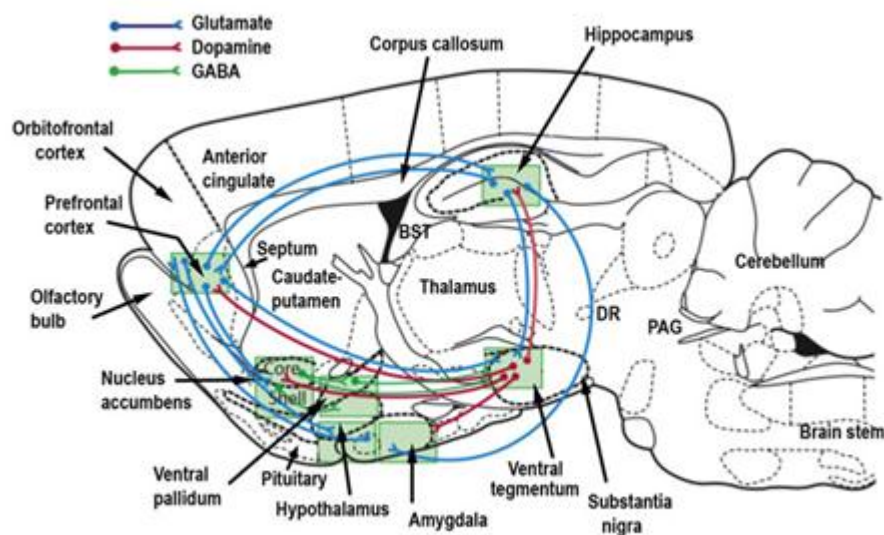


Fig.3 Circuito Mesolimbico e Circuito Mesocortico

MS e plasticità sinaptica

Bambini cresciuti in condizioni di scarse o assenti cure materne hanno una maggiore incidenza di sviluppare disturbi legati al tono dell'umore, psicosi e scarso controllo degli impulsi, che possono poi persistere per tutta la vita (*Mullen et al., 1996; Heim & Nemeroff, 2001*). Allo stesso tempo, un buon legame genitore-bambino ha dimostrato ridurre tali tendenze. Nei paradigmi della MS i cuccioli vengono separati dalle loro madri diverse volte durante un periodo postnatale critico ed inoltre, gli effetti della separazione sono tempo-dipendente (*Lehmann & Feldon, 2000; Pryce & Feldon, 2003; Ladd et al., 2004*). Ad esempio, come precedentemente detto, la MS per 3 ore quotidianamente, dal giorno 2 al giorno 12 postnatale (PND), porta ad un aumento del rilascio dell'ormone adrenocorticotropo e una diminuzione dell'espressione del mRNA del recettore dei glucocorticoidi dell'ippocampo e della corteccia frontale (*Plotsky & Meaney, 1993; Ladd et al., 2004*). Dati recenti suggeriscono che la MS, eseguita prima del *handling*, induce una riduzione della densità delle spine dendritiche dei neuroni piramidali del terzo strato della corteccia prefrontale (PFC) (*Bock et al., 2005*). La MS effettuata durante l'*handling* (PND5-7) non causa alcun cambiamento nella morfologia dendritica della suddetta regione ed inoltre, l'*handling* è caratterizzato da bassi livelli basali di ormoni dello stress senza alcuna risposta ai fattori di stress esterni (*Rosenfeld et al., 1992; Levine, 2002*) ed è stato proposto come possa proteggere il cervello in giovane età nei confronti degli effetti negativi dei livelli elevati di ormoni dello stress (*Meaney et al., 1991*).

L'ippocampo e l'amigdala sono interconnessi con la corteccia prefrontale (PFC) mediale, e inviano le principali proiezioni eccitatorie verso il nucleo accumbens (NAcc) (*Heidbreder & Groenewegen, 2003*). La PFC e l'ippocampo sono coinvolti nella regolazione della funzione dell'asse HPA (*Sullivan & Gratton, 2002; Herman & Mueller, 2006*), e una disfunzione dell'asse HPA è stata associata a disturbi di depressione (*Holsboer, 2000*). Ancora più importante, lo stress a lungo termine o la somministrazione ripetuta di Corticosterone sono stati associati ad

alterata arborizzazione dendritica e nascita di spine dendritiche nei neuroni del circuito cortico- limbico. È interessante notare che ratti con lesioni neonatali dell'ippocampo ventrale mostrano un'iperattività locomotoria in seguito a stress (*Flores et al., 1996; Silva-Gómez et al., 2003*) con cambiamenti morfologici come atrofia dei neuroni piramidali della PFC mediale e dei neuroni spinosi del NAcc (*Flores et al., 2005; Alquicer et al., 2008*). E' interessante notare come recenti evidenze suggeriscono che utilizzando un paradigma di separazione materna, le proteine legate alla regolazione dello stress ossidativo sono modificate nella regione CA1 dell'ippocampo ventrale (*Marais et al., 2009*). Pertanto, tutti questi studi suggeriscono un coinvolgimento della regione CA1 dell'ippocampo ventrale allo stress e l'effetto della MS sulle cellule piramidali nell'ippocampo ventrale e dei neuroni spinosi medi del NAcc rimane ancora elusiva, e queste strutture, unitamente ai neuroni piramidali della PFC, svolgono un ruolo critico nell'emotività dell'individuo, così come nei processi di apprendimento e memoria

Isolamento sociale

L'isolamento sociale è un modello sperimentale di stress cronico e consiste nell'allontanamento del giovane animale, subito dopo lo svezzamento, che viene quindi privato del contatto sociale dai propri simili per lunghi periodi di tempo. Questo modello nasce tra gli anni '50 e '60 del secolo scorso, quando alcuni ricercatori descrissero il comportamento di ratti e topi da esperimento allevati individualmente per lunghi periodi di tempo, senza il contatto fisico con i conspecifici. Gli animali cresciuti in queste condizioni si mostravano reattivi alla manipolazione (*Ader and Friedman, 1964*), timidi (*Moyer e Korn, 1965*), emotivi (*Koch and Arnold, 1972*) e aggressivi (*Yen et al., 1958*). Negli anni successivi numerosi studi hanno esaminato questo modello animale sotto diversi punti di vista: comportamentale, morfologico, biochimico e fisiologico. Poiché, come già detto, si tratta di uno stress indotto durante una fase critica dello sviluppo, caratterizzata dal gioco e dal contatto con i propri simili (*Einion e Morgan, 1977*),

questo produce una serie di alterazioni comportamentali e fisiologiche che influenzano il comportamento dell'animale da adulto.

Tutte queste evidenze, nate da approfonditi studi, hanno portato all'elaborazione dei concetti di "Stress da isolamento" e di "Sindrome di stress da isolamento", indicando con il primo la condizione stressante in cui si trovano a vivere gli animali, naturalmente sociali e gregari, e con il secondo la sindrome comportamentale associata a tale condizione (Valzelli, 1973; Heidbreder et al., 2000). Uno degli aspetti comportamentali osservati negli animali socialmente isolati è la spiccata aggressività verso lo sperimentatore che ne rende difficile la manipolazione, indicando uno stato emozionale alterato. L'aggressività si manifesta anche nei confronti dei conspecifici quando, dopo il periodo di isolamento, gli animali vengono rimessi in gruppo (Kostowski et al., 1977; Wongwitdecha and Mardsen, 1996; Karim and Arslan, 2000).

Numerosi test sono stati utilizzati in questi animali per determinarne lo stato emozionale ed è stato dimostrato che l'isolamento sociale induce uno stato conflittuale. Infatti, nel test dell'elevated plus maze, gli animali isolati trascorrono più tempo nei bracci chiusi (Karim and Arslan, 2000; Serra et al., 2000) e nel test di Vogel il numero delle bevute con punizione è ridotto, rispetto agli animali stabulati in gruppo (Serra et al., 2000).

In accordo con questa aumentata emotività, numerosi studi hanno mostrato che l'isolamento sociale determina un aumento dell'attività locomotoria in un nuovo ambiente (Silva-Gomez et al., 2003; Hellemans et al., 2004). Inoltre, gli animali isolati impiegano più tempo per entrare in un nuovo ambiente a loro non familiare (neofobia) (Einon and Morgan, 1977; Dalrymple-Alford and Benton, 1984) e mostrano un aumento della defecazione se posti in un campo aperto (open field) (Holson et al., 1991; Hall et al., 1997). Questi comportamenti sono antagonizzati dalle benzodiazepine (Einon and Tye, 1975; Morinan and Parker, 1992). In alcuni studi, però, non sono state osservate queste alterazioni comportamentali indotte dall'isolamento sociale: ad esempio, ci sono lavori che non mostrano differenze nell'attività locomotoria spontanea tra

animali isolati e quelli stabulati in gruppo (*Gardner et al., 1975; Gamallo et al., 1986*); in altri è riportata una riduzione della defecazione nell'open field (*Gentsch et al., 1982; Gentsch et al., 1988*) o nessun cambiamento in questo parametro (*Gamallo et al., 1986*). Bisogna considerare che queste differenze nell'attività locomotoria possono essere indice di un aumentato stato conflittuale (tentativo di trovare una via di fuga oppure immobilità dovuta all'eccessiva paura).

Inoltre, negli studi di isolamento sociale, i protocolli, le procedure sperimentali, la specie e/o il ceppo di animali, la durata e il momento della vita in cui viene iniziato l'isolamento possono essere diversi, quindi i singoli risultati possono apparire contraddittori.

Gli animali socialmente isolati, oltre ad alterazioni dello stato emozionale, mostrano anche alterazioni della memoria e dell'apprendimento spaziali (*Hellemans e coll., 2004; Jones e coll., 1992; Pisu et al., 2011*), del tempo di immobilità nel test di Porsolt (*Heritch e coll., 1990*) ed hanno un'alterata risposta comportamentale a diversi farmaci come i barbiturici (*Einon e coll., 1976; Jurasaka e coll., 1983*), gli oppioidi (*Katz e Steinberg, 1972*), gli agonisti dopaminergici così come gli psicostimolanti amfetamino-simili (*Jones e coll., 1990; Smith e coll., 1997*).

I cambiamenti comportamentali osservati negli animali socialmente isolati sono associati a modificazioni della neurotrasmissione centrale. In particolare, il comportamento ansioso e conflittuale degli animali isolati è associato all'alterazione dell'attività del recettore GABA_A (*Serra e coll., 2000; Robertson e coll., 1978; Harro e coll., 1990*).

Il recettore GABA_A è un eteropentamero costituito dall'assemblaggio di diverse subunità glicoproteiche omologhe che si uniscono a formare un canale ionico permeabile agli ioni Cl⁻; il ligando endogeno per tale complesso recettoriale è l'acido γ -amminobutirrico (GABA) che, liberato dalla terminazione presinaptica, induce l'apertura del canale associato al recettore. Si genera così una corrente entrante di ioni Cl⁻ che iperpolarizza la membrana postsinaptica (generando un potenziale postsinaptico inibitorio) e innalza così la soglia di eccitabilità neuronale: il GABA è infatti il più diffuso neurotrasmettitore inibitorio nel sistema nervoso

centrale dei mammiferi. Oltre al sito per il GABA, sul recettore GABA_A sono presenti siti per molecole convulsivanti quali il TBPS o la picrotossina (modulatori negativi della trasmissione GABAergica) e per diverse classi di molecole ad attività ansiolitica, anticonvulsivante ed ipnotica come le benzodiazepine, i barbiturici, l'etanolo, gli anestetici generali e gli steroidi (Figura 4).

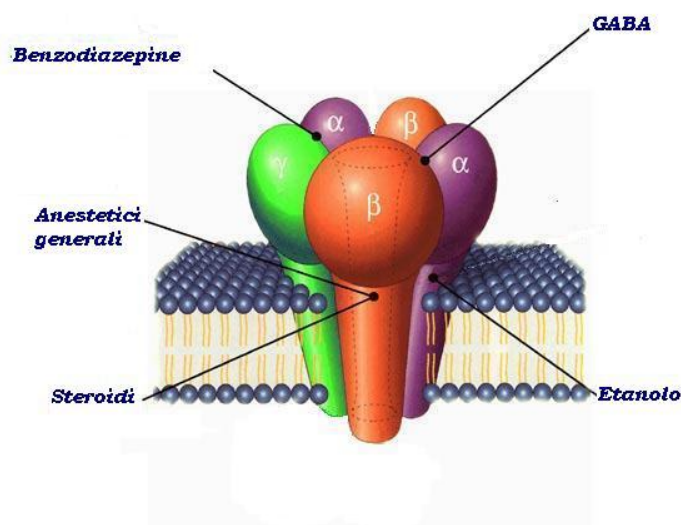


Figura 4. Rappresentazione schematica del recettore GABA_A.

Come già detto in precedenza, la conflittualità indotta dall'isolamento sembra essere associata alla riduzione della funzione del recettore GABA_A (Robertson e coll., 1978; Harro e coll., 1990; Serra e coll., 2000). Un possibile meccanismo attraverso il quale lo stress cronico, determinato dall'isolamento sociale, induce una “*down regulation*” della trasmissione GABAergica potrebbe essere dovuta ad una modificazione della conformazione del recettore GABA_A in seguito ad una variazione nell'espressione delle specifiche subunità che lo compongono. Infatti, studi condotti nei nostri laboratori, hanno dimostrato che l'isolamento sociale modifica l'espressione di diverse subunità che compongono il recettore GABA_A (Serra e coll., 2006).

Inoltre, l'isolamento sociale nel ratto induce una riduzione dei livelli cerebrali e plasmatici dell'allopregnanolone (AP) e di tetraidrodeossicorticosterone (THDOC).

Gli steroidi sono composti lipofili che possono essere prodotti in periferia, dalle gonadi e dal surrene, e a livello cerebrale dai neuroni e dalle cellule gliali. Essendo altamente lipofili, anche gli steroidi sintetizzati dalle gonadi e dal surrene possono facilmente attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) (*Paul and Purdy, 1992*) e quindi, esercitare i loro effetti sul Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Gli ormoni steroidei sintetizzati direttamente nel cervello sono denominati “**neurosteroidi**”. Indipendentemente dalla loro origine, gli studi hanno dimostrato che alcuni composti steroidei, denominati **steroidi neuroattivi**, possono alterare l'eccitabilità neuronale attraverso l'interazione con alcuni recettori per i neurotrasmettitori (*Majewska et al., 1986; Paul and Purdy, 1992; Lambert et al., 1995*).

La produzione degli steroidi a livello della corticale del surrene è regolata dall'asse IIS.

Gli ormoni steroidei possono influenzare le funzioni neuronali attraverso due meccanismi d'azione:

- il primo meccanismo, di tipo genomico, è caratterizzato dal legame degli steroidi a dei recettori intracellulari, formando un complesso che migra nel nucleo e infine si lega a punti specifici del DNA;
- il secondo consiste invece in un'azione non genomica, caratterizzata da un'immediata insorgenza dell'effetto (da pochi secondi a minuti), attraverso la quale gli steroidi, legandosi a dei particolari recettori di membrana, modulano la funzione dei neurotrasmettitori.

I due metaboliti del progesterone, AP e THDOC, sono, sia in vivo che in vitro, tra i più potenti modulatori allosterici positivi endogeni del recettore GABA_A, facilitando l'interazione del GABA e delle benzodiazepine con i loro siti di legame e potenziando le correnti al cloro (Cl⁻).

Il meccanismo molecolare dipende dalle concentrazioni dello steroide: a basse concentrazioni questi composti facilitano l'azione del GABA (*Harrison et al., 1987*) mentre, ad alte concentrazioni, sono capaci di aprire direttamente il canale (*Puia et al., 1990*). La loro somministrazione a dosi farmacologiche determina, nei roditori, un effetto ansiolitico, anticonvulsivante e sedativo-ipnotico (*Majewska et al., 1986 e 1992; Harrison et al., 1987; Lambert et al., 1995*).

Come già detto, l'isolamento sociale del ratto induce una riduzione dei livelli cerebrali e plasmatici di AP e THDOC e tale riduzione potrebbe contribuire a determinare il comportamento conflittuale manifestato dagli animali sottoposti a tale tipo di stress cronico (*Serra et al., 2000*).

Il meccanismo molecolare responsabile della riduzione dei livelli di AP e THDOC non è ancora stato chiarito. E' stato ipotizzato (*Matsumoto et al., 1999*) che l'isolamento sociale riduca l'attività o l'espressione dell'enzima 3 α -idrossisteroide deidrogenasi (3 α -HSD) che catalizza la riduzione del 5 α -diidroprogesterone in AP; la diminuzione dell'attività di questo enzima porterebbe ad una riduzione dei livelli cerebrali di AP. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che, in alcuni ceppi di topo, l'effetto dell'isolamento sociale è selettivo per questo steroide (*Matsumoto et al., 1999*). Tuttavia è plausibile che l'effetto di tale condizione sia mediato anche da altri meccanismi.

Gli animali isolati sono, inoltre, più sensibili all'effetto steroidogenico indotto dallo stress acuto. Questo meccanismo di risposta è mediato dall'asse IIS, come dimostrato dall'evidenza che in ratti castrati e surrenectomizzati lo stress acuto o la somministrazione di farmaci che riducono la trasmissione GABAergica non modifica le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC (*Barbaccia e coll., 1997*). Gli animali socialmente isolati, quando sottoposti ad uno stress acuto come il foot-

shock, mostrano un aumento dei livelli di AP e THDOC molto maggiore rispetto agli animali stabulati in gruppo (*Serra e coll., 2000*). Questa evidenza è in accordo con l'idea che, durante lo stress cronico, si sviluppi una "traccia facilitatoria", caratterizzata da una maggiore sensibilità dell'asse IIS ai nuovi stimoli stressanti (*Akana e coll., 1992*). L'evidenza che gli animali isolati mostrano una risposta esagerata allo stress rispetto a quelli stabulati in gruppo, unita a quella della riduzione della steroidogenesi basale, suggerisce che la funzione dell'asse IIS di questi animali sia alterata.

E' inoltre interessante notare come la manipolazione degli animali isolati (due volte al giorno durante tutto il periodo dell'isolamento) prevenga la riduzione dei livelli cerebrocorticali e plasmatici di neurosteroidi (*Serra e coll., 2000*).

L'isolamento sociale induce delle profonde alterazioni della morfologia neuronale. Negli animali socialmente isolati è stata infatti riscontrata una diminuzione della lunghezza dei dendriti e della densità delle spine dendritiche nei neuroni piramidali dall'area CA1 dell'ippocampo e nella corteccia prefrontale (*Silva-Gomez et al., 2003*) ed una ridotta neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo (*Westenbroek et al., 2004*). Inoltre l'isolamento sociale riduce i livelli di BDNF nell'ippocampo, mentre non sono stati osservati cambiamenti nello striato e nella corteccia prefrontale (*Pisu et al., 2011; Scaccianoce et al., 2006*).

Tutte queste osservazioni suggeriscono come l'isolamento sociale abbia un effetto negativo sullo sviluppo e sul mantenimento delle funzioni cerebrali e sono in accordo con l'evidenza che alcune alterazioni comportamentali (quali ansia, aumento dell'attività motoria e deficit cognitivi), causate dall'isolamento sociale, siano parzialmente revertite dall'esposizione degli animali ad un ambiente socialmente "arricchito" o dalle interazioni sociali con animali della stessa specie (*Hellemans e coll., 2004*).

Obiettivi

Come noto in letteratura, le interazioni madre-cucciolo durante le prime fasi della vita sono importanti per lo sviluppo dell'intero sistema nervoso (*Plosky et Meaney, 1993; Caldji et al., 2000; Liu et al., 2000*). La separazione della prole dalla madre, in funzione della sua durata, causa profonde modificazioni comportamentali e neurochimiche. Gli effetti osservati vanno da una maggiore espressione dei recettori per i glucocorticoidi sia a livello ippocampale sia nella corteccia prefrontale successivamente a brevi periodi di separazione (*Meaney et al., 1985*) ad una soppressione della neurogenesi e ad una parallela diminuzione del fattore neurotrofico BDNF a livello ippocampale (*Liu et al., 2000*).

L'esperienza emotiva nei primi anni di vita ha mostrato un'interferenza con lo sviluppo di reti sinaptiche eccitatorie nell'ippocampo dei roditori. La separazione materna è un paradigma animale progettato per imitare l'esposizione ripetuta a una situazione stressante per il piccolo durante i primi anni di vita, con conseguenti sintomi comportamentali e neuroendocrini di reattività allo stress elevato da adulti (*Aisa et al., 2007; Heim et Nemeroff, 2001; Lehmann et Feldon, 2000*) o senescenti (*Solas et al., 2010*). Ma esso è uno stress elevato anche per le mamme, in questo periodo tutte le sue attenzioni sono rivolte alla sua prole che deve proteggere da qualunque tipo di pericolo. Gli adattamenti che avvengono nel cervello delle madri durante l'allattamento potrebbero essere quindi determinati sia dalle variazioni degli ormoni che avvengono durante questo periodo che dagli stimoli esterni indotti dal bambino.

Lo stress indotto alla madre dalla separazione materna altera sia i livelli ormonali che il suo comportamento verso la propria prole.

Alla luce delle premesse fatte sin ora e delle evidenze sperimentali ottenute da numerosi gruppi di ricerca, l'obiettivo principale del mio lavoro è stato quello di valutare nell'ippocampo delle mamme al termine dell'allattamento:

- la variazione della densità delle spine dendritiche nel giro dentato;
- la morfologia delle spine dendritiche;

- l'arborizzazione dendritica, il numero dei segmenti, il numero delle biforcazioni, la lunghezza totale dei dendriti e il numero dei bracci terminali.

Nell'ippocampo della prole adulta:

A) Se lo stress subito nelle prime due settimane di vita possa essere dannoso per lo sviluppo del cervello. Per valutare ciò ho studiato la neurogenesi nell'ippocampo di ratto adulto sottoposto nei primi 15 giorni di vita a due diversi protocolli di separazione materna:

- Separazione materna breve: 15 minuti al giorno dal terzo al quindicesimo giorno dopo la nascita;
- Separazione materna lunga: 3 ore al giorno dal terzo al quindicesimo giorno dopo la nascita;

B) Quanto lo stress indotto da insufficienti cure materne nei primi 15 giorni di vita sia importante per la vulnerabilità allo stress cronico in età adulta. E' stata valutata la neurogenesi in ratti che nei primi 15 giorni di vita sono stati sottoposti a separazione materna breve o lunga e che dal giorno dello svezzamento sono stati sottoposti ad un nuovo stress cronico: l'isolamento sociale per un mese. Al termine dell'isolamento sociale un gruppo di ratti è stato riunito in gruppo per un altro mese, mentre un secondo gruppo di ratti isolati ha continuato l'isolamento per un altro mese prima del sacrificio.

Per valutare gli effetti dei vari stress nell'ippocampo di questi animali è stata studiata:

- la variazione della densità delle spine dendritiche nel giro dentato;
- la morfologia delle spine dendritiche;
- l'arborizzazione dendritica, il numero dei segmenti, il numero delle biforcazioni, la lunghezza totale dei dendriti e il numero dei bracci terminali
- La proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo, attraverso l'utilizzo di due marcatori, la BrdU e la Ki-67.
- La neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo attraverso l'utilizzo di una doppia marcatura con BrdU/DCX

- Le eventuali variazioni dei livelli di espressione della proteina DCX durante la neurogenesi.

Introduzione

Stress e neurogenesi

La neurogenesi ippocampale è un processo dinamico influenzato da stimoli ambientali e fisiologici, e svolge un ruolo fondamentale nelle risposte allo stress. È stato dimostrato che gli ormoni coinvolti nella risposta allo stress e le varie forme di stress, tra cui lo stress prenatale, la separazione materna, immobilizzazione, diminuiscono la proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo dei roditori adulti (*Schoenfeld e Gould, 2012*). Sono diverse le evidenze sperimentali a favore della correlazione tra neurogenesi e risposta allo stress fornite dai modelli animali in cui si è andati a inibire la neurogenesi. Il blocco della neurogenesi da irradiazione cranica, agenti antimitotici, come methylazoxymethanol (MAM) o l'espressione transgenica di una proteina apoptotica in PNG, può prolungare la risposta ai glucocorticoidi e indurre comportamenti depressivi in seguito ad eventi traumatici (*Petrik et al, 2012; Revest et al., 2009*). Tuttavia, nel complesso si può affermare che la mancanza di neurogenesi da sola non può alterare la risposta allo stress al momento della ablazione, ma piuttosto può influenzare la risposta a fattori di stress futuri.

Partendo dall'idea che uno stress prolungato nel tempo può essere dannoso e che lo stress moderato e controllabile può essere utile, nel ratto è stata dimostrata una riduzione della neurogenesi nello stress lieve (*Parihar et al., 2011*). La neurogenesi è una condizione necessaria affinché si abbiano gli effetti benefici come quelli apportati ad esempio da un ambiente arricchito sui sintomi depressivi indotti dallo stress (*Schloesser et al., 2010*). Inoltre alcuni antidepressivi come la fluoxetina possono favorire la neurogenesi stessa (*Malberg et al., 2000*). Tuttavia, l'efficacia terapeutica degli antidepressivi può essere mantenuta anche dopo l'abolizione della neurogenesi (*Bessa et al., 2009*), mettendo in discussione l'effetto tra antidepressivi e neurogenesi. La neurogenesi può essere in parte implicata nella resilienza allo stress, e questo è stato dimostrato in modelli animali con un'elevata neurogenesi basale, sia in

quelli in cui la neurogenesi può essere efficacemente attivata. I meccanismi coinvolti nello stress e nella neurogenesi non sono pienamente compresi, ma possono coinvolgere l'azione dei glucocorticoidi sui neuroni neoformati vicini cellule progenitrici neurali (NPC) che non esprimono mineralcorticoidi e glucocorticoidi (*Garcia et al., 2004*). I glucocorticoidi possono anche agire aumentando la trasmissione glutamatergica attraverso un maggiore rilascio di glutammato e l'input eccitatorio recettore-dipendente dalla corteccia entorinale sui neuroni appena formati (*Cameron et al., 1995*). I glucocorticoidi hanno azioni proapoptotiche sulle NPC e sui neuroni immaturi nell'ippocampo (*Yu et al., 2010*). Oltre agli ormoni dello stress, fattori neurotrofici come il BDNF, VEGF, e insulin growth factor 1 (IGF-1), possono promuovere la proliferazione e la differenziazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e mediare alcuni degli effetti positivi derivati da un ambiente arricchito (*Fournier e Duman, 2012; Lee and Son, 2009*). Possono contribuire anche alcuni neuropeptidi, come gli oppioidi endogeni e l'ossitocina, rilasciati in seguito a esperienze sociali gratificanti, oppure il neuromodulatore dopamina (*Drake et al, 2007; Veena et al., 2011*).

La neurogenesi è un processo di generazione di nuovi neuroni che si verifica principalmente durante le fasi embrionali e neonatali nei mammiferi (*Ming e Song, 2011*), ma persiste per tutta la vita anche nel cervello adulto e anziano. Essa avviene principalmente in due regioni cerebrali: la zona subgranulare (SGZ) del giro dentato dell'ippocampo e la zona subventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali. La zona subgranulare genera neuroni granulari funzionali da NPC, mentre la zona subventricolare genera interneuroni che migrano nel bulbo olfattivo. Nel giro dentato dell'ippocampo, cellule granulari di nuova produzione vengono poi incorporate nel circuito ippocampale, ricevono input eccitatori principalmente dalla corteccia entorinale e proiettano alle cellule piramidali del CA3 dell'ippocampo (Fig 5).

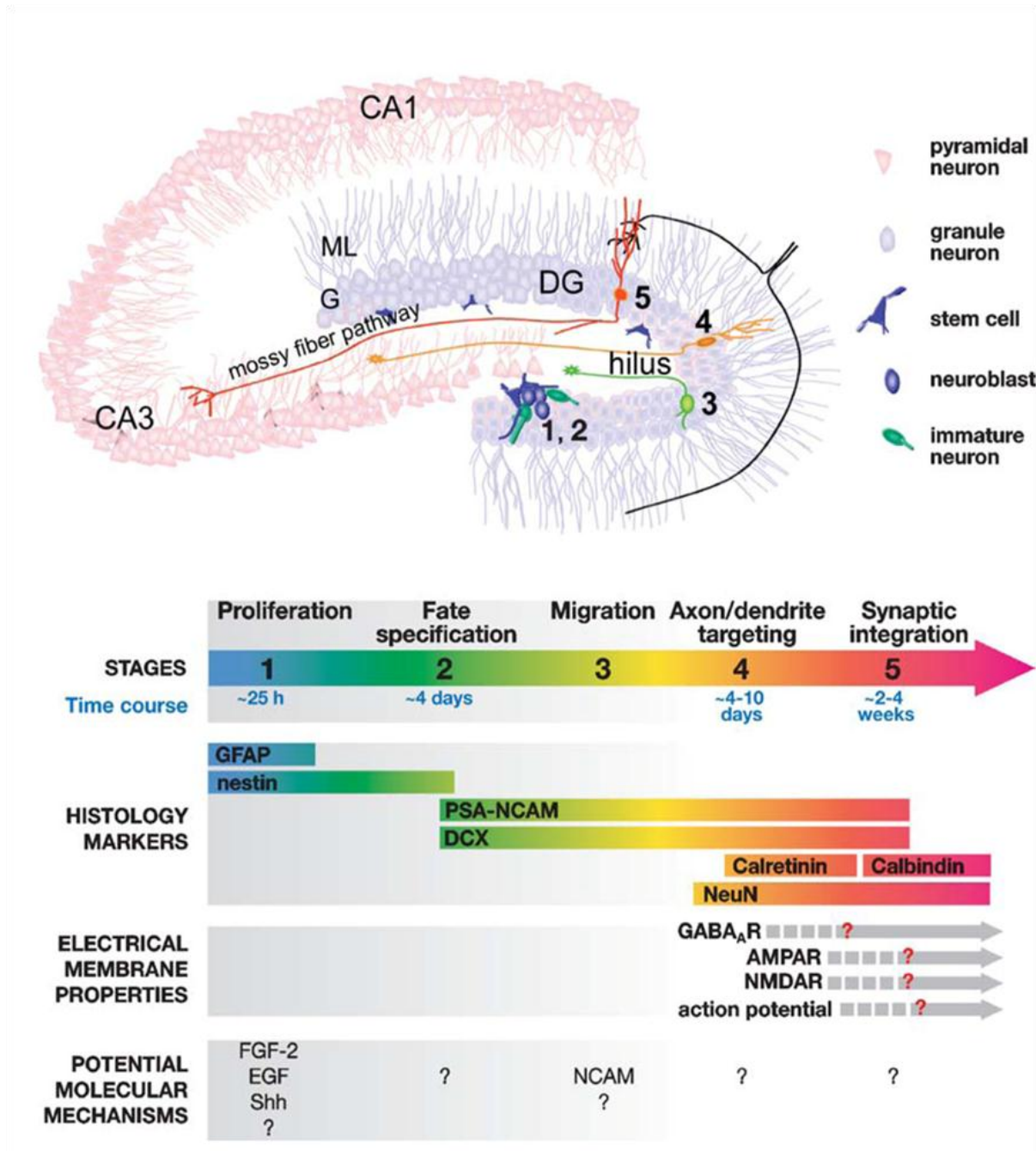


Figura 5. Neurogenesi di nuovi neuroni granulari nel giro dentato dell'ippocampo da cellule staminali presenti nella SGZ:

la neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo avviene attraverso 5 fasi di sviluppo. Fase 1 di proliferazione: le cellule staminali (blu) hanno il corpo cellulare localizzato nella SGZ del giro dentato e i loro processi radiali che penetrano all'interno dello strato dei granuli e i corti processi tangenziali che si estendono lungo il bordo compreso tra lo strato dei granuli e l'ilo. Queste cellule si trasformano poi in cellule in via di amplificazione (blu chiaro). Fase 2 di differenziazione: le cellule amplificate si differenziano in neuroni immaturi (verde). Le cellule proliferanti

progenitrici nel SGZ sono strettamente associate con gli astrociti e ai vasi. Fase 3 di migrazione: i neuroni immaturi migrano nello strato di cellule granulari. Fase 4 di formazione di assoni e dendriti: i neuroni immaturi (arancione) estendono il loro assone lungo la via della "mossy fiber" verso le cellule piramidali della CA3, mentre estendono i loro dendriti in direzione opposta verso lo strato molecolare del giro dentato. Fase 5 di integrazione sinaptica: i nuovi neuroni granulari (rosso) ricevono gli inputs dalla corteccia entorinale e inviano segnali verso la CA3 e l'ilo. Nella figura sono indicati i marcatori specifici per lo stadio di sviluppo del neurone e la loro funzione. DG, giro dentato; ML, strato molecolare; GL, strato granulare.

Le cellule di nuova generazione prodotte nella SVZ invece migrano nel tubercolo olfattivo attraverso la stria migratoria rostrale (RMS) e una volta giunti a destinazione si differenziano in interneuroni, cellule dei granuli e cellule periglomerulari (Carlen et al., 2002; Belluzzi et al., 2003). [Fig.6]

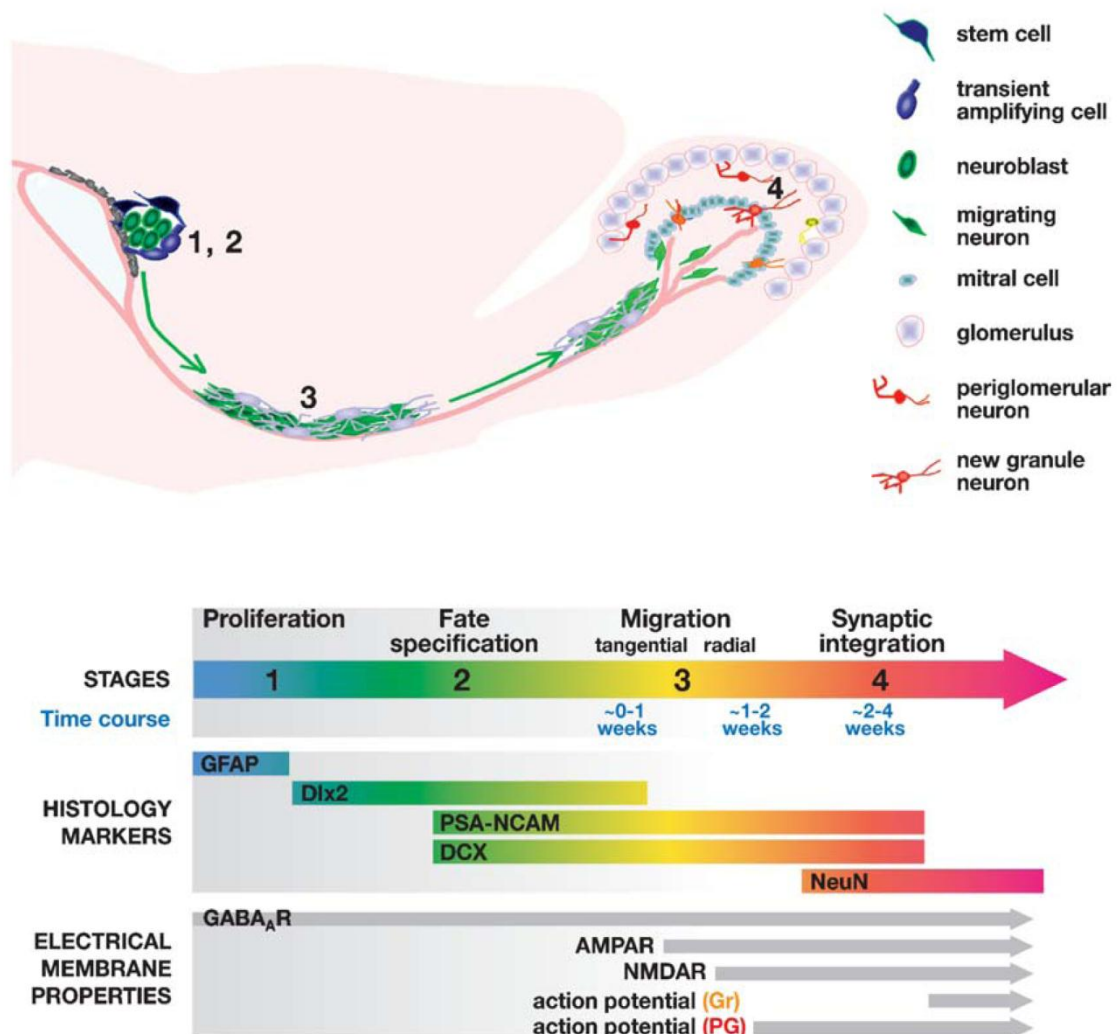


Figura 6. Formazione di nuovi interneuroni nel bulbo olfattivo da cellule staminali neurali presenti nella SVZ:

Per quanto riguarda l'origine dei nuovi neuroni nel giro dentato dell'ippocampo, l'esistenza di vere e proprie cellule staminali in quest'area è una questione ancora dibattuta; dati sperimentali mostrano che esiste una popolazione eterogenea di precursori cellulari nella SGZ capace di generare nuove cellule: quindi i neuroni nascono da cellule capaci di proliferare presenti al confine tra l'ilo e lo strato delle cellule granulari. Durante la maturazione i nuovi neuroni estendono il loro assone e i loro dendriti e questo processo è seguito dalla formazione di spine e sinapsi (Bohlen and Halbach, 2007). I neuroni che non si integrano nella rete neuronale pre-esistente vengono eliminati per apoptosi. La neurogenesi nell'ippocampo continua quindi durante tutta la vita, anche se un certo declino viene osservato con l'avanzare dell'età.

La neurogenesi è presente anche in aree cerebrali dei mammiferi adulti come la neocorteccia (*Gould et al., 1999; Takemura et al., 2005*), lo striato (*Van Kampen et al., 2004*), l'amigdala (*Bernier et al., 2002*) e sostanza nera (*Zhao et al., 2003; Yoshimi et al., 2005*). La neurogenesi in queste aree è presente a livelli molto bassi e non sembra essere regolata da condizioni fisiologiche.

Tutte le fasi della neurogenesi sono controllate da una serie di fattori intrinseci (l'insieme dei fattori espressi dalle cellule staminali come la proteina NCAM che facilita la proliferazione nell'ippocampo e il differenziamento dei neuroni regolando dei fattori di trascrizione) ed estrinseci (fattori prodotti dai tessuti circostanti che agiscono sulle cellule staminali, come neurotrasmettitori, stato ormonale e fattori di crescita), (*Pierre-Marie Lledo et al., 2006*).

Tra i neurotrasmettitori, il glutammato inibisce la divisione agendo sui recettori NMDA (*Cameron et al., 1995; Bernabeau et al., 2000*) mentre stimola la proliferazione agendo sui recettori AMPA (*Bai et al., 2003*); il GABA inibisce la proliferazione (*Tozuka et al., 2005*) mentre acetilcolina e noradrenalina promuovono la neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo (*Cooper-Khun et al., 2004; Mohapel et al., 2005; Kulkarni et al., 2002*). Anche la dopamina è coinvolta ma non è ancora chiaro in che modo agisce.

Tra gli ormoni, i primi a essere stati identificati per il loro ruolo nella neurogenesi sono i corticosteroidi, che vengono prodotti in quantità maggiori in condizioni di stress e determinano una riduzione della neurogenesi nel SNC (*Gould et al., 1997*).

Ci sono poi una serie di fattori ambientali coinvolti nella neurogenesi: ad esempio è stato visto che un ambiente arricchito promuove la sopravvivenza dei neuroni di nuova formazione (*Kempermann et al., 1997*). Ci sono anche una serie di fattori negativi che invece inibiscono la neurogenesi come lo stress (*P. J. Lucassen et al., 2010*), [Tabella 1].

Per quanto riguarda la funzione dei nuovi neuroni che si formano, questa non è ancora del tutto chiara, ma poichè l'ippocampo svolge un ruolo centrale nei processi di apprendimento e memoria

è molto probabile che la neurogenesi contribuisca ad un'aumentata plasticità del cervello favorendo questi processi.

Regulatory factors	Proliferation		Survival		Neuronal differentiation		Potential mechanisms
	SVZ	SGZ	SVZ	SGZ	SVZ	SGZ	
Mice strain		+/-		+/-		+/-	
Gender	n.c.	+/-	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
Aging	-	-		n.c.		-	EGFR signaling - Corticosteroids levels +
Hormones							
Corticosterone		-					
Estrogen	n.c.	+		n.c.		n.c.	
Oestrogen		+					Serotonin?
Pregnancy	+	n.c.					Prolactin
Afferents, neurotransmitters							
Dopamine	-	-					D2L receptors
Serotonin	+	+					
Acetylcholine		-	-	-			
Glutamate		-		n.c.			mGluR, NMDAR
Norepinephrine	n.c.	+		n.c.		n.c.	PAC1 and PKC
PACAP	+	+					
Nitric oxide	-	n.c./-	n.c.		+/n.c.	n.c.	
Growth factors							
FGF-2	+	n.c.					
EGF	+	n.c.				-	
IGF-1		+		+		+	
Behavior							
Enriched environment	n.c.	+/n.c.	n.c.	+/n.c.	n.c.	n.c./+	VEGF
Enriched odor exposure	n.c.	n.c.	+	n.c.			
Physical activity	n.c.	+	n.c.	+			VEGF
Learning							
Water maze		n.c.		+/n.c.		n.c.	
Blink reflex		n.c.		+			
Dietary restriction		n.c.		+			BDNF, NT-3
Stress		-		n.c.			Glucocorticoids +
Drugs							
Antidepressants		+					Serotonin
Opiates		-					
Methamphetamine		-					
Lithium		+				n.c.	
Pathological stimulations							
Ischemia	+	+/-		+	+	+	NMDAR, CREB
Seizures	+	+/-		+/n.c.		+/n.c.	
Inflammation	+/-	-		-		-	IL-6, TNF α
Degenerative diseases							
AD/HD/PD	+	+					
Diabetes		-					

Tabella 1. Diversi fattori che possono regolare la neurogenesi nel SGZ e nel SVZ:

in questa tabella sono riassunti dati di alcune pubblicazioni sulla neurogenesi nell'adulto e intende dare una visione generale dei diversi fattori che possono aumentare o inibire la neurogenesi. Sono descritti alcuni esempi per diverse categorie. Gli effetti indicati con "+" sono aumento; "-": riduzione; "N.C.": non varia; l'assenza dei simboli indica che non è stato determinato. "AD": malattia di Alzheimer; "HD" malattia di Huntington; "PD": malattia di Parkinson.

Stadi della neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo

La neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo avviene per tutta la vita, ma può essere modulata da diverse condizioni fisiologiche e patofisiologiche. Infatti diversi stili di vita, l'ambiente e certe patologie possono influenzare la velocità di formazione dei nuovi neuroni (*Kepermann et al., 1997; Young et al., 1999; Ra et al., 2002; Kim et al., 2002; Lledo et al., 2006*).

Diversi studi hanno mostrato che la neurogenesi nell'ippocampo aumenta durante l'apprendimento (*Rolls 2000*) e ha un ruolo importante anche per la memoria (*Praag et al., 1999; Drapeau et al., 2003*). Altri lavori hanno correlato l'aumento della neurogenesi con l'aumento della memoria di tipo spaziale (*Merrill et al., 2003; Van der Borght et al., 2005*); questo perchè la neurogenesi è correlata ad alcuni ma non a tutti i tipi di memoria ippocampo dipendenti (*Shors et al., 2002*).

La neurogenesi nell'ippocampo può essere suddivisa in diversi stadi e in ognuno di questi stadi le cellule di nuova formazione possono esprimere markers diversi (*Kempermann et al., 2004; Ming and Song, 2005*). La neurogenesi può essere divisa in cinque fasi [Fig.5].

Fase 1 (di proliferazione)

Durante questa prima fase le cellule di nuova formazione esprimono la proteina fibrillare acida della glia (GFAP) e la proteina nestina (*Fukuda et al., 2003; Filippov et al., 2003*). Nella SGZ sono stati identificati due tipi di astrociti GFAP positivi: gli astrociti orizzontali e gli astrociti radiali. Quelli orizzontali estendono processi altamente ramificati lungo il bordo della SGZ e non esprimono il marcatore delle cellule immature nestina e rappresentano l'astroglia tradizionale. Quelli radiali invece possiedono prominenti proiezioni radiali nello strato delle cellule dei granuli e altri processi laterali intercalati vicino ai neuroni dei granuli. Gli astrociti radiali

esprimono nestina e probabilmente funzionano come cellule staminali che danno origine ai neuroblasti ed eventualmente ai nuovi neuroni dei granuli. Gli astrociti radiali si trasformano in cellule di tipo D (*Alvarez-Buylla et al., 2002*). Queste cellule hanno un citoplasma ricco di organelli compresi molti mitocondri, lisosomi, abbondante reticolo endoplasmatico ruvido ed un distinto apparato del Golgi (*Doetsch et al., 1997*). Ancora, queste cellule sono di piccola taglia, appaiono immunoreattive per la GFAP e sembra che funzionino come precursori transienti nella formazione di nuovi neuroni (*Taupin, 2006*).

Fase 2 (di differenziamento) e Fase 3 (di migrazione)

La fase 2 rappresenta lo stadio in cui le cellule amplificate iniziano la loro differenziazione in neuroni immaturi [Fig.5]. Le cellule nella fase 2 sono immunoreattive per la nestina e negative per GFAP. In questa fase le cellule incominciano a formare le prime proiezioni dei processi neuronali. Al termine della fase 2 e all'inizio della fase 3 le cellule non esprimono più nestina e iniziano ad esprimere la proteina Double cortin (DCX) e la molecola di adesione cellulare neuronale polisialilata (PSA-NCAM), (*Fukuda et al., 2003*).

Nella fase 3 i neuroni immaturi esprimono entrambe le proteine DCX e PSA-NCAM e iniziano la migrazione nello strato granulare del giro dentato dell'ippocampo [Fig.5].

Fase 4 (di allungamento degli assoni e dei dendriti)

Durante questa fase i neuroni immaturi allungano i loro dendriti verso lo strato molecolare del giro dentato e i loro assoni verso la CA3 dell'ippocampo. I neuroni immaturi continuano ad esprimere DCX e PSA-NCAM ed esprimono anche la proteina calretinina e la proteina molecolare specifica dei neuroni NeuN (*Brandt et al., 2003; Llorens-Martin et al., 2006*), [Fig.5]

Fase 5 (di formazione delle sinapsi)

In questa fase i neuroni granulari di nuova formazione formano i contatti sinaptici con i neuroni che provengono dalla corteccia entorinale e inviano i loro assoni verso la CA3 e l'ilo dell'ippocampo. A partire da 2/3 settimane dall'inizio della neurogenesi queste cellule non esprimono più calretinina ed iniziano ad esprimere calbindina (*Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2004*). La calbindina è una proteina presente in tutti i neuroni maturi, ma anche in quelli di nuova formazione che si sono ben integrati nell'ippocampo (*Rami et al., 1987; Baimbridge 1992; Van Praag et al., 2002*). Oltre alla calbindina, questi neuroni esprimono anche la proteina NeuN (*Khun et al., 1996*) [Fig. 5].

Lo sviluppo dei neuroni ippocampali in neurogenesi può essere studiato attraverso l'espressione dei diversi markers appena descritti.

Immunomarcatura

BrdU

Un passo avanti nello studio della neurogenesi è stato fatto grazie all'uso della 5-bromo-2-deossipuridina (BrdU) (*Miller e Nowakowski 1988*), poiché questa tecnica immunoistochimica consente la stima delle cellule marcate, anche in sezioni spesse, con metodi di conteggio stereologici. Probabilmente la BrdU sfrutta lo stesso trasportatore della timidina e una volta incorporata nel DNA, può essere marcata mediante un anticorpo specifico il cui legame può essere visualizzato tramite le tecniche di immunoistochimica (*Gratzner, 1982*). La marcatura con la BrdU è attualmente la più utilizzata per gli studi sulla neurogenesi.

La BrdU viene introdotta principalmente mediante un'iniezione intraperitoneale. A seconda della modalità di applicazione (durata, concentrazione BrdU, tempi di sopravvivenza dopo l'iniezione di BrdU), il numero di cellule marcate all'interno del cervello può variare (*Dayer et al 2005*). Ad esempio, la BrdU in elevate concentrazioni (circa 200/300 mg per chilogrammo di peso corporeo) sono necessarie per marcare tutte le cellule in fase S nel giro dentato dell'ippocampo dell'adulto, per fare ciò la BrdU deve attraversare la barriera emato-encefalica. Trattamenti che disturbano o interrompono la funzione della barriera emato-encefalica ad esempio, le lesioni da kainato, epilessia, o ischemia (*Cornford e Oldendorf 1986; Bolton e Perry 1998*) potrebbero pertanto indurre aumenti del numero di cellule marcate dalla BrdU. Tale incremento, tuttavia, potrebbe essere indipendente dai cambiamenti nella proliferazione, dal momento che gli effetti sono attribuibili ad un'alterata disponibilità di BrdU nel cervello. La BrdU potrebbe anche marcare gli eventi di sintesi di DNA che non sono direttamente correlati alla proliferazione cellulare, come la riparazione del DNA (*Nowakowski e Hayes 2000*) e/o mancato ingresso nel ciclo cellulare, che può verificarsi come parte di un processo apoptotico nelle cellule postmitotiche (*Bauer e Patterson 2005*). Tuttavia, alcuni dati sperimentali suggeriscono che le concentrazioni in cui la BrdU viene comunemente utilizzata potrebbe non essere sufficiente per

rilevare le cellule in fase di riparazione del DNA (Bauer e Patterson 2005). La BrdU è in grado di marcare tutte le cellule in fase S del giro dentato dell'ippocampo dell'adulto, a prescindere dal destino di queste cellule marcate [Fig.7]. Pertanto, una cellula positiva alla BrdU potrebbe essere un progenitore di nuovi neuroni, ma senza l'uso di marcatori aggiuntivi, è un indicatore generale di genesi di nuove cellule, un aumento del numero di cellule marcate dalla BrdU non è di per sé, indice di neurogenesi. Di conseguenza, le tecniche di immunohistochimica che prevedono l'uso combinato di BrdU e di altre proteine, utilizzate come markers per i neuroni di nuova formazione, danno un'analisi dettagliata e specifica della neurogenesi fino al completo sviluppo e integrazione del neurone.

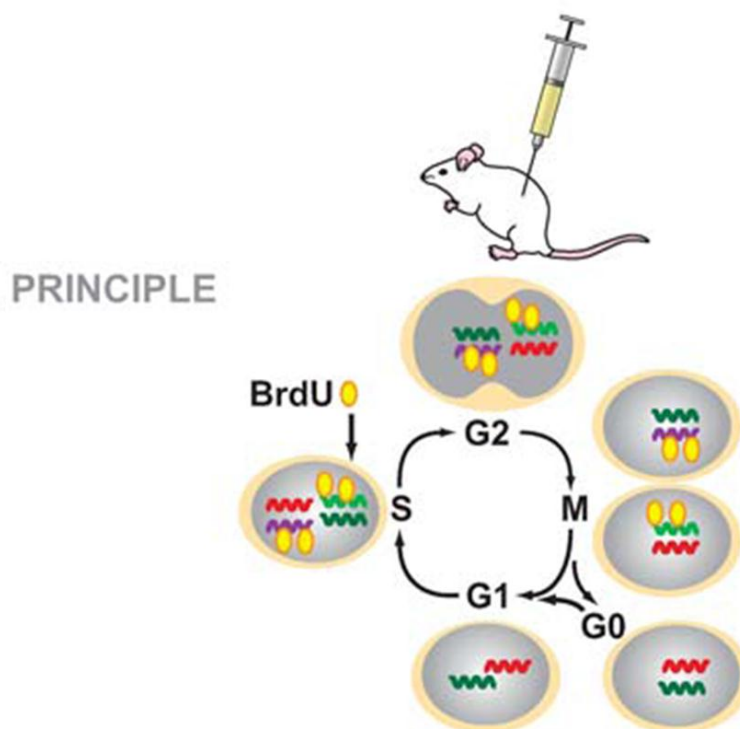


Figura 7. Metodica per lo studio della neurogenesi nell'adulto:

questa metodica si basa sull'incorporazione di un analogo del nucleotide timidina (BrdU) durante la replicazione del DNA nella fase S del ciclo cellulare

Anche se l'uso della BrdU rappresenta il metodo più utilizzato per lo studio della neurogenesi, tuttavia presenta diverse limitazioni. In base alla dose somministrata può dare un certo grado di tossicità: sono stati osservati numerosi effetti collaterali conseguenti ad alti dosaggi di BrdU (malformazioni sulla progenie se somministrata ad animali gravidi ad esempio). Le dosi maggiormente utilizzate negli esperimenti (roditori e primati non umani) vanno dai 100 ai 200 mg/kg. Gli effetti tossici sono minori nel SNC degli adulti rispetto al SNC embrionale e neonatale; infatti la barriera si sviluppa intorno al giorno 10 dopo il parto e fornisce così una maggiore protezione al SNC.

Un altro problema che si può presentare con l'utilizzo della BrdU è che essendo una base alogenata, inserendosi nel DNA può renderlo instabile favorendo l'insorgenza di mutazioni, rotture nei filamenti ecc...

Le tecniche di immunistochemical, con l'uso di un anticorpo primario che si lega ai singoli filamenti di DNA contenenti la BrdU e successivamente all'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo specifico per il complesso anticorpo primario-BrdU mi permettono di visualizzare il preparato al microscopio.

Una volta somministrata, la BrdU dovrebbe restare disponibile per un periodo di circa due ore, dopo le quali il livello scende drasticamente.

Sono stati messi a punto diversi protocolli di applicazione che utilizzano tempistiche differenti a seconda di ciò che si vuole osservare. La BrdU marca esclusivamente i nuclei delle cellule che si trovano nella fase S ma non quelli delle cellule che si trovano in altre fasi della proliferazione. Per questo motivo se si vuole marcare l'intera popolazione cellulare proliferante di quel momento o tutte le cellule proliferanti durante un periodo di tempo più esteso è necessario somministrare più volte la BrdU; se si vogliono individuare tutte le cellule proliferanti in un preciso momento le somministrazioni devono essere fatte nel giro di poche ore, mentre se si vuole osservare la proliferazione in un tempo maggiore le somministrazioni possono essere distanti anche giorni o settimane. Questo rende i risultati più affidabili in quanto con più iniezioni si ha una probabilità

inferiore di tralasciare cellule. Tuttavia, anche somministrazioni multiple possono dare problemi: si rischia infatti di marcare più volte la stessa cellula se questa si divide più volte e non si ha la certezza di aver marcato tutte le cellule in quanto alcune potevano non essere in fase S nel momento in cui è stata somministrata la BrdU. Modificando il tempismo con cui si effettuano i sacrifici a seguito delle iniezioni è possibile individuare le cellule in un particolare momento della neurogenesi; sono stati infatti definiti nuovi protocolli per definire sia il numero di iniezioni e ogni quanto tempo vanno fatte sia dopo quanto tempo dall'ultima iniezione si deve fare il sacrificio. Ad esempio se si effettua una iniezione di BrdU al giorno per un periodo totale di 10/12 giorni e si sacrifica l'animale dopo due ore dall'ultima somministrazione si possono osservare bene le cellule in proliferazione e in migrazione precoce; se invece si effettuano quattro iniezioni consecutive in un giorno o una iniezione al giorno per 10/12 giorni e si sacrifica l'animale quattro settimane dopo l'ultima somministrazione si potrà osservare bene il tipo di neurone formato in quanto le nuove cellule generate in questo lasso di tempo riescono ad andare incontro a maturazione completa.

Ki-67

Il nome Ki-67 è derivato dalla città di origine (Kiel, Germania) e il numero del clone originale in una piastra a 96 pozzetti (*Gerdes et al., 1983*). Ki-67 è un antigene nucleare espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare, tranne la fase di riposo e all'inizio della fase G1 (*Zacchetti et al., 2003*). A causa della sua breve emivita di circa 1h, è raramente rilevabile nelle cellule in fase quiescente G0 (*Zacchetti et al., 2003*). Ki-67 non è rilevabile durante i processi di riparazione del DNA ed è principalmente assente nelle cellule quiescenti (*Zacchetti et al., 2003*). Il numero di cellule Ki-67-positivo è maggiore di circa il 50% rispetto a quello delle cellule marcate con BrdU nel giro

dentato dell'ippocampo, dal momento che la BrdU può essere incorporata nel DNA solo durante la fase S del processo mitotico, mentre Ki-67 è espresso per tutta la sua durata (*Kee et al., 2002*).

Double cortin (DCX)

La Double cortin (DCX) è una proteina ampiamente espressa nel sistema nervoso in via di sviluppo, si trova associata ai microtubuli ne promuove la polimerizzazione e si ritiene che agisca anche sulla loro stabilità (*Gleeson et al.1999; Francis et al.1999*), tanto che alleli mutanti del gene per la DCX causano alterazioni e problemi nella migrazione.

La DCX è necessaria per la migrazione e differenziazione neuronale e può etichettare la prima e la seconda fase della neurogenesi nello strato infragranulare del giro dentato, espressa principalmente nei corpi cellulari neuronali e svolge un ruolo importante nella migrazione e differenziazione assonale.

La presenza della Double cortin nei neuroblasti in migrazione e nei giovani neuroni (*Gleeson et al.1999; Francis et al.1999*) è sfruttata come marker per lo studio della neurogenesi nel cervello adulto. Solitamente la sua espressione per un certo periodo è contemporanea a quella di PSA-NCAM (altro marker per la neurogenesi).

Si ritiene che l'espressione della DCX sia specifica per i giovani neuroni, in quanto le cellule positive per la DCX esprimono antigeni di tipo neuronale mentre mancano di antigeni specifici ad esempio per cellule gliali, cellule indifferenziate o cellule apoptotiche (*Rao and Shetty, 2004*).

Tuttavia non tutti i neuroni neoformati esprimono la DCX: questa proteina infatti viene espressa nei nuovi neuroni dell'ippocampo, dello striato e del bulbo olfattivo, ma ad esempio non si evidenzia nei giovani neuroni della neocorteccia (*Dayer et al. 2005*).

La DCX viene espressa in diverse fasi della neurogenesi, dalla fase in cui le cellule si differenziano in neuroni immaturi dello strato subgranulare alla fase in cui i nuovi neuroni iniziano a integrarsi formando nuove sinapsi nella rete neuronale preesistente. Quindi la DCX marca i precursori neuronali nelle ultime fasi di mitosi e i neuroni nella prima fase post-mitotica (*Brown et al., 2003*).

L'espressione della DCX decresce quando i nuovi neuroni iniziano a esprimere i markers tipici della fase di maturazione.

Il pattern di espressione della DCX nelle nuove cellule può essere studiato nei neuroni di nuova formazione insieme alla BrdU. In questo caso deve essere fatta una immunostochimica in cui devono essere usati contemporaneamente un anticorpo specifico per la BrdU ed uno per la proteina DCX. La colocalizzazione nello stesso neurone di entrambi i marcatori indica processi di neurogenesi.

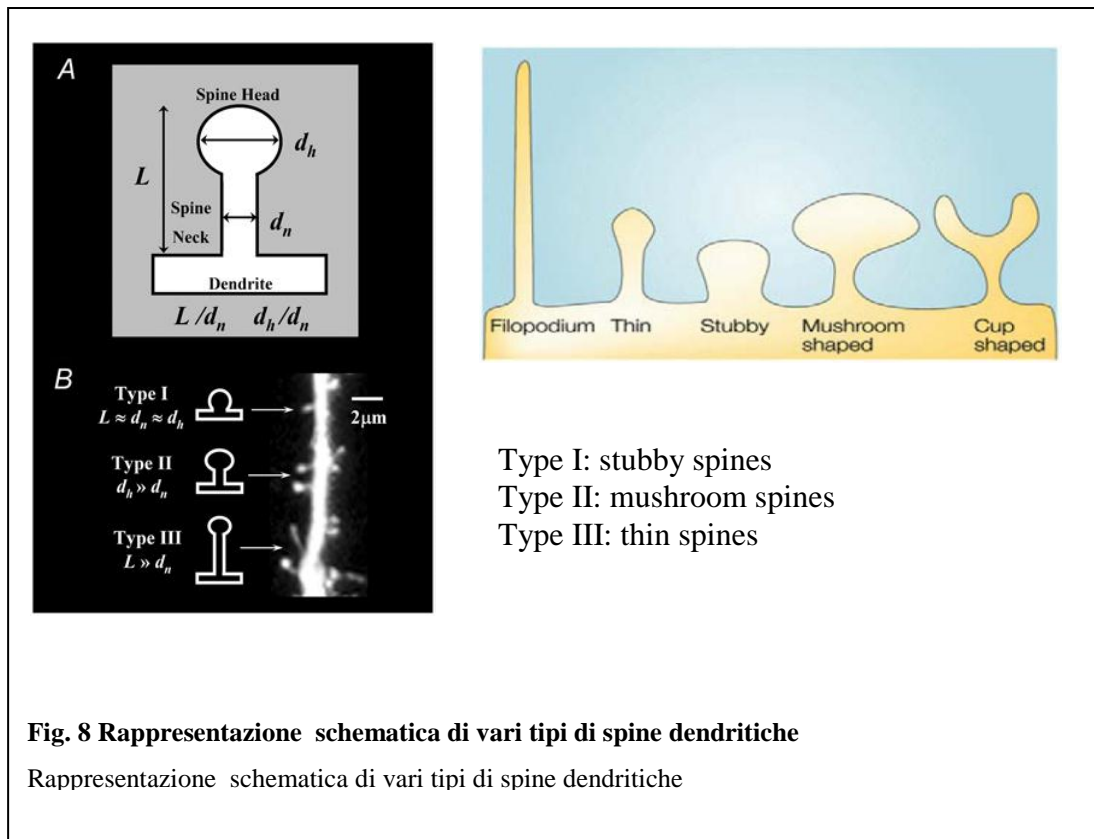
Spine dendritiche

Struttura

Le spine dendritiche sono minuscole protrusioni che emergono dai dendriti dei neuroni; sono caratterizzate da un collo e da una testa a forma di bulbo capace di ricevere input da parte di sinapsi eccitatorie e produrre una risposta postsinaptica (*Hering e Sheng, 2001*).

Le spine dendritiche costituiscono il principale sito d'azione dei segnali eccitatori nella maggior parte dei neuroni. I neuroni che possiedono spine dendritiche sono principalmente di tipo glutamatergico (per esempio neuroni piramidali) o GABAergico (neuroni di Purkinje), mentre alcune classi di neuroni non ne possiedono, come per esempio gli interneuroni GABAergici (*Hering e Sheng, 2001*).

La lunghezza di una spina dendritica in genere varia tra i 0,5 e i 2 μm , ma può raggiungere i 6 μm nella regione CA3 dell'ippocampo (*Chicurel et al. 1992*); il volume varia da meno di 0.01 μm^3 a 0.8 μm^3 (*Harris 1999*), mentre la densità oscilla tra 1 e 10 spine/ μm di dendrite maturo (*Sorra e Harris, 2000*). Attraverso dettagliati studi anatomici su tessuto cerebrale fissato, in base alla loro forma le spine dendritiche vengono classificate in sottili (thin), tozze (stubby), a fungo (mushroom) e a forma di coppa (cup-shaped) (*Harris et al. 1992; Chang et al. 1984*) [Fig. 8].



La forma delle spine può quindi variare sia per la lunghezza e lo spessore del collo, sia in base alla forma e alla dimensione della testa. Nel cervello adulto la maggior parte delle spine si trovano nella forma “thin”. Le spine “thin” hanno una lunghezza superiore al diametro del collo della spina e terminano con una piccola testa (inferiore a 0.6 μm di diametro). Le spine “stubby” sono corte e larghe, e non presentano il collo. Le spine “mushroom” hanno un collo stretto e una grande testa irregolare (>0.6 μm di diametro). Nell’area CA1 e nel giro dentato dell’ippocampo maturo questi tipi di spine dendritiche hanno un’unica sinapsi sulla loro testa. Esistono anche spine ramificate (branched) che presentano più teste che emergono da un’origine comune. In queste aree ogni testa delle spine ramificate è collegata con un diverso assone presinaptico mentre altre teste non hanno un partner presinaptico.

Classificare le spine in base alla loro forma si è dimostrato utile a garantire che l’intera gamma di morfologie possa essere rappresentata attraverso ricostruzioni tridimensionali e per determinare se si verificano variazioni morfologiche per mezzo di manipolazioni sperimentali (Kirov et al.,

1999; Sorra e Harris, 1998; Chicurel e Harris, 1992; Harris et al., 1992; Harris e Stevens, 1989). Tuttavia la classificazione arbitraria delle spine in queste quattro categorie non tiene conto della grande eterogeneità della loro morfologia che emerge anche su un singolo dendrite (Sorra e Harris, 2000). Studi di imaging in vivo hanno rivelato che le spine sono elementi molto dinamici; nonostante la loro forma tenda a stabilizzarsi con la maturazione (Holtmaat et al. 2005), e una piccola proporzione di esse è caratterizzata da un continuo turnover: alcuni studi hanno infatti mostrato che le spine di tipo “thin” sono in grado di sorgere e sparire in pochi giorni, mentre le “mushroom” possono mantenersi per diversi mesi (Holtmaat et al. 2005; Zuo et al. 2005; Majewska et al. 2006).

I filopodi costituiscono una particolare forma di spina dendritica caratterizzata da un collo molto lungo e sottile e dall'assenza della testa, sono abbondantemente presenti nei neuroni in via di sviluppo ma possono trovarsi anche nel cervello adulto in situazioni particolari, per esempio in seguito all'induzione della plasticità, ad ischemia o durante la rigenerazione dopo un danno neuronale. I filopodi dendritici sono strutture estremamente mobili e flessibili in grado di cambiare velocemente la loro conformazione, che dura solo alcuni minuti (Parnass et al. 2000; Lendvai et al. 2000). Il cambiamento della forma è determinato da un rimodellamento del citoscheletro di actina e l'attività di protusione actina-dipendente. Grazie alla loro motilità i filopodi sono adatti per l'esplorazione dello spazio attorno ai dendriti. Essi prendono ripetutamente contatti con gli assoni vicini, tuttavia solo un sottoinsieme selezionato di questi contatti viene stabilizzato nel giro di pochi minuti attraverso la generazione di un segnale dato dalla variazione di concentrazione del calcio; inoltre i filopodi sono in grado di discriminare tra gli assoni con cui contraggono una sinapsi, e infatti non stabiliscono contatti con gli assoni di neuroni inibitori (Lohmann et al. 2008); ciò suggerisce che la capacità di riconoscere gli assoni adatti per instaurare un collegamento è dovuta all'espressione o al riconoscimento di specifici segnali molecolari.

Si pensa che i filopodi dendritici possano essere morfologicamente e strutturalmente trasformati in spine dendritiche; infatti durante la prima settimana di vita postnatale emergono e interagiscono con gli assoni per formare le prime sinapsi; durante la seconda settimana cominciano poi a prevalere le spine di tipo “thin”, “stubby” e “mushroom” (*Harris et al. 1999*)

Con lo sviluppo successivo gli alberi sinaptici e le spine “stubby” diminuiscono di numero e la maggior parte delle sinapsi si trova sulle spine “thin” e “mushroom” (*Fiala et al. 1998*). Le sinapsi inizialmente si formano a partire da spine dinamiche simili a filopodi che successivamente vengono trasformati in spine stabili in modo quasi coincidente con la formazione delle specializzazioni postsinaptiche (*Okabe et al. 2001; Marrs et al. 2001*). È stato inoltre osservato che le spine “stubby” e altri tipi di spine possono originare dai filopodi in neuroni ippocampali in via di sviluppo (*Parnass et al. 2000*). Nel medesimo studio è stata evidenziata anche la trasformazione opposta, cioè il passaggio da spina stabile a filopodo. Sembra che i filopodi possano trasformarsi in spine senza essere prima riassorbiti dall’albero sinaptico. Molto probabilmente la trasformazione di un filopodo in una spina è un processo reversibile controllato da fattori locali come l’attività sinaptica.

Oltre che per forma e dimensione, le spine dendritiche si differenziano anche per gli organelli che contengono e per molecole specifiche. In generale, le spine di grandi dimensioni formano in proporzione sinapsi più estese e contengono un maggior numero di organuli. Analisi effettuate al microscopio elettronico hanno messo in evidenza un ispessimento più denso della superficie della spina localizzato sotto la membrana della testa; esso è caratterizzato dalla presenza di numerosi organelli citoplasmatici e viene definito “*densità post sinaptica*” (PSD). La PSD occupa circa il 10% della superficie della spina ed è esattamente allineata con la zona attiva presinaptica. Poiché la dimensione della testa delle spine è proporzionale alla superficie del PSD, al numero dei recettori postsinaptici (*Nusser et al., 1998*) e al numero delle vescicole presinaptiche legate (*Schikorski et al., 1997*), la crescita della testa delle spine è probabilmente correlata a un rafforzamento della trasmissione sinaptica.

La maggior parte delle sinapsi ha un unico e continuo PSD per spina, ma alcuni PSD si rivelano discontinui o perforati, e possono essere ulteriormente classificati come “*fenestrati*”, “*a ferro di cavallo*” o “*segmentati*”. Il PSD contiene recettori per il glutammato di tipo AMPA e NMDA (Nusser et al. 1998; Desmond et al. 1998).

Uno dei principali organelli presenti all'interno della spina è il reticolo endoplasmatico liscio (SER); esso ha una forma allungata e schiacciata, è costituito da grandi cisterne e si trova in alcune spine in base alla dimensione della spina stessa (Spacek e Harris, 1997). Il SER probabilmente regola la concentrazione intracellulare di calcio nella spina, immagazzinandolo e rilasciandolo in risposta ad uno stimolo sinaptico (Sabatini et al., 2001; Svoboda, 1999). Alcune spine presentano un SER più complesso chiamato “*apparato della spina*” che è spesso associato alla presenza di poliribosomi e del reticolo endoplasmatico rugoso (Steward et al., 1996, 1998).

La funzione dell'apparato della spina non è ancora chiaro. Tuttavia la sua ultrastruttura suggerisce che possa essere coinvolto nella sintesi di proteine legate alla membrana o a proteine di trasporto, in modo simile al reticolo endoplasmatico rugoso (RER) o al complesso di Golgi nel soma cellulare (Spacek e Harris, 1997). Nelle spine dendritiche, soprattutto in quelle di grandi dimensioni, sono state trovate anche vescicole rivestite, endosomi e corpi multivescicolari. I mitocondri sono generalmente assenti nella maggior parte delle spine dendritiche, anche se sono abbondanti nei dendriti. Nell'ippocampo i mitocondri sono stati trovati solamente nelle grandi spine dendritiche dell'area CA3 (Chicurel e Harris, 1992). A generare l'energia necessaria per la trasduzione del segnale nella spina è l'ATP che può diffondere dai mitocondri presenti nel dendrite; in alternativa l'ATP può essere prodotto grazie alla glicolisi direttamente nella sinapsi (Wu et al., 1997).

Le spine dendritiche ippocampali hanno un citoscheletro costituito da actina che si distingue dal citoscheletro dendritico per l'assenza di microtubuli e filamenti intermedi (Kaeck et al., 1997; Markham e Fifikova, 1986; Cohen et al., 1985; Matus et al., 1982). Il citoscheletro delle spine partecipa a rapidi cambiamenti nella forma, che presumibilmente alterano la funzione sinaptica.

Le spine dendritiche contengono una complessa miscela di ioni, lipidi, proteine come per esempio molecole di segnalazione e di adesione cellulare, recettori per i neurotrasmettitori, canali ionici, proteine del citoscheletro e diversi enzimi (*Sorra e Harris, 2000*).

Plasticità delle spine dendritiche

Eterogenee per forma e dimensioni, le spine dendritiche non sono elementi statici, ma nel cervello adulto la loro morfologia cambia continuamente in funzione dell'attività neuronale, dell'esperienza e dell'apprendimento, riflettendo così la natura plastica delle connessioni sinaptiche (*Matus 2000; Lendvai et al. 2000; Trachtenberg et al. 2002; Zuo et al. 2005; Holtmaat et al. 2005*). La capacità di crescita e modellamento delle connessioni è tipica dello sviluppo ma persiste anche nell'adulto (*Gilbert e Wiesel, 1992*), e viene definita *plasticità neuronale*.

Gli studi che hanno esaminato gli effetti dell'esperienza sensoriale sulla plasticità sinaptica hanno mostrato cambiamenti sia nel numero che nella morfologia delle spine dendritiche; ratti stabulati in un ambiente arricchito hanno mostrato un aumento nel numero, nella dimensione e nella densità delle spine dendritiche (*Diamond et al. 1975; Leggio et al. 2005*). Al contrario una riduzione delle esperienze sensoriali mediata da un allevamento al buio riduce la densità delle spine nella corteccia visiva, effetto parzialmente revertito dalla successiva esposizione alla luce (*Wallace e Bear, 2004*). Un altro studio (*Geinisman et al. 2000*) ha mostrato che l'apprendimento è in grado di modificare la forma delle spine nell'ippocampo.

Le sinapsi ippocampali e corticali subiscono modificazioni strutturali per dimensioni e forma in seguito a LTP “*in vitro*” e in seguito all'esperienza “*in vivo*” (*Matsuzaki et al. 2004; Holtmaat et al. 2006; Harvey et al. 2007*); inoltre le spine che si formano possono dar vita a nuove sinapsi funzionali ed eventualmente rimpiazzare le spine non attive (*Engert et al. 1999*). La LTP induce

modificazioni del numero e della morfologia delle spine in regioni importanti per l'apprendimento, come l'ippocampo e la corteccia. Pare che l'aumento del numero delle spine sia dovuto a una nascita di nuove spine dendritiche piuttosto che al formarsi di queste dalla divisione di spine già esistenti (*Fiala et al., 2002*).

Grande importanza per quanto riguarda gli effetti sulle spine dendritiche rivestono anche le neurotrofine in generale, data la loro azione sulle sinapsi eccitatorie (*Poo, 2001; Tyler et al., 2002 a,b; Vicario-Abejon et al., 2002*); in modo particolare il BDNF è un importante candidato nel mediare i cambiamenti attività dipendenti delle spine dendritiche nel sistema nervoso centrale.

Una struttura anomala delle spine è spesso associata a vari disturbi neurologici, come la sindrome dell'X fragile, la sindrome di Down o di Rett (*Kaufmann et al. 2000*).

Gli ormoni sessuali sono in grado di alterare la densità delle spine dendritiche; le femmine di ratto infatti mostrano un maggior numero di spine rispetto ai maschi nella regione CA1 dell'ippocampo; inoltre la densità delle spine cambia anche nelle varie fasi del ciclo estrale (*Mong et al. 2001; Shors et al. 2001; Woolley et al. 1992; Yankova et al. 2001*). La densità delle spine dendritiche risulta essere aumentata nell'ippocampo di ratti maschi in seguito a un evento stressante acuto, ma è ridotta nell'ippocampo di ratti femmina (*Shors et al. 2001*).

Di notevole interesse è anche l'influenza che la maternità e gli ormoni della gravidanza hanno per quanto riguarda la plasticità neuronale. E' stato dimostrato che la gravidanza e gli ormoni che in questa fase vengono prodotti stimolano la proliferazione delle spine dendritiche nella regione CA1 dell'ippocampo femminile. Inoltre quest'incremento nel numero delle spine dendritiche sembra mantenersi stabile anche nel cervello delle femmine che sono nel periodo dell'allattamento, il cui profilo ormonale è differente se paragonato a quello di femmine nelle fasi terminali della gravidanza. Stabilito l'importante ruolo che l'ippocampo ha sulla memoria e sull'apprendimento, e l'influenza che le spine dendritiche hanno per quanto riguarda la regolazione molecolare del fenomeno dell'allattamento, gli studi ottenuti suggeriscono un

miglioramento nel caratteristico comportamento che viene attuato dalle femmine durante la maternità. Sembra quindi che vengano migliorati i processi di apprendimento e memoria, in modo particolare la memoria spaziale (*Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005; Tomizawa et al., 2003*), e un miglioramento si nota anche per quanto riguarda la reattività all'ambiente (*Wartella et al., 2003*); tutto questo avrebbe una notevole importanza nel contesto in cui la madre sviluppa tutta una serie di comportamenti specifici mirati alla cura e alla protezione della prole.

Le funzioni delle spine dendritiche

Le spine dendritiche probabilmente si sono evolute per sostenere il vasto numero di sinapsi che si trovano nei singoli neuroni. I Platelmini (Planaria) sono i più semplici organismi che possiedono simmetria bilaterale e un cervello primitivo. Diversi tipi di neuroni di Planaria possiedono spine dendritiche. Anche i neuroni di altri invertebrati mostrano delle strutture simili alle spine dendritiche. Per questo motivo è presumibile che le spine apparvero molto prima dello sviluppo del cervello dei mammiferi (*Reuter e Gustafsson, 1995; Sarnat e Netsky, 1985; Keenan et al., 1981*). Le spine dendritiche consentono ai dendriti di aumentare la loro superficie di contatto con l'assone; in pratica, esse consentono l'incremento della densità sinaptica.

Nel sistema nervoso centrale la maggior parte degli input eccitatori glutamatergici sono ricevuti dalle spine dendritiche dei neuroni postsinaptici. Le spine dendritiche ippocampali differiscono dalle spine presenti in altre aree del cervello (*Groves et al., 1994; de Zeeuw et al., 1990; Gerfen, 1988; Spacek e Hartmann, 1983*) e raramente presentano sinapsi inibitorie o modulatorie peptidergiche (*Trommald e Hulleberg, 1997; Harris e Stevens, 1989*). Le sinapsi modulatorie, infatti, tendono ad essere localizzate sui vicini alberi dendritici o sul soma dei neuroni dell'ippocampo.

Molti modelli biofisici suggeriscono che il collo delle spine dendritiche possa rallentare il trasferimento di cariche dalla sinapsi al dendrite genitore (*Segev e Rall, 1988, 1998*). Quindi vi è un potenziale più grande sul dorso della testa per un periodo transitorio dopo l'attivazione sinaptica che facilita l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti. La maggior parte delle spine non sono lunghe e sottili abbastanza per impedire totalmente il trasferimento delle cariche dalla sinapsi al dendrite madre. Per questo motivo alcuni studiosi pensano che la funzione primaria delle spine dendritiche sia quella di fornire un micro compartimento in cui far avvenire alcune reazioni chimiche postsinaptiche, come per esempio quelle che richiedono un'elevata concentrazione di calcio (*Svoboda et al., 1996; Harris e Stevens, 1989*).

Esperimenti di imaging hanno dimostrato che le spine dendritiche compartmentalizzano il calcio in modo tale che le variazioni intracellulari della sua concentrazione non si diffondano da una sinapsi attiva alle vicine sinapsi inattive. La forma e le dimensioni delle spine contribuiscono alle differenze della cinetica del calcio, le quali poi si traducono in diversi eventi di segnalazione sinaptica. Tali variazioni nella concentrazione del calcio localizzate nelle spine dendritiche sono il risultato del flusso ionico attraverso canali voltaggio-dipendenti o ligando-dipendenti (per esempio recettori NMDA) o del rilascio di calcio dai depositi intracellulari (SER). A seconda della fonte da cui deriva il calcio o del cambiamento di concentrazione dello stesso vengono evocati diversi meccanismi di segnalazione. Prove recenti suggeriscono che una concentrazione elevata di calcio è sufficiente a modificare la lunghezza delle spine.

Le spine possono agire come compartimenti chimici semiautonomi poiché sono separate dall'albero del dendrite attraverso un "collo" che spesso è molto sottile. La geometria del collo delle spine può controllare la cinetica e la grandezza della risposta postsinaptica del calcio.

Un'altra caratteristica utile delle spine è che il volume delle loro testa è abbastanza ridotto da permettere cambiamenti notevoli nei livelli di calcio intrasinali in risposta all'apertura di un piccolo numero di recettori o canali (*Sorra e Harris, 2000*).

Tuttavia il significato funzionale della plasticità delle spine non è ancora del tutto chiaro.

Arborizzazione dendritica

I neuroni svolgono un ruolo vitale nel sistema nervoso centrale e periferico, compresa l'integrazione, la produzione e la trasmissione di segnali elettrochimici, e la creazione di connettività di rete plastica. Dallo sviluppo prenatale fino all'età adulta, queste funzioni sono determinate da molti fattori interagenti, come l'espressione di diversi geni,

dinamiche molecolare intracellulari, e il tipo e la distribuzione di canali ionici (*Scorcioni R. et al., 2008; Uylings et al., 2002*).

I neuroni mostrano strutture di ramificazione allungate derivanti dai loro corpi cellulari. Questi alberi, chiamati assoni e dendriti, rispettivamente inviano e ricevono segnali da e verso altri neuroni. Assoni e dendriti differiscono per dimensioni e forma, sia tra loro e all'interno delle diverse classi di cellule. Data la complessità e la variabilità della morfologia neuronale, i metodi computerizzati sono tipicamente impiegato per eseguire analisi complete e quantitative.

Forma e dimensione dei neuroni

Distinti gli aspetti funzionali del neurone, le dimensioni interne sono definite dal numero totale di rami terminali (il "grado" dell'albero) o da altre caratteristiche morfometriche, inclusi lunghezza totale, l'area superficiale e volume interno (*Ascoli GA, et al., 2008*).

L'estensione spaziale del neurone può anche essere descritto in termini della distanza raggiunta dal soma o per l'altezza, larghezza, e profondità di un box contenente l'intera arborizzazione. La lunghezza maggiore corrisponde spesso ad una maggiore area di spazio invaso, e quindi un maggiore potenziale di connettività.

Per gli assoni può verificarsi un aumento di divergenza (un segnale inviato a molte cellule). Cablaggio totale viene minimizzato aumentando lunghezza di assoni e dendriti (*Chklovskii DB. 2000*) quando la divergenza è maggiore della convergenza (più presinaptici rispetto ai neuroni postsinaptici). Quando la convergenza è maggiore della divergenza, i dendriti sono relativamente di maggiore lunghezza. Queste previsioni sono state confermate nella retina, cervelletto, bulbo olfattivo e neuroni corticali.

La superficie di membrana è correlata con il numero di sinapsi in dendriti e assoni terminali (*Liu G. 2004; Pierce JP, Milner TA. 2001*).

La velocità di propagazione del segnale cresce linearmente con il diametro, tuttavia il costo metabolico anche cresce a causa del rapporto quadrato tra diametro e sezione (*Wang SS, et al., 2008*). All'interno dei grandi costi metabolici del cervello, la trasmissione sinaptica e la generazione degli spike sono particolarmente ad alta intensità di energia a causa dell'elevata ATP richiesta dalle pompe ioniche (*Laughlin SB. et al., 1998*). Il numero totale di rami (definito come la regione tra due biforcazioni o tra una biforcazione ed una terminazione) è un'altra misura assoluta delle dimensioni dell'albero e varia ampiamente tra i tipi di cellule. Rami singoli possono operare singolarmente per l'elaborazione separata di gruppi specifici di input sinaptici (*Losonczy A, Makara JK, Magee JC 2008*). Le biforcazioni servono anche come nodi di integrazione, incrementando la potenza dendritica (*Mel BW. 1994*).

Ogni percorso all'interno di un albero, dal soma alla terminazione, ha il suo proprio numero totale di rami, la lunghezza, la superficie e il volume. Per qualsiasi metrica dimensione, la portata massima tra tutti i percorsi in un albero è anche funzionalmente rilevante. l'ordine dei rami, definito come il numero di biforcazioni dal corpo cellulare, influenza anche i segnali. Modelli di calcolo e gli esperimenti elettrofisiologici hanno dimostrato che i punti di diramazione sono soggetti ad una interruzione della propagazione del segnale attivo. Queste interruzioni sono a causa di una mancata corrispondenza tra i rami. Una maggiore densità di biforcazioni quindi può avere un impatto significativo sulla propagazione passiva e attiva del segnale sia verso o lontano dal soma. Tutte le proprietà morfologiche suddette maturano attraverso varie fasi di sviluppo. Inizialmente, i neuroni sono piccoli, e rami mediocri si estendono dal corpo cellulare. Dopo più fasi di retrazione e l'allungamento, uno dei rami si differenzia rapidamente per allungamento e adotta caratteristiche assonali (*Dotti CG. et al., 1988*). Il resto dei germogli eventualmente assume proprietà dendritiche, di spine, piccole sporgenze con sinapsi eccitatorie con gli assoni (*Scott E, et al., 2001*). Gli assoni e dendriti inoltre sviluppano proprietà biofisiche distinte, tra cui le distribuzioni di canale e il citoscheletro (*Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K. 2002;*). I rami di allungamento e le arborizzazioni formano

sinapsi con altri processi cellulari, creando una rete neuronale. La connettività di rete deve essere rimodulata attraverso la retrazione delle sinapsi sottoutilizzate, e la stabilizzazione di quelle funzionanti (Luo L, O'Leary DD. 2005). Questa plasticità è guidata da fattori dinamici, e da una intensa attività che può influenzare i neuroni durante lo sviluppo e in modi diversi a seconda dell'età e del tipo di cellule (McAllister AK. 2000). I meccanismi di crescita dendritica sono sensibili agli stimoli ambientali, producendo grandi ramificazioni negli esseri che vivono in un ambiente arricchito (Fiala BA et al., 1978; Nilsson M. et al., 1999) e piccole ramificazioni in risposta ad ambienti stressanti (Magariños AM. et al., 1996; Bremner JD. et al., 1997). Il citoscheletro è la struttura che sta alla base della forma e delle caratteristiche fisiche di dendriti e assoni. Il citoscheletro fornisce e mantiene le proprietà strutturali degli alberi neuronali, mediando il trasporto intracellulare, e il diametro del ramo, l'allungamento, e le biforcazioni (Bhaskar L. et al., 2007; Hillman DE. et al., 1988; Dent EW. et al., 2003).

La struttura del citoscheletro è formata dai filamenti di actina, microtubuli, e dai filamenti intermedi. Nei dendriti, l'actina è in gran parte posizionata vicino alla superficie del ramo, dove può generare alta densità di spine, formare i filopodi e guidare la direzione e la forma generale delle spine (Fischer M. et al., 1998). I microtubuli compongono gran parte della base del ramo e agiscono come un osso scheletrico mantenendo la forma dell'albero neuronale. I microtubuli danno la giusta polarità che determina la direzione di trasporto ed è una risorsa importante per il fattore di differenziazione tra assoni e dendriti. I microtubuli assonali trasportano solo distalmente, mentre i microtubuli dendritici in entrambe le direzioni (Baas PW. et al., 1988).

Il percorso principale di un albero neuronale può essere definito come il percorso dal soma verso una terminazione sinaptica, mentre molti meccanismi biofisici come i messaggeri chimici e componenti metabolici determinano i tipi di cellule di tutto il corpo, anche la caratterizzazione neuronale sarebbe incompleta senza considerare la sua completa morfologia.

E' inoltre un evento dinamico nella propagazione del segnale, l'integrazione, e la connettività.

Le misure morfometriche sommate tra gli alberi possono caratterizzare gli aspetti fondamentali di diversi tipi di cellule. Tutte queste proprietà sono mediate dalla funzione dell'ambiente e dall'efficienza metabolica. Crescita e modelli funzionali, unitamente alle proprietà morfologiche, hanno la capacità di isolare i singoli elementi e aumentare la comprensione delle loro relazioni l'uno all'altro (*Kerry M. et al., 2008*).

Lo sviluppo delle ramificazioni dendritiche e la loro stabilizzazione sono indotti dagli stimoli sinaptici pervenuti al neurone e l'attività sinaptica che regola lo sviluppo e la stabilità dell'albero dendritico si modifica con la maturazione delle sinapsi e dei neuroni. I dendriti sono i siti primari di connessione sinaptica e sono anche il luogo in cui gli ingressi sinaptici sono integrati prima dell'inizio del potenziale d'azione. Questa attività che rimodella le strutture sinaptiche avviene durante lo sviluppo del cervello (*Feller MB, 1999*), attività necessaria per la creazione di collegamenti tra cervello e le altre regioni (*Katz LC. et al., 1996*). L'attività rimodellativa è importante anche durante gli eventi iniziali di formazione degli alberi dendritici che possono essere paragonati ad eventi che regolano la stabilizzazione degli alberi in neuroni maturi. Neuroni differenziati di recente tipicamente estendono un assone prima, e poi, dopo un ritardo di diverse ore, inizierà ad elaborare la ramificazione dendritica. Nel corso dei giorni successivi, il moncone dendritico cresce rapidamente. Dopo diversi giorni di rapida crescita, la crescita della ramificazione dendritica rallenta di circa la metà rispetto a quanto osservato nei neuroni neoformati (*Wu G-Y. et al., 1999*).

Perché le ramificazioni dendritiche in sviluppo aggiungono e ritraggono i loro rami? Si potrebbe pensare che il modo più 'efficiente' di crescere di una ramificazione è aggiungere rami e tenerli. I dati indicano, tuttavia, che le ramificazioni in rapida crescita sono estremamente dinamiche, e che le ramificazioni diminuiscono la loro dinamicità quando smettono di crescere. Una possibilità è che i rami 'testano' l'ambiente per la formazione di sinapsi ottimali. Successivamente, quando la ramificazione è formata, l'attività sinaptica ha un ruolo drammaticamente diverso nella stabilizzazione della struttura degli alberi dendritici. Un'idea è

che questa attività regola sia le integrazioni del ramo che le ritrazioni. Le integrazioni dei rami dendritici possono essere aumentate a causa del rilascio spontaneo di glutammato dai rami degli assoni. Appena aggiunti i rami dendritici testano l'ambiente locale per la formazione di sinapsi e sono mantenuti se formano sinapsi stabili. La seconda idea è che le sinapsi buone potrebbero promuovere ulteriormente l'elaborazione dell'arborizzazione. Ma anche i meccanismi che rallentano o inibiscono la formazione dell'albero dendritico sono ugualmente importanti durante lo sviluppo del cervello. Malattie caratterizzate dalla formazione di grandi alberi dendritici inducono un grave ritardo mentale (*Kaufmann WE. et al., 2000; Purpura DP, 1975*). Questi meccanismi possono incidere su due proprietà fondamentali delle ramificazioni dendritiche: l'area di copertura, o 'campo recettivo', e il grado di ramificazione all'interno dell'albero. I meccanismi che limitano o migliorano la complessità dendritica sono suscettibili ad influenzare sia le proprietà integrative che il *firing* del neurone. Per esempio, neuroni densamente ramificati, come i neuroni stellati, hanno differenti proprietà integrative e *firing* da quelli di neuroni con più ramificazioni dendritiche diffusamente ramificati (*Mainen ZF, et al., 1996*). Una ramificazione dendritica più folta può ricevere input convergenti maggiori di neuroni meno ramificati. Pertanto, meccanismi che influenzano la densità del ramo potrebbero influenzare il grado in cui ingressi afferenti distinti influenzano il neurone postsinaptico.

Materiali e Metodi

Animali

Per gli esperimenti ho utilizzato femmine di ratti Sprague-Dowley CD (Charles Rivers, Como), con peso corporeo di circa 180-200 grammi, e ratti maschi del ceppo Sprague-Dowley CD (Charles Rivers) del peso corporeo di circa 250-300 gr, mantenuti con un ciclo luce-buio di 12 ore, a temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidità (65%) costanti, con la disponibilità *ad libitum* di acqua e cibo.

Per l'accoppiamento un ratto maschio e una femmina sono stati stabulati nella stessa gabbia per un giorno; l'accoppiamento è stato verificato la mattina seguente in base alla presenza del tappo spermatico nella gabbia. Questo giorno è stato considerato il giorno 0 di gravidanza.

Dopo l'accoppiamento, le femmine sono state separate dai maschi e sono state stabulate in gruppi di 4-5 per gabbia fino al giorno prima del parto, poi sono state stabulate in gabbie singole con i loro piccoli fino al giorno dello svezzamento. Durante il periodo post-partum un gruppo di mamme sono state sottoposte al protocollo di separazione materna. Infine, sono state sacrificate 21 giorni dopo il parto, nel momento in cui sono stati svezzati i piccoli, mentre un gruppo di piccoli è stato sottoposto ad isolamento sociale e un secondo gruppo stabulato in condizioni standard fino al loro utilizzo.

Protocollo per la Separazione Materna

Per valutare gli effetti dello stress indotto dalla separazione materna, a partire dal 3° al 15° giorno dopo il parto i piccoli sono stati allontanati ogni giorno dalla loro mamma. Sono stati utilizzati due diversi protocolli di separazione materna:

- breve durata, in cui ogni giorno i piccoli sono stati allontanati dalla loro mamma per 15 minuti dalle ore 9:00 alle ore 9:15;
- lunga durata, in cui ogni giorno i piccoli sono stati allontanati dalla loro mamma per 3 ore al giorno, dalle ore 9:00 alle ore 12:00.

I piccoli, appartenenti ad entrambi i gruppi, durante l'allontanamento sono stati posti in una nuova gabbia e trasferiti in una nuova stanza a 25°C, in modo da non comunicare con la propria mamma attraverso le vocalizzazioni. I piccoli appartenenti al gruppo di controllo non sono mai stati allontanati dalla loro mamma, ma ogni giorno alle ore 9:00 sono stati manipolati.

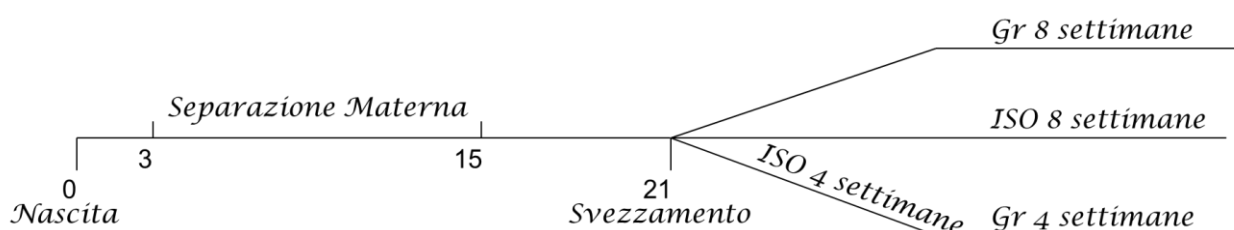
Protocollo Isolamento sociale

Il giorno dello svezzamento (giorno 21° dopo la nascita), i ratti di controllo e quelli sottoposti alla separazione materna breve e lunga sono stati suddivisi in 3 gruppi:

- a) *controllo*: stabulati in gruppi in 5 per gabbia, per tutta la durata dell'esperimento (60 giorni);
- b) *ratti isolati*: ratti allevati in gabbie singole per 60 giorni;
- c) *ratti isolati e riuniti in gruppo*: ratti stabulati singolarmente in una gabbia per 30 giorni e poi reinseriti in gabbia in gruppo di 5 ratti per altri 30 giorni.

Durante l'isolamento i ratti sono stabulati nelle gabbie singole ma in un'unica stanza. Al termine dei 60 giorni i ratti appartenenti a tutti e 3 i gruppi sperimentali sono stati divisi in altri 3 gruppi:

- un gruppo sacrificato e il cervello prelevato per lo studio delle spine dendritiche e dell'arborizzazione dendritica;
- un gruppo trattato con BrdU, sacrificato 24 ore dopo l'iniezione e utilizzato per lo studio della proliferazione cellulare;
- un terzo gruppo è stato trattato con BrdU e sacrificato dopo 10 giorni per lo studio della neurogenesi.



Trattamento con BrdU

La BrdU (200 mg/kg, Sigma) è stata sciolta in soluzione fisiologica e iniettata in peritoneo una sola volta nei ratti sacrificati dopo 24 ore mentre per quattro giorni consecutivi nei ratti sacrificati dopo 10 giorni, in modo da poter marcare tutte le cellule in neurogenesi nelle varie fasi del ciclo cellulare.

Immunoistochimica

Preparazione del tessuto

Prima di essere sacrificati, i ratti sono stati anestetizzati profondamente con equithesin (3 ml/Kg, costituito da una miscela di 1g di pentobarbital sodico, 4.251g di cloralio idrato, 2.125g MgSO₄, 12 ml EtOH, 43.6 ml di glicole e acqua distillata fino ad arrivare ad un volume di 100 ml). I tessuti sono stati quindi fissati con paraformaldeide al 4% (w/v) disciolta in tampone fosfato 0,1M (costituito da NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄, pH 7,4) tramite perfusione intracardiaca inizialmente con tampone fosfato (circa 100 ml) per eliminare il sangue dai tessuti. Dopo aver perfuso il tampone fosfato, senza interrompere mai il flusso, è stata iniettata la paraformaldeide (circa 250 ml). Infine è stato prelevato il cervello dell'animale e questo è stato postfissato immergendolo per 24 ore a 4°C in paraformaldeide. Successivamente il tessuto è stato immerso per una notte in una soluzione di tampone saccarosio al 20%, quindi è stato conservato in tampone fosfato e saccarosio al 30% sino al giorno del taglio. Questo passaggio ha permesso l'eliminazione della paraformaldeide in eccesso ed inoltre ha protetto il tessuto dalla formazione di ghiaccio durante la conservazione delle fettine a -20°C.

Il cervello è stato poi tagliato mediante un vibratomo. Sono state tagliate fette sagittali di 50 µm di spessore, che sono state deposte singolarmente nei pozzetti di una piastra multiwells contenente liquido anticongelante, conservate in freezer fino al giorno dell'esperimento di immunoistochimica.

Studio della proliferazione cellulare con BrdU

Il giorno dell'esperimento le fettine sono state lavate con tampone PBS 1X (10 mM di Na₂HPO₄, 140mM di NaCl, 2 mM KH₂PO₄ 3 mM KCl) e poi con tampone PBS 1X più Triton X-100 allo 0.3 % (PBS-T). Il Triton X-100 è un detergente non ionico che forma dei complessi con le molecole di colesterolo presenti nelle membrane cellulari inducendo la formazione di micropori che permettono l'ingresso delle molecole di anticorpo all'interno delle cellule. Questo trattamento è necessario perché gli anticorpi sono molecole di grandi dimensioni che non attraversano facilmente le membrane cellulari. Il Triton permette quindi di permeabilizzare le membrane ma non interagisce con le reazioni antigene-anticorpo. Successivamente sono state incubate con PBS + 5% di sieroalbumina bovina per 1 ora, in modo da bloccare i siti immunoreattivi non specifici. Infatti, gli anticorpi interagiscono spesso in maniera idrofobica ed elettrostatica con altri composti presenti nelle cellule e la soluzione migliore per evitare la formazione di questi legami aspecifici è trattare i tessuti con un soluzione proteica inerte (siero) prima di applicare l'anticorpo primario. Le proteine presenti nel siero interagiscono con le proteine cellulari che potrebbero competere con gli anticorpi per i siti di legame idrofobici presenti nelle cellule. Le fettine sono state quindi incubate tutta la notte con l'anticorpo primario specifico per BrdU (Millipore) alla concentrazione 1:500. Questo anticorpo non necessita della denaturazione del DNA. Trascorso questo tempo le fettine sono state lavate per 3 volte con tampone PBS-T in modo da eliminare la soluzione di anticorpo primario in eccesso. Le fettine sono state quindi incubate per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario specifico (Ab II goat anti-mouse) concentrato 1:100, coniugato con il fluorocromo FITC. Per poter localizzare nel giro dentato dell'ippocampo le cellule marcate con BrdU, tutti i neuroni sono stati marcati con il colorante Hoechst 33342. Pertanto le fettine sono state incubate per 30 minuti con una soluzione di 3 ng/ml di Hoechst 33342 preparata in PBS-T. Questo composto si lega alla

timidina ed adenina del DNA, per cui è in grado di marcare i nuclei di tutte le cellule; inoltre è un composto fluorescente, e può essere visualizzato con un microscopio a fluorescenza. Al termine dell'incubazione, le fettine sono state lavate con tampone PBS 1X, distese nel vetrino e il coprioggetto è stato montato con gelatina-glicerolo.

Studio della proliferazione cellulare con Ki-67

Il giorno dell'esperimento le fettine sono state lavate con tampone PBS 1X (10 mM di Na_2HPO_4 , 140mM di NaCl, 2 mM KH_2PO_4 3 mM KCl) e poi con tampone PBS 1X più Triton X-100 allo 0.3 % (PBS-T). Successivamente sono state incubate con PBS + 5% di sieroalbumina bovina per 1 ora, in modo da bloccare i siti immunoreattivi non specifici. Le fettine sono state quindi incubate tutta la notte con l'anticorpo primario specifico per Ki-67 (Millipore) alla concentrazione 1:200. Trascorso questo tempo le fettine sono state lavate per 3 volte con tampone PBS-T in modo da eliminare la soluzione di anticorpo primario in eccesso. Le fettine sono state quindi incubate per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario specifico (Ab II goat anti-rabbit) concentrato 1:1000 coniugato con il fluorocromo DyLight594. Infine le fettine sono state incubate per 30 minuti con una soluzione di 3 ng/ml di Hoechst 33342 preparata in PBS-T.

Al termine dell'incubazione, le fettine sono state lavate con tampone PBS 1X, distese nel vetrino e il coprioggetto è stato montato con gelatina-glicerolo.

Studio della neurogenesi

Le fettine sono state prelevate dal liquido anticongelante, trasferite in tampone PBS 1X (10 mM di Na_2HPO_4 , 140mM di NaCl, 2 mM KH_2PO_4 3 mM KCl) e sono stati eseguiti due lavaggi da 10 minuti ciascuno. In seguito ai lavaggi è stato applicato il trattamento per la denaturazione, necessario per la penetrazione dell'anticorpo primario che marca la BrdU integrata nel DNA. Le fettine sono state incubate in acido citrico 0.1 M per 5 minuti a 90 gradi centigradi. Terminati i 5 minuti le fettine sono state sottoposte a 3 lavaggi da 5 minuti in PBS 1X e poi sono state incubate con tripsina 0.05% in TBS (tris buffer) e CaCl allo 0,1% per 10 minuti. Eseguiti altri tre lavaggi, le fettine sono state incubate in HCl 2N per 60 minuti a 37 gradi centigradi per la denaturazione del DNA. Terminato questo trattamento, per neutralizzare l'acido cloridrico i tessuti sono stati immersi per 10 minuti in tampone borato 0.1 M, pH 8.5 per due volte.

Successivamente, le fettine sono state incubate per un'ora in siero di pollo al 3% preparato in PBS-T (10 mM di Na_2HPO_4 , 140mM di NaCl, 2 mM KH_2PO_4 3 mM KCl + Triton X-100 0.1%) allo 0.3 %. Terminato il blocking, senza l'interposizione di lavaggi in quanto questi determinerebbero la rimozione del siero, le fettine sono state trattate con l'anticorpo primario. In questa marcatura sono stati utilizzati due anticorpi primari: uno che si lega alla BrdU (anticorpo di ratto monoclonale diluito 1:200) e l'altro che invece si lega alla DCX (anticorpo policlonale preparato in capra, diluizione 1:250). Gli anticorpi sono stati preparati in PBS-T 0.3 %, e i tessuti vengono incubati in camera fredda per una notte.

Il giorno successivo i tessuti sono stati sottoposti a 3 lavaggi da 5 minuti in PBS-T per lavare l'eccesso di anticorpo e poi sono stati incubati per due ore con gli anticorpi secondari preparati in PBS-T 0.3 %. Gli anticorpi utilizzati sono due: un anticorpo preparato in pollo specifico per le immunoglobuline di ratto e coniugato al FITC (diluizione 1:200) e un anticorpo preparato in asino specifico per le immunoglobuline di capra coniugato con Alexa594 (diluizione 1:1000).

Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario le fettine sono state lavate con tampone PBS-T, distese nel vetrino portaoggetto e montato il vetrino coprioggetto con una goccia di gelatina-glicerolo.

Analisi delle immagini al microscopio confocale e conta delle cellule marcate

Le fettine sono state visualizzate al microscopio confocale (Leica TCS SP5X AOBS). Le immagini acquisite sono state analizzate mediante un programma per l'analisi delle immagini (Leica Application Suite).

Tutte le immagini sono state acquisite con un obiettivo 40X (NA=1.3).

Per la marcatura con Brdu: le cellule in proliferazione marcate con Brdu sono state visualizzate in verde, in quanto il fluorocromo FITC viene eccitato alla lunghezza d'onda di 495nm ed emette in 519nm con l'ausilio del laser Argon.

Tutti i neuroni della fettina invece sono stati visualizzati in blu, in quanto l'Hoechst 33342 viene eccitato a 360nm ed emette in misura ottimale a 470nm.

Per la marcatura con Ki-67: le cellule di nuova formazione marcate con KI-67 sono state visualizzate in rosso, in quanto il fluorocromo Dy-light594 viene eccitato alla lunghezza d'onda di 594nm e presenta un'emissione massima a 618nm.

Tutti i neuroni della fettina invece sono stati visualizzati in blu, in quanto l'Hoechst 33342 viene eccitato a 360nm ed emette in misura ottimale a 470nm.

Le immagini acquisite separatamente per ciascuno dei due fluorocromi sono state poi sovrapposte, in modo da poter localizzare le cellule in proliferazione esclusivamente in corrispondenza dello strato subgranulare del giro dentato dell'ippocampo, scartando tutte quelle che eventualmente si trovano nel resto della fettina.

Per la marcatura Brdu/DCX: Le cellule di nuova formazione sono state visualizzate in verde, in quanto il fluorocromo FITC associato al complesso della BrdU viene eccitato alla lunghezza d'onda di 488nm e presenta un'emissione massima a 520nm.

Le cellule positive per la DCX sono state visualizzate in rosso, in quanto il fluorocromo Alexa594 viene eccitato alla lunghezza d'onda di 594nm e presenta un'emissione massima a 618nm.

La doppia marcatura mi permette di visualizzare nello specifico le cellule in neurogenesi che sono quelle positive per Brdu + DCX. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata in maniera sequenziale per ciascun fluorocromo. La successiva sovrapposizione delle immagini mi permette di poter valutare la colocalizzazione dei due fluorocromi.

Per la conta delle cellule marcate è stato utilizzato il principio di Cavalieri: il tessuto è stato tagliato interamente ma è stata processata solo una fetta ogni 10; nelle immagini acquisite è stato contornato il giro dentato in modo da definire l'area che, riferita allo spessore della porzione analizzata (50 μm), ha permesso di calcolarne il volume; infine sono state contate tutte le cellule marcate per le diverse proteine nelle fette di tessuto analizzate. Il numero totale di cellule in neurogenesi presenti all'interno dell'intero tessuto è stato quindi ottenuto attraverso la seguente equazione:

$$N = 1/ssf \times 1/asf \times 1/hsf \times \Sigma C$$

in cui:

- ssf (section sampling fraction) rappresenta la frazione delle fettine di tessuto analizzate;
- asf (area sampling fraction) rappresenta l'area della sezione della fettina analizzata;
- hsf (height sampling fraction) rappresenta lo spessore della fettina;
- ΣC rappresenta la somma delle cellule marcate contate in tutte le fettine analizzate.

In questo modo è stato possibile per ogni marcatura ottenere il numero di cellule positive per mm³ di tessuto.

Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati effettuati su almeno 5 animali diversi per gruppo sperimentale.

I dati sono espressi come la media \pm SEM e sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle medie è stata fatta utilizzando il test "post hoc" seguito dallo Scheffè.

Studio dei livelli di espressione della proteina DCX

Le fettine sono state prelevate dal liquido anticongelante e lavate con PBS 1X (2 lavaggi da 10 minuti) (10 mM di Na₂HPO₄, 140mM di NaCl, 2 mM KH₂PO₄ 3 mM KCl) e poi con tampone PBS più Triton X-100 allo 0.3 % (PBS-T); Successivamente le fettine sono state incubate per 30 min a temperatura ambiente con una soluzione di fenil-idrazina 0,1% v/v in PBS- T in modo da bloccare le perossidasi endogene. Questo passaggio permette di eliminare la formazione di legami aspecifici dovuti all'uso di anticorpi secondari coniugati alla perossidasi. Le perossidasi endogene presenti nel tessuto danno luogo ad una colorazione non specifica causata dal legame substrato-cromogeno usato per la rilevazione dell'immunocomplesso. Infatti, il cromogeno usato in questo caso non può distinguere tra l'enzima che fa parte del sistema sperimentale che localizza immunologicamente l'antigene cellulare e l'attività enzimatica simile presente nel campione prima della colorazione.

Poichè gli anticorpi spesso interagiscono in maniera idrofobica ed elettrostatica con altri composti presenti nelle cellule, il modo più efficace per prevenire questa colorazione aspecifica è quella di esporre il campione ad una soluzione proteica inerte prima di applicare l'anticorpo primario. Queste proteine inerti "bloccano" le proteine cellulari che possono competere con le immunoglobuline degli anticorpi per i siti di legame idrofobici presenti nelle cellule.

La soluzione bloccante da me usata è il siero dell'animale della stessa specie in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario. In queste condizioni l'anticorpo primario non forma legami aspecifici per le proteine cellulari, e l'anticorpo secondario non può fissarsi all'immunoglobulina della stessa specie animale. Per questa ragione le fette sono state incubate per almeno 1h a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di siero d'asino preparato in tampone PBS-T.

Successivamente, le fettine vengono incubate con l'anticorpo primario per la DCX per 1 giorno a 4°C in agitazione continua in camera fredda, (anticorpo policlonale preparato in capra, diluizione 1:250).

Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con il tampone PBS-T per eliminare l'anticorpo in eccesso non legato alle fettine.

Le fettine dopo essere state lavate dall'eccesso di anticorpo primario sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario biotinilato specifico anti-capra, diluito 1:300 in tampone PBS-T.

Dato che le proteine da me studiate sono presenti nel tessuto in piccole quantità, per amplificare il segnale ho usato il sistema ABC (Avidin-Biotin-Complex). Le fettine sono state incubate per 30 minuti in una soluzione di streptavidina e biotina coniugata con la perossidasi in PBS-T. La streptavidina può legare diverse molecole di biotina, per cui durante l'incubazione si forma un grosso complesso formato da tante molecole di biotina, legate alle molecole di streptavidina, e coniugate con altrettante molecole di perossidasi. Questo grosso complesso si lega alla biotina presente nell'anticorpo secondario e permette quindi di amplificare notevolmente il segnale derivato da ogni singola proteina bersaglio. Inoltre la biotina legata all'anticorpo secondario è ben accessibile alla streptavidina grazie alla presenza di lunghi spacer di molecole di carbonio che riducono i potenziali d'ingombro sterico e facilitano il legame con la streptavidina.

Al termine dei consueti lavaggi in PBS-T le fettine sono state infine incubate con una soluzione di PBS-T contenente il cromogeno 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB). Questo composto catalizza una reazione tra un appropriato substrato donatore di elettroni (l'enzima

perossidasi) che si ossida formando un prodotto finale di reazione costituito da una molecola colorata ed il perossido di idrogeno (H_2O_2) che sarà ridotto ad H_2O . Il DAB produce un precipitato marrone resistente all'acqua e all'alcol, per questo motivo le fettine colorate con il DAB possono essere disidratate, montate con i metodi convenzionali e conservate per lungo tempo. Il DAB è stato preparato alla concentrazione di 0,05 % in tampone PBS-T, contenente 0,01% (v/v) di H_2O_2 e 0,03% (w/v) di Nichel ammonio solfato (che accentua la colorazione).

Le fettine sono state incubate con il DAB per circa 6-10 min e successivamente lavate con PBS, montate su vetrini precedentemente gelatinati (gelatina 2% w/v) e lasciati asciugare.

Il mattino successivo sono state disidratate nella scala ascendente degli alcoli (alcol etilico 70%; 80%; 95%; assoluto) e chiarificate con Xilene. Infine è stato montato un vetrino coprioggetto con il montante a base di solventi organici (EUKITT).

Sono state preparate sezioni di controllo mettendo solo l'anticorpo primario, solo l'anticorpo secondario, solo ABC o niente. In tutti questi casi le fettine sono apparse prive o quasi di colorazione.

Analisi delle immagini

Le fettine sono state osservate in campo chiaro al microscopio (BX-41, Olympus, Hamburg, Germany) e le immagini sono state acquisite per mezzo di una telecamera ad alta risoluzione collegata al computer.

Le immagini rappresentative sono state acquisite con un obiettivo UPlan 2X (apertura numerica 0,05). Le fettine sono state analizzate e determinati i livelli di espressione della DCX mediante il software AnalySIS 3.2 (*Soft Imaging System, Münster, Germany*).

Sono state esaminate le fette in cui l'ippocampo appare più sviluppato, in base alle coordinate indicate nell'atlante Paxinos and Watson (1986).

L'analisi semiquantitativa delle immagini è stata fatta sulle immagini acquisite in bianco e nero a

8 bit. L'analisi densitometrica fa riferimento ad una scala di grigio in cui al bianco è attribuito il valore 0 mentre al nero il valore 255. Ogni regione ippocampale oggetto del mio studio è stato delimitato con il mouse da una linea, andando così a circoscrivere un'area (ROI, Region Of Interest). In questa ROI il software misura l'intensità media dei valori di grigio che a sua volta rappresenta l'intensità di marcatura e quindi i livelli di proteine espressi. L'intensità di grigio è infine espressa in unità arbitrarie ed è espressa come percentuale di variazione rispetto al controllo.

Impregnazione argentica di Golgi

I tessuti utilizzati per l'analisi della densità delle spine dendritiche sono stati colorati attraverso la tecnica dell'impregnazione cromoargentica di Golgi modificata da Del Rio Hortega.

Una fetta di cervello fresco appena prelevato dall'animale e tagliato allo spessore di 1mm è stata immersa inizialmente in una soluzione fissativa composta da bicromato di potassio al 10% e cloralio idrato al 6% disciolti in H₂O e miscelata in parti uguali ad una soluzione di paraformaldeide all'8%. Il tessuto è rimasto immerso in questa soluzione per 4 giorni, e ogni giorno la soluzione è stata preparata fresca e sostituita. La fissazione è stata effettuata a temperatura ambiente e al buio, in quanto la soluzione è fotosensibile. Al quinto giorno il fissativo è stato eliminato, le fette sono state lavate brevemente con acqua distillata, e il tessuto è stato immerso in più soluzioni di nitrato d'argento a concentrazioni crescenti: 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1% e 1.5%. Il tessuto è rimasto immerso 5 minuti in ogni soluzione, dopo di che è stato lasciato per 3 giorni nella soluzione all'1.5%, al buio e a temperatura ambiente.

Come risultato è stata ottenuta la precipitazione selettiva di un sale, il *cromato d'argento*, che ha colorato di nero il corpo cellulare del neurone e tutti i suoi prolungamenti fino alle diramazioni

più estreme. Caratteristica della reazione è la sua parzialità, per cui soltanto una bassa percentuale delle cellule ha assunto la colorazione bruna.

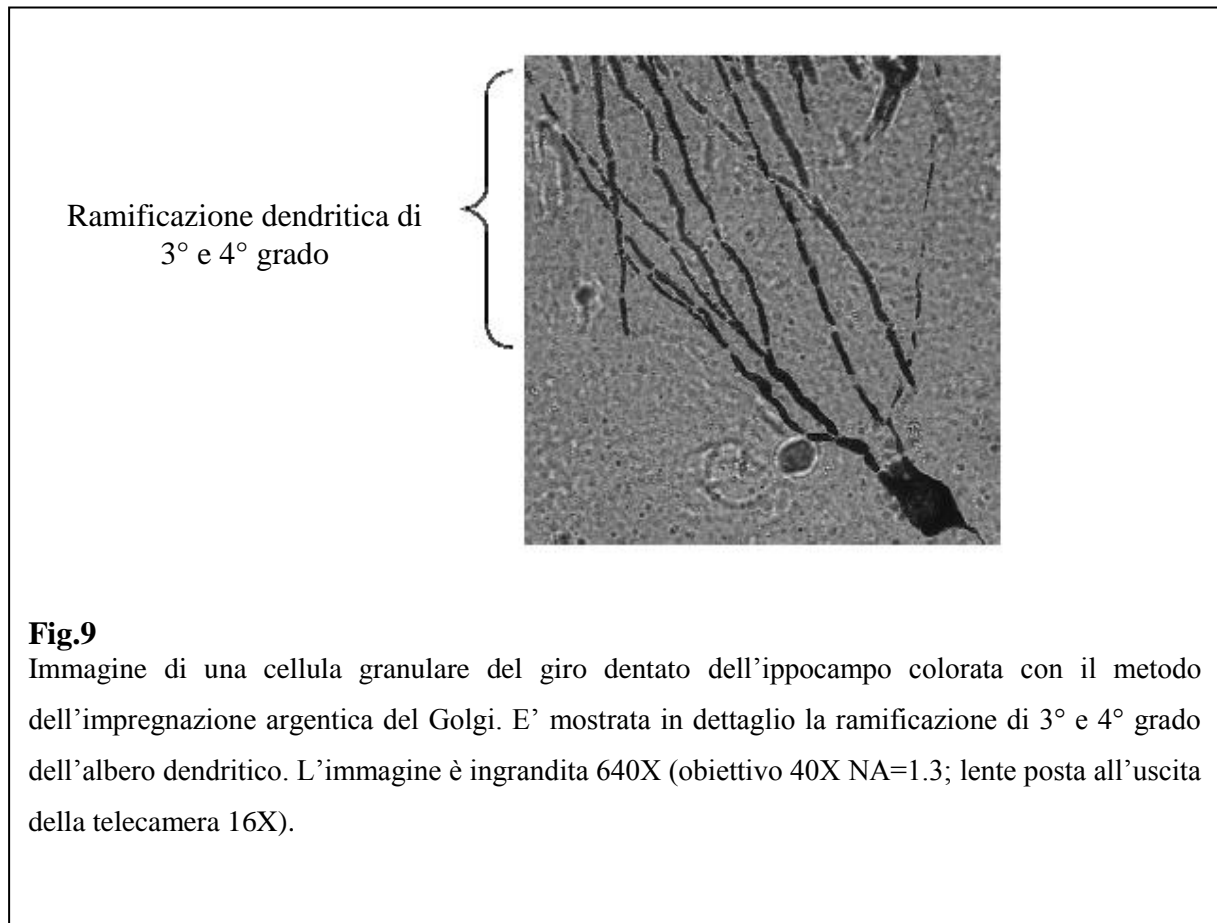
Il tessuto è stato quindi ripulito con l'utilizzo di un pennello dai cristalli di cromato d'argento ed è stato tagliato al vibratomo. Sono state fatte fettine dello spessore di 50 μm che sono state essiccate e disidratate mediante la scala degli alcoli e infine montate con un vetrino coprioggetto ed Eukitt.

Gli stessi vetrini oltre che per la conta delle spine dendritiche sono stati utilizzati con software diversi sia per l'analisi morfologica delle stesse spine sia per l'analisi dell'arborizzazione dendritica.

Analisi e conta delle spine al microscopio

Le fettine sono state analizzate con un microscopio invertito in campo chiaro (Zeiss, Axio Observer Z.1). Le immagini sono state acquisite con una telecamera ad alta risoluzione (Zeiss AxioCam MR-m) e sono state analizzate per mezzo del computer e di un software per l'analisi delle immagini (Zeiss, AxioVision). Per la conta e l'identificazione delle spine sono state adottate le seguenti procedure: nell'immagine intera dell'ippocampo sono stati scelti i neuroni ben separati dagli altri, in cui era possibile seguire i processi che partono dal corpo cellulare che si trova nello strato granulare del giro dentato dell'ippocampo e che penetrano fino alla porzione distale dello strato molecolare dell'ippocampo. Il neurone è stato acquisito ad un ingrandimento di 640X (obiettivo 40X con NA=1.6 ad immersione in olio e 16X ingrandimento della lente posta all'uscita della telecamera).

Le spine sono state analizzate e contate solo nei bracci di 3° e 4° grado, quindi nei dendriti posti nella parte più distale dello strato molecolare [Fig.9].



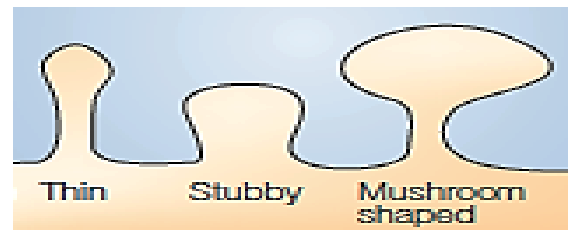
L'analisi delle spine dendritiche è stata fatta contando le spine totali che compaiono in un unico piano focale. Le spine sono state inoltre analizzate con un'acquisizione lungo l'asse z per verificare più in dettaglio se ognuna possedesse almeno una testa nella parte apicale. Sono state considerate spine tutte le protrusioni dei dendriti che terminano con una piccola testa. Le spine inizialmente non sono state differenziate in base alla loro forma, ma è stata presa in considerazione la percentuale di filopodi presenti. I filopodi sono protrusioni lunghe e sottili che terminano senza testa. Tutte le spine sono state analizzate su porzioni di dendriti lunghi almeno 10 μm . Sono stati analizzati 7 animali per gruppo sperimentale e per ogni animale sono state analizzate circa 40 porzioni di dendriti.

Morfologia delle spine dendritiche

Le fettine sono state acquisite con un microscopio invertito in campo chiaro (Zeiss, Axio Observer Z.1). Le immagini sono state acquisite con una telecamera ad alta risoluzione (Zeiss Axiocam MR-m).

Per la classificazione morfologica delle spine dendritiche è stato utilizzato il software *NeuronStudio*; per far sì che il software rilevi le spine nella zona di interesse bisogna tracciare il neurite che vogliamo prendere in considerazione, in base alle dimensioni della testa, del collo e al volume le spine sono state suddivise in 3 gruppi:

- Thin spines
- Stubby spines
- Mushroom spines



Arborizzazione dendritica

Le analisi morfometriche vengono effettuate in molti studi neurobiologici poiché permettono di osservare le alterazioni assonali che possono essere frutto di processi fisiologici, neuropatologici o indotti sperimentalmente, mettendo in luce le eventuali correlazioni funzionali e strutturali di tali modificazioni.

Sono molte le situazioni nelle quali si assiste a delle modificazioni morfologiche nell'albero dendritico come l'apprendimento, un arricchimento degli stimoli ambientali e fluttuazioni ormonali e dal grado di attività bioelettrica neuronale.

Per lo studio dell'arborizzazione dendritica, è stato utilizzato un software per l'analisi delle immagini che ci ha permesso innanzitutto la ricostruzione per intero dell'albero dendritico dal soma per tutta l'estensione del neurite.

Le immagini sono acquisite con un microscopio invertito in campo chiaro (Zeiss, Axio Observer Z.1) e con una telecamera ad alta risoluzione (Zeiss Axiocam MR-m). L'obiettivo utilizzato per l'acquisizione di queste immagini è un obiettivo 10X e con l'ausilio della funzione mosaico che ci offre il software del computer collegato al microscopio.

Le immagini sono poi state analizzate mediante il software ImageJ, quindi una volta che l'immagine viene importata su Imagej, binarizzata e successivamente le immagini vengono sogliate e ripulite di tutto il background per isolare semplicemente il neurone di interesse, poi attraverso il software si ha la ricostruzione di tutto l'albero neuronale che poi verrà analizzato e ci fornirà diversi parametri sull'albero dendritico esaminato, come la lunghezza totale dell'albero, il numero di segmenti terminali che indicano il grado del neurone, il numero totale di segmenti, la lunghezza media dei segmenti e il numero di biforcazioni.

Risultati

Studio della densità e della morfologia delle spine e dell'albero dendritico nelle mamme

Per il mio studio ho preso in considerazione le mamme di controllo, quelle che sono sempre rimaste con i loro piccoli fino al 21 giorno, giorno dello svezzamento, e le mamme sottoposte a separazione materna lunga, quindi per 3h al giorno per 15 giorni.

Il giorno in cui i cuccioli sono stati svezzati, le mamme sono state sacrificate e utilizzate per gli esperimenti.

Al fine di valutare se la separazione materna ripetuta durante il periodo post-partum potesse alterare la densità, la morfologia delle spine dendritiche e dell'albero dendritico nelle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo, il giorno del sacrificio il cervello è stato prelevato e colorato attraverso la tecnica dell'impregnazione cromoargentina di Golgi modificata da Del Rio Hortega.

Come è possibile osservare nel grafico (Fig.10), la separazione materna ha indotto una lieve ma non significativa diminuzione della densità delle spine dendritiche nelle mamme sottoposte a separazione materna per 3 ore al giorno rispetto alle mamme di controllo che non sono state separate dai loro piccoli

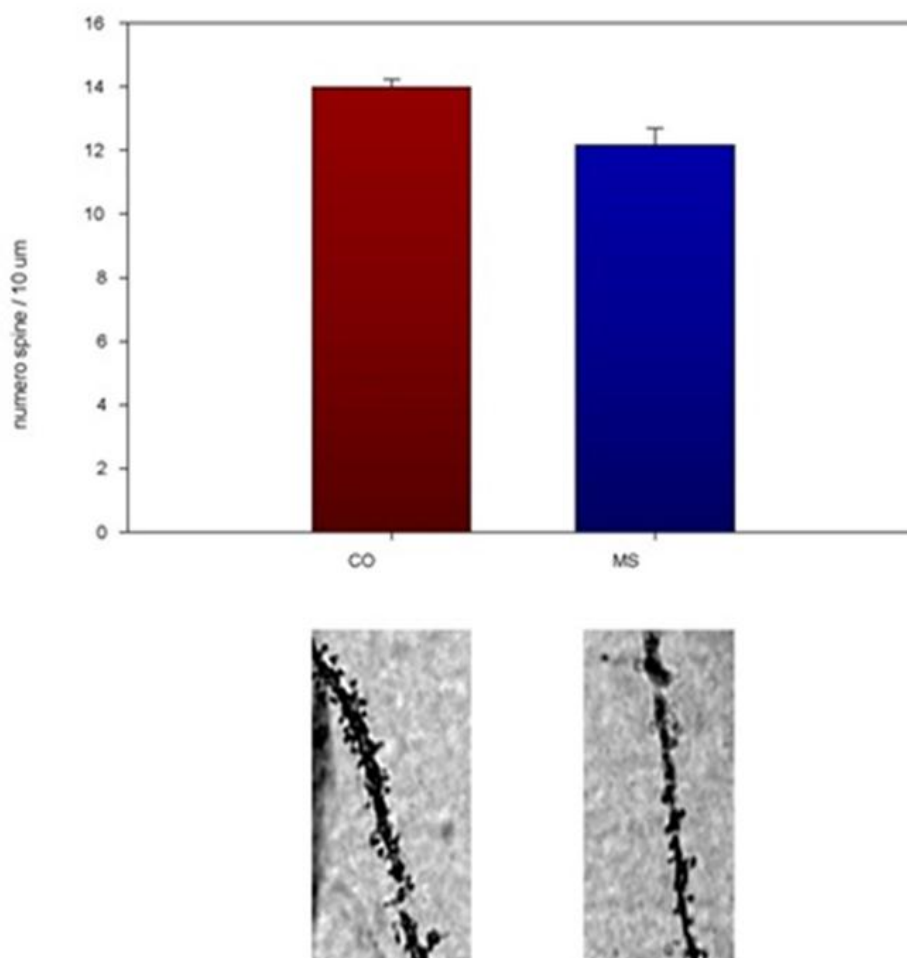


Fig.10 Effetto dello stress cronico da separazione materna sull'espressione delle spine dendritiche nell'ippocampo delle mamme

La densità delle spine dendritiche è stata calcolata come numero di spine presenti in unità di 10 μ m di dendrite, i valori corrispondono alle medie \pm S.E.M dei valori ottenuti da almeno 15 segmenti per animale (5 animali per ogni gruppo sperimentale).

Per quanto riguarda gli studi sulla morfologia delle spine è stata osservata una diminuzione significativa della percentuale delle spine mushroom ed un aumento delle spine thin nelle mamme sottoposte a separazione materna per tre ore al giorno, rispetto a quanto osservato nelle mamme di controllo (Fig.11, Fig.12).

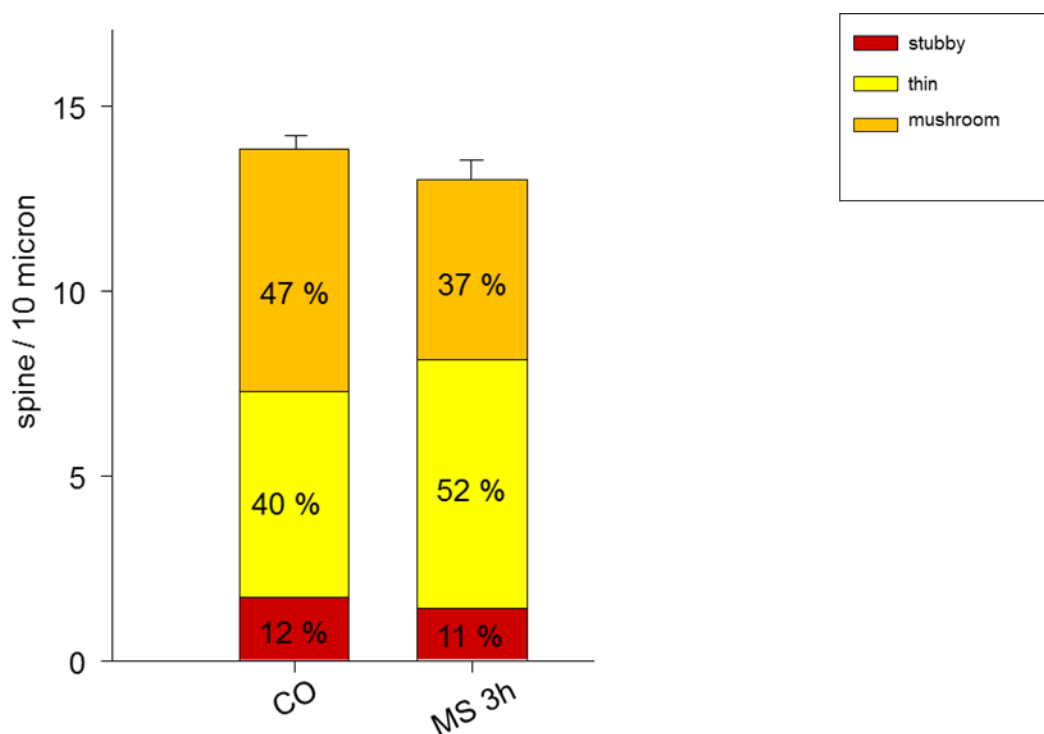
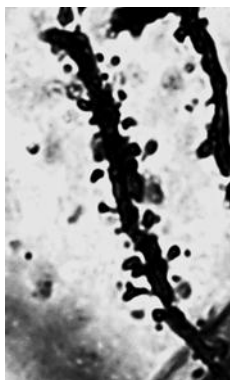
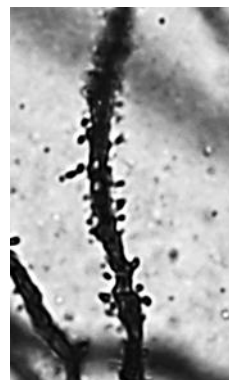


Fig.11 Effetto dello stress cronico da separazione materna nella morfologia delle spine dendritiche nell'ippocampo delle mamme



CO



MS 3h

Fig.12 Immagini rappresentative della densità delle spine dendritiche nelle madri di controllo, in quelle private dei loro piccoli per 3 ore al giorno per 15 giorni.

Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 100X (NA=1.3).

Per valutare gli effetti della separazione materna sull'arborizzazione dendritica, le stesse immagini acquisite per la determinazione del numero delle spine dendritiche sono state analizzate mediante il software ImageJ.

I dati da me ottenuti mostrano una riduzione significativa della lunghezza totale dei dendriti, del numero dei segmenti e del numero dei bracci terminali nella mamme che hanno subito la separazione materna rispetto alle mamme che sono rimaste indisturbate con i loro cuccioli (Fig. 13-15-17).

La lunghezza media dei segmenti dendritici appare invece significativamente più alta nelle mamme che hanno subito la separazione materna rispetto alle mamme di controllo (Fig.14).

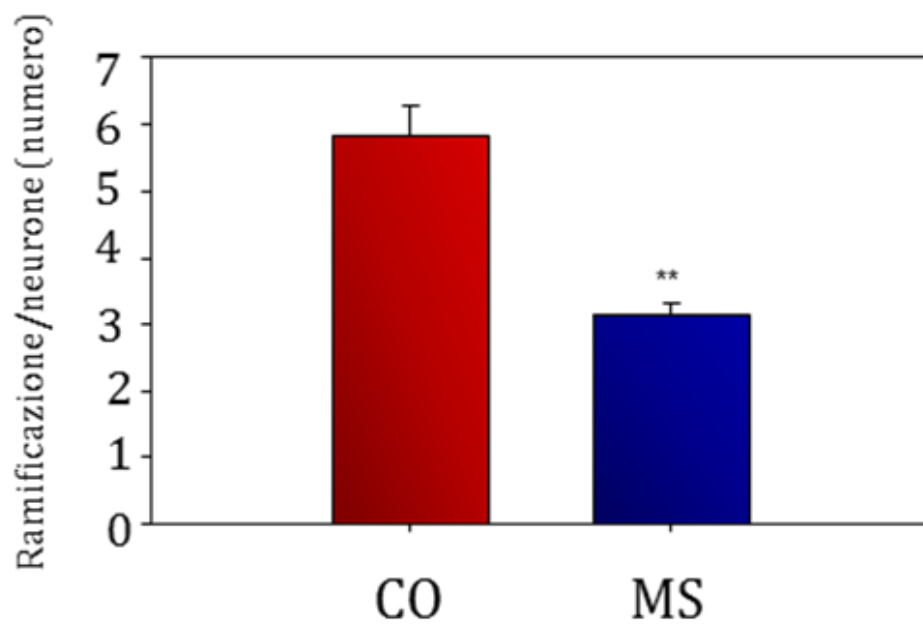


Fig.13 determinazione del numero delle biforcazioni dell'albero dendritico: i valori del grafico sono espressi in numero di bracci /neurone;

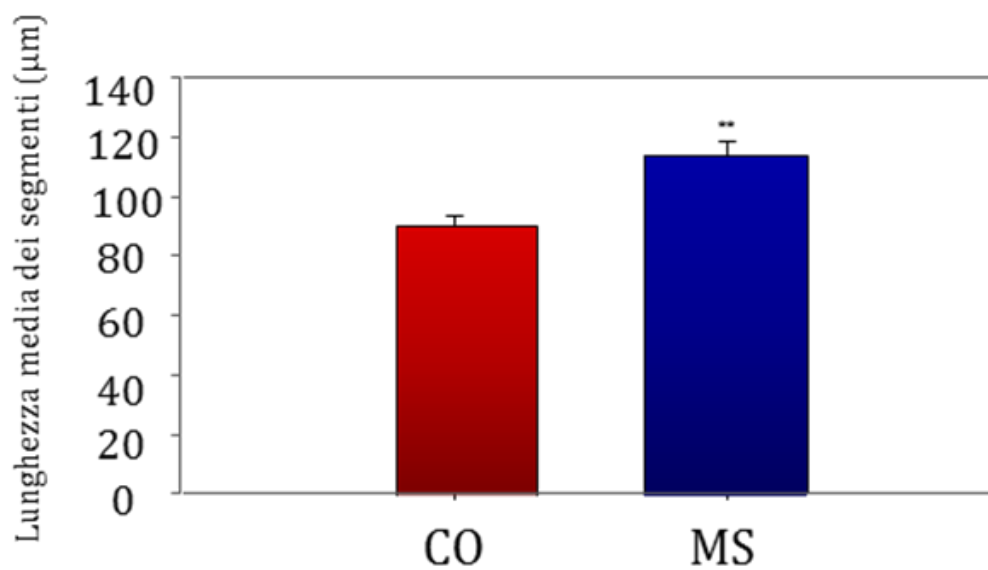


Fig.14 Determinazione della lunghezza media dei segmenti espressi in µm;

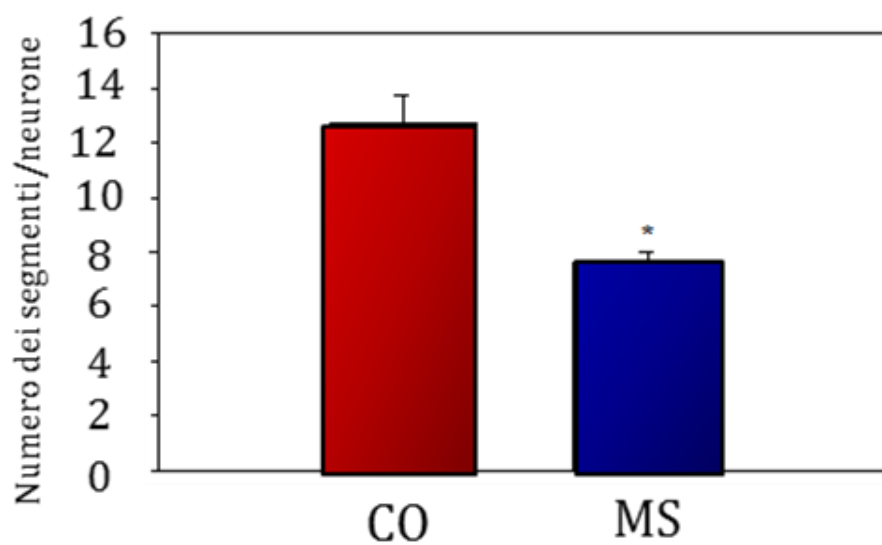


Fig. 15 Determinazione della lunghezza totale dei dendriti espressi in μm ;

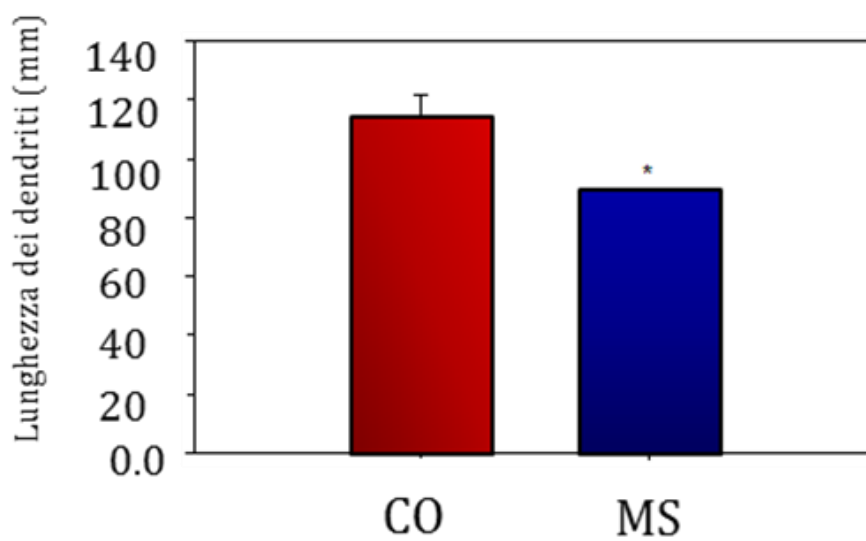


Fig.16 Determinazione del numero dei segmenti;

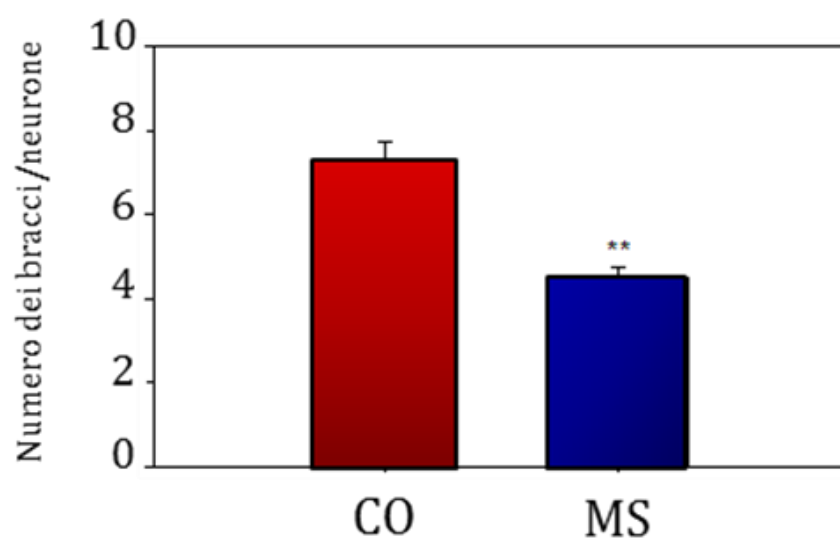


Fig. 17 Determinazione del numero dei bracci terminali.

Tutti i valori sono le medie \pm SEM di 5 animali per gruppo sperimentale. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs controllo.

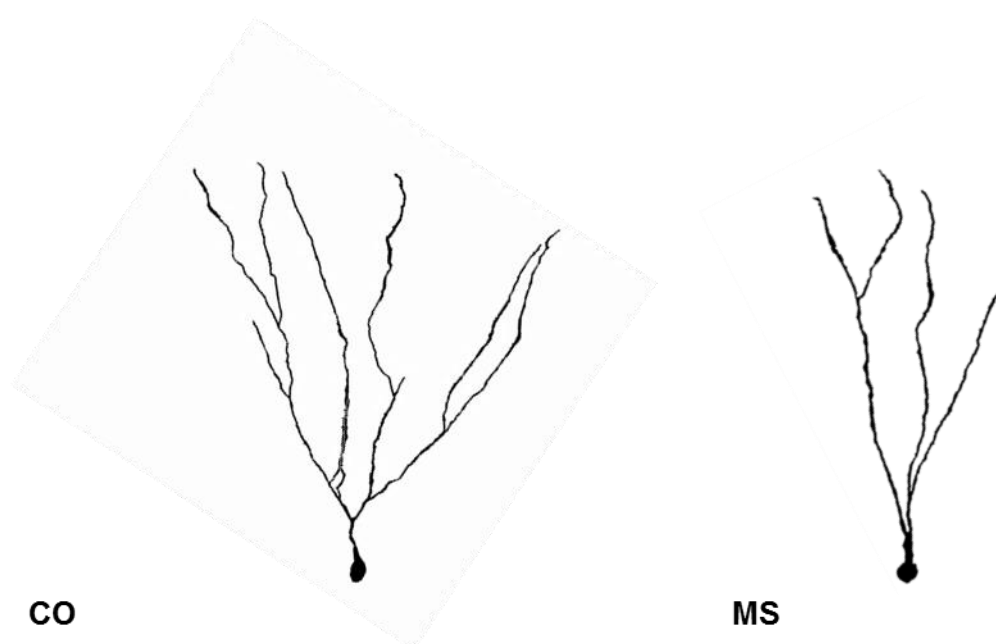


Fig.18 Immagini rappresentative dell'arborizzazione delle cellule piramidali di mamme di controllo e mamme sottoposte a separazione materna;

Studio della proliferazione con BrdU e Ki-67 nella prole

Nella mia ricerca ho utilizzato due protocolli sperimentali di separazione materna, uno breve in cui ogni giorno i piccoli sono stati separati dalla loro mamma per 15 minuti al giorno dal terzo al quindicesimo giorno dopo il parto; e una lunga in cui i piccoli sono stati separati dalla loro mamma per 3 ore al giorno dal terzo al quindicesimo giorno dopo il parto. I risultati ottenuti sono stati comparati con quelli ottenuti dai ratti di controllo, ratti che hanno subito ogni giorno una breve manipolazione. Per verificare la vulnerabilità ad un secondo stress cronico, il giorno dello svezzamento un gruppo di piccoli appartenenti al gruppo di controllo e ai gruppi di separazione materna breve e lunga sono stati isolati per 30 giorni, mentre gli altri sono stati stabulati in condizioni standard in gruppi di 5 per gabbia. Al termine dei 30 giorni un gruppo di ratti isolati sono stati riuniti in 5 per gabbia per 30 giorni prima del sacrificio, mentre un secondo è rimasto ancora isolato per altri trenta giorni. Al termine del trattamento ai ratti è stata iniettata la BrdU, e sono stati sacrificati dopo 24 ore dall'iniezione e utilizzati per lo studio della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo attraverso l'immunomarcatura per la BrdU, un secondo gruppo di ratti è stato utilizzato per lo studio della proliferazione attraverso la conta delle cellule neoformate immunoreattive per la Ki-67.

I risultati da me ottenuti mostrano che la separazione materna di 3 ore induce una riduzione significativa del numero di cellule in proliferazione rispetto ai controlli che non hanno subito la separazione materna (Fig.19-20).

L'isolamento sociale induce una marcata riduzione delle cellule in proliferazione sia negli animali di controllo (non separati dalle loro madri) che negli animali separati per 3 ore (Fig.19-20).

Il reinserimento in gruppo dopo l'isolamento sociale mostra invece una completa reversione nei numeri delle cellule in proliferazione negli animali di controllo ma rimane significativamente

ridotta negli animali che hanno subito separazione materna per 3 ore rispetto agli animali di controllo.

Nei ratti che hanno subito separazione materna 15 minuti e/o isolamento sociale nel complesso, non sono state osservate variazioni significative nel numero di cellule in proliferazione (Fig.19-20).

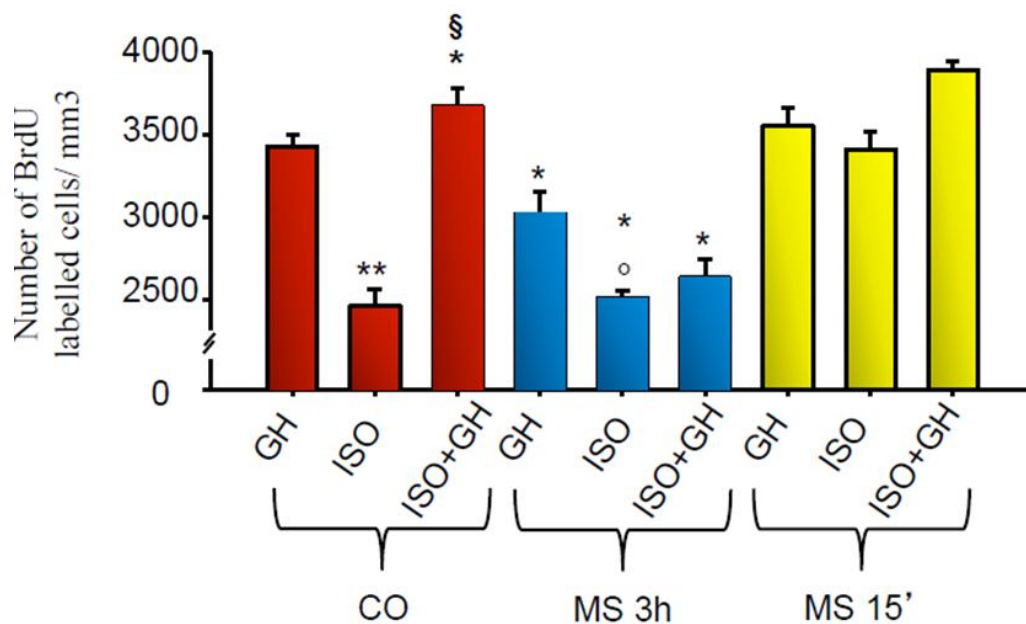
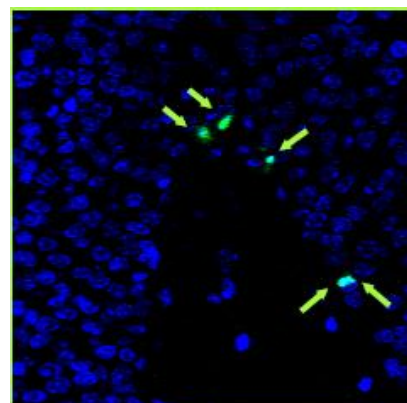
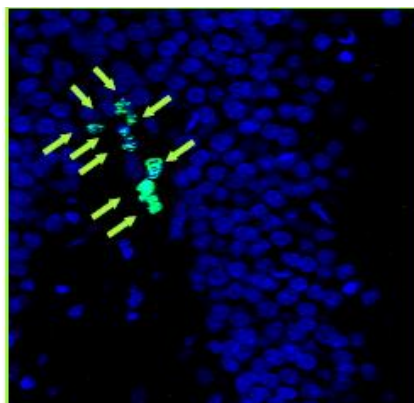


Fig.19 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sull'espressione delle cellule Brdu positive nel giro dentato dell'ippocampo di ratto.

A) Determinazione grafica del numero di cellule in neurogenesi Brdu positive per mm³ nel giro dentato dell'ippocampo. +/- SEM di 5 animali per gruppo sperimentale;

*P<0,05 vs GH CO; °P<0,05 vs GH MS 3h



B) Immagini acquisite con microscopio confocale Leica SP5, obiettivo 40X, NA 1.25; in cui sono rappresentate le cellule in proliferazione nel giro dentato dell'Ippocampo, la doppia marcatura mostra in verde le cellule BrdU positive, e in blu le cellule marcate con l'Hoechst 33342.

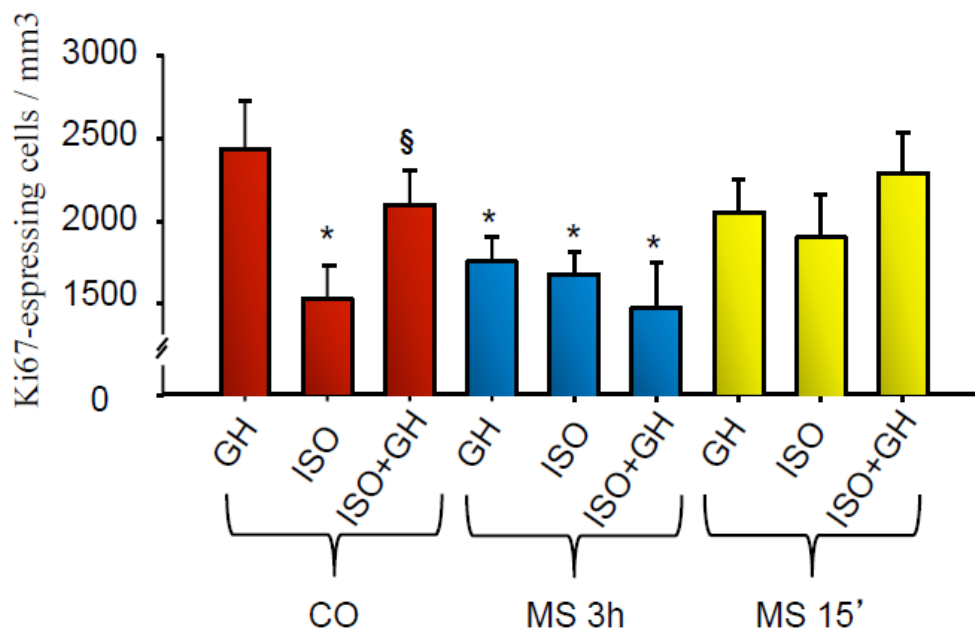
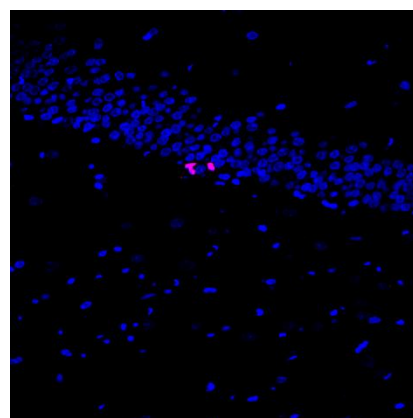
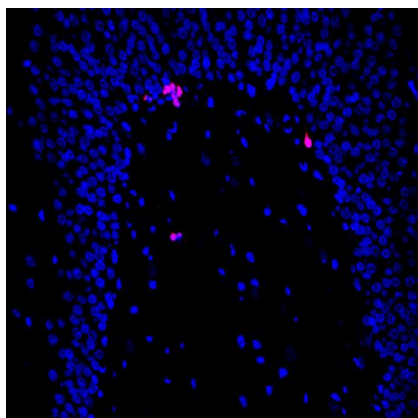


Fig.20 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sull'espressione delle cellule KI-67 positive nel giro dentato dell'ippocampo di ratto.

A) Determinazione grafica del numero di cellule in neurogenesi KI-67 positive per mm³ nel giro dentato dell'ippocampo. +/- SEM di 5 animali per gruppo sperimentale;

*P<0,05 vs GH CO; § P<0,05 vs ISO CO;



B) Immagini acquisite con microscopio confocale Leica SP5, obiettivo 40X, NA 1.25; in cui sono rappresentate le cellule in proliferazione nel giro dentato dell'Ippocampo, la doppia marcatura mostra in rosso le cellule Ki-67 positive, e in blu le cellule marcate con l'Hoechst 33342.

Studio della neurogenesi

Per lo studio della neurogenesi sono stati utilizzati gli animali appartenenti ai gruppi sperimentali usati nel protocollo precedente.

Gli animali al termine dell'isolamento sociale sono stati trattati per quattro giorni consecutivi con BrdU e sacrificati dopo 10 giorni, in modo da poter marcare tutte le cellule in neurogenesi nelle varie fasi del ciclo cellulare.

I risultati da me ottenuti, come si può notare dal grafico sottostante (Fig.21), hanno mostrato che la sola separazione materna lunga non è in grado di indurre nei ratti adulti una modificazione della neurogenesi rispetto a ratti di controllo che non hanno subito la separazione materna.

La neurogenesi appare invece ridotta nei ratti che sono stati sottoposti ad isolamento sociale, sia in quelli di controllo che in quelli separati dalla mamma per 3 ore al giorno rispetto agli animali allevati in gruppo (Fig.21).

Il reinserimento in gruppo dei ratti isolati induce un aumento della neurogenesi che ritorna ai valori di controllo.

Nel gruppo di ratti che hanno subito la separazione breve, quindi solo per 15 minuti al giorno, l'isolamento sociale e il successivo reinserimento in gruppo non hanno indotto alcuna modificazione della neurogenesi rispetto agli animali stabulati in gruppo.

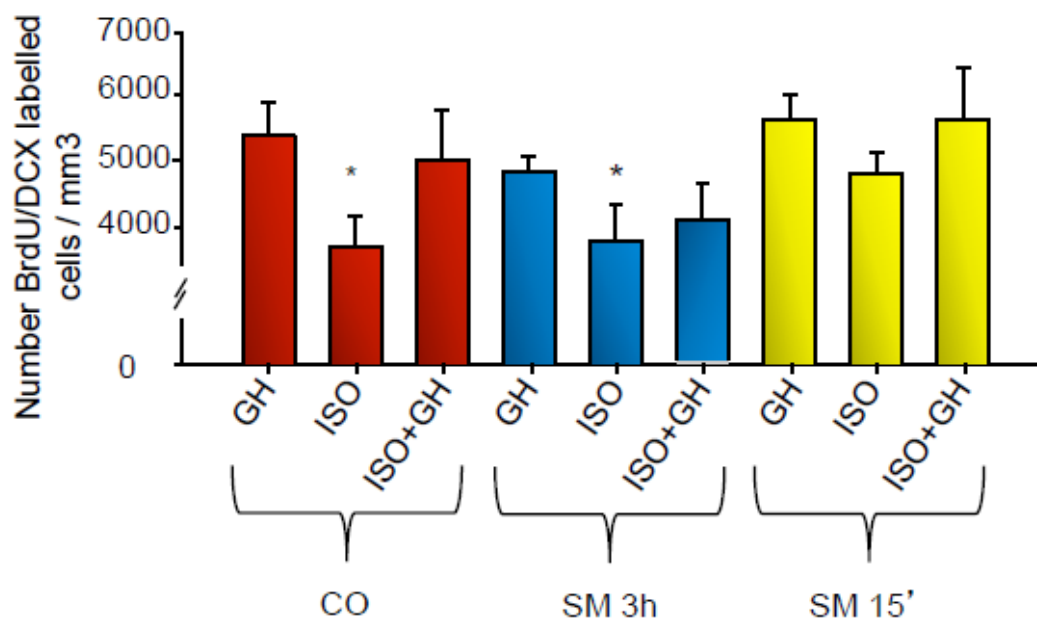
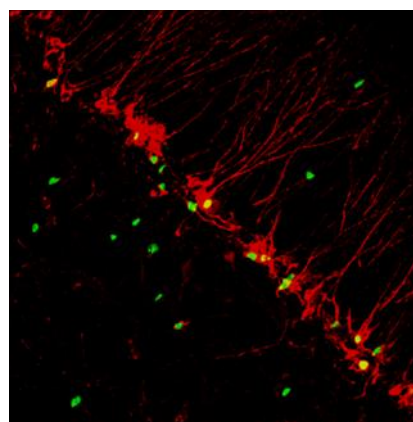
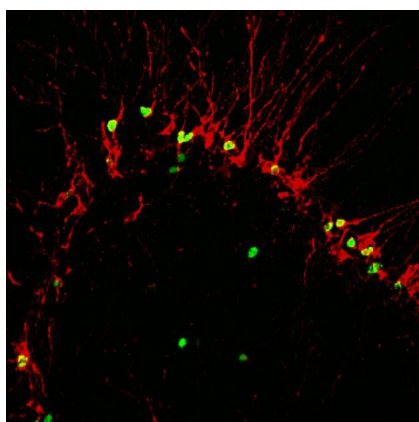


Fig.21 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sull'espressione delle cellule Brdu positive nel giro dentato dell'ippocampo di ratto.

A) Determinazione grafica del numero di cellule in neurogenesi Brdu positive per mm³ nel giro dentato dell'ippocampo. +/- SEM di 5 animali per gruppo sperimentale;

*P<0,05 vs GH CO;



B) Immagini acquisite con microscopio confocale Leica SP5, obiettivo 40X, NA 1.25; ; in cui sono rappresentate le cellule in neurogenesi nel giro dentato dell'Ippocampo, la doppia marcatura mostra in rosso le cellule DCX positive, e in verde le cellule marcate BrdU positive.

Studio della densità e morfologia delle spine e dell'albero dendritico

Per quanto riguarda la densità delle spine dendritiche nei ratti adulti, come si può notare dal grafico (Fig.22), la separazione materna lunga o breve non ha indotto nessuna variazione nella densità delle spine dendritiche rispetto agli animali di controllo.

Neanche l'isolamento sociale ha indotto modificazioni significative della densità delle spine dendritiche negli animali che hanno subito la separazione materna lunga o breve rispetto agli animali di controllo.

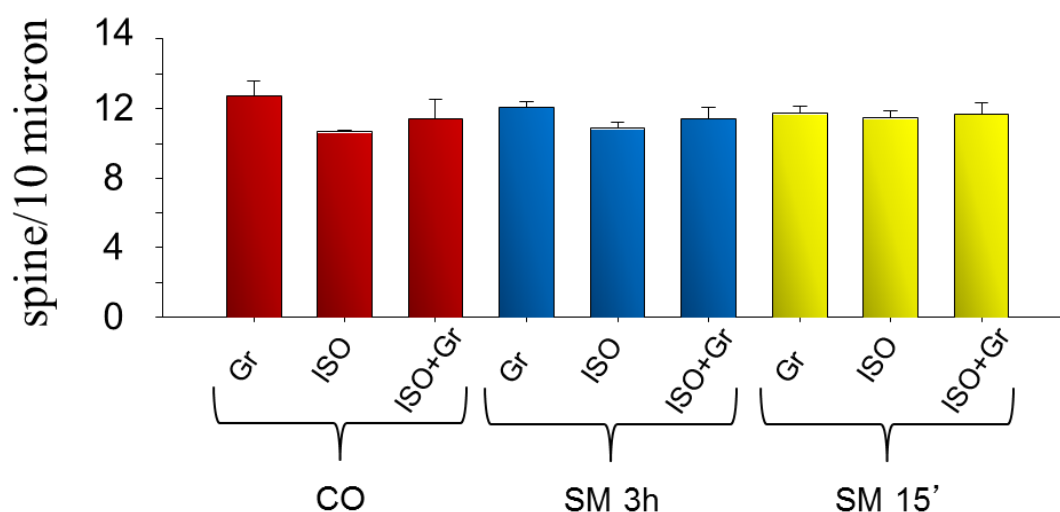


Fig.22 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sulla densità delle spine dendritiche nell'ippocampo di ratto.

A) La densità delle spine dendritiche è stata calcolata come numero di spine presenti in unità di 10 μ m di dendrite, i valori corrispondono alle medie \pm S.E.M dei valori ottenuti da almeno 15 segmenti per animale (5 animali per ogni gruppo sperimentale).

Lo studio della morfologia delle spine dendritiche nei ratti adulti ha mostrato un aumento significativo delle spine thin e una riduzione delle spine mushroom negli animali che hanno subito la separazione materna per 3 ore al giorno rispetto agli animali di controllo (Fig.23).

L'isolamento sociale nel gruppo dei ratti separati dalle mamme per 3 ore non varia il pattern di espressione delle spine thin e mushroom rispetto agli animali separati per 3 ore dalle mamme ma non isolati, negli animali di controllo l'isolamento sociale è in grado di variare il rapporto delle spine thin e mushroom rispetto agli animali di controllo non isolati.

Il successivo reinserimento in gruppo riporta ai valori di controllo la densità delle spine thin e mushroom in entrambi i gruppi (Fig.23).

Nel gruppo degli animali separati per 15 minuti non è stata osservata alcuna variazione nella morfologia delle spine dendritiche, i valori si mantengono molto simili ai valori dei controlli che non hanno subito la separazione materna (Fig.23/24).

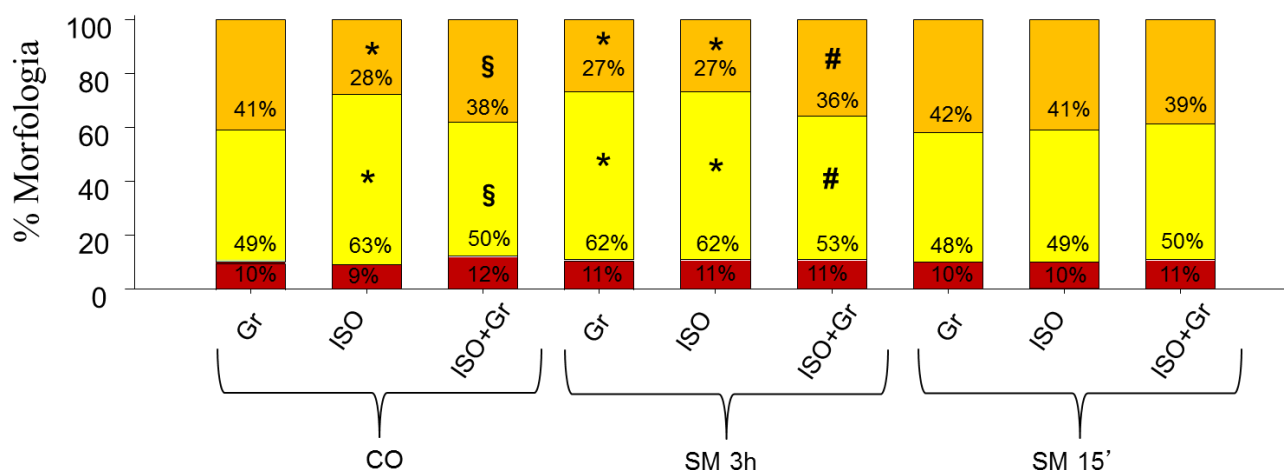


Fig.23 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sulla morfologia delle spine dendritiche nell'ippocampo di ratto. * $p < 0.05$ vs CO Gr; # $p < 0.05$ vs MS 3h ISO; § $p < 0.05$ vs CO ISO

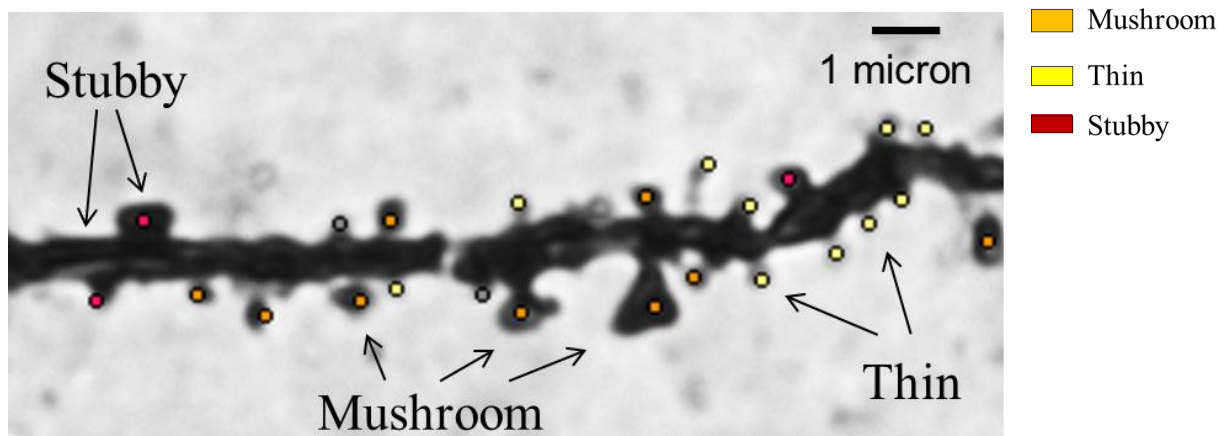


Fig. 24 Immagine rappresentativa della diversa classificazione delle spine dendritiche nel neurone

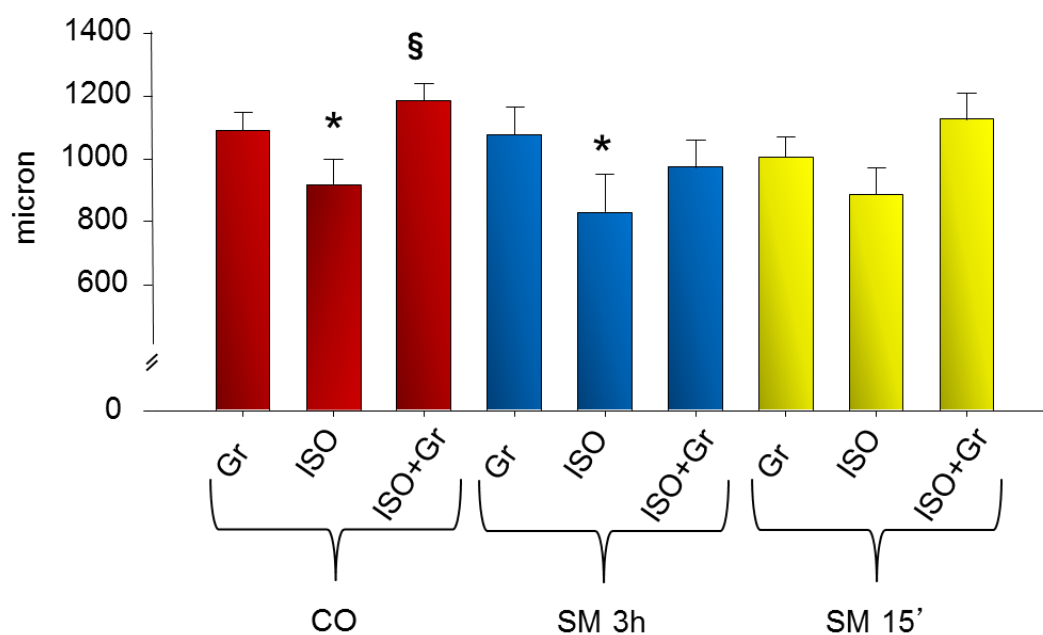
Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 100X (NA=1.3).

Come mostra il grafico (Fig.25) la sola separazione materna non è in grado di indurre una variazione significativa della complessità dell'arborizzazione dendritica del neurone.

L'isolamento sociale induce invece, sia nei ratti di controllo che in quelli separati per 3 ore al giorno, una riduzione della complessità del neurone evidenziata da una minore lunghezza dell'albero dendritico e da una riduzione del numero dei segmenti apicali.

Il reinserimento in gruppo ha ripristinato le condizioni di controllo negli animali di controllo ma non in quelli separati per 3 ore, in cui il numero di segmenti apicali resta ridotto rispetto agli animali di controllo reinseriti in gruppo. In tutti gli animali che hanno subito la separazione breve, non sono state evidenziate variazioni significative nella complessità del neurone.

Lunghezza totale dei dendriti



Segmenti apicali

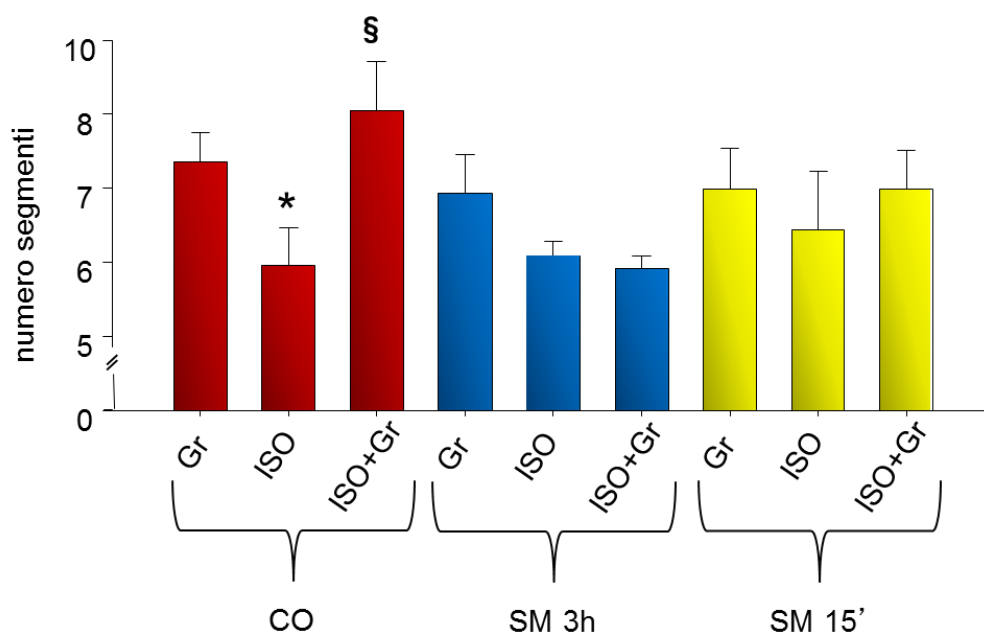


Fig. 25 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress cronico da separazione materna sull'arborizzazione dendritica nell'ippocampo di ratto.

Arborizzazione del neurone, densità e morfologia delle spine dendritiche: i neuroni sono stati colorati attraverso l'impregnazione argentea del Golgi. Per gli studi sull'arborizzazione dendritica è stato utilizzato il software ImageJ

Livelli di espressione della DCX nell'ippocampo dei figli

Nel nostro studio abbiamo inoltre voluto valutare nei figli in età adulta, i livelli di espressione della proteina DCX nell'ippocampo.

I nostri risultati mostrano che non c'è nessuna variazione nei livelli di espressione di questa proteina negli animali appartenenti ai diversi gruppi sperimentali da me studiati (Fig.26)

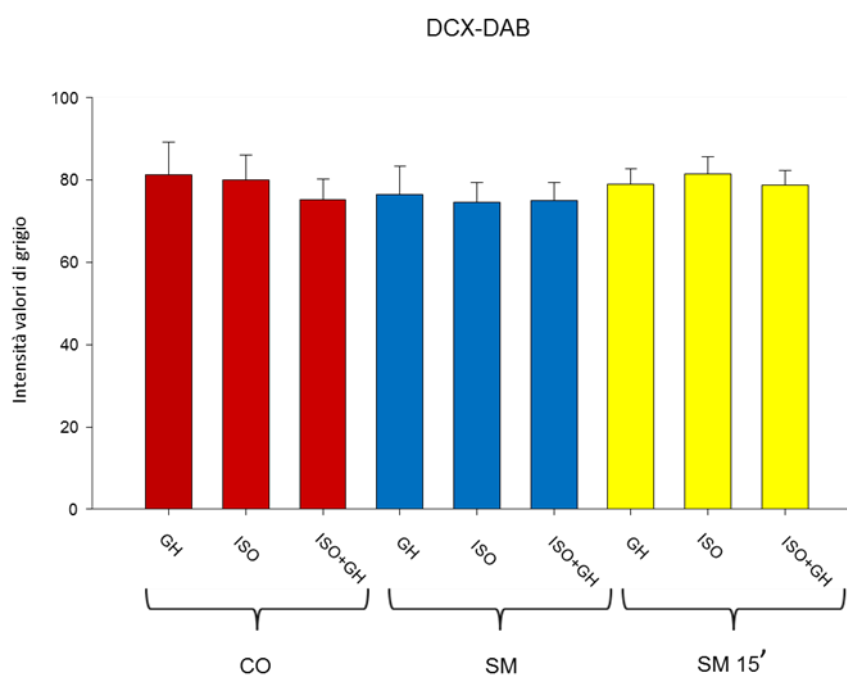
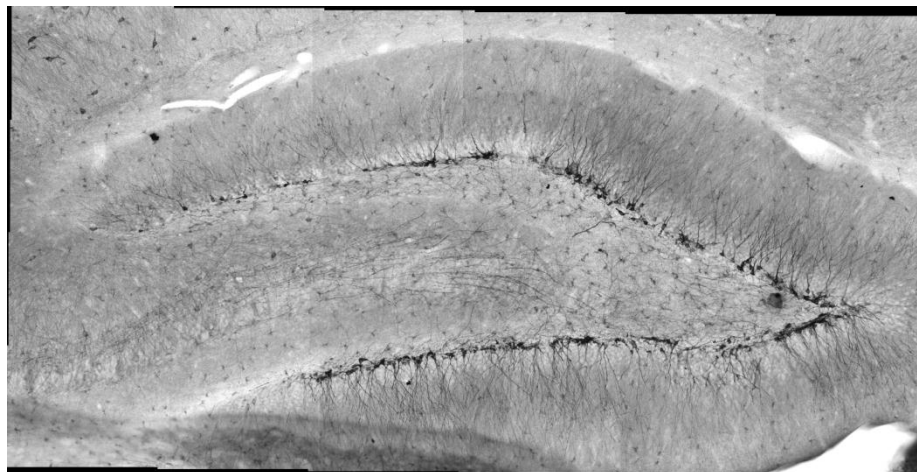


Fig.26 Grafico rappresentativo i livelli di espressione della proteina DCX nell'ippocampo di ratti maschi adulti dei diversi gruppi sperimentali.

A) I livelli di espressione sono espressi come variazione di intensità di grigio.



B) Immagine rappresentativa dell'espressione della proteina DCX visualizzata mediante marcatura DCX-DAB.

Le immagini rappresentative sono state acquisite con un obiettivo UPlan 2X (apertura numerica 0,05), e utilizzata la funzione mosaico.

Nel complesso i miei risultati mostrano che:

L'isolamento sociale ha indotto una riduzione della neurogenesi, della complessità dell'albero dendritico e una variazione della morfologia delle spine sia negli animali di controllo che in quelli separati per 3h al giorno nei primi 15 giorni.

Il reinserimento in gruppo dopo un mese di isolamento ha revertito nei ratti di controllo l'effetto dello stress da isolamento sulla morfologia e densità delle spine dendritiche, la complessità dell'arborizzazione dendritica e la stessa neurogenesi negli animali che non sono mai stati separati dalla loro mamma.

Al contrario, negli animali sottoposti a separazione materna per 3h, il reinserimento in gruppo non ha revertito gli effetti dello stress da isolamento.

Nei ratti che hanno subito la separazione materna solo per 15 minuti, l'isolamento sociale per 60 giorni non ha indotto nessuna variazione nei parametri da noi studiati.

Questi risultati dimostrano che una breve (15 min) separazione materna degli animali nei primi 15 giorni di vita rende questi più resilienti ad uno stress cronico nella vita adulta. Al contrario uno stress di 3h al giorno determina minori cure materne predittive, nell'età adulta, maggiore vulnerabilità alla psicopatologia con alterazioni della plasticità neuronale a livello della sfera emozionale, affettiva e cognitiva.

Discussione

Studi comportamentali nei roditori hanno dimostrato che modificazioni ambientali nei diversi periodi della vita possono indurre effetti profondi e duraturi nella plasticità neuronale che si riflettono in una maggiore o minore vulnerabilità o resilienza ad uno stress cronico subito in altre fasi della vita

(*Franklin et al., 2012*). In particolare lo stress subito nelle prime due settimane di vita, come quello indotto da inadeguate cure materne è particolarmente deleterio per il normale sviluppo del cervello.

Per queste ragioni lo scopo del mio studio è stato verificare quanto lo stress indotto da insufficienti cure materne nei primi 15 giorni di vita sia importante in età adulta per la vulnerabilità a condizioni di stress cronico. Per chiarire questo nel mio studio ho utilizzato due protocolli sperimentali di separazione materna, una breve di soli 15 minuti al giorno ed una lunga di 3 ore ogni giorno

In entrambi i protocolli i ratti sono stati separati dalla loro mamma dal 3 al 15 giorno dopo la nascita. Successivamente ai ratti è stato applicato un secondo stress cronico, quello dell'isolamento sociale a partire dal giorno dello svezzamento. I ratti isolati al termine dei 30 giorni previsti dal protocollo, sono stati divisi in due gruppi: un gruppo è stato riunito per altri 30 giorni, mentre gli animali del secondo gruppo sono rimasti isolati per un altro mese.

I risultati da me ottenuti hanno mostrato che la proliferazione cellulare, la neurogenesi e l'arborizzazione dendritica non vengono modificati negli animali adulti separati dalle mamme per 3 ore al giorno rispetto agli animali di controllo.

Al contrario la morfologia delle spine dendritiche è alterata nei ratti sottoposti a separazione materna per 3 ore al giorno, infatti, in questo gruppo di animali il numero delle spine thin è aumentato, mentre è notevolmente ridotto il numero delle mushroom rispetto agli animali di controllo.

Nei ratti sottoposti a separazione materna breve, per soli 15 minuti non è stata osservata nessuna modificazione dei parametri da me studiati.

In letteratura sono presenti diversi lavori che prendono in esame lo stress da separazione materna, in alcuni di questi è stata dimostrata una riduzione della plasticità neuronale, dei livelli di alcuni fattori

neurotrofici, come BDNF e NGF, della neurogenesi, delle spine dendritiche ma anche una variazione della morfologia e dell' arborizzazione dendritica (*Lippman et al., 2008; Jaworska et al., 2008; Monroy et al., 2010; Failure et al., 2006; 2007*).

I miei studi sugli effetti indotti dalla separazione materna per 3 ore al giorno durante le prime due settimane di vita sulla proliferazione cellulare hanno mostrato nell'ippocampo una significativa alterazione solo della morfologia delle spine dendritiche. Come evidenziato anche dai miei risultati la morfogenesi nelle cellule granulari del giro dentato inizia durante la tarda embriogenesi, continua durante il periodo postnatale e perdura, anche se con minore intensità, fino alla vita adulta (*Altman & Bayer, 1990*). Lo stress indotto dalla separazione materna lunga effettuata immediatamente dopo la nascita ha quindi interferito sul normale sviluppo dell'ippocampo, un periodo estremamente vulnerabile per il corretto sviluppo cerebrale.

Precedenti studi hanno riportato risultati contrastanti sugli effetti della separazione materna nei piccoli, ma è difficile compararli fra loro in quanto non tutti i protocolli sperimentali sono uguali. Infatti in alcuni di questi studi sono stati usati diversi tempi di separazione materna (3 o 15 minuti) e hanno subito una breve manipolazione (ogni giorno per qualche minuto) anche i ratti di controllo, cioè quelli che non sono stati separati dalle loro mamme, mentre in altri studi la proliferazione è stata studiata in ratti adulti (oltre i 3 mesi di età). In accordo con il mio studio, in altri due lavori non è stata osservata una modificazione della neurogenesi negli animali separati dalle loro mamme (*Aisa et al., 2009; Mirescu et al., 2004; Hulshof et al., 2004*).

Un paradigma simile di separazione materna a quello da me utilizzato è stato effettuato nei laboratori di Mirescu et al (2004) in cui, come nel mio studio è stata osservata una diminuita proliferazione cellulare nelle cellule granulari dell'ippocampo in ratti di circa 2 mesi di età. Gli autori hanno suggerito che la down-regulation della neurogenesi nell'ippocampo è mediata da un meccanismo corticale dipendente. Anche se diversi stimoli dimostrano che i glucocorticoidi sono

coinvolti nella soppressione della neurogenesi, nonché nella morfologia delle spine e dell'albero dendritico, questa influenza non è rilevabile semplicemente misurando i livelli basali periferici di glucocorticoidi (*Mirescu & Gould, 2006*). Infatti negli esperimenti di Mirescu et al (2004) i ratti separati dalle madri mostravano livelli plasmatici di corticosterone simili ai ratti che sono stati allevati in condizioni standard. Gli autori in questo caso hanno spiegato la riduzione della proliferazione cellulare e della morfologia neuronale associata alla separazione materna come il risultato di una ipersensibilità ai livelli normali di corticosterone.

I dati da me ottenuti non mostrano alcuna riduzione della neurogenesi, ma solo un'alterazione della morfologia delle spine dendritiche altamente sensibile alla fluttuazione degli ormoni steroidei.

Tutti i parametri da me studiati non si modificano negli animali separati dalle loro mamme per soli 15 minuti al giorno. Infatti, lo stress subito da questi animali non sembrerebbe tale da alterare questi parametri.

I dati ottenuti dal mio studio hanno mostrato che sia nei ratti non separati dalle loro mamme, che quelli separati dalle loro mamme per 3 ore al giorno sono più suscettibili allo stress cronico da isolamento sociale rispetto a quelli separati dalle loro mamme per 15 minuti al giorno.

Inoltre mentre l'ambiente socialmente arricchito ripristina nei ratti non separati dalle loro mamme i parametri da me studiati, questo non accade nei ratti separati dalle mamme per 3 ore al giorno.

È noto dalla letteratura che l'isolamento sociale determina una diminuzione della neurogenesi, delle spine dendritiche e di diversi fattori trofici, mentre l'ambiente socialmente arricchito ripristina questi parametri (*Givalois et al., 2001; Rage et al., 2002; Marnigere et al., 2003; 2004*).

Ma il dato interessante della mia tesi è che la separazione materna per 3 ore al giorno rende gli animali adulti più vulnerabili allo stress da isolamento sociale e che non recuperano quando vengono riuniti in gruppo. Al contrario i ratti separati per 15 minuti al giorno invece sembrerebbero resilienti a questo stress.

Gli effetti benefici di questo protocollo potrebbero essere dovuti al fatto che le madri curano molto più intensamente i loro piccoli quando le vengono ridati dopo un allontanamento per brevi periodi. Pertanto questi piccoli sembrerebbero ricevere più cure materne rispetto a quelli che sono rimasti tutto il tempo con la loro mamma (*Franklin et al., 2012*). Anche i piccoli separati dalla loro mamma per 3 ore ricevono molte cure materne quando questi vengono rimessi con la loro mamma (*Biggio et al., 2013*), ma il fatto che per lungo tempo (3 ore) non abbiano avuto un contatto con la loro mamma questi non sono comunque sufficienti a renderli resilienti allo stress indotto dall'isolamento sociale (*Franklin et al., 2012*).

La separazione materna interferisce con la funzione neuroendocrina e con il comportamento nei roditori e primati, compreso l'uomo (*Heim e Nemeroff 2012; Pryce e Feldon 2003*). Infatti, come precedentemente detto, le cure parentali svolgono un ruolo importante nello sviluppo emotivo e cognitivo della prole. Tuttavia le interazioni tra i cuccioli e le loro madri sono complesse. Diversi lavori suggeriscono che la stimolazione tattile fornita dalla madre durante le prime settimane di vita è associata a cambiamenti a lungo termine nel comportamento (*Kaffman e Meaney, 2007*). I piccoli sono in grado di percepire la separazione dalla loro mamma e di conseguenza anche di adattarsi all'assenza della madre. Nei piccoli roditori, le risposte fisiologiche associate alla separazione materna sono la vocalizzazione ultrasonica, il tentativo di abbandonare il nido, il rilascio di ormoni dello stress e l'inibizione di diverse vie anabolizzanti associate con lo sviluppo e la crescita (*Hofer 1994; Kuhn e Schanberg 1998*). Il rilascio di ormoni dello stress, come il corticosterone, non è importante solo per la gluconeogenesi, ma è necessario per mantenere un elevato livello di glucosio in assenza di un adeguato approvvigionamento alimentare (*Burton et al., 1997*), e numerosi lavori suggeriscono un ruolo fondamentale del corticosterone nell'organizzazione sinaptica a livello corticale (*Vouimba et al., 2007*). Inoltre la perdita del supporto termico e delle stimolazioni tattili attive dovuti alla separazione materna sembra inibire la secrezione degli ormoni della crescita e la

sintesi del DNA (*Kuhn e Schanberg, 1998; Levine, 2009*). Infatti sia gli ormoni della crescita che il corticosterone inducono cambiamenti importanti nella morfologia dendritica dei neuroni corticali e dell'ippocampo di ratto e di primati (*Noguchi et al., 1983; Noguchi e Sugisaki, 1985; Woolley et al., 1990; Magarinos et al., 2009*). Infine un'alterazione dei livelli di corticosterone è stata ipotizzata essere un fattore di rischio per i disturbi correlati all'umore, compresa la depressione e l'ansia (*Weinstock, 2008*).

Pertanto i disturbi nelle cure materne possono produrre effetti di lunga durata nei livelli di corticosterone che possono portare ad una diversa sensibilità ad uno stimolo stressante, che nei casi gravi, possono poi portare all'insorgenza di malattie legate a disturbi dell'umore.

In conclusione i risultati da me ottenuti mostrano che la separazione materna in età neonatale induce profondi cambiamenti neuroanatomici sull'ippocampo e che queste modificazioni si mantengono inalterate fino all'età giovanile del ratto.

Questi dati potrebbero fornire delle informazioni riguardo la comprensione di alcuni meccanismi molecolari che rendono l'individuo maggiormente vulnerabile alla psicopatologia con alterazioni della plasticità neuronale a livello della sfera emozionale, affettiva e cognitiva.

E' noto che nella maggior parte delle specie di mammiferi, alla fine della gestazione e durante il periodo dell'allattamento, le femmine cambiano improvvisamente il loro comportamento: tutte le loro attenzioni sono dedicate alla cura e protezione dei loro piccoli (*Numan & Insel, 2003*).

Numerosi studi hanno dimostrato che alcune variazioni comportamentali che la madre subisce, sono conseguenze dei drammatici cambiamenti ormonali che si verificano durante la gravidanza e dopo il parto. Queste fluttuazioni ormonali, a loro volta, generano nel cervello dei cambiamenti neuronali che inducono uno stato elevato di responsività materna. Le modificazioni neuronali consistono in variazioni di tipo neurochimico e di plasticità neuronale con la formazione di nuove connessioni attraverso la crescita dell'arborizzazione dendritica (*Pascual-Leone et al., 2005*). Nel mio lavoro ho

voluto studiare inoltre il rimodellamento della plasticità neuronale, la densità delle spine dendritiche e l'arborizzazione dendritica dei neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo nelle mamme, al termine dell'allattamento, che durante i primi 15 giorni dopo il parto hanno subito la separazione dai loro piccoli per 3 ore al giorno.

Per il mio studio ho utilizzato la marcatura dei neuroni con l'impregnazione argentea del Golgi e l'analisi della densità delle spine e dello sviluppo dell'arborizzazione dendritica è stata fatta per mezzo di software per l'analisi dell'immagine.

I risultati da me ottenuti non hanno mostrato nessuna variazione nel numero e nella morfologia delle spine dendritiche rispetto alle mamme che sono rimaste per tutto il periodo con la loro prole, ma hanno invece mostrato una riduzione dell'albero dendritico.

Diversi lavori presenti in letteratura hanno mostrato che durante il periodo post-partum si ha un aumento delle spine dendritiche ed un aumento dell'arborizzazione dendritica sia nel giro dentato che nell'area CA3 dell'ippocampo (*Pawluski et al., 2006, 2010 ; Workman et al., 2013*). Al contrario lo stress cronico determina una riduzione del numero delle spine dendritiche e dell'arborizzazione dendritica in diverse aree cerebrali (*Galea et al., 1997 ; Son et al., 2011 ; Magarinos & McEwen, 1995 ; Radley et al., 2013*).

In un altro studio, la somministrazione cronica di alte dosi di corticosterone somministrato nei ratti durante la gravidanza e dopo il parto, ha mostrato un aumento delle spine fungiformi ed una riduzione dell'albero dendritico nel CA3 dell'ippocampo (*Workman et al., 2013*).

I miei dati possono essere quindi importanti per la comprensione di come disfunzioni che riguardano l'asse HPA durante il periodo post-partum alterino la plasticità neuronale.

E' possibile che le mamme dopo il parto possano essere meno sensibili agli effetti negativi dei glucocorticoidi elevati rispetto alle femmine senza prole e che la morfologia dendritica non venga modificata nello stesso modo come nei ratti senza prole (*Johnstone et al., 2000 ; Russell et al., 2001*

; Douglas et al., 2003 ; Brunton & Russell, 2008 ; Workman et al., 2013). Infatti, sia la prolattina che l'ossitocina (ormoni che aumentano notevolmente di concentrazione durante l'allattamento), hanno la capacità di proteggere l'ippocampo dallo stress o da alti livelli di corticosterone (Torner et al., 2009 ; Leuner et al., 2011). Tuttavia il mio studio rivela che il cervello materno (nonostante l'aumento degli ormoni) è ancora sensibile all'influenza di alte concentrazioni di glucocorticoidi.

Nel mio studio, nonostante abbia mostrato una riduzione dell'albero dendritico, non ho osservato alcuna modificazione della densità delle spine dendritiche, anche se in letteratura è documentato il ruolo dello stress acuto e cronico nelle variazioni del numero delle spine e della complessità dell'albero dendritico (Moghaddam et al., 1994 ; Yuste & Bonhoeffer, 2001 ; Magarinos & McEwen, 1995). Tuttavia, cambiamenti della densità delle spine dendritiche possono avvenire in tempi molto brevi (entro poche ore) e gli steroidi (ormoni surrenalici e gonadici) possono regolare la densità delle spine dendritiche nell'ippocampo in tempo breve (Woolley, 1998).

La separazione materna è stata indotta dal 3° al 15° giorno dopo il parto, mentre le mamme sono state sacrificate al termine dell'allattamento, cioè al 21° giorno. Pertanto le mamme sono rimaste indisturbate con i loro piccoli per una settimana prima del sacrificio. Durante questo periodo di relativa "tranquillità", la densità delle spine potrebbe essere tornata nella norma.

Il mio studio caratterizza le conseguenze neuronali indotte dallo stress subito in un periodo delicato della donna (come quello dell'allattamento). In questo studio ,infatti, ho mostrato come uno stress cronico subito durante il periodo post-partum, possa determinare una ridotta complessità dendritica come conseguenza di alti livelli di glucocorticoidi. Questi dati ,nel loro insieme, forniscono delle importanti informazioni riguardo i meccanismi neurobiologici indotti da elevate concentrazioni di glucocorticoidi durante il periodo post-partum.

Per quanto riguarda la morfologia delle spine nelle mamme è stata osservata una diminuzione delle spine mushroom nelle mamme sottoposte a separazione materna per tre ore al giorno, e un aumento sempre in queste mamme delle spine thin rispetto ai valori evidenziati nelle mamme di controllo.

E' risaputo che le spine non sono elementi statici, ma nel cervello adulto la loro morfologia cambia continuamente in funzione dell'attività neuronale, dell'esperienza e dell'apprendimento, riflettendo così la natura plastica delle connessioni sinaptiche (*Matus 2000; Lendvai et al. 2000; Trachtenberg et al. 2002; Zuo et al. 2005; Holtmaat et al. 2005*).

L' allontanamento dei figli per tre ore la giorno potrebbe essere considerato come uno stress per le mamme e quindi causare un'alterazione della plasticità sinaptica.

E' noto che una riduzione delle esperienze sensoriali mediata da un allevamento al buio riduce la densità delle spine nella corteccia visiva, effetto parzialmente revertito dalla successiva esposizione alla luce (*Wallace e Bear, 2004*). La separazione dei piccoli potrebbe essere considerata per le mamme come una riduzione di stimoli e questo potrebbe essere la causa della variazione della morfologia delle spine dendritiche. Quindi lo stress cronico subito dalle mamme ogni giorno, sembrerebbe essere la causa del ridotto sviluppo della plasticità neuronale.

Bibliografia

- *Ader R, Friedman SB. Social factors affecting emotionality and resistance to disease in animals: IV. Differential housing, emotionality, and Walker 256 carcinosarcoma in the rat. Psychol. Rep, 1964, 15:535-541.*
- *Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(3):256-66.*
- *Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez M,. Effects of neonatal stress on markers of synapticplasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. Hippocampus, 2007,19:1222-31.*
- *Akana SF, Dallman MF, Bradbury MJ, Scribner KA, Strack AM, Walker CD. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. Endocrinology, 1992 Jul, 131(1):57-68.*
- *Alquicer G, Morales-Medina JC, Quirion R, Flores G. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. J Chem Neuroanat, 2008 Mar, 35(2):179-87. Epub 2007 Oct 22.*
- *Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci, 2002, 22(3), 629-634*
- *Anisman H, Matheson K, Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29:525–546.*
- *Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., Merali, Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? Int J Dev Neurosci, 1998, 16(3-4), 149-164.*

- *Ascoli GA, Alonso L, Anderson S, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, et al. Petilla Terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci, 2008, 9:557–68.*
- *Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:8335–9.*
- *Bai, F., Bergeron, M., Nelson, D.L. Chronic AMPA receptor potentiator treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. Neuropharmacology, 2003, 44, 1013-1021.*
- *Baimbridge, K.G. Calcium-binding proteins in the dentate gyrus. Epilepsy Res Suppl, 1992, 7, 211-220.*
- *Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G, The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. Br. J. Pharmacol, 1997, 120(8):1582-8.*
- *Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Sale A, Maffei L. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. Cell Death Differ, 2010 Jul, 17(7):1092-103. doi: 10.1038/cdd.2009.193. Epub 2009 Dec 18*
- *Bauer S, Patterson PH. The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. J Cell Biol, 2005 Nov 21, 171(4):641-50. Epub 2005 Nov 15.*
- *Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackmann, J., Lo Turco J.J. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. J Neurosci, 2003, 23, 10411-10418.*
- *Bernabeau, R., Sharp, F.R. NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. J. Cereb. Blood Flow Metab, 2000, 20, 1669-1680.*

- *Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., Parent, A. Newly generated neurons in amygdala and adjoining cortex of adult primates. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99, 11464-11469.*
- *Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. Front Behav Neurosci, 2009 Jan 27, 3:1. doi: 10.3389/neuro.08.001.2009. eCollection 2009.*
- *Bhaskar L, Krishnan VS, Thampan RV. Cytoskeletal elements and intracellular transport. J Cell Biochem, 2007, 101:1097–108.*
- *Bhatnagar S, Shanks N, Plotsky PM, Meaney MJ, Hypothalamic-pituitary-adrenal responses in neonatally handled and nonhandled rats: differences in facilitatory and inhibitory neural pathways. In: McCarthy, R., Agulara, G., Sabba, E., Kvetnansky, R. (Eds.), Stress; Molecular and Neurobiological Advances. Gordon & Breach, New York, 1996, 1–24.*
- *Biggio F, Pisu MG, Garau A, Boero G, Locci V, Mostallino MC, Olla P, Utzeri C, Serra M. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. Eur Neuropsychopharmacol, 2014 Jul, 24(7):1152-61. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.03.009. Epub 2014 Apr 5.*
- *Bock J, Gruss M, Becker S, Braun K. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. Cereb Cortex, 2005 Jun, 15(6):802-8. Epub 2004 Sep 15*
- *Bolton SJ, Perry VH. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. Exp Neurol, 1998 Nov, 154(1):231-40.*
- *Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Behrens, W. von der, Kempermann, G. Transient calretinin expression defines early post-mitotic step*

of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. Mol Cell Neurosci, 2003, 24, 603-613.

- *Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, et al. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report. Biol. Psychiatry, 1997, 41:23–32.*
- *Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. J Comp Neurol 4, 2003.*
- *Cameron HA, Gould E. The control of neuronal birth and survival. In Receptor Dynamics in Neural Development, ed. CASHaw, 1999, pp. 141–57. New York: CRC*
- *Cameron, H. A., McEwen, B. S., Gould, E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. J. Neurosci, 1995, 15, 4687–4692.*
- *Cameron, H.A., Tanapat, P. & Gould, E. Adrenal steroids and NMDA receptor activation regulate neurogenesis in the adult rat dentate gyrus through a common pathway. Neuroscience, 1998, 82, 349-354.*
- *Carlen, M., Cassidy, R.M., Brismar, H., Smith, G.A., Enquist L.W., Frisen, J. Functional integration of adult born neurons. Curr Biol, 2002, 12, 606-608.*
- *Chang FL, Greenough WT, Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice, Brain Res, 1984, 309(1):35-46*
- *Chicurel ME, Harris KM. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus, J Comp Neurol, 1992, 325:169–182.*

- Chklovskii DB. *Optimal sizes of dendritic and axonal arbors in a topographic projection. J Neurophysiol*, 2000, 83:2113–9.
- Clinton SM, Vázquez DM, Kabbaj M, Kabbaj MH, Watson SJ and Akil H, *Individual differences in novelty-seeking and emotional reactivity correlate with variation in maternal behavior. Hormones and Behavior*, 2007, 51(5):655-664.
- Cohen RS, Chung SK, Pfaff DW. *Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as a probe, Cell Mol Neurobiol*, 1985, 5:271–284.
- Cooper-Khun, C.M., Winkler, J., Khun, H.G. *Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. J Neurosci Res*, 2004, 77, 155-165.
- Cornford EM, Oldendorf WH. *Epilepsy and the blood-brain barrier. Adv Neurol*, 1986, 44:787-812.
- Dalrymple-Alford JC, Benton D, *Preoperative differential housing and dorsal hippocampal lesions in rats. Behav Neurosci*, 1984, 98:23-34.
- de Zeeuw CI, Ruigrok TJ, Holstege JC, Jansen HG, Voogd J. *Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive of the cat:II. Ultrastructure of dendritic spines and their GABAergic innervation, J Comp Neurol*, 1990, 300:478–494.
- Dent EW, Tang F, Kalil K. *Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. Neuroscientist*, 2003, 9:343–53.
- Desmond NL, Weinberg RJ. *Enhanced expression of AMPA receptor protein at perforated axospinous synapses, Neuroreport*, 1998, 9(5):857-60
- Diamond, M.C., Lindner, B., Johnson, R., Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., *Differences in occipital cortical synapses from environmentally enriched, impoverished, and standard colony rats, J. Neurosci. Res*, 1975, 1, 109–119

- Dietz, D.M., Laplant, Q., Watts, E.L., Hodes, G.E., Russo, S.J., Feng, J., Oosting, R.S., Vialou, V., and Nestler, E.J. Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol. Psychiatry*, 2011, 70, 408–414.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 1997, 17, 5046-5061.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 1988, 8:1454–68.
- Drake, C.T., Chavkin, C., and Milner, T.A. Opioid systems in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res*, 2007, 163, 245–263.
- Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 14385-14390.
- Eison DF, Morgan MJ, A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol*, 1977, 10:123-32.
- Eison DF, Stewart J, Atkinson S, Morgan MJ, Effect of isolation on barbiturate anaesthesia in the rat. *Psychopharmacol*, 1976, 50:85-88.
- Eison DF, Tye NC, Chlordiazepoxide and isolation induced timidity in rats. *Psychopharmacol*, 1975, 44:83-85.
- Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity, *Nature*, 1999, 399:66-70
- Feller MB: Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron*, 1999, 22:653-656.

- *Fiala BA, Joyce JN, Greenough WT. Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats. Exp Neurol, 1978, 59:372–83.*
- *Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation, Nat Neurosci, 2002, 5(4):297-8.*
- *Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1, (1998) J Neurosci.;18(21):8900-11*
- *Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci, 2003, 23, 373-382.*
- *Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. Neuron 1998;20:847–54.*
- *Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. Neuroscience, 2005, 133(2):463-70*
- *Flores G, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. J Neurosci, 1996 Mar 15,16(6):2020-6.*
- *Fournier, N.M., and Duman, R.S. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression. Behav. Brain Res, 2012, 227, 440–449.*

- Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ, Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1999, 896, 66-84.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnel, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S.K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., Chelly, J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 1999, 23, 247-256.
- Franklin TB, Mansuy IM. Epigenetic inheritance in mammals: evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiol Dis*, 2010 Jul, 39(1):61-5. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.012. Epub 2009 Nov 27. Review.
- Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K. Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, 2002, 43:305–15.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 2003, 23, 9357-9366.
- Gamallo A, Villanua A, Trancho G, Fraile A, Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav*, 1986, 36:217-221.
- Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., and Kempermann, G. Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*, 2004, 3, 363–371.
- Gardner EB, Boitano JJ, Mancino NS, D'Amico DP, Environmental enrichment and deprivation: effects on learning, memory and exploration. *Physiol Behav*, 1975, 14:321-327.

- Geinisman, Y., Disterhoft, J.F., Gundersen, H.J., McEchron, M.D., Persina, I.S., Power, J.M., van der Zee, E.A., West, M.J. *Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning*, *J. Comp. Neurol.*, 2000, 417, 49–59
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Frischknecht HR, Feer H, Siegfried B, *Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization*. *Physiol Behav*, 1988, 43:13-16.
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Kraeuchi K, Feer H, *Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments*. *Behav Brain Res*, 1982, 4:45-54.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *Int J Cancer*, 1983 Jan 15, 31(1):13-20.
- Gerfen CR. *Synaptic organization of the striatum*, *J Electron Microsc Tech*, 1988, 10:265–281.
- Gilbert CD, Wiesel TN. *Receptive field dynamics in adult primary visual cortex*, *Nature*, 1992, 356(6365):150-2.
- Gordon MK, Levine S, *Behavioral and neuroregulatory patterns in rats that experienced maternal separation as pups*. *Soc. Neurosci*, 1999, Abstr. 270.
- Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S., and McEwen, B.S. *Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus*. *J. Neurosci*, 1992, 12, 3642–3650.
- Gould, E, McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., Fuchs, E. *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation*. *J. Neurosci*, 1997, 17, 2492-2498.

- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah M., Tanapat P., Gross, C.G., Fuchs, E. *Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc. Nat. Acad Sci USA, 1999a, 96, 5263-5267.*
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., Gross, C.G. *Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science, 1999b, 286, 548-552.*
- Gratzner, H.G. *Monoclonal antibody to 5-bromo-and-5-iododeoxyuridine. A new reagent for detection of DNA replication. Science, 1982, 218, 474-475.*
- Greenough, W.T., Black, J.E., Wallace, C.S. *Experience and brain development. Child Dev, 1987, 58(3), 539-559.*
- Groves PM, Linder JC, Young SJ. *5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum, Neuroscience, 1994, 58: 593–604.*
- Hall FS, Humby T, Wilkinson LS, Robbins TW, *The effects of isolation-rearing of rats on behavioural responses to food and environmental novelty. Physiol Behav, 1997, 62:281-290.*
- Harris JR, *The Nurture Assumption: Why children Turn Out the Way They Do. New York: Touchstone, 1999.*
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. *Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation, J Neurosci, 1992, 12:2685–2705*
- Harris KM, Stevens JK. *Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics, J Neurosci, 1989, 9(8):2982-97.*
- Harris KM., *Structure, development and plasticity of dendritic spines, Curr Opin Neurobiol, 1999, 9(3):343-8.*

- *Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL, Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. J Pharmacol Exp Ther, 1987, 241:346-353.*
- *Harro J, Kiivet RA, Lang A, Vasar E, Rats with anxious or non-anxious type of exploratory behaviour differ in their brain CCK-8 and benzodiazepine receptor characteristics. Behav. Brain Res, 1990, 39:63-71.*
- *Harvey CD, Svoboda K. Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites, Nature, 2007, 450:1195-1200*
- *Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev, 2003 Oct, 27(6):555-79.*
- *Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P, Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. Neuroscience, 2000; 100:749-768.*
- *Heim C, Nemeroff CB, The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biol. Psychiatr, 2001, 49:1023-1039.*
- *Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. Focus on corticotropin-releasing factor. Ann N Y Acad Sci, 1997 Jun 21, 821:194-207. Review. No abstract available.*
- *Hellemans KG, Benge LC, Olmstead MC, Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. Brain Res Dev Brain Res, 2004, 150:103-115.*
- *Hering H, Sheng M. , Nat Rev Neurosci, 2001, 2(12):880-8.*

- *Heritch AJ, Henderson K, Westfall TC, Effects of social isolation on brain catecholamines and forced swimming in rats: prevention by antidepressant treatment. J. Psychiatr. Res, 1990, 24(3):251-8.*
- *Herman JP, Mueller NK. Role of the ventral subiculum in stress integration. Behav Brain Res, 2006 Nov 11, 174(2):215-24. Epub 2006 Jul 28.*
- *Hillman DE. Parameters of dendritic shape and substructure: intrinsic and extrinsic determination? In: Lasek RJ, Black MM, editors. Intrinsic determinants of neuronal form and function. New York: Liss, 1988, p. 83–113.*
- *Hinde RA, Spencer-Booth Y, Bruce M. Effects of 6-day maternal deprivation on rhesus monkey infants. Nature, 1966, 210:1021–1023.*
- *Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. Neuropsychopharmacology, 2000 Nov, 23(5):477-501.*
- *Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Turner BB, "Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. Physiol Behav, 1991, 49:1107-1118.*
- *Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex, Nature, 2006, 441:979-983*
- *Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo, Neuron, 2005, 45:279-291*
- *Howerton CL, Bale TL. Prenatal programming: at the intersection of maternal stress and immune activation. Horm Behav, 2012 Aug, 62(3):237-42. Doi 10.1016/j.yhbeh.2012.03.007. Epub 2012 Mar 23. Review.*
- *Hulme, P.A. Childhood sexual abuse, HPA axis regulation, and mental health: an integrative review. West. J. Nurs. Res, 2011, 33, 1069–1097.*

- *Jacobs BL, van Praag H, Gage FH, Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. Mol Psychiatry, 2000, 5(3):262-9.*
- *Jaffee SR. Sensitive, stimulating caregiving predicts cognitive and behavioral resilience in neurodevelopmentally at-risk infants. Dev Psychopathol, 2007 Summer, 19(3):631-47.*
- *Jones D, Morris N, Irrelevant speech and serial recall: implications for theories of attention and working memory. Scand J Psychol, 1992, 33(3):212-29.*
- *Jones GH, Marsden CA, Robbins TW, Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms of the nucleus accumbens. Psychopharmacol, 1990, 102:364-372.*
- *Jurakasa JM, Greenough WT, Conlee JW, Differential rearing affects responsiveness of rats to depressant and convulsant drugs. Physiol. Behav, 1983, 31:711-715.*
- *Kaech S, Fischer M, Doll T, Matus A. Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines, J Neurosci, 1997, 17:9565–9572.*
- *Karim A, Arslan MI, Isolation modifies the behavioural response in rats. Bangladesh Med Res Counc Bull, 2000, 26:27-32.*
- *Katz DM, Steinberg H, Proceedings: Previous environment and responses to morphine. Biochem, Pharmacol. Asp. Dep. And Rep. Marijuana Res, 1972.*
- *Katz LC, Shatz CJ: Synaptic activity and the construction of cortical circuits. Science, 1996, 274:1132-1138.*
- *Kaufman IC, Rosenblum LA. Depression in infant monkeys separated from their mothers. Science, 1967, 155:1030–1031.*
- *Kaufmann WE, Moser HW. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation, Cereb. Cortex, 2000, 10:981-991.*

- *Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. J Neurosci Methods, 2002 Mar 30, 115(1):97-105.*
- *Keenan CL, Coss R, Koopowitz H. Cytoarchitecture of primitive brains: Golgi studies in flatworms, J Comp Neurol, 1981, 195:697–716*
- *Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci, 2004, 27, 447-452.*
- *Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature, 1997, 386, 493-495.*
- *Kikusui T, Isaka Y, Mori Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. Behav Brain Res, 2005 Jul 30, 162(2):200-6. Epub 2005 Apr 9.*
- *Kim, J.J., Diamond, D.M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat. Rev. Neurosci, 2002, 3, 453-462.*
- *Kinsley C.H., Madonia L., Gifford G.W., Tureski K., Griffin G.R., Lowry C., Williams J., Collins J., McLearnie H., Lambert K.G. Motherhood improves learning and memory, Nature, 1999, 402(6758):137-8.*
- *Kirov SA, Harris KM. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated, Nat Neurosci, 1999, 2:878–883.*
- *Koch MD, Arnold WJ, Effects of early social deprivation on emotionality in rats. J Comp Physiol Psychol, 1972, 78:391-399.*
- *Koehnle TJ, Rinaman L. Early experience alters limbic forebrain Fos responses to a stressful interoceptive stimulus in young adult rats. Physiol Behav, 2010 May 11, 100(2):105-15. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.02.006. Epub 2010 Feb 14.*

- *Kostowski W, Czlonkowski A, Rewerski W, Piechocki T, Morphine action in grouped and isolated rats and mice. Psychopharmacology (Berl), 1977, 53:191-193.*
- *Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J. Neurosci, 1996, 16, 2027–2033.*
- *Kulkarni, V.A., Jha, S., Vaidya, V.A. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. Eur J Neurosci Res, 2002, 76, 205-215.*
- *Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. Biol Psychiatry, 2004 Feb 15, 55(4):367-75*
- *Ladd CO, Owens MJ, Nemeroff CB Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. Endocrinology, 1996, 137:1212–1218.*
- *Laloux C, Mairesse J, Van Camp G, Giovine A, Branchi I, Bouret S, Morley-Fletcher S, Bergonzelli G, Malagodi M, Gradini R, Nicoletti F, Darnaudéry M, Maccari S. Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. Psychoneuroendocrinology, 2012 Oct, 37(10):1646-58. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.02.010. Epub 2012 Mar 22.*
- *Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA, Neurosteroids and GABAA receptor function. Trends Pharmacol Sci, 1995, 16:295-303.*

- Lambert K.G., Berry A.E., Griffins G., Amory-Meyers E., Madonia-Lomas L., Love G., Kinsley C.H. *Pup exposure differentially enhances foraging ability in primiparous and nulliparous rats*, *Physiol. Behav*, 2005, 84(5):799-806.
- Laughlin SB, van Steveninck RRR, Anderson JC. *The metabolic cost of neural information*. *Nat Neurosci*, 1998,1:36–41.
- Lee, E., and Son, H. *Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors*. *BMB Reports*, 2009, 42, 239–244
- Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., Petrosini, L. *Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat*, *Behav Brain Res*, 2005, 163(1):78-90.
- Lehmann, .J, Feldon J. *Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing?* *Rev Neurosci*, 2000, 11(4), 383-408.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*, *Nature*, 2000, 404(6780):876-81
- Levine ES, Kolb JE. *Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons*. *J Neurosci Res*, 2000 Nov 1, 62(3):357-62.
- Levine S, *The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 746:275-88; discussion 289-93.
- Levine S. *Infantile experience and consummatory behavior in adulthood*. *J Comp Physiol Psychol*, 1957 Dec, 50(6):609-12. No abstract available.
- Levine S. *Infantile experience and resistance to physiological stress*. *Science*, 1957, 126:405.

- Levine S. *Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. Physiol Behav, 2001,73:255–60.*
- Levine S. *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. Neurotox Res, 2002 Aug-Sep, 4(5-6):557-564.*
- Levine, S. *Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. Physiol Behav, 2001, 73:255–60.*
- Levine, S., Huchton, D.M., Wiener, S.G., Rosenfeld, P, *Time course of the effect of maternal-deprivation on the hypothalamic—pituitary—adrenal axis in the infant rat. Dev. Psychobiol, 1991, 24, 547—558.*
- Lewis M, Miller SM, *Handbook of development psychopathology. New York: Plenum Press, 1990.*
- Lichtman AH, Cramer CP, *Relative importance of experience, social facilitation, and availability of milk in weaning of rats. Dev Psychobiol, 1989 May, 22(4):347-56.*
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ, *Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. Nat Neurosci, 2000, 3(8):799-806.*
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, *Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science, 1997, 277:1659– 62.*
- Liu G. *Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. Nat Neurosci, 2004, 7:373–9.*
- Lledo, P..M, Lagier, S. *Adjusting neurophysiological computations in the adult olfactory bulb. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17, 443–453.*

- *Llorens-Martin, M., Torres-Aleman, I., Trejo, J.L. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. Hippocampus, 2006, 16, 480-490.*
- *Lohmann C, Bonhoeffer T. A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia, Neuron, 2008, 59:253-260*
- *Losonczy A, Makara JK, Magee JC. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. Nature, 2008, 452:436–41.*
- *Lucassen, P.J., Stumpel, M.W., Wang, Q., Aronica, E. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. Neuropharmacology, 2010, 58, 940-949*
- *Luo L, O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease. Annu Rev Neurosci, 2005;28:127–56.*
- *MacQueen GM, Ramakrishnan K, Ratnasingan R, Chen B, Young LT, Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. Int J Neuropsychopharmacol, 2003, 6(4):391-6.*
- *Magariños AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. J Neurosci, 1996;16:3534–40.*
- *Mainen ZF, Sejnowski TJ: Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. Nature, 1996, 382:363-366.*
- *Majewska AK, Newton JR, Sur M. Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo, J Neurosci, 2006, 26:3021-3029*

- *Majewska MD, Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. Prog Neurobiol, 1992, 38:379-395.*
- *Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM, Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. Science, 1986, 232:1004-1007.*
- *Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci, 2000 Dec 15, 20(24):9104-10*
- *Marais L, Hattingh SM, Stein DJ, Daniels WM. A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. Metab Brain Dis, 2009 Dec, 24(4):569-86. doi: 10.1007/s11011-009-9156-3. Epub 2009 Oct 16*
- *Markham JA, Fifkova E. Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development, Brain Res, 1986, 392:263–269.*
- *Marrs GS, Green SH, Dailey ME. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites, Nat Neurosci, 2001, 4(10):1006-13.*
- *Matsumoto K, Uzunova V, Pinna G, Taki K, Uzunov DP, Watanabe H, Mienville JM, Guidotti A e Costa E, Permissive role of brain allopregnanolone content in the regulation of pentobarbital-induced righting reflex loss. Neuropsychopharmacol, 1999, 38: 955-963.*
- *Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines, Nature, 2004, 429:761-766.*
- *Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. Neurosci Bio behav Rev, 2003 Jan-Mar, 27(1-2):45-55.*
- *Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities, Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79:7590 –7594.*

- McAllister AK. *Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. Cereb. Cortex*, 2000, 10:963–73.
- McKinney WT Jr, Bunney WE Jr. *Animal model of depression. I. Review of evidence: Implications for research. Arch Gen Psychiatry*, 1969, 21:240–248.
- Meaney MJ, *Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. Annu. Rev. Neurosci*, 2001, 24:1161–92
- Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A, *Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. In: Tache', Y., Rivier, C. (Eds.), Corticotropin-Releasing Factor and Cytokines: The Role of the Stress Responses. New York Acad. of Sci*, 1993, 70–85.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. *Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. Dev Neurosci*, 1996, 18(1-2):49-72. Review.
- Meaney MJ, Stewart J, *Environmental factors influencing the affiliative behavior of male and female rats. Anim. Learn. Behav*, 1979, 7:397-405.
- Meaney MJ, Viau V, Bhatnagar S, Betito K, Iny LJ, O'Donnell D, Mitchell JB. *Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response ; J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991 Aug, 39(2):265-74.
- Mel BW. *Information-processing in dendritic trees. Neural Comput*, 1994, 6:1031–85.
- Mel BW: *Why have dendrites? A computational perspective. In Dendrites. Edited by Stuart G, Spruston N, Häusser M. Oxford: Oxford University Press*, 1999, 271-289.

- *Merrill, D.A., Karim, R., Darraq, M., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H, Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. J Comp Neurol, 2003, 459, 201-207.*
- *Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. Pharmacol Ther, 2008 Nov, 120(2):102-28. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.07.006. Epub 2008 Aug 15. Review.*
- *Milde AM, Enger Ø, Murison R, The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. Physiol Behav, 2004, 81(1):71-84.*
- *Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. Brain Res, 1988 Aug 2, 457(1):44-52.*
- *Ming, G.L., Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci, 2005, 28, 223-250.*
- *Mirescu C, Peters JD, Gould E, Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. Nat Neurosci, 2004, 7(8):841-6.*
- *Mohapel, P, Leanza, G., Kokaia, M., Lindvall, O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. Neurobiol Aging, 2005, 26, 939-946.*
- *Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ, McCarthy MM. Gonadal steroids reduce the density of axospinous synapses in the developing rat arcuate nucleus: an electron microscopy analysis, J Comp Neurol, 2001, 432(2):259-67*
- *Monroy E, Hernández-Torres E, Flores G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. J Chem Neuroanat, 2010 Oct, 40(2):93-101. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.05.005. Epub 2010 May 27.*

- *Morinan A, Parker V, Rich DA, Cariuk P, Horton RW, Social isolation does not alter brain regional benzodiazepine binding site numbers, affinity and coupling in the rat. Psychopharmacology (Berl), 1992, 106:565-569.*
- *Moyer KE, Korn JH, Behavioral effects of isolation in the rat. Psychon. Sci, 1965, 3:503-504.*
- *Mullen PE, Martin JL, Anderson JC, Romans SE, Herbison GP. The long-term impact of the physical, emotional, and sexual abuse of children: a community study. Child Abuse Negl, 1996 Jan, 20(1):7-21*
- *Myers MM, Brunelli SA, Squire JM, Shindeldecker RD, Hoffer MA, Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. Dev. Psychobiol, 1989, 22:29–53.*
- *Myers-Schulz BI, Koenigs M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. Mol Psychiatry, 2012 Feb, 17(2):132-41. doi: 10.1038/mp.2011.88. Epub 2011 Jul 26.*
- *Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson P. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. J Neurobiol, 1999, 39:569–78.*
- *Nowakowski RS, Hayes NL. New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? Science, 2000 May 5, 288(5467):771. No abstract available.*
- *Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus, Neuron, 1998, 21(3):545-59*
- *Okabe S, Miwa A, Okado H. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules, J Neurosci, 2001, 21(16):6105-14*

- *O'Leary DD, Borngasser DJ, Fox K, Schlaggar BL, Plasticity in the development of neocortical areas. Ciba Found Symp, 1995, 193:214-230*
- *O'Leary, D.D., Ruff, N.L., Dyck, R.H. Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. Curr Opin Neurobiol, 1994, 4(4), 55-544.*
- *Panksepp J, Siviy S, Normansell L, The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. Neurosci Biobehav Rev, 1984, 8(4):465-92.*
- *Parihar VK, Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Shetty AK. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. Mol Psychiatry, 2011 Feb, 16(2):171-83. doi: 10.1038/mp.2009.130. Epub 2009 Dec 15.*
- *Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons, Hippocampus, 2000, 10(5):561-8.*
- *Paul SM, Purdy RH, Neuroactive steroids. FASE B J, 1992, 6:2311-2322.*
- *Pei Q, Zetterström T, Fillenz M. Tail pinch-induced changes in the turnover and release of dopamine and 5-hydroxytryptamine in different brain regions of the rat. Neuroscience, 1990, 35(1):133-8.*
- *Pellis SM, Pellis VC, Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat Rattus Norvegicus. Aggr. Behav, 1987, 13:227-242.*
- *Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? Neuropharmacology, 2012 Jan;62(1):21-34. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.003. Epub 2011 Sep 19. Review.*
- *Pierce JP, Milner TA. Parallel increases in the synaptic and surface areas of mossy fiber terminals following seizure induction. Synapse, 2001,39:249–56.*

- *Pisu MG, Dore R, Mostallino MC, Loi M, Pibiri F, Mameli R, Cadeddu R, Secci PP, Serra M, Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. Behav. Brain Res, 2011, 222:73-80.*
- *Plotsky PM, Meaney MJ, Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. Brain Res. Mol. Brain Res, 1993, 18, 195–200.*
- *Plotsky PM, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ, Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(12):2192-204.*
- *Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators, Nat Rev Neurosci, 2001 Jan, 2(1):24-32.*
- *Pryce CR, Bettschen D, Nanz-Bahr NI, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. Behav Neurosci, 2003 Oct, 117(5):883-93.*
- *Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29(4-5):649-74. Epub 2005 Apr 25*
- *Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH, Costa E, Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. Neuron, 1990, 4:759-765.*
- *Purpura DP: Dendritic differentiation in human cerebral cortex: normal and aberrant developmental patterns. Adv Neurol, 1975,12:91-134.*
- *Ra, S.M., Kim, H., Jang, M.H., Shin, M.C., Lee, T.H., Lim, B.V., Kim, C.J., Kim, E.H., Kim, K.M., Kim, S.S. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. Neurosci Lett, 2002, 333, 123-126.*

- *Rami, A., Brehier, A., Thomasset, M., Rabie, A. Cholecalciferol in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study. Dev Biol, 1987, 124, 228-238.*
- *Rao, M.S., Shetty, A.K., Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. Eur J Neurosci, 2004, 19, 234-246.*
- *Reuter M, Gustafsson MK. The flatworm nervous system: pattern and phylogeny, Experientia, 1995, 72:25–59*
- *Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Mol Psychiatry, 2009 Oct, 14(10):959-67. doi: 10.1038/mp.2009.15. Epub 2009 Mar 3.*
- *Rizzi S, Bianchi P, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R. Impact of environmental enrichment on neurogenesis in the dentate gyrus during the early postnatal period. Brain Res, 2011 Sep 30, 1415:23-33. doi: 10.1016/j.brainres.2011.08.007. Epub 2011 Aug 9.*
- *Robertson HA, Martin IL, Candy GM, Differences in benzodiazepine receptor binding in Maudsley reactive and Maudsley non-reactive rats. Eur. J. Pharmacol, 1978, 50: 455-457.*
- *Rolls, E.T., Memory systems in the brain. Annu Rev Psychol, 2000, 51, 599-630.*
- *Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development Neurosci Biobehav Rev, 1992 Winter, 16(4):553-68.*
- *Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. Physiol Behav, 1992 Oct, 52(4):787-91*
- *Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. Ca(2+) signaling in dendritic spines, Curr Opin Neurobiol, 2001, 11(3):349-56.*

- Sapolsky RM, Meaney MJ. *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. Brain Res, 1986 Mar, 396(1):64-76. Review.*
- Sarnat HB, Netsky MG. *The brain of the planarian as the ancestor of the human brain, Can J Neurol Sci, 1985, 12:296–302.*
- Scaccianoce S, Del Bianco P, Paolone G, Caprioli D, Modafferi AM, Nencini P, Badiani A, *Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. Behav Res, 2006, 168(2):323-5.*
- Schikorski T, Stevens CF. *Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses, J Neurosci, 1997, 17(15):5858-67.*
- Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. *Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. Mol Psychiatry, 2010 Dec;15(12):1152-63. doi: 10.1038/mp.2010.34. Epub 2010 Mar 23.*
- Schoenfeld TJ, Gould E. *New neurons retire early. Nat Neurosci, 2012 Dec, 15(12):1611-2. doi: 10.1038/nn.3268. No abstract available.*
- Scorcioni R, Polavaram S, Ascoli GA. *L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. Nat Protoc, 2008, 3:866–76.*
- Scott EK, Luo L. *How do dendrites take their shape? Nat Neurosci, 2001, 4:359–65.*
- Segev I, Rall W. *Computational study of an excitable dendritic spine, J Neurophysiol, 1988, 60:499–523.*
- Segev I, Rall W. *Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations, Trends Neurosci, 1998, 21:453–460.*

- Serra M, Mostallino MC, Talani G, Pisu MG, Carta M, Mura ML, Floris I, Maciocco E, Sanna E, Biggio G. Social isolation-induced increase in alpha and delta subunit gene expression is associated with a greater efficacy of ethanol on steroidogenesis and GABA receptor function. *J. Neurochem*, 2006, 98(1):122-33.
- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH, Biggio G,. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem*, 2000, 75:732-740.
- Shear MK, Brunelli SR, Hofer MA, 1983. The effects of maternal deprivation and of refeeding on the blood pressure of infant rats. *Psychosom Med*, 1983 Mar, 45(1):3-9.
- Shors TJ, Chua C, Falduto J. Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus, *J Neurosci*, 2001, 21(16):6292-7
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning, *Hippocampus*, 2002, 12(5):578-84.
- Silva-Gómez AB, Rojas D, Juárez I, Flores G. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res*, 2003 Sep 5, 983(1-2):128-36.
- Smith JK, Neill JC, Costall B. Post-weaning housing conditions influence the behavioural effects of cocaine and d-amphetamine. *Psychopharmacol*, 1997, 131:23-33.
- Smotherman WP, Brown CP, Levine S. Maternal responsiveness following differential pup treatment and mother-pup interactions. *Dev. Psychobiol*, 1977, 10, 242–253.
- Smotherman WP, Robinson SR, Lavallee PA, Hennessy MB. Influences of the early olfactory environment on the survival, behavior and pituitary-adrenal activity of cesarean delivered preterm rat pups. *Dev Psychobiol*, 1987, 20:415–423.

- Sorra KE, Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines, *Hippocampus*, 2000, 10(5):501-11
- Sorra KE, Harris KM. Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1, *J Neurosci*, 1998, Jan 15;18(2):658-71
- Spacek J, Harris KM. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat, *J Neurosci*, 1997, 17:190–203.
- Spacek J, Hartmann M. Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices, *Anat Embryol (Berl)*, 1983, 167:289–310
- Steward O, Falk PM, Torre ER. Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes, *J Neurocytol*, 1996, 25(12):717-34
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG *Arc* to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites, *Neuron*, 1998, 21(4):741-51
- Sullivan RM, Gratton A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology*, 2002 Jan-Feb, 27(1-2):99-114.
- Svoboda K, Mainen ZF. Synaptic $[Ca^{2+}]_i$: intracellular stores spill their guts, *Neuron*, 1999, 22(3):427-30
- Svoboda K, Tank DW, Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts, *Science*, 1996, 272:716–719.

- Takemura, N.U. Evidence for neurogenesis within the white matter beneath the temporal neocortex of the adult rat brain. *Neuroscience*, 2005, 134, 121-132.
- Taupin, P. Adult neural stem cells, neurogenic niches and cellular therapy. *Stem Cell Review*, 2006, 2, 213-220.
- Tomizawa K., Iga N., Lu Y.F., Moriwaki A., Matsushita M., Li S.T., Miyamoto O., Itano T., Matsui H. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade, *Nat. Neurosci*, 2003, 6(4):384-90.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 2005 Sep 15, 47(6):803-15.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex, *Nature*, 2002, 420(6917):788-94.
- Trommald M, Hulleberg G. Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs, *J Comp Neurol*, 1997, 377:15–28.
- Tyler W.J., Alonso M., Bramham C.R., Pozzo-Miller L.D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning, *Learn. Mem*, 2002, 9(5):224-37.
- Uylings HBM, Van Pelt J. Measures for quantifying dendritic arborizations. *Netw Comput Neural Syst* 2002, 13:397–414.
- Valzelli L. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, 1973, 31:305-320.
- Van der Borgh, K., Wallinga, A.E., Luiten, P.G., Eggen, B.J., Zee, E.A., van der Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the

neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. Behav Neurosci, 2005,119, 926-932.

- *Van Kampen, J.M., Hagg, T., Robertson, H.A. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation. Eur J Neurosci, 2004, 19, 2377-2387.*
- *van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, Nov 9;96(23):13427-31.*
- *van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature, 2002, 415, 1030-1034.*
- *Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM, The neurobiology of social play behavior in rats. Neurosci Biobehav Rev, 1997, 21(3):309-26.*
- *Veena J, Rao BS, Srikumar BN. Regulation of adult neurogenesis in the hippocampus by stress, acetylcholine and dopamine. J Nat Sci Biol Med, 2011, Jan;2(1):26-37. doi: 10.4103/0976-9668.82312.*
- *Veenema AH, Blume A, Niederle D, Buwalda B, Neumann ID. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. Eur J Neurosci, 2006, 24(6):1711-20.*
- *Veenema AH, Neumann ID. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(3):463-7.*
- *Vicario-Abejón C., Owens D., McKay R. Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization, Nat. Rev. Neurosci, 2002, 3(12):965-74.*

- Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C. *Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. Endocrinology, 1986 Apr, 118(4):1445-51.*
- Wallace, W., Bear, M.F. *A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex, J. Neurosci, 2004, 24, 6928–6938*
- Wang SS, Shultz JR, Burish MJ, Harrison KH, Hof PR, Towns LC, et al. *Functional trade-offs in white matter axonal scaling. J Neurosci, 2008, 28:4047–56.*
- Wartella J, Amory E, Lomas LM, Macbeth A, McNamara I, Stevens L, Lambert KG, Kinsley CH. *Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat, Physiol Behav, 2003, 79(3):373-81.*
- Weinberger DR. *Arch. Gen. Psychiatry, 1987, 44, 660-669.*
- Weiss IC, Feldon J. *Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. Psychopharmacology (Berl), 2001, 156:305-326.*
- Weiss, F., Koob, G.F. *Drug addiction: functional neurotoxicity of the brain reward systems. Neurotox Res, 2001, 3(1), 145-156.*
- Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ. *Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. Brain Res. Bull, 2004,64: 303-308.*
- Wigger A, Neumann ID. *Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. Physiol Behav, 1999, 66(2):293-302.*
- Wongwitdecha N, Marsden CA. *Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. Behav Brain Res, 1996, 75:27-32.*
- Woolley CS, McEwen BS. *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat, J Neurosci, 1992, 12(7):2549-54.*

- Wu G-Y, Zou DJ, Rajan I, Cline HT. *Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. J Neurosci* 1999, 19:4472-4483.
- Wu K, Aoki C, Elste A, Rogalski-Wilk AA, Siekevitz P. *The synthesis of ATP by glycolytic enzymes in the postsynaptic density and the effect of endogenously generated nitric oxide, [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(5):2714]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94:13273–13278*
- Yankova M, Hart SA, Woolley CS. *Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(6):3525-30. Epub 2001 Feb 20.*
- Yap JJ, Miczek KA. *Stress and Rodent Models of Drug Addiction: Role of VTA-Accumbens-PFC-Amygdala Circuit. Drug Discov Today Dis Models, 2008, Winter;5(4):259-270.*
- Yen H. C. Y., Stanger R. L., Millman N. *Isolation-induced aggressive behavior in ataractic test. J. Pharmacol. exp. Ther, 2005,122, 85A.*
- Yoshimi, K., Ren, Y.R., Seki, T., Yamada, M., Ooizumi, H., Onodera, M., Saito, Y., Murayama, S., Okano, H., Mizuno, Y., Mochizuky, H. *Possibility for neurogenesis in substantia nigra of Parkinsonian brain. Ann Neurol ,2005, 58, 31-40.*
- Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Draguno, M., During M.J. *Enviromental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nat. Med 5, 1999, 448-453.*
- Yu, S., Patchev, A.V., Wu, Y., Lu, J., Holsboer, F., Zhang, J.Z., Sousa, N., and Almeida, O.F. *Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids. Ann. Neurol, 2010, 67, 21–30.*
- Zacchetti AI, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. *Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues:*

comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. APMIS, 2003, Mar;111(3):430-8.

- *Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., Janson, A.M. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100, 7925-7930.*
- *Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex, Neuron, 2005, 46:181-189.*

“La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell’Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014- XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Valentina Maria Melis gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.)”.

*Legge Regionale 7 agosto 2007, n.7 : ‘Promozione della ricerca scientifica e dell’innovazione tecnologica in Sardegna’
CODICE: CRP-60921.*

Programmi di ricerca scientifica di rilevante interesse nazionale, anno 2010-2011- prot.20107MSMA4_001.

Ringrazio Prof. Biggio, per avermi dato l'opportunità di lavorare con lui, per essere stato sempre molto disponibile e per i suoi insegnamenti.

Ringrazio Prof. Sanna per essere stato il mio relatore di questo progetto e per la diponibilità.

Ringrazio la Dott.ssa Mostallino per avermi accompagnato in questi tre anni di lavoro, per l'aiuto che mi ha dato per la stesura della tesi e per il lavoro fatto insieme.