

***Risultati: I parte***

### 3. Interazione tra i sistemi ORXergico-GABAergico nel feeding behavior in condizioni di eutermia

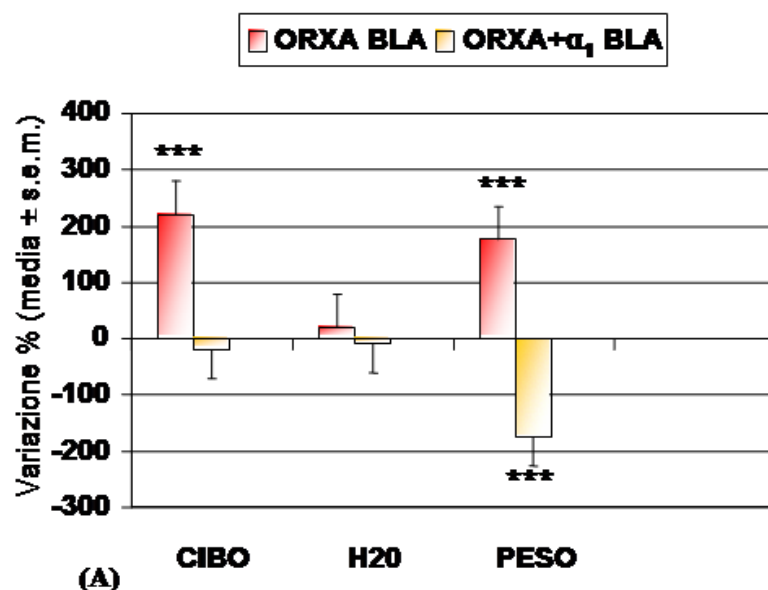
E' importante studiare l'interazione che intercorre tra i sistemi ORXergico e GABAergico durante il normale comportamento giornaliero del criceto (feeding behavior). In questo lavoro è stato analizzato, il comportamento alimentare nei diversi gruppi (assunzione di acqua e cibo), e l'eventuale variazione di peso associata a questi eventi in condizioni di eutermia. Importante è perciò poter valutare quelle che sono le eventuali variazioni nel food e water intake, in seguito alla somministrazione di agonisti ORXergici e GABAergici nei diversi nuclei amigdalari considerati.

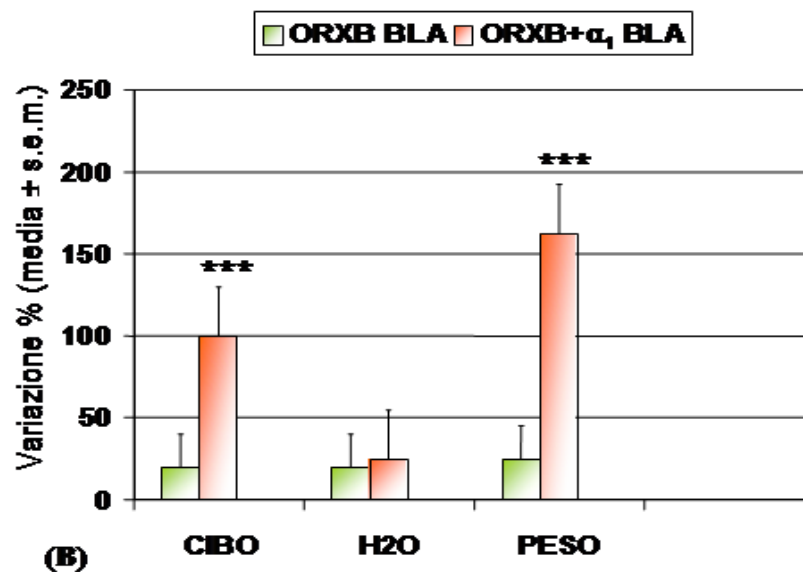
La Fig.19 A mostra il comportamento alimentare e le variazioni del peso di criceti trattati ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA. È evidente ( $F_{5,30}=3.70$   $p<0.01$ ) un'assunzione molto forte di cibo nei criceti ORXA BLA (220%) rispetto ai criceti trattati ORXA+ $\alpha_1$  BLA (-20%), mentre, per quanto riguarda l'assunzione di acqua, non si osservano variazioni significative.

Rilevanti sono invece le variazioni di peso riscontrate in entrambi i gruppi trattati, difatti, si osserva un aumento ponderale molto forte nel criceto trattato con ORXA BLA (175%) ed un calo ponderale molto forte nell'animale ORXA+ $\alpha_1$  BLA (-175%) (Fig.19 A).

Nella Fig.15 B vengono mostrate le differenze nell'assunzione di cibo ed acqua e le variazioni del peso di criceti trattati ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA.

È evidente un'assunzione molto forte di cibo nei criceti ORXB+ $\alpha_1$  BLA (100%) rispetto ai trattati ORXB BLA (20%); l'assunzione di acqua può essere trascurata poiché i valori non sono rilevanti. Un aumento ponderale molto forte si osserva nei criceti ORXB+ $\alpha_1$  BLA (163%) rispetto a quelli trattati con ORXB BLA (25%) (Fig.19 B).





**Fig. 19** Assunzione di acqua (ml), cibo (gr) e variazione ponderale evidenziati in gruppi di criceti con fotoperiodo 14h-10h e temperatura di 25°C, in seguito ai trattamenti ICV: ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (A); ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (B). I valori medi (media  $\pm$  s.e.m.) sono stati espressi in %, gli animali trattati sono stati n=3 per gruppo e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls* (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Successivamente sono state analizzate le variazioni del comportamento alimentare e del peso corporeo anche per i criceti trattati ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (Fig.20 A). Si osserva in modo particolare un'assunzione molto forte di cibo nei gruppi ORXA+ $\alpha_1$  Ce (375%) rispetto ai trattati ORXA Ce (40%) nei quali si evidenzia invece una moderata assunzione di cibo. Facendo riferimento all'assunzione di acqua ed alle variazioni del peso non si osservano risultati significativi.

Nella Fig.20 B sono stati considerati i trattamenti ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce. Evidente è l'incremento molto forte nell'assunzione di cibo dei criceti trattati ORXB+ $\alpha_1$  Ce (225%) rispetto ai trattati ORXB Ce (20%) dove non osserviamo risultati significativi. Vediamo inoltre un'assunzione molto forte di acqua nei trattati ORXB Ce (140%) ed un forte aumento della stessa nei criceti ORXB+ $\alpha_1$  Ce (70%), mentre sono trascurabili le variazioni del peso in entrambi i gruppi trattati ORXB Ce (16%) ed ORXB+ $\alpha_1$  Ce (-21%) (Fig. 20 B).

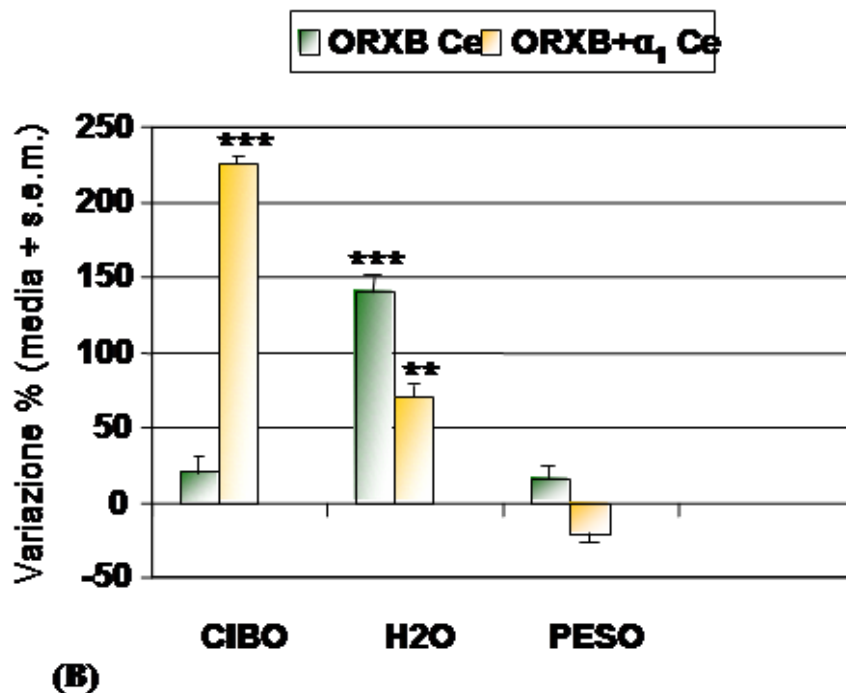
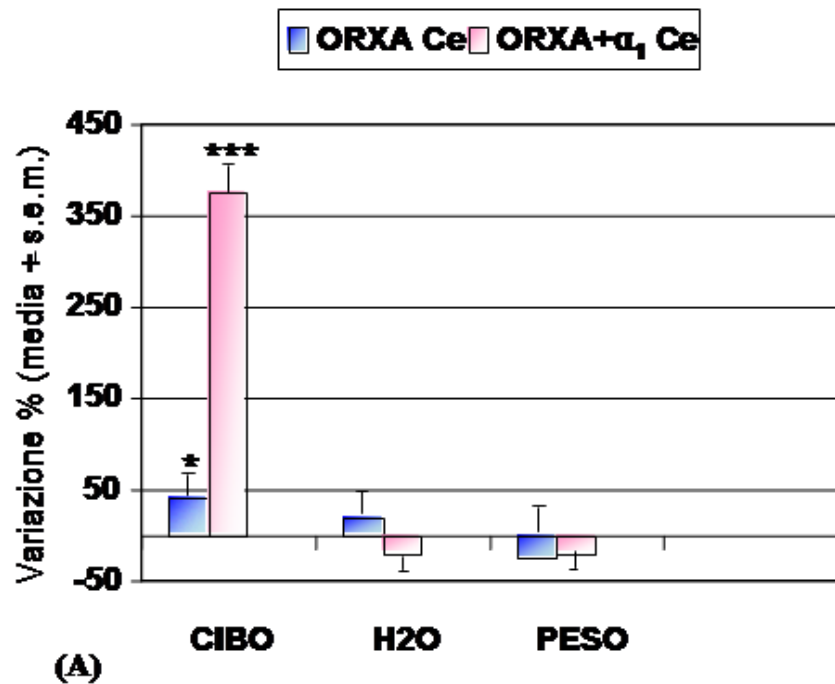


Fig. 20 Assunzione di acqua (ml), cibo (gr) e variazione ponderale evidenziati in gruppi di criceti con fotoperiodo 14h-10h e temperatura di 25°C, in seguito ai trattamenti ICV: ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (A); ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (B). I valori medi (media  $\pm$  s.e.m.) sono stati espressi in %, gli animali trattati sono stati n=3 per gruppo e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls* (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001).

### **3.1 Interazione tra i sistemi ORXergico-GABAergico nel feeding-behavior durante l'ibernazione**

L'ibernazione viene definita come lo stato di letargia o torpore che si verifica nella stagione fredda in diverse specie di Mammiferi, nei quali si osserva riduzione della  $T_b$ , della funzionalità respiratoria, del metabolismo energetico e delle attività cardiovascolari. Durante l'ibernazione anche l'encefalo va incontro a continui e costanti cambiamenti, associati a fenomeni plastici che permettono una riorganizzazione della trascrizione in funzione della nuova condizione di stress ambientale. Per realizzare questo lavoro, dopo aver effettuato l'analisi comportamentale in condizioni eutermiche, si è cercato di valutare come l'animale tollerasse la somministrazione dei diversi agonisti ORXergici e GABAergici durante tutto il ciclo di ibernazione. In particolare, si è studiato il cross-talking tra i sistemi ORXergico e GABAergico nei nuclei encefalici esaminati, osservando eventuali variazioni del comportamento alimentare e del peso corporeo nei diversi gruppi. Nei seguenti grafici sono stati messi a confronto diversi gruppi di criceti ibernanti: ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (Fig. 21 A); ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (Fig. 21 B). Nel primo grafico si evidenzia come nei trattati ORXA BLA si ha una forte assunzione di cibo (67%), mentre, nel gruppo trattato con ORXA+ $\alpha_1$  BLA si osserva una riduzione moderata nell'assunzione di cibo (-42%). Per quanto riguarda l'assunzione di acqua, si osserva solo nei trattati ORXA+ $\alpha_1$  BLA una moderata diminuzione (-36%). I medesimi gruppi in relazione alle variazioni di peso, dopo il trattamento, mostrano un calo ponderale molto forte in ORXA BLA (-350%), contrariamente a quanto evidenziato nei trattati ORXA+ $\alpha_1$  BLA dove si osserva, invece, un incremento ponderale molto forte (98%) (Fig. 21 A).

Nella Fig. 21 B vengono confrontati i gruppi ibernanti ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA, sempre in relazione all'assunzione di acqua, cibo ed alle loro variazioni di peso dopo il trattamento. Si evidenzia una forte diminuzione nell'assunzione di cibo in ORXB BLA (-67%), mentre l'assunzione di cibo per ORXB+ $\alpha_1$  BLA non risulta significativa (13%). Anche l'assunzione di acqua nei medesimi gruppi non è rilevante. Per quanto riguarda le variazioni di peso, si osserva un calo ponderale molto forte, esclusivamente nei trattati ORXB+ $\alpha_1$  BLA (-350%) (Fig. 21 B).

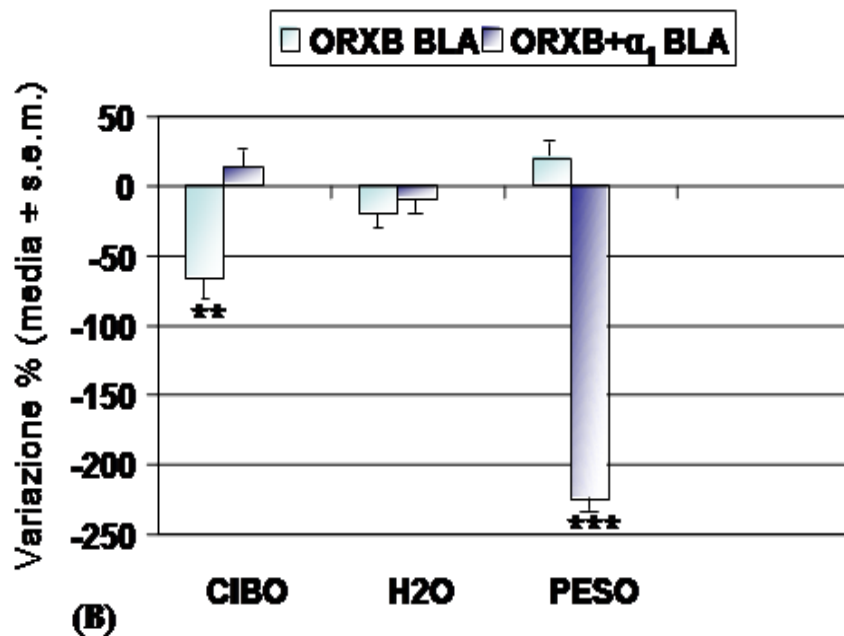
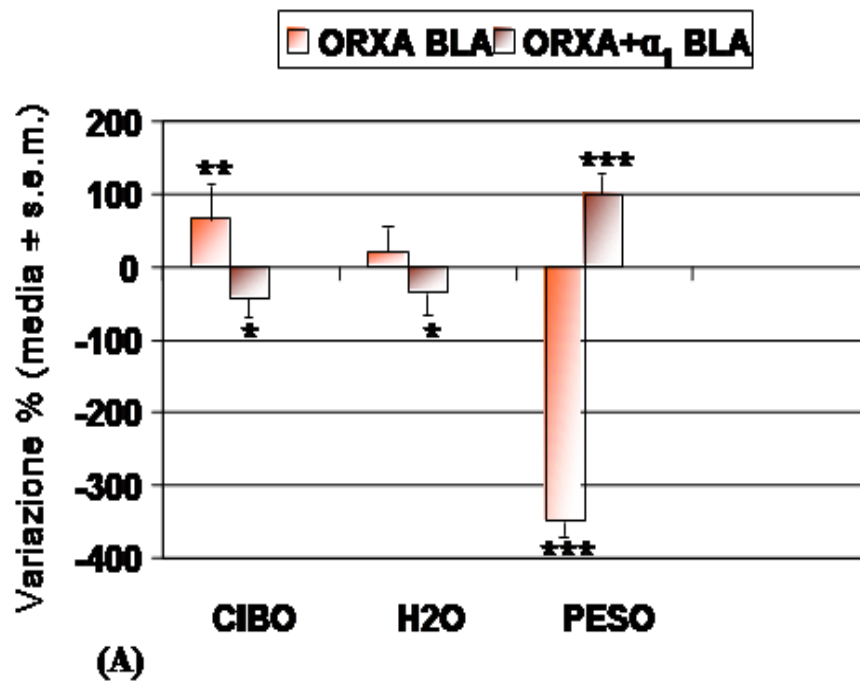
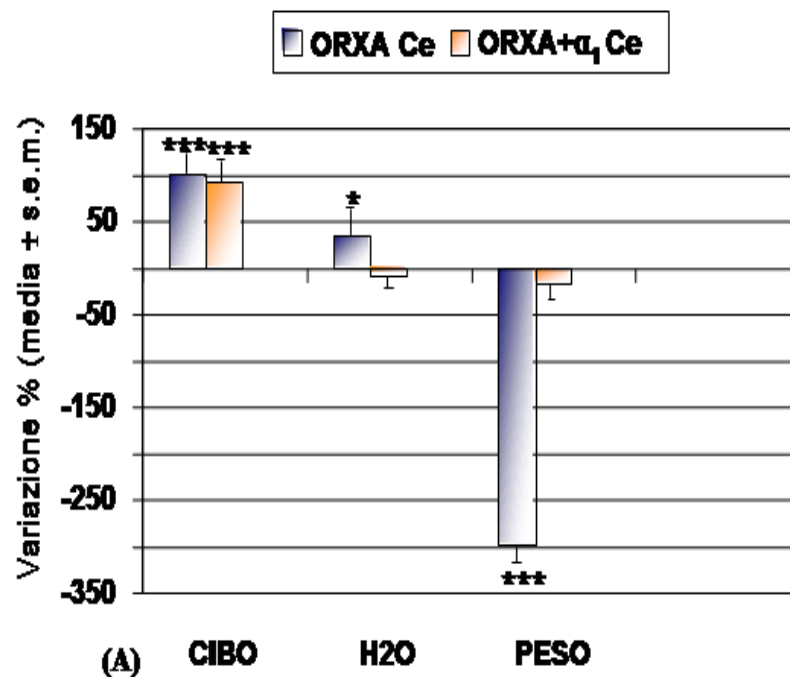


Fig. 21 Assunzione di acqua (ml), cibo (gr) e variazione ponderale evidenziati in gruppi di criceti ibernanti in seguito ai trattamenti ICV:ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA, vs CTRL BLA (A); ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (B). I valori medi (media  $\pm$  s.e.m.) sono stati espressi in %, gli animali trattati sono stati n=3 per gruppo e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Successivamente sono stati confrontati i gruppi ibernanti trattati stereotassicamente a livello del Ce: ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce, vs CTRL Ce; ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (Fig. 22 A-B). Dall'analisi statistica ( $F_{(3,50)}=3.70$   $p<0.01$ ) è risultata un'assunzione molto forte di cibo sia nei criceti ibernanti ORXA Ce (100%) che in quelli trattati con ORXA+ $\alpha_1$  Ce (92%), mentre solo per il trattamento ORXA Ce si osserva una moderata assunzione di acqua (33%) ed un calo ponderale molto forte (-300%) (Fig. 22 A).

Nel grafico successivo si è registrato, un incremento molto forte nel food-intake per i gruppi osservati ORXB Ce (133%) ed ORXB+ $\alpha_1$  Ce (192%), mentre, una forte assunzione di acqua solo da parte dei trattati con ORXB Ce (67%). Per quanto riguarda le variazioni di peso, si nota un calo ponderale molto forte sia per ORXB Ce (-233%) che per ORXB+ $\alpha_1$  Ce (-250%), che risulta non proprio proporzionale alla quantità di acqua e cibo assunti dai diversi gruppi (Fig. 22 B).



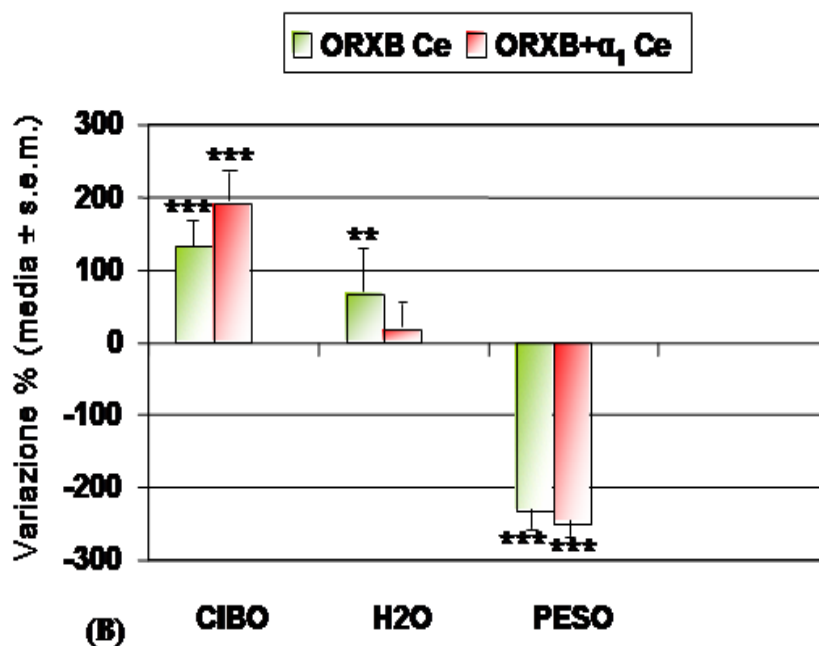


Fig. 22 Assunzione di acqua (ml), cibo (gr) e variazione ponderale evidenziati in gruppi di criceti ibernanti in seguito ai trattamenti ICV:ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce, vs CTRL Ce (A); ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (B). I valori medi (media  $\pm$  s.e.m.) sono stati espressi in %, gli animali trattati sono stati n=3 per gruppo e le differenze significative, ottenute mediante ANOVA sono state successivamente confrontate con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3.2 Interazione tra i sistemi ORXergico-GABAergico nelle attività motorie del criceto durante la fase eutermica

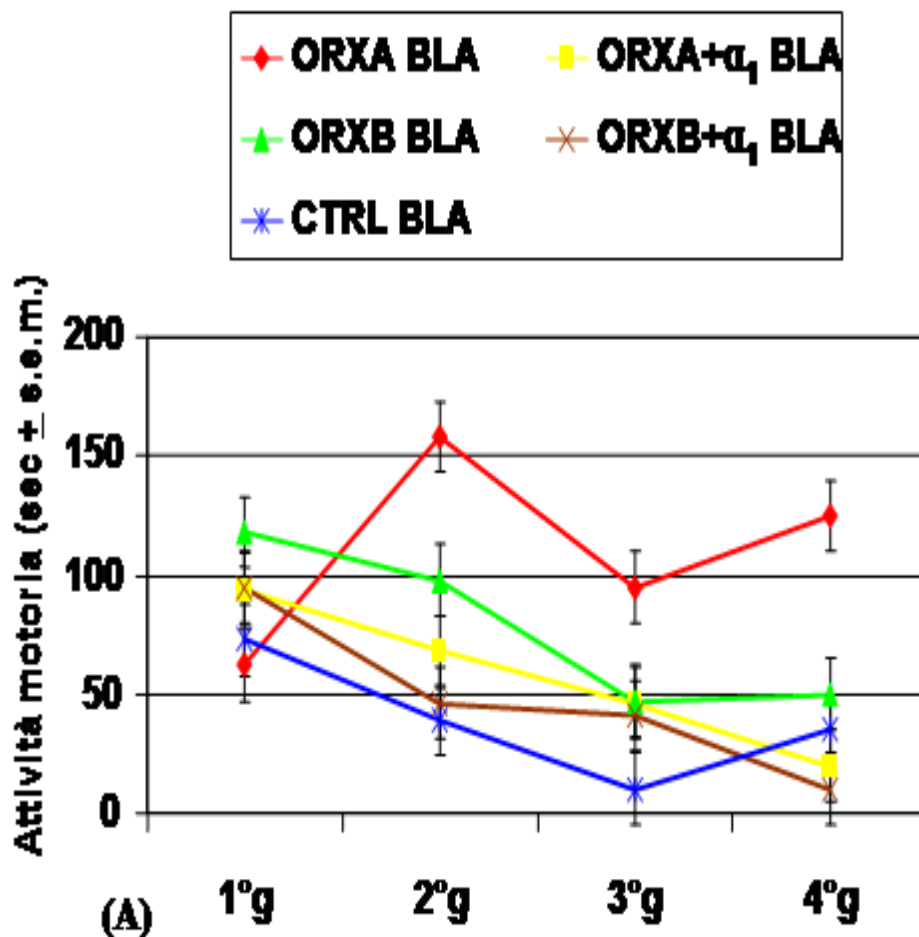
In ultima analisi è importante valutare se il cross-talking tra il sistema ORXergico e GABAergico possa giocare un ruolo chiave nel regolare sia meccanismi fisiologici quali il ritmo sonno-veglia, che anche l'attività motoria. Per effettuare ciò, sono stati quantizzati i tempi delle principali attività giornaliere svolte dagli animali, quali: pulirsi, muoversi nel nido, muoversi nella gabbia, sollevamento sulle zampe posteriori e annusare. I gruppi sperimentali confrontati sono quelli che hanno subito la somministrazione sia delle ORXs che degli agonisti GABAergici a livello del BLA e del Ce: ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA, ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA e CTRL BLA (Fig. 23 A); ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce, ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce e CTRL Ce (Fig. 23 B).

Possiamo osservare che il criceto trattato con ORXA BLA è il più attivo con un massimo di motor behavior il 2° g, mentre, il trattato con ORXB BLA ha un massimo di attività il 1° g. Il CTRL BLA come si può osservare risulta essere l'animale meno attivo di tutti. Il gruppo trattato ORXA+ $\alpha_1$  BLA si muove in misura lievemente maggiore rispetto al trattato



ORXB+  $\alpha_1$  Bla, ma entrambi mostrano una riduzione delle attività rispetto ai trattati ORXA BLA, ORXB BLA ed un aumento delle stesse rispetto al CTRL BLA (Fig. 23 A).

Anche per quanto riguarda i trattamenti effettuati a livello del Ce possiamo osservare come l'ORXA rappresenti il trattato con una maggiore attività motoria e con un massimo della stessa il 2° g. I gruppi CTRL Ce ed ORXB Ce si muovono in misura minore rispetto ai trattati con ORXA Ce con un massimo delle attività rispettivamente nel 3° e nel 1°g. Anche i trattati ORXA+ $\alpha_1$  Ce ed ORXB+ $\alpha_1$  Ce mostrano una riduzione delle attività rispetto ai trattati ORXA Ce; entrambi presentano un decremento paragonabile tra il 1°g ed il 2° g mentre si può notare successivamente un lieve incremento dell'attività tra il 2°g ed il 3° g solo di ORXB+ $\alpha_1$  Ce.



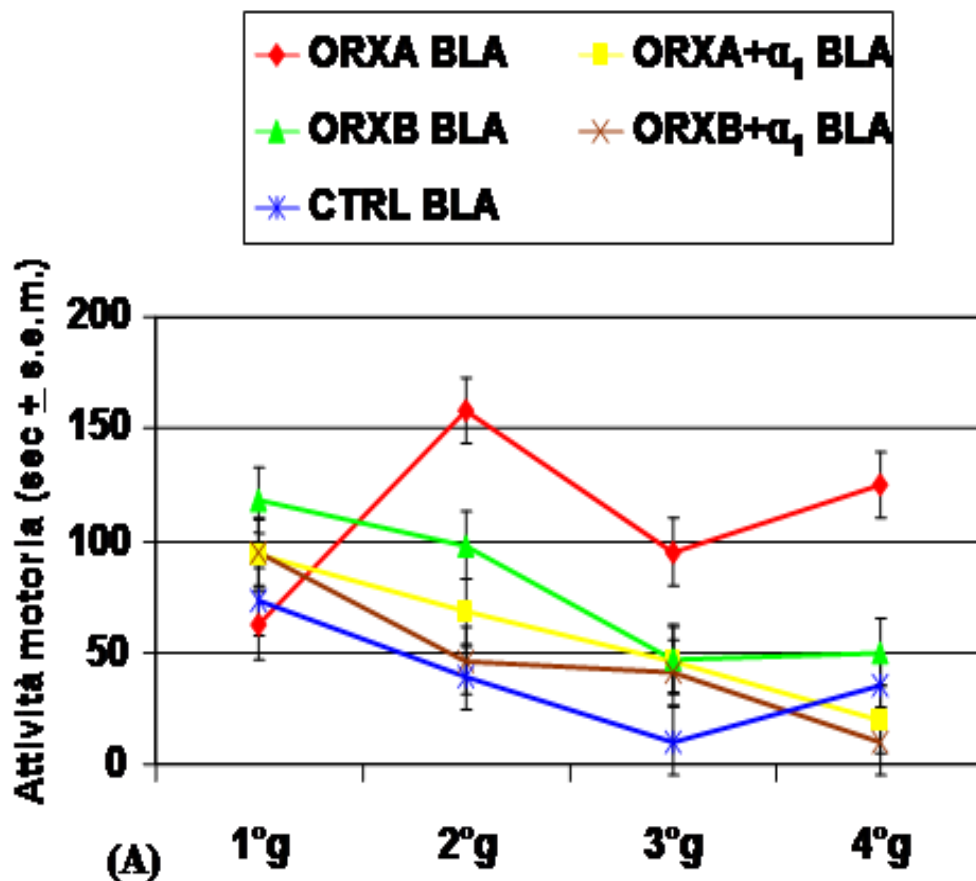


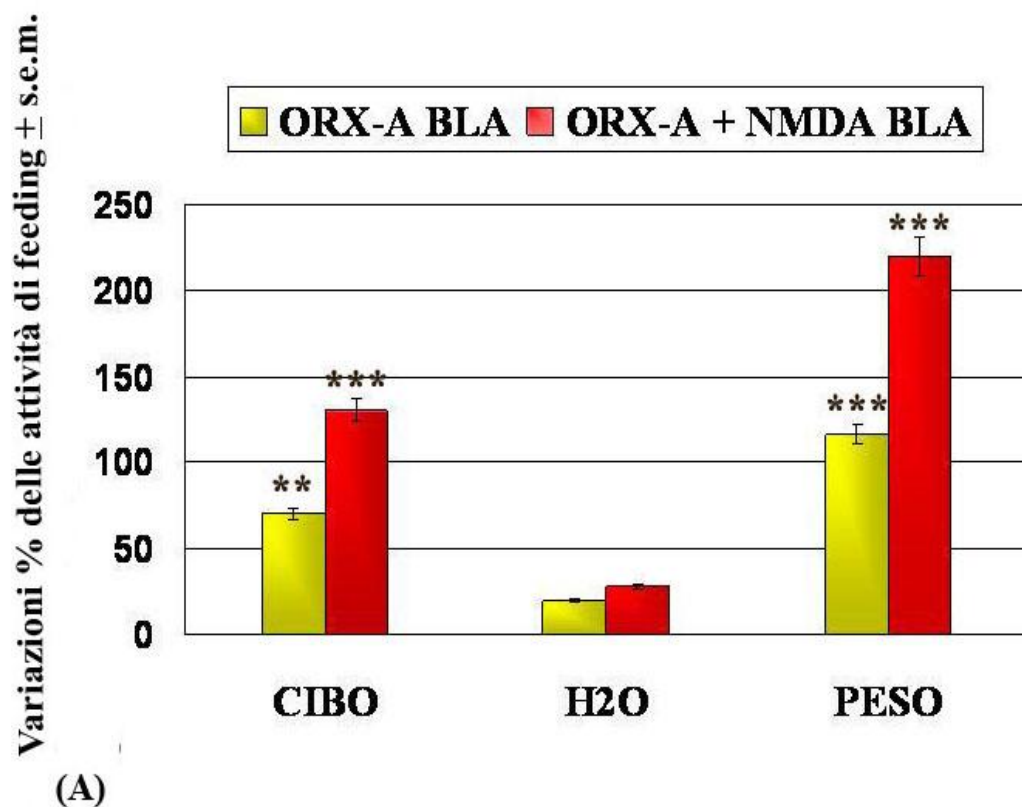
Fig. 23 Attività giornaliera (pulirsi+muoversi nella gabbia+muoversi nel nido+sollevarsi+annusare: espressa in sec) nei diversi trattati: ORXA BLA, ORXA+ $\alpha_1$  BLA, ORXB BLA, ORXB+ $\alpha_1$  BLA vs CTRL BLA (A); ORXA Ce, ORXA+ $\alpha_1$  Ce, ORXB Ce, ORXB+ $\alpha_1$  Ce vs CTRL Ce (B). Le osservazioni sono state effettuate giornalmente agli stessi orari per 4 giorni mantenendo i diversi criceti trattati nelle medesime condizioni di temperatura, disponibilità di acqua, cibo, fotoperiodo e valori di umidità.

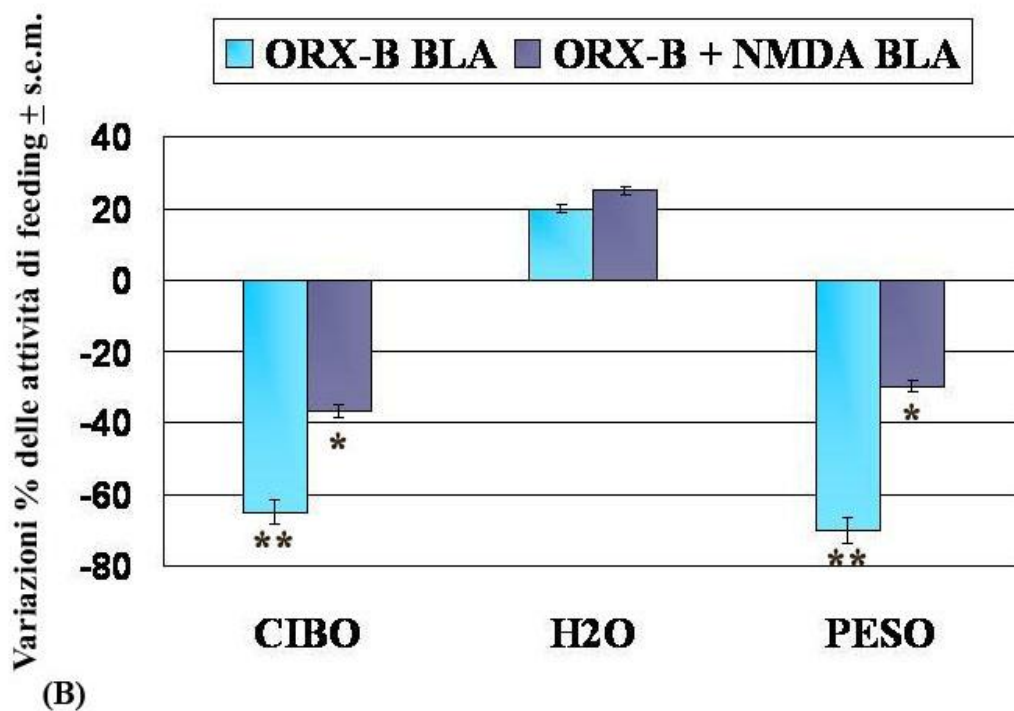
### 3.3 Interazione tra i sistemi ORXergico e Gluergico nel feeding behavior in condizioni di eutermia

E' molto importante studiare l'interazione tra i sistemi ORXergico e Gluergico durante le normali attività giornaliere del criceto (feeding behavior), infatti, in questo lavoro di tesi, il nostro obiettivo è stato quello di osservare il comportamento alimentare (assunzione di acqua e cibo) nei diversi gruppi di animali trattati e l'eventuale variazione di peso associata a questi eventi in condizioni di eutermia. Importante è perciò poter valutare quelle che sono le eventuali variazioni nel food e water intake, in seguito alla somministrazione di agonisti ORXergici e Gluergici nei diversi nuclei amigdalari considerati.

La Fig. 24 A mostra il comportamento alimentare e le variazioni di peso di criceti trattati ORX-A BLA, ORX-A+NMDA BLA vs CTRL BLA. È evidente ( $F_{5,30}=3.70$   $p<0.01$ ) un'assunzione forte di cibo nei criceti ORX-A BLA (70%), mentre, molto forte negli animali ai quali è stata somministrata ORX-A+NMDA BLA (130%). Per quanto riguarda l'assunzione di acqua, non si osservano variazioni significative in entrambi i trattati. Rilevanti sono invece le variazioni di peso riscontrate, difatti, si osserva un aumento ponderale molto forte sia nel criceto trattato con ORX-A BLA (116%) che in quello trattato con ORX-A+NMDA BLA (220%) (Fig. 24 A).

Nella Fig. 24 B vengono mostrate le differenze nell'assunzione di cibo ed acqua e le variazioni di peso di criceti trattati ORX-B BLA, ORX-B+NMDA BLA vs CTRL BLA. Si nota, in questi gruppi di animali, una forte riduzione nell'assunzione di cibo nei criceti ORX-B BLA (-65%) rispetto ai trattati ORX-B+NMDA BLA (-37%) nei quali la diminuzione nel food-intake risulta moderata; l'assunzione di acqua può essere trascurata poiché i valori non sono significativi. Una perdita ponderale forte, in accordo con i dati riguardanti l'assunzione di cibo, si osserva nei criceti ORX-B BLA (-70%) rispetto a quelli trattati con ORX-B+NMDA BLA (-30%) dove si osserva una diminuzione del peso corporeo moderata (Fig. 24 B).





**Fig. 24** Variazioni delle attività di feeding espresse in %  $\pm$  s.e.m di eutermici trattati icv con ORXA BLA, ORXA+NMDA BLA vs CTRL BLA (A); ORXB BLA, ORXB+NMDA BLA vs CTRL BLA (B). I valori sono stati confrontati mediante ANOVA e Post Hoc Test con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Successivamente, tali variazioni del comportamento alimentare e del peso corporeo, sono state analizzate anche nei criceti trattati con ORX-A Ce, ORX-A+NMDA Ce vs CTRL Ce (Fig. 25 A).

In questo caso, si osserva un'assunzione molto forte di cibo nei gruppi ORX-A Ce (111%), rispetto ai trattati ORX-A+NMDA Ce (22%). In riferimento all'assunzione di acqua è evidente un forte aumento nel consumo, nei gruppi ORX-A Ce (63%), nei quali si nota anche un'altrettanto significativo aumento nel peso corporeo (80%). Negli animali trattati con ORX-A+NMDA Ce, invece, il consumo di acqua e le variazioni ponderali non risultano rilevanti.

Nella Fig. 25 B sono stati considerati i criceti trattati con ORX-B Ce, ORX-B+NMDA Ce vs CTRL Ce. Facendo riferimento all'assunzione di cibo ed alle variazioni di peso corporeo, non si osservano variazioni significative in nessuno dei gruppi trattati. Osserviamo, invece, un'assunzione molto forte e forte di acqua nei trattati rispettivamente con ORX-B+NMDA Ce (120%) e ORX-B Ce (80%) (Fig. 25 B).

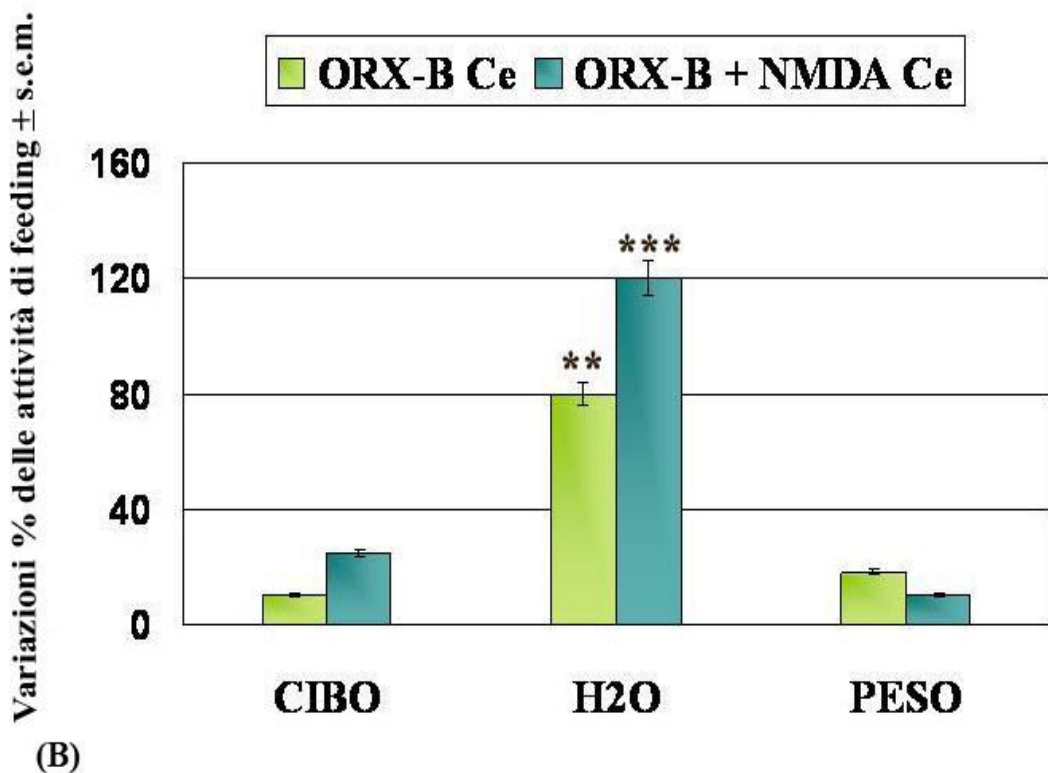
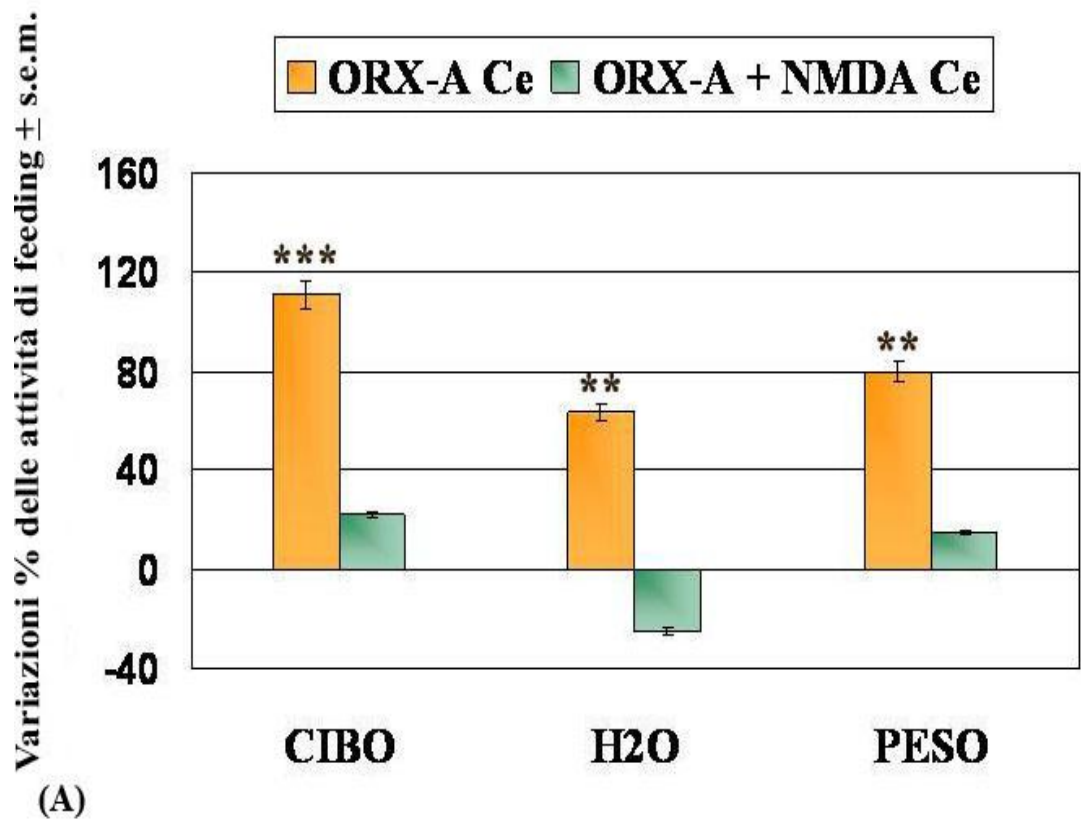


Fig. 25 Variazioni delle attività di feeding espresse in %  $\pm$  s.e.m di eutermici trattati icv con ORXA Ce, ORXA+NMDA Ce vs CTRL Ce (A); ORXB Ce, ORXB+NMDA Ce vs CTRL Ce (B). I valori sono stati confrontati mediante ANOVA e Post Hoc Test con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### **3.4 Interazione tra i sistemi ORXergico e Gluergico nel feeding-behavior durante l'ibernazione**

L'ibernazione viene definita come lo stato di letargia o torpore che si verifica nella stagione fredda in diverse specie di Mammiferi, nei quali si osserva riduzione della Tb, della funzionalità respiratoria, del metabolismo energetico, delle attività cardiovascolari e dei fenomeni plastici relativi al SN. Durante l'ibernazione, l'encefalo va incontro a continui e costanti cambiamenti, associati a fenomeni plastici che permettono una riorganizzazione della trascrizione in funzione della nuova condizione di stress ambientale. In questo lavoro di tesi sono state valutate le variazioni del comportamento alimentare e del peso corporeo nei diversi gruppi sia in condizioni eutermiche e sia durante tutto il ciclo di ibernazione. Nei seguenti grafici sono stati messi a confronto diversi gruppi di criceti ibernanti: ORX-A BLA, ORX-A+NMDA BLA vs CTRL BLA (Fig.13 A); ORX-B BLA, ORX-B+NMDA BLA vs CTRL BLA (Fig. 26 B). Nel primo grafico si evidenzia come nei trattati ORX-A BLA si ha una assunzione molto forte di cibo (162%) ed un conseguente aumento ponderale (237%). Nel trattato con ORX-A+NMDA, non si osservano variazioni significative nel food-intake e nel peso corporeo. Per quanto riguarda, invece, l'assunzione di acqua, è doveroso constatare un consumo moderato esclusivamente nei criceti trattati con ORX-A+NMDA BLA (45%) (Fig. 26 A).

Nella Fig. 26 B vengono confrontati i gruppi ibernanti ORX-B BLA, ORX-B+NMDA BLA vs CTRL BLA, sempre in relazione all'assunzione di acqua, cibo ed alle loro variazioni di peso dopo il trattamento. Si evidenzia una forte riduzione nell'assunzione di cibo in ORX-B BLA (-61%), mentre, un moderato calo si osserva nei gruppi ORX-B+NMDA BLA (-30%). In riferimento ai consumi di acqua, notiamo un moderato aumento sia nei trattati con ORX-A (44%), che con ORX-B+NMDA BLA (38%). Per quanto riguarda le variazioni di peso, non si riscontrano variazioni rilevanti in nessuno degli animali trattati (Fig. 26 B).

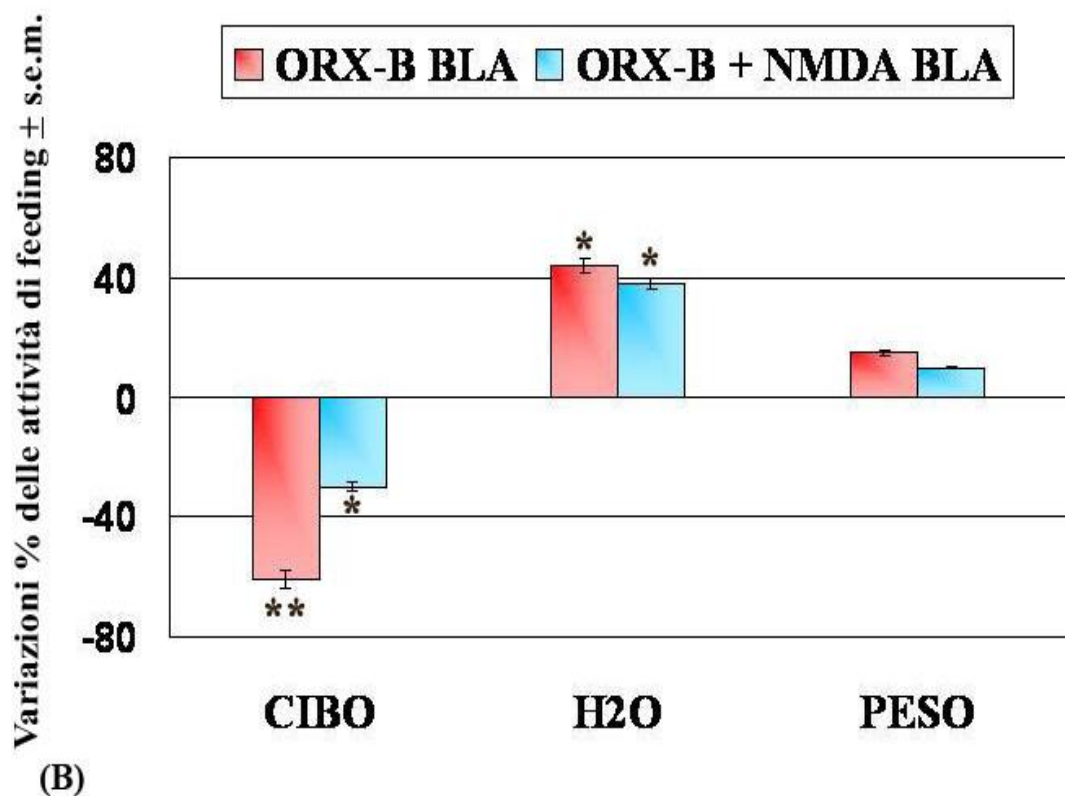
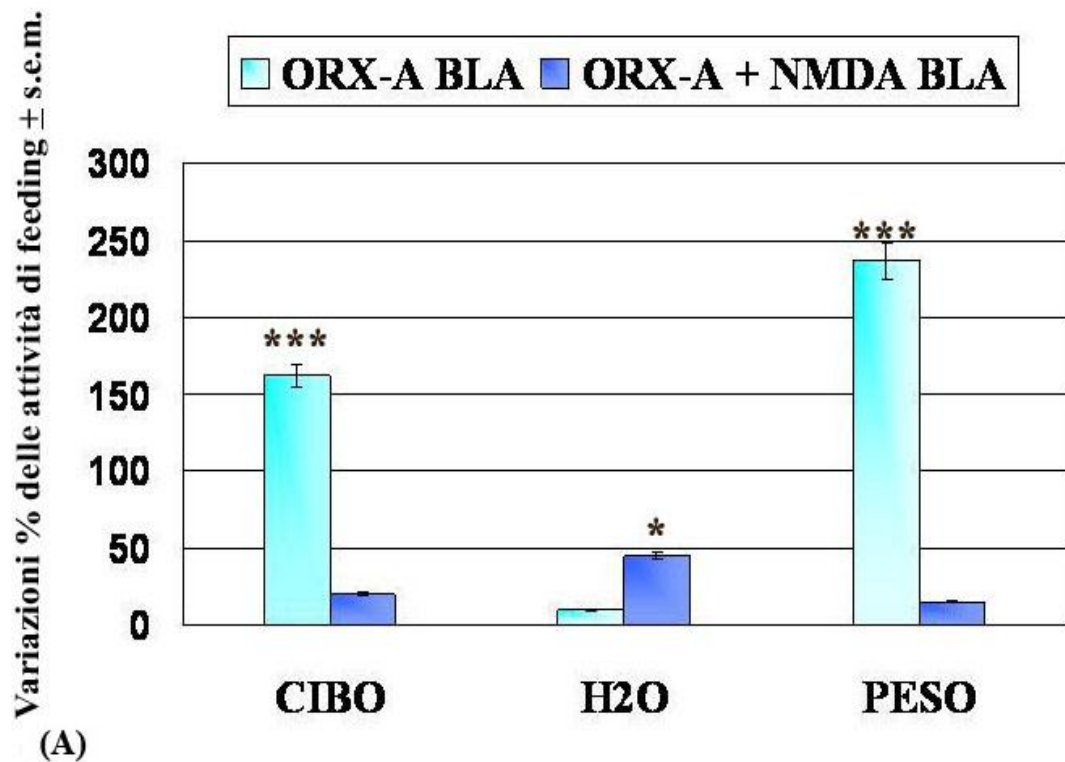
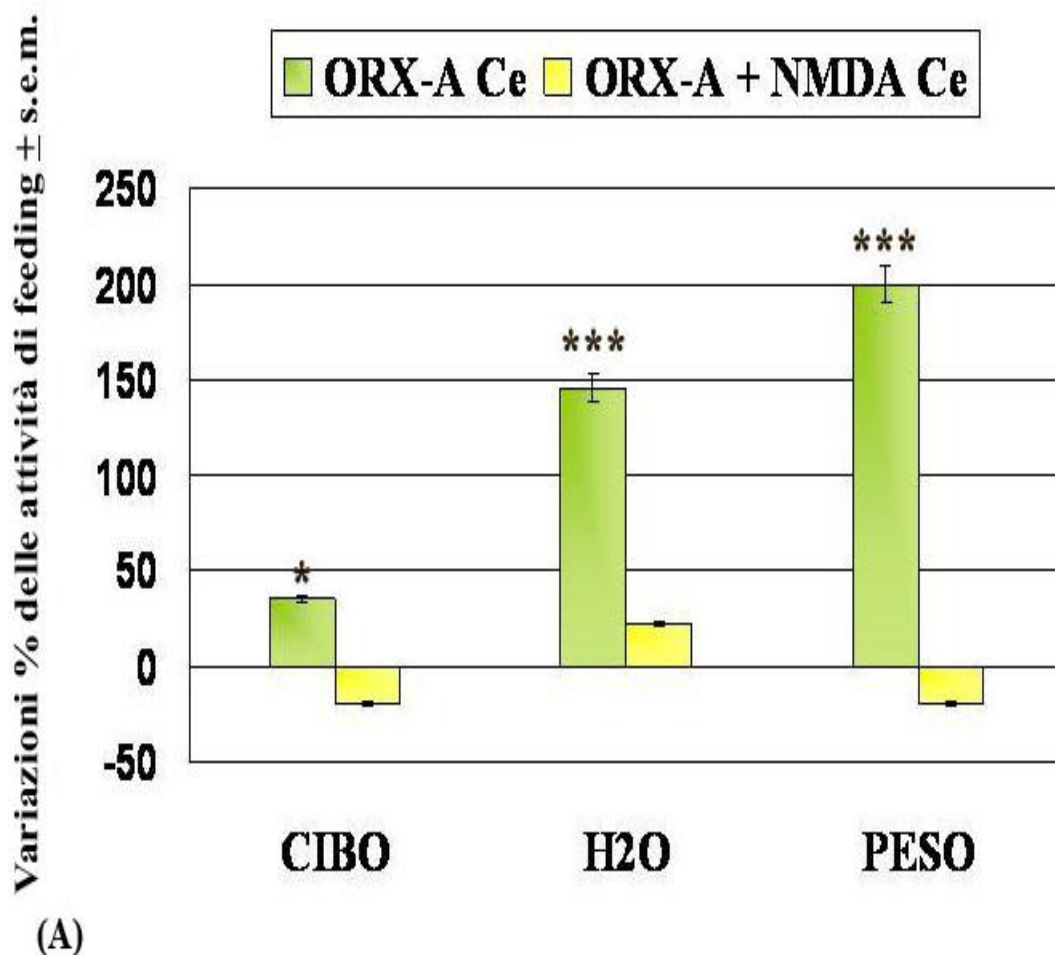


Fig. 26 Variazioni delle attività di feeding espresse in %  $\pm$  s.e.m di ibernanti trattati icv con ORXA BLA, ORXA+NMDA BLA, vs CTRL BLA (A); ORXB BLA, ORXB+NMDA BLA vs CTRL BLA (B). I valori sono stati confrontati mediante ANOVA e Post Hoc Test con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Infine, sono stati confrontati i gruppi ibernanti trattati stereotassicamente a livello del Ce: ORX-A Ce, ORX-A+NMDA Ce, vs CTRL Ce; ORX-B Ce, ORX-B+NMDA Ce vs CTRL Ce (Fig. 27 A-B). Dall'analisi statistica ( $F_{(3,50)}=3.70$   $p<0.01$ ) è risultata una moderata assunzione di cibo esclusivamente nei criceti ibernanti trattati con ORX-A Ce (35%). Nello stesso animale trattato con ORX-A Ce si osserva, inoltre, una assunzione molto forte di acqua (146%), ed un aumento ponderale anch'esso molto forte (200%). Nell'animale che ha subito il doppio trattamento con ORX-A+NMDA nel Ce non sono evidenti variazioni significative in nessuno dei parametri analizzati (Fig. 27 A).

Nel grafico successivo si è registrato un incremento, moderatamente forte nel food-intake dei gruppi trattati ORX-B Ce (59%) ed una forte riduzione nell'assunzione di cibo negli animali ORX-B+NMDA Ce (-76%). Un'assunzione di acqua molto forte si evidenzia solo nei trattati con ORX-B Ce (100%). Per quanto riguarda le variazioni di peso, si nota, un aumento ponderale molto forte in ORX-B Ce (200%), contrariamente a quanto si osserva nel trattato con ORX-B+NMDA Ce, nel quale è evidente un forte calo ponderale (-100) (Fig. 27 B).





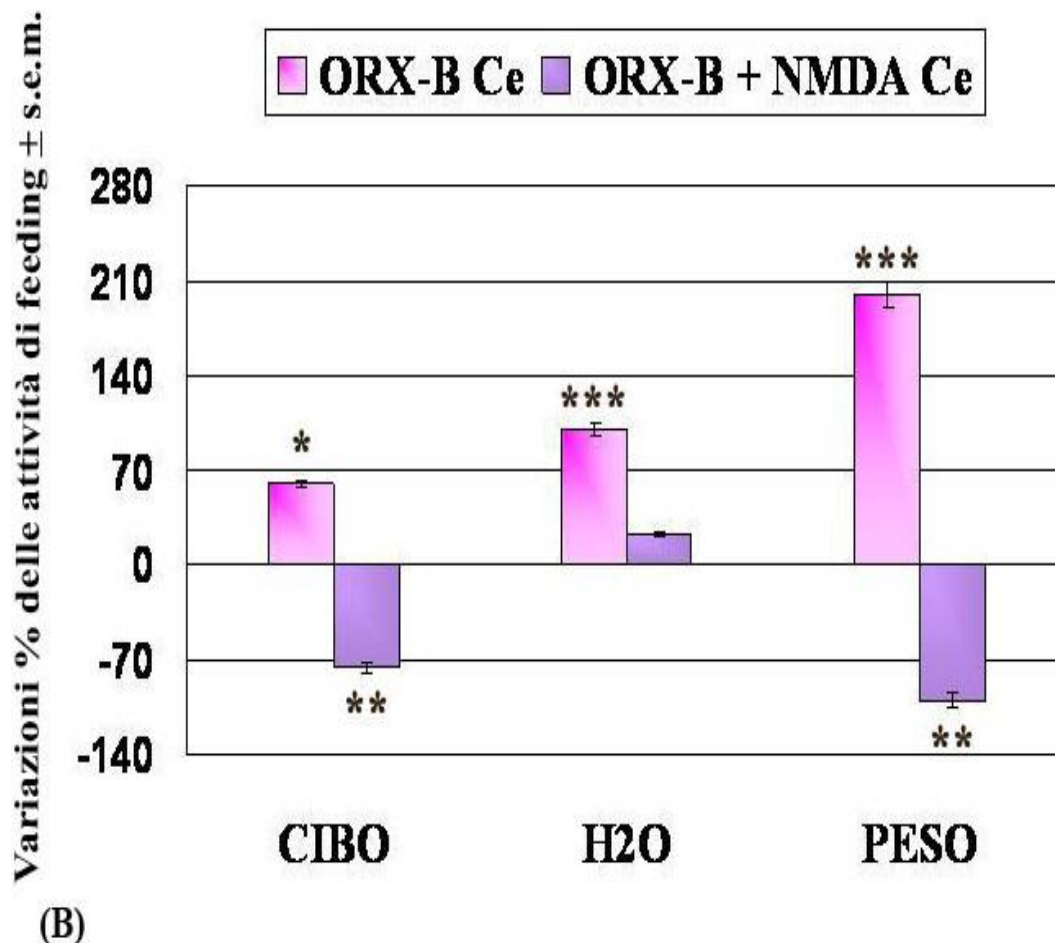
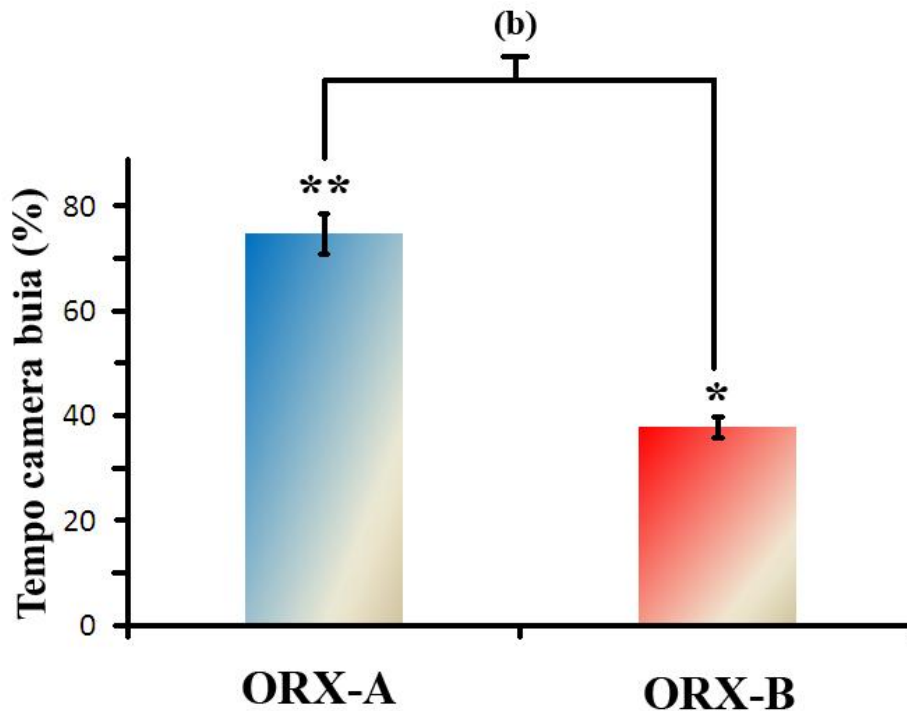


Fig. 27 Variazioni delle attività di feeding espresse in %  $\pm$  s.e.m di ibernanti trattati icv con ORXA Ce, ORXA+NMDA Ce, vs CTRL Ce (A); ORXB Ce, ORXB+NMDA Ce vs CTRL Ce (B). I valori sono stati confrontati mediante ANOVA e Post Hoc Test con *Neumann Keuls* (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3.5 Valutazioni comportamentali : LDT e EPM

Allo scopo di valutare l'effetto ansiolitico/ansigenico delle ORXs nel criceto dorato in prima fase di questo lavoro è stato condotto uno studio comportamentale mediante LDT 30 minuti dopo che gli animali sono stati sottoposti alla somministrazione nel Ce di ORX-A e ORX-B.

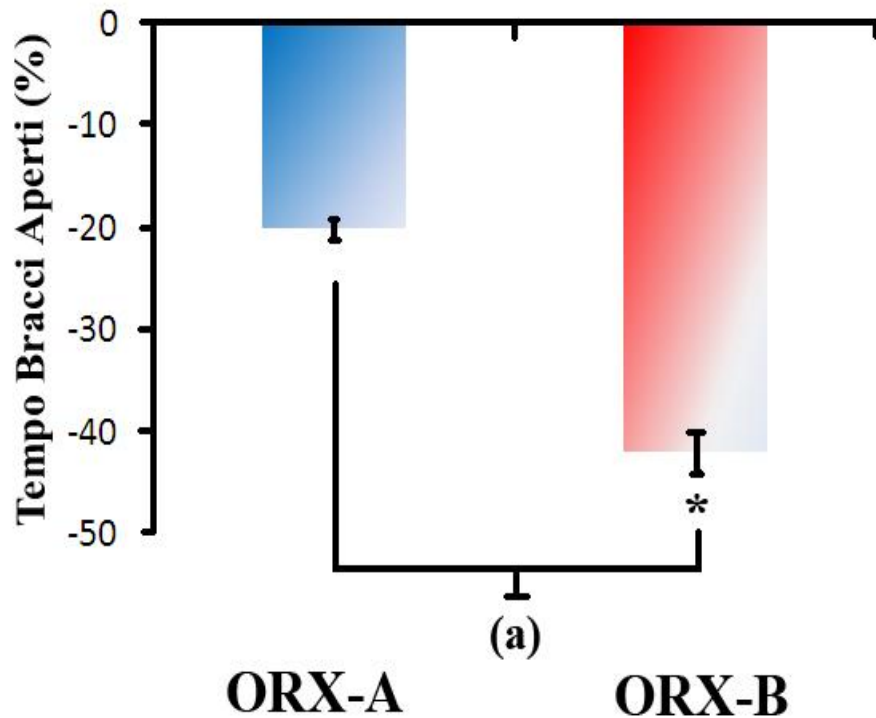
Gli esemplari di *Mesocricetus auratus* hanno dimostrato un effetto ansiogenico indotto da entrambe le ORXs, come mostra il forte aumento (+75%) del tempo trascorso nella camera buia dei criceti trattati con 3  $\mu$ l di ORX-A rispetto ai controlli (CTR). Analogamente la somministrazione di 3  $\mu$ l di ORX-B determina un aumento del tempo trascorso in questa stessa camera, tempo che in questo caso risulta moderato (+38%) rispetto ai CTRs (Fig. 28). Tuttavia, è interessante constatare che tale effetto risulta essere indotto in maniera significativamente forte ( $p < 0.01$ ) dall'ORX-A piuttosto che dall'ORX-B.



**Fig. 28** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A e ORX-B nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nella camera buia dell'LDT. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls* rispetto ai CTRs. a= \*p<0.05; b= \*\*p<0.01; c= \*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-B.

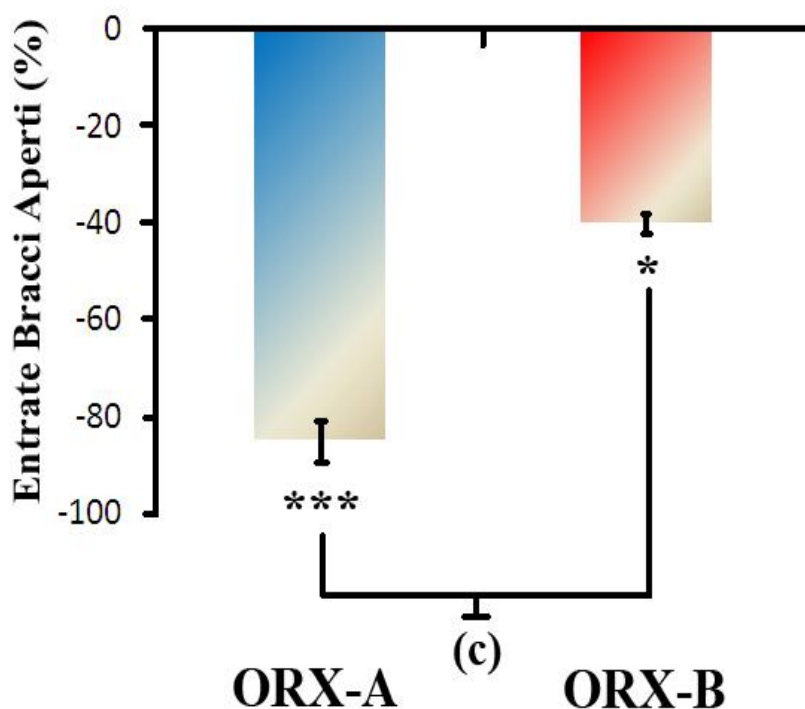
Successivamente, con l'intento di valutare meglio l'effetto ansiogenico indotto dalle ORXs è stata effettuata un'ulteriore analisi comportamentale mediante l'EPM, un test più sofisticato che mediante la valutazione di alcuni parametri etologici fornisce maggiori indicazioni relative allo stato d'ansia dell'animale.

In effetti, dalla Fig. 29 si può notare una moderata riduzione del tempo trascorso nei bracci aperti nei criceti trattati con ORX-B (-42%) rispetto ai CTRs che risulta essere moderatamente significativa (p<0.05) rispetto ai criceti trattati con ORX-A.



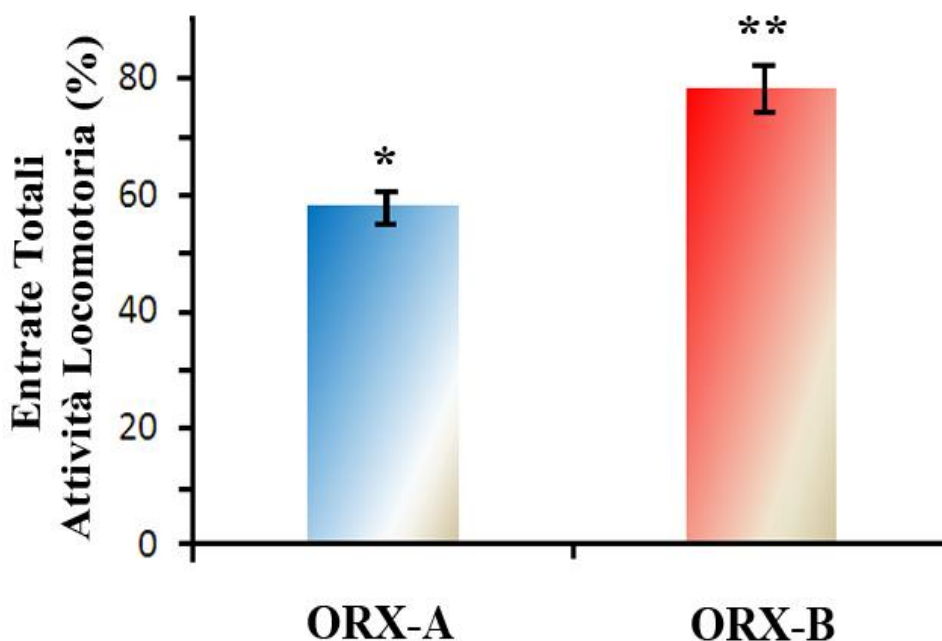
**Fig. 29** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A e ORX-B nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 rispetto ai CTRs. a,\*p<0.05; b,\*\*p<0.01; c,\*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-A o B.

Tuttavia, quando si è andati a valutare le differenze nel numero di entrate nei bracci aperti (Fig. 30) rispetto ai CTRs abbiamo constatato nei criceti trattati con ORX-A una riduzione molto forte di tale numero (-85%) mentre nei criceti trattati con ORX-B una riduzione moderata (-40%). E' inoltre interessante notare che tale effetto risulta essere indotto in maniera altamente significativa (p<0.001) dall'ORX-A piuttosto che dall'ORX-B.



**Fig. 30** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A e ORX-B nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 rispetto ai CTRs. a,\*p<0.05; b,\*\*p<0.01; c, \*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-A o B.

Dal momento che l'ORX-A e B hanno indotto un differente numero di entrate nei bracci aperti (Fig.30) si è poi proceduto con la valutazione degli effetti dalle ORXs sull'attività locomotoria reale dell'animale misurando il numero totale di entrate nei bracci aperti e chiusi. Da tale valutazione è emerso, un moderato (+58%) ed un forte (+78%) incremento di tale parametro nei trattati, rispettivamente, con ORX-A e ORX-B (Fig. 31).



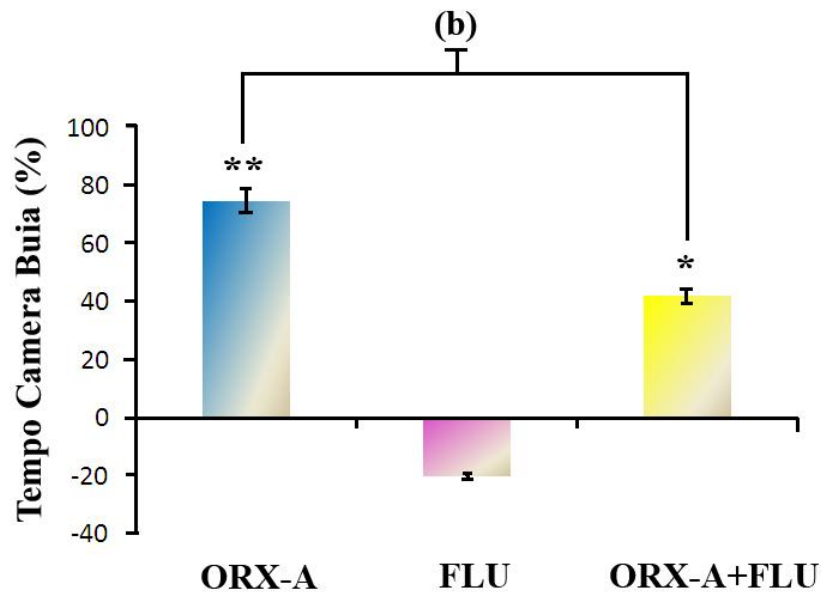
**Fig. 31** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A e ORX-B nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate totali (attività locomotoria). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001 rispetto ai CTRs. a, \* p<0.05; b, \*\* p<0.01; c, \*\*\* p<0.001 rispetto all'ORX-A o B.

### 3.6 Interazione tra sistema ORXergico e GABAergico

E' noto che diversi aspetti comportamentali, quali il feeding (White et al., 2005), l'attività locomotoria (Novak et al., 2006) ed il ciclo sonno-veglia (Sutcliffe et al., 2000) sono regolati dalle reciproche connessioni che intercorrono tra i neuroni ORXergici e GABAergici (Kotz et al., 2002). Pertanto, ulteriori informazioni circa il ruolo del sistema ORXergico negli stati d'ansia sarebbero utili per conoscere non solo la relazione tra le ORXs, l'ansia e specifiche aree cerebrali ma anche per comprendere gli effetti derivanti dall'interazione dell'ORX con il GABA<sub>A</sub>, in particolare con la subunità  $\alpha_2$ , un elemento chiave coinvolto nella regolazione dei comportamenti ansiosi.

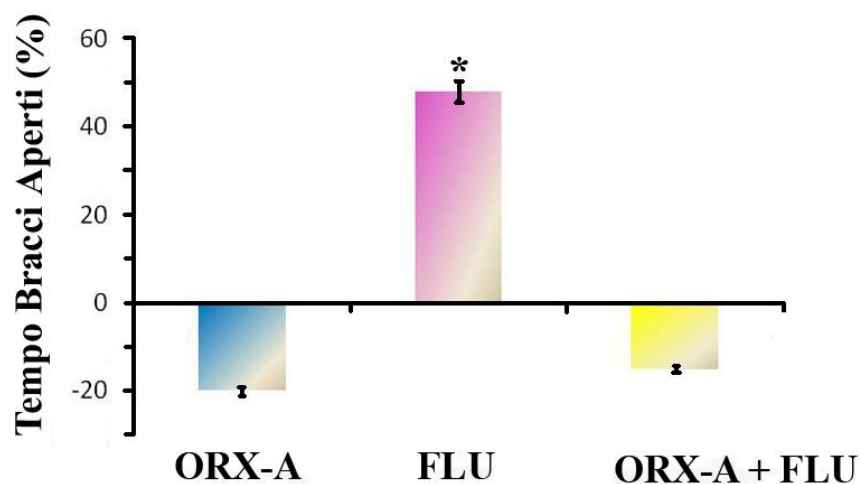
A tale proposito abbiamo inizialmente confrontato a livello del nucleo Ce dell'AMY l'effetto comportamentale dei singoli trattamenti con ORX-A, ORX-B e FLU con l'azione del cotrattamento di ORX-A o B insieme al FLU. Innanzitutto dall'analisi condotta mediante LDT è interessante osservare che criceti trattati con ORX-A rispetto ai CTRs mostrano un forte (+67%) incremento del tempo trascorso nella camera buia che è

moderato (+42%) dal cotrattamento con il FLU in maniera molto significativa ( $p < 0,01$ ) rispetto al singolo trattamento (Fig. 32).



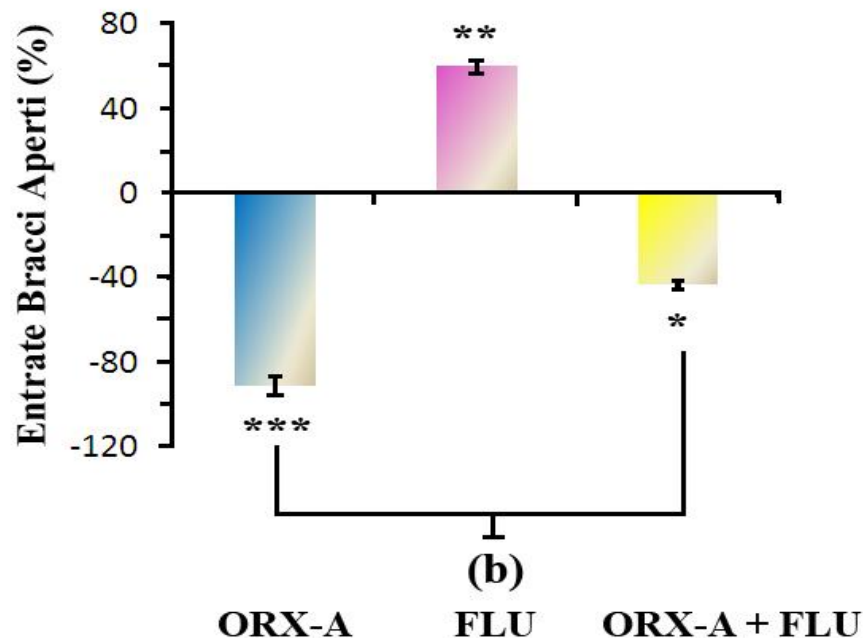
**Fig 32** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A, FLU e ORX-B+FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nella camera buia dell'LDT. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati  $n=3$  per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls* rispetto ai CTRs. a= \* $p < 0.05$ ; b= \*\* $p < 0.01$ ; c= \*\*\* $p < 0.001$  rispetto all'ORX-A+FLU.

Le successive valutazioni mediante l'EPM test mostrano rispetto ai CTRs un incremento, in seguito al solo trattamento con FLU, sia della percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti (Fig. 33), in maniera moderata (+48%) che del numero di entrate in questi stessi bracci (Fig. 34) in maniera forte (+60%).



**Fig. 33** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A, FLU e ORX-A + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti.

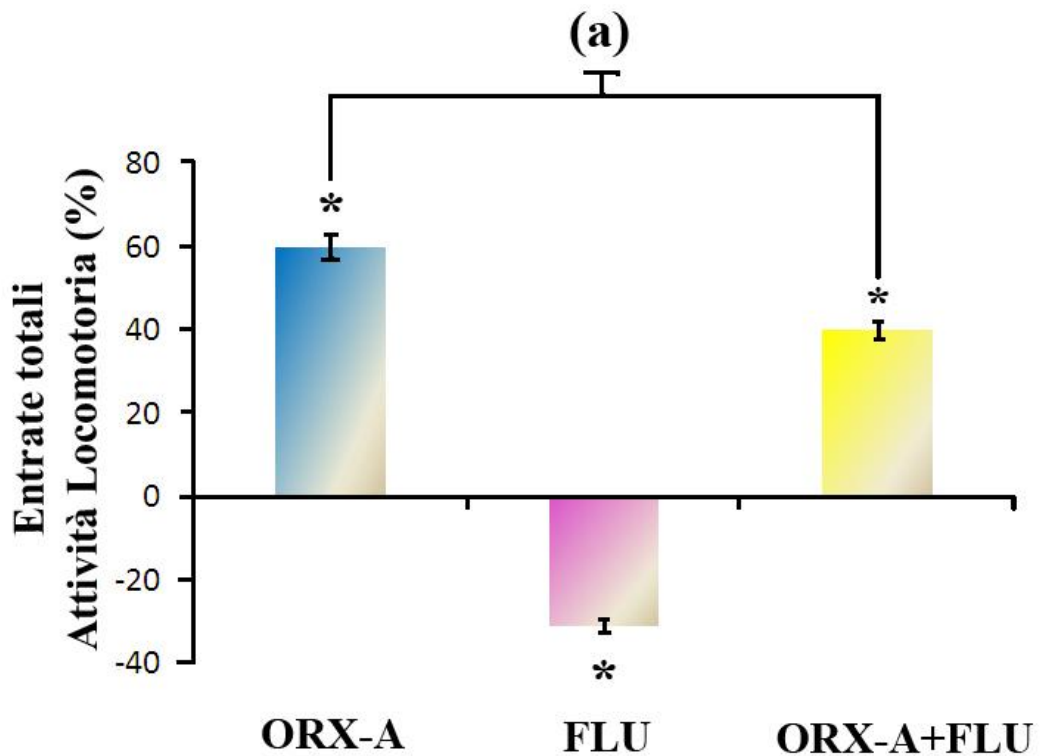
Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 rispetto ai CTRs. a, \*p<0.05; b, \*\*p<0.01; c, \*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-A o B.



**Fig. 34** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A, FLU e ORX-A + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 rispetto ai CTRs. a, \*p<0.05; b, \*\*p<0.01; c, \*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-A o B.

Contrariamente, la sola somministrazione di ORX-A determina una riduzione molto forte (-91%) della percentuale di entrate nei bracci aperti rispetto ai CTRs che è meno (-43%) ridotta dal cotrattamento con il FLU in maniera molto significativa (p<001) rispetto alla sola somministrazione con ORX-A (Fig. 34).

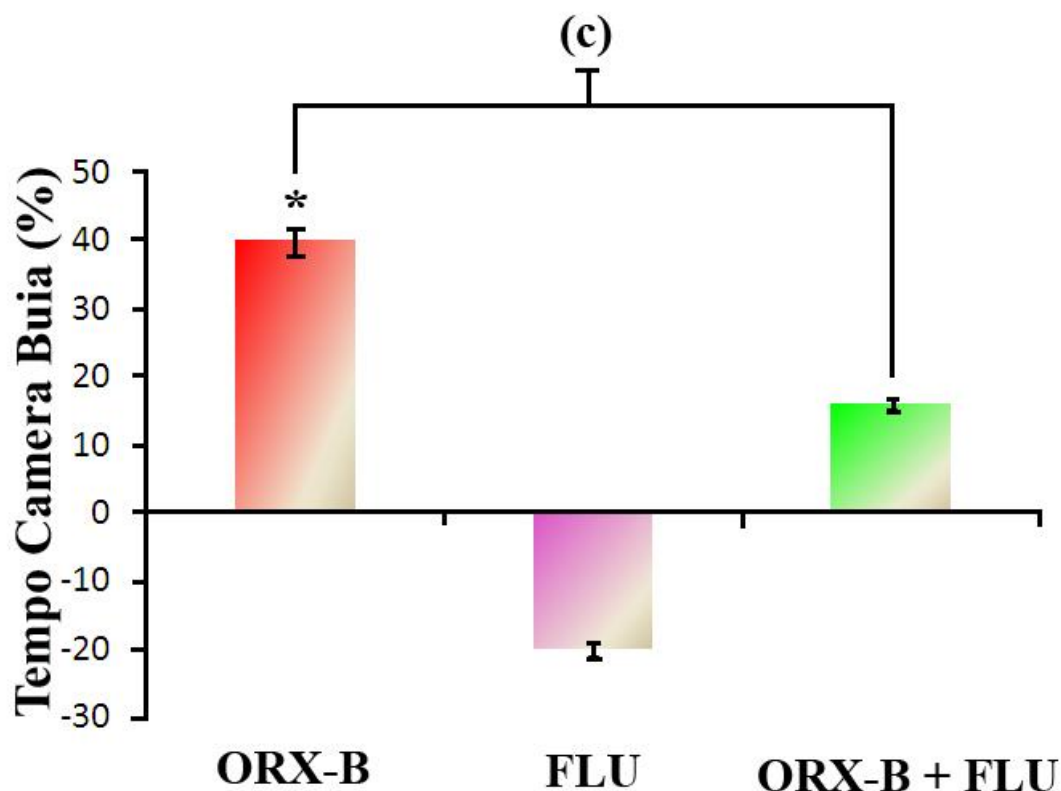
Comunque, la valutazione degli effetti dalle ORXs sull'attività locomotoria reale dell'animale (Fig. 35) ha evidenziato un moderato incremento di tale attività indotto sia dalla singola somministrazione di ORX-A (+60%) che dal cotrattamento con FLU (+40%). Anche in questo caso la sola somministrazione di FLU è in grado di indurre una riduzione moderata (-31%) dell'attività locomotoria dell'animale.



**Fig. 35** Effetto di iniezioni ICV di ORX-A, FLU e ORX-A + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate totali (attività locomotoria). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati  $n=3$  per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  rispetto ai CTRs. a, \* $p<0.05$ ; b, \*\* $p<0.01$ ; c, \*\*\* $p<0.001$  rispetto all'ORX-A o B.

Per quanto concerne gli effetti indotti dall'interazione dell'altro tipo di ORX, l'ORX-B, con la subunità  $\alpha_2$  del GABA<sub>A</sub> le iniziali valutazioni comportamentali condotte mediante il primo test, il LDT, hanno evidenziato rispetto ai CTRs un moderato (+40%) incremento del tempo trascorso nella camera buia dei criceti trattati indotto dall'ORX-B, incremento che risulta essere ridotto in maniera altamente significativa ( $p<0.001$ ) rispetto al singolo trattamento con ORX-B (Fig. 36).





**Fig. 36** Effetto di iniezioni ICV di ORX-B, FLU e ORX-B+FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nella camera buia dell'LDT. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls* rispetto ai CTRs. a= \*p<0.05; b= \*\*p<0.01; c= \*\*\*p<0.001 rispetto all'ORX-B.

Procedendo sempre con la valutazione dell'interazione di ORX-B con la subunità  $\alpha_2$  del GABA<sub>A</sub>, le osservazioni comportamentali condotte mediante l'EPM test, mostrano nei criceti trattati con ORX-B rispetto ai CTRs un moderato decremento (-42%) sia del tempo trascorso nel braccio aperto (Fig. 37) che della percentuale di entrate in tali bracci (Fig. 38).

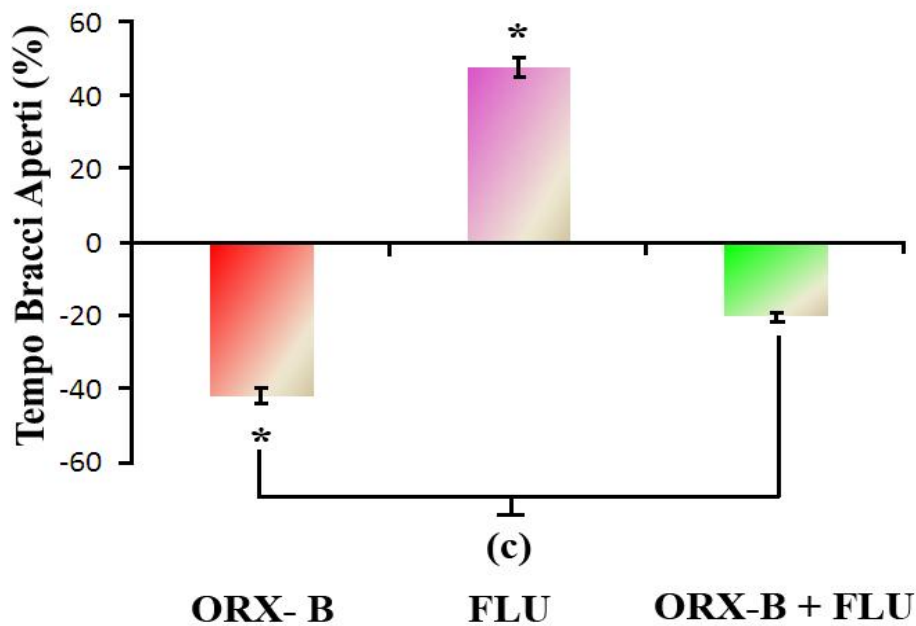


Fig. 37 Effetto di iniezioni ICV di ORX-B, FLU e ORX-B + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto ai CTRs. a, \*  $p < 0.05$ ; b, \*\*  $p < 0.01$ ; c, \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto all'ORX-A o B.

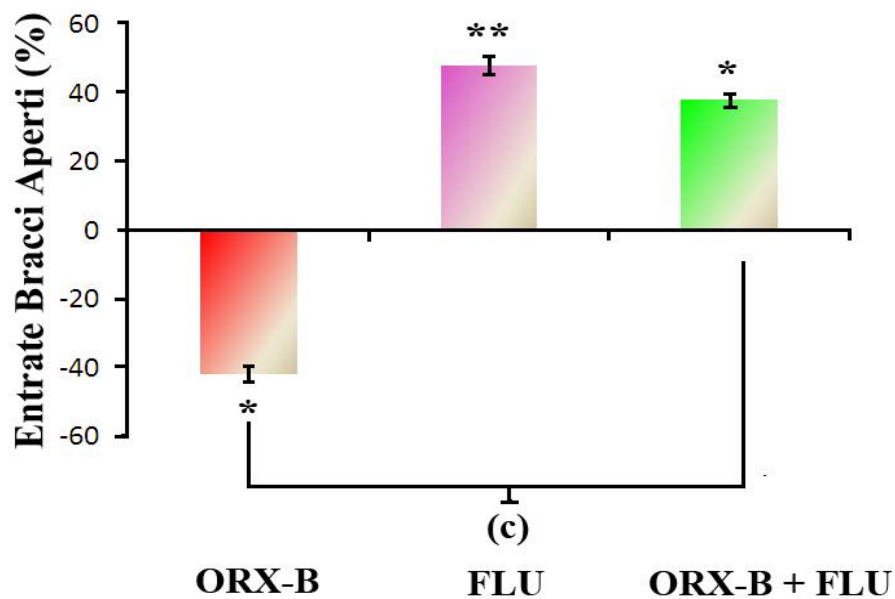


Fig. 38 Effetto di iniezioni ICV di ORX-B, FLU e ORX-B + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati n=3 per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente

confrontate con *Neumann Keuls*. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto ai CTRs. a, \*  $p < 0.05$ ; b, \*\*  $p < 0.01$ ; c, \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto all'ORX-A o B.

In particolare nel caso dell'ORX-B si verifica un moderato (+38%) aumento della percentuale di entrate nei bracci aperti indotta dal cotrattamento con il FLU (Fig. 38).

Infine, la successiva valutazione dell'attività locomotoria dell'animale ha evidenziato rispetto ai CTRs un forte incremento (+78%) di tale attività indotto dall'ORX-B che è ridotto dal cotrattamento con il FLU in modo molto significativo ( $p < 0.01$ ) rispetto all'effetto indotto dalla sola somministrazione di ORX-B (Fig. 39).

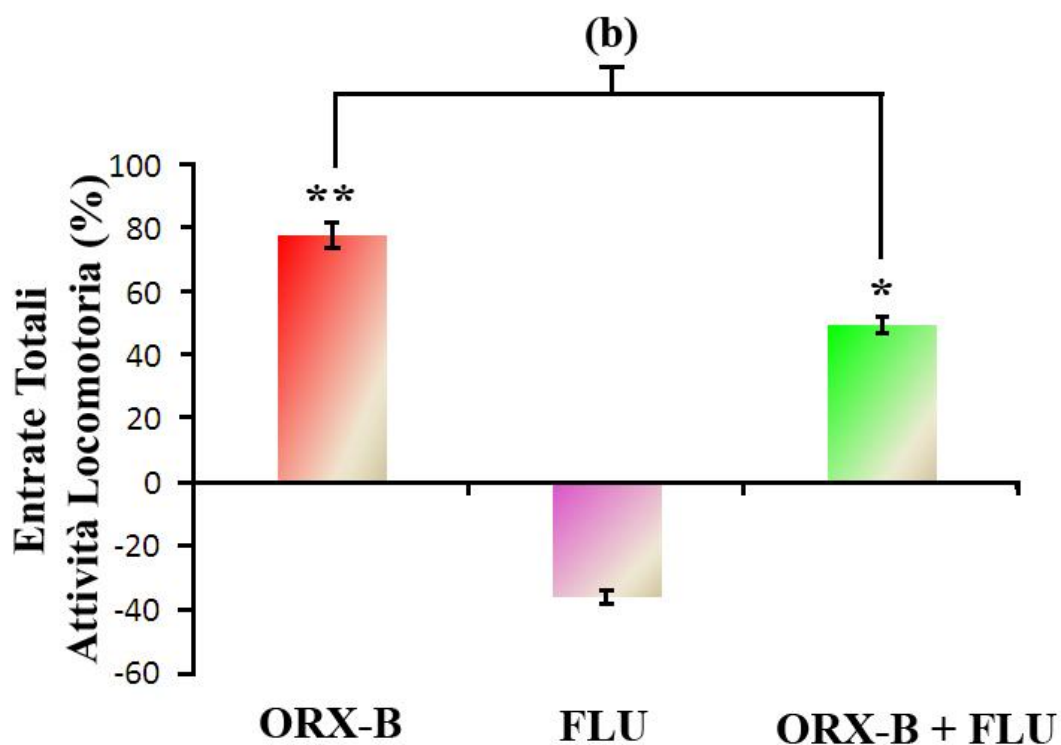


Fig. 39 Effetto di iniezioni ICV di ORX-B, FLU e ORX-B + FLU nel nucleo Ce dell'AMY. I dati sono espressi come percentuale di entrate totali (attività locomotoria). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$  s.e.m e gli animali sono stati  $n=3$  per gruppo. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA e successivamente confrontate con *Neumann Keuls*. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto ai CTRs. a, \*  $p < 0.05$ ; b, \*\*  $p < 0.01$ ; c, \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto all'ORX-A o B.