

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
Federico II**

**STUDIO DEL FENOTIPO
COMPORTAMENTALE DI TOPI NCX3**

K.O.

**DOTTORATO DI RICERCA
IN NEUROSCIENZE**

Ch.:Lucio Annunziato.

Dottoranda:

Margherita Fusco

Modelli animali geneticamente ingegnerizzati, sono uno dei metodi più comunemente usati nella ricerca genetica del comportamento, infatti la descrizione del comportamento murino aiuta a mapparne il genoma caratterizzando i repertori comportamentali di linee pure, incrociate, knockouts, transgeniche e popolazioni ottenute attraverso incroci selettivi.

In questo studio ci siamo proposti d'indagare il ruolo svolto dal canale per il sodio ed il calcio nel determinare il comportamento.

Con questa finalità abbiamo analizzato il comportamento di topi K.O. per il gene NCX3 ed i relativi eterozigoti.

K.D. Philipson ci spiega in articolo del 2000 che, il catione calcio è uno dei più importanti messaggeri intracellulari ed esistono diversi meccanismi per regolarne le quantità: uno di questi meccanismi coinvolge lo scambiatore sodio-calcio. La relativa abbondanza degli altri trasportatori del catione calcio determina l'importanza dello scambiatore sodio-calcio in un determinato tipo di cellula. L'attività dello scambiatore ha un ruolo chiave nella contrattilità dei cardiomiociti.

I tessuti nei quali l'attività dello scambiatore è particolarmente importante sono: il tessuto renale, muscolare liscio e cerebrale.

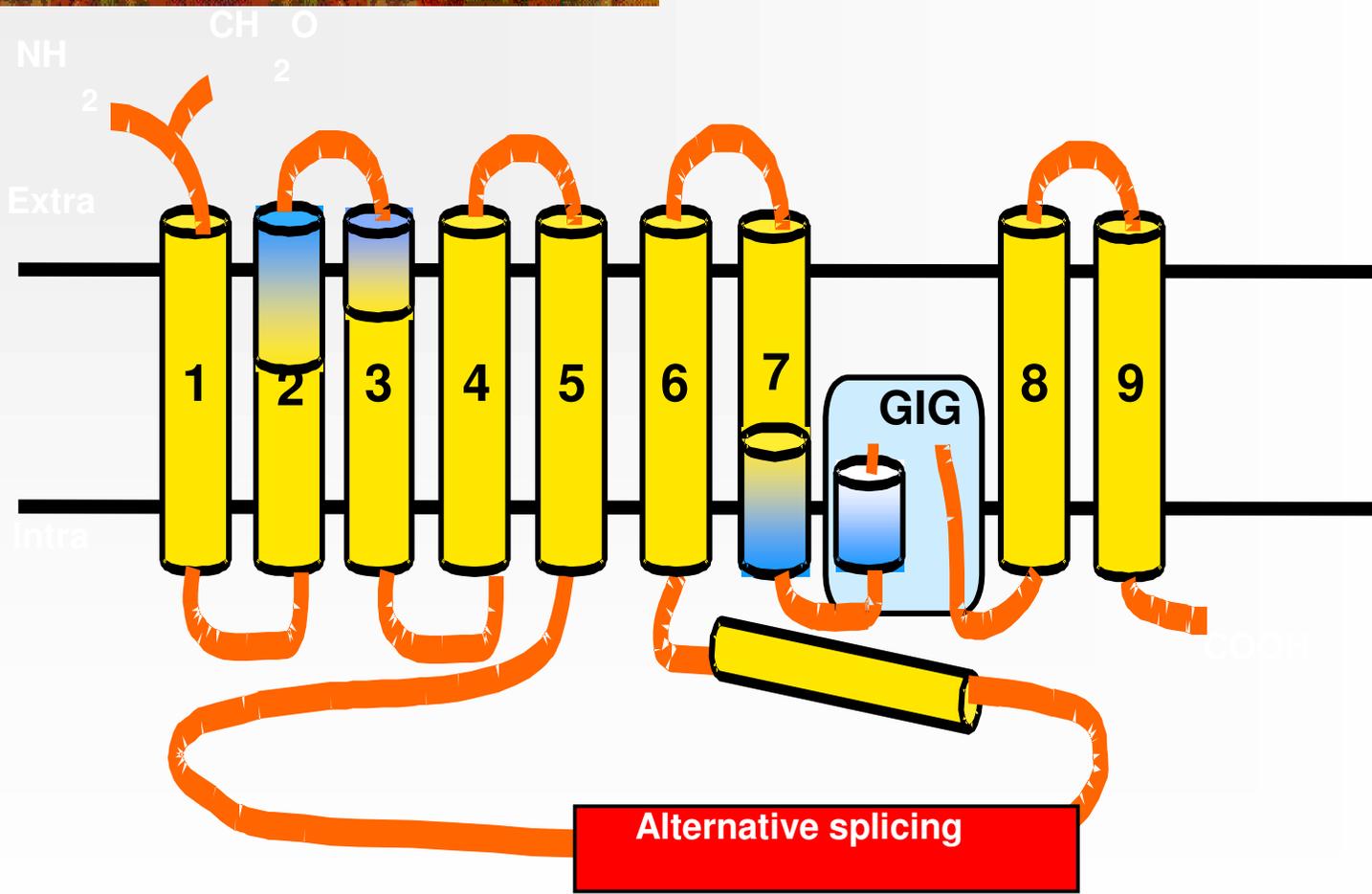
L'attività dello scambiatore ha un ruolo chiave nella contrattilità dei cardiomiociti.

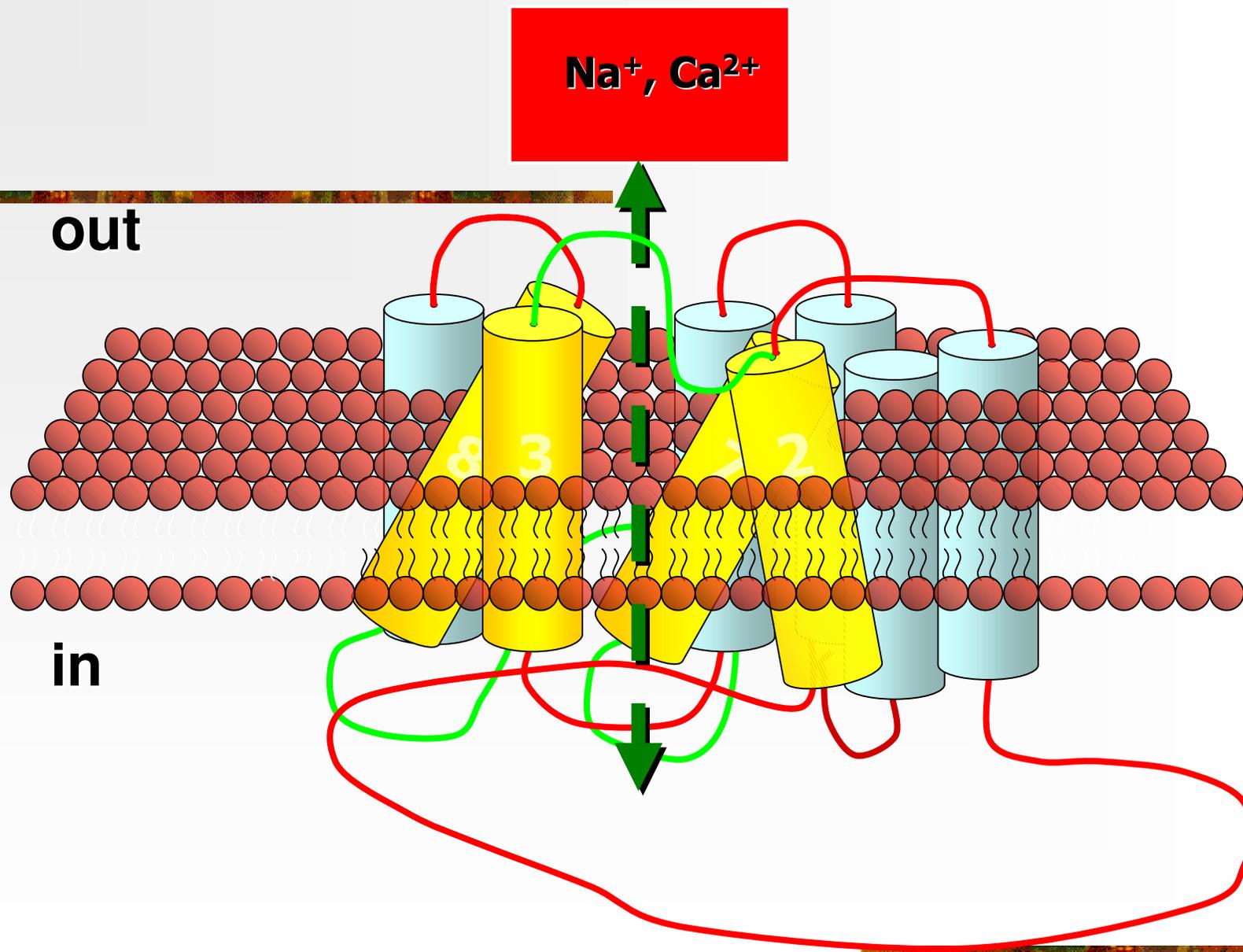
Lo scambiatore sodio-calcio, è una proteina che attraversa la membrana cellulare 9 volte.

Lo scambiatore sodio-calcio, è chiamato così perché opera lo scambio di ioni calcio e sodio in modo bidirezionale tra l'interno e l'esterno della cellula.

I 9 segmenti transmembrana dello scambiatore, possono essere identificati in un dominio idrofobico n-terminale e in un dominio idrofobico c-terminale, coinvolti nel trasporto degli ioni.

La regolazione dell'attività dello scambiatore, avviene a livello del restante loop intracellulare, formato da 500 aa.ed è chiamato loop F.





In condizioni fisiologiche, lo scambiatore estrude cationi calcio dalla cellula in risposta a una depolarizzazione o stimolazione del glutammato.

La stechiometria dello scambio è di 3 ioni sodio per ogni ione calcio scambiato.

TOPI KNOOUT OUT

Ad oggi sono stati ingegnerizzati topi knock out per la isoforma 1 e per la isoforma 2 dello scambiatore sodio-calcio. Il primo non è vitale, probabilmente a causa del ruolo importante giocato da NCX1 a livello cardiaco.

Il topo KO per l'isoforma 2, invece, mostra tipiche modifiche comportamentali ed elettrofisiologiche, che hanno portato ad ipotizzare un ruolo di NCX2 nei processi di apprendimento e memoria.

Recentemente è stato realizzato anche un topo KO per l'isoforma 3 di NCX (Jeon et al 2003). Quest' ultimo presenta alterazioni a livello motorio, dovute alla mancanza di espressione di NCX3 a livello muscolare.

IL GENE NCX

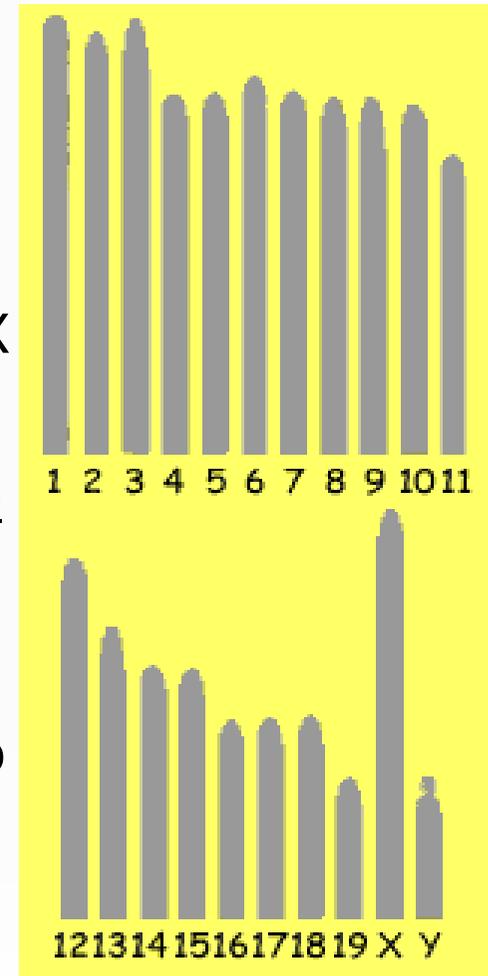
Il gene NCX è stato mappato sul cromosoma 12.

Il gene che codifica per lo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX) è presente in 3 isoforme (NCX1, NCX2 ed NCX3).

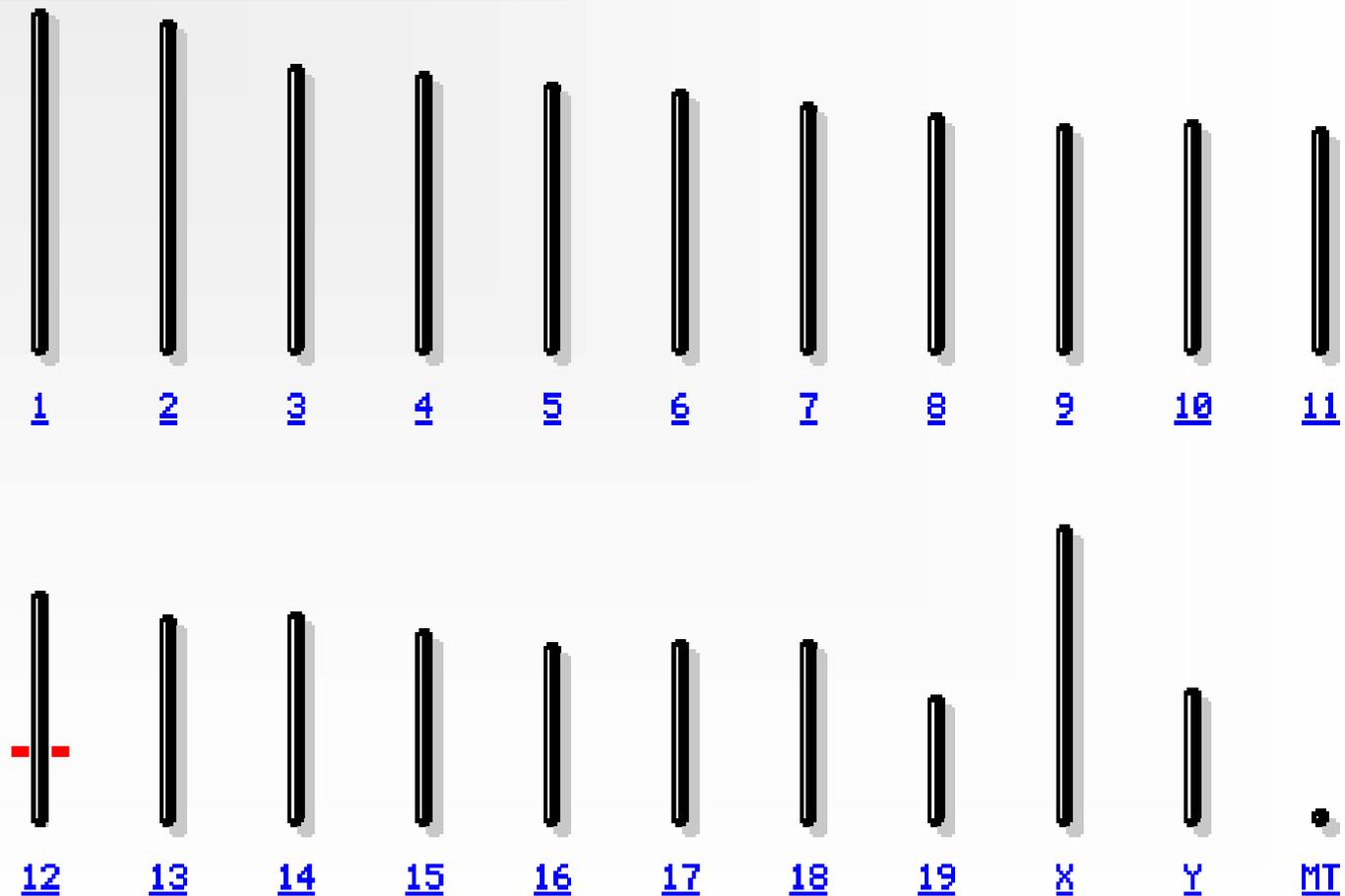
Allo stato attuale non è noto se le tre isoforme di NCX abbiano ruoli differenti nel SNC.

La differente distribuzione (vedi Canitano et al.) delle proteine prodotte dalle 3 isoforme geniche, fa supporre che questi scambiatori abbiano effetti differenti sia dal punto di vista fisiologico che in corso di patologie come l'ischemia cerebrale (vedi Pignataro et al.).

E' ben noto, per esempio che un inattivazione proteolitica di NCX3 è responsabile di morte neuronale per eccitotossicità.



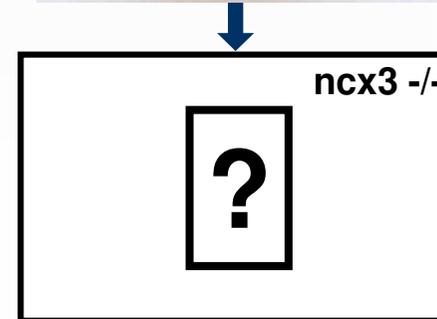
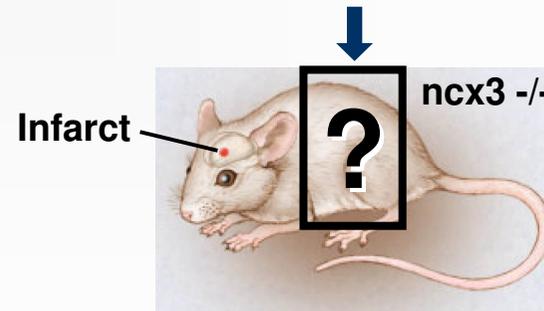
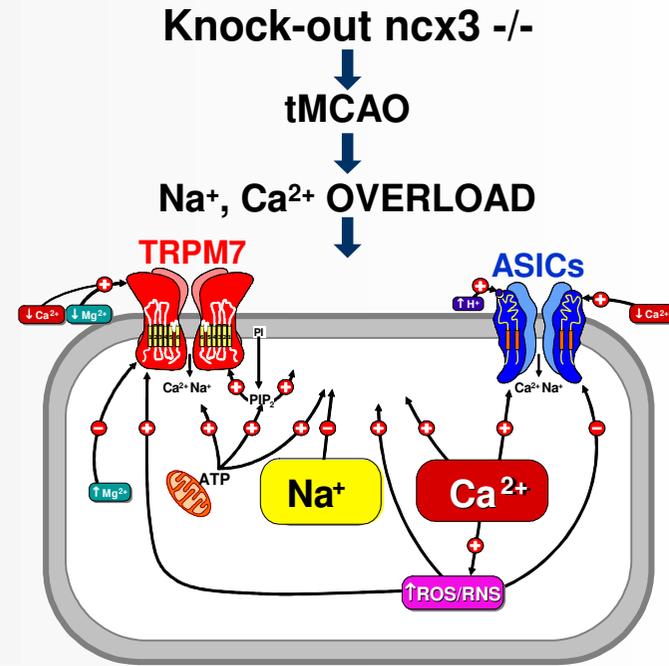
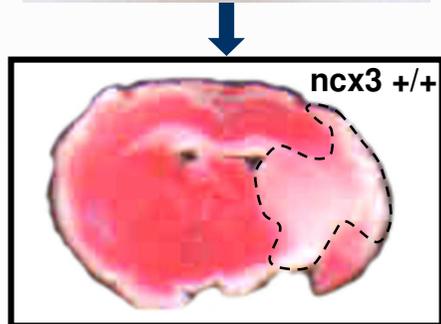
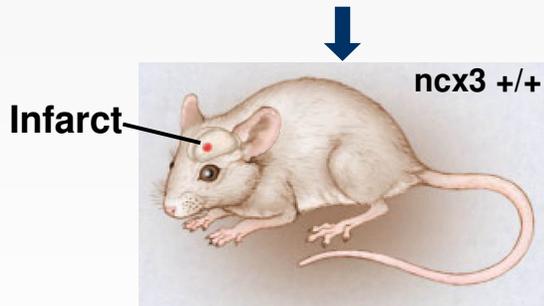
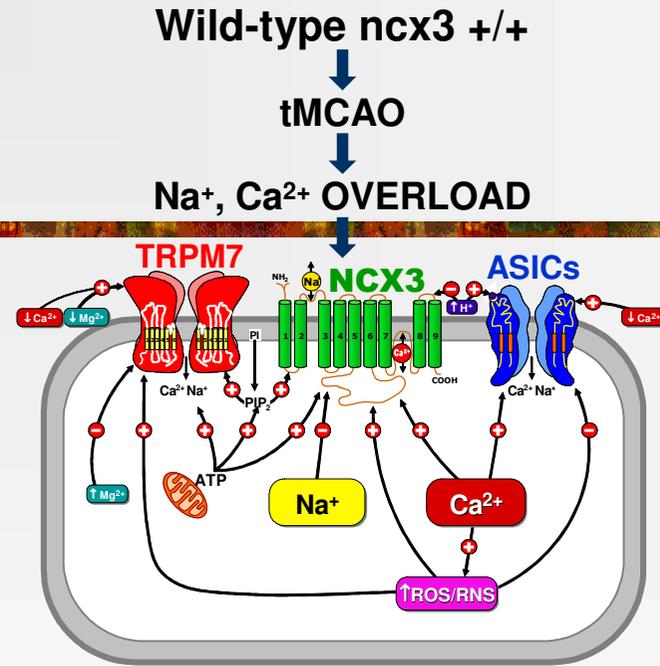
IL gene ncx si trova sul cromosoma 12 .



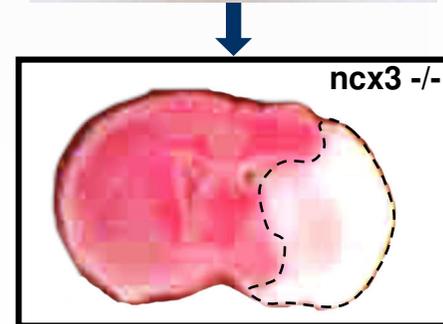
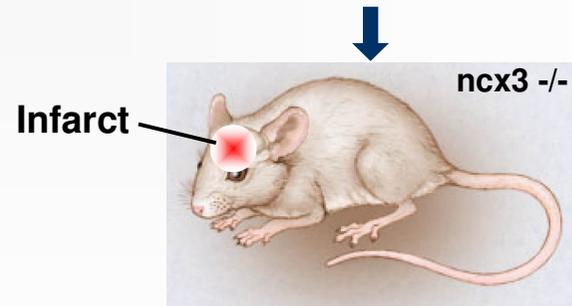
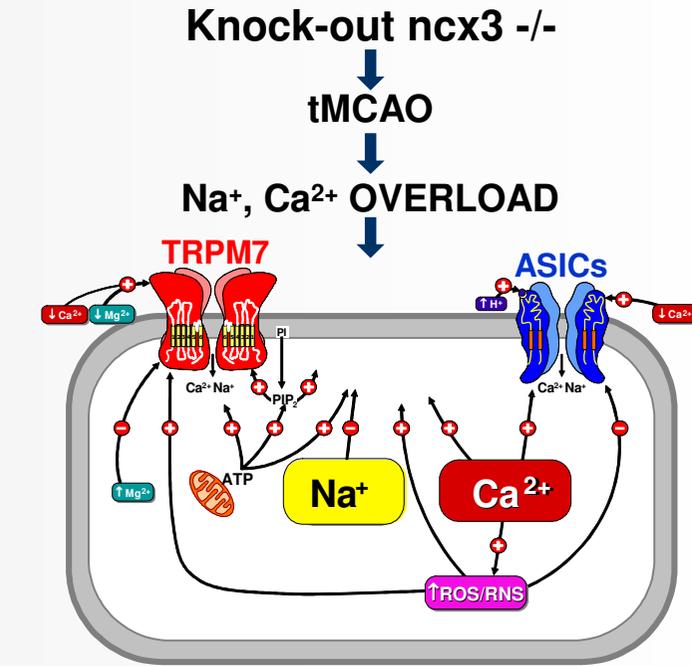
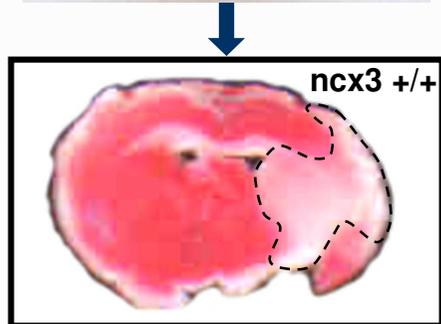
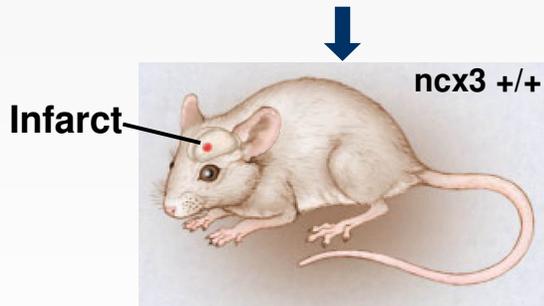
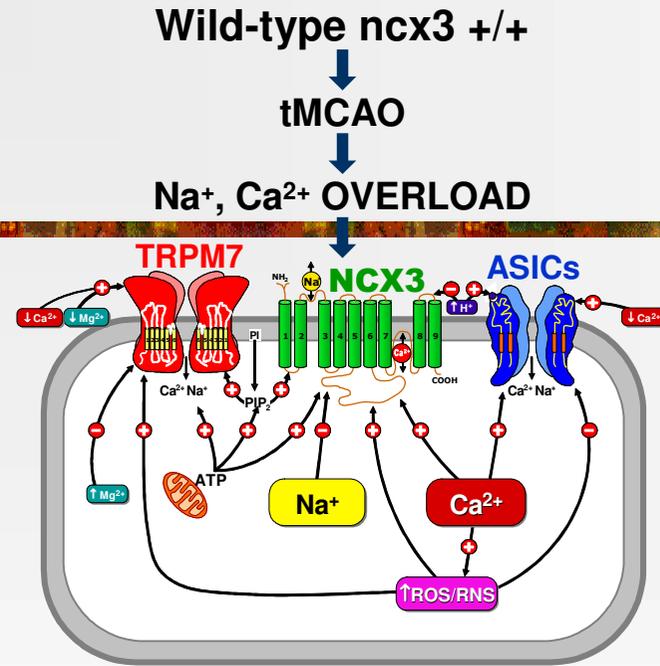
Hits:

6

INVOLVEMENT OF NCX3 DURING STROKE



INVOLVEMENT OF NCX3 DURING STROKE



Localizzazione mRNA NCX3

Gli mRNAs di NCX3 sono stati trovati principalmente nell'ippocampo, nel talamo, nell'amigdala e nel cervelletto.

Localizzazione proteine NCX3

Le proteine di NCX3 sono state trovate principalmente nella sottoregione CA3 dell'ippocampo,

negli strati oriens, radiato, molecolare e lacunosomolecolare del cervelletto,

oltrechè nello striato ventrale.

Questi dati ci rendono possibile ipotizzare che la mancanza di NCX3 a livello del sistema nervoso centrale possa indurre alterazioni sia motorie che di apprendimento e memoria; tali funzioni, infatti sono svolte principalmente dalle regioni cerebrali in cui si esprime NCX3.

Immagine dell'encefalo.



OBIETTIVI DEL PROGETTO

Obiettivi del progetto

- Definire il fenotipo comportamentale e quindi le funzioni fisiologiche dello scambiatore in vivo utilizzando dei topi NCX3 K.O.
- Per far questo ci proponiamo di:
 - **DEFINIRE LE CARATTERISTICHE COMPORTAMENTALI DEI TOPI NCX3 K.O.**
 - **COMPARARLI CON GLI ETEROZIGOTI.**

RIASSUNTO

Possiamo riassumere il nostro quesito riferendoci all'elenco degli interrogativi utili allo studio del comportamento compilato dall'etologo Tinbergen, come viene riportato da Patrick Bateson nel volume “La misurazione del comportamento.”:

“In che modo interagiscono i geni dell'individuo e la sua esperienza durante la strutturazione del suo comportamento?”.



APPRENDIMENTO E MEMORIA.

APPRENDIMENTO

L'apprendimento è il processo attraverso il quale il cervello acquisisce informazioni dall'ambiente esterno (A. Giuditta, 1993).

L'apprendimento poi era stato definito operativamente da Thorpe nel 1956, come un cambiamento durevole o relativamente stabile nel comportamento che deriva dall'esposizione ripetuta ad una serie di stimoli.

L'apprendimento nell'adulto può essere classificato in

Apprendimento non associativo

e

Apprendimento associativo.

APPRENDIMENTO NON ASSOCIATIVO

L'apprendimento non associativo è il tipo più semplice di apprendimento, esso viene definito non associativo perché la situazione stimolo che produce la modificazione del comportamento, coinvolge un solo tipo di recettore sensoriale.

L'apprendimento non associativo si può classificare in

Abituazione e

Sensibilizzazione.

ABITUDINE O ABITUAZIONE?

Konrad Lorenz nel saggio del 1973

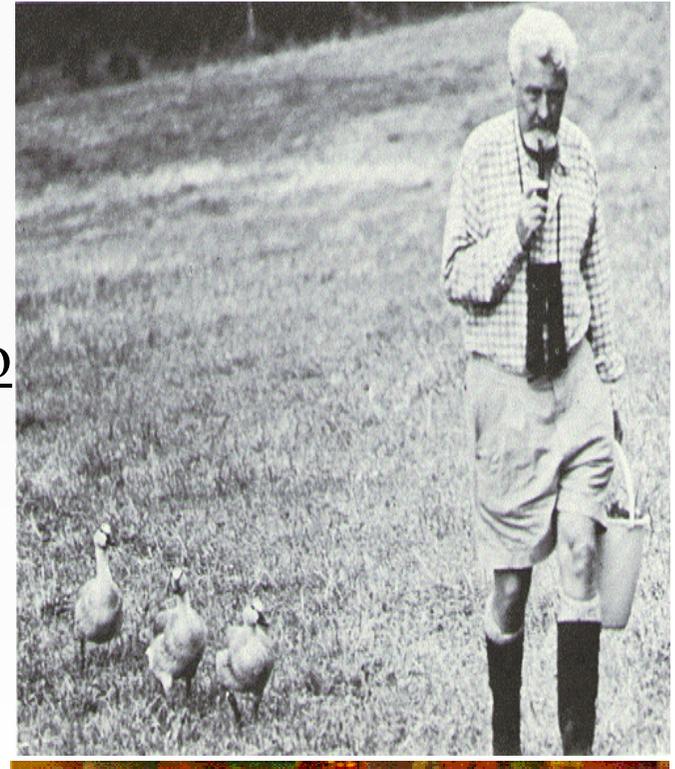
“L'altra faccia dello specchio” (DIE

RUCKSEITE DES SPIEGELS), osserva

che:

“Nel linguaggio comune noi impieghiamo il termine di abitudine non soltanto per indicare il processo attraverso cui ci abituiamo ad uno stimolo, ma anche quando una determinata situazione stimolo o un certo comportamento, ripetuti molte volte, ci sono divenuti cari, o addirittura insostituibili.”

Lorenz sceglie allora di utilizzare il termine abituazione per il primo processo ed il termine abitudine per il secondo.



ABITUAZIONE

L'abituazione consiste in una diminuzione della risposta comportamentale in seguito alla presentazione ripetuta di uno stesso stimolo iniziale non nocivo e nuovo.

L'abituazione consiste nell'imparare a riconoscere e ad ignorare gli stimoli che hanno perso il carattere di novità o di significato.

L'abituazione ha spesso un ruolo in forme di apprendimento più complesse, che includono non solo l'acquisizione di nuove risposte, ma anche la soppressione di risposte inadeguate (E. Kandel 1979).

Nel 1906 Sherrington osservò che una stimolazione ripetuta della pelle di un gatto produceva un'abituazione della risposta riflessa di flessione-retrazione di un arto.

Solo nel 1976 però, 70 anni dopo, Kandel ed i suoi collaboratori, hanno chiarito i meccanismi molecolari alla base del fenomeno dell'abituazione studiandolo nella lumaca di mare Aplysia californica.

APLYSIA O LUMACA DI MARE.

Il genere Aplysia comprende animali appartenenti al phylum dei Molluschi alla classe dei Gasteropodi, alla sottoclasse degli opistobranchi ed all'ordine dei tettibranchi.

Al genere Aplysia appartengono animali bentonici (vivono sui fondali marini) e che si nutrono di alghe.

Presentano una conchiglia interna ridotta, un corpo in cui si può distinguere il capo, il sacco dei visceri e l'organo locomotorio che gli zoologi definiscono comunemente piede. L'apparato locomotore li rende adatti a strisciare sul fondo, ma anche a nuotare grazie a 2 espansioni laterali del piede dette parapodi.

Sono animali acquatici che respirano attraverso una branchia detta ctenidio, situata dietro il cuore e protetta da una ripiegatura del mantello che avvolge il sacco dei visceri.

Sul capo delle *Aplysia* si possono distinguere due paia di appendici con funzione di organi di senso.

Le appendici anteriori sono dette antenne, quelle posteriori sono dette rinofori con funzione olfattoria e possono essere ritirate completamente nella tasca dei rinofori in caso di disturbo.

Le *Aplysia* presentano un sistema nervoso gangliare con 2 gangli cefalici, 2 gangli pleurali, 2 gangli pedali e 2 gangli viscerali uniti da fibre nervose dette connettivi e commessure.

I 2 gangli cerebrali sono sopraesofagei e da essi partono i nervi che vanno al faringe ed alle appendici del capo.

I gangli pedali sono sottoesofagei ed innervano il piede.

Vi è poi una massa gangliare sottoesofagea, posteriore ai gangli pedali, formata dall'unione dei gangli pleurali, parietali e viscerale.

L'abituazione di Aplysia.

Se si tocca la cute della tasca branchiale di un' Aplysia, l'animale risponde ritraendo difensivamente la tasca stessa.

In seguito alla ripetizione del succitato stesso stimolo, l' Aplysia impara presto che esso non è nocivo e non vale la pena di ritrarre la branchia, si dice allora che l'animale si è abituato allo stimolo.

Esiste un numero sufficiente di ripetizioni dello stimolo tale da essere memorizzato dall'animale a breve termine cioè fino ad alcune ore dopo la sequenza di stimolazioni, scaduto questo termine se lo stimolo non viene ripresentato, l'animale lo dimentica e in seguito ricomincerà a ritrarre la branchia:

Si dice che l'animale si è disabituato.

Kandel ha osservato che l'abituazione del riflesso di retrazione della branchia di *Aplysia* mostra tutti gli aspetti che caratterizzano l'abituazione dei vertebrati.

Nel 1978 Kandel ha trovato che nell'*Aplysia* l'abituazione oltre a determinare una diminuzione del potenziale sinaptico eccitatorio del motoneurone, determina anche una diminuzione dell'afflusso di calcio ed un conseguente minor rilascio di neurotrasmettitore tra i neuroni sensoriali ed i motoneuroni che circondano la branchia.

MEMORIA A BREVE E A LUNGO TERMINE.

A. Giuditta, nel suo articolo del 1993 “Espressione genica nell’apprendimento”, ci spiega che:”Se apprendimento equivale ad acquisizione, memoria è la traccia lasciata dall’apprendimento, ma anche la capacità del cervello di ritenere e organizzare tali tracce.”Ci ricorda inoltre che la memoria può sopravvivere per poche decine di minuti e in questo caso si definisce memoria a breve termine oppure per periodi molto più lunghi (ore, giorni o periodi indefiniti) e allora si definisce memoria a lungo termine.

ABITUAZIONE A BREVE O A LUNGO TERMINE IN APLYSIA.

Kandel ha trovato che se si sottopone un' Aplysia o i suoi neuroni ad un'unica seduta di addestramento costituita da 10 stimoli alla cute del mantello che ricopre la branchia, la riduzione del riflesso persiste al massimo per poche ore, ma dopo 4 sedute di addestramento ripetute in giorni consecutivi, la memoria permane per più di 3 settimane.

I dati di Kandel mostrano che in seguito al maggior numero di stimolazioni non si riduce solo l'efficacia delle sinapsi, ma il numero di sinapsi tra neuroni sensoriali e motoneuroni.

L'ABITUAZIONE DEI RODITORI.

In una review del 2006 Leussis e Bolivar raccolgono gran parte dei risultati relativi all'abituazione nei roditori.

Le autrici ci ricordano che il fenomeno dell'abituazione nei roditori è stato studiato essenzialmente nella forma di abituazione ad un nuovo ambiente e quindi è stata definita come un cambiamento dell'esplorazione o dell'attività locomotoria nel tempo, nel corso di una sessione di esposizione o nel corso di successive sessioni.

I neurotrasmettitori coinvolti in questo tipo di abituazione sono la serotonina, l'acetilcolina, la dopamina e il glutammato.

Attualmente si sta cercando di definire quali geni siano direttamente o indirettamente coinvolti in tale tipo di abituazione.

LA SENSIBILIZZAZIONE

La sensibilizzazione è il processo mediante il quale un animale apprende ad aumentare una data risposta riflessa in seguito ad uno stimolo nocivo.

LO STUDIO DEL COMPORAMENTO

OPEN FIELD BEHAVIOR.

Uno dei test più comunemente usati nello studio del comportamento murino è l'open field test.

Questo test comporta l'osservazione e la misurazione del comportamento dei topi introdotti in una gabbia nuova, vuota e pulita, avente pareti trasparenti e illuminata dalla quale l'animale non può scappare e per questi motivi il test induce loro una certa ansia.

Con questo test si può analizzare qualitativamente e quantitativamente il comportamento esploratorio e motorio degli individui focali.

I topi all'interno di un open-field, manifestano dei comportamenti abbastanza spontanei e questo vuol dire che l'ambiente nel quale vengono introdotti gli animali è simile a quello al quale sono evolutivamente adattati.

Brothell (1981) ci fa notare che i topi in ambiente antropizzato per esempio, tendono ad esplorare le nostre case e perfino i mobili.

Clark B.J. Et al. Hanno trovato che in un ambiente nuovo chiuso da pareti un topo tende ad esplorare lo spazio partendo da un angolo e mantenendosi inizialmente vicino le pareti e cerca dei punti di riferimento tattili e visivi.



Anche se il comportamento esploratorio in open field non differisce sostanzialmente da quello naturale, non bisogna dimenticare alcune importanti differenze.

I topi vengono introdotti nella gabbia sperimentale da una persona; l'ambiente è vuoto.

Le precedenti considerazioni m'inducono ad auspicare altri esperimenti nei quali i topi da una home cage possano spontaneamente passare ad esplorare un open field.



METODO DI LAVORO

- Norme di registrazione e di campionamento

Registrazione e campionamento

- Abbiamo utilizzato una registrazione continua (registrazione di tutte le occorrenze)
 - Ho utilizzato un campionamento focale (osservazione dell'individuo focale per l'intera sessione e registrazione di tutte le occorrenze di un comportamento alla volta).
-

OPEN FIELD

.Gli animali sono stati osservati in un' arena di 50cm x 50 cm con pareti trasparenti per la durata di 5 minuti.

Le osservazioni preliminari condotte in questo test di attività spontanea mi hanno consentito di scrivere l'etogramma degli esemplari.

Open field



Irenaus Eibl-Eibesfeldt ne “I FONDAMENTI DELL’ETOLOGIA”, ci ricorda che ogni ricerca comincia con la descrizione e la classificazione dei fenomeni che si propone di studiare.

Bisogna allora, compilare il catalogo minuzioso di tutti i moduli comportamentali dell’animale.

I moduli comportamentali sono unità funzionali costanti nella forma e facili a individuarsi.

L'ETOGRAMMA

Si definisce etogramma il catalogo di descrizioni dei moduli comportamentali distinti e specie-specifici che formano il repertorio comportamentale di base di una specie.

Per studiare l'etogramma di base abbiamo utilizzato un topo albino maschio adulto e lo abbiamo osservato in differenti tipi di home-cage, semplici ed arricchite.

STUDIO DELLE POSTURE.

**SI POGGIA SUI 4 ARTI:- con la colonna tesa e
ventre al suolo o sollevato.**

-postura raccolta con la colonna arcuata.

**-poggia gli arti anteriori ad un sostegno in
modo da assumere una postura semieretta o
eretta.**



SI POGGIA SU 3 ARTI:

Postura raccolta:



Postura semieretta:



Postura eretta:



IL TOPO SI POGGIA SU 2 ARTI.

Postura raccolta:



Postura semieretta:



Postura eretta:



POSTURE DURANTE IL COMPORTAMENTO ALIMENTARE.



POSTURE DURANTE IL COMPORTAMENTO LOCOMOTORIO ORIZZONTALE.

Cammina:



Svolta:



POSTURE DURANTE IL COMPORTAMENTO LOCOMOTORIO VERTICALE.

Rearing su 4 arti:



r. su 3 arti:



r. su 2 arti:



SALTA.



ETOGRAMMA

Le categorie comportamentali descritte in base alla loro struttura, cioè in base agli atteggiamenti ed ai movimenti del soggetto sono:

1 Immobile-sniff: l'animale sta al suolo muovendo solo il capo e le vibrisse.

2 Walk-sniff: l'animale cammina esplorando.

3 corner crossing: svolta.

4 Rearing: l'animale si solleva sugli arti posteriori al centro del perimetro oppure vicino una parete, nel qual caso può poggiare uno o entrambi gli arti anteriori alla parete. Durante il rearing l'animale può apparire immobile, oppure mostrare evidenti movimenti del capo, delle vibrisse o degli arti anteriori. Il rearing può essere considerato un evento o uno stato in dipendenza dalla sua durata.

5 salta.

6 Leaning-posture: l'animale sta seduto.

7 Freezing: postura immobile.

8 Self-grooming: l'animale si lecca il pelo direttamente, tramite gli arti anteriori o si pulisce le vibrisse. Si l'ano, i genitali, la coda. Si gratta.

ATTIVITA' SPONTANEA IN HOME-CAGE DEI TOPI C57BL/6

I nostri topi sono stati ottenuti da topi C57BL/6 .

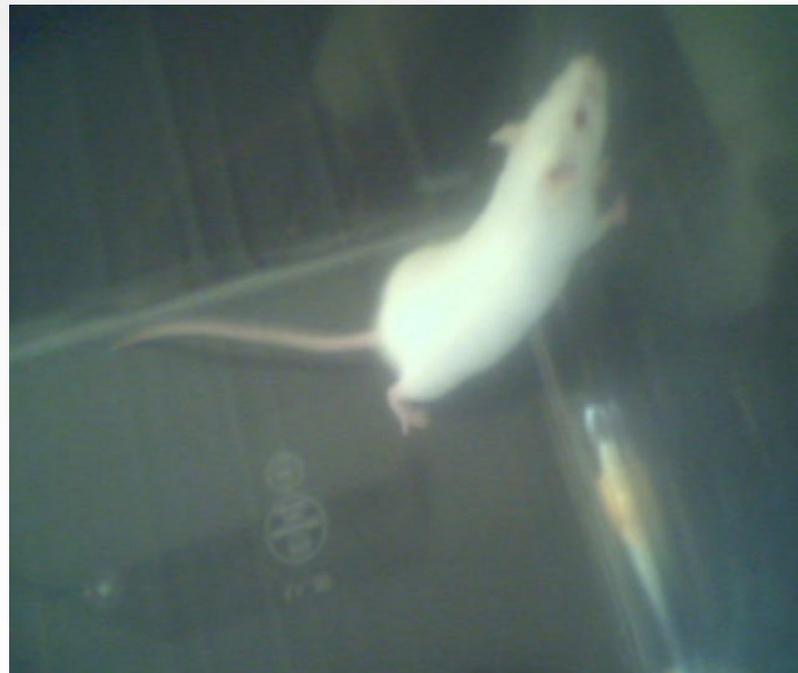
J. Umemori ha trovato che i topi C57BL/6J sono relativamente ipoattivi nella home-cage, se paragonati ad altre linee.

L'autore ci ricorda come sia ormai noto il coinvolgimento delle connessioni dopamminergiche nei gangli basali del cervello, nei movimenti e le attività locomotorie spontanee.

STUDIO PRELIMINARE DELL'ATTIVITA' LOCOMOTORIA VERTICALE.

- REARINGS

Mouse rearing in open field.



STUDIO APPROFONDITO DEI REARINGS.

A ben guardare ci si accorge che durante i r. alle pareti il topo può poggiarsi quasi interamente ad essa.

Inoltre durante alcuni r. il topo può restare seduto.



QUESTA POSTURA SI PUO' OSSERVARE ANCHE AGLI ANGOLI DELLE PARETI INTERNE DEL LAT MAZE. IN ESSA IL TOPO EFFETTUA IL REARING POGGIANDO UNA SOLA DELLE ZAMPE ANTERIORI ALLA PARETE E SPORGE IL CAPO E L'ALTRA ZAMPA OLTRE LO SPIGOLO.



Rearing con il corpo in posizione obliqua.

Se si fornisce al topo uno “scalino” sul quale poter salire, esso lo utilizzerà per esplorare più in alto e se poi lo scalino è posto vicino una parete, l’animale effettuerà dei r. anche in posizione obliqua .



Solleva il capo verso l'alto



POSTURA SU TRE ARTI PRIMA DI EFFETTUARE UN REARING



STUDIO DELLA FUNZIONE DEI REARINGS.

ESCE DALLA TANA IN REARING





Il r. è anche un atto locomotorio durante deambulazione sulla ruota.



R. durante Il comportamento alimentare



**REARING PER CERCARE
DI RAGGIUNGERE IL CIBO**



**CERCA DI RAGGIUNGERE LA GRATA.
UN ARTO ANTERIORE è TESO E
POGGIATO ALLA PARETE, L'ALTRO
è RACCOLTO.**

**SI TENDE ANCORA DI
PIÙ**





TIPI DI MISURE.

Ho misurato:

Il numero di rearings durante la seduta di osservazione

la frequenza dei rearings durante la seduta di osservazione, cioè il numero totale delle occorrenze del comportamento nel tempo di osservazione,

la durata totale dei rearings, cioè il tempo totale trascorso in quel comportamento durante la seduta d'osservazione;

la durata media dei rearings, cioè la durata totale diviso il numero delle occorrenze.

rearings in open field.

$n=3+\backslash-$ $n=3-\backslash-$

r.	in	o. p.	Prel.						
Topi k.o.	2	4	6	media					
n. r.	64	69	63	65					
d.	179	236	63	150					
d. m.	3	3	1	2					
f.	0.6	0.8	0.2	0,5					
Topi etero.	1	3	5						
n. r.	84	77	77	79					
d.	95	77	77	83					
d.m.	1	1	1	1					
f.	0.3	0.3	0.3	0.3					

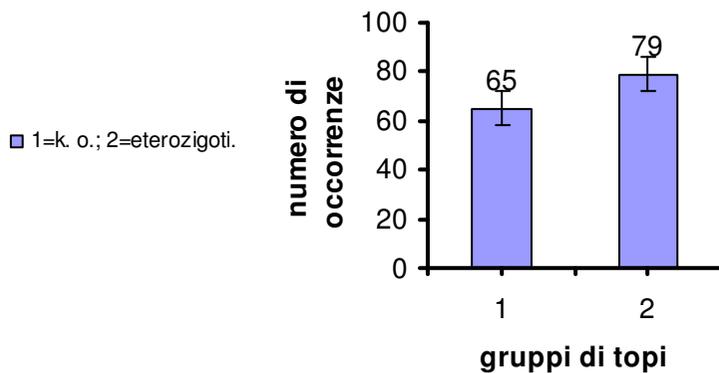
rearings in open field.

$$n=3+\ \ - \ n=3-\ \ -$$

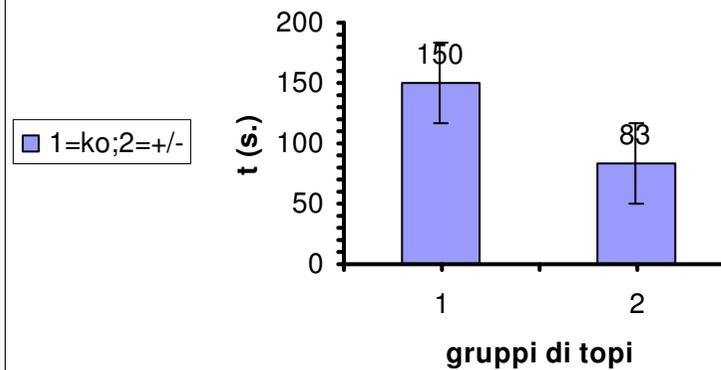
I dati mostrano una maggiore omogeneità di comportamento tra i topi eterozigoti che trascorrono la stessa percentuale di tempo in eventi ($d.m.=1$) di r. ($f.=0.3$).

I topi K.O. manifestano comportamenti più eterogenei, effettuano un numero minore di r. (65 contro 79), ma molti di essi sono stati ($d.m.=2$) e per questo motivo la percentuale di t. che trascorrono nel comportamento studiato, risulta maggiore.

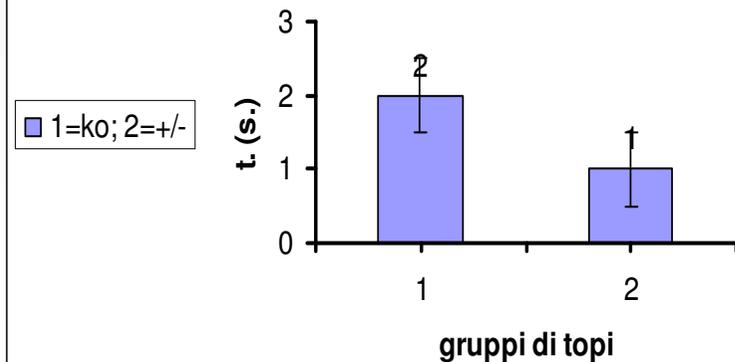
n r in o p durante l'osservazione preliminare



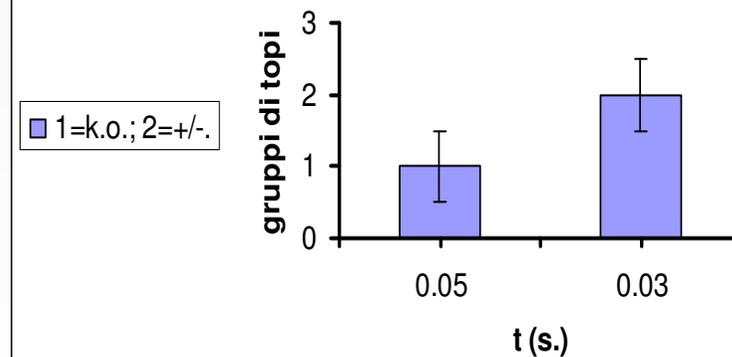
durate del n di r in o p durante l'osservazione preliminare



durata media del n. di r. in o. f. durante l'osservazione preliminare.



percentuale di t. trascorso in r. in o. f. durante l'osservazione preliminare.



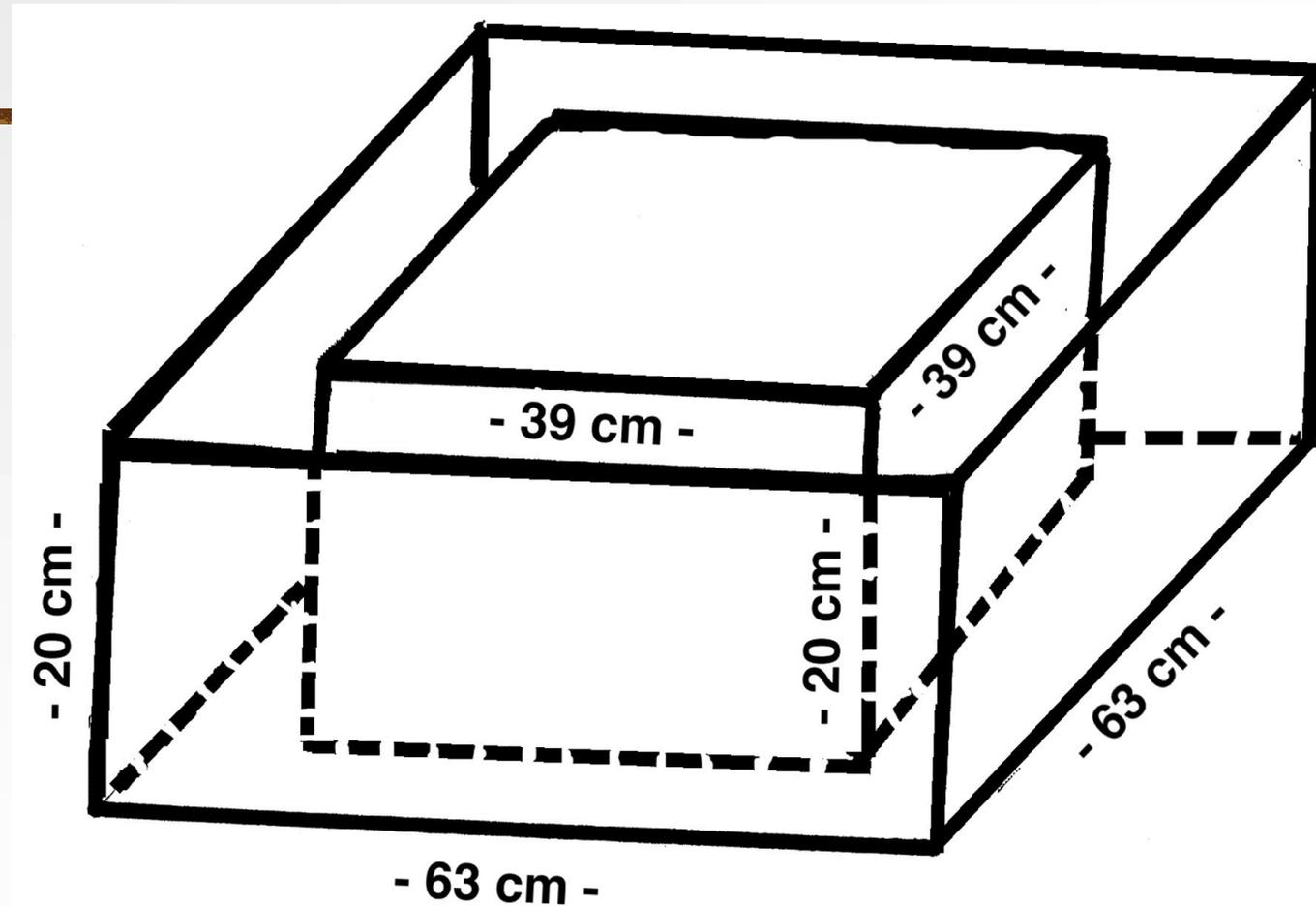
LAT MAZE

Il lat maze è un apparato costruito in modo tale da consentire all'animale di muoversi solo all'interno di un corridoio limitato da pareti alte e lisce .

Il corridoio descrive un percorso quadrangolare.

All'interno di un tale labirinto i comportamenti che si possono osservare si restringono. Aumenta l'attività locomotoria probabilmente tesa, dopo una iniziale esplorazione, a trovare il modo di uscirne

LAT MAZE

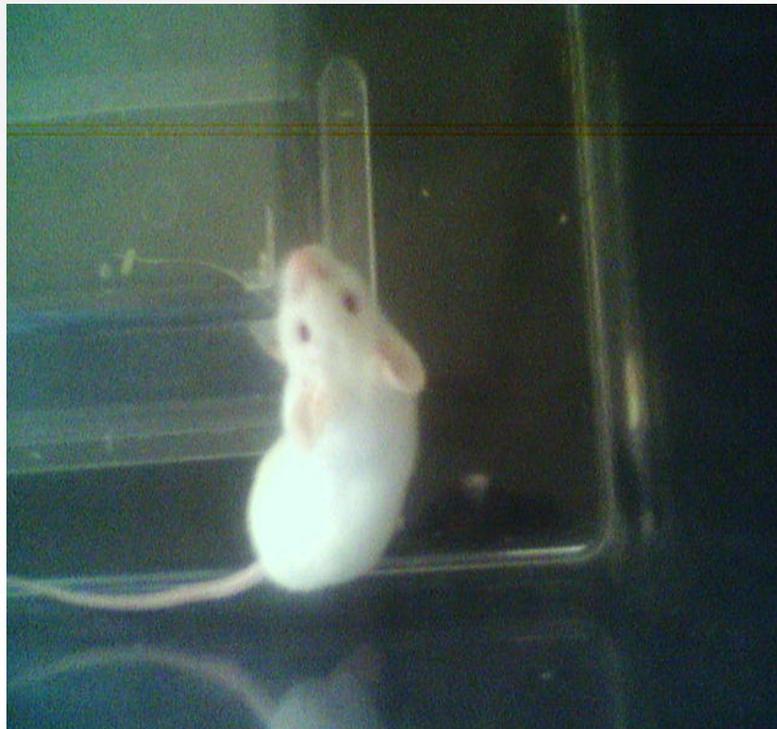


Griesbach, Grace S. and Amsel, Abram (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11435-11439

ATTIVITA' LOCOMOTORIA VERTICALE IN LAT MAZE.

Studio dei rearings

REARING NEL LAT MAZE . IL TOPO POSA ENTRAMBE LE ZAMPE AD UN ANGOLO DELLE PARETE INTERNE DELLA GABBIA SPERIMENTALE.



r.	in	l. m.	l	Esp.						
Topi +/-	1	3	5	7	9	11	12	media		
n.r.	49	85	50	54	51	42	41	53		
d.(s.)	78	120	85	156	103	65	67	96		
d.m. (s.)	2	1	2	3	2	2	2	2		
f. (s.)	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0,2		

Tra i 7 topi eterozigoti osservati distinguiamo 3 gruppi:

2 topi che effettuano meno r. (n=41; 42) di d.m. 2s.; 4 topi che fanno un numero medio di r. (n. =49;50;51;54.) con d. m. 2s. ;1 topo che ne fa molti (85), ma con d.m. 1 s.

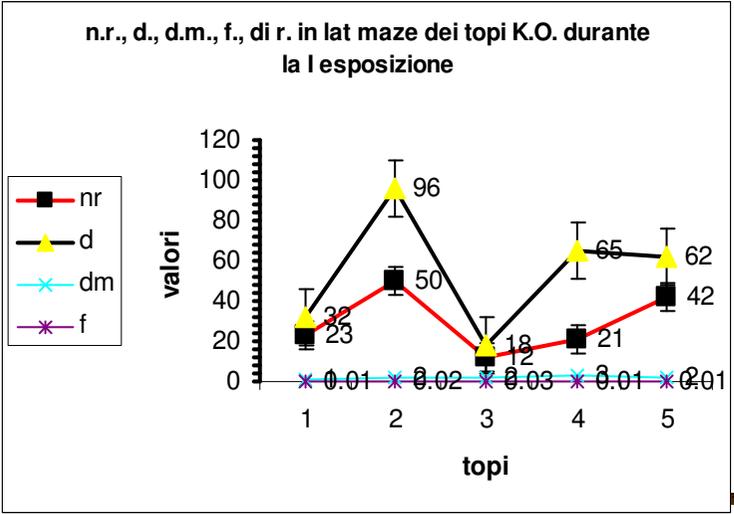
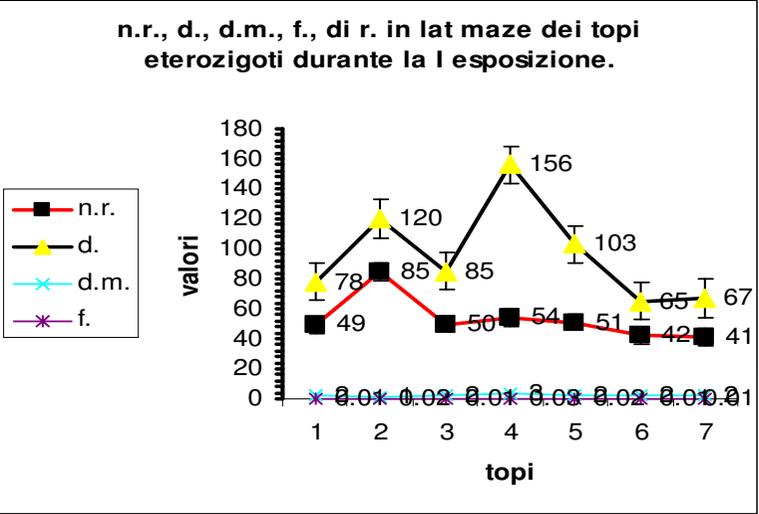
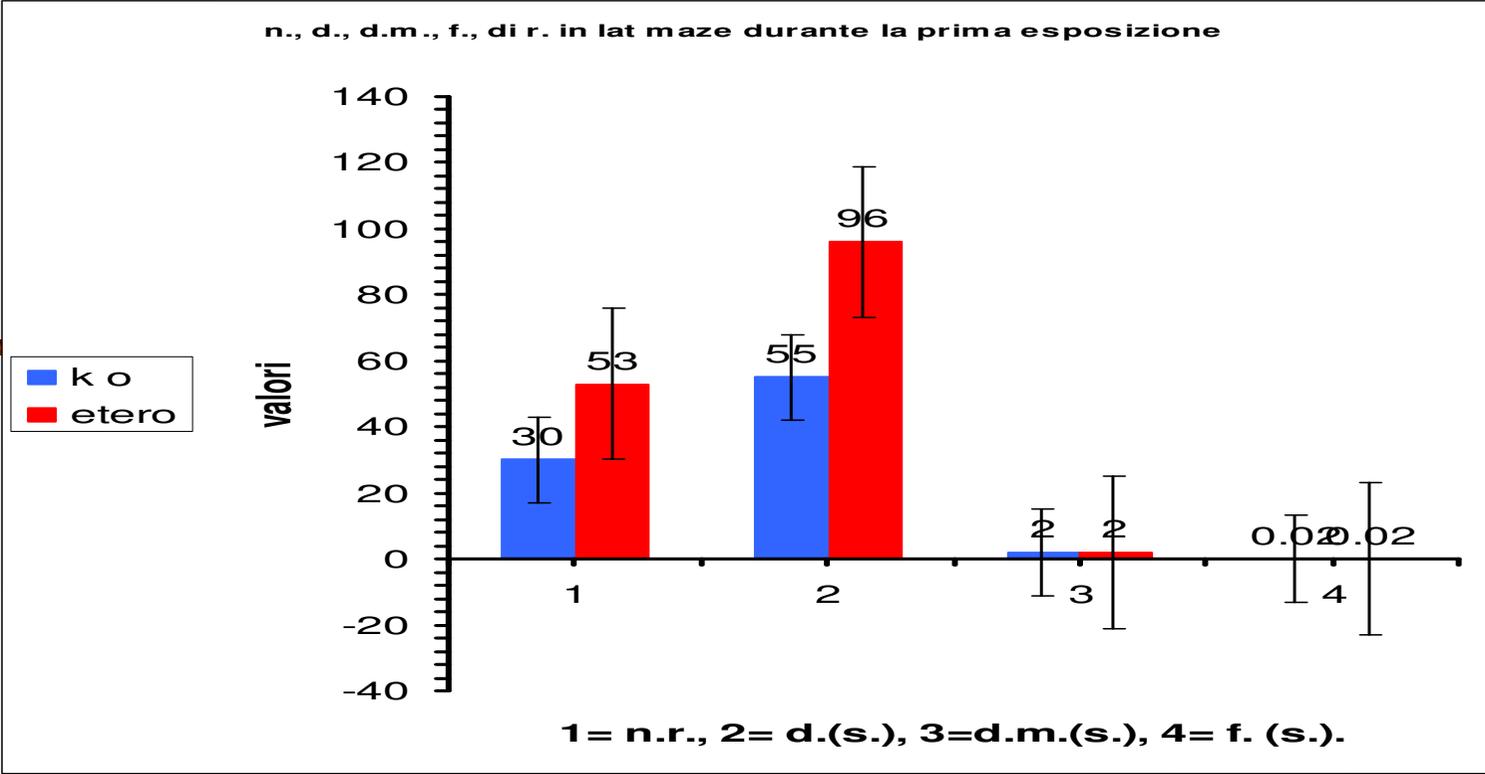
Un solo topo del secondo gruppo ha manifestato dei r. molto lunghi (d. m.=3.).

r.	in	l. m.	l	Esp.		
Topi k.o.	2	4	6	8	10	media
n.	23	50	12	21	42	30
d. (s.)	32	96	18	65	62	55
d. m. (s.)	1	2	2	3	2	2
f. (s.)	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2

I topi K.O. sono più eterogenei rispetto al n. di r. effettuati.

Il topo che effettua i r. più lunghi non è quello che ne fa di meno e quello che li fa più brevi non è quello che ne fa di più.

Le considerazioni fatte dimostrano che anche se confrontando i valori medi sembra che non ci siano grandi differenze tra i comportamenti degli eterozigoti ed i K.O. (d.m.=2/2; f.=0.2/0.2), tranne che per il n. più alto negli eterozigoti (53 contro 30), in realtà il comportamento è alterato nei K.O.



ABITUAZIONE

L'abituazione consiste in una diminuzione della risposta comportamentale in seguito alla presentazione ripetuta di uno stesso stimolo iniziale non nocivo e nuovo.

L'abituazione consiste nell'imparare a riconoscere e ad ignorare gli stimoli che hanno perso il carattere di novità o di significato.

L'abituazione ha spesso un ruolo in forme di apprendimento più complesse, che includono non solo l'acquisizione di nuove risposte, ma anche la soppressione di risposte inadeguate (E. Kandel 1979).

L'ABITUAZIONE DEI RODITORI.

In una review del 2006 Leussis e Bolivar raccolgono gran parte dei risultati relativi all'abituazione nei roditori.

Le autrici ci ricordano che il fenomeno dell'abituazione nei roditori è stato studiato essenzialmente nella forma di abituazione ad un nuovo ambiente e quindi è stata definita come un cambiamento dell'esplorazione o dell'attività locomotoria nel tempo, nel corso di una sessione di esposizione o nel corso di successive sessioni.

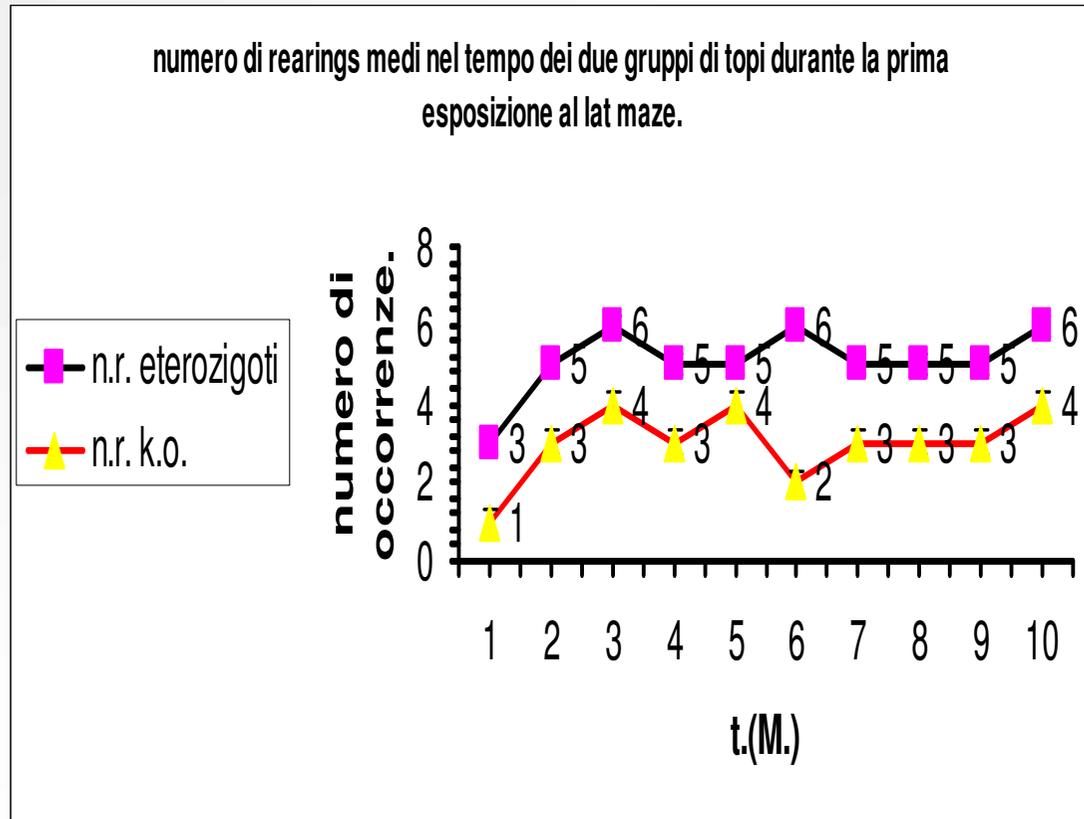
I neurotrasmettitori coinvolti in questo tipo di abituazione sono la serotonina, l'acetilcolina, la dopamina e il glutammato.

Attualmente si sta cercando di definire quali geni siano direttamente o indirettamente coinvolti in tale tipo di abituazione.

ABITUAZIONE INTRASESSIONE

Confrontando
l'andamento medio
del numero di r. nel
t., ci accorgiamo che
entrambi i gruppi si
abituano al lat maze
dopo 3 minuti di
esplorazione.

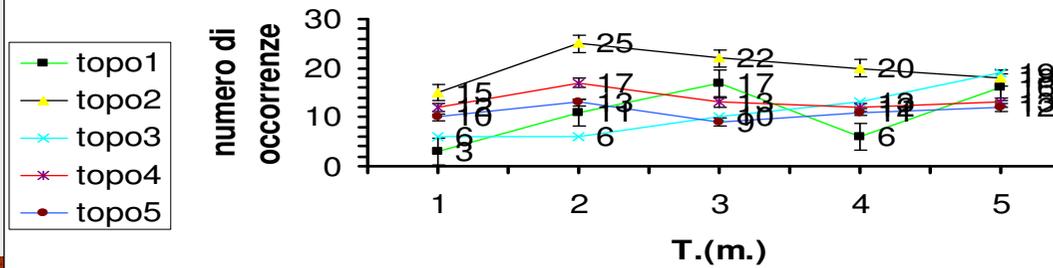
Le 2 curve mostrano
lo stesso andamento
tranne il sesto
minuto.



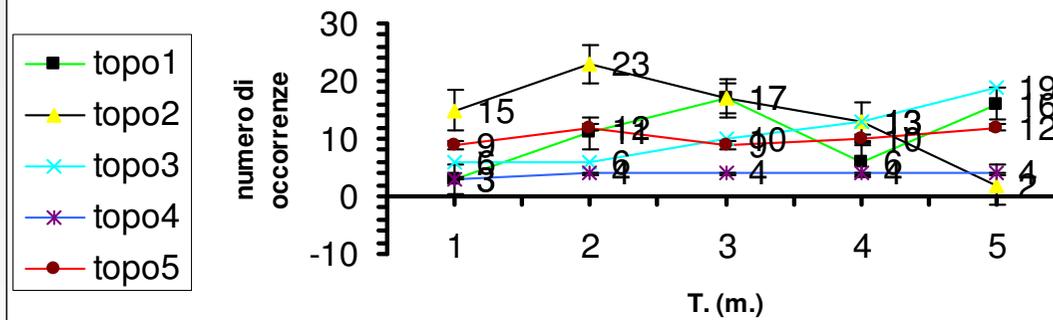
II ESPOSIZIONE

R	in	la	maze	H	esp	KO					
TOPO3	T	1	2	3	4	5	tot	medi	Perc.		
eventi		3	11	17	6	16	53	11	0.2		
stati		0	0	0	0	0	0				
D stati											
N r											
TOPO 6											
eventi		15	23	17	13	2	70	14			
stati		0	2	5	7	16	18	4	0.2		
D stati		0	4	12	23	55	94	5			
N r		15	25	22	20	18	100	20			
D tot		15	27	2	36	57	164	9			
Topo 9				9							
Eventi		6	6	10	13	19	54	11			
stati		0	0	0	0	0	0	0			
D stati		0	0	0	0	0	0	0			
N r		6	6	10	13	19	54	11			
D tot		6	6	10	13	19	54	1	0.2		
Topo 10											
Eventi		3	4	4	4	4	19	4			
stati		9	13	9	8	9	48	10			
D stati		42	39	47	47	45	22	5			
N r		12	17	13	12	13	67	13			
D tot		45	43	51	51	49	23	4	0.8		
TOPO 11							9				
Eventi		9	12	9	10	12	52	10			
stati		1	1	0	1	0	3	0.6			
D stati		2	2	0	2	0	6	2			
N r		10	13	9	11	12	55	11			
D tot		11	14	9	12	12	58	1	0.2		

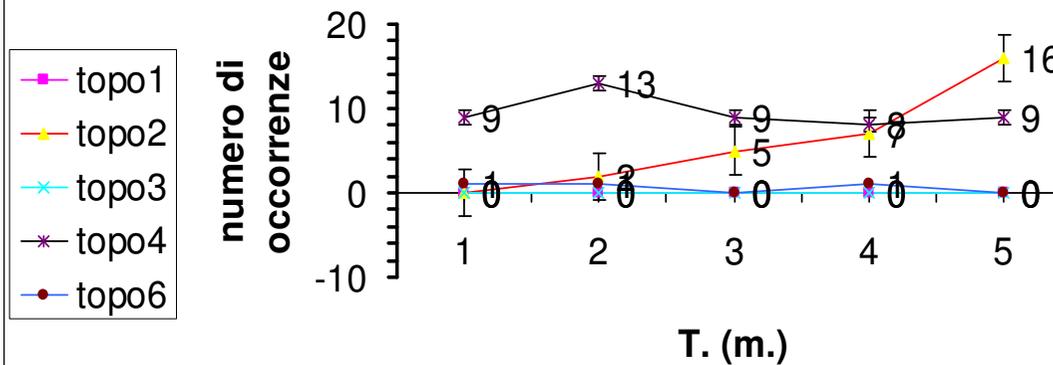
andamento del numero di rearings in funzione del tempo dei topi k. o. nel lat maze durante la II esposizione



andamento del numero di eventi di rearings in funzione del tempo dei topi K.O. nel lat maze durante la II esposizione.



andamento del numero di stati di rearings nel tempo dei topi k.o. nel lat maze durante la II esposizione.



I topi K.O. si abituano al l.m., durante la II esposizione, dopo 2 minuti, infatti la curva relativa al **n. di r.** cambia andamento.

Questo dato dimostra che l'apprendimento spaziale è stato memorizzato a lungo termine, infatti si abituano un minuto prima rispetto alla I esposizione.

Il cambiamento consiste in una diminuzione del numero di r. per 3 topi ed in un aumento per uno di essi.

Un solo topo mantiene un numero di r. costante per l'intera sessione.

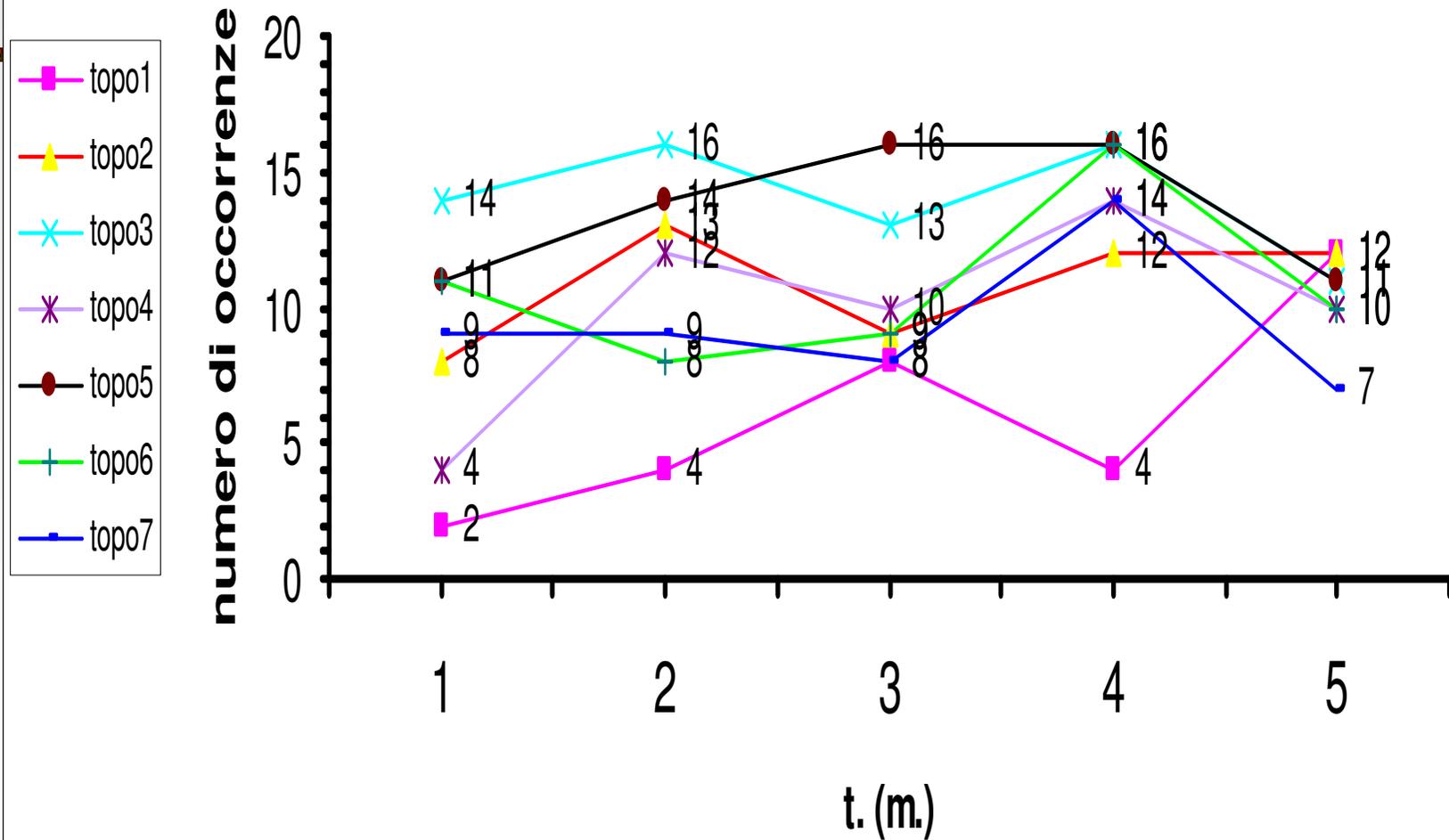
Le curve relative al **numero di eventi di r.** coincidono come andamento con quelle del n. di r. totali per tutti i topi K.O. durante la II esposizione tranne uno di essi che dopo il secondo minuto continua ad aumentare il n. di occorrenze.

Il **numero di stati di r.** in lat maze effettuati dai topi K.O. Durante la II esposizione sono la misura che varia di più.

Un topo non resta mai in r. più di 1s. Per l'intera sessione, un altro ne fa un numero costante, un altro ne aumenta il numero per l'intera sessione con un brusco aumento dopo il quarto minuto, un altro ne diminuisce il numero fino ad annullarli al terzo minuto e solo uno di essi ne aumenta il numero i primi 2 minuti e poi li diminuisce.

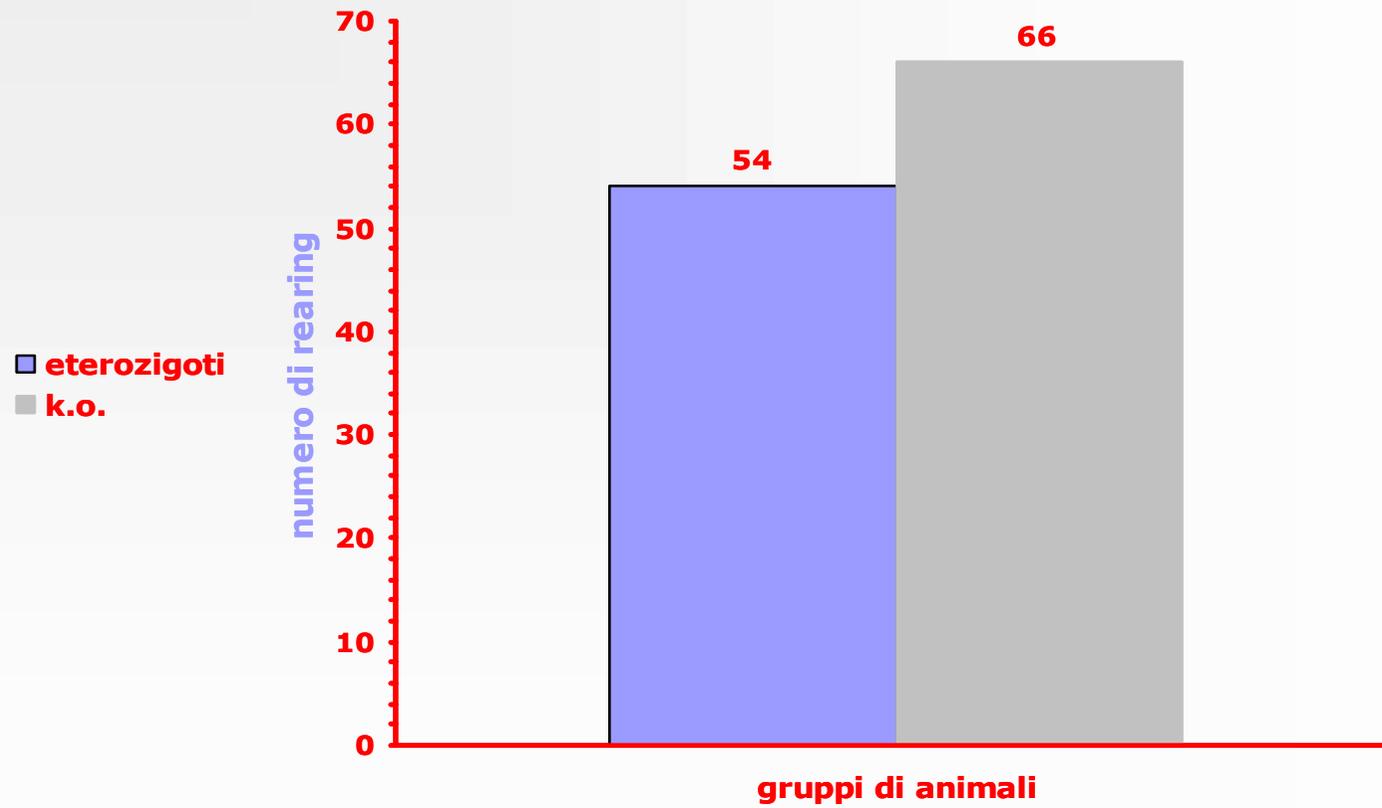
R.	IN	LAT	MAZE	TOPI	+/-	II	ESPOSIZIONE
T. (m.)	1	2	3	4	5	media	Tot.
Topo1							
n. ev.	2	4	8	4	12	6	30
n. stat.							0
Topo 2							
n. ev.	8	13	9	12	12	11	54
n. stat.							0
Topo 3							
n. ev.	14	15	13	15	11	14	68
n. stat.	0	2	0	1	0	0.6	3
n. r.	14	16	13	16	11	14	71
Topo 4							
n. ev.	4	12	10	14	9	9.8	49
n. stat.	0	0	0	0	1	0.2	1
n. r.	4	12	10	14	10	10	50
Topo5							
n. ev.	11	14	16	16	11	14	68
n. stat.							0
Topo6							
n. ev.	11	6	9	15	9	10	50
n. st.	0	4	0	2	2	1.6	8
n. r.	11	8	9	16	10	11	54
Topo7							
n.ev.	7	9	7	12	7	8	42
n. st.	2	0	1	2	0	1	5
n. r.	9	9	8	14	7	9.4	47

andamento del numero di r. in funzione del tempo dei topi eterozigoti in lat maze durante la II esposizione

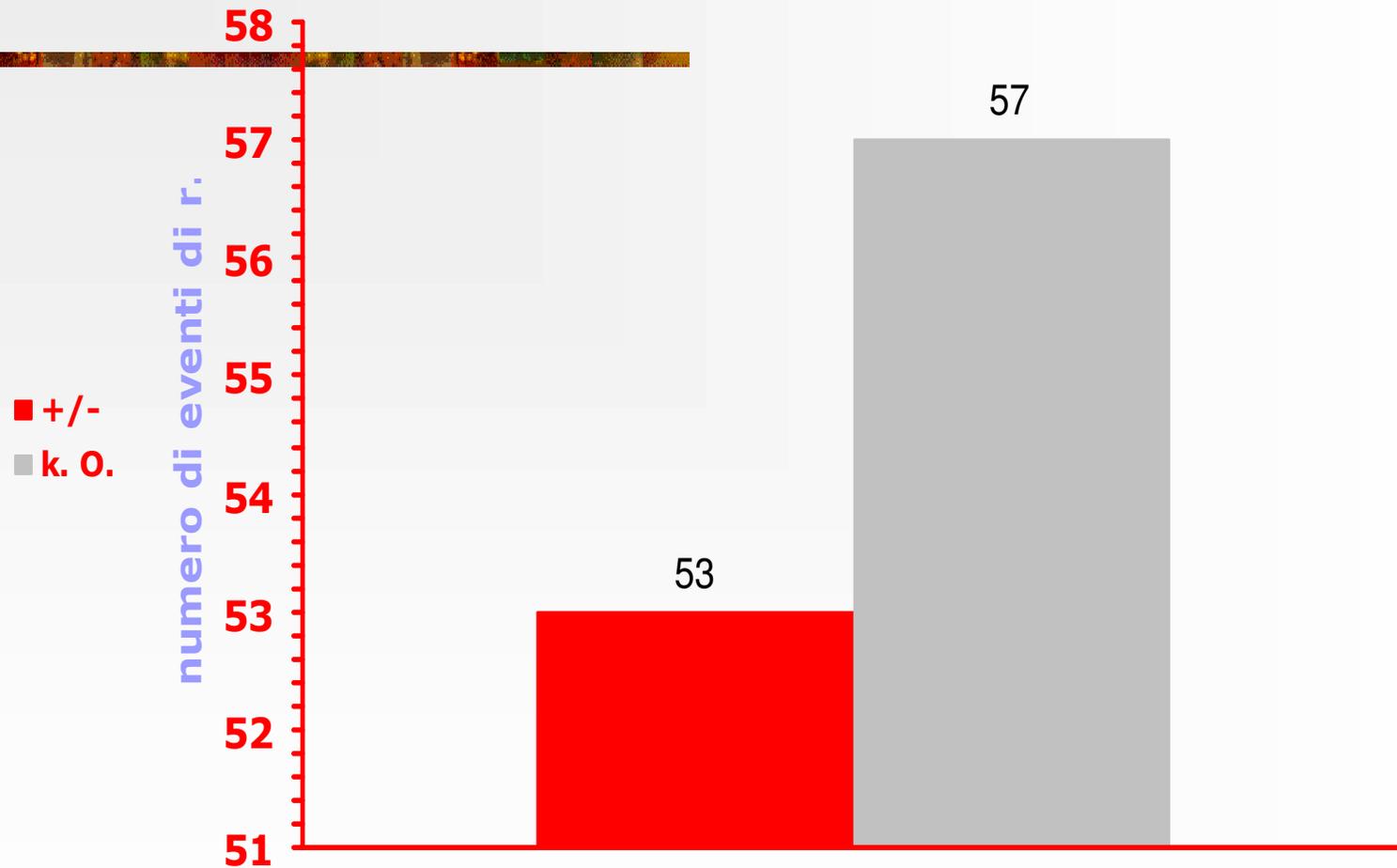


Anche i topi eterozigoti, tranne uno di essi, si abituano al
lat maze durante la II esposizione dopo 2 minuti.

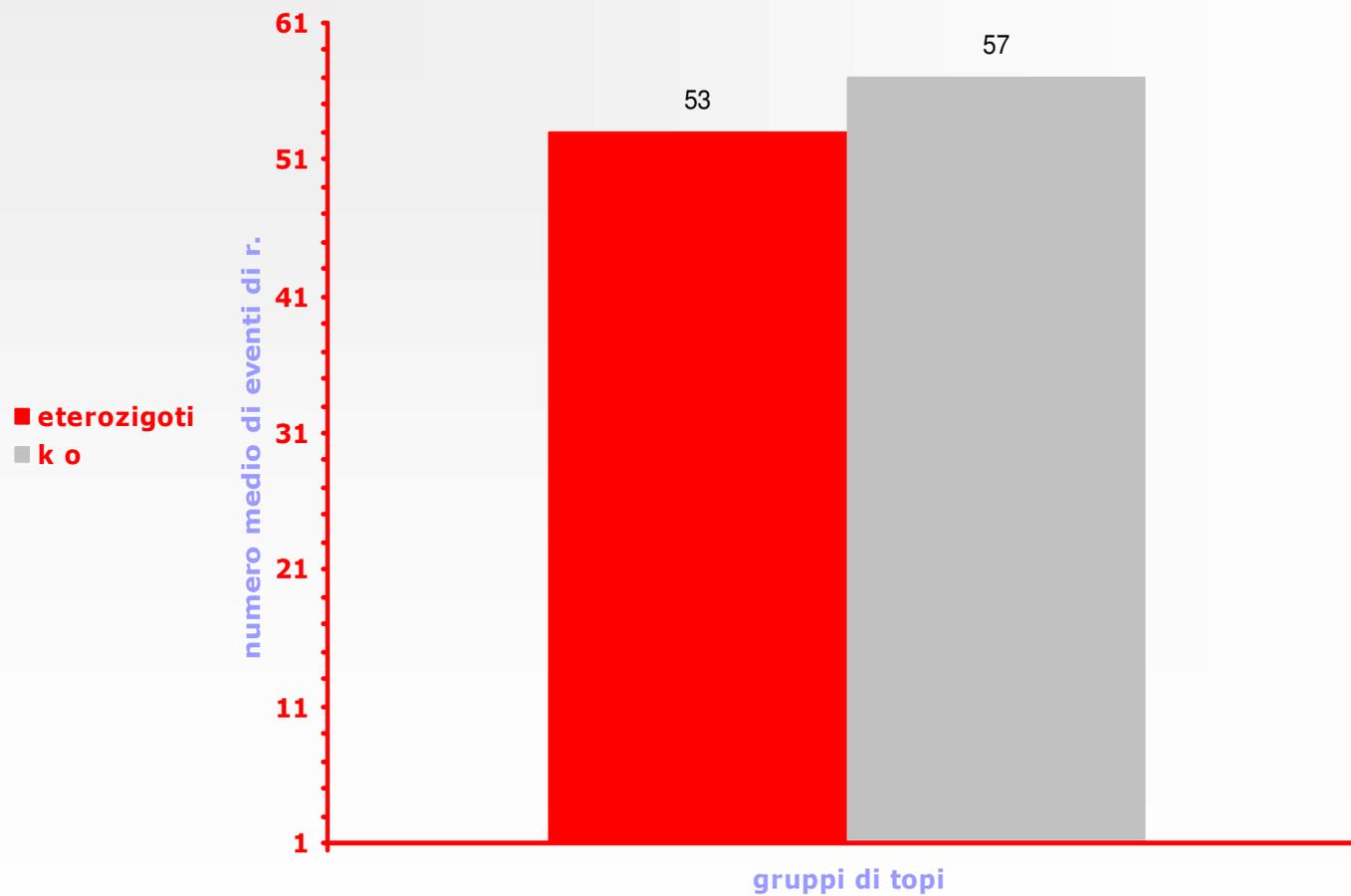
numero medio di rearing in lat maze durante la II esposizione



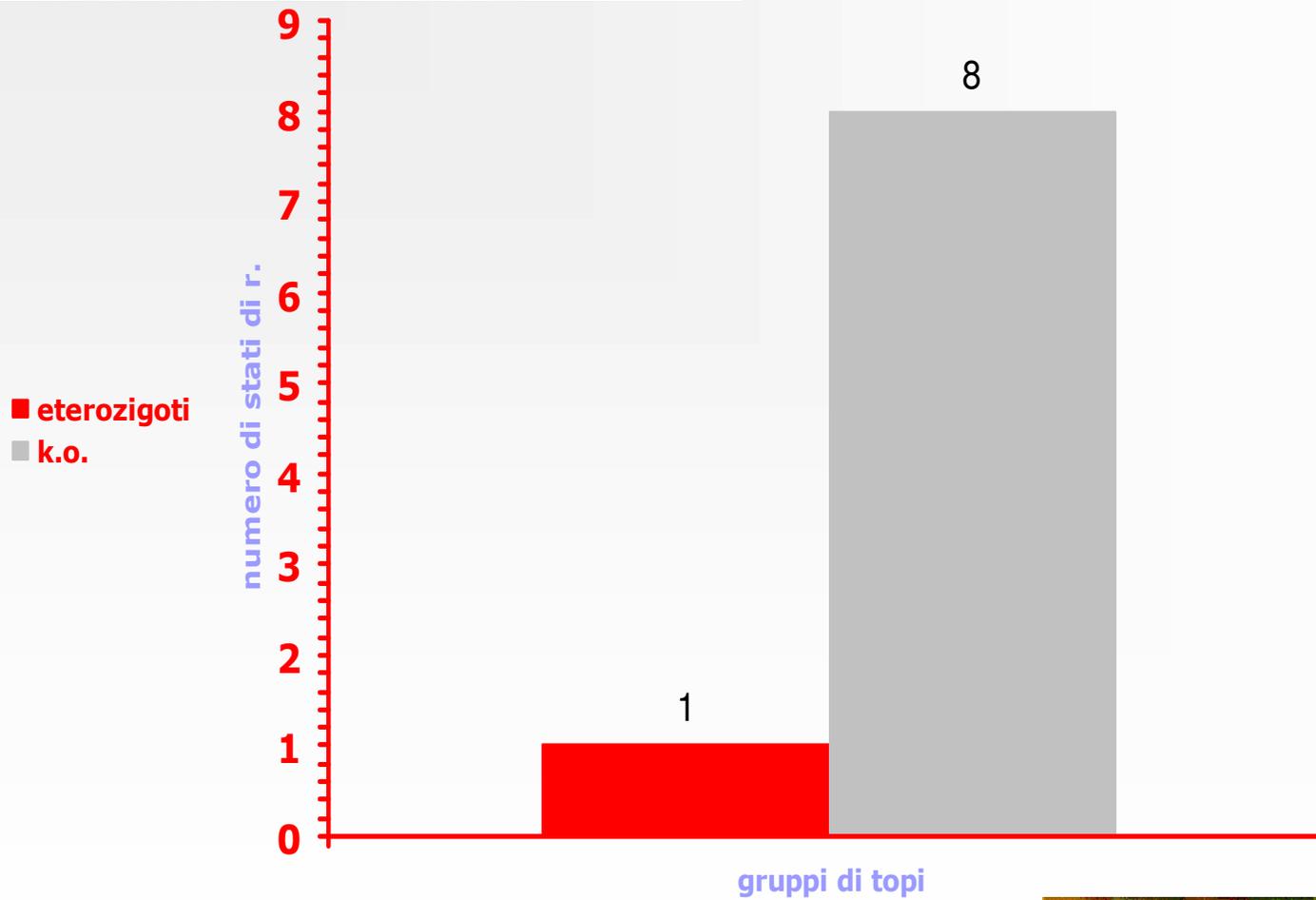
confronto tra il numero medio di r. nei 2 gruppi di topi



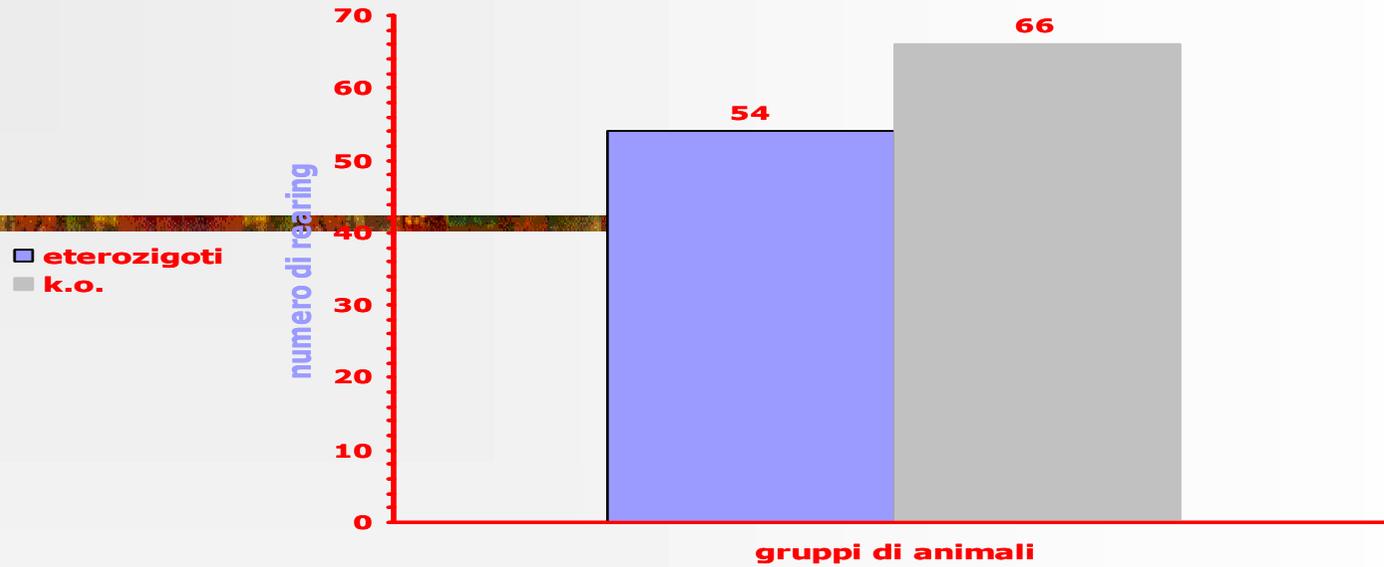
confronto tra il numero medio di eventi di rearing in lat maze dei 2 gruppi di animali durante la II esposizione



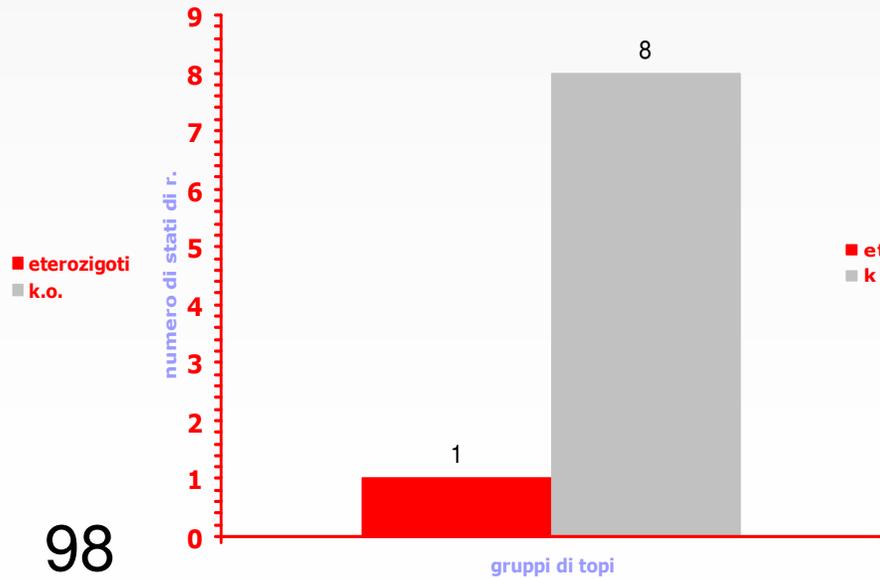
confronto tra il numero medio di stati di rearing inlat maze dei 2 gruppi di topi durante la seconda esposizione.



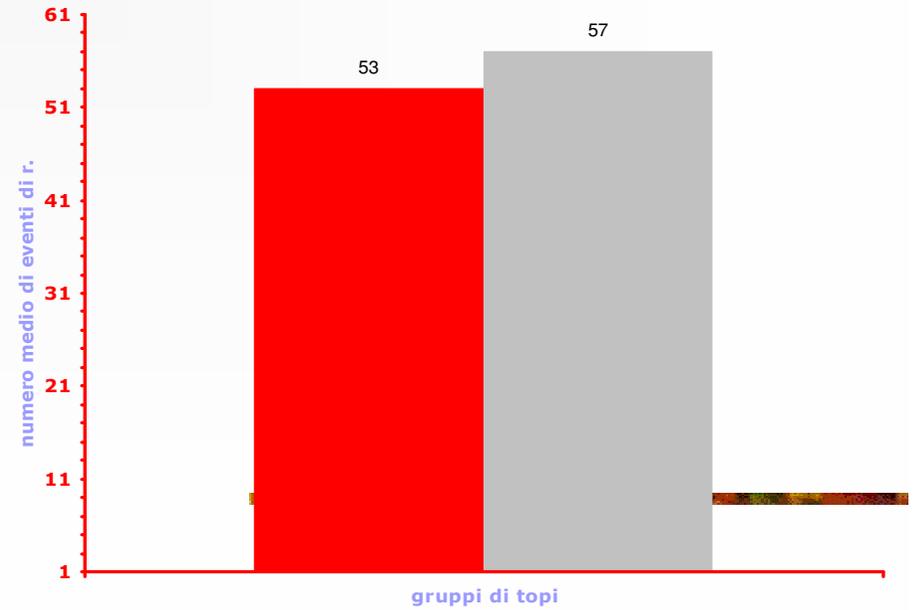
numero medio di rearing in lat maze durante la II esposizione



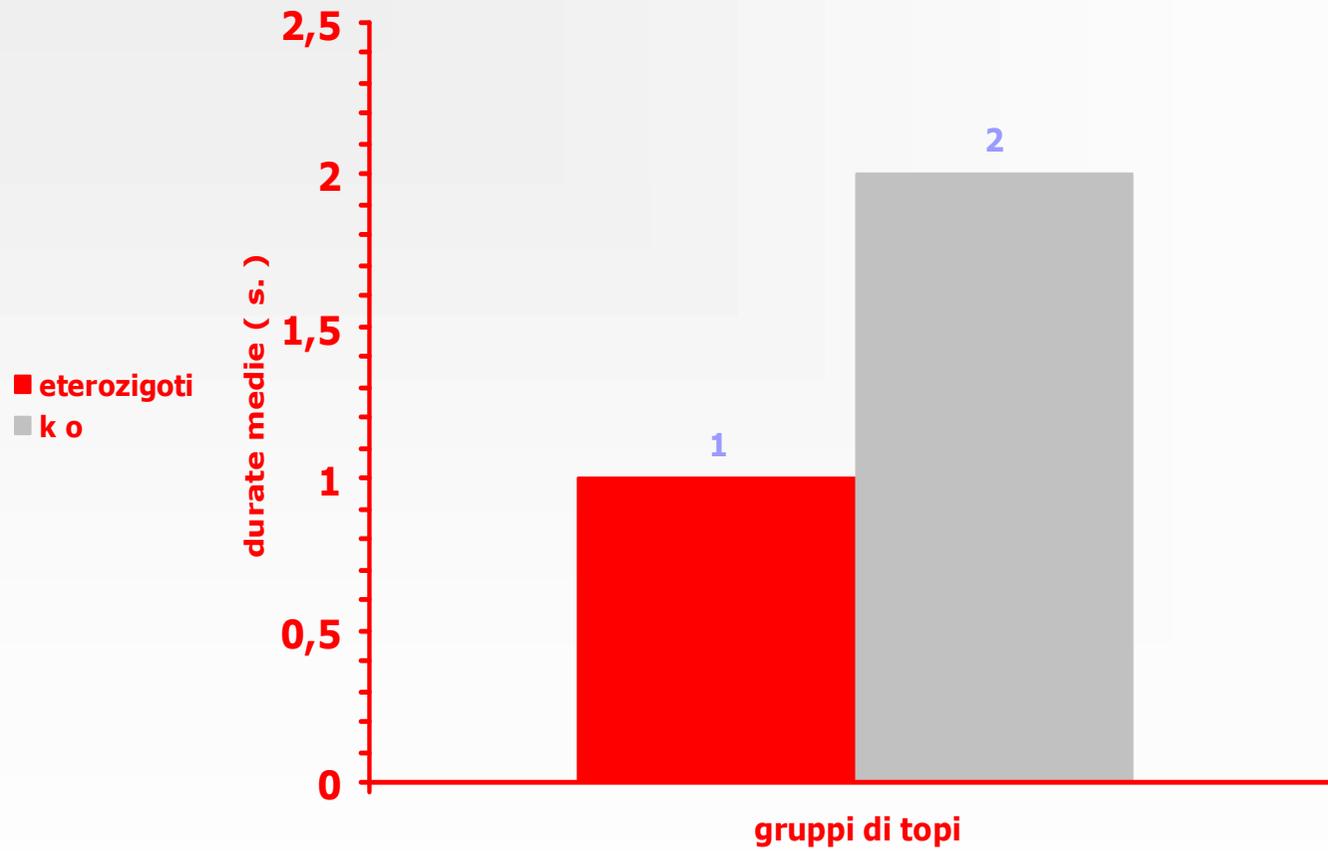
confronto tra il numero medio di stati di rearing in lat maze dei 2 gruppi di topi durante la seconda esposizione.



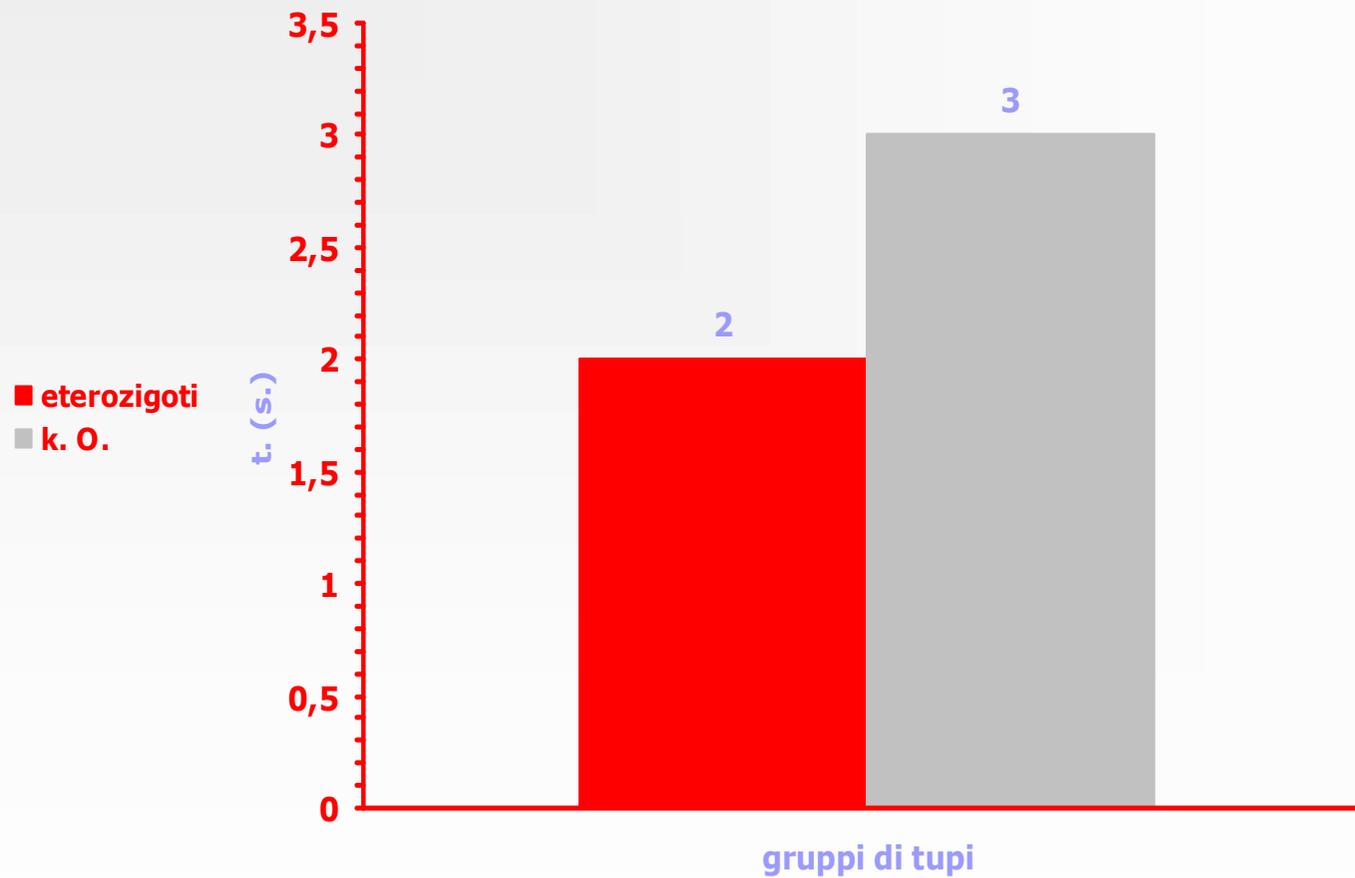
confronto tra il numero medio di eventi di rearing in lat maze dei 2 gruppi di animali durante la II esposizione



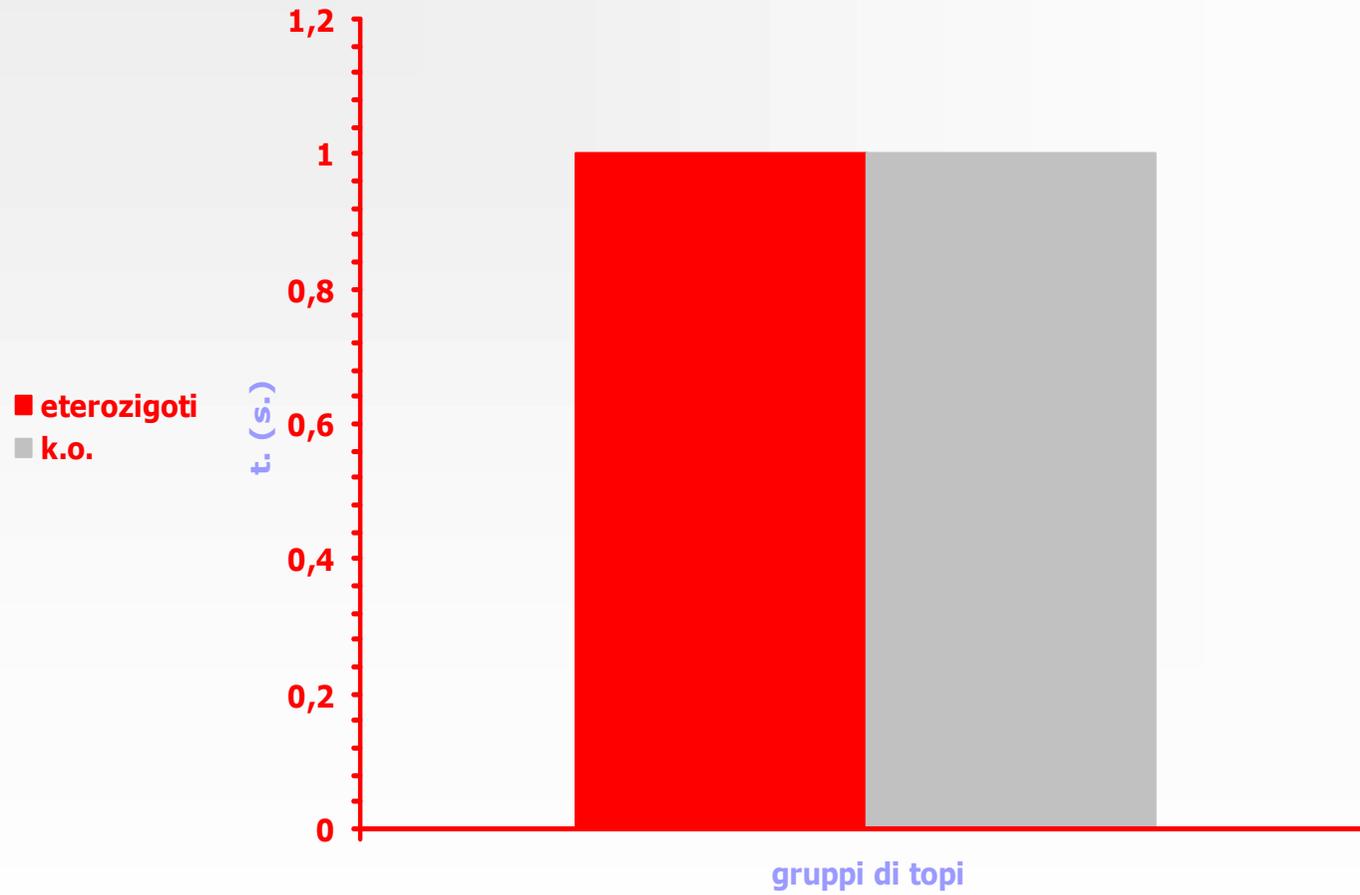
confronto tra la durata media degli stati di rearing dei 2 gruppi di topi in lat maze durante la II esposizione.



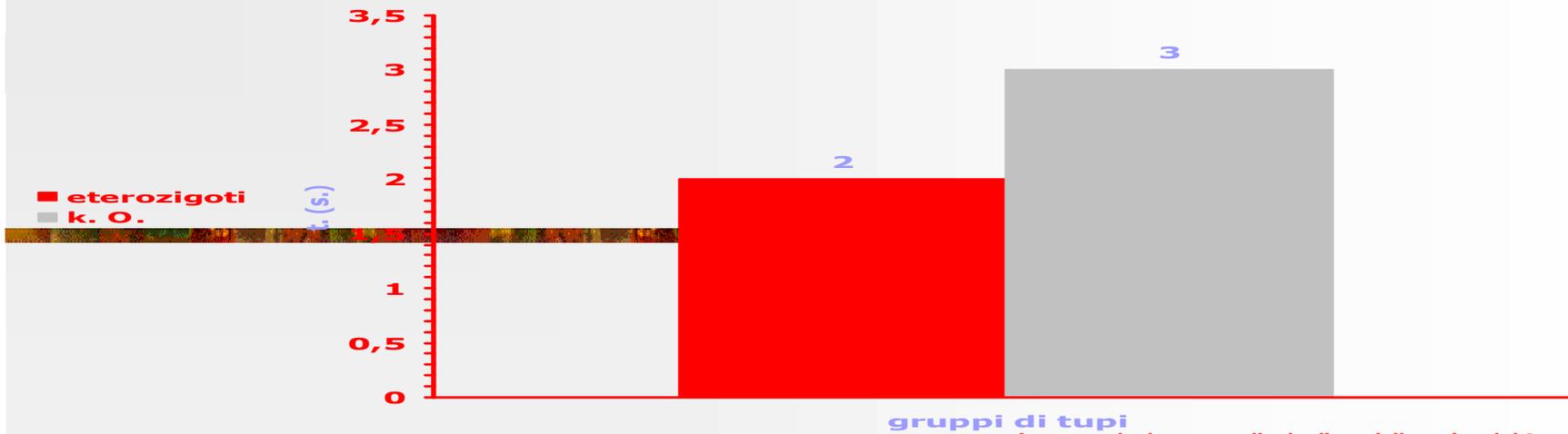
confronto tra la percentuale di tempo trascorso in rearing dai 2 gruppi topi durante la II esposizione al lat maze.



durate medie dei rearing in lat maze durante la II esposizione

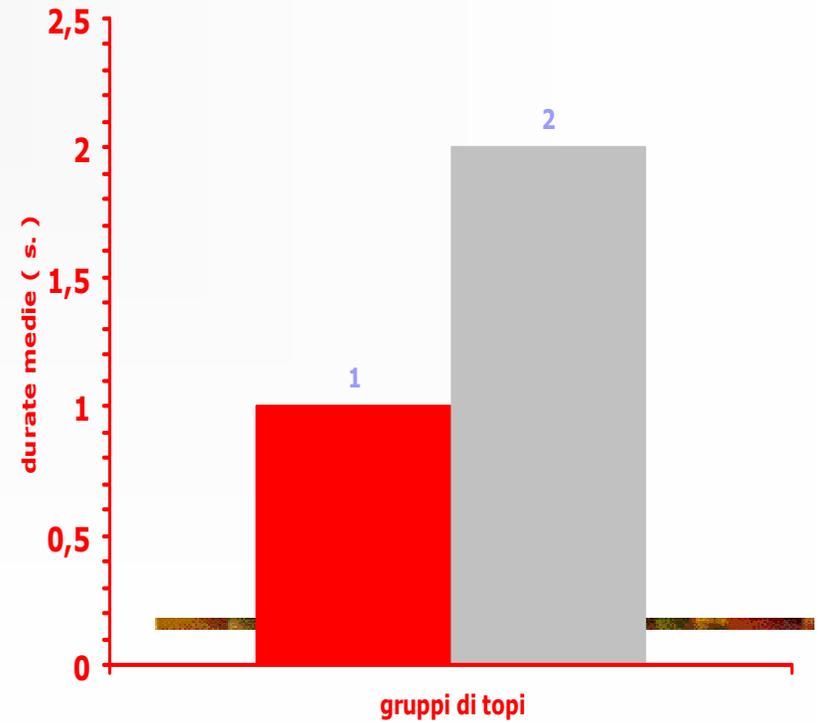
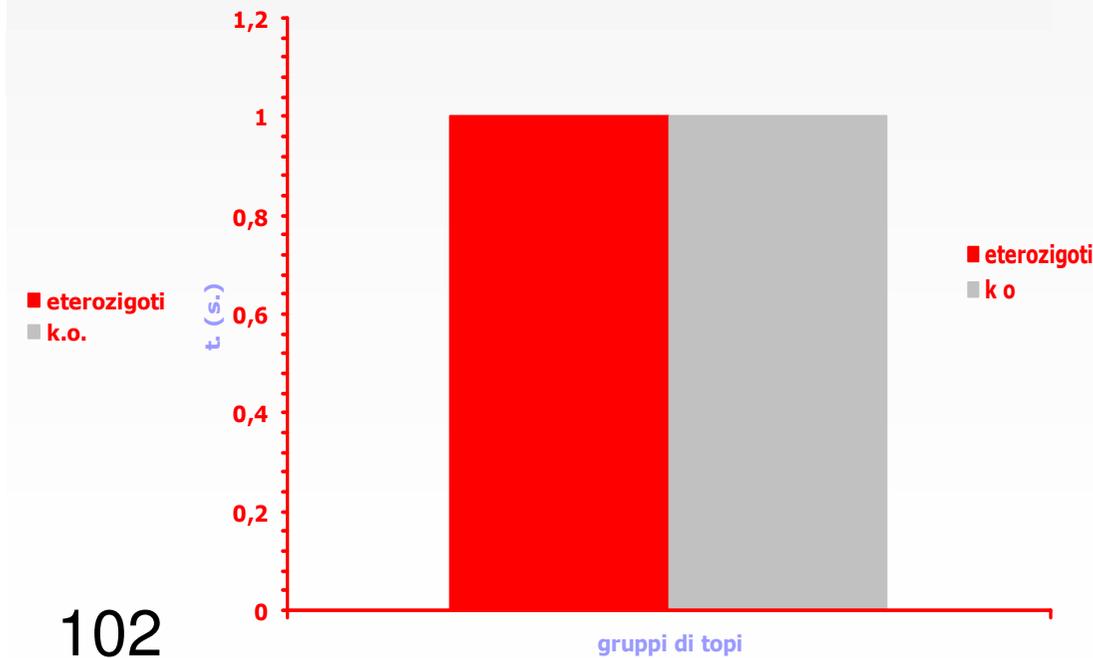


confronto tra la percentuale di tempo trascorso in rearing dai 2 gruppi topi durante la II esposizione al lat maze.



confronto tra la durata media degli stati di rearing dei 2 gruppi di topi in lat maze durante la II esposizione.

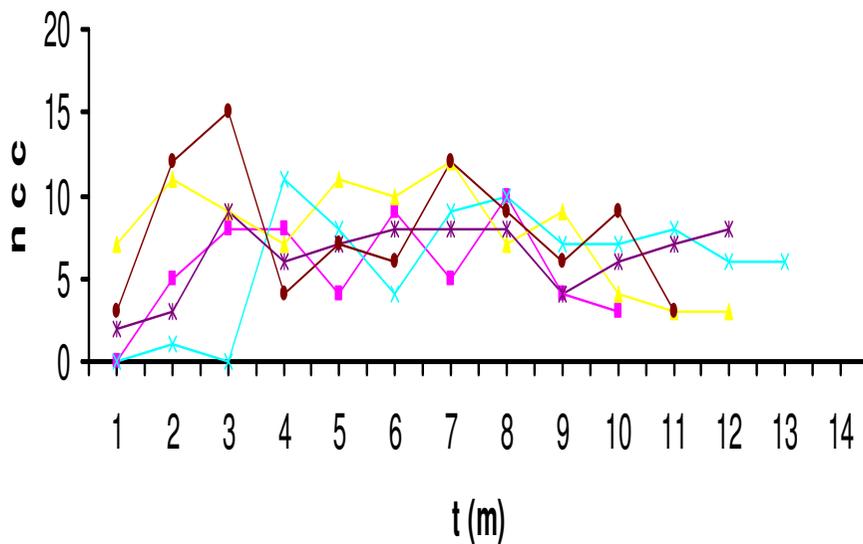
durate medie dei rearing in lat maze durante la II esposizione



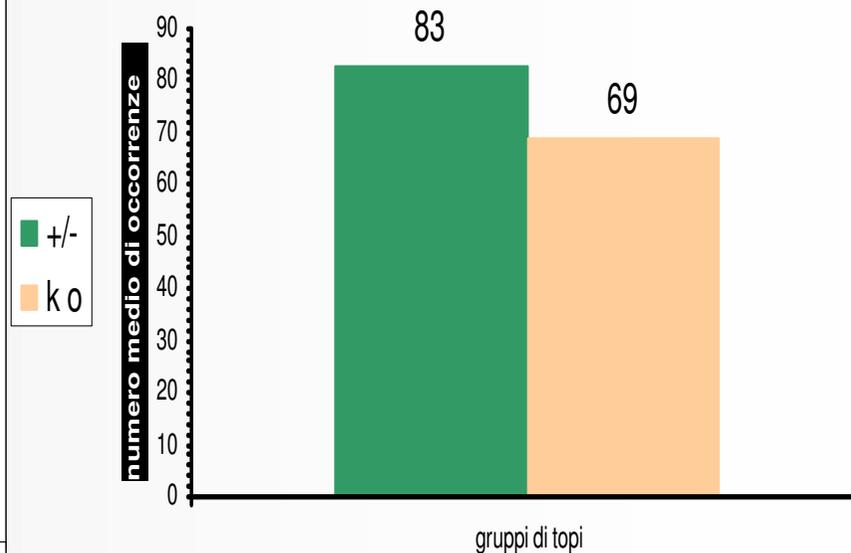
Numero di corner crossing medi in blocchi di un minuto dei 2 gruppi di topi analizzati nel lat maze durante la I esposizione.

1	5	2
2	8	6
3	10	8
4	9	7
5	8	7
6	7	7
7	8	9
8	8	9
9	8	6
10	9	6
t	cc etero	cc ko

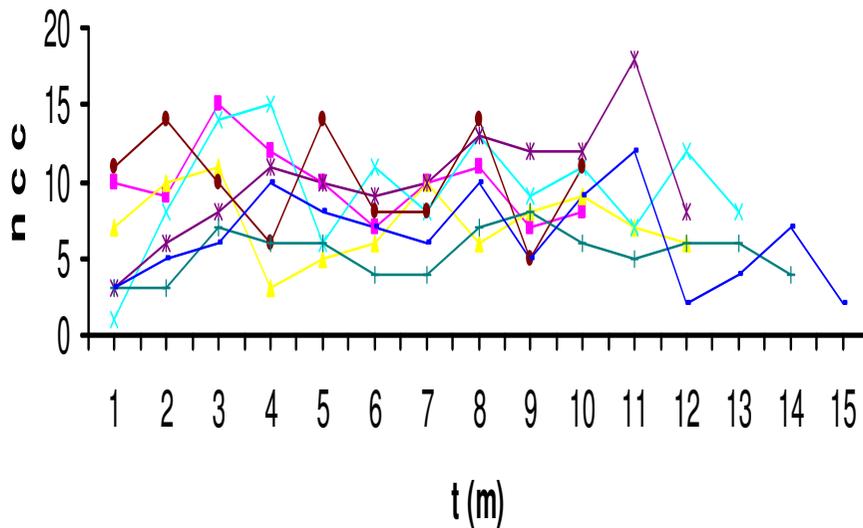
andamento temporale del numero di corner crossing in lat maze durante la prima esposizione dei topi k.o.



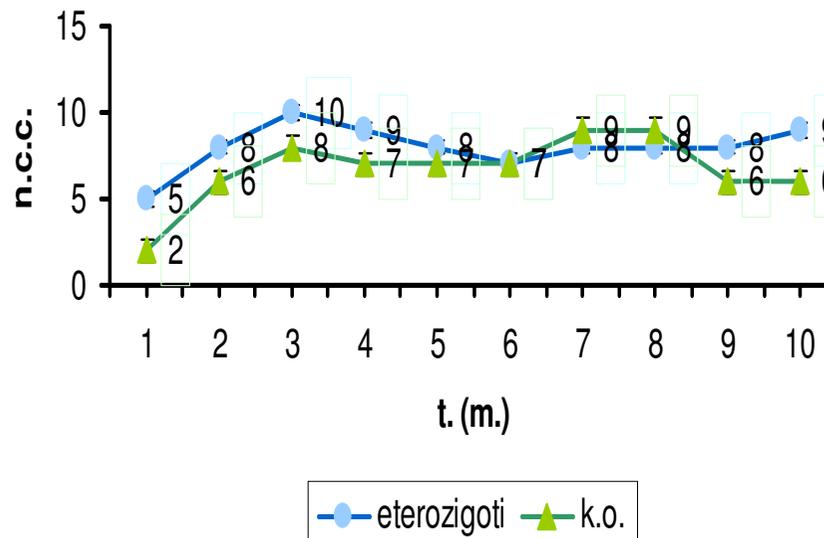
confronto tra il numero medio di corner crossing dei 2 gruppi di topi durante la 1 esposizione al lat maze



andamento temporale del numero di corner crossing in lat maze dei topi eterozigoti durante la prima esposizione



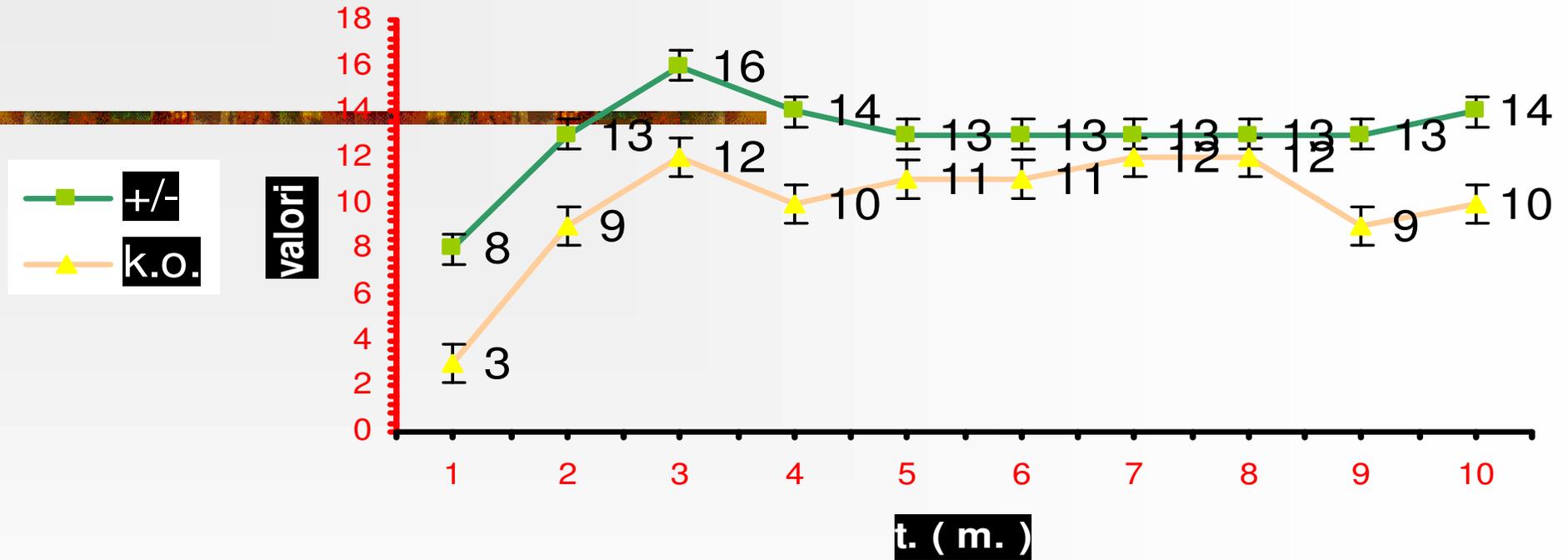
confronto tra l'andamento temporale del numero medio di corner crossing in lat maze tra i topi eterozigoti ed i k.o.



La misura del numero di corner crossing conferma l'abituazione intrasessione al lat maze dopo 3 minuti di esposizione nel corso della I sessione di esperimenti.

ATTIVITA TOTALE

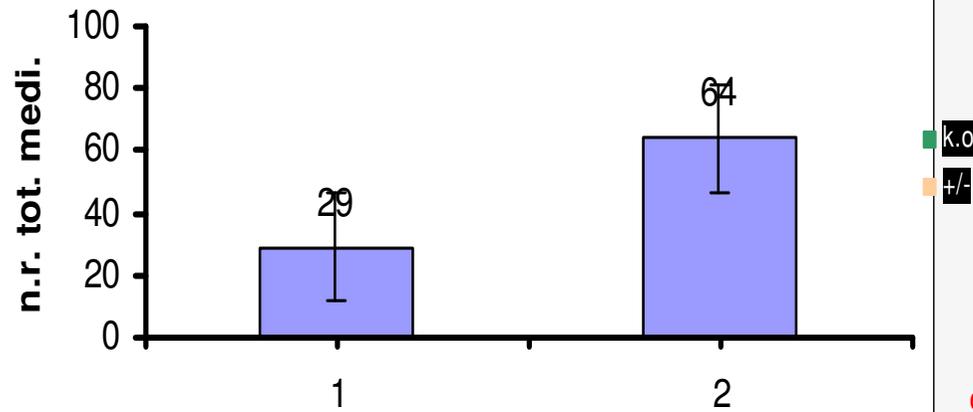
confronto tra l'attività totale in funzione del tempo in lat maze durante la prima esposizione dei 2 gruppi di topi.



confronto tra l'attività totale in lat maze durante la prima esposizione dei 2 gruppi di topi.

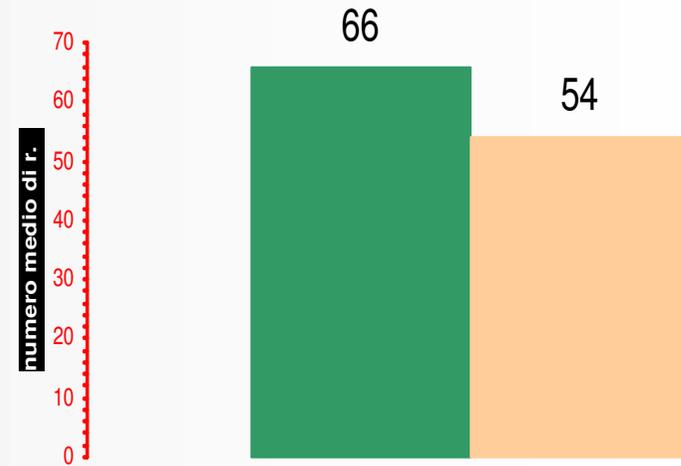


numero di rearings totali medi nei 2 gruppi



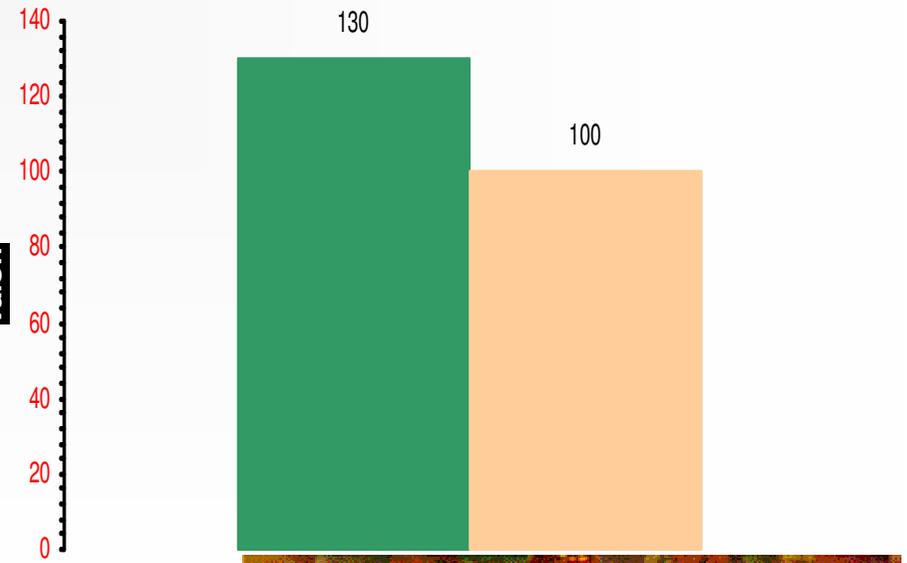
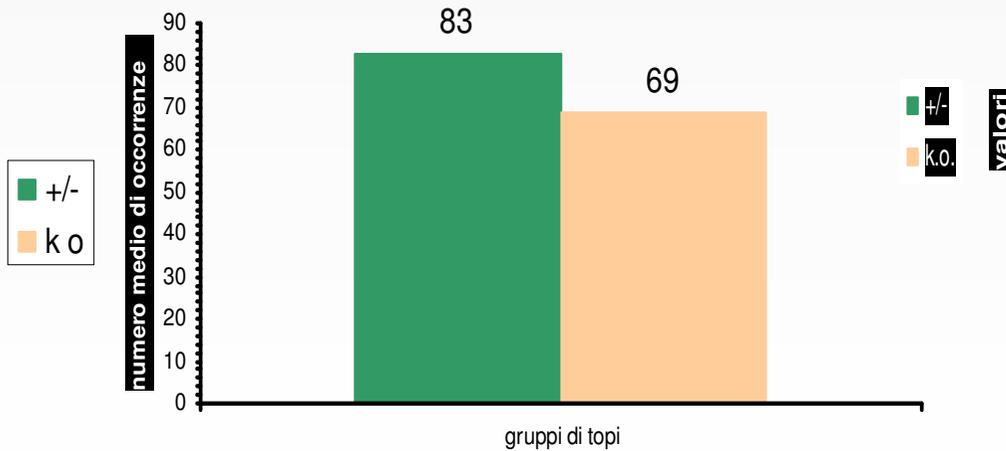
1=k.o.;2=+/-

confronto tra il numero medio di rearing in lat maze dei 2 gruppi di topi durante la seconda esposizione.



confronto tra l'attività totale in lat maze durante la prima esposizione dei 2 gruppi di topi.

confronto tra il numero medio di corner crossing dei 2 gruppi di topi durante la I esposizione al lat maze



CONCLUSIONI

Le significative variazioni comportamentali riscontrate nei topi K.O. ed eterozigoti nelle prove di open field e nella gabbia di Lat dimostrano che la forma 3 dello scambiatore sodio/calcio è coinvolta nei processi di apprendimento e memoria di compiti del tipo non associativo.