

ANIMALI NELLA RICERCA BIOLOGICA

ANNO 2011/2012

Le scienze biologiche presentano diversi livelli di analisi:

Molecola

Cellula

Tessuto

Organo

Sistema di organi

INDIVIDUO/ORGANISMO

Popolazioni della stessa specie

Comunità di diverse specie

Ecosistema

Nel PROCESSO DI SINTESI E ANALISI più si osserva qualcosa nella sua complessità più si ha un quadro completo di ciò che sta succedendo; più si entra in un processo analitico (andare nel dettaglio) più si capisce il particolare perdendo però di vista il generale.

A qualsiasi livello si lavori il fine ultimo, nella maggior parte dei casi, riguarda l'individuo.

Il punto di riferimento è sempre l'organismo perché tutta la biologia moderna opera nell'ambito di una teoria unificante: TEORIA EVOLUZIONISTICA. Infatti, l'evoluzione sia molecolare che cellulare si valuta a livello dell'organismo su cui agiscono:

- La selezione naturale, in termini di riproduzione e sopravvivenza.
- Mutazioni o modificazioni
- Ricercatori nella valutazione di un farmaco a livello della sua azione sistemica.
- La morte, se l'individuo presenta "problemi", che determina quindi la morte dei sistemi, degli organi, dei tessuti, delle cellule con conseguenze anche nei livelli di analisi superiori.

OBBIETTIVO DEL CORSO:

Capire come, in che modo e perché gli animali possano essere usati nella ricerca biologica e in quale maniera organizzare la ricerca con modelli organismici.

L'utilizzo di un modello animale non implica solo uno studio applicato ma anche che le informazioni acquisite siano esportabili in un ambito più ampio. Si deve partire dal presupposto che ci siano delle somiglianze tra specie diverse che fanno sì che le conoscenze acquisite in una specie siano esportabili in altre specie.

LA SIMILARITA' TRA SPECIE E' LA CHIAVE DI TUTTO.

Es. Studio della contrazione muscolare nel topo per estendere l'info. Ad altri vertebrati (similarità di contrazione muscolare nei vertebrati).

La scelta di un modello animale implica:

- La conoscenza della biologia degli animali;
- Una serie di scelte tra cui quella etica.

www.tolweb.org/tree sito usato allo scopo di esprimere il concetto di Clade: gruppo tassonomico di organismi con antenato singolo comune. I discendenti di quell'antenato esprimono caratteristiche simili all'antenato stesso.

Es. Eucarioti: Clade le cui caratteristiche unificanti sono il citoscheletro, i mitocondri, DNA organizzato in cromosomi, ribosomi.

Questo sito permette quindi di effettuare la scelta dell'organismo modello in base allo studio di interesse:

Es. Uso di *Drosophila* per studi sullo sviluppo del corpo di organismi bilaterali essendo la stessa *Drosophila* un animale a simmetria bilaterale.

CONDIVISIONE DEL PATRIMONIO GENETICO CON UOMO:

98% PRIMATI

94% TOPI E RODITORI

50% BANANA

Le funzioni vitali sono antichissime e condivise da tutti gli organismi viventi.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Perché è importante valutare gli effetti di una molecola di sintesi a livello di un organismo?
2. Che specie posso usare per delle ricerche su un meccanismo di funzionamento dei mitocondri?
3. Perché esistono regole sulla sperimentazione animale?

RISPOSTE:

1. Perché anche considerando l'effetto specifico non è prevedibile l'effetto globale.
2. E' possibile utilizzare tutti gli organismi che presentano mitocondri ad esempio gli eucarioti in quanto le loro cellule presentano mitocondri.
3. Le regole esistono per tutelare il ricercatore e il benessere degli animali, garantire risultati migliori, l'opinione pubblica evitando movimenti contro la sperimentazione animale e la riproducibilità dei dati, ottimizzare e standardizzare le procedure. Tutte ragioni legate ad aspetti etici e sperimentali.

AREE DI RICERCA ANIMALE:

- Allevamento di animali da laboratorio 44% permette ricerca e sviluppo di nuovi trattamenti
- Ricerca di base 35% permette ricerca per la conoscenza.
- Sviluppo di nuovi trattamenti 18% es. ricerca preclinica.
- Safety test 2% per testare la sicurezza di prodotti non medici usati in casa, agricoltura e industria. (I cosmetici non sono più testati sugli animali dal 1998)
- Sviluppo di metodi di diagnosi 1%.

NUMERO DI ANIMALI:

In UK sono usati più di 3 milioni e mezzo di animali per procedure scientifiche in un anno.

Circa lo stesso numero di 20 anni fa. Negli anni '90 c'è stato un decremento della sperimentazione dovuto all'introduzione di regole più severe; in oltre da metà degli anni '80 molti esperimenti vengono effettuati su animali con modificazioni genetiche o mutazioni dannose che è il motivo dell'incremento del numero di procedure su animali negli ultimi anni.

TIPI DI ANIMALI:

- 82% roditori
- 18% pesci, anfibi, rettili
- 0,8% grandi mammiferi
- 0,4 piccoli mammiferi (furetti-conigli ecc)
- 0,1% gatti e cani
- < 0,1% primati

Scimpanzé e orangotango non sono stati usati in UK per più di 20 anni e ora il loro utilizzo è stato bandito.

GRUPPI ANIMALISTI

www.animaliberationfront.com

www.infolav.org

Motivi su cui si basano per contrastare la ricerca animale:

- Animali e uomo sono diversi;
- Animali e uomo soffrono di patologie differenti;
- La sperimentazione non è utile

Gruppi animalisti estremisti basano le loro motivazioni anche su argomenti religiosi.

Nei siti sono utilizzate parole e immagini a forte impatto emotivo. Spesso sono diffuse informazioni che presentano una prospettiva sbagliata di quelle che sono le proporzioni del numero degli animali usati, la sofferenza e il danno provocato.

Es. Immagine della scimmia con cranio aperto con elettrodi inseriti nel cervello (immagine forte)... l'animale presenta sofferenza limitata in quanto il cervello non presenta sensori per il dolore. Oltre alle immagini di primati sono inserite soprattutto quelle di gatti e cani che sono tutti usati in % bassissime.

LE TRE R:

- Replace (rimpiazza)
- Reduce (riduci)
- Refine (raffina-migliora)

Le regole esistono per motivi etici, scientifici, legali ed economici e si decidono su criteri che si basano sulle tre R.

1. **RIDUCI:** Ridurre al massimo il numero di animali quindi usarne il numero minore per ottenere quell'informazione o ottenere il massimo numero di informazioni dallo stesso numero di animali.
2. **RIMPIAZZA:** Utilizzare in alternativa all'animale, quando si può, test in vitro, in silico o altre specie.
3. **RAFFINA:** Usare procedure migliori o migliorabili in modo da ridurre il danno e il dolore all'animale, riducendo anche l'errore e la variabilità per ottenere migliore riproducibilità.

Es. Combinazione delle 3 R: LD50 (bandita in UK), sono stati individuati test migliori per individuare la dose tossica di un farmaco. Permettono di ottenere la stessa informazione della LD50 ma usando meno animali ed in modo che nessuno riceva la dose tossica intenzionalmente.

Es. Sostituzione del procedimento di dissezione a scopo didattico con ricostruzioni virtuali.

E' importante sapere e partire dal concetto che i ricercatori sono esseri umani come tutti gli altri e non hanno al desiderio di maltrattare gli animali. Molti di questi scienziati lavorano per determinare le migliori condizioni di benessere per gli animali in studio o per ottenere lo sviluppo di metodi scientifici tali da poter ridurre la necessità degli animali fino a rimpiazzarli completamente.

Il benessere degli animali ha un interesse anche scientifico in quanto un animale in condizioni di stress può determinare risultati falsati.

E' utile quindi:

- Migliorare le condizioni di vita degli animali in cattività (refine).
- Ridurre la variabilità negli animali in modo da ottenere risultati più omogenei e ridurre quindi la quantità di animali necessari.
- Utilizzare metodi statistici migliori per ridurre il numero di animali e ottenere risultati migliori.
- Utilizzare bene la letteratura per evitare la riproduzione di esperimenti scientifici.

OPINIONE PERSONALE è importante per un ricercatore per dare un senso a ciò che si fa e per valutare che gli esperimenti effettuati siano utili e i risultati non possano essere ottenuti in altro modo. E' importante anche per poter sostenere le proprie azioni anche davanti a chi si oppone e per verificare che le proprie azioni siano in linea con la propria etica.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE

1. Da cosa dipende l'accettare o non accettare la ricerca sugli animali?
2. Perché è importante per un biologo sviluppare una propria opinione sulla ricerca sugli animali?
3. I movimenti animalisti possono contribuire nel miglioramento della sperimentazione animale? In che modo?

RISPOSTE

1. Dipende dall'essere a conoscenza che la ricerca è utile necessaria e insostituibile.
2. Per avere un atteggiamento critico sperimentale e etico nei confronti della propria ricerca mantenendo sempre la coerenza nel decidere se i pro di quello che si fa superano i contro, in questo modo è possibile sostenere ciò che si fa anche davanti a chi si oppone.
3. Nel sensibilizzare il ricercatore nei confronti della ricerca stessa. Da entrambi i fronti è necessario un confronto supportato da informazioni aggiornate e approfondimenti sugli argomenti discussi.

REGOLE SULLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

E' necessario conoscere la distinzione tra etica e scienza.

Etica e scienza sono le due colonne che supportano la sperimentazione animale e non sono contrastanti tra loro.

La scienza fornisce le informazioni necessarie a scrivere delle regole sensate, l'etica pone i limiti che si danno alle regole.

Etica dipende da conoscenza e la conoscenza è fondata sull'etica.

Se si fa scienza sulla base di regole etiche le conoscenze saranno limitate da ciò che possiamo fare, viceversa l'etica sperimentale dipende da ciò che si sa (e quindi formata sulla base della nostra conoscenza).

Es. pratici:

Se si stabilisce che è meno peggio fare esperimenti invasivi su un topo piuttosto che su un macaco dipende dal fatto che le nostre conoscenze pregresse ci dicono che tra le due specie il topo ha minor sviluppo neurologico.

Se esistono risultati ottenuti senza seguire regole etiche (es. esperimenti nazisti) sarebbe ingiusto non usare quelle informazioni, soprattutto per le vittime che sarebbero morte inutilmente.

Le regole non sono fisse, né definite per sempre in quanto dipendono dall'avanzamento della scienza e dall'avanzamento della coscienza etica comune (generalmente è rappresentativa di una maggioranza).

Le regole sulla sperimentazione scientifica hanno origine da altre regole che miravano a tutelare il benessere animale.

Il primo atto riguardante gli animali e il loro benessere nacque nel luglio 1822 pubblicato da Re Giorgio IV e si chiama:

"Atto per pervenire al trattamento crudele e improprio del bestiame".

DIRETTIVA DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO SULLA
PROTEZIONE DEGLI ANIMALI UTILIZZATI A FINI SCIENTIFICI
...Regolamenta solo l'utilizzo scientifico.

Quando si stabiliscono delle regole è sempre necessario trovare un compromesso tra costi e benefici: qualsiasi ricerca è lecita se il beneficio è altissimo, nessuna ricerca è lecita se il beneficio è poco.

Il compromesso tra costi e benefici è il primo principio fondamentale che guiderà l'applicazione in pratica di queste regole.

La stesura delle regole **si ispira** a principi scientifici ed etici (dignità dell'animale, conoscenze sulla sofferenza animale ecc..) ma **viene guidata** da esatte strategie per definire le regole (3 R).

ANALISI DELLA DIRETTIVA DELLA COMUNITA' EUROPEA SULLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE:

(2) Il benessere degli animali è un valore dell'Unione sancito dall'articolo 13 del trattato sul funzionamento dell'Unione europea .

Spiega: il benessere degli animali per la comunità europea è un principio importante, irrinunciabile.

(6) Sono disponibili nuove conoscenze scientifiche con riguardo ai fattori che influenzano il benessere degli animali nonché alla loro capacità di provare ed esprimere dolore, sofferenza, angoscia e danno prolungato. Per tale motivo è necessario migliorare il benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime per la loro tutela in linea con i più recenti sviluppi scientifici.

Spiega: poiché la nostra conoscenza è cambiata rispetto alla prima direttiva dell' 1986 è necessario scriverla di nuovo.

(7) L'atteggiamento nei confronti degli animali dipende anche dalla percezione nazionale e in taluni Stati membri vi è l'esigenza di mantenere norme in materia di benessere degli animali più ampie di quelle approvate a livello dell'Unione.

Spiga: l'etica è una percezione e non è uguale per tutti i paesi dell'unione ed è quindi necessario trovare un compromesso più o meno condiviso da tutti.

(8) Oltre agli animali vertebrati, che comprendono i ciclostomi, è opportuno includere anche i cefalopodi nell'ambito di applicazione della presente direttiva, poiché è scientificamente dimostrato che possono provare dolore, sofferenza, angoscia e danno prolungato.

Spiega: Le nuove conoscenze ci obbligano a tutelare nuovi animali.

(11) La cura e l'uso di animali vivi a fini scientifici sono disciplinati dai principi, sanciti a livello internazionale, della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento.

Spiega: Questo articolo cita le 3R che sono le strategie principali su cui si basano tutte le seguenti regole. Le 3R sono principi ampiamente condivisi e ciò rende le regole più forti.

(12) Gli animali hanno un valore intrinseco che deve essere rispettato.

Spiega: viene riconosciuto in un testo di legge da non più di 30 anni, è un concetto nuovissimo.

L'uso degli animali nelle procedure suscita anche preoccupazioni etiche nell'opinione pubblica. Pertanto, gli animali dovrebbero sempre essere trattati come creature senzienti e il loro utilizzo nelle procedure dovrebbe essere limitato ai settori che possono giovare in ultimo alla salute degli uomini e degli animali o all'ambiente.

Pertanto, l'uso di animali a fini scientifici o educativi dovrebbe essere preso in considerazione solo quando non sia disponibile un'alternativa non animale. L'uso di animali nelle procedure scientifiche dovrebbe essere proibito in altri settori di competenza dell'Unione.

Spiga: la ricerca è lecita se ha dei chiari benefici, altrimenti non si fa sugli animali.

(13) La scelta dei metodi e delle specie da utilizzare ha conseguenze dirette sul numero di animali utilizzati e sul loro benessere. È opportuno pertanto che la scelta dei metodi assicuri la selezione del metodo in grado di fornire i risultati più soddisfacenti causando il minor dolore, sofferenza o angoscia possibile. I metodi selezionati dovrebbero usare il minor numero possibile di animali per fornire risultati affidabili e ricorrere all'uso di specie con la minore capacità di provare dolore, angoscia, sofferenza o danno prolungato, che siano ottimali per l'estrapolazione nelle specie bersaglio.

Spiga: il brano racchiude le 3R e sottolinea il fatto che è necessario trovare compromessi anche nell'utilizzo delle 3R stesse.

(15) Gli animali dovrebbero essere soppressi solo da personale competente usando un metodo opportuno per la specie.

Spiga: uso di termini sopprimere o uccidere al posto di sacrificio o altri termini.

In fondo alla direttiva ci sono i sistemi permessi per la soppressione di ogni specie.

(17)...l'uso di primati non umani dovrebbe essere autorizzato solo ai fini della ricerca di base, della conservazione delle rispettive specie di primati non umani o quando i lavori, compreso lo xenotrapianto, sono svolti in relazione ad affezioni umane potenzialmente letali o in relazione a casi che abbiano un sensibile impatto sulla vita quotidiana della persona, ossia affezioni debilitanti.

Spiega: i primati per la ricerca generalmente non possono essere utilizzati. Tranne nelle condizioni descritte sopra se non ci sono alternative.

(18) L'uso delle scimmie antropomorfe, in quanto specie più vicine all'essere umano dotate delle competenze sociali e comportamentali più avanzate, dovrebbe essere autorizzato unicamente ai fini di ricerche volte alla conservazione di dette specie, e qualora sia necessario intervenire per un'affezione potenzialmente letale e debilitante per l'essere umano, e nessun'altra specie o metodo alternativo sarebbe sufficiente per raggiungere gli scopi della procedura. È opportuno che lo Stato membro che invoca tale necessità fornisca le informazioni necessarie affinché la Commissione possa prendere una decisione in merito.

Spiega: le scimmie antropomorfe non possono essere usate, sono concessi solo rari casi. Se si ha la necessità di utilizzare questi animali è necessario richiedere autorizzazione direttamente alla comunità europea.

(20) Determinate specie di animali vertebrati utilizzate nelle procedure devono essere allevate appositamente a tale scopo affinché le persone che effettuano le procedure possano conoscerne a fondo il patrimonio genetico, biologico e comportamentale. Tali conoscenze migliorano la qualità scientifica e l'affidabilità dei risultati e riducono la variabilità, in definitiva diminuendo il numero di esperimenti e l'uso di animali. Inoltre, per motivi legati al benessere e alla conservazione animale, l'uso negli esperimenti di animali prelevati dall'ambiente naturale dovrebbe essere limitato ai casi in cui è impossibile raggiungere lo scopo usando animali allevati appositamente per essere utilizzati nelle procedure.

(28) Il benessere degli animali usati nelle procedure dipende fortemente dalla qualità e dalla competenza professionale del personale incaricato della supervisione e delle persone che conducono le procedure o controllano le persone incaricate della cura giornaliera degli animali. Gli Stati membri dovrebbero assicurare mediante autorizzazione o con altri mezzi che il personale abbia un livello di istruzione, formazione e competenza adeguati. Inoltre è importante che il personale sia controllato finché non abbia acquisito e dato prova delle competenze richieste. Orientamenti non vincolanti a livello dell'Unione sui requisiti in materia di istruzione promuoverebbero a lungo termine la libera circolazione del personale.

Spiega: L'Italia non ha un corso di laurea o professionale per fare il tecnico di laboratorio che si occupa degli animali (in quasi tutti i paesi c'è).

(31) Nella detenzione, nell'allevamento e nell'uso degli animali si dovrebbe attribuire la massima priorità a considerazioni relative al benessere degli animali. Pertanto, gli allevatori, i fornitori e gli utilizzatori dovrebbero essere dotati di un organismo preposto al benessere degli animali il cui compito principale sia di fornire consulenza su questioni relative al benessere degli animali.

Spiega: viene imposto anche a allevatori, i fornitori e utilizzatori la presenza di un organismo di controllo interno che assicuri il benessere animale.

(39) È altresì di fondamentale importanza garantire, per ragioni sia morali che scientifiche, che ogni utilizzo di un animale sia attentamente valutato considerando la validità, l'utilità e la pertinenza scientifica o educativa del risultato che si prevede di ottenere da tale utilizzo. Il possibile danno arrecato agli animali dovrebbe essere misurato in relazione ai benefici attesi dal progetto. Pertanto, nella procedura di autorizzazione dei progetti che prevedono l'uso di animali vivi dovrebbe essere effettuata una valutazione del progetto imparziale e indipendente dai responsabili dello studio. L'attuazione efficace della valutazione di un progetto dovrebbe anche prevedere un'analisi adeguata del ricorso a nuove tecniche di sperimentazione scientifica che si rendono disponibili.

Spiega: E' necessaria una valutazione delle procedure sperimentali da enti imparziali e indipendenti dai responsabili dello studio per ottenere l'autorizzazione.

(42) Per gestire i rischi per la salute umana e animale e per l'ambiente, la legislazione dell'Unione prevede che sostanze e prodotti possano essere immessi in commercio solo previa comunicazione di dati appropriati riguardanti la loro sicurezza ed efficacia. Per alcuni requisiti ciò è possibile soltanto ricorrendo alla sperimentazione animale, di seguito denominata «sperimentazione regolatoria». È necessario introdurre misure specifiche per incrementare l'uso di approcci alternativi ed eliminare inutili ripetizioni della sperimentazione regolatoria. A tal fine, gli Stati membri dovrebbero riconoscere la validità dei dati sperimentali ottenuti con i metodi previsti dalla legislazione dell'Unione.

Spiega: sperimentazione regolatoria, ossia test di tossicità definiti obbligatori per legge. Non è possibile eliminare completamente questa necessità (safety test 2%).

(47) ...Necessità di elaborare nuovi metodi e sottoporli a convalida non cessa di crescere e impone di istituire formalmente un laboratorio di riferimento dell'Unione per la convalida di metodi alternativi. Tale laboratorio dovrebbe essere indicato come il Centro europeo per la convalida di metodi alternativi...

Spiega: fondare centri a scopo di validare metodi alternativi di sperimentazione.

(49) I progressi tecnici e scientifici nella ricerca biomedica possono essere tanto rapidi quanto l'aumento delle conoscenze sui fattori che influenzano il benessere animale. Per questo occorre prevedere la possibilità di una revisione della presente direttiva. È opportuno che detta revisione esamini la possibilità di sostituire l'uso degli animali, in particolare dei primati non umani, in via prioritaria laddove possibile, tenuto conto del progresso scientifico. La Commissione dovrebbe altresì effettuare periodicamente riesami tematici con riguardo alla sostituzione, alla riduzione e al perfezionamento dell'uso degli animali nelle procedure.

Spiega: poiché le conoscenze sul benessere animale avanzano insieme alla sperimentazione stessa si comunica che la direttiva potrà essere rivista nei prossimi anni.

La legge determina anche le modalità di operazione.

Estratto da "Molecular Biology":

Per ottenere risultati sperimentali migliori è necessario minimizzare la variabilità degli animali da laboratorio dovuta al genotipo e all'ambiente.

Minore variabilità maggiore forza del dato statistico.

Fattori che possono confondere il dato sperimentale:

- Animale: età, sesso, condizione, ceppo, condizione riproduttiva.
- Ambiente: condizioni climatiche (luce, temperatura ecc.), alimentazione, ambiente sociale, stimoli ambientali, pulizia, gabbia.
- Ricercatore: addestramento, attenzione o professionalità.
- Metodi di indagine: modalità di rilevamento (manuale/automatico), scelta delle statistiche.

Gli istituti di ricerca generalmente hanno una loro Policy cioè scrivono, basandosi sulla direttiva, una loro regolamentazione; spesso più restrigente che permette di rendere noto all'opinione pubblica in che modo e su che principi viene effettuata la sperimentazione animale. Es. <http://www.cam.ac.uk/research/about/research-overview/policy-on-the-use-of-animals-in-research-and-teaching/>

Policy on the use of animals in research and teaching

Research using animals has made, and continues to make, a vital contribution to the understanding, treatment and cure of major human and animal health problems; including cancer, heart disease, polio, diabetes and neurological diseases and disorders. While new methods have enabled scientists and medical researchers to reduce studies involving animals, some work must continue for further fundamental advances to be made.

The University of Cambridge only uses animals in research where there are no alternatives. In fact, the law demands that where a non-animal approach exists, it should be used. The principles of reduction, refinement and replacement of animals in research (the '3Rs') underpin all related work carried out at the University; ensuring that the number of animals used is minimised and that procedures, care routines and husbandry are refined and regularly reviewed to maximise welfare.

Until satisfactory alternatives have been developed, the processes of discovery, enquiry and teaching require procedures that involve animals in order to gain a knowledge and understanding of structure, physiological and pathological processes, and in order to pass on knowledge to students.

Scientists at Cambridge, and elsewhere, are seeking ways to reduce the number of animals needed for their research and for teaching; indeed they have been instrumental in devising a number of such alternative methods. However, 'alternative' tests and models have yet to be developed that can properly reproduce the complex biological characteristics of man and animals, and studies of wild animals in their natural environment will always require the involvement of the animals themselves.

Riguardo a Ferrara: www.unife.it/ricerca/sperimentazione-animale

The screenshot shows the website interface for 'Sperimentazione animale' on the UNIFE website. The header includes the UNIFE logo, the word 'RICERCA', and navigation links for 'Contatti', 'Telefono-Email', 'Cerca', and 'A A A'. An 'Accedi' button is in the top right. The left sidebar contains a menu with items like 'Home', 'Banche dati', 'Strutture', 'Finanziamenti e gestione', 'Valutazione Qualità della Ricerca (VQR) 2004-2010', 'Valorizzazione', 'Sperimentazione animale', 'Dottorati di ricerca', and 'Link'. The main content area is titled 'Sperimentazione animale' and shows a list of links: 'Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (C.E.A.S.A.)', 'Ricerca con Sperimentazione animale - Modulistica', 'Decreto Legislativo 27 Gennaio 1992, n.116', 'Adozione Animali da esperimento NEW', and 'Obiezione di coscienza'. A hamster image is displayed to the right of the list. Below the image are icons for email and a printer. On the right side, there are two boxes: 'Ricerca Nazionale - Bandi' with sub-items 'Bandi Nazionali', 'Bandi di Ateneo', and 'Altre opportunità di finanziamento', and 'Giornate formative' with sub-items 'Incontri, convegni, seminari in materia di Ricerca Nazionale'. Both boxes have a 'vai alla pagina' link.

Comitato etico: organismo di autocontrollo che gli istituti di ricerca devono avere per validare le ricerche. La valutazione viene fatta da un gruppo di persone con competenze diverse (scientifiche, legislative, etiche).

Se il comitato etico dà parere positivo alla ricerca è necessario inoltrare la richiesta al rettore e quindi al ministero della salute.

La modulistica si divide in:

- **Progetti di ricerca in regime di comunicazione:** riguarda tutti i casi in cui la sofferenza e il dolore inferti all'animale sono minime e le procedure sono molto poco invasive. Il ministero ha 30 giorni per dare risposta.
- **Progetti di ricerca in regime di autorizzazione in deroga:** riguarda tutti le procedure più invasive che possono sollevare problemi etici maggiori.

La modulistica passa prima dal comitato etico, poi dal rettore e quindi al Ministero della Salute per la valutazione finale.

Ancora il ministero della salute si basa sul decreto legislativo del 1986 come tutta la comunità europea per dar modo agli enti di ricerca di adeguarsi alla nuova legislazione. Ferrara ha attuato nel 1992 la direttiva dell'1986.

Adozione Animali da esperimento:

**RICERCA**Contatti Telefono-Email Cerca A A AAccedi

Home
Banche dati
Strutture
Finanziamenti e gestione
Valutazione Qualità della Ricerca (VQR) 2004-2010
Valorizzazione
Sperimentazione animale
Dottorati di ricerca
Link

Adozione animali da esperimento

— ultima modifica 15/06/2011 09:26



L'Università degli Studi di Ferrara, in linea con i più recenti orientamenti espressi dal Ministero della Salute (Circolare 14 maggio 2001 n.6, in applicazione del Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, in materia di protezioni degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici) è disponibile ad offrire in adozione animali inizialmente destinati alla ricerca, nei rari casi in cui, benché sani, non siano idonei alla sperimentazione.

L'adozione è consentita esclusivamente per finalità umanitarie, tenuto conto che gli animali adottabili presentano caratteristiche psico-fisiche tali da renderli idonei a svolgere la funzione di animali da compagnia.



L'Università degli Studi di Ferrara provvederà periodicamente a comunicare, tramite avviso pubblicato sul sito della Sezione "Ricerca" - Voce "Sperimentazione Animale", se e quali animali siano disponibili per l'affido. La richiesta di adozione dovrà essere presentata tramite il modulo pubblicato sul sito stesso, debitamente compilato, da inviare a:
Università degli Studi di Ferrara-Ufficio Ricerca Nazionale - Via Savonarola 9-44100 Ferrara

Le domande di adozione che dovessero pervenire in assenza di animali disponibili all'affido, non saranno prese in considerazione.

[ANIMALI DATI IN ADOZIONE](#)
[ANIMALI DISPONIBILI ALL'ADOZIONE](#)
[CHI PUO' ADOTTARE](#)

Ricerca Nazionale - Bandi
- Bandi Nazionali
- Bandi di Ateneo
- Altre opportunità di finanziamento
[vai alla pagina](#)

Giornate formative
Incontri, convegni, seminari in materia di Ricerca Nazionale
[vai alla pagina](#)

Ultime notizie
Bando 2011 per la promozione iniziative di Internazionalizzazione
26/09/2011
[Link alla pagina "Bandi internazionali pubblicati"](#)
23/05/2010
Bando di Ateneo per giovani Ricercatori
07/01/2008

Obiezione di coscienza: E' possibile anche per gli studenti effettuare la propria obiezione di coscienza (compilando il modulo) e non saranno quindi tenuti a prendere parte direttamente alle attività e agli interventi sugli animali. L'obiezione può essere revocata in qualsiasi momento.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Qual è il punto chiave della discussione sulla necessità della ricerca sugli animali?
2. Quali principi guidano la stesura delle regole sulla sperimentazione animale?
3. Fare un esempio di modifica di una procedura sperimentale in seguito all'applicazione delle 3R.

RISPOSTE:

1. La necessità esiste quando i costi della sperimentazione portano dei benefici alti, e quando non ci sono alternative all'uso di animali.
2. Soprattutto i principi di riduzione, sostituzione e perfezionamento che mirano ad ottimizzare le procedure sperimentali utilizzando il minor numero di animali nel miglior modo possibile.
3. Sulla base della creazione di un modello di Alzheimer in roditori da laboratorio è possibile sostituire l'utilizzo dei primati. Si utilizza quindi un animale a minor sviluppo neurologico.. oppure... sperimentazioni su animali con variabilità genetica e ambientale minima permettono di ottenere risultati migliori con l'utilizzo di un minor numero di animali.

I MODELLI ANIMALI

Il concetto di modello è sempre relativo ad un bersaglio.

A volte un modello può essere meglio del bersaglio.

Es. per studi di genetica l'uomo non sarebbe utilizzato nemmeno se si potesse fare in quando il suo ciclo riproduttivo è troppo lungo, è meglio studiare processi genetici in animali che si riproducono in ore o giorni come *Drosophila*.

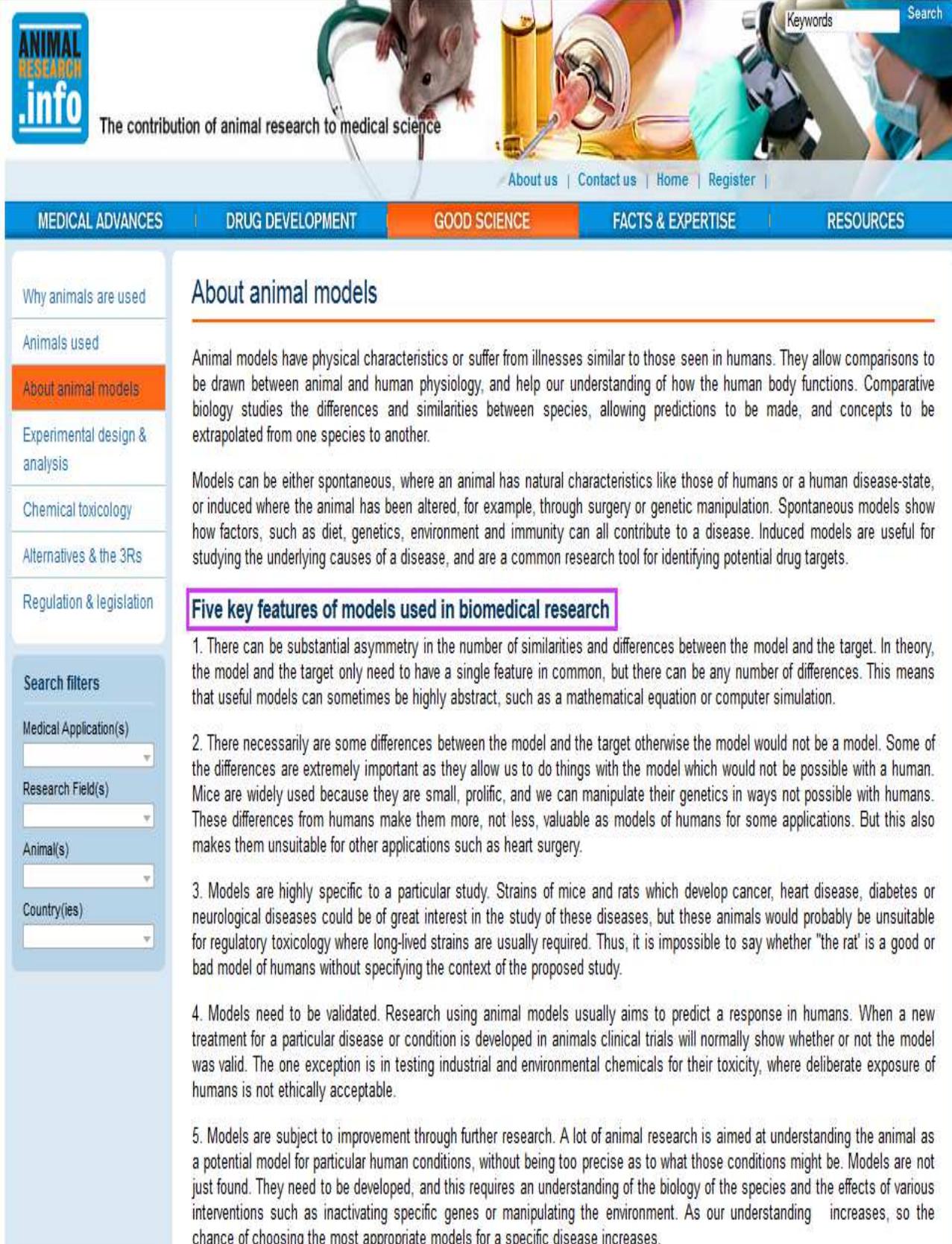
Un modello non è sempre scelto in conseguenza al fatto che la specie bersaglio non è utilizzabile, spesso il modello è semplicemente il migliore per quel particolare scopo.

CARATTERISTICHE DEI MODELLI PERCHE' POSSANO ESSERE UTILI

(ritrovati nella discussione in aula):

- Condivisione del sistema fisiologico in oggetto;
- Facile allevamento e manutenzione (dimensione, tasso di generazione, condizioni abiotiche e biotiche, dieta, docilità);
- Conoscenza della biologia;
- Sviluppo neurologico;
- Accessibilità alla raccolta del dato: compatibilità con i metodi di studio.

Tutto ciò si rifà al sito: <http://www.animalresearch.info/en/science/animalmodels> in cui sono elencate le 5 caratteristiche chiave della ricerca biomedica:



ANIMAL RESEARCH .info
The contribution of animal research to medical science

Keywords Search

About us | Contact us | Home | Register |

MEDICAL ADVANCES | DRUG DEVELOPMENT | **GOOD SCIENCE** | FACTS & EXPERTISE | RESOURCES

Why animals are used
Animals used
About animal models
Experimental design & analysis
Chemical toxicology
Alternatives & the 3Rs
Regulation & legislation

Search filters
Medical Application(s)

Research Field(s)

Animal(s)

Country(ies)

About animal models

Animal models have physical characteristics or suffer from illnesses similar to those seen in humans. They allow comparisons to be drawn between animal and human physiology, and help our understanding of how the human body functions. Comparative biology studies the differences and similarities between species, allowing predictions to be made, and concepts to be extrapolated from one species to another.

Models can be either spontaneous, where an animal has natural characteristics like those of humans or a human disease-state, or induced where the animal has been altered, for example, through surgery or genetic manipulation. Spontaneous models show how factors, such as diet, genetics, environment and immunity can all contribute to a disease. Induced models are useful for studying the underlying causes of a disease, and are a common research tool for identifying potential drug targets.

Five key features of models used in biomedical research

1. There can be substantial asymmetry in the number of similarities and differences between the model and the target. In theory, the model and the target only need to have a single feature in common, but there can be any number of differences. This means that useful models can sometimes be highly abstract, such as a mathematical equation or computer simulation.
2. There necessarily are some differences between the model and the target otherwise the model would not be a model. Some of the differences are extremely important as they allow us to do things with the model which would not be possible with a human. Mice are widely used because they are small, prolific, and we can manipulate their genetics in ways not possible with humans. These differences from humans make them more, not less, valuable as models of humans for some applications. But this also makes them unsuitable for other applications such as heart surgery.
3. Models are highly specific to a particular study. Strains of mice and rats which develop cancer, heart disease, diabetes or neurological diseases could be of great interest in the study of these diseases, but these animals would probably be unsuitable for regulatory toxicology where long-lived strains are usually required. Thus, it is impossible to say whether "the rat" is a good or bad model of humans without specifying the context of the proposed study.
4. Models need to be validated. Research using animal models usually aims to predict a response in humans. When a new treatment for a particular disease or condition is developed in animals clinical trials will normally show whether or not the model was valid. The one exception is in testing industrial and environmental chemicals for their toxicity, where deliberate exposure of humans is not ethically acceptable.
5. Models are subject to improvement through further research. A lot of animal research is aimed at understanding the animal as a potential model for particular human conditions, without being too precise as to what those conditions might be. Models are not just found. They need to be developed, and this requires an understanding of the biology of the species and the effects of various interventions such as inactivating specific genes or manipulating the environment. As our understanding increases, so the chance of choosing the most appropriate models for a specific disease increases.

Traduzione:

1. Ci possono essere sostanziali asimmetrie del numero di somiglianze e differenze tra il modello e il bersaglio. In teoria, il modello e il bersaglio hanno bisogno di avere una sola caratteristica in comune, ma ci possono essere un qualsiasi numero di differenze. Ciò significa che i modelli utili a volte possono essere molto astratti, come un'equazione matematica o una simulazione al computer.
2. Ci sono necessariamente alcune differenze tra il modello e il target altrimenti il modello non sarebbe un modello. Alcune delle differenze sono estremamente importanti in quanto ci permettono di agire su un modello in un modo che non sarebbe possibile con un essere umano. I topi sono ampiamente utilizzati, perché sono piccoli, prolifici, e siamo in grado di manipolare la loro genetica in modi non possibili con gli esseri umani. Queste differenze dagli umani li rendono più, non meno, validi come modelli di esseri umani per alcune applicazioni. Ma questo li rende anche inadatti per altre applicazioni, come la chirurgia cardiaca.
3. I modelli sono altamente specifici per un particolare studio. Ceppi di topi e ratti che sviluppano il cancro, malattie cardiache, diabete o malattie neurologiche potrebbero essere di grande interesse nello studio di queste malattie, ma questi animali sarebbero probabilmente inadatti nella tossicologia regolatoria, dove sono solitamente richiesti ceppi a lunga vita. Quindi, è impossibile dire se "il topo" è un buono o cattivo modello degli esseri umani senza specificare il contesto dello studio proposto.
4. I modelli devono essere convalidati. La ricerca che utilizza modelli animali di solito mira a predire una risposta negli esseri umani. Quando un nuovo trattamento per una particolare malattia o condizione è sviluppato negli animali gli studi clinici normalmente dimostrano se il modello è valido o meno. L'unica eccezione riguarda test chimici industriali e ambientali di tossicità, dove l'esposizione intenzionale di esseri umani non è eticamente accettabile.
5. I modelli sono soggetti a miglioramento attraverso ulteriori ricerche. Molta della ricerca su animali ha lo scopo di capire l'animale come un potenziale modello per particolari condizioni umane, senza essere troppo precisi tali condizioni. I modelli non sono solo trovati. Hanno bisogno di essere sviluppati, e questo richiede una comprensione della biologia della specie e gli effetti dei vari interventi, come inattivando specifici geni o manipolando l'ambiente. Col crescere della nostra comprensione, aumenta anche la possibilità di scegliere i modelli più appropriato per una specifica malattia.

SITO WEB: <http://www.animalresearch.info/en/science/animalsused>

CAENORHABDITIS ELEGANS:

Comunemente usato perché è il più piccolo Nematode, molto diffuso, è facile da allevare, ha un genoma ben studiato, un ciclo generazionale rapido (giorni) e sono molto prolifici.



E' suscettibile ai cambiamenti ambientali e mutazioni, ha un piccolo sistema nervoso che svolge molte delle funzioni del sistema nervoso di organismi superiori (sviluppo neurologico minore).

Sono utilizzati per identificare sostanze chimiche con proprietà antibiotiche attraverso lo screening di una vasta gamma di possibili candidati.

Si procede infettando i vermi con batteri.

Si distribuiscono 15 vermi infetti e una sostanza diversa da testare in ogni pozzetto (384 totali).

Dopo 5 giorni si verifica la sopravvivenza dei nematodi all'infezione e quindi la possibile azione antibiotica della sostanza utilizzata.

Per identificare più facilmente i vermi vivi da quelli morti si può utilizzare un colorante arancione in grado di penetrare solo nelle cellule morte.

Il processo è automatizzato.

Questo metodo ha portato alla scoperta di 28 antibiotici su 37000 testati in pochissimo tempo.

Questi test non sono conclusivi ma sono un punto di partenza.

Utili negli studi di genetica per la velocità generazionale.

DROSOPHILA MELANOGASTER

Diventata popolare perché si accumula comunemente su frutta guasta e per ciò detto anche moscerino della frutta.

Il ciclo riproduttivo veloce l'ha reso subito una



specie modello per studi di genetica.

Molto usato anche negli studi dello sviluppo grazie alla sua simmetria bilaterale (scoperta di geni omeotici).

ZEBRAFISH

Utilizzato per lo studio dello sviluppo nei vertebrati perché gli embrioni sono trasparenti (accessibilità del dato).

Si sviluppa rapidamente, produce tantissime uova ed è di facile allevamento.



E' stato utilizzato tantissimo anche per l'ottenimento di modelli particolari attraverso la manipolazione del genoma (è stato creato un modello di zebrafish che sviluppa un particolare tipo di leucemia dove le cellule leucemiche sono fosforescenti: si può quindi studiare la diffusione della malattia).

RANA TRASPARENTE

Risultato di una manipolazione, permette di studiare nell'animale adulto lo sviluppo degli organi interni.

Il vantaggio di ottenere una rana trasparente consiste nel facilitare l'osservazione e la raccolta continua di dati (si evita di uccidere gruppi di

animali dopo un certo numero di giorni per verificare la fase di sviluppo es. 10 rane le uccido al 3° giorno, altre 10 al 10° giorno ecc..), si riduce quindi il numero di animali necessari, si perfeziona l'esperimento in quanto è sufficiente osservare per ottenere informazioni e usando uno stesso individuo per l'osservazione delle diverse fasi di sviluppo si riduce la variabilità e quindi l'attendibilità dei dati.

Bisogna, però, tener conto delle problematiche che possono derivare dalla manipolazione genetica.



TOPO

Circa il 70% degli animali usati in laboratorio sono topi.

Sono piccolo, poco costosi e facili da maneggiare. Hanno ciclo vitale e riproduttivo breve.



Il topo è un ottimo modello per le malattie umane perché l'organizzazione del loro DNA e la loro espressione genica è simile a quella dell'uomo (uomo e topo condividono il 98% dei geni).

Molte malattie umane colpiscono anche i topi (cancro, diabete, ansia), in oltre manipolando i loro geni è possibile ottenere lo sviluppo di altre patologie che normalmente non li riguardano.

Lo studio di patologie sui topi ha aiutato la comprensione della fisiologia umana e delle cause dello sviluppo della malattia.

Il massiccio studio su topi e su ratti ha permesso, di realizzare vere e proprie banche dati, ma anche di ottenere ceppi ad alta omogeneità genetica importantissimi per ridurre la variabilità e l'errore nelle misure.

Grazie alla selezione artificiale si sono ottenuti **topi nudi** o immunodeficienti, presentano infatti un sistema immunitario carente.

Necessitano di un ambiente sterile e di attenzioni particolari, ma permettono studi riguardanti patologie del sistema immunitario (AIDS, leucemie ecc).



Il topo è un animale che permette facile manipolazione genetica, maggiormente rispetto del ratto, e per ciò è un animale estremamente utile.

Non è facile fare un animale K.O. in quanto spesso, data la multifunzionalità dei geni, l'animale muore.

Es. di studio con topi geneticamente modificati:

- Topi grassi: mancano di un enzima
- Topi forti: hanno alterazione della miostatina
- Topi resistenti al freddo: mancano di un canale sodio responsabile del dolore al freddo.

RATTO

Presenta alcuni vantaggi rispetto al topo:

- Dimensioni
- Caratteristiche fisiologiche

E' un modello utilizzato molto per gli studi comportamentali.

Il ratto condivide con il topo molte delle caratteristiche dette prima.

Usato inizialmente nella ricerca perché era considerato un animale nocivo.



PRIMATI

Usati perché sono i parenti più stretti dell'uomo e in alcuni casi non si possono compiere studi in altre specie es. patologie che riguardano solo o prevalentemente i primati; studi che riguardano le funzioni superiori del sistema nervoso centrale.



Si utilizzano per studi di:

- Tossicologia;
- Neuroscienze;
- Malattie debilitanti o potenzialmente letali come Alzheimer o Parkinson;
- Patologie infettive altamente specifiche (es. HIV, Poliomelite, Malaria);
- Vaccini ad uso umano.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE

1. In che modo la creazione di una rana trasparente è in linea con il principio delle 3R?
2. A volte la preferenza per un modello tra i vari disponibili cambia in base a nuove ricerche scientifiche, illustra un esempio.
3. L'utilizzo dei primati è ancora necessario per alcune ricerche, es per i vaccini. Perché questo utilizzo è considerato accettabile?

RISPOSTE

1. In quanto si riduce il numero di animali necessari e la variabilità dei risultati perché si facilita l'osservazione e la raccolta dei dati diventa continua, l'esperimento viene perfezionato perché è necessaria la sola osservazione per lo studio dello sviluppo.
2. La scoperta di ratti con deficit del gene Obese per la Leptina permettere di ottenere ottimi modelli per lo studio delle patologie inerenti all'obesità in sostituzione all'utilizzo di ratti wild type che per raggiungere la condizione di studio devono essere alimentati in maniera forzata.. oppure.. Sono stati creati modelli murini che riproducono patologie come l'Alzheimer che permettono la sostituzione dei primati in questi studi.
3. La ricerca che utilizza primati con lo scopo di ottenere vaccini è ancora considerata accettabile in quanto alcune patologie riguardano strettamente i primati e determinano un alto impatto sull'umanità.

COMUNICAZIONE ACUSTICA NEI GRILLI

Un esempio di interazione trasmettitore-ricevitore



Lezione tratta da "Behavioral Neurobiology" Autore: Carew

L'interazione trasmettitore ricevitore è abbastanza complessa perché presuppone una serie di sistemi molto specializzati, soprattutto nell'uomo.

In oltre, per decodificare il messaggio trasmesso è necessario conoscere lo stesso linguaggio.

Basta un errore o una disfunzione in qualsiasi punto del processo per rendere la comunicazione inefficace. Es. lesioni alle corde vocali, danno agli organi sensori ecc.

Lo studio di questa interazione è stata studiato in un modello più semplice: il grillo.

I grilli hanno un sistema nervoso molto semplificato, e il loro linguaggio è ridotto a 3 tipi di segnale (solo il maschio canta):

- Segnale di richiamo permette al maschio di farsi localizzare dalla femmina (segnale a distanza);
- Canto di accoppiamento che invita all'accoppiamento;
- Canto aggressivo in presenza di un altro maschio per allontanarlo.

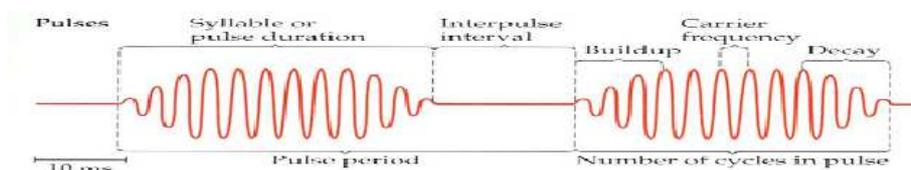
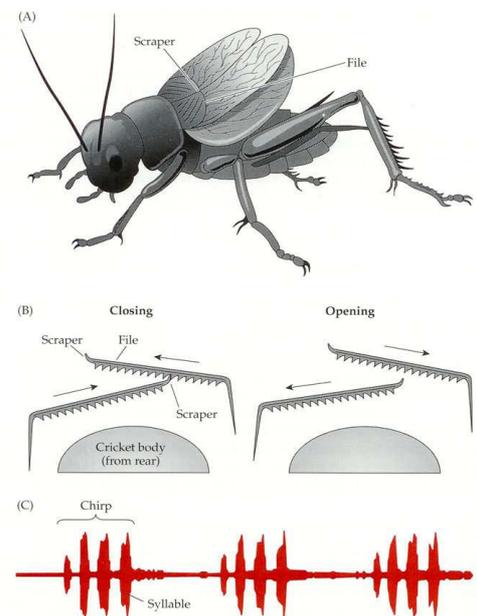
I canti si distinguono in base al ritmo.

Il canto del grillo avviene per mezzo delle elitre: ali modificate che sono fatte scorrere le une sulle altre.

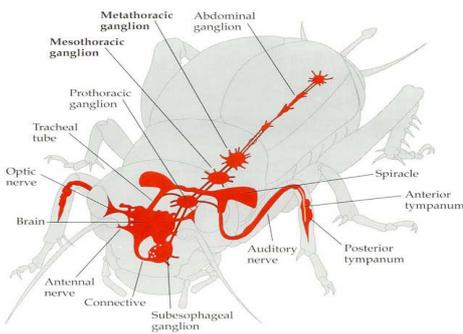
Alla chiusura delle ali corrisponde la produzione di suono.

Un segnale sonoro è contraddistinto sempre da:

- una frequenza di base detta frequenza portante (ciò il numero di volte che la cosa che produce il suono vibra; unità di misura Hz= volte al secondo);
- Elementi o sillabe che vengono ripetute ritmicamente cioè quante volte il segnale viene ripetuto nel tempo: frequenza del trillo.



Il sistema nervoso del grillo è caratterizzato da una ridotta encefalizzazione, è presente un cervello e dei gangli, posti lungo l'asse del sistema nervoso centrale, che funzionano come piccoli cervelli accessori.



I suoni vengono ricevuti grazie al nervo auditivo che parte dai timpani collocati sulle zampe e raggiunge il ganglio pro toracico.

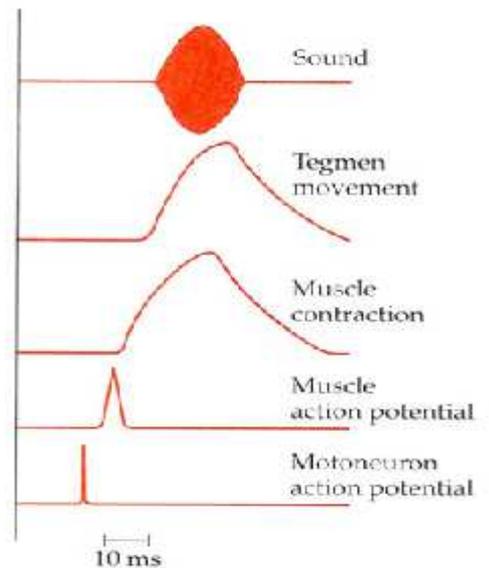
Lo studio della produzione del segnale è stato effettuato grazie al Trak Tracing una metodologia che

permette, partendo dagli organi effettori di determinare qual è il centro di controllo superiore.

Una elitra è mossa da 2 muscoli, una con funzione di aprirla e l'altra di chiuderla, detti M90 e M99; si muovono quindi in modo ritmico alternandosi (es. cuore e locomozione). Il motoneurone che li innerva raggiunge il ganglio toracico.

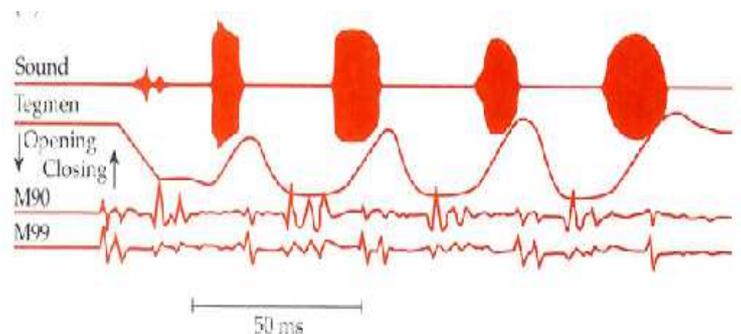
Questo grafico presenta una scala dei tempi in cui l'inizio dei diversi eventi è leggermente sfasato.

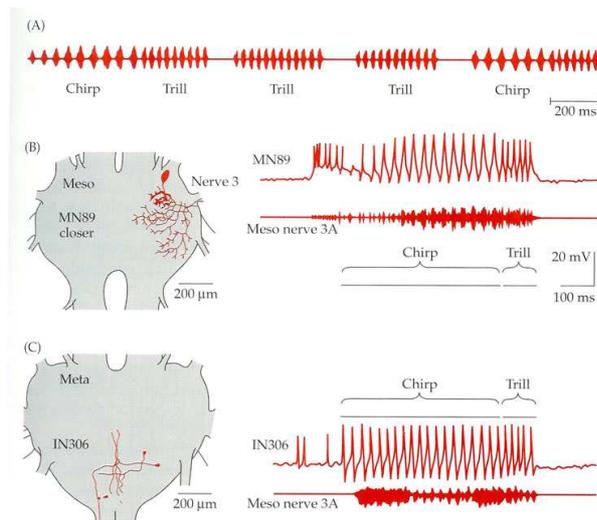
Il ritardo tra il potenziale d'azione del neurone a quello del muscolo dipende dalla trasmissione dell'impulso che è rapida ma non immediata, il movimento dell'ala è successivo alla contrazione muscolare perché è necessario che la forza sviluppata dal muscolo equivalga e superi l'inerzia dell'elitra.



M99 si contrae e fa aprire le ali subito dopo parte la contrazione di M90 che fa chiudere le ali ed in corrispondenza della chiusura si ha produzione del suono.

Questo ciclo si ripete in modo ritmico e porta quindi alla produzione di suono ritmicamente.





Si registrano le attività del nervo e dei motoneuroni di un determinato ganglio e si confronta con l'andamento della frequenza del suono prodotto per ricercare le analogie e poter dedurre quale centro superiore determina la produzione del canto (deve avere le stesse proprietà di scarica del segnale che produce). In questo caso in analisi ci sono il ganglio mesotoracico con il neurone MN89 e il nervo (nel nervo l'attività elettrica è sempre meno precisa).

Il motoneurone rappresenta bene le frequenze di scarica del suono e quindi c'è una corrispondenza diretta tra il pattern del suono e il pattern del motoneurone.

Nel ganglio metatoracico invece questa corrispondenza non è presente, anche se l'attività dell'interneurone considerato inizia e finisce insieme al canto.

Il complesso di neuroni a livello dei gangli toracici rappresenta un generatore indipendente di pattern: cioè un centro che è in grado di produrre un movimento ritmico dei muscoli senza bisogno di un comando a monte.

Il cervello è in grado di influire sulla scelta di inizio, fine e tipo del canto ma il suo pattern dipende solo dal generatore.

Mediante stimolazione del cervello con elettrodi è possibile indurre ognuno dei canti aumentando la frequenza dell'impulso, ma non è possibile modulare il ritmo del canto, sempre perché questa funzione dipende dal generatore di pattern che è localizzato nel ganglio toracico.

La femmina di grillo è in grado di riconoscere il segnale del maschio e localizzarlo.

E' stato effettuato un esperimento:

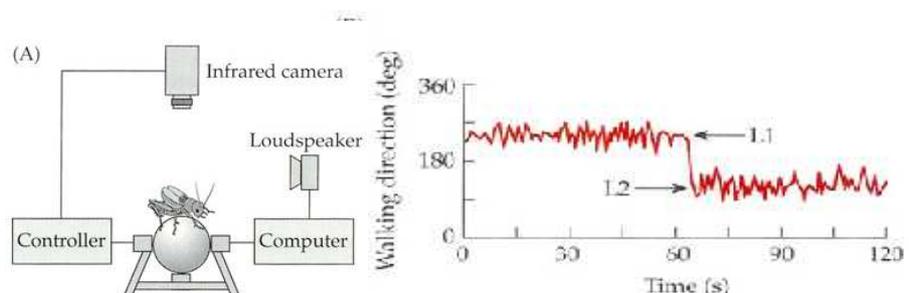
Un grillo femmina è stato posto su una sfera rotante (funziona come un tapis roulant) e i suoi movimenti

sono stati registrati.

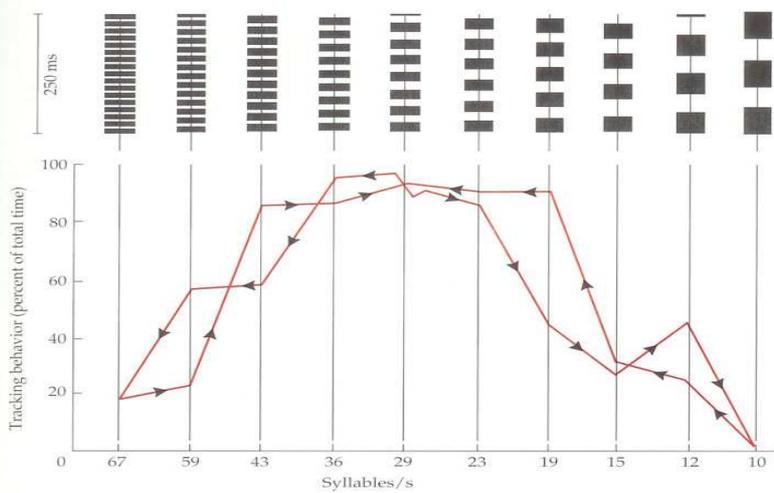
Con questo metodo è possibile determinare a quale stimolo (canto) la femmina risponde preferenzialmente.

Il movimento del grillo

è direzionale verso il richiamo ma con andamento a zig-zag. Il grillo è quindi in grado di localizzare il maschio che canta.



I ricercatori si sono domandati cosa potesse variare cambiando la struttura del canto, sono stati quindi creati dei canti artificiali e sono stati testati sulle femmine.



La risposta della femmina è preferenziale nei confronti dei canti che presentano una frequenza di 30 sillabe al secondo.

A valori che si allontanano dalle 30 sillabe al secondo la femmina risponde progressivamente in maniera minore.

Il grafico mostra una banda centrale di frequenze a cui il

ricevente risponde al massimo e una risposta calante o nulla agli estremi.

Questo tipo di risposta è detta risposta a banda passante.

Anche la vista (dagli infrarossi all'ultravioletto) e l'udito umano (da infrasuoni a ultrasuoni) rispondono allo stesso modo.

MECCANISMO DI LOCALIZZAZIONE DEL MASCHIO:

Il timpano è localizzato nelle zampe anteriori in quanto la testa ha dimensioni troppo piccole e i timpani sarebbero troppo vicini.

I timpani sono collegati tra loro da un sistema di tracheole interno.

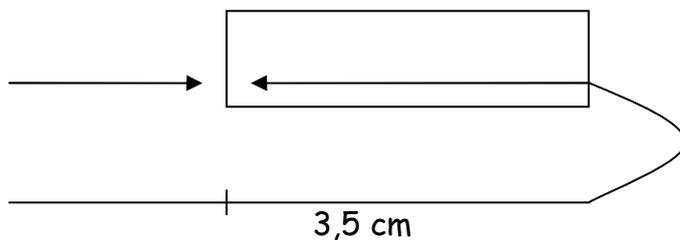
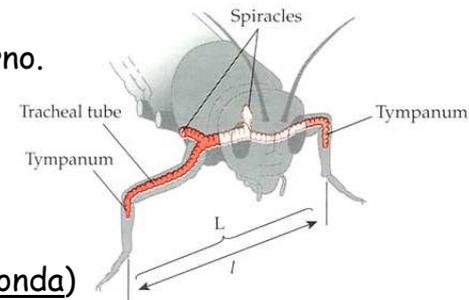
Tenendo conto che:

Velocità del suono = 343 m/s

Frequenza portante del richiamo = 5 kHz = 5000 Hz

Lunghezza d'onda = $(343 \text{ m/s}) / (5000 \text{ 1/s}) = 0.0686 \text{ m} = 7.9 \text{ cm}$

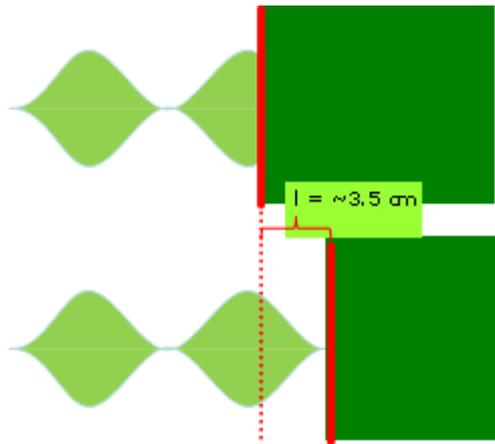
Distanza interna tra i timpani = ~3,5 cm (metà della lunghezza d'onda)



Se il suono arriva da sinistra arriva sul timpano sinistro direttamente.

Per arrivare alla parte interna del timpano sinistro il suono deve fare il giro all'interno delle tracheole e

compiere una distanza di circa 3,5 cm. La distanza che percorre il suono per raggiungere la parte interna e esterna del timpano è diversa.

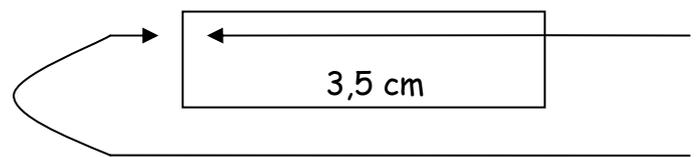


Il suono raggiungerà quindi un lato della membrana quando la sua ampiezza è massima e l'altro lato della membrana quando l'altezza è minima.

L'ampiezza massima solleciterà la membrana al massimo e l'ampiezza minima solleciterà la membrana al minimo. Tra l'interno e l'esterno della membrana ci sarà quindi una differenza di pressione che è massima

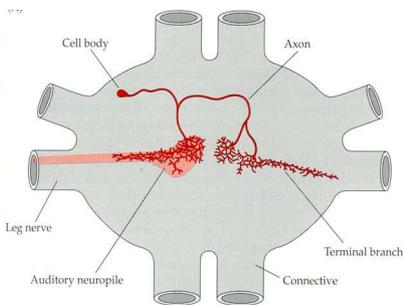
Se il suono arriva da destra impiega più o meno lo stesso tempo a raggiungere i 2 lati della membrana.

Il suono raggiungerà le 2 membrane con la stessa ampiezza (circa). Tra l'interno e l'esterno della membrana la differenza di pressione sarà minima.

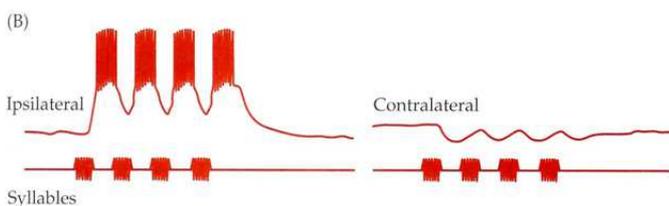


La conformazione strutturale permette di identificare la provenienza del suono grazie al principio delle differenze di pressione.

Oltre a questo meccanismo sono presenti dei sistemi di elaborazione del segnale per migliorare la localizzazione:



Nel ganglio in cui arriva il nervo auditorio sono presenti particolari neuroni detti Omega per la loro forma simile alla lettera greca, che sono in grado rispondere maggiormente ai segnali che vengono dallo stesso lato in cui sono organizzati rispetto ai segnali che vengono dalla parte opposta.



Nel grafico sotto è rappresentata la risposta del neurone allo stimolo sonoro sia ipsilaterale (che proviene dallo stesso lato del neurone) che controlaterale (proveniente dal lato opposto).

Allo stimolo ipsilaterale il neurone risponde con delle scariche molto forti,

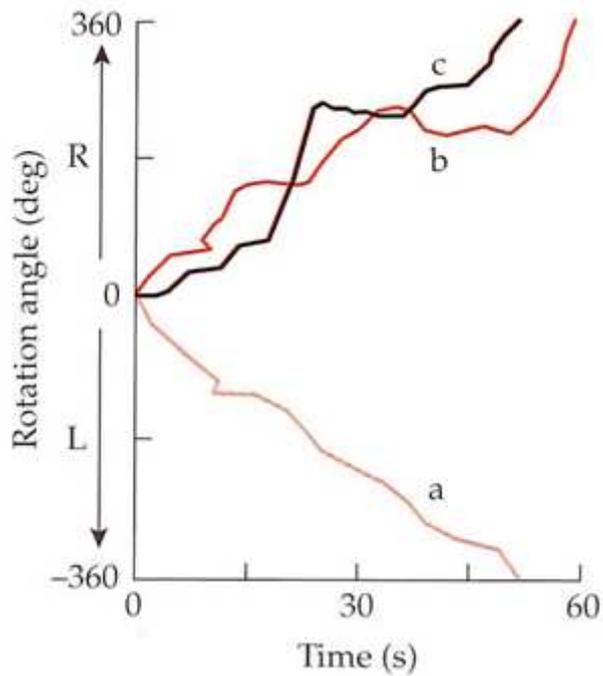
allo stimolo contro laterale la risposta sembra addirittura contraria, a determinare una iperpolarizzazione.

Questo sistema di controllo ulteriore determina una amplificazione della risposta.

Se il suono è frontale la discriminazione della localizzazione non avviene, è necessario che il grillo si ponga lateralmente rispetto alla provenienza del suono, per questo l'andamento del grillo femmina nell'avvicinarsi al maschio è a zig-zag.

I grilli sono in grado di localizzare il maschio grazie ad una serie di specializzazioni sia strutturali che fisiologiche.

I grilli preferiscono una certa frequenza nel canto perché presentano un gruppo di



neuroni (a) che rispondono preferenzialmente a frequenze di sillabe basse, un altro gruppo di neuroni (b) che rispondono preferenzialmente a frequenze di sillabe alta ed un ultimo gruppo di neuroni (c) che riceve le informazioni dalle 2 sottopopolazioni di neuroni a e b e risponde in modo equivalente alla banda passante.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Cos'è un generatore centrale di pattern?
2. Cos'è un sistema sensoriale a banda passante?
3. Come funziona un sensore di differenza di pressione?

RISPOSTE:

1. E' un area neuronale specifica in grado di sviluppare autonomamente un potenziale di azione con caratteristiche di ritmicità, è indipendente dal sistema nervoso il quale può fornire solo una regolazione qualitativa. Es. pacemaker del cuore.
2. E' un sistema che presenta un gradiente di risposta a seconda delle caratteristiche dello stimolo con picco centrale che indica la massima risposta.
3. Funziona misurando la differenza di pressione che si viene a creare ai due lati di una membrana e permette di valutare in questo modo la provenienza dello stimolo. La risposta è massima quando la differenza di pressione tra le 2 membrane è massima e viceversa.

RICONOSCIMENTO DELLA PREDA NEL ROSPO



Consiste nel riconoscimento di un pattern cioè si riconosce un determinato oggetto grazie alle sue caratteristiche principali. Il termine pattern sta ad identificare una regolarità che si riscontra all'interno di un insieme di oggetti.

Le macchine fotografiche di nuova generazione riescono a riconoscere il volto sorridente grazie alla ricerca di un pattern che consiste nella bocca incurvata in un certo modo.

Lo studio del meccanismo di riconoscimento di un pattern può essere importante a livello tecnologico per automatizzare determinati sistemi.

Il rospo è un animale che ha un sistema nervoso relativamente semplice, non presenta uno sviluppo corticale quindi il riconoscimento del pattern ha un controllo subcorticale. La rana infatti è in grado di riconoscere la sua preda naturale, caratteristica fondamentale negli animali cacciatori.

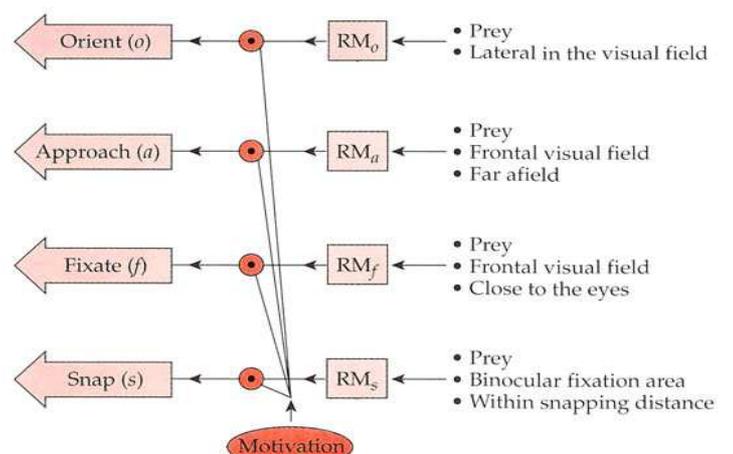
Il sistema del riconoscimento della preda nel rospo è molto primitivo, risponde a semplici segnali che corrispondono ad alcune caratteristiche dalla preda stessa.



La tipica preda del rospo è un verme, e il rospo identifica come preda tutto ciò che ha forma e movimento riconducibili ad esso: forma allungata che si muove lungo il suo asse maggiore.

Il comportamento del rospo a caccia prevede una precisa sequenza di movimenti ripetuti ogni volta che è in presenza della preda:

1. Il rospo si orienta verso la preda;
2. si avvicina;
3. fissa la preda con la vista binoculare;
4. Snap, il rospo cattura con la lingua la preda.



La sequenza di azioni compiuta dal rospo si ripete in modo automatico senza che avvenga abituaione (risponde sempre allo stimolo, tranne quando è sazio). Questa caratteristica lo rende un ottimo modello di studio.

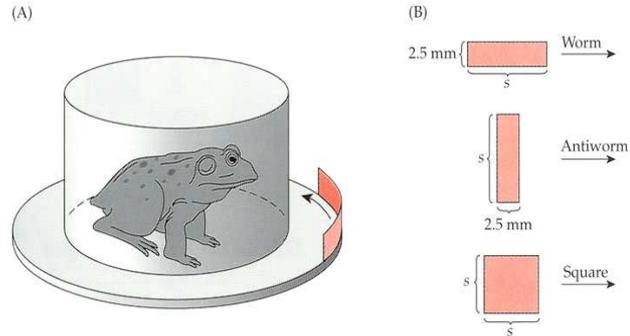
Per studiare il rospo si usano stimoli artificiali in quanto sono più controllabili e standardizzabili rispetto allo stimolo naturale.
 Le informazioni che si ricavano sono importabili ad altre specie, compreso l'uomo perché il sistema nervoso del rospo è la base del sistema nervoso dei mammiferi.

Esperimento:

Il rospo viene posto su un disco attorno al quale viene fatto girare uno stimolo "preda" artificiale.

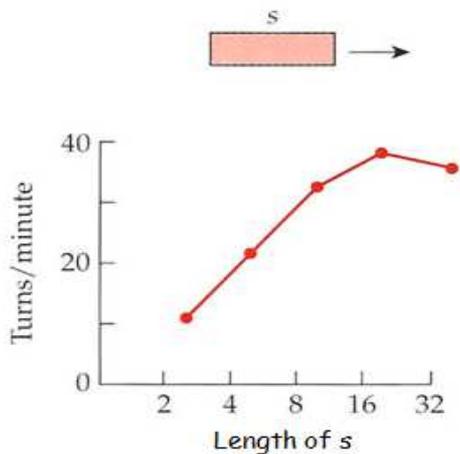
Gli stimoli artificiali consistono in:

- Verme: cartoncino rettangolare che viene fatto muovere lungo il suo asse maggiore;
- Antiverme: cartoncino rettangolare che viene fatto muovere lungo il suo asse minore (in antitesi con il verme);
- Quadrato: cartoncino di forma quadrata.

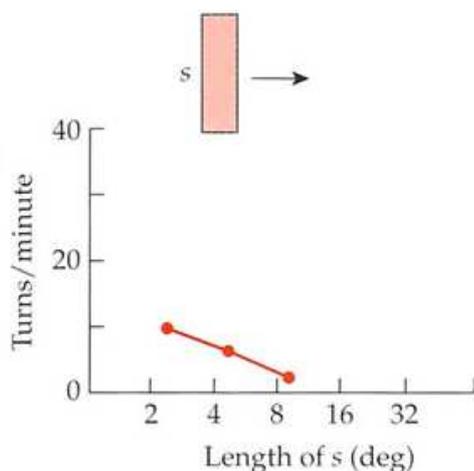


La lunghezza s è una distanza angolare.

Si sfrutta la risposta meccanica del rospo allo stimolo per misurare il suo interesse verso lo stimolo.

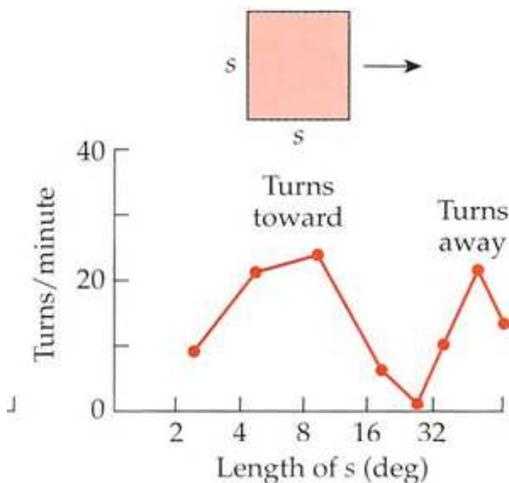


A) Mostrando al rospo lo stimolo verme a cui vengono man mano variate le lunghezze di s , il rospo mostra interesse minimo per un verme con lunghezza angolare di 3 deg e massimo con lunghezza angolare di 20 deg. Il rospo preferisce quindi vermi che abbiano una certa lunghezza angolare, la sua risposta diminuisce all'aumentare o al diminuire di s rispetto al valore preferenziale.



B) Mostrando al rospo lo stimolo antiverme in cui varia s di volta in volta, si ottiene una risposta maggiore a piccole misure s . All'aumentare di s la risposta diminuisce fino ad annullarsi.

Dai due grafici si evince che l'interesse per il verme è sempre maggiore rispetto all'interesse per l'antiverme. Il rospo è quindi in grado di discriminare uno stimolo artificiale in base ad una componente fondamentale: il movimento lungo l'asse minore o maggiore.

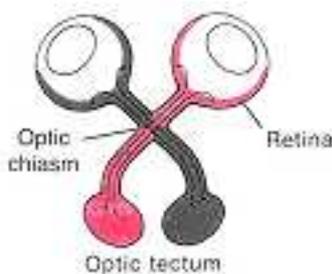


C) La risposta del rospo al quadrato aumenta all'aumentare di s fino ad un certo valore, poi diminuisce all'aumentare di s fino a rispondere in maniera opposta (scappa perché riconosce lo stimolo come possibile predatore).

Il rilevatore di preda (riconoscitore di pattern) del rospo risponde preferenzialmente a un oggetto di forma allungata che si muove nella direzione dell'asse maggiore. Questa proprietà è detta configurazionale: cioè una combinazione di forma e movimento che discrimina uno stimolo da un altro (es. verme da antiverme).

Il riconoscimento della preda a livello neurale è dovuto a una parte del cervello detta rilevatore di preda.

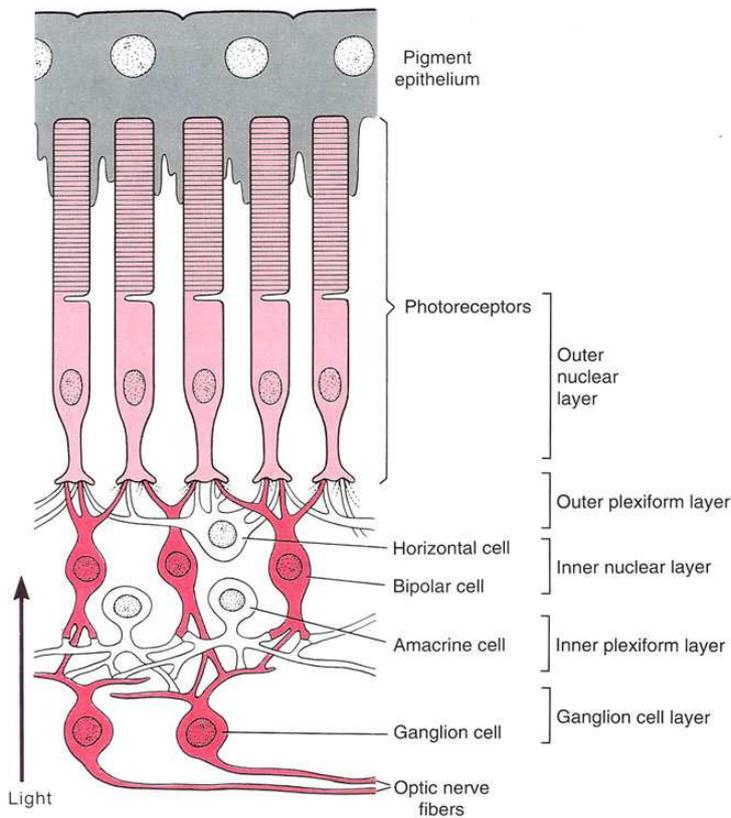
Viene individuata ricercando un area neurale che risponde elettrofisiologicamente in modo corrispondente al comportamento del rospo in presenza della preda (cioè che risponda maggiormente al verme e in maniera minore all'antiverme).



Il sistema visivo del rospo è estremamente semplice. E' composto dalla retina le cui fibre si incrociano nel chiasma ottico e raggiungono il tetto ottico. Le fibre sono completamente incrociate: è un sistema controlaterale (nei mammiferi le fibre non si incrociano al 100%).

Le zone da analizzare sono quindi poche, il primo punto di ricerca è la Retina la

quale presenta fotorecettori che portano l'informazione a cellule amacrine connesse con le cellule gangliari di collegamento che formano le fibre del nervo ottico.



Le cellule sensoriali presentano un "Campo recettivo": cioè zona dello spazio capace di eccitare la cellula. Non è una zona dello spazio assoluta, è relativa alla posizione del recettore. Il campo recettivo viene definito per i recettori sensoriali che sono legati ad una posizione nello spazio; esiste tipicamente nei recettori per la visione, l'udito ecc..

Diverse cellule hanno proprietà diverse ed esempio esistono quelle dette "centro on e perimetro off" che hanno la massima risposta quando lo stimolo avviene nel centro del campo recettivo e invece hanno risposta soppressa quando lo stimolo è periferico.

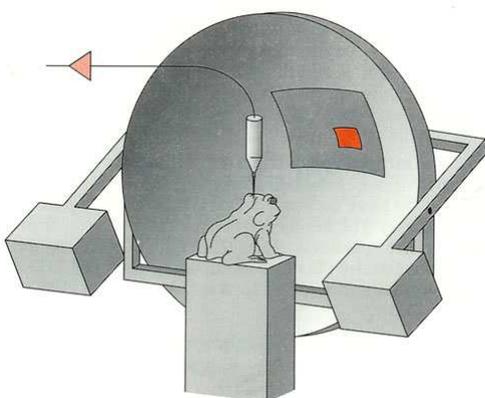
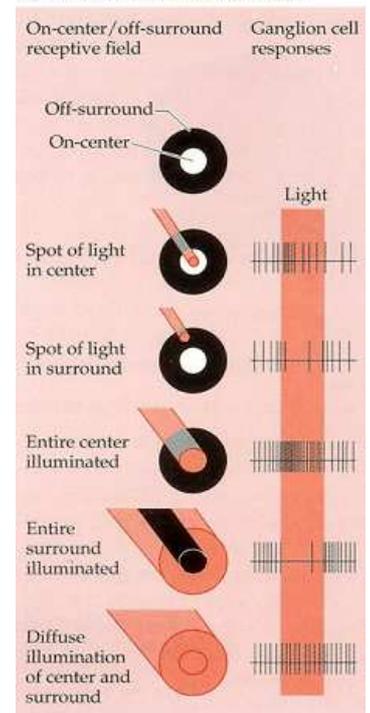
La figura mostra che quando il raggio luminoso (stimolo) raggiunge il centro del campo recettivo c'è una scarica che aumenta e diventa massima quando il raggio colpisce l'intera zona centrale.

Quando il raggio colpisce la zona periferica la risposta cala ed è minima quando l'intero campo percettivo periferico viene colpito.

Se invece tutto il campo recettivo viene colpito la risposta non c'è.

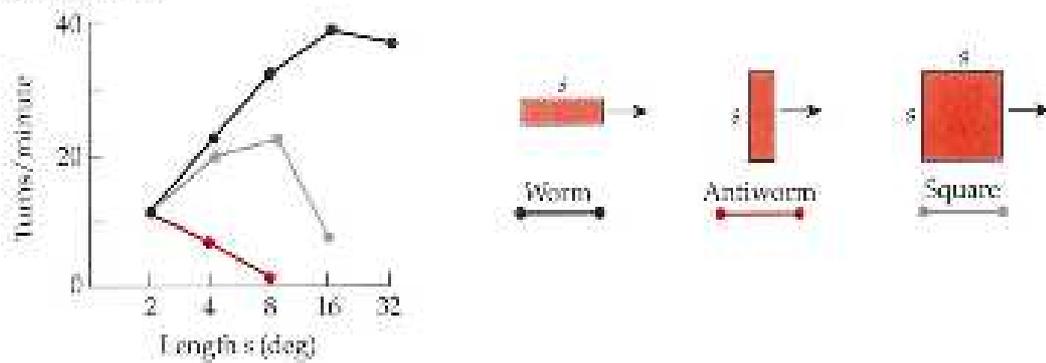
La situazione è invertita in cellule "centro off perimetro on".

(A) An on-center / off-surround cell



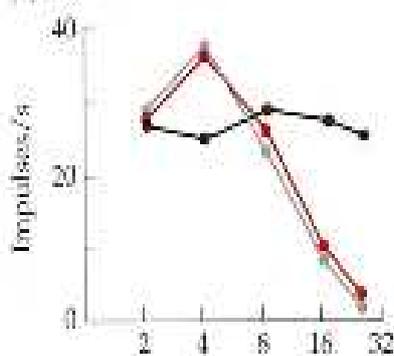
Sono stati eseguiti una serie di esperimenti che prevedevano di porre il rospo in una certa posizione e con elettrodi registrare l'attività di una zona specifica del sistema nervoso. Di fronte al rospo è presente uno schermo dove vengono riprodotti i vari stimoli.

(A) Behavior

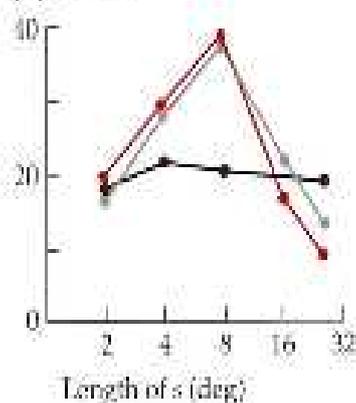


Il primo esperimento riguardò le cellule recettoriali della retina:
Si confronta quindi la risposta cellulare allo stimolo con quella comportamentale riassunta nel grafico A.

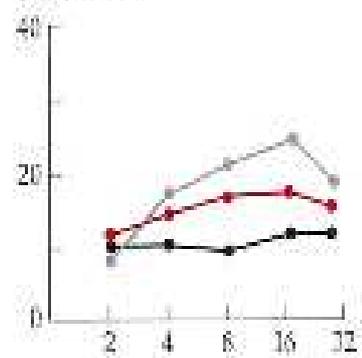
(B) R2 cells



(C) R3 cells



(D) R4 cells

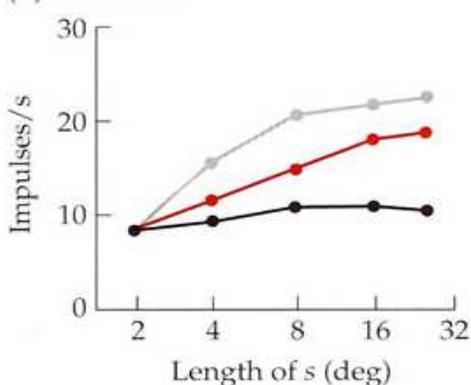


Nei grafici B, C, D sono rappresentate le risposte di gruppi di cellule della retina che risultano non essere il rilevatore di preda in quanto la risposta allo stimolo verme è inferiore a quella dello stimolo antiverme.

Le cellule R2 R3 R4 presentano un campo recettivo centro on periferia off la risposta è quindi minore nel verme perché attraversa in maniera orizzontale tutto il campo recettivo.

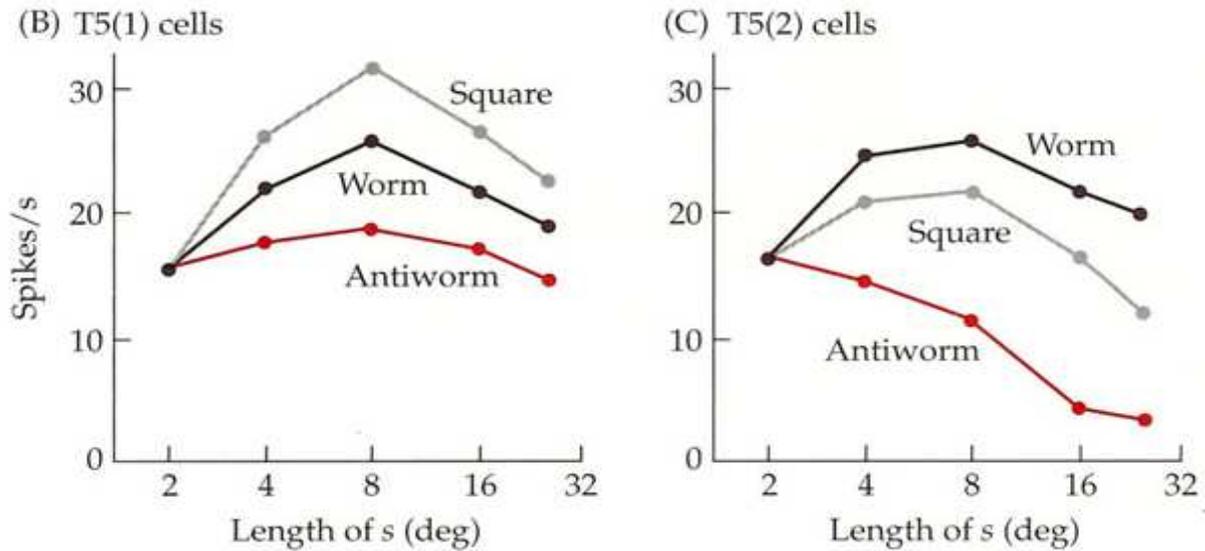
Il successivo esperimento riguardò il talamo:

(B) TH3 cells



anche in questo caso le cellule TH3 del talamo non sono i rilevatori di preda perché rispondono al verme in maniera minore rispetto all'antiverme.

A questo punto si analizzò il tetto ottico tenendo in considerazione le cellule T5(1) e T5(2):

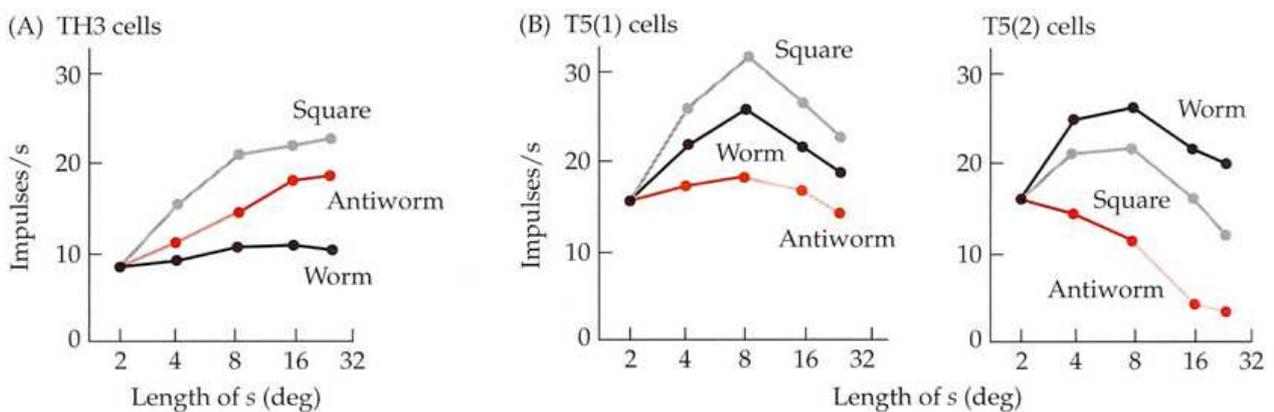


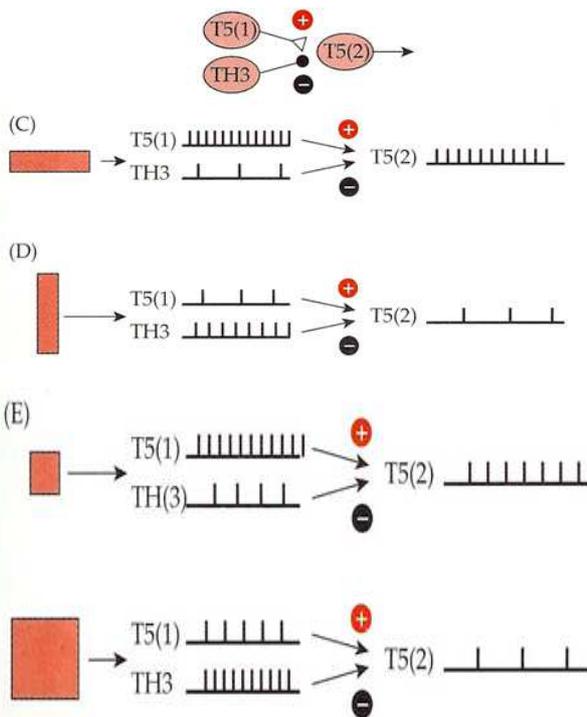
T5(2) risponde in modo corrispondente al comportamento del rospo (grafico A) e risulta quindi essere il possibile rilevatore di preda.

Per verificare la reale implicazione delle cellule T5(2) nel riconoscimento della preda si sono lesionate e questo ha causato nel rospo la totale perdita di discriminazione della preda, il rospo riconosceva qualsiasi cosa come preda.

I ricercatori hanno provato a lesionare anche le cellule TH3 del talamo ottenendo un cambio comportamentale.

La risposta delle T5(2) infatti dipende dalla risposta di altri 2 centri: TH3 e T5(1). Tutto ciò è deducibile dai successivi grafici: TH3 ha un effetto repressorio sulla risposta di T5(2) mentre T5(1) ha effetto eccitatorio.





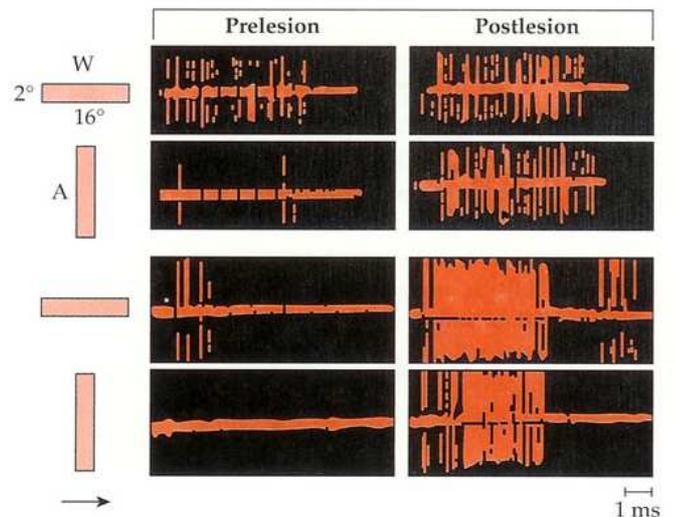
Il verme causa una risposta molto alta nelle T5(1), e una risposta molto bassa nelle TH3, di conseguenza la risposta nelle T5(2) è alta.

L'antiverme causa nelle T5(1) una risposta minima e nelle TH3 una buona risposta, sommando le due risposte si ottiene una risposta bassa.

Al piccolo quadrato le T5(1) rispondono in modo elevato e le TH3 in modo basso originando un interesse non trascurabile.

Il quadrato di dimensioni maggiori determina invece una risposta bassa nelle T5(1) e alta nelle TH3 causando un minimo interesse da parte del rospo.

A questo punto siamo in grado di dedurre che nel grafico affianco sono state lesionate le cellule TH3 (che hanno effetto inibitorio) in quanto dopo la lesione la risposta è alta sia in presenza del segnale verme sia in presenza del segnale antiverme. La risposta delle T5(2) risulta essere identica a quelle delle cellule T5(1).



TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. A cosa deve rispondere preferenzialmente il rilevatore di preda del rospo?
2. Come si può verificare se un centro nervoso funziona da rilevatore di preda?
3. Come viene regolata l'attività fisiologica dei neuroni rivelatori di preda, ossia i T5(2) del tetto ottico?

RISPOSTE:

1. Deve rispondere preferenzialmente a tutto ciò che è conforme a forma e movimento della preda naturale, cioè forma allungata e movimento lungo l'asse maggiore.
2. Si confronta l'attività elettrofisiologica del centro nervoso con quella comportamentale in presenza dei diversi stimoli. Una volta ottenuta corrispondenza si può validare l'ipotesi lesionando il centro individuato per verificare la sua reale implicazione come rilevatore di preda.
3. La regolazione dei T5(2) dipende delle risposte dei T5(1) e dei TH3 allo stimolo dove T5(1) ha effetto eccitatorio e TH3 inibitorio. La risposta del rivelatore di preda è dovuto alla somministrazione delle informazioni fornite dai due centri.

APPRENDIMENTO DEL CANTO NEGLI UCCELLI



ZEBRA FINCH (*Taeniopygia guttata*)

Gli uccelli canori hanno una proprietà molto rara in natura: sono in grado di imparare a cantare. Uno dei primi tentativi di rappresentare in forma scritta il canto degli uccelli risale al 1600; utilizzarono come sistema di rappresentazione il pentagramma e le note.

La capacità di apprendimento vocale è rara, nell'ambito del taxon uccelli ci sono solo tre gruppi che hanno questa capacità:

- Passeriformi (o uccelli canori) 1/3 di tutti gli uccelli (3000/9000),
- Psittaciformi (pappagalli),
- Trochiliformi (colibrì).

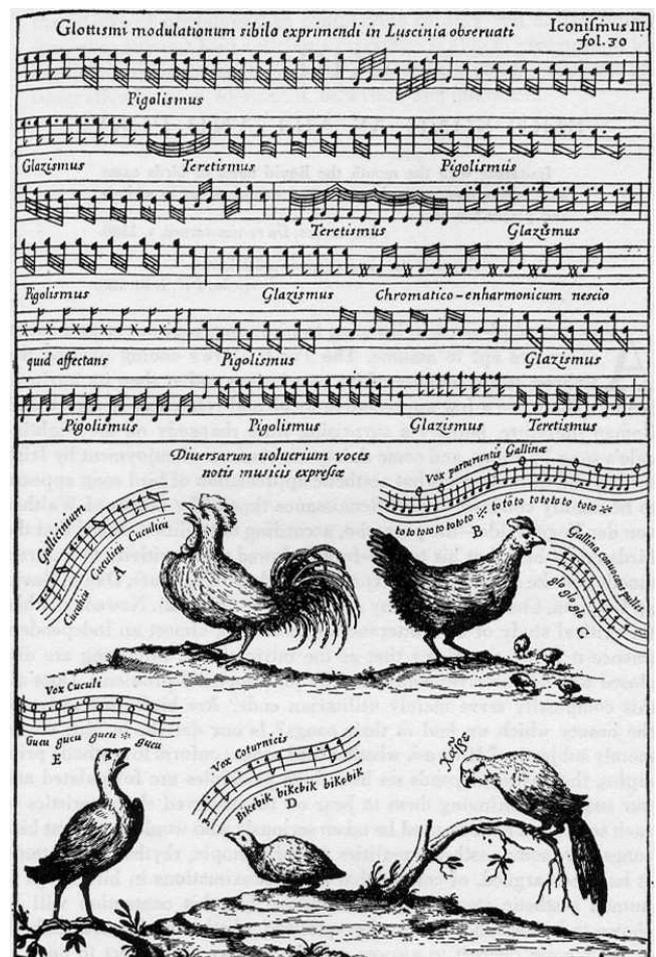
L'apprendimento vocale è possibile anche per alcuni mammiferi:

- Uomo,
- Cetacei,
- Chiroterteri (pipistrelli), solo alcune specie.

I primati non sono in grado di apprendimento vocale, le scimmie antropomorfe sono in grado di linguaggio gestuale ma non di riprodurre suoni in quanto è necessaria una particolare conformazione degli organi fonatori e di centri cerebrali responsabili per il processo del linguaggio.

La difficoltà iniziale nello studio dell'apprendimento del canto in uccelli canori era la mancanza di un sistema di misurazione del canto univoco (oggettivo).

Nel dopo guerra si riescono ad utilizzare due strumenti: il magnetofono e il sonografo in grado di fornire dati oggettivi.



William Thorpe fu il primo ricercatore a effettuare uno studio specifico mirato a capire come avviene l'apprendimento del canto nei passeriformi.

Il primo passo fu dimostrare che avvenisse effettivamente un apprendimento del canto.

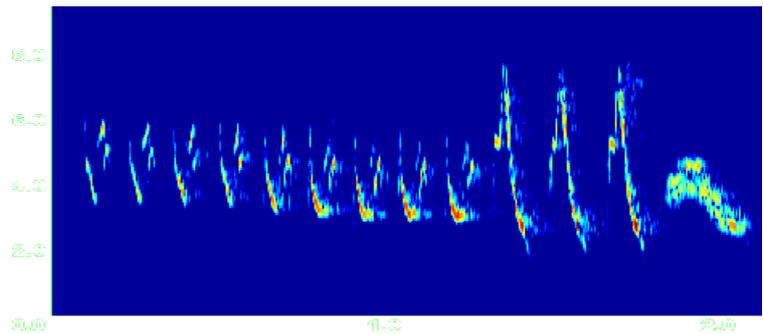
Nell'uomo l'apprendimento perfetto dei fonemi è possibile solo fino ai tre anni, e questo perché è necessaria una particolare conformazione del cavo buccale che si definisce durante l'età infantile (fase che corrisponde a quella sensibile negli uccelli). Apprendimento non significa solo acquisire informazioni ma consiste anche nel imparare a controllare i muscoli e i sistemi che sono responsabili del comportamento finale.



Lo studio sul fringuello portò a capire che in condizioni Kaspar Hauser (isolamento), egli non impara a cantare.

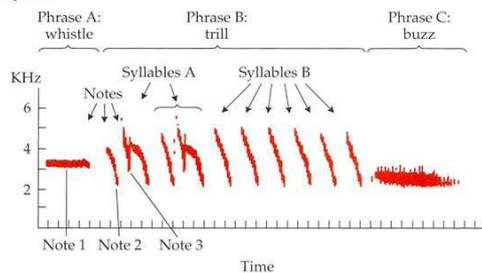
L'SOLAMENTO NON PERMETTE APPRENDIMENTO, è sempre necessario un modello da imitare.

Il canto del fringuello è stato rappresentato qui con spettrogramma, grafico in cui la frequenza è posta in funzione del tempo. I grafici ci permettono uno studio più semplice di un fenomeno dinamico.

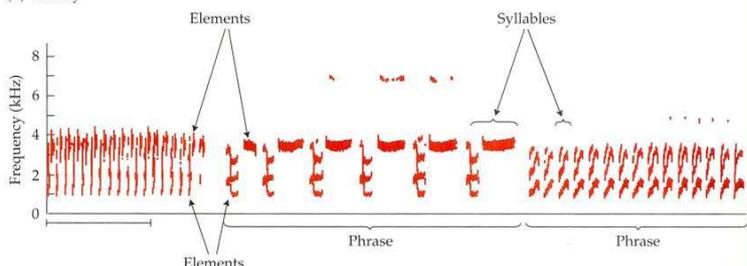


Diversi uccelli cantano in maniera differente:

(A) White-crowned sparrow



(B) Canary



Ogni singolo elemento del canto è detto sillaba, un insieme di sillabe compone un canto. A volte una sillaba è composta da più elementi.

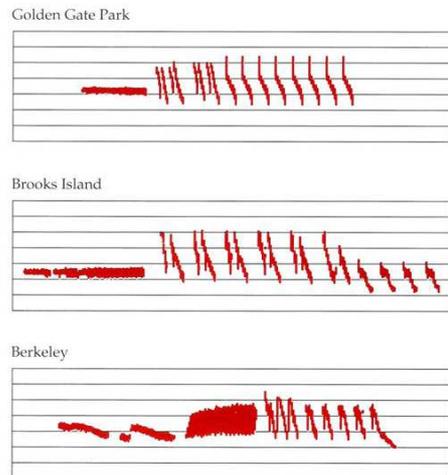


Lo studio da parte di Thorpe ed altri ricercatori sul Passero capobianco portò alla scoperta dell'esistenza di dialetti: individui della stessa specie in zone geograficamente diverse producono canti diversi.

Questa come altre caratteristiche sono riportabili all'uomo.

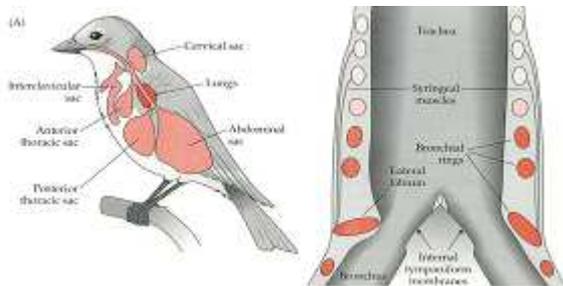
Anche il periodo della lallazione umana ha un corrispondente nel mondo degli uccelli, questa fase è tipica del fenomeno di apprendimento vocale ed è necessaria all'acquisizione del controllo neuromuscolare. Negli uccelli è detta fase di sottocanto.

L'origine dei dialetti non ha motivazioni genetiche ma trova spiegazione nell'interazione con l'ambiente di crescita (fatto dovuto a pressione culturale).

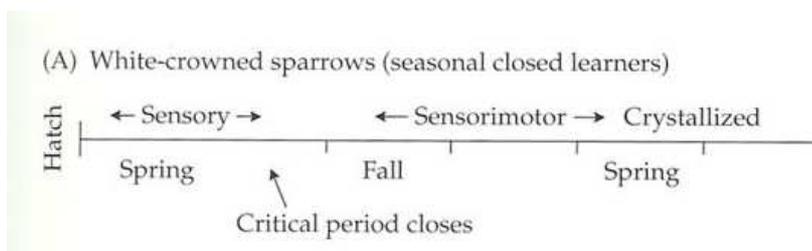


L'organo fonatorio degli uccelli è detto Siringe e consiste in una particolare

conformazione del punto di divisione tra bronchi e trachea in cui sono presenti delle labbra (strutture cartilaginee) che possono essere ruotate in modo da cambiare il flusso d'aria che proviene dai bronchi. Sono presenti nove muscoli siringali per la modulazione del suono.

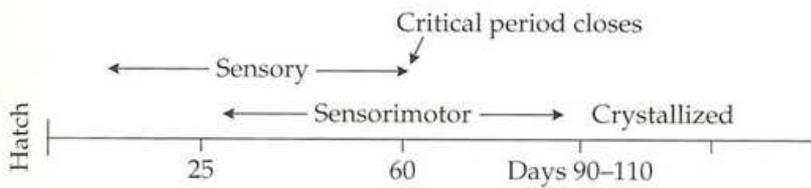


L'apprendimento del canto negli uccelli presenta un periodo detto Sensibile in cui si può imparare che è differente da specie a specie.



A seguito della fase sensibile, in questo caso, è presente una fase detta Sensomotoria in cui si presenta il sottocanto (lallazione umana) in cui si impara il controllo neuromotorio. In questa specie come in altre i due periodi sono separati e quindi più facilmente studiabili.

(B) Zebra finches (age-limited learners)

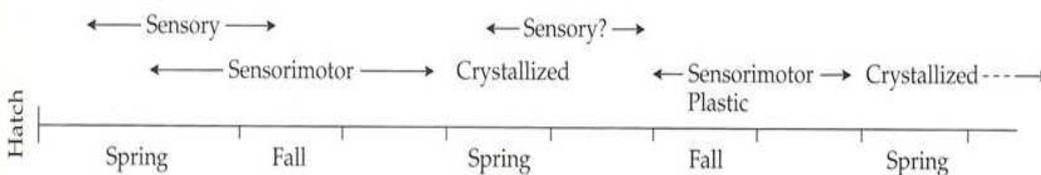


In altre specie le due fasi sono sovrapposte.

In oltre alcune specie sono dette closed learners (es. passero corona-bianca) perché da un certo momento non sono più in grado di imparare.

Altre specie dette opened learners (es. canarino) in quanto il periodo di memorizzazione si riapre in modo periodico.

(C) Canaries (open-ended learners)



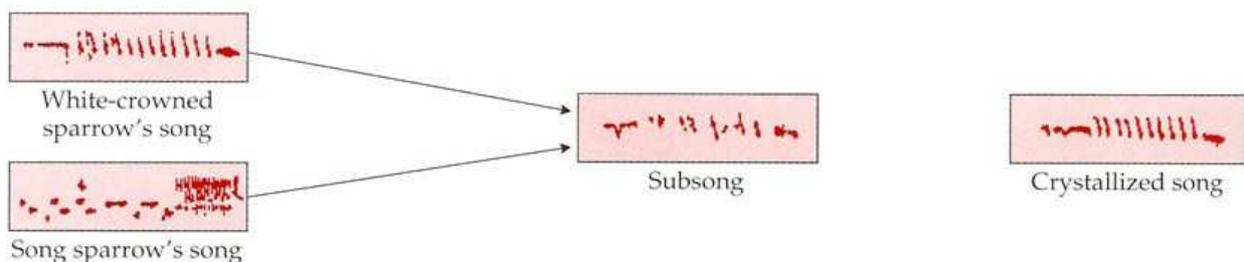
Nel canarino ogni anni si formano nuovi neuroni per memorizzare nuovi canti.

I nuovi neuroni derivano da cellule staminali che nel caso del canarino sono a livello dei lati del terzo ventricolo cerebrale.

Fu una delle prime dimostrazioni della plasticità del cervello.

La predisposizione all'apprendimento è specie specifica, alcune specie sono in grado di imparare un po' di tutto mentre altre sono più limitate.

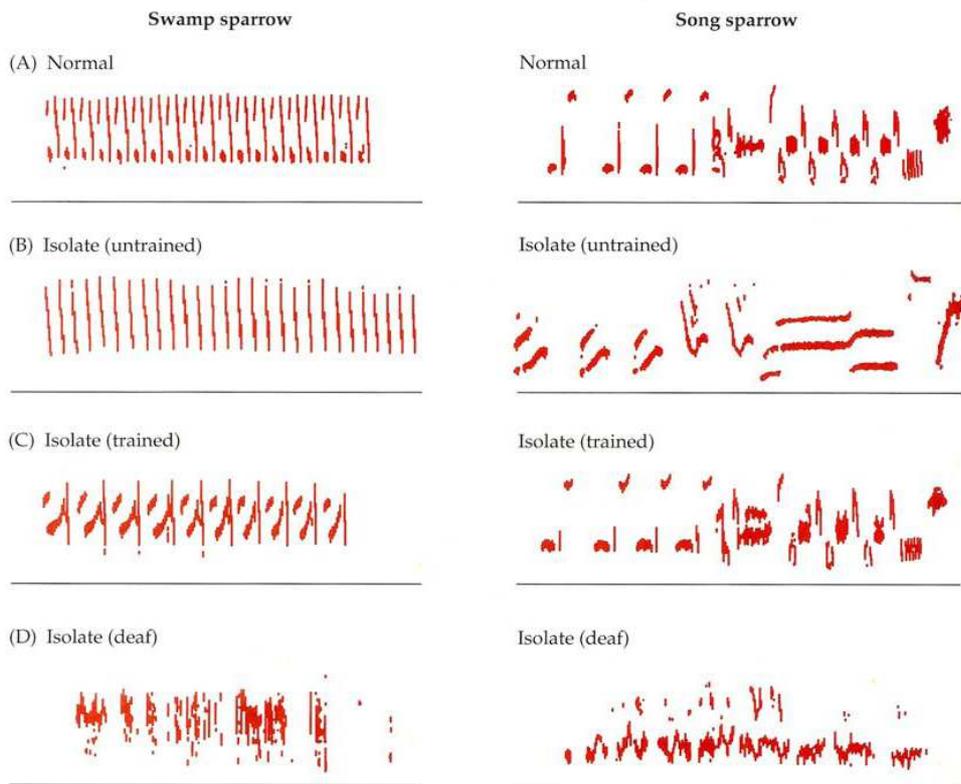
Tutto ciò è sostenuto dal seguente esperimento in cui è stato utilizzato un passero corona-bianca che viene esposto durante la fase sensibile a due canti diversi, uno di un esemplare della stessa specie e l'altro di un esemplare di una specie diversa.



Dopo la fase sensomotora il passero riproduce il canto "cristallizzato" e tra i due proposti viene riprodotto il canto del conspecifico.

Il sistema nervoso è predisposto a imparare preferenzialmente il canto della propria specie, esiste quindi un modello di canto costitutivo interno (deriva dal genotipo) che fa da base alla capacità di apprendimento.

Un ulteriore esperimento è stato effettuato con due specie diverse studiate in differenti condizioni:



Il caso A è il canto che si ottiene in condizioni naturali.

Il caso B presenta il canto effettuato dall'animale isolato.

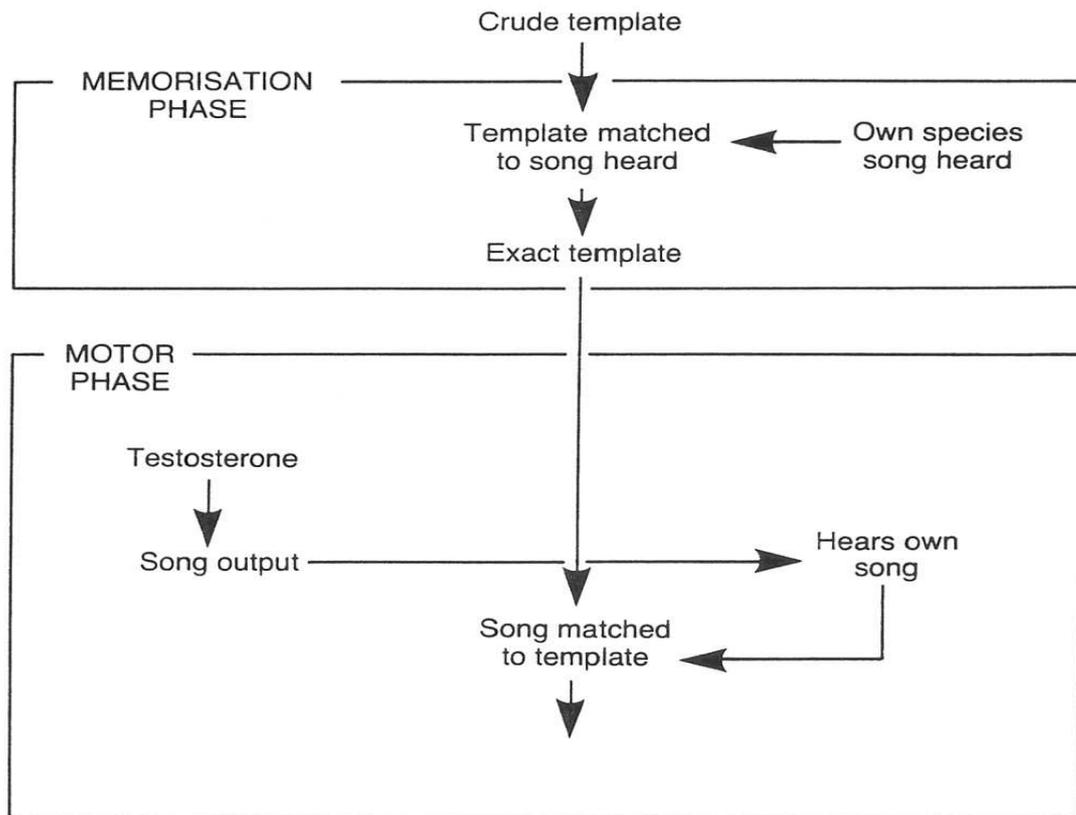
Il caso C presenta il canto dell'animale isolato ma addestrato con il canto di un conspecifico.

Il caso D rappresenta il canto di un animale sordo mantenuto isolato.

Si può concludere:

- Senza tutor l'apprendimento non avviene in maniera corretta, l'animale canta il modello costitutivo,
- L'animale è in grado di imparare anche da un trainer artificiale,
- L'animale sordo non riceve feedback uditivo e non è in grado di imparare il controllo sensomotorio.

SCHEMA KONISHI DI APPRENDIMENTO:



Crude template significa modello crudo e sta ad indicare ciò che deriva dal genotipo, esso viene migliorato e trasformato dall'ascolto del canto dei conspecifico (fase di apprendimento sensoriale) e dalla successiva fase motoria.

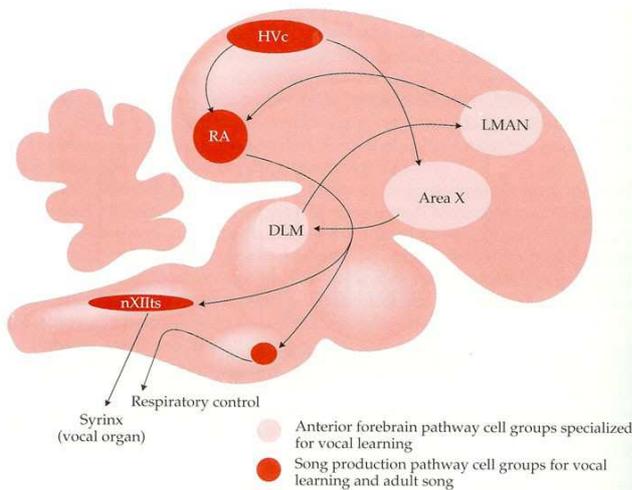
Il canto ascoltato deve corrispondere o essere compatibile con il modello intrinseco (determinato dal genotipo) a questo punto comincia la fase di "prove di canto" in cui l'animale cerca di riprodurre ciò che ha sentito e impara il controllo sensomotorio grazie ad un feedback uditivo che gli permette di correggere il canto fino ad ottenere il giusto canto.

All'animale in isolamento manca la parte "own species song heard" per cui canterà il modello "crudo" reimpostato dal genotipo, l'animale sordo invece manca anche della fase "hears own song".

Uccello con enorme capacità di apprendimento dei canti:

www.youtube.com/watch?v=VjE0Kdfos4Y

SISTEMA NEURALE DEL CANTO:



Formato da una serie di regioni dell'encefalo degli uccelli canori che sono responsabili della produzione e dell'apprendimento del canto.

Il sistema nervoso degli uccelli è molto sviluppato (l'animale più intelligente dopo l'uomo è il corvo della nuova caledonia: è capace di fabbricare strumenti:

<http://youtu.be/swQAqc3IJSM>)

ed è peculiare in quanto l'encefalo è organizzato in nuclei ben visibili, in cui sono raggruppate zone con precise

funzioni e questo rende molto più facile lo studio.

Sono presenti due circuiti: quello rosso detto circuito motorio che permette la produzione del canto e contiene il nucleo ipoglossico o XII il quale controlla la siringe, il nucleo presente alla base del cervello che controlla la respirazione, e quello rosa che è la via che permette l'apprendimento detta via anteriore.

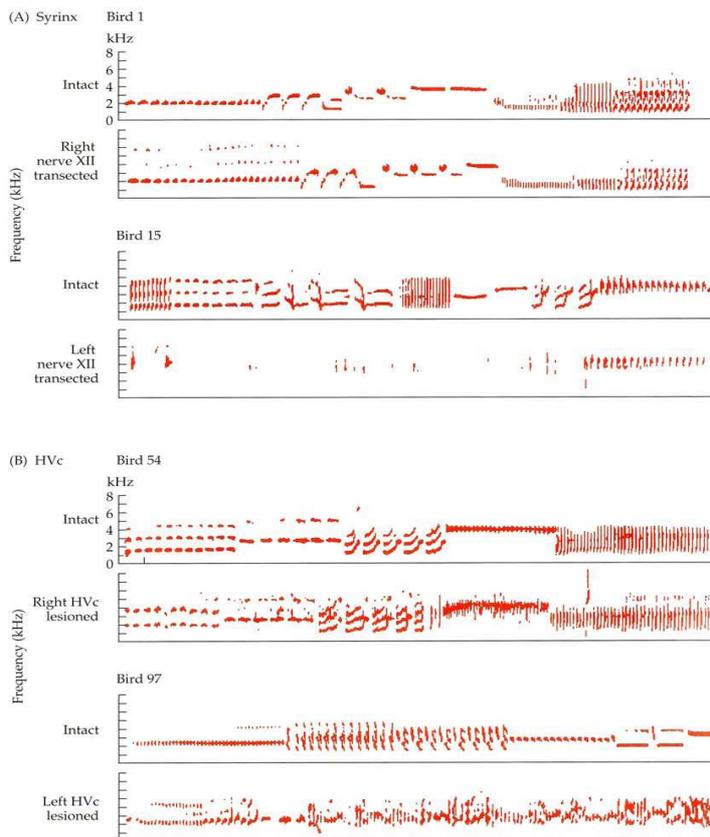
HVC è il nucleo di controllo superiore e contiene il pattern del canto, RA invece è un nucleo pre-motorio che contiene le sillabe da riprodurre che sono però scelte da HVC: è un sistema di controllo gerarchico.

HVC è stata la prima struttura in cui si è dimostrato un dimorfismo sessuale macroscopico, nei maschi è circa il 40-50% più grande rispetto a quello delle femmine. (Anche nell'uomo sono state scoperte aree sessualmente dimorfiche a livello dell'ipotalamo e sono state chiamate per l'appunto: aree sessualmente dimorfiche dell'ipotalamo... sembra che siano collegate all'orientamento sessuale in quanto nei maschi omosessuali hanno le stesse dimensioni di quelle femminili).

Un'altra caratteristica del sistema del canto consiste nel fatto che sia lateralizzato: cioè ha perso la sua bilateralizzazione iniziale e si è concentrato in un solo emisfero cerebrale.

Le funzioni cognitive complesse generalmente vengono localizzate in uno dei due emisferi per facilitare l'azione del cervello.

La lateralizzazione negli uccelli fu dimostrata lesionando in un primo esperimento i

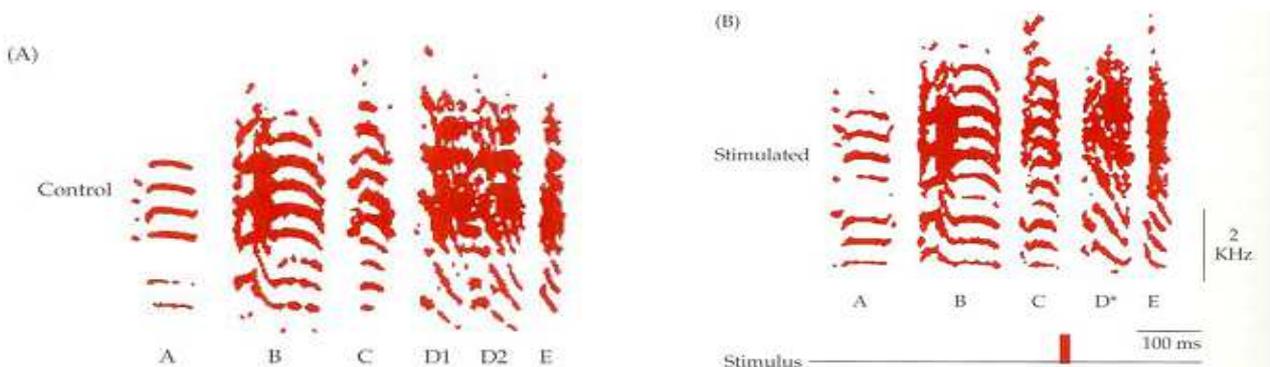


centri che controllano la siringe (grafico A).

Determinando danno al nervo XII destro il canto più o meno è uguale al canto di un canarino intatto, mentre lesionando il XII nervo sinistro la struttura del canto praticamente scompare. Nel canarino il controllo del canto ha una dominanza sinistra.

In un secondo esperimento è stato lesionato HVC prima a destra e poi a sinistra (in 2 individui diversi) ottenendo il medesimo risultato. Il canto è un sistema lateralizzato nell'emisfero sinistro.

Per dimostrare che HVC aveva controllo gerarchico fu effettuato un ulteriore esperimento su un *Diamante Mandarin*:



Il grafico A rappresenta il canto normale: costituito da 6 sillabe .

Il grafico B rappresenta il canto di un Diamante mandarino che in un determinato istante (dopo la sillaba C) viene stimolato grazie ad un elettrodo all'interno di HVC. Nel momento in cui viene applicato lo stimolo il canto si modifica in quanto viene omessa una sillaba (come se saltasse il disco).

La medesima azione fatta nei diversi nuclei del cervello non determina un cambio del pattern del canto e tutto ciò dimostra il controllo gerarchico di HCV sul sistema del canto (HVC controlla la sintassi del canto).

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Quali aspetti sono comuni al canto degli uccelli e al linguaggio umano?
2. Perché è importante il feedback auditivo nell'apprendimento vocale?
3. Come si dimostra se un comportamento è lateralizzato?

RISPOSTE:

1. È comune la presenza di dialetti che sono dovuti ad una pressione culturale e all'interazione con l'ambiente in cui crescono e non a differenze genetiche.

La risposta deve riguardare una singola caratteristica e non un elenco, altri aspetti in comune erano: la fase sensibile, la fase sensomotoria, la lateralizzazione, la capacità di apprendimento vocale...

2. Perché permette di sentirsi e correggersi assumendo il controllo neuromuscolare e riuscendo infine a ottenere il canto ascoltato nella fase sensibile, tutto ciò è dimostrato dal fatto che individui sordi non sono in grado di comunicare normalmente con i propri simili.
3. Si dimostra lesionando i centri ritenuti responsabili a destra in un individuo e a sinistra in un altro, si verifica quindi se il comportamento si modifica con una lesione piuttosto che con l'altra. La parte che causa degli effetti (che devono essere nettamente maggiori rispetto all'altra) sarà quella in cui è avvenuta lateralizzazione.

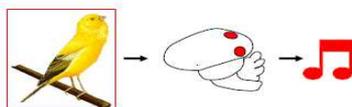
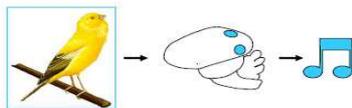
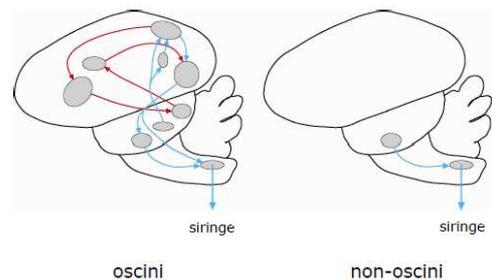
RUOLO DEGLI ESTROGENI NEL CONTROLLO DEL CANTO

Questo studio prende in considerazione tutti i livelli di indagine biologica perché è necessario collegare l'attività specifica di alcuni geni di neuroni ad un comportamento complesso.

Tutto il seguente studio è rivolto a uccelli canori soprattutto utilizzando canarino e diamante mandarino.

Il sistema neurale del canto è un network specifico di nuclei cerebrali distinti che non esiste negli uccelli che non cantano.

Il canto e il sistema neurale si sono evoluti insieme, ma si è evoluto indipendentemente nel gruppo degli oscini.

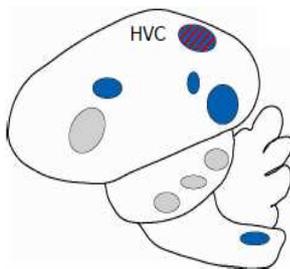


femmina

Il canto è un dimorfismo sessuale, solo il maschio canta (solo in rare specie esotiche canta la femmina), e permette la selezione sessuale.

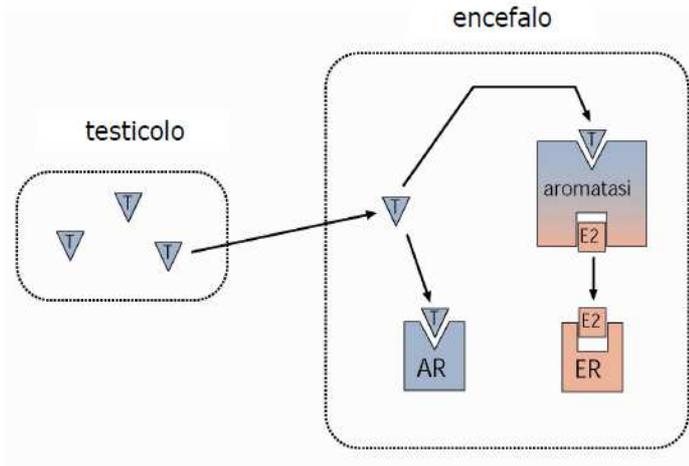
Studiando HVC si è scoperto che presenta recettori per gli ormoni sessuali: Androgeni (testosterone) e Estrogeni (estradiolo).

- rec. estrogeni
- rec. androgeni



Gli androgeni sono tipicamente chiamati ormoni maschili e gli estrogeni, ormoni femminili.

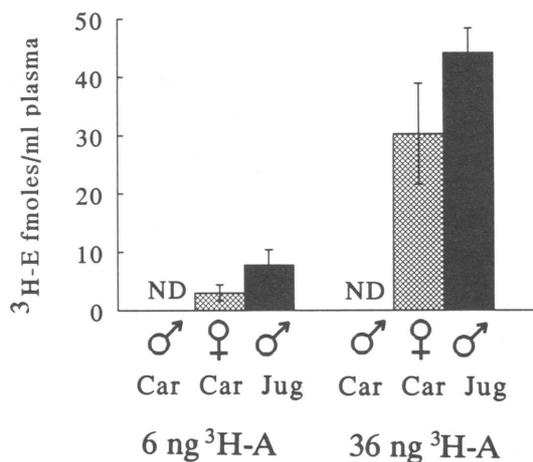
Il canto è un dimorfismo sessuale per cui è normale che ci sia una regolazione da parte di ormoni sessuali ma è strano il fatto che ci sia un controllo da parte degli Estrogeni: ci si domanda a cosa servono, e perché ci sono data la poca concentrazione di estrogeni in circolo.



Il testosterone nell'uomo in certi tessuti target viene trasformato in estradiolo: il tessuto bersaglio negli oscini è il cervello dove il testosterone può comportarsi come tale o subire modifica e diventare un estradiolo. (Gli organismi producono estrogeni sempre tramite gli androgeni grazie all'enzima aromatasi).

Nel cervello degli oscini sono quindi presenti tessuti in grado di determinare aromatizzazione del testosterone.

Schlinger e Arnold nel 1992 dimostrarono che il cervello degli uccelli canori era in grado di produrre estrogeni pubblicando il lavoro con il titolo "Negli uccelli la più grande ghiandola endocrina è il cervello" .



Il grafico è il risultato di un dosaggio enzimatico in cui si misura la capacità dell'aromatasi di convertire gli androgeni in estrogeni in degli omogenati di tessuto nervoso.

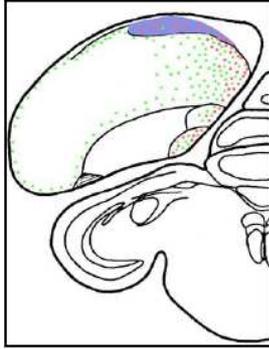
Il substrato è androstredione marcato con trizio (radioattivo) che viene usato a due diverse concentrazioni 6 e 36 ng (danno lo stesso risultato in proporzione).

Si misura poi la quantità di estrogeno marcato (indice diretto dell'attività dell'enzima).

La prima colonna indica la concentrazione di estrogeno marcato nella carotide del maschio, la seconda nella carotide della femmina e la terza nella giugulare del maschio. Si nota che nella carotide (arteria che porta sangue al cervello) del maschio non trovo estrogeno che entra a livello celebrale mentre nella femmina si perché la conversione enzimatica è avvenuta nell'ovaio. Nella giugulare (vena uscita dai tessuti celebrati) del maschio si riscontra la presenza di estrogeno marcato e questo dimostra che la conversione è avvenuta nel cervello.

I recettori per gli estrogeni in HVC sono quindi presenti perché c'è un centro a livello celebrale che produce estradiolo ma...

Quali sono le zone di produzione degli estrogeni?



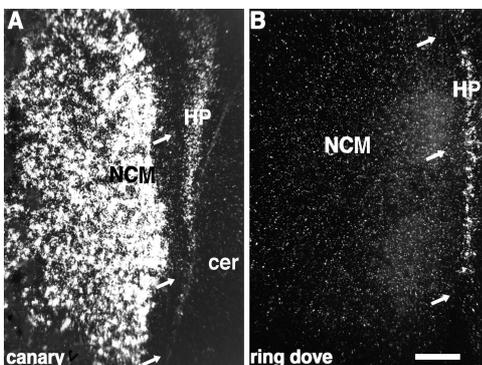
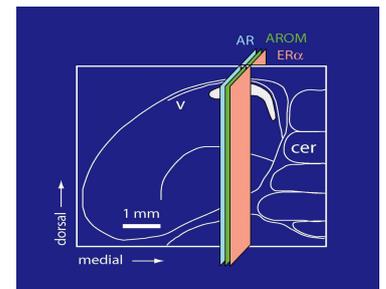
Gahr nel 1993, Shen nel 1995 e Jacobs nel 1996 furono in grado di mappare la distribuzione dei recettori degli estrogeni e dell'aromatasi nel cervello degli oscini.

- aromatasi
- recettori X estrogeni (ER)

La tecnica usata fu l'ibridazione in situ che permette di localizzare le zone di un tessuto in cui viene espresso un determinato gene. Si utilizza una sonda marcata che si ibrida alla sequenza complementare di mRNA del gene di interesse. Si usa RNasi per eliminare tutto ciò che non si è legato specificamente. Tramite una particolare illuminazione detta "campo scuro" si visualizza in quali posizioni si è legata la sonda, quindi si definisce in quali zone è espresso il gene di interesse.

Grazie a un criostato si fanno sezioni (sagittali) molto sottili (~20µm) per ricercare i loci di espressione del recettore per gli androgeni (AR), del recettore per gli estrogeni (ER) e dell'aromatasi (AROM).

Le tre sezioni vengono sottoposte a ibridazione in situ.

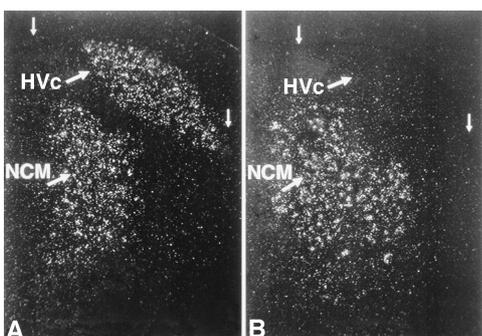


Espressione del mRNA dell'aromatasi nel nidopallio caudomediale (NCM).

Le zone che appaiono più chiare sono quelle che esprimono mRNA AROM.

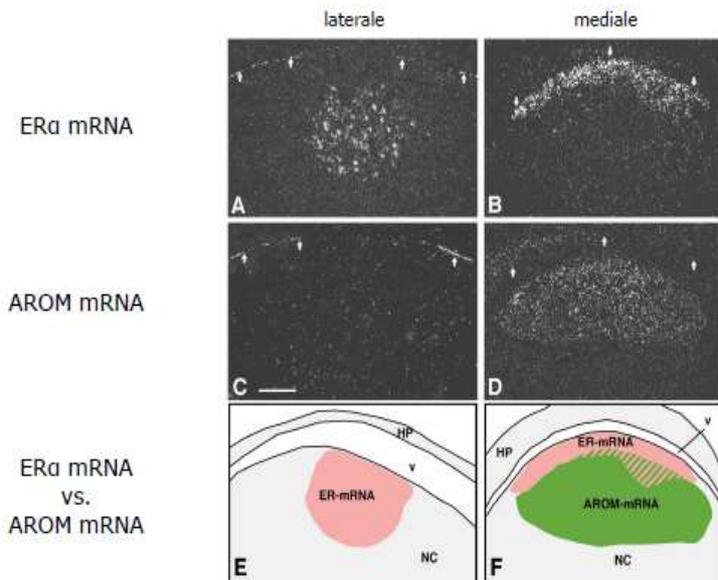
Il confronto riguarda un oscino e un non oscino, il canarino presenta una quantità enorme di espressione di AROM.

Tutto ciò ci suggerisce che l'AROM sia implicata nel sistema nel canto.



Espressione dei recettori per gli androgeni (AR) nell'immagine A e dell'aromatasi (AROM) nell'immagine B a livello del nidopallio.

HVC viene identificato dalla presenza di AR, sito che però non presenta AROM.



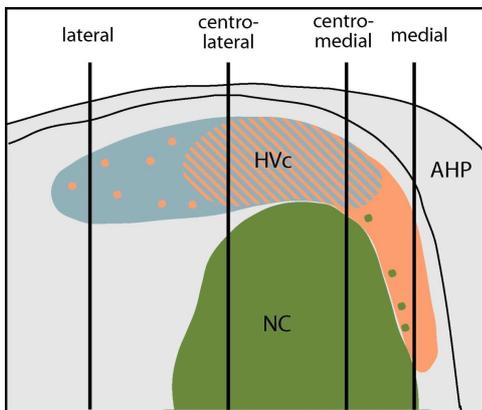
Espressione dei recettori per gli estrogeni (ER) e dell'aromatasi (AROM) nel nidopallio.

Le immagini sono relative a 2 sezioni una più laterale e una più mediale.

Nella zona laterale è presente poca aromatasi che si concentra medialmente.

Esiste una piccola zona che esprime sia AROM che ER.

Gli studi di ibridazione in situ mostrano che nel cervello degli uccelli canori c'è una abbondante quantità di AROM che circonda la zona del cervello sensibile agli estrogeni.



Riassumendo:

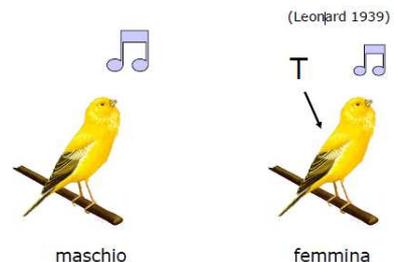
- il pattern di distribuzione dell'aromatasi differisce tra oscini e non oscini,
- il nidopallio caudomediale è adiacente ad HVC: la zona di produzione degli estrogeni è adiacente al sito di utilizzo,
- HVC contiene entrambi i tipi di recettori: androgenici e estrogenici.

Dai dati osservati si può ipotizzare che gli estrogeni abbiano un ruolo nel sistema del canto.

Per verificare questa ipotesi si è utilizzato un modello nel modello:

si inietta testosterone nella femmina per indurre mascolinizzazione, tutto ciò porta la femmina a cantare determinando anche una modificazione a livello neurale in quanto i nuclei del sistema del canto aumentano di dimensioni (differenziamento sessuale nell'adulto).

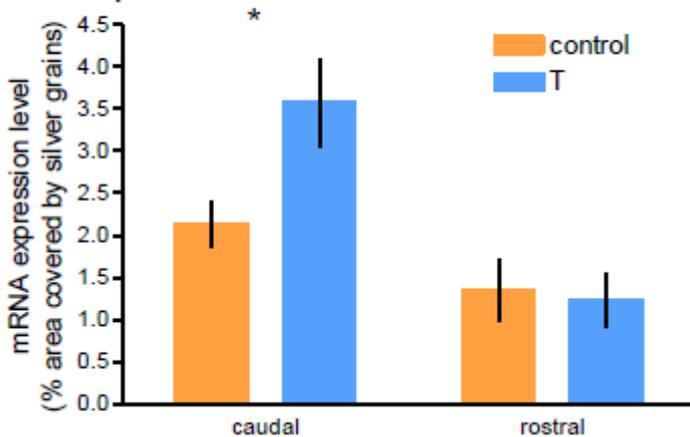
Il tempo necessario a creare il modello nel modello è di 3-4 settimane (relativamente breve).



Vantaggi del modello nel modello (femmina mascolinizzata):

- Si sa esattamente quando si fa iniziare lo sviluppo del canto,
- Si ha a che fare con un animale adulto molto più stabilizzato a livello fisiologico,
- L'utilizzo di un trattamento farmacologico permette modulazione.

Effetti del T sull'espressione dell'aromatasi in NCM

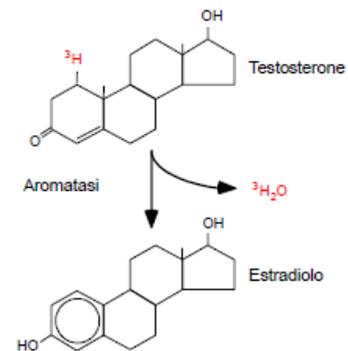


L'aromatasi aumenta di concentrazione nell'NCM a seguito della somministrazione di Testosterone.

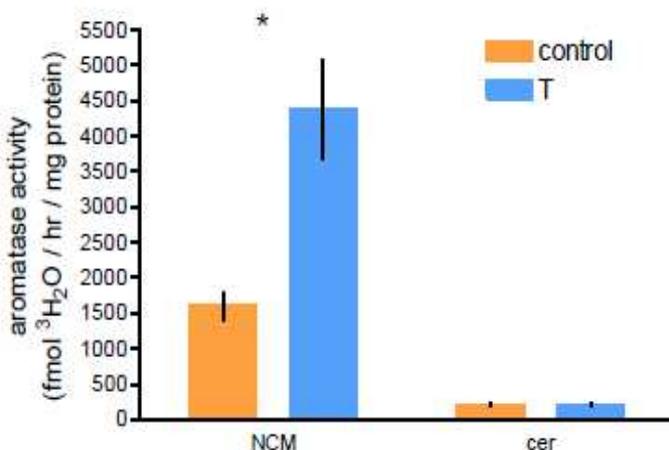
Con dosaggio radio-enzimatico è possibile quantificare l'efficienza dell'enzima.

Si utilizza testosterone triziato, che subisce aromatizzazione liberando una molecola di H₂O radioattiva.

Viene misurata quindi la quantità di acqua marcata con trizio e se ne ricava la quantificazione della funzionalità enzimatica.



Effetti del T sull'attività dell'aromatasi



L'attività enzimatica è aumentata negli individui a cui è stato somministrato il Testosterone.

Somministrando testosterone alla femmina determino quindi induzione dello sviluppo del canto accompagnato da un aumento dell'espressione dell'aromatasi e della produzione di estrogeni.

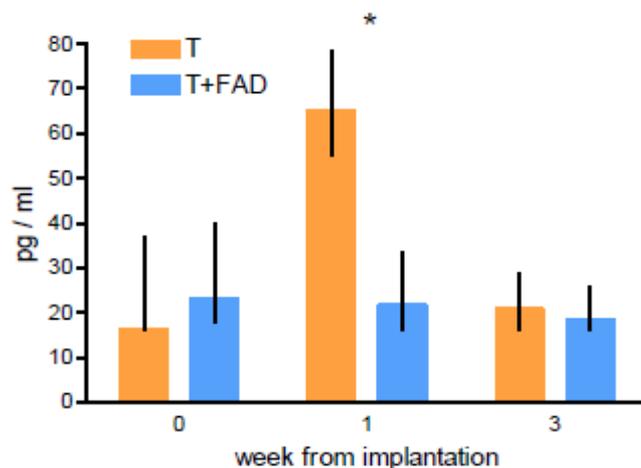
A questo punto si può determinare blocco dell'aromatasi nelle femmine trattate con testosterone inibendo quindi la produzione di estrogeni.

Tutto ciò non si effettua direttamente su un maschio perché il trattamento dovrebbe durare per tutto il tempo necessario allo sviluppo del canto che avviene nel periodo infantile e quindi la mancanza di estrogeni causerebbe alterazioni metaboliche e fisiologiche importanti.

Il blocco dell'aromatasi avviene per opera di un inibitore competitivo: il Fadrozolo. L'esperimento si effettua somministrando Fadrozolo a femmine trattate con testosterone (la somministrazione si effettua in modo lento e costante grazie ad un pellet che viene impiantato a livello sottocutaneo mescolandolo alla sostanza da rilasciare).

Come controllo si deve utilizzare una femmina trattata con testosterone.

Effetti del Fadrozolo sulla produzione di estrogeni

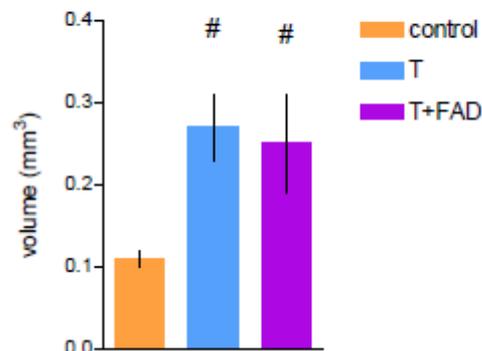


Vengono misurati i livelli di estrogeni a diversi intervalli di tempo dopo la somministrazione nell'arco di tre settimane:

- Nella settimana della somministrazione le concentrazioni di estrogeni nel sangue risultano essere normali (20-30 pg/ml),
- Nella settimana successiva alla somministrazione, le femmine trattate solo con T, presentano un significativo aumento degli estrogeni nel sangue rispetto agli individui trattati con T + FAD.

La presenza di estrogeni mostrata dal grafico negli animali a cui è stato somministrato FAD oltre che T è dovuta sia alla incapacità del FAD di inibire il 100% degli enzimi (si deve considerare che dosi più elevate di FAD sono tossiche), sia a limiti strumentali in quanto in quasi tutti i tipi di dosaggio ormonale esiste un margine inferiore detto "sensibilità del dosaggio" al di sotto del quale non si è in grado di distinguere il reale valore da zero e quindi tutto ciò che sta tra zero e la sensibilità del dosaggio non è misurabile: il valore minimo che posso attribuire è quindi quello della sensibilità.

Effetti del Fadrazolo sul volume di HVC

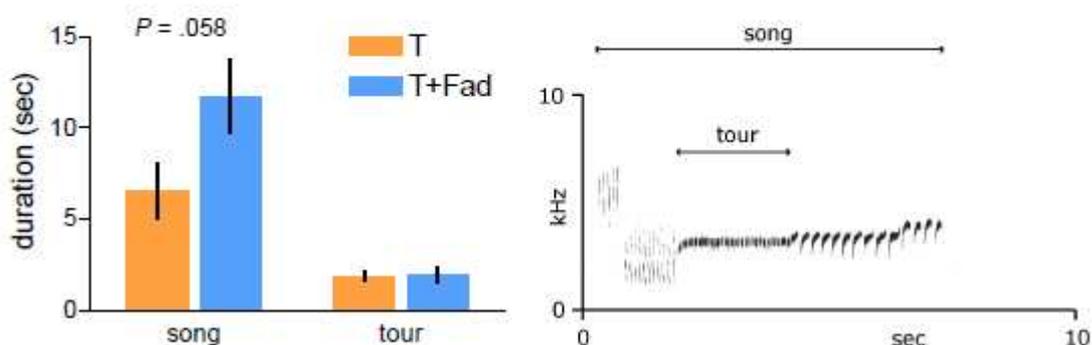


Il volume di HVC aumenta con la somministrazione di T ma questo aumento non è contrastato dal trattamento con FAD.

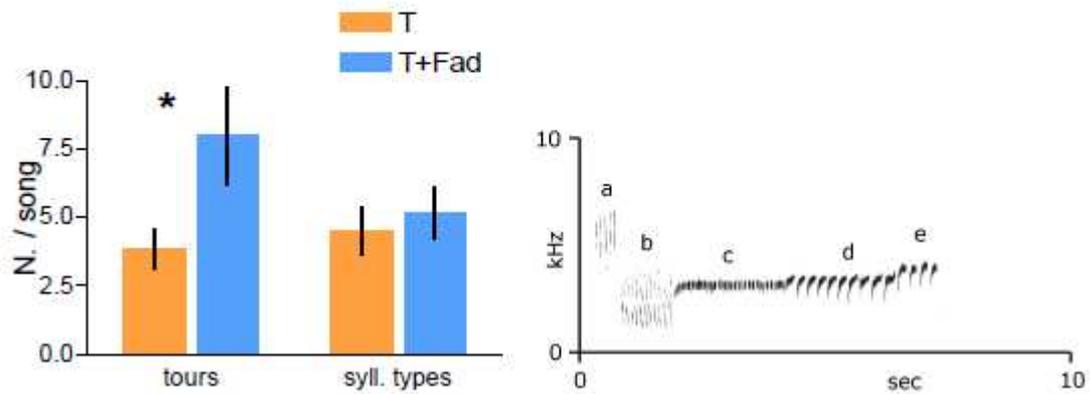
Probabilmente il volume di HVC cambia direttamente a causa del testosterone e non per la sua conversione in estradiolo.

Altri esperimenti effettuati per capire il ruolo degli estrogeni nel sistema del canto:

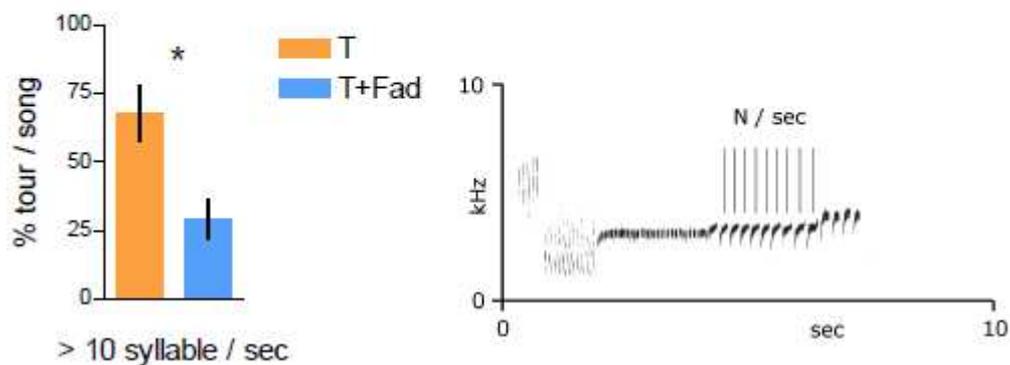
Il Fadrazolo provoca un allungamento (non significativo) del canto



Il Fadrazolo provoca un aumento del numero di frasi (tours)



Il Fadrazolo provoca una riduzione della frequenza di ripetizione delle sillabe



Quest'ultimo risultato è il più importante in quanto altri studi hanno dimostrato che un alto numero di sillabe ripetute in modo rapido determinano un maggior interesse della femmina nei confronti del maschio.

Gli estrogeni sono molto utili per favorire la plasticità e quindi importanti durante l'apprendimento del canto ma anche nella fase del sottocanto determinando frasi più complesse e sillabe più veloci.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Perché l'azione di un ormone può dipendere da processi enzimatici nei tessuti bersaglio?
2. In che modo studi di ibridazione in situ con sonde marcate possono aiutare a comprendere le località e le modalità di azione degli ormoni ?
3. Quali sono le problematiche sperimentali associate all'utilizzo di bloccanti o inibitori enzimatici ?

RISPOSTE:

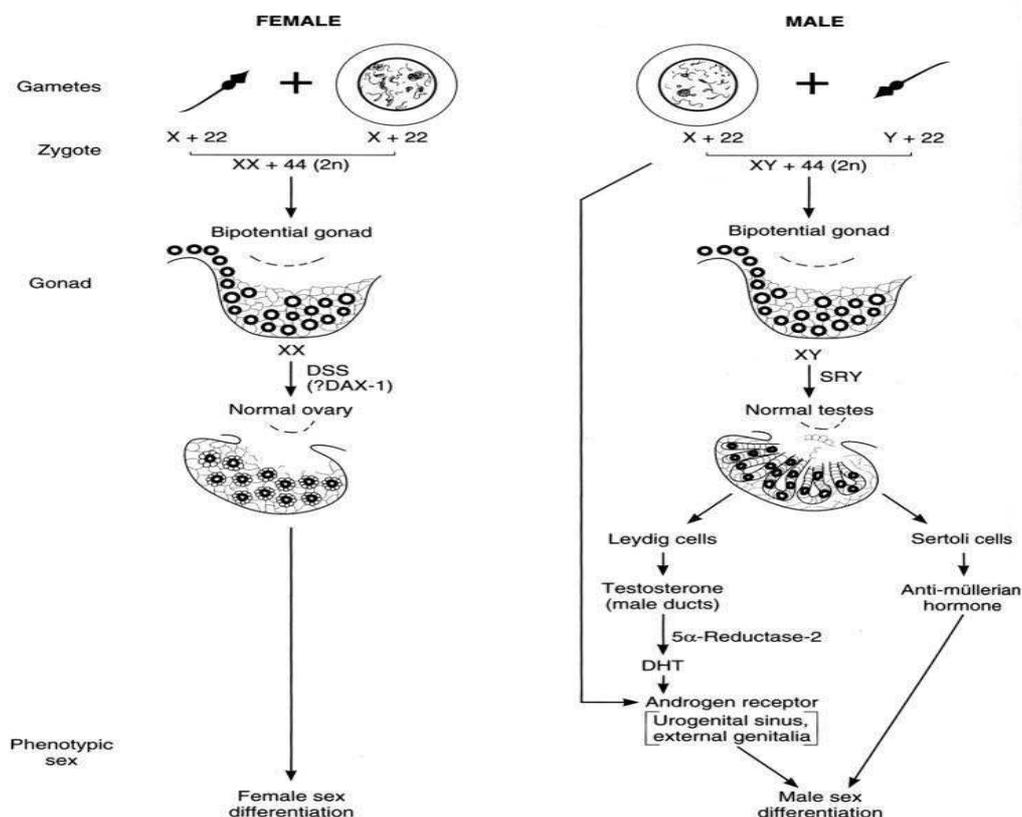
1. Perché l'enzima può determinare modificazioni strutturali all'ormone e quindi cambiare la sua specifica azione: l'ormone può agire direttamente o comportarsi da precursore ormonale (pro-ormone) se agisce in seguito a trasformazione enzimatica.
2. Le sonde permettono di localizzare i recettori ormonali grazie alla specifica complementarità degli mRNA che li traducono e quindi capire i siti in cui agiscono gli ormoni di interesse, le modalità di azione sono deducibili relazionando le località di produzione e di azione degli ormoni stessi.
3. I problemi sono sia di tipo fisiologico in quanto le sostanze usate possono essere tossiche ad alte concentrazioni e a quelle utilizzate la capacità di inibire l'enzima può non essere del 100%, sia di tipo strumentale in quanto non sono misurabili valori al di sotto della sensibilità del dosaggio.

IL RUOLO DELL'ALFAPETOPROTEINA

Alfafetoproteina è coinvolta nel differenziamento sessuale.

Si distinguono tre livelli di distinzione del sesso:

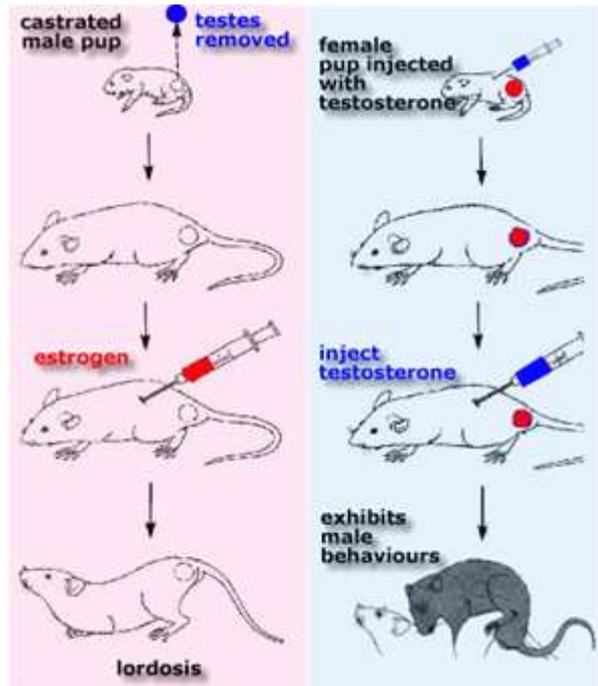
- Sesso genetico: definizione del sesso a livello cromosomico (XX o XY).
- Sesso gonadico o gametico: riguarda lo sviluppo delle gonadi in ovari o testicoli infatti il cromosoma Y possiede il gene SRY che determina lo sviluppo della gonade maschile (prima dell'intervento di SRY la gonade è bipotenziale), la mancanza del cromosoma Y e quindi dell'espressione di SRY determina sesso femminile che viene quindi definito sesso neutro;
- Sesso fenotipico: dipende da due meccanismi paralleli dovuti alle cellule del Leydig del testicolo che producono testosterone e determinano mascolinizzazione cioè lo sviluppo dei genitali maschili, e alle cellule del sertoli del testicolo che producono l'ormone mülleriano e determinano defemminizzazione dell'embrione. Alcuni aspetti del fenotipo si sviluppano precocemente ed altri più tardi. Tra gli aspetti che hanno sviluppo posticipato c'è il differenziamento sessuale del sistema nervoso e del comportamento.



Un gruppo di ricercatori somministrò ad un neonato femmina di ratto una dose di testosterone e scoprì che da adulto dopo una ulteriore dose di testosterone il ratto mostrava un comportamento sessuale maschile.

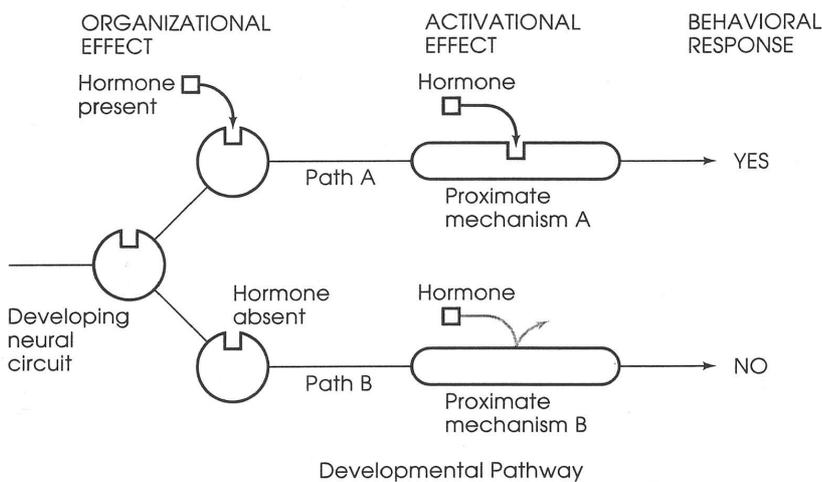
Se lo stesso trattamento in modo opposto viene effettuato in un maschio castrato da neonato si sviluppa comportamento femminile dopo la somministrazione di una dose di estrogeni da adulto.

I controlli con iniezione placebo da neonati alla successiva somministrazione ormonale da adulti non hanno alcuna alterazione comportamentale.



Il differenziamento sessuale del sistema nervoso e del comportamento nei mammiferi segue due fasi:

- Organizzativa che avviene in età precoce (nei topi poco dopo la nascita, nell'uomo durante lo sviluppo intrauterino): il testosterone trasforma il sistema nervoso da femminile a maschile;
- Attivatoria che nell'uomo avviene alla pubertà (12-13 anni): agiscono gli ormoni determinando il comportamento sessuale precedentemente predisposto nella fase organizzativa.



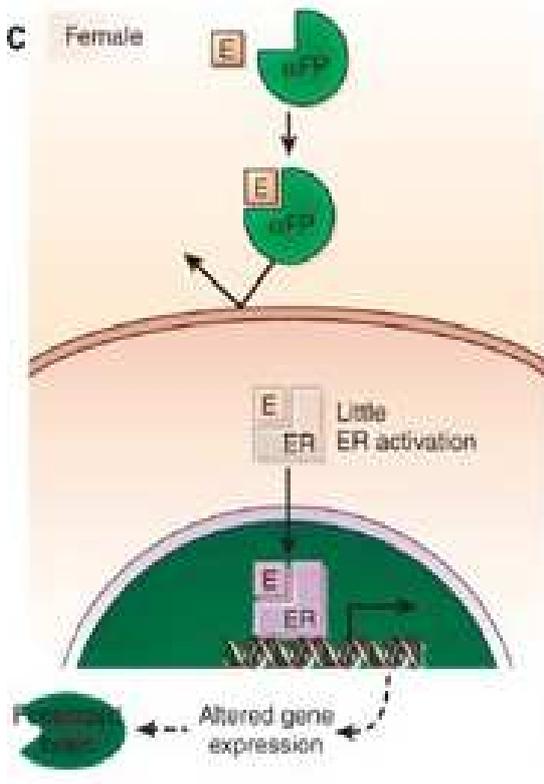
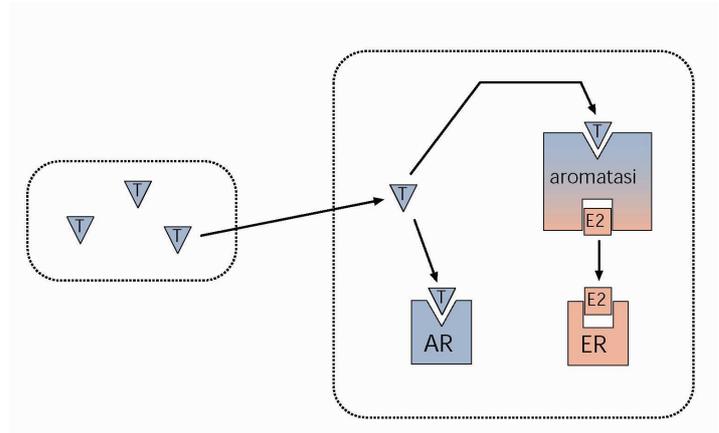
Se l'ormone è presente (caso A) il sistema nervoso si sviluppa in modo da rispondere all'ormone da adulto, se l'ormone è assente (caso B) il sistema nervoso si sviluppa in modo da non rispondere all'ormone nell'adulto.

Il sistema nervoso femminile e maschile sono quindi organizzati in maniera diversa.

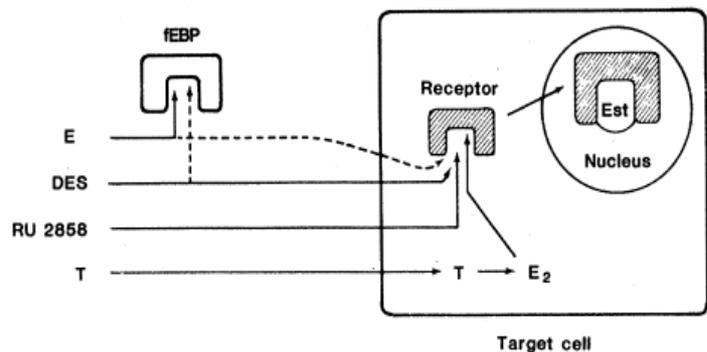
Il testosterone nel sistema nervoso può agire sia come androgeno che come estrogeno dopo aromatizzazione.

La domanda immediata dei ricercatori fu: "se l'effetto mascolinizzante del testosterone dipende in parte anche dalla sua conversione in estrogeno come mai il feto femminile non viene mascolinizzato dato l'alto aumento estrogenico in circolo nella madre?".

Gli ormoni steroidei passano tranquillamente la placenta come la barriera ematoencefalica.

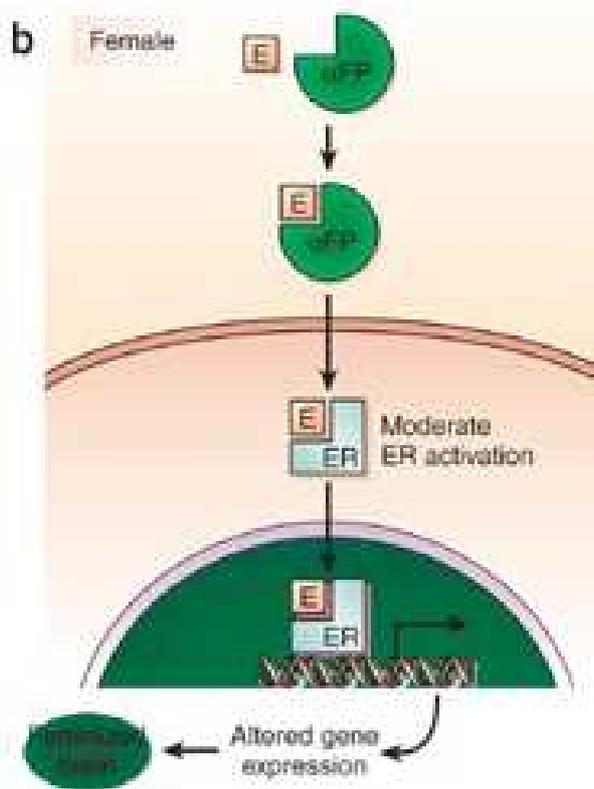


Negli anni '70 venne proposta l'esistenza di una proteina fetale inizialmente chiamata fEBP (fetoneonatal estrogen binding protein) oggi detta AFP (alfafetoproteina) che protegge il feto dall'azione degli ormoni materni. La sua azione consisterebbe nel legare l'estradiolo in circolo segregandolo e impedendogli quindi di raggiungere la cellula target e svolgere la sua azione mascolinizzante.



La scoperta dell'AFP fu in parte casuale in quanto si notò che figlie femmine nate da madri trattate con estrogeni sintetici (es. dietilstilbestrolo o DES e 11β-methoxy-17α-ethynylestradiol o RU 2858) per diminuire il rischio di aborto spontaneo, avevano disturbi di identità di genere (facevano giochi da maschio da bambine e da adulte avevano problemi di transessualità e orientamento sessuale).

Questi ormoni erano in grado di evitare il legame con AFP e potevano mascolinizzare il feto.



Qualche anno dopo si ipotizzo anche che AFP avesse un'azione di trasporto degli estrogeni nella cellula permettendo quindi un'entrata regolata dell'ormone nei feti femminili. AFP funzionerebbe quindi da modulatore per determinare l'ingresso moderato di estrogeno nelle cellule target.

"...these two clearly opposing views on the function of AFP in brain sexual differentiation have not been experimentally tested owing to the absence of a suitable animal model..."

Bakker et al. Nature Neuroscience 9, 220 -226 (2006)

L'assenza di un modello adatto impedì quindi per anni di ottenere prove a favore di una teoria o dell'altra.

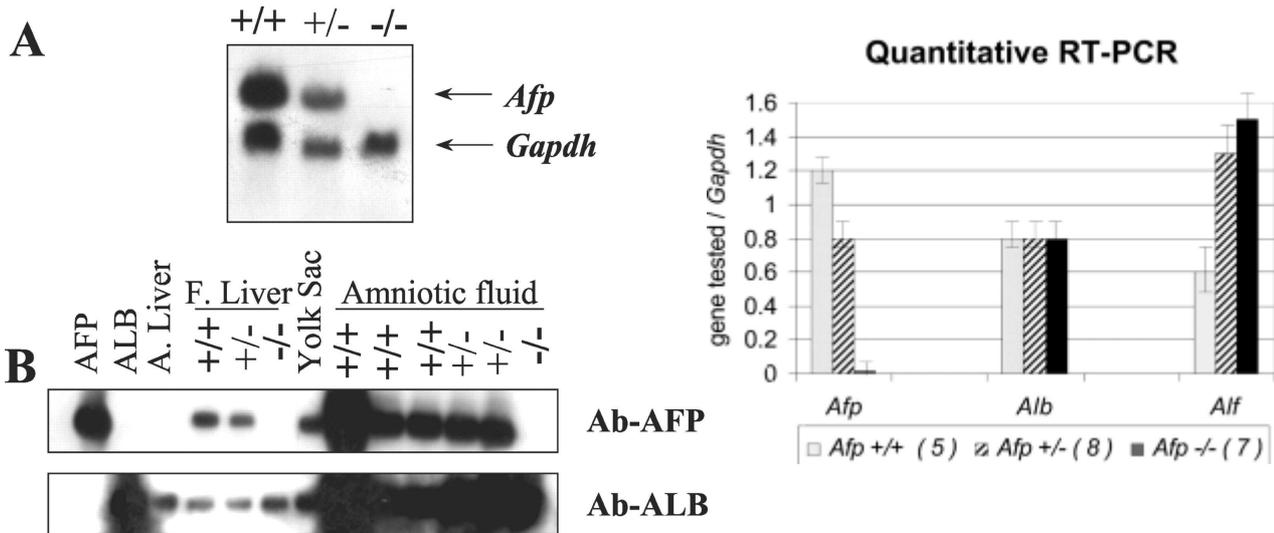
La comprensione del ruolo di AFP era legata a difficoltà sperimentali (studio intrauterino e k.o. dell'AFP erano complicati).

PNAS October 1, 2002 vol. 99 no. 20 12865-12870

Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility

Philippe Gabant*, Lesley Forrester†,‡, Jennifer Nichol†, Thierry Van Reeth*, Christelle De Mees*, Bernard Pajack§, Alistair Watt†, Johan Smits¶, Henri Alexandrel, Claude Szpirer*,**, and Josiane Szpirer*

Il titolo dell' articolo specifica che "AFP non è essenziale per lo sviluppo embrionale" quindi il knock out per il gene permette ugualmente la sopravvivenza dell'embrione ma "è necessaria per la fertilità femminile", cioè senza AFP nascono femmine non fertili.



Questi dati sono il risultato di esperimenti per verificare che l'animale omozigote k.o. non presenti AFP.

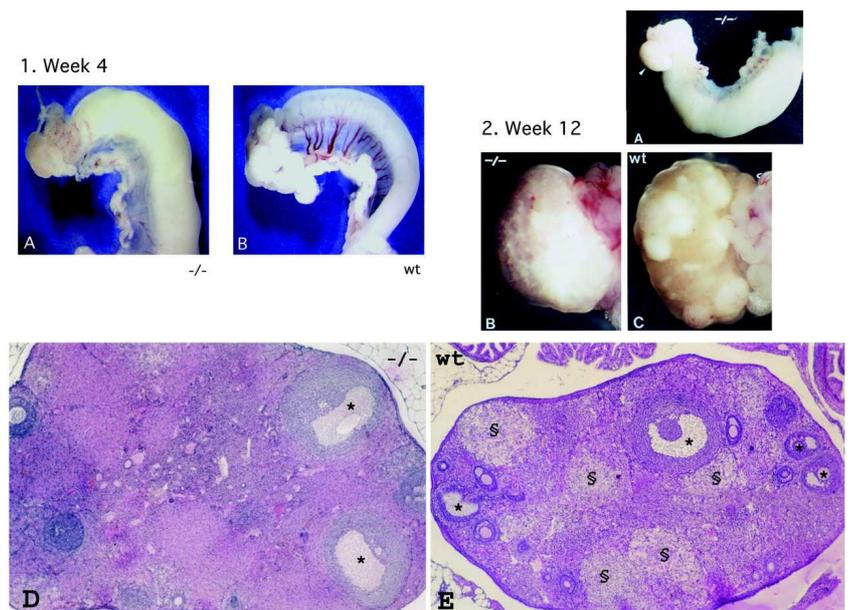
Nel caso A si è utilizzato Northern blot, nel caso B è stato utilizzato Western blot in diversi tessuti.

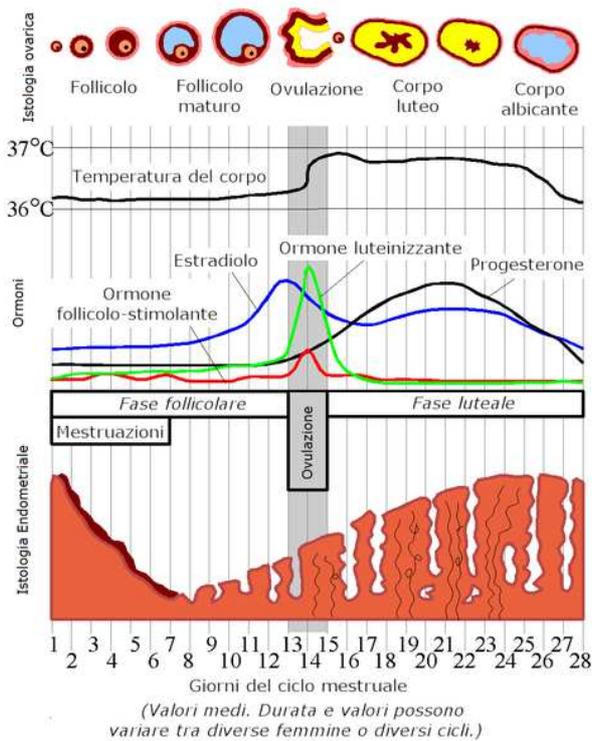
Un'ulteriore analisi è stata effettuata con RT-PCR quantitativa.

AFP negli omozigoti non è presente.

Per completare le analisi si è osservato anche il fenotipo grazie ad analisi istologiche e anatomiche di uteri ed ovaie di topi k.o. e wild type.

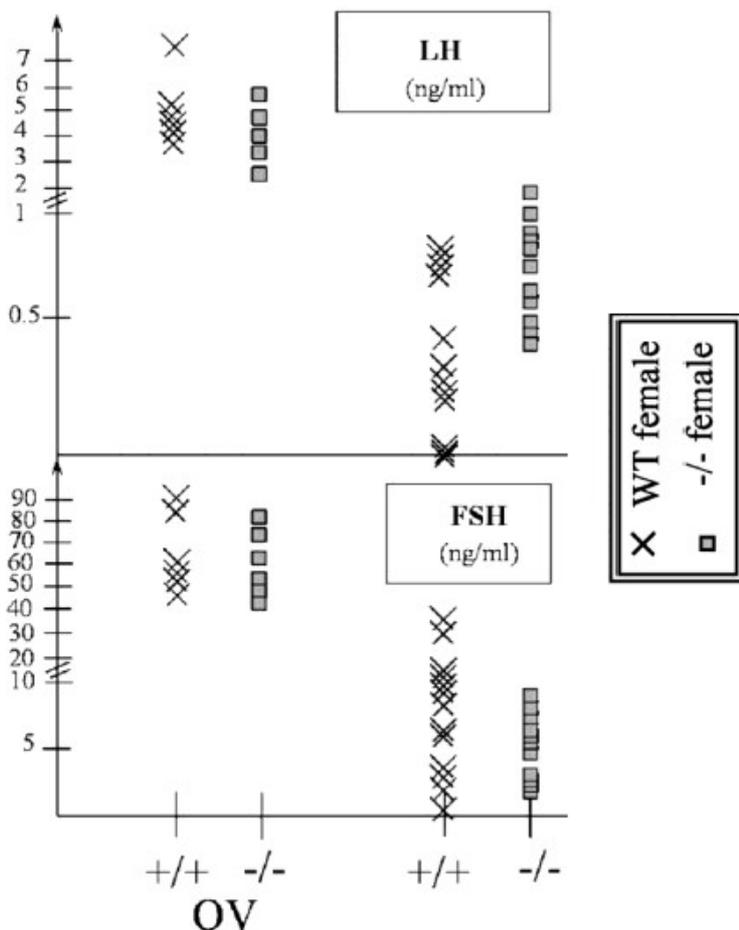
Si nota che alla quarta settimana c'è già una certa differenza dell'ovario e delle tube tra i due animali -/- e wt. Alla settimana 12 nel wt sono presenti strutture follicolari mentre il mutante non presenta alcun follicolo ovarico (le ovaie nel -/- non funzionano: la femmina non è fertile).





Analizzando il ciclo mestruale si nota che durante la fase follicolare si ha tipicamente un aumento dei livelli di estradiolo e durante l'ovulazione c'è un picco nella concentrazione dell'ormone luteinizzante.

I livelli dell'ormone luteinizzante LH e dell'ormone follicolo stimolante FSH in animali -/- e wt sono descritti nelle seguenti tabelle:



Tenendo conto della legenda si può dedurre che negli animali testati (Ovariectomizzati OV e non) ci sono differenze significative nei livelli di LH ma non di FSH. Le gonadotropine sono prodotte sotto stimolazione ipotalamo-ipofisaria e tutto ci riconduce a un controllo da parte nervoso che risulta alterato negli -/-. Si può dedurre quindi che probabilmente l'infertilità degli animali è dovuta alla mancanza di organizzazione femminile del cervello.

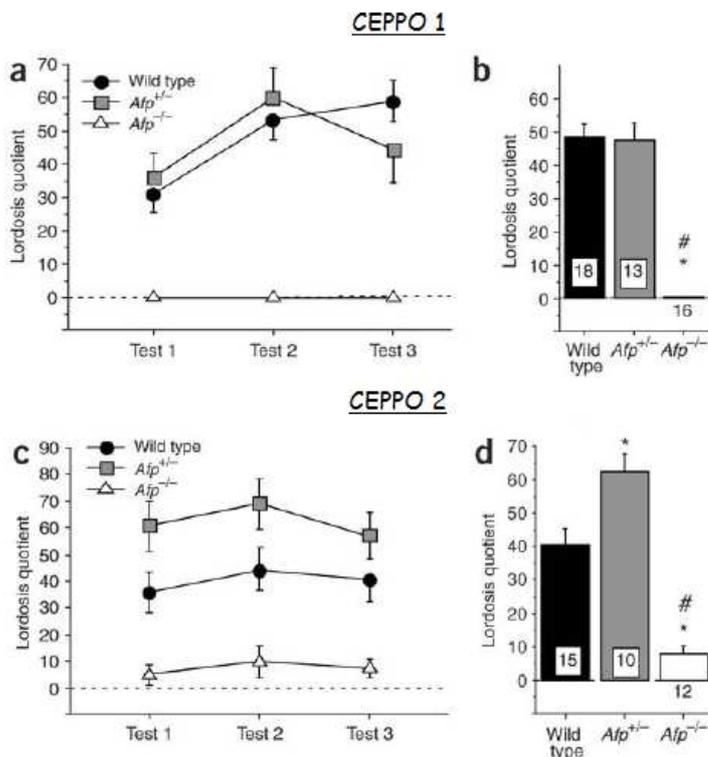
Article *Nature Neuroscience* 9, 220 -226 (2006) Published online: 1 January 2006; / doi:10.1038/nn1624

Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens

Julie Bakker¹, Christelle De Mees², Quentin Douhard¹, Jacques Balthazart¹, Philippe Gabant², Josiane Szpirer² & Claude Szpirer².

AFP ha ruolo nel proteggere il feto femminile, e questo risultato è stato ottenuto valutando anche il comportamento sessuale degli animali trattati.

Gli sperimentatori per ottenere risultati più affidabili hanno utilizzato due ceppi diversi di topi:



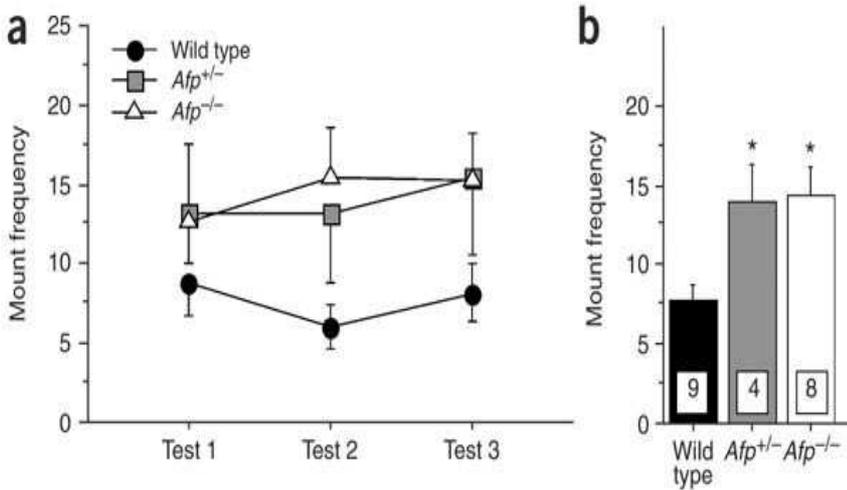
Il comportamento femminile è caratterizzato da una particolare postura pre-accoppiamento detta Lordosi che il maschio non assume mai.

Viene effettuato un test, ripetuto tre volte per l'analisi del comportamento sessuale.

Ne risulta che l'eterozigote non si discosta molto dal quoziente di lordosi del wt ma l'omozigote non sviluppa alcuna lordosi in risposta allo stimolo maschile.

Queste femmine -/- risultano quindi essere defemminizzate.

Per verificare se sono anche mascolinizzate è necessario analizzare se presentano comportamento sessuale maschile mettendole a contatto con altre femmine wt:

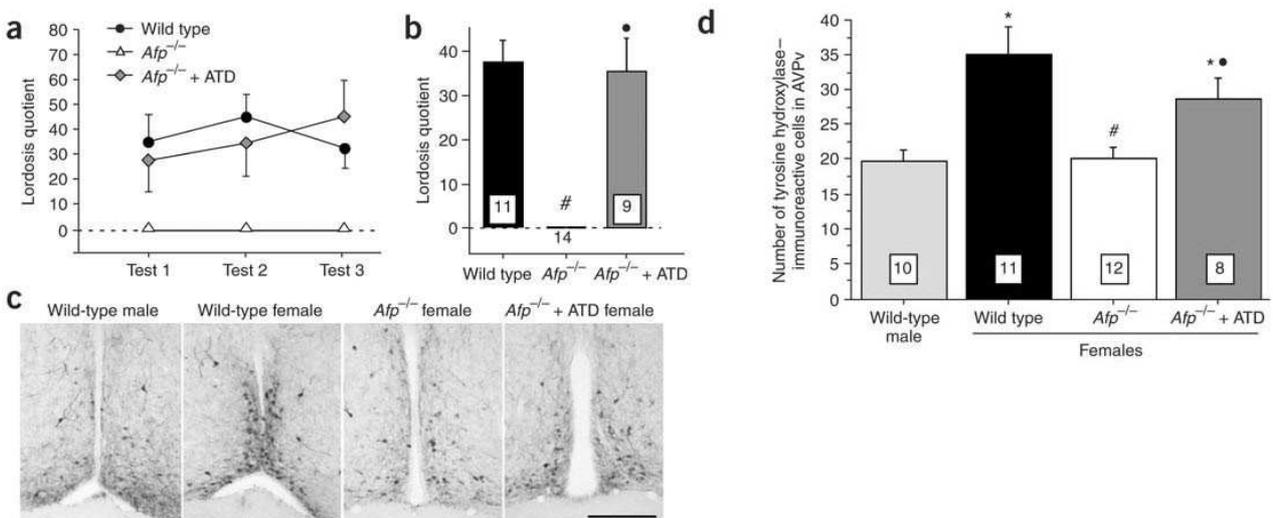


Il test viene effettuato sia su -/- che +/- ed entrambi risultano avere una frequenza di monta (comportamento maschile) maggiore rispetto a quella presente nei wt.

Le femmine k.o. risultano quindi essere anche mascolinizzate.

A questo punto la ricerca proseguì con lo scopo di determinare quale delle due ipotesi sul ruolo dell'AFP fosse veritiera.

Il sistema utilizzato fu quello di determinare eliminazione degli estrogeni utilizzando un competitore per l'aromatasi.



Se si trattano le femmine -/- nel periodo prenatale con un inibitore dell'aromatasi si recupera il fenotipo femminile.

Il grafico A mostra come le femmine -/- + ATD presentino frequenza di lordosi comparabile al wild type.

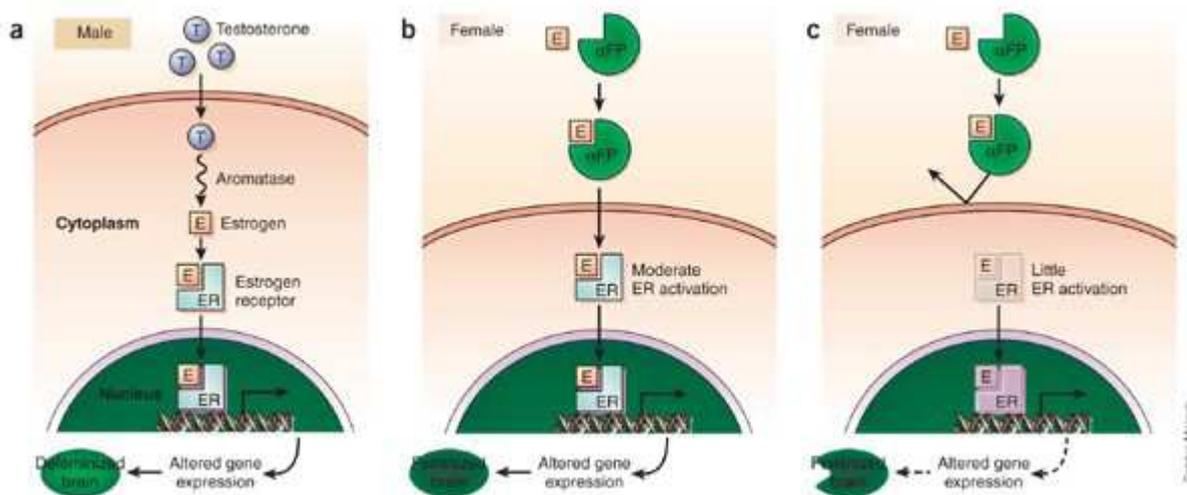
Il grafico C e D utilizzano l'enzima tirosina idrossilasi (sessualmente dimorfico) come marcatore del differenziamento sessuale del sistema nervoso. Il fenotipo -/- risulta

essere simile al fenotipo maschile mentre quello $-/-^{+ATD}$ è simile a quello femminile wt.

Tutti questi dati sperimentali permettono di distinguere tra le due ipotesi.

Se fosse vera l'ipotesi della schermatura totale l'assenza di estrogeni non provocherebbe alcuna differenza fenotipica dal wt in quanto se gli estrogeni mancano questi non possono causare organizzazione maschile del cervello.

Se fosse vera l'ipotesi della modulazione si dovrebbero riscontrare anomalie nel comportamento sessuale in quanto la quantità di estrogeni modulata necessaria per lo sviluppo di fenotipo femminile sarebbe completamente assente, mancando gli estrogeni stessi.



Tutte le prove sono quindi a favore della teoria della schermatura totale: AFP protegge il cervello di femmine di topo dalla mascolinizzazione e defemminizzazione da parte degli estrogeni.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Perché il cervello del maschio viene mascolinizzato dal testosterone?
2. Descrivi il fenotipo più interessante (secondo il tuo parere) dei topi mutanti nel gene per AFP.
3. Come si valutano gli effetti fenotipici di una manipolazione genetica?

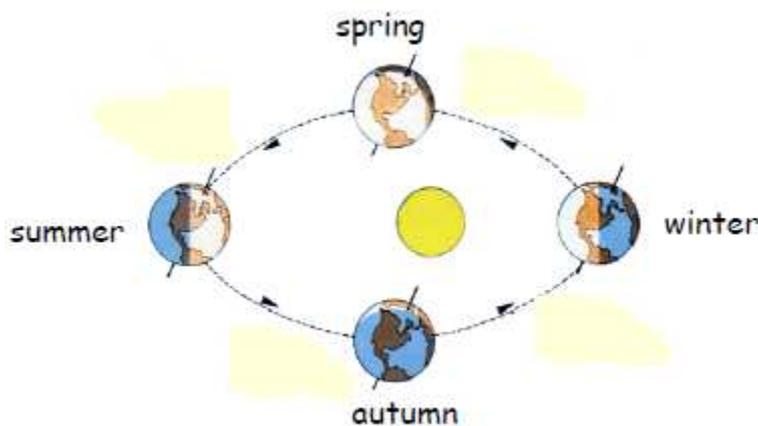
RISPOSTE:

1. Perché può agire a livello del sistema nervoso come androgeno o come estrogeno dopo aromatizzazione, legando i recettori e determinando modulazione dell'espressione genica.
2. Il topo femmina k.o. omozigote per AFP che risulta essere sia mascolinizzata che defemminizzata. Questo esperimento riporta una prima evidenza del ruolo di protezione di AFP.
3. Si valutano confrontando tutti gli aspetti fenotipici degli individui mutanti con quelli degli individui wild type che devono essere il modello di paragone.

EVOLUZIONE DEI RITMI CIRCADIANI

Meccanismi cronofisiologici che sono alla base dell'espletamento dei processi comportamentali nell'arco delle 24 ore.

Esempio ciclo sonno-veglia.



La vita sulla terra e la sua evoluzione è sempre stata influenzata da cambiamenti ambientali periodici dovuti al moto di traslazione e rotazione della terra, in particolare il ciclo luce buio giornaliero e l'alternanza delle stelle.

Questi due eventi fanno parte delle periodicità astronomiche fondamentali insieme alle maree.

Organisms have adapted to these rhythms in order to maximally benefit from the limited natural resources

Gli organismi si sono adattati a questi ritmi per cercare di massimizzare i benefici nell'usufruire delle limitate risorse ambientali.

L'evoluzione ha creato meccanismi che permettono di misurare il tempo: per l'esattezza sono meccanismi che permettono di anticipare l'evento, l'organismo si può preparare fisiologicamente.

The mechanism that keeps track of time, and therefore allows the organism to anticipate upcoming daily changes is termed CIRCADIAN CLOCK

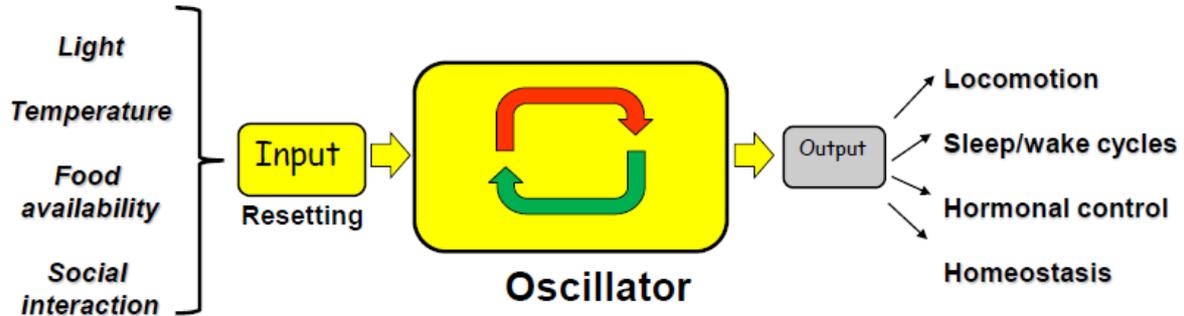
I ritmi circadiani sono degli orologi molecolari che sono presenti in quasi tutti gli organi dei vertebrati e in un amplissima gamma di organismi.

Circadian clocks are molecular time-keeping mechanisms that reside in a wide range of cell types in a variety of organisms

Le caratteristiche fondamentali di un orologio biologico sono la capacità di sincronizzarsi (entrainment) a variabili ambientali (zeitgebers) e di mantenere la loro funzione ritmica anche in condizioni costanti.

Queste caratteristiche permettono adattamento alle variazioni ambientali (sincronizzazione) e risultano essere endogeni in quanto permangono in condizioni ambientali aperiodiche (non sono generati dagli input ambientali esterni).

General mechanism of biological oscillators



Gli stimoli esterni:

- Luce
- Temperatura
- Disponibilità di cibo
- Interazioni sociali

Servono per resettare e sincronizzare l'orologio biologico (oscillatore molecolare) che permette di generare output che regolano processi fisiologici ai ritmi ambientali.

Questi oscillatori possono essere presenti in diversi organi.

In oltre gli oscillatori sono in grado di compensare la temperatura: al variare della temperatura ambientale la velocità di reazione degli orologi biologici non cambia infatti hanno $Q_{10} \approx 1$ per l'equazione di Van 't Hoff.

FEATURES OF BIOLOGICAL CLOCKS:

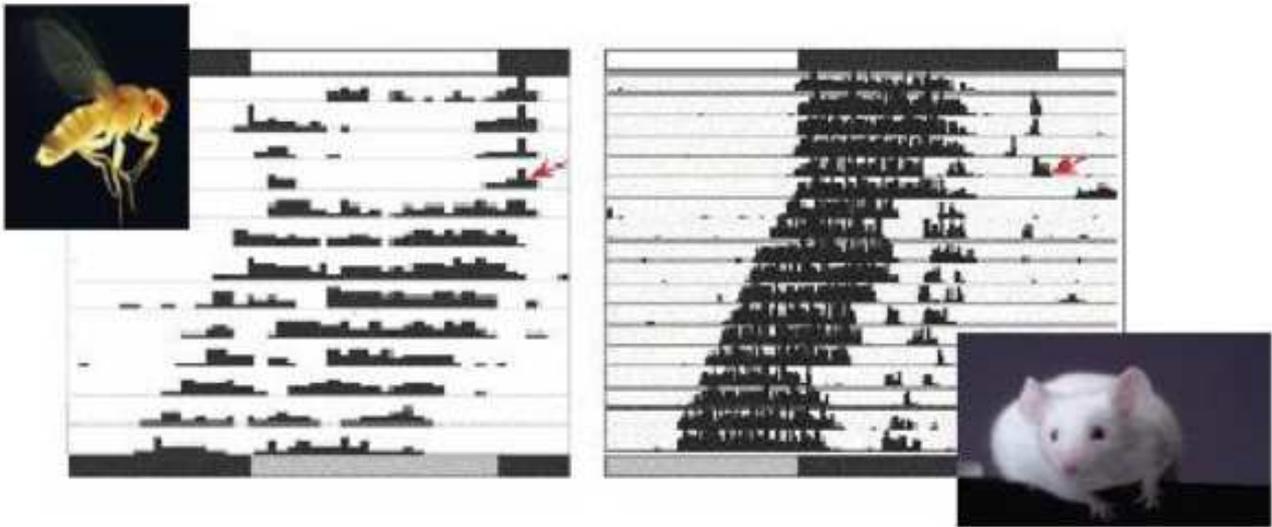
- Reset by environmental cues (Zeitgebers): Light, temperature.....
- Circadian oscillation:
Period approx. 24h (circa diem = about a day) Persists in constant conditions
- Temperature compensation:
Period constant over physiological temperature range

Endogenous clock systems
(circadian, circannual, ultradian)
are present in all organisms known.

They have evolved to measure time and to keep the organism in entrainment with the environment.

Light, feeding and temperature are the strongest Zeitgebers for circadian rhythms.

Esempi di ritmicità circadiana locomotoria in diverse specie animali:



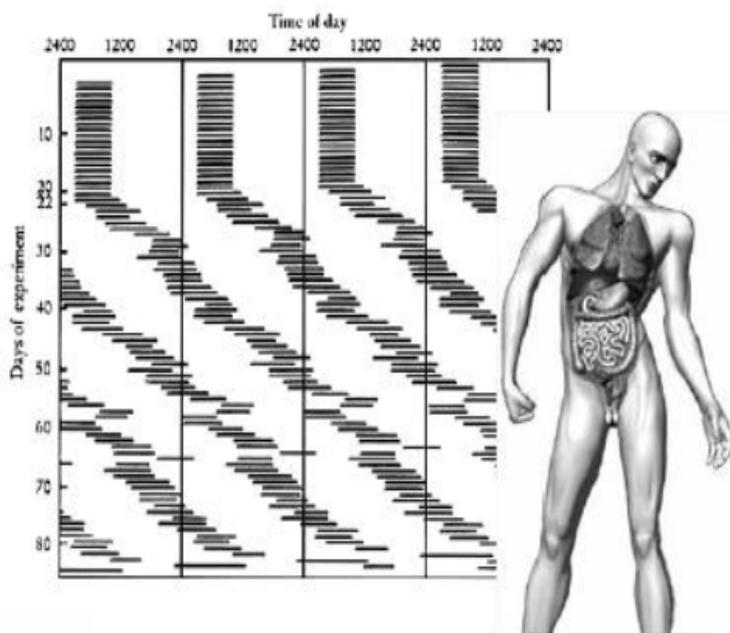
Drosophila è un animale diurno mentre il topo è notturno.

La barra nera nel grafico indica la fase buio mentre quella bianca indica la fase luce. Si nota che gli animali sono perfettamente sincronizzati allo spegnimento-accensione della luce.

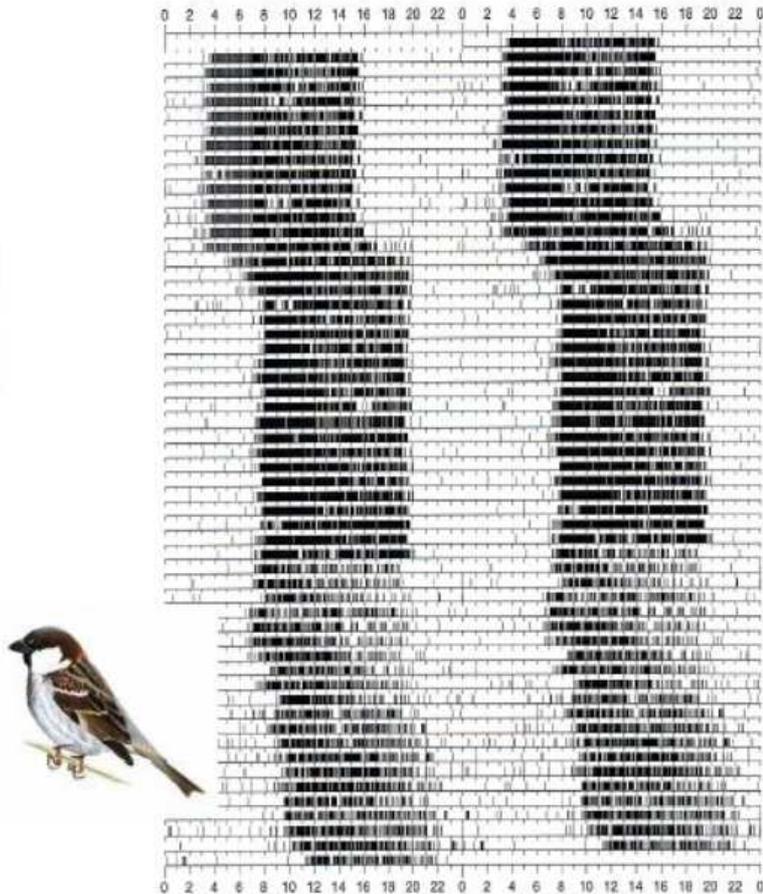
Dai giorni segnati dalla freccia gli animali sono stati posti al buio, quindi in condizioni ambientali costanti (inclusa la temperatura).

Entrambi continuano ad alternare una fase di sonno ad una fase di veglia ma l'inizio della loro attività viene anticipato di giorno in giorno di qualche minuto.

Tutto ciò indica che il ritmo di attività locomotoria è controllato endogenamente ed è circadiano ma con un periodo diverso dalle 24 ore: è più corto perché anticipano la veglia.



Questo grafico si riferisce ad un test effettuato su un persone che vennero monitorati in condizioni costanti all'interno di un appartamento "bunker" che venne scavato in una collina. I primi 20 giorni era presente il ciclo luce-buio e successivamente era mantenuta la fase luce. L'attività locomotoria viene giornalmente posticipata in condizione di luce costante e questo indica che l'orologio circadiano umano è più lungo di 24 ore.



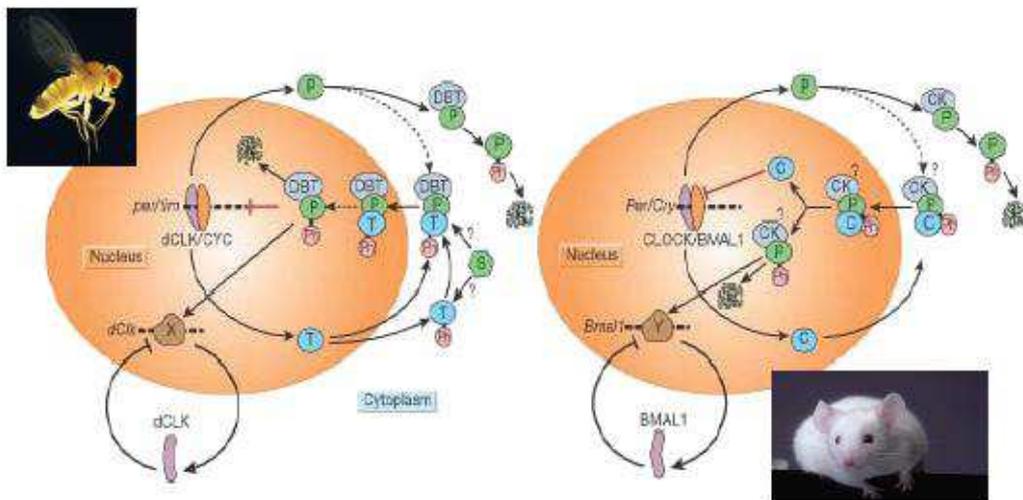
Passero domestico che risulta, nella prima parte del grafico, essere sincronizzato al ciclo luce buio.

Successivamente viene effettuato uno SHIFT cioè viene spostata di 6 ore l'accensione della luce (stesso effetto del jet lag).

L'animale ci mette cinque giorni per sincronizzarsi gradualmente alla nuova situazione.

Altra dimostrazione che un segnale ambientale influenza l'attività animale.

All'interno delle cellule i ritmi circadiani sono generati da una serie di loop molecolari di tipo trascrizionale e traduzionale che interagiscono fra di loro.



Il meccanismo di base sono conservati nel corso dell'evoluzione.

The molecular circadian mechanism (molecular transcriptional and translational feedback loop) has been conserved during the evolution.

L'oscillazione molecolare all'interno delle cellule ha come risultato finale una modificazione dell'attività cellulare.

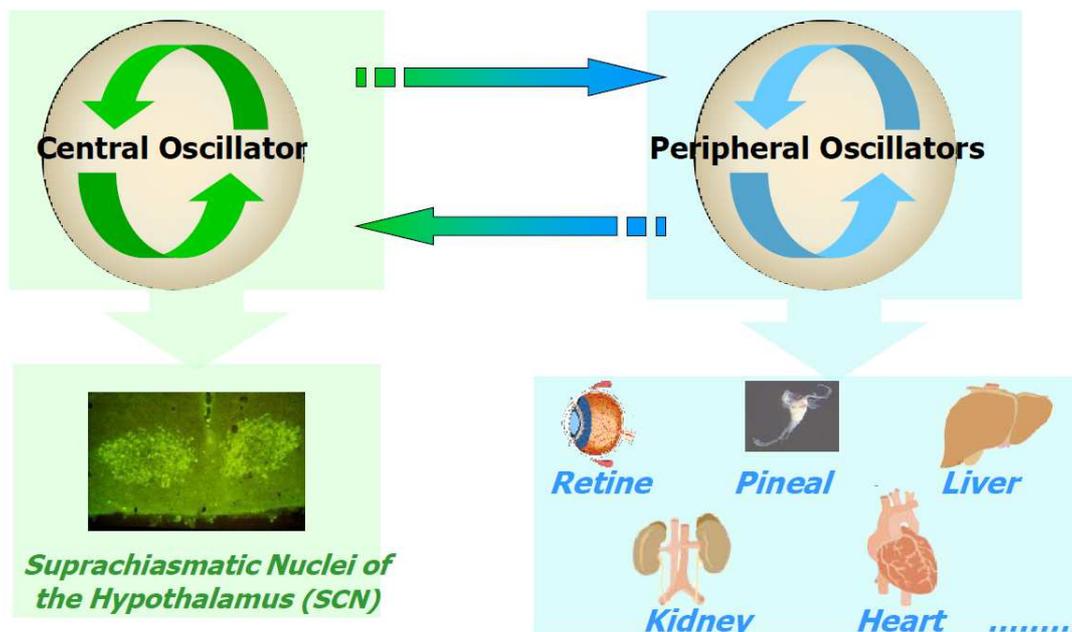
La sincronizzazione da permette all'organo di sviluppare determinati processi fisiologici basati sui ritmi dell'ambiente esterno.

Gli organi comunicano attraverso diversi fattori l'uno con l'altro e l'organismo svilupperà un fenotipo circadiano sincronizzato con l'ambiente esterno (comportamento con andamento circadiano).

I meccanismi hanno controllo a feedback negativo di ritorno.

Il coordinamento non è casuale, ognuna delle cellule di ogni organo contiene il proprio orologio, e tutti gli orologi devono essere sincronizzati tra loro altrimenti si ha il processo di desincronizzazione.

È presente un oscillatore detto Centrale o primario (gerarchicamente superiore) situato in alcuni nuclei ipotalamici che sincronizzerà l'attività di tutti gli organi periferici (situazione presente in mammiferi e uomo).



Molecular oscillations result in modifications of cellular activity

Cells within a given tissue synchronize with each other via particular output signals

Neurotransmitters, neuropeptides, diffusable factors, hormones, etc.

Organs communicate with each other (Coordination of organ function)

Whole-organism feedback system (From genes to cells to tissues to organs to behavior and back).

Body physiological functions have to be coordinated in a way that:

Physiology and behavior correspond to the environment

Interdependent metabolic functions are synchronized with each other

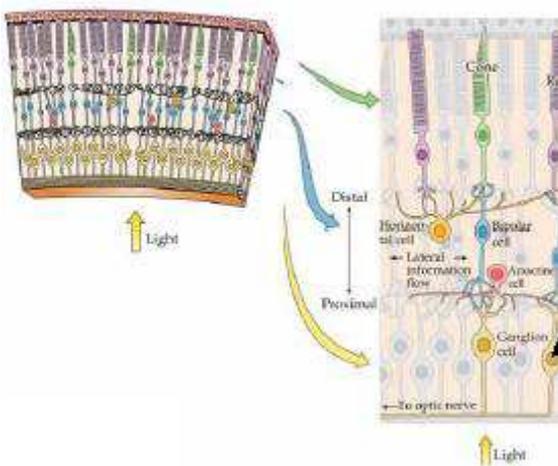
Incompatible metabolic functions are separated from each other.

Le domande chiave su cui si focalizzarono principalmente I ricercatori furono:

- Dove sono localizzati i centri che regolano le ritmicità circadiane?
- Come la luce viene percepita per sincronizzare l'orologio circadiano?

La seconda domanda deve tener presente del fatto che i mammiferi hanno come unico recettore hanno la retina dell'occhio ma altri vertebrati non mammiferi presentano fotorecettori anche in ghiandole pineali (nel cervello di uccelli rettili e pesci), occhi parietali (nei rettili) , organi parapineali (in alcuni pesci) e fotorecettori cerebrali (in vertebrati non mammiferi).

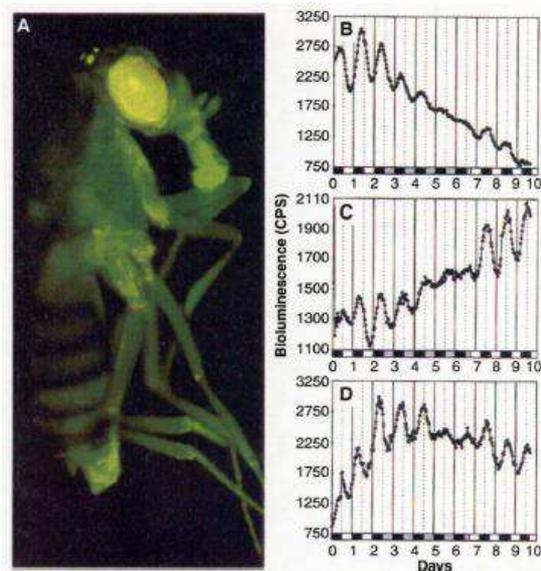
Il sistema di percezione della luce è un multiple receptor system.



Nella retina di mammiferi è stato scoperto che i fotorecettori necessari per la sincronizzazione dei ritmi circadiani (fotorecettori che percepiscono lo stimolo fotonico e lo trasmettono ai nuclei soprachiasmatici del l'ipotalamo) non sono localizzati nei coni e nei bastoncelli ma nelle cellule ganglionari dove viene espressa la melanopsina: una opsina che permette la percezione della luce per la sincronizzazione dell'orologio.

I mutanti che mancano di melanopsina non sono più in grado di sincronizzarsi al ciclo luce-buio.

In altri animali la situazione è molto più complessa ad esempio in drosophila:



In un moscerino wt viene preso il promotore di un gene orologio che è stato clonato e vi si lega il gene della luciferasi.

Somministrando il substrato la drosophila mostrava espressione della luciferasi in tutti i tessuti (la drosophila era completamente verde) e ciò significa che anche il gene orologio veniva espresso in modo ubiquitario.

L'espressione però era ritmica.

Si utilizza quindi una Drosophila transgenica e si divide in tre parti: testa addome e torace per ottenere tre culture separate.

Nelle diverse colture si analizzò per dieci giorni successivi l'espressione di luciferasi. Ne risultò che in tutte e tre le colture era presente luciferasi in ciclo luce buio ma non era costante nel tempo: varia nell'arco delle 24 ore.

E' espressa ad alti livelli durante la fase buio e a bassi livelli durante la fase luce.

Quando la coltura viene sistemata per 3 giorni a condizioni costanti l'espressione del gene continua ad essere ritmica.

Chiara dimostrazione di 4 fatti:

- I geni sono espressi in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti,
- La trascrizione dei geni orologio non è costante nel tempo ma ritmica,
- Diverse parti del corpo presentano oscillatori circadiani tra loro indipendenti,
- Parti indipendenti del corpo hanno la capacità di sincronizzarsi al ciclo luce buio.

Molti ricercatori pensavano che *Drosophila* avesse fotorecettori in tutti gli organi perché i raggi del sole erano in grado di attraversare completamente il suo corpo e quindi ricevere input dall'ambiente direttamente.

Gli studi successivi riguardarono Zebrafish e si scoprì che:

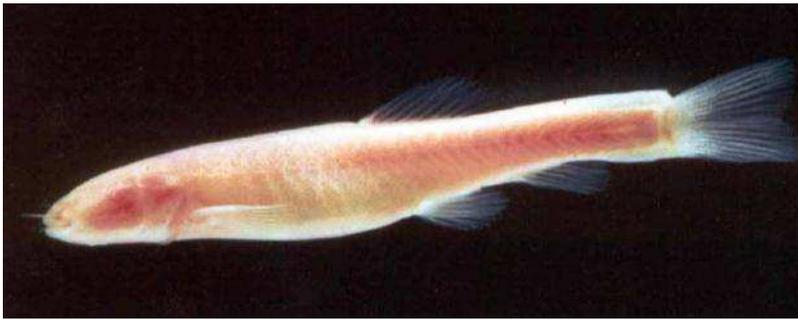
I geni orologio sono espressi in tutti i tessuti e in maniera ritmica anche in coltura, sono quindi indipendenti dall'intero organismo, all'interno di questi organi sono presenti fotorecettori per cui c'è una diretta risposta alla luce da parte dell'organo. (stessi risultati di *Drosophila* in un vertebrato).

Il successivo lavoro sperimentale utilizza l'evoluzione per cercare di studiare meglio i sistemi di percezione di variabili ambientali che regolano l'orologio circadiano: in particolare si è utilizzato come modello i pesci ipogei (cavefish).

I pesci ipogei si sono evoluti in condizioni di buio costante (vivono in acque sotterranee), temperatura più o meno costante e disponibilità nutritiva molto semplice e non molto variabile.

Si sono probabilmente evoluti a partire da una specie sorella epigea che si è poi estinta.

Il modello scelto dal ricercatore è stato:



Phreatichthys andruzzii

Pesce ipogeo che vive in Africa ed è endemico della Somalia.

È un pesce albino senza scaglie e anoftalmo (senza occhi, che si degenerano dopo 22 ore dalla schiusa, dopo 1 mese oltre agli occhi sono assenti i nervi ottici, il chiasma ottico e i lobi mesencefalici si riducono).

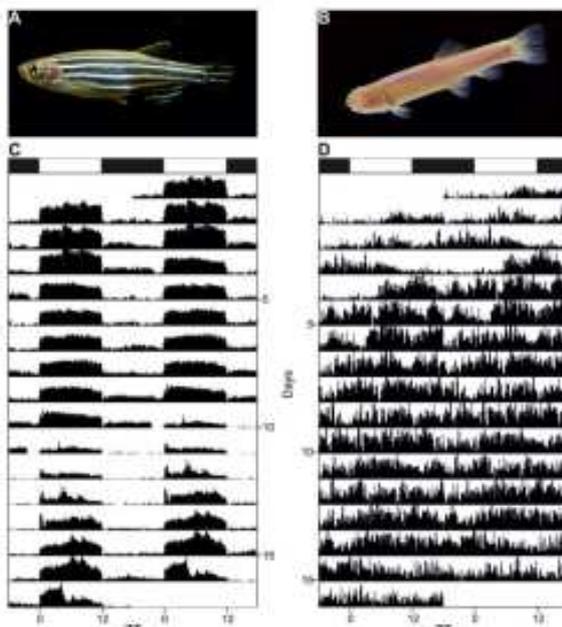
L'approccio usato è classico: si basa su un'analisi comparativa dell'orologio circadiano dai geni al comportamento tra Phreatichthys andruzzii e zebrafish.

Zebrafish è un ciprinide come Phreatichthys andruzzii (hanno antenato in comune).



Gli animali sono stati posti in condizioni di luce-buio per vedere se la loro attività presentava ritmicità circadiana.

Successivamente si verifica la loro attività anche in condizioni di buio costante.



Zebrafish ha attività perfettamente sincronizzata al ciclo luce buio.

Phreatichthys andruzzii è sempre attivo, la sua attività non è ritmica, è distribuita in maniera più o meno uniforme nell'arco delle 24 ore e non sembra essere influenzata dalla luce.

Primo chiaro risultato comportamentale non sincronizzato di Phreatichthys andruzzii, al contrario di zebrafish.

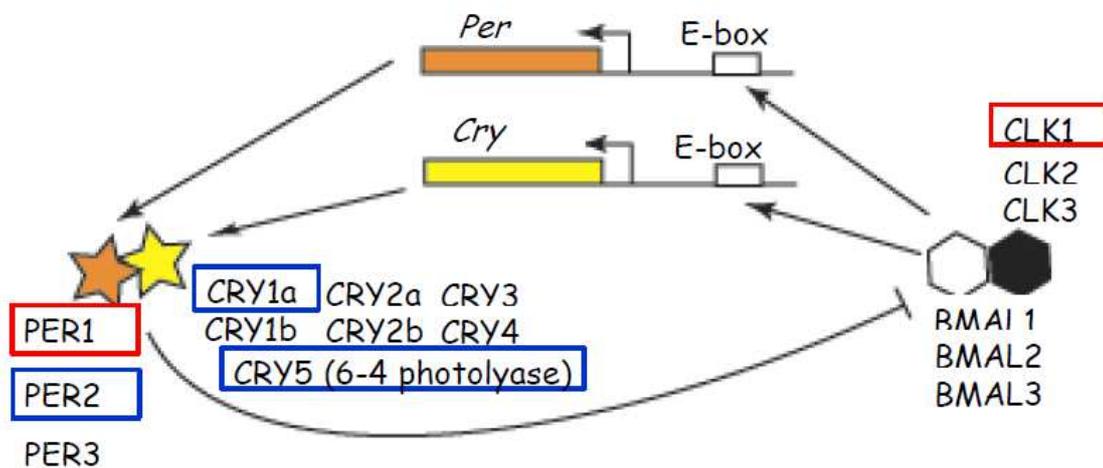
E' noto però che *Phreatichthys andruzzii* ha un comportamento di fototassia negativo (rifugge dalla luce) ed è quindi in grado di percepire la luce. Dal primo esperimento si deduce che questi fotorecettori non sono collegati ad alcun orologio circadiano.

Si verificò quindi se la luce pur non influenzando il comportamento fosse in grado di condizionare l'espressione dei singoli geni nei diversi organi.

In primo luogo si è dovuto indentificare, selezionare e clonare i geni omologhi a quelli di zebrafish coinvolti nel sistema circadiano.

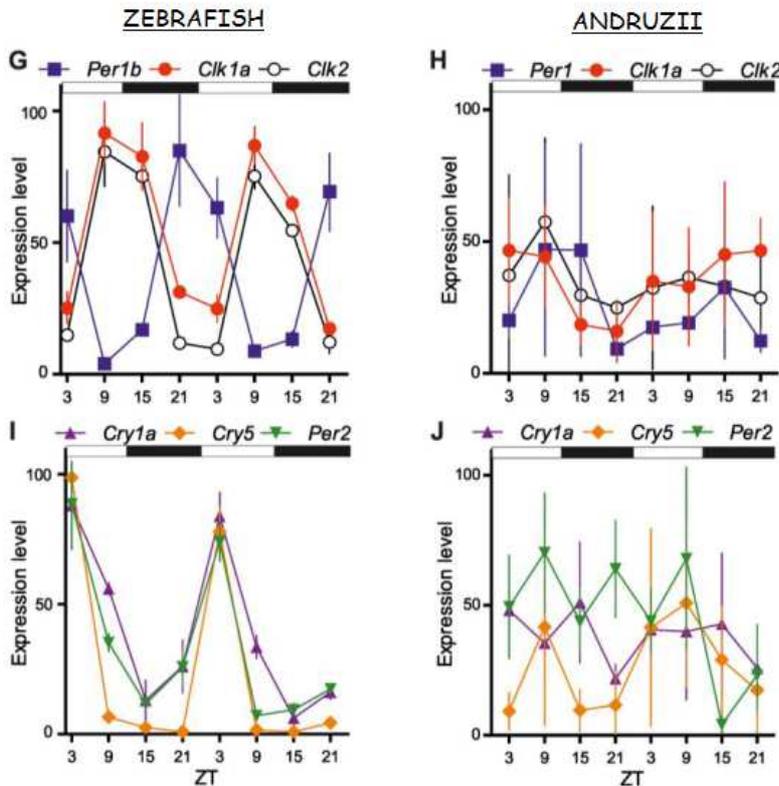
I geni su cui ci si è focalizzati sono (quelli più famosi e studiati):

- 3 geni della famiglia period (PER1-2-3),
- 7 geni della famiglia cryptochrome (CRY1a-CRY1b-CRY2a-CRY2b-CRY3-CRY4-CRY5),
- 3 geni della famiglia clock (CLK1-2-3).



PER 1-2 sono geni che appartengono al loop, CRY sono proteine in grado di percepire la luce.

Si verifica la loro espressione in determinate condizioni e si confronta con quella di zebrafish in diversi tessuti.



Si sono campionati i pesci per 48 ore di continuo a distanza di 6 ore in un ciclo luce buio.

Si controlla l'espressione di tre geni fondamentali del sistema circadiano:

- PER1
- CLK1
- CLK2

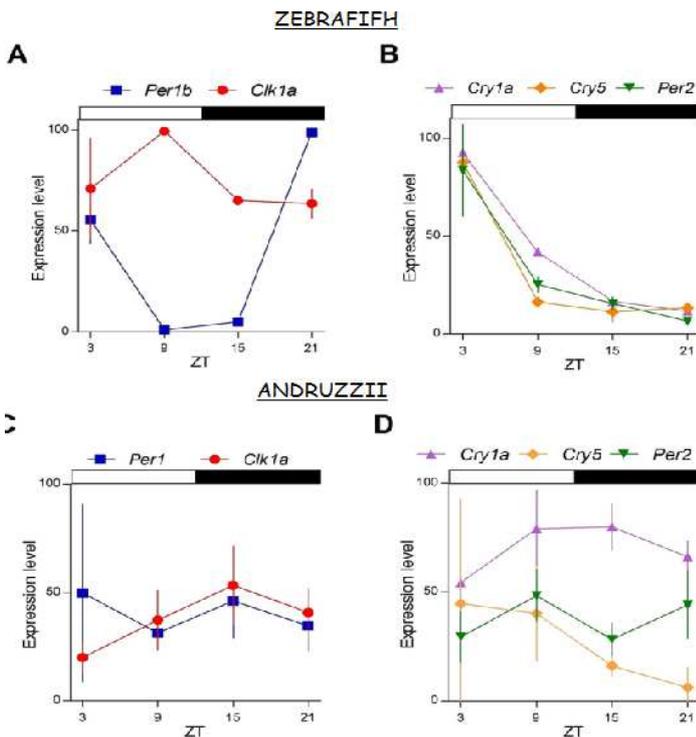
E tre geni la cui espressione è indotta dalla luce:

- CRY1a
- CRY5
- PER2

Mentre zebrafish presenta espressione ritmica dei geni studiati andruzzii non sviluppa alcuna regolarità di espressione.

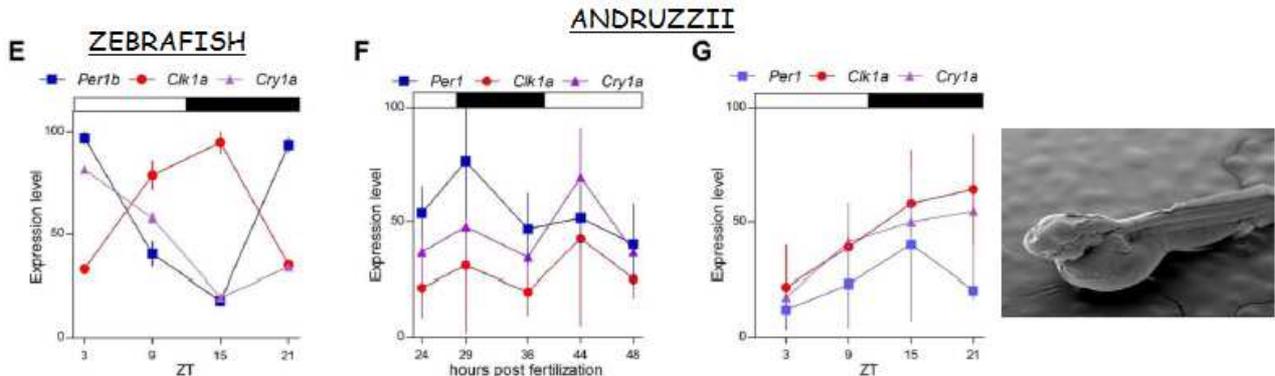
L'espressione è stata studiata in cellule delle pinne caudali.

Il successivo test venne effettuato sulle cellule cerebrali:



Anche in questo caso zebrafish presenta ritmicità al contrario di *Phreatichthys andruzzii*.

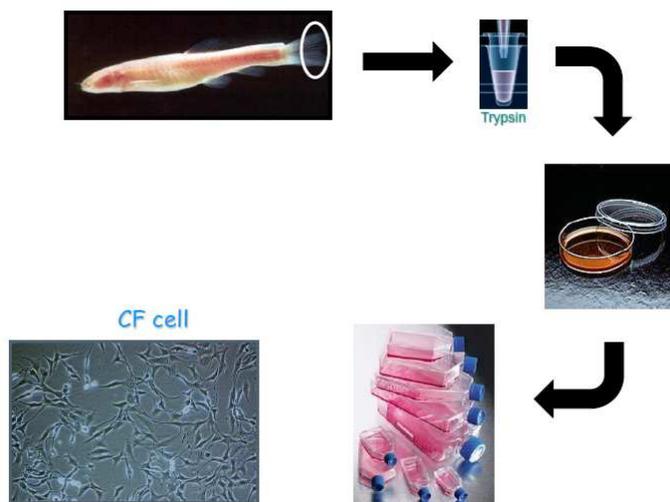
Anche le analisi sulle larve dei pesci (quando *Phreatichthys andruzzii* presenta ancora gli occhi) danno gli stessi risultati:



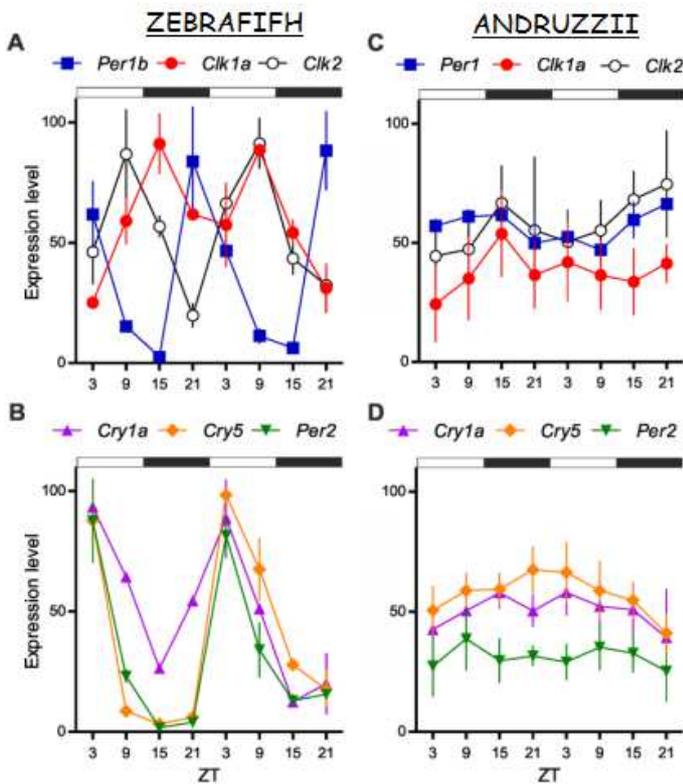
Zebrafish anche nello stadio di larva presenta ritmicità mentre *Phreatichthys andruzzii* sia dopo un ora dalla nascita che a quattro settimane non presenta regolazione circadiana.

E' stato dimostrato che un animale vertebrato, sia dal punto di vista comportamentale che da quello dell'espressione genica, era aritmico.

Si è creata poi una coltura di cellule di pinna caudale di *Phreatichthys andruzzii*, in cui sono presenti fibroblasti e cellule dell'epidermide.



E' stata comparata l'espressione dei sei geni visti fin ora nelle CF cells con quella di cellule di zebrafish della stessa natura.



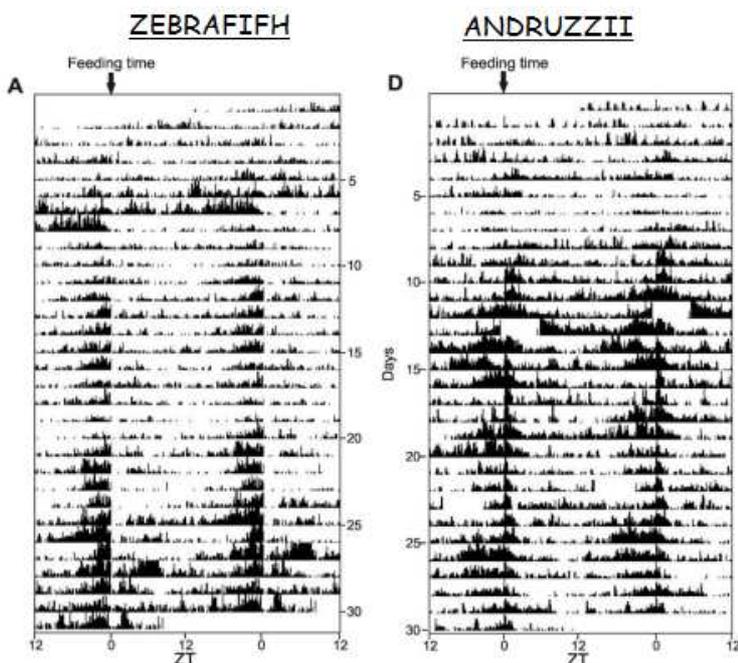
Il risultato è sempre lo stesso.

Si deduce quindi che *Phreatichthys andruzzii* manca di un orologio circadiano sensibile al ciclo luce-buio e che manca anche il pathway che permette di sincronizzarsi al segnale luminoso.

Phreatichthys andruzzii presenta però un orologio circadiano sensibile alla disponibilità di cibo.

L'attività del pesce e l'espressione genica potevano essere condizionate dalla somministrazione giornaliera di cibo sempre alla stessa ora.

L'esperimento effettuato consisteva nel porre gli animali in condizioni di buio continuo e temperatura costante, il cibo era reso disponibile a un orario fisso e sempre nella stessa quantità.



L'attività locomotoria registrata in entrambi i pesci è sincronizzata all'orario di somministrazione del cibo.

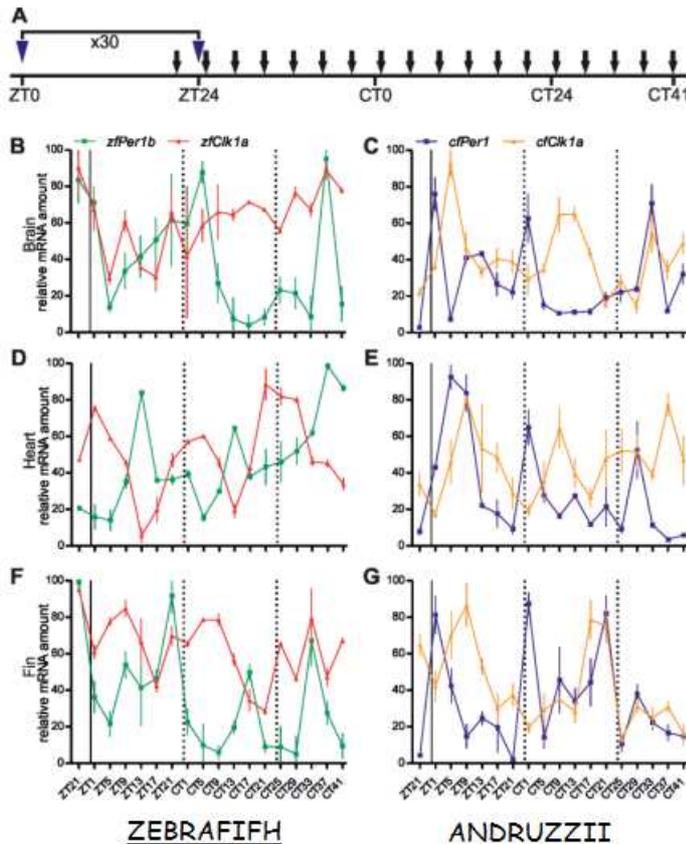
L'attività motoria che anticipa la distribuzione del cibo è detta Food Anticipatory Activity.

Variando il segnale sincronizzante (invece della luce il cibo) i *Phreatichthys andruzzii* manifestano un'attività ritmica.

E' stato dunque analizzato il profilo di espressione dei geni orologio dopo 30 giorni di somministrazione regolare di cibo e tre giorni di assenza di alimentazione.

Le analisi vennero effettuate da prima dell'ultima alimentazione per i tre giorni successivi ogni 4 ore.

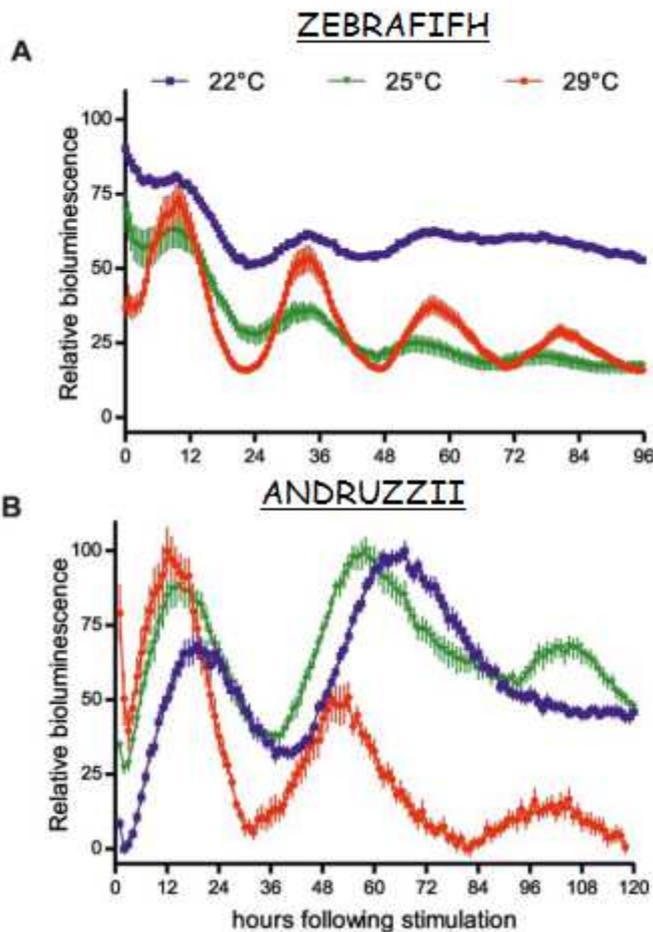
I geni *CLK* e *PER* sono stati testati nel cuore, nella pinna, nel cervello e nel fegato.



Si nota immediatamente che anche nei giorni successivi all'ultima alimentazione i geni sono espressi in maniera ritmica sia in zebrafish che in *Phreatichthys* con fasi molto simili. La ritmicità è presente in tutti gli organi analizzati quindi sia nelle cellule con oscillatori centrali che periferici.

Basandosi sul fatto noto che la somministrazione transiente di glucocorticoidi su cellule induce l'espressione di geni orologio in maniera ritmica, si è eseguita la somministrazione sulle cellule di zebrafish e *Phreatichthys* (è un segnale metabolico come l'alimentazione).

Si ricercano in pratica gli stessi risultati ottenuti in vivo ma in vitro.



Il saggio usato è un reporter: si trasfetta una linea cellulare con un promotore di zebrafish che contiene un gene per la luciferasi poi si dà un impulso di desametonide e si registra se il gene è espresso in maniera ritmica.

L'analisi è stata effettuata per 120 ore consecutive.

Il gene studiato ha un profilo ritmico sia per zebrafish sia per *Phreatichthys*.

Zebrafish presenta però un periodo di oscillazione di circa 24 ore mentre *Phreatichthys* il periodo è molto più lungo: dalle 28 alle 47 ore a seconda della temperatura.

Questo risultato insieme a tutti gli altri permette di asserire che *Phreatichthys* ha un orologio circadiano che funziona, sincronizzabile all'alimentazione ma non al ciclo luce buio e che la lunghezza del periodo di oscillazione è diversa dalle 24 ore (orologio circadiano aberrante).

Phreatichthys è quindi un importantissimo modello che permette di studiare le vie di trasduzione del segnale luminoso verso l'orologio circadiano in quanto si possono valutare quali molecole e quale parte del meccanismo non funziona.

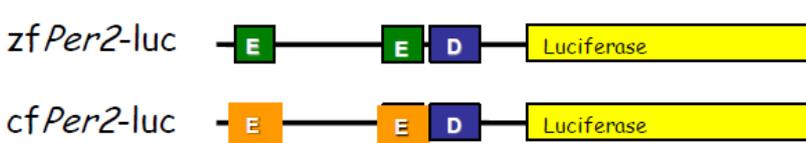
La regolazione dell'orologio circadiano con lo stimolo luminoso poteva non funzionare per:

- La mancanza di fotorecettori;
- La mancanza di elementi in grado di percepire il segnale luminoso nella sequenza dei promotori dei suoi geni orologio.

La ricerca è stata focalizzata su PER2 perché è un gene che partecipa al funzionamento dell'orologio ed è direttamente controllato dalla luce. Lavori in zebrafish evidenziarono una parte del promotore del gene PER2 che viene definita light responsive elements e contiene elementi E-box e D-box che se vengono tolti causano la mancata risposta alla luce.

	E-box	D-box
Cavefish	GGCCATGGT-GTC CACATG AGGTGTATGACATAC	TTATGTAAA GAGACTGGCGGTCTGTT
Zebrafish	GGCCATGGGTGTC CACGTG AGTTGTATGACACAC	TTATGTAAA AAGACTGACGGGCGTTT
Chicken	AAACATGGTGTCA CACGTG AG-----GCT	TTATGTAAA ATGAGCGGCGTGC GGCG
Human	GAACATGGAGTTC CATGTG CG-----TCT	TTATGTAAA AAGAGCGACGGGCGCGG
Mouse	GAACATGGAGTTC CATGTG CG-----TCT	TTATGTAAA GAGAGCGACGGGCGTCT
Rat	GAACATGGAGTTC CATGTG CG-----TCT	TTATGTAAA GAGAGCGACGGGCGTCT
	***** ** * * *	***** * * * * * *

Allineando la sequenza del promotore di PER2 di zebrafish a quella dello stesso gene di altre specie compreso Phreatichthys ci si rende conto che il promotore di Phreatichthys sembra avere una mutazione puntiforme che potrebbe essere responsabile della insensibilità alla luce.



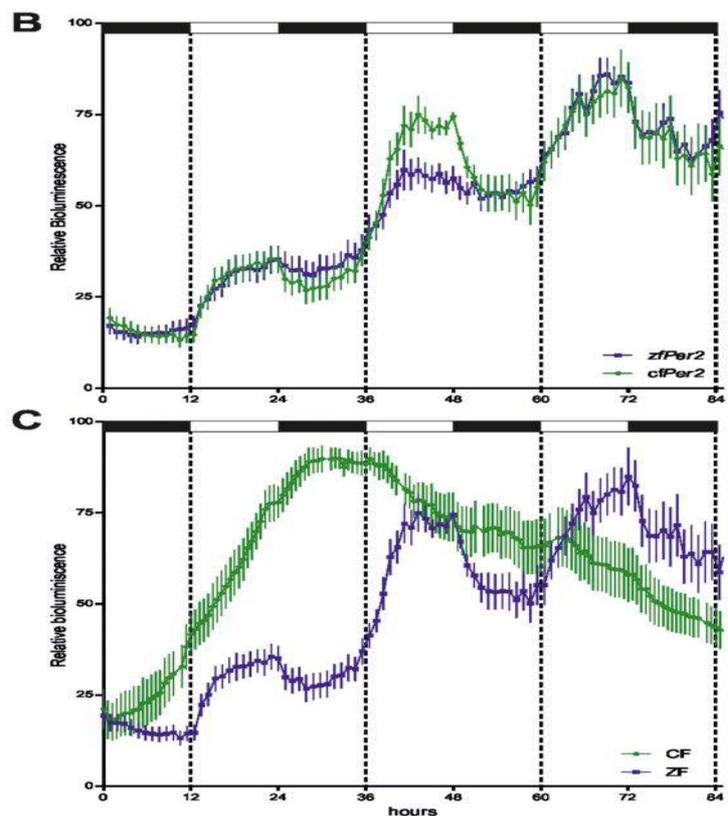
Sono stati quindi costruiti due vettori con luciferasi, uno con PER2 di zebrafish e l'altro con PER2 di cavefish.

I vettori sono stati trasfettati in linee cellulari di cavefish e zebrafish.

B riguarda la trasfezione di cellule di zebrafish e mostra che entrambi i promotori sono espressi in maniera ritmica.

Quindi la mutazione puntiforme di cavefish non ha alcun ruolo: non impedisce la ricezione dello stimolo luce.

C riguarda la trasfezione di cellule di cavefish e mostra che il promotore CF all'interno di queste non sviluppa alcuna ritmicità. Il meccanismo probabilmente ha un difetto a monte a livello della percezione della luce.



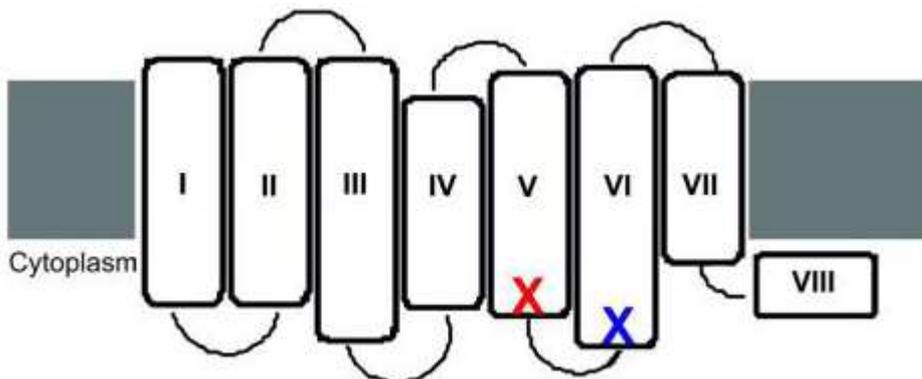
E' possibile che ci siano delle mutazioni a carico dei fotorecettori periferici che rendono l'orologio di cavefish cieco.

Si sono dunque clonati tutti i fotopigmenti (opsine) in cavefish omologhi a quelli di zebrafish.

In particolare due dei fotopigmenti clonati che erano espressi in maniera molto diffusa erano mutati:

- Opsina della famiglia delle Melanopsine,
- Opsina della famiglia delle TMT (teleostea multiple tissue).

Le opsine sono proteine a sette segmenti transmembrana:



A livello del settimo segmento è presente una Lys che attacca il cromoforo (punto di funzionamento cardine): il cromoforo è una vitamina A.

Le mutazioni trovate nei cavefish inducevano un codone di stop prematuro che tagliava la proteina, nel caso della TMT, a livello del quinto segmento transmembrana e nel caso della Melanopsina, all'inizio del sesto segmento transmembrana.

E' possibile che l'orologio di cavefish non percepisca la luce a causa di queste mutazioni.

Si è effettuato allora un esperimento di rescue prendendo delle cellule di cavefish (che non percepiscono la luce) e all'interno vi inserisco il promotore di zebrafish di PER2 (che ha elementi di percezione della luce) e gli fornisco in maniera esogena la TMT o la Melanopsina di zebrafish (wild type: senza mutazione) e il cromoforo.

Registro quindi in ciclo luce buio l'espressione della luciferasi.

Se il rescue funziona PER2 deve essere espresso in maniera ritmica e sincronizzata alle 24 ore.

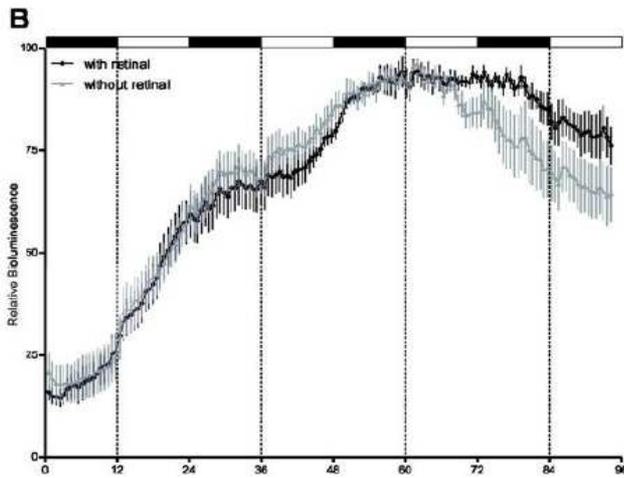
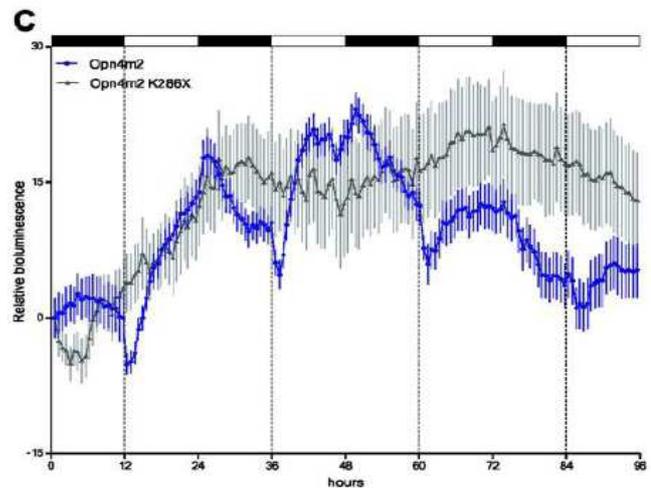


Grafico riferito al controllo in cui le cellule sono state trasfettate con PER2. Viene fornito il retinale (cromoforo) ma non l'opsina.

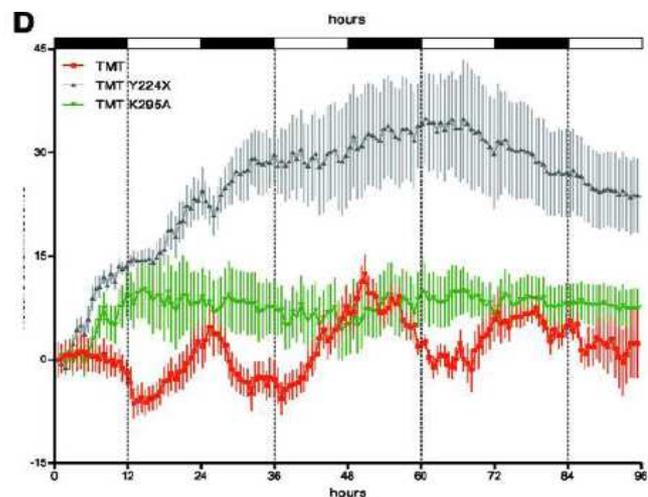
Non c'è alcuna espressione ritmica.

Se si somministra alle cellule trasfettate il retinale, la vitamina A e la Melanopsina l'espressione comincia ad essere ritmica e sincronizzata al ciclo luce-buio.

Questo dimostra che la melanopsina è fondamentale per la percezione della luce nell'orologio circadiano.



Lo stesso risultato della melanopsina è stato ottenuto con TMT.

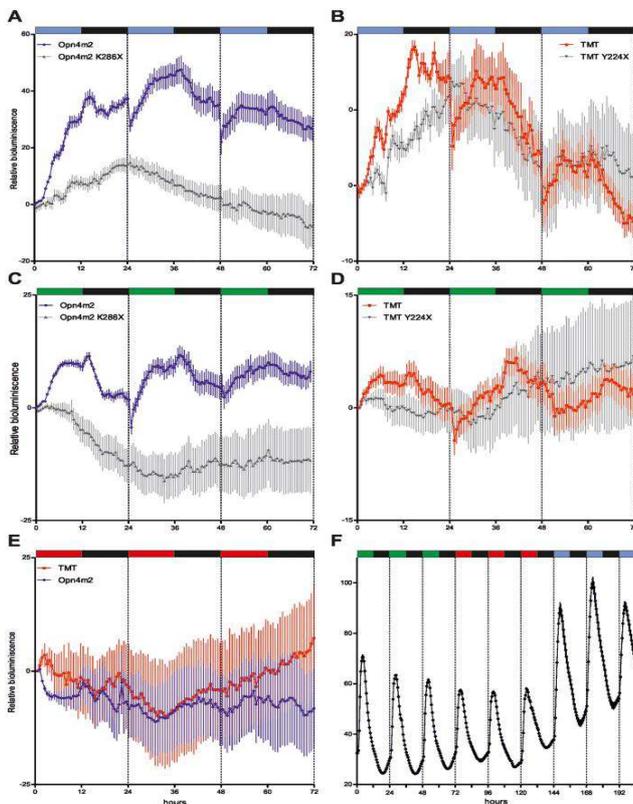


Sono stati usati due ulteriori controlli:

le opsine wt di zebrafish hanno subito una mutagenesi direzionale per ottenere la stessa mutazione che c'è nelle opsine di cavefish.

Il risultato ottenuto è mostrato dalle curve in grigio: si perde tutta la ritmicità.

L'ultimo esperimento effettuato era uguale al precedente ma invece di alternare la luce bianca al buio venivano alternate diverse lunghezze d'onda. Ciò permette di verificare le risposte delle opsine alle diverse lunghezze d'onda.



Sia in luce blu che in luce verde sia la melanopsina che la TMT rispondono in maniera ritmica ma non lo fanno in luce rossa.

In cavefish manca l'opsina che risponde alla luce rossa (probabilmente non è stata identificata) che invece c'è in zebrafish.

RIASSUMENDO:

- *Phreatichthys andruzzii* ha passato circa gli ultimi due milioni di anni in isolamento dal ciclo luce-buio naturale e questa condizione ha causato la formazione di un orologio circadiano aberrante.
- L'orologio è sincronizzabile all'alimentazione per cui si specula che ci sia qualche segnale alimentare periodico nella falda sotto al deserto somalo che fa sì che questo animale mantenga un orologio circadiano che gli permette di anticipare l'arrivo della fonte di cibo dandogli un chiaro vantaggio.
- Melanopsina e TMT sono due fotorecettori periferici legati all'orologio circadiano nei teleostei.
- La presenza di fotorecettori multipli, permette che ognuno estragga in modo differenziale informazioni dalla luce del sole dando quindi la possibilità all'orologio circadiano di anticipare l'alba e il tramonto.
- *P. andruzzii* è un potente modello utile per dissezionare i meccanismi molecolari che rispondono alla luce.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Quali sono state le cause dell'evoluzione degli orologi biologici?
2. A cosa servono e come funzionano i sincronizzatori ambientali (Zeitgebers)?
3. Dove sono localizzati i fotorecettori circadiani nei vertebrati? Quali sono le opsine che coordinano la fotorecezione circadiana?

RISPOSTE:

1. Gli orologi biologici permettono di adattarsi ai ritmi ambientali e ciò determina la possibilità di beneficiare in modo più efficace delle risorse naturali originando un vantaggio evolutivo perché permette di anticipare un evento.
2. Gli Zeitgebers permettono di sincronizzare l'orologio circadiano alle variabili ambientali cicliche e funzionano agendo, attraverso diversi pathway, sui geni orologio.
3. Nei vertebrati non mammiferi si ritrovano a livello di numerosi organi, nei vertebrati mammiferi sono presenti solo a livello della retina. Le opsine che coordinano la fotorecezione sono della famiglia delle Melanopsine e delle TMT.

ENDOCRINE DISRUPTION OF BRAIN AND BEHAVIOUR (Interferenze Endocrine Neurocomportamentali)

Gli interferenti endocrini sono sostanze che interferiscono con il sistema endocrino, sono insidiosi perché non avendo effetti tossici tipicamente la loro azione si manifesta in tempi molto lunghi con effetti che si manifestano a livello sociale, cognitivo e riproduttivo.

La tabella è una review delle differenze che esistono tra i sessi per diverse patologie neurologiche e psichiatriche:

Alcune patologie possono essere più comuni nell'uomo e altre nelle donne, ci sono anche i casi estremi in cui vengono colpiti solo uomini (es. *kleine-levin syndrome*) o solo le donne (es. *Rett syndrome*).

La parte centrale raggruppa tutte quelle patologie che hanno incidenza più o meno equa in uomini e donne. *Anoressia* e *bulimia* sono note colpire più le donne e la *schizofrenia* maggiormente gli uomini.

In alcuni casi l'incidenza impari delle malattie può essere dovuta alla diversa fisiologia tra uomini e donne, in altri casi, invece, le differenze sono dovute a fattori ambientali esterni ad esempio:

- L'abuso di sostanze stupefacenti e alcool è maggiore negli uomini a causa dell'ambiente sociale che frequentano (negli anni dopo la guerra, gli uomini, la sera, andavano al bar mentre le donne stavano in casa con i bambini).
- La rabbia perché gli uomini sono più esposti agli animali durante la caccia.
- Lo stress dovuto a traumi è più comune nelle donne perché tipicamente in guerra proporzionalmente gli uomini muoiono e le donne restano traumatizzate.

Table 1
Ratios for women over men suffering from a selection of neurological and psychiatric diseases

Disease	Percent women: percent men
Rett syndrome	100:0
Postoperative hyponatremic encephalopathy with permanent damage or death	96:4
Anorexia nervosa	93:7
Lymphocytic hypophysitis	90:10
True (central) precocious puberty	90:10
Hypnic headache syndrome	84:16
Bulimia	75:25
Senile dementia of the Alzheimer type	74:26
Multiple sclerosis	67:33
Anxiety disorder	67:33
Posttraumatic stress disorders	66:34
Dementia	64:36
Unipolar depression, dysthymia	63:37
Whiplash	60:40
Severe learning disability	38:62
Substance abuse	34:66
Stuttering	29:71
Schizophrenia	27:73
REM sleep behavioral disorder	24:76
Male-to-female versus female-to-male transsexuals	28:72
Dyslexia	23:77
ADHD	20:80
Autism	20:80
Sleep apnoea	18:82
Kallmann syndrome	17:83
Rabies	13:87
Gilles de la Tourette	10:90
Kleine-Levin syndrome	0:100

Alcune di queste patologie e la loro incidenza su un genere o l'altro non hanno spiegazioni ben chiare ma possono esserne responsabili:

- Ormoni, sviluppo, differenziamento
- Meccanismi di azione degli ormoni steroidei
- Alterazioni ormonali: effetti comportamentali
- Dimorfismo sessuale nel sistema nervoso.



Henri Cartier-Bresson, 1949

La foto mostra un eunuco che nella corte imperiale cinese aveva il compito preciso di assistere l'arem.

Essendo eunuchi non potevano procreare e quindi anche se in contatto con l'arem non potevano "inquinare" il sangue reale.

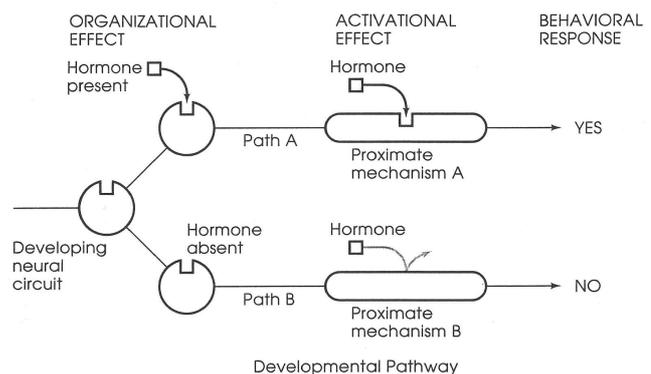
L'eunuco è un caso in cui le differenze sessuali vengono alterate da interferenze esterne (rimozione chirurgica delle gonadi prima dello sviluppo).

La morfologia risulta alterata (i lineamenti sono molto allungati) e ciò dimostra che la fase di attivazione puberale è fondamentale per il corretto sviluppo del corpo umano.

Il sistema nervoso e il comportamento vengono differenziati durante lo sviluppo dall'azione ormonale.

La fase organizzativa del sistema nervoso dipende dalla presenza o assenza del testosterone (il sesso femminile è quello neutro).

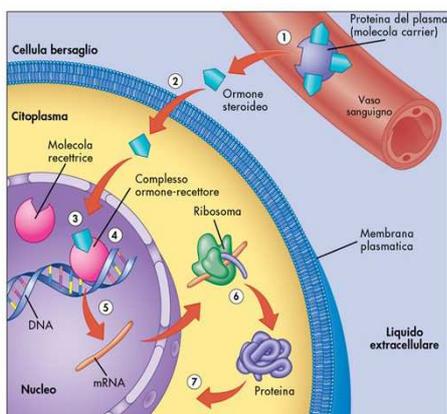
La fase attivazionale nell'adulto consiste nella risposta del sistema nervoso all'ormone a seconda dell'organizzazione ricevuta: il maschio ha una risposta comportamentale al testosterone che la femmina non ha.



Differenziamento sessuale del comportamento (Phoenix et al., 1959)

Durante lo sviluppo, gli ormoni gonadici organizzano in modo permanente il differenziamento dei centri nervosi che controllano i comportamenti specifici di ciascun sesso (effetto *organizzativo*);

nell'adulto, gli ormoni gonadici agiscono sui centri nervosi sessualmente dimorfici per attivare i comportamenti sessualmente specifici (effetto *attivazionale*).



Gli ormoni steroidei funzionano tutti più o meno nello stesso modo:

vengono rilasciati dalle ghiandole endocrine (testosterone dai testicoli, estradiolo dal mesovario, corticosteroidi dal surrene) ed entrano nel circolo sanguigno, quando arrivano al tessuto bersaglio passa la membrana cellulare e dentro alla cellula forma un complesso con il recettore (sono recettori nucleari). Il complesso attivato funziona da fattore di trascrizione e interagisce quindi con il DNA.

Gli interferenti endocrini non sono una classe omogenea di molecole, sono sostanze in grado di simulare l'azione di altri ormoni. Sono in grado quindi di legare i recettori determinando alterazioni di trascrizione genica con possibili effetti simili a quelli di un ormone.

Gli Xenoestrogeni sono estrogeni non naturali, sono degli interferenti endocrini che mimano l'azione degli estrogeni.

Molti studi hanno mostrato robuste correlazioni tra contaminazione dell'ambiente e alterazioni fenotipiche nella fauna e nell'uomo.

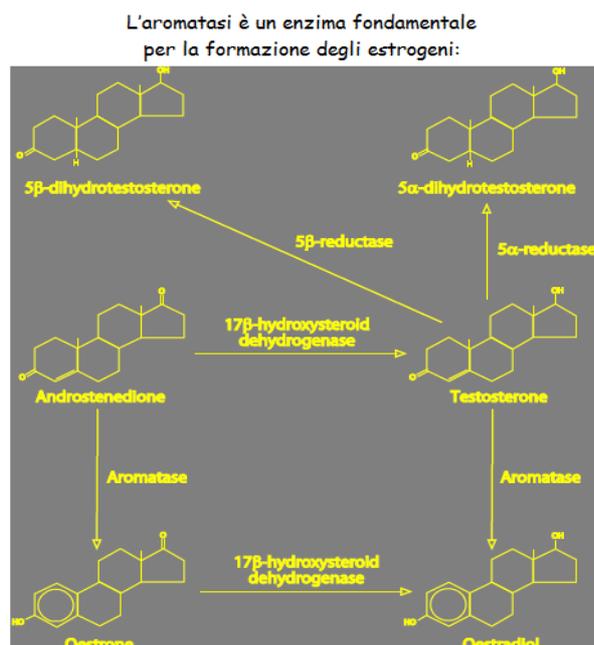
Numerosi studi sperimentali dimostrano effetti sulle funzioni riproduttive nella fauna acquatica. Il più comune effetto riguarda la sterilità.

Tuttavia...

Ci sono poche dimostrazioni sperimentali di effetti nei mammiferi alle concentrazioni ambientali.

Permane in ogni caso l'ipotesi che Xenoestrogeni possano avere effetti sul normale sviluppo del sistema nervoso soprattutto a livello degli aspetti legati al differenziamento sessuale.

Per affrontare lo studio dei possibili effetti a lungo termine degli Xenoestrogeni bisogna tener conto di tre aspetti fondamentali: della concentrazione, della modalità e della durata del trattamento per ottenere le condizioni simil-ambientali.



Critiche sugli effetti sperimentali degli xenoestrogeni:

- I composti hanno ulteriori effetti non estrogenici,
- Effetti tossici multipli e difficoltà di generalizzare gli effetti degli xenoestrogeni,
- Trattamenti che non riproducono un'esposizione ambientale,
- Le modalità di somministrazione, il periodo, la durata, e le dosi del trattamento differiscono da una esposizione dovuta a contaminazione ambientale.

I ricercatori si posero quindi la domanda:

"Cosa succede se gli animali assumono oralmente in modo costante delle concentrazioni molto basse di xenoestrogeni durante il periodo dello sviluppo?"

1: Xenoestrogeno 'puro'



Per l'esperimento si è scelto di usare un estrogeno puro (etinil estradiolo: principio attivo della pillola anticoncezionale), la sostanza non presenta una sua tossicità, funziona come estrogeno ed è un comune contaminante delle acque superficiali. Tutte queste accortezze rispondono alla prima e alla seconda critica.

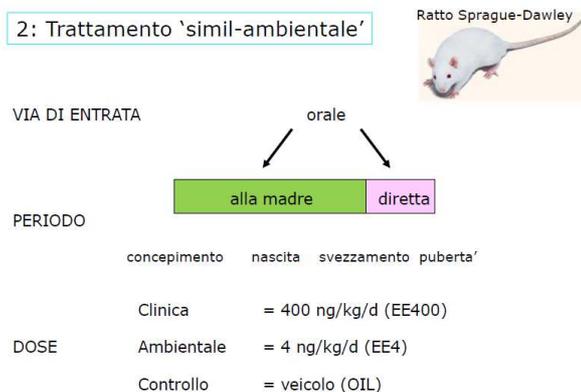
Come modello di studio si usa il ratto perché per gli aspetti di differenziamento sessuale è un buon modello per quello umano.

L'etinil estradiolo è stato dato alla madre dal momento della fecondazione. La somministrazione era orale permessa grazie ad un pre-addestramento degli animali alla nutrizione tramite pipetta (durante addestramento viene somministrato olio di arachidi).

Ad alcuni animali erano dati 4ng/kg al giorno: dose ambientale (definita tramite calcoli sulla concentrazione ritrovata in pesci che vivono in acque inquinate), ad altri animali erano dati 400ng/kg al giorno: dose clinica.

L'etinil estradiolo continua ad essere somministrato anche durante tutto il periodo di allattamento. Successivamente il composto viene dato ai piccoli fino alla pubertà (30gg dalla nascita).

2: Trattamento 'simil-ambientale'



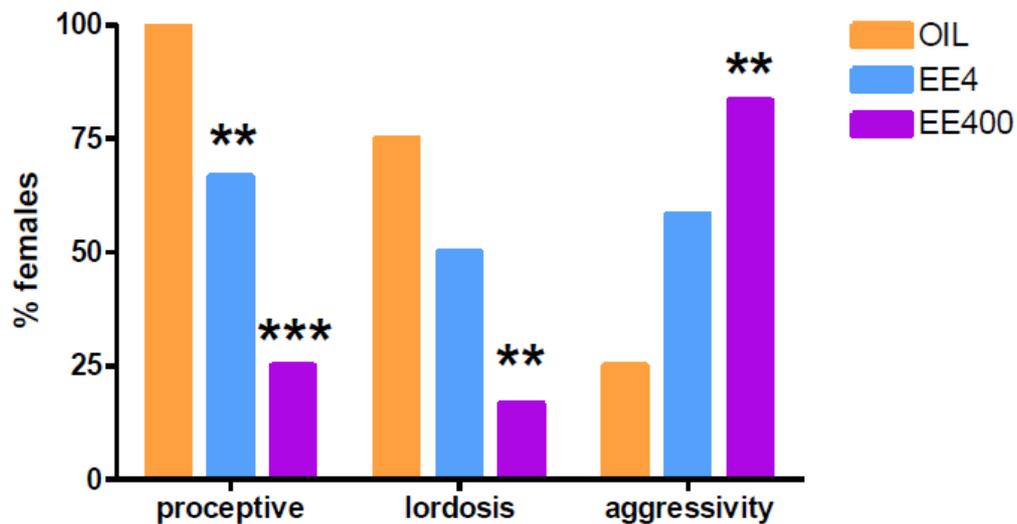
Gli effetti degli xenoestrogeni sono stati ricercati su una serie di caratteristiche (endpoint):

- Sviluppo
- Comportamento sessuale femminile (sensibile agli estrogeni nella fase organizzativa)
- Fertilità e fecondità delle coppie
- Apprendimento spaziale nei maschi.

RISULTATI:

1. Comportamento sessuale femminile

Effects of EE2 on female sexual behaviour



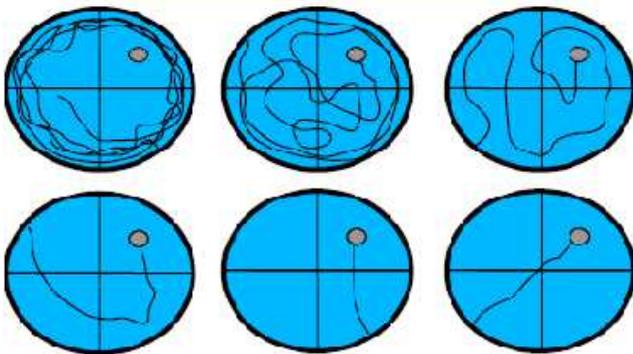
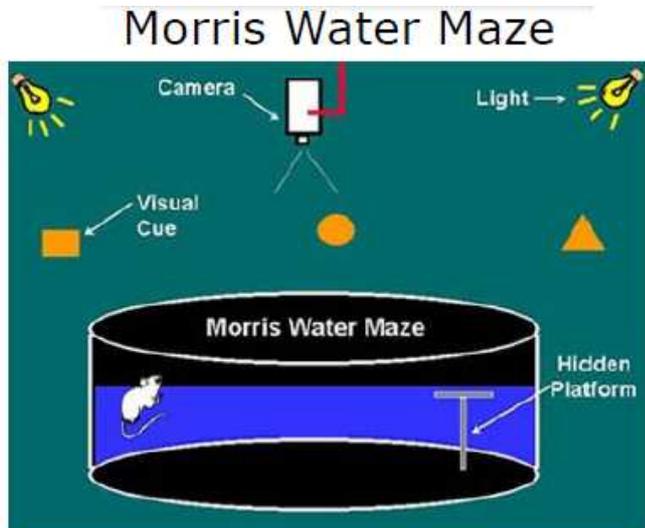
Il comportamento sessuale delle femmine (di controllo: OIL, con la dose ambientale: EE4 e con la dose clinica: EE400) viene valutato misurando la % di comportamento procettivo (segnali di disponibilità all'accoppiamento), lordosi e aggressività.

Sia il comportamento procettivo che la lordosi sono meno frequenti negli animali che hanno subito il trattamento, gli EE400 in entrambi i casi presentano un calo significativo delle attività, per gli EE4 la significatività viene raggiunta solo nel comportamento procettivo nonostante anche la lordosi si sia ridotta di un 25%. L'aggressività verso il maschio invece aumenta significativamente negli EE400 ma non negli EE4 anche se aumenta di un 30%.

Il test viene effettuato a 2 mesi d'età nei ratti femmina, un mese dopo la fine del trattamento.

2. Apprendimento spaziale nei maschi

Gli effetti valutati sono riportabili a modificazioni del sistema nervoso e del sistema endocrino conseguenti alla loro esposizione all'etinil estradiolo durante la fase di sviluppo.



Per valutare l'apprendimento spaziale nel ratto si è utilizzato il Morris Water Maze: un labirinto in cui gli animali devono trovare una piattaforma nascosta 2cm sotto il pelo dell'acqua basandosi su dei riferimenti fuori dalla vasca. L'acqua della vasca viene resa opaca con latte o vernici atossiche.

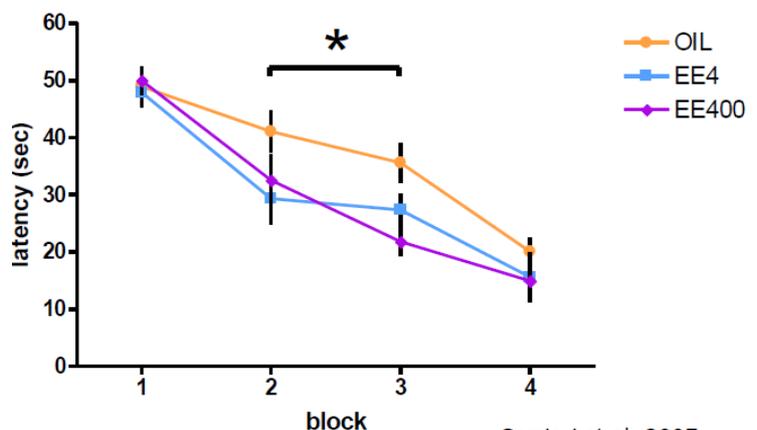
La prima volta che il ratto fa il test è il ricercatore che lo accompagna alla piattaforma in quanto generalmente da solo non riesce a trovarla.

Con il proseguire dei test il ratto è sempre più rapido nel trovare la piattaforma e dopo 4 o 5 volte vi sale senza perdere tempo.

Il ratto è un animale a cui piace nuotare e quindi non viene stressato molto dai test. Ogni volta che viene ripetuto il test il ratto viene rilasciato in un punto diverso della vasca.

Sull'asse delle ordinate viene inserito il tempo di latenza cioè il tempo che il ratto impiega per trovare la piattaforma. Il ratto con il passare delle prove impara ma il processo di apprendimento sembra essere significativamente più rapido nei ratti trattati con lo xenoestrogeno.

Escape latency in EE2 treated males

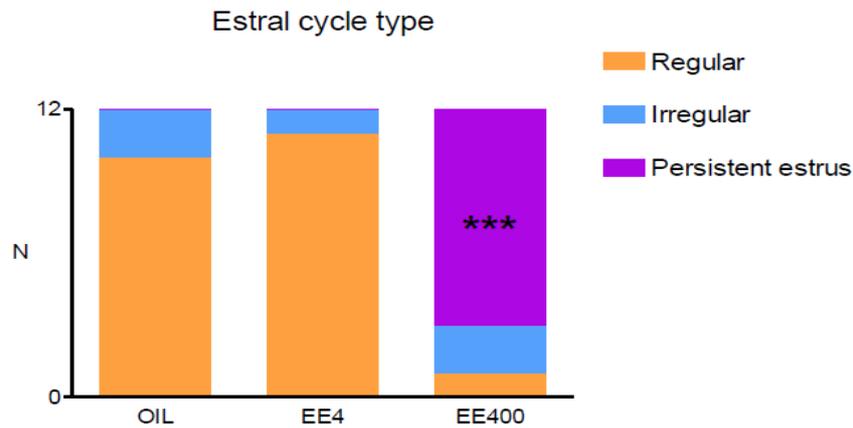


Corrieri et al. 2007

3. Effetti sullo sviluppo

Si valuta il ciclo estrale (corrisponde al ciclo mestruale umano).
L'effetto dell'etinil estradiolo sembra essere presente solo nei EE400:

Effects of EE2 on the estral cycle



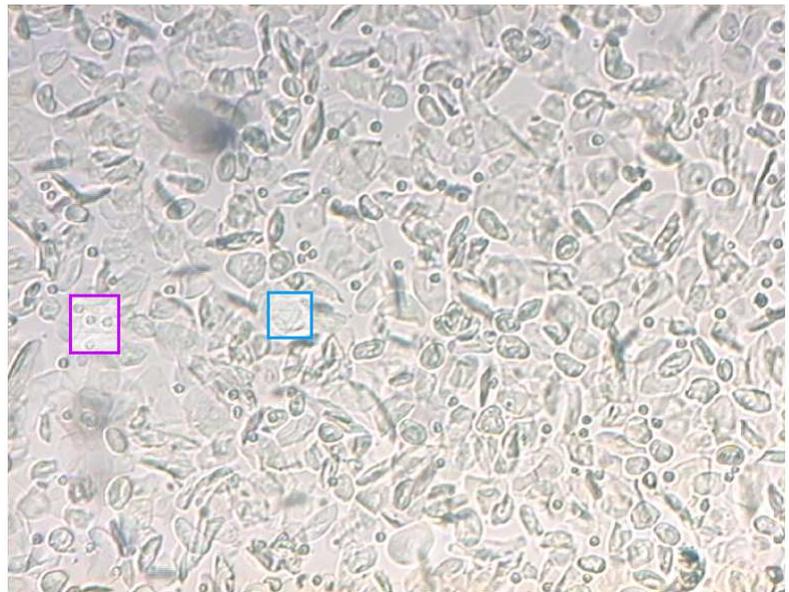
Fusani et al. 2007

I controlli e gli EE4 presentano un ciclo regolare con qualche normale caso di irregolarità mentre la maggior parte delle femmine trattate con la dose clinica hanno una situazione di estro persistente valutata a livello citologico.

Dallo striscio vaginale effettuato su femmina di ratto EE400, si nota la presenza di molte **cellule corneificate** tipiche dello stato estrale ma anche di **leucociti** presenti nelle fasi di pre-estrale.

La citologia dello striscio nel suo complesso corrisponde a quello di un ratto anziano intorno ai 12-13 mesi di età che si trova a in uno stato di estro persistente.

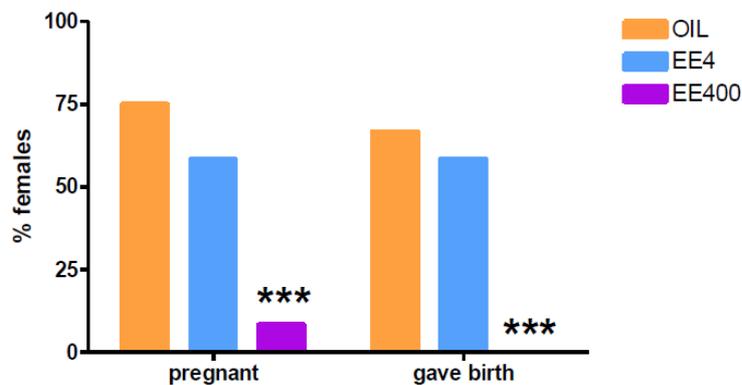
Etinil estradiolo è capace quindi di anticipare di molto l'invecchiamento riproduttivo di questi animali.



4. Fertilità e fecondità delle coppie

Si fanno incrociare maschi e femmine dello stesso gruppo sperimentale non fratelli.

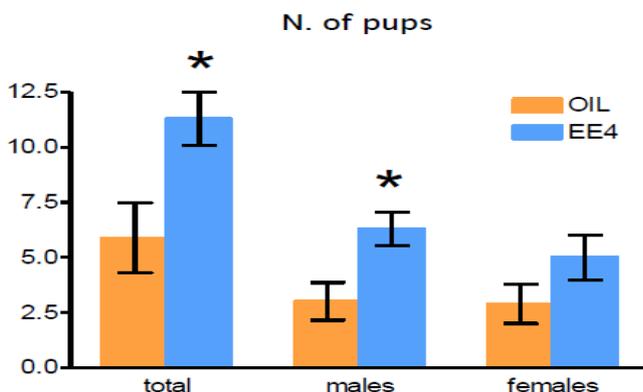
Effects of EE2 on reproduction of treated pairs



Fusani et al. 2007

Le femmine trattate con la dose più alta non riescono ad avere figli e solamente una rimane gravida ma subisce un aborto (dato non sorprendente ma nemmeno ovvio perché etinil estradiolo è un anticoncezionale). Le EE4 sembrano avere normale fertilità e fecondità.

Effects of EE2 on F2 at PND2



Fusani et al. 2007

Analizzando la seconda generazione si nota che le femmine del gruppo EE4 hanno partorito più figli dei controlli: aumento di fecondità.

Le dosi ambientali causano alterazioni nella fecondità delle seconde generazioni.

RIASSUMENDO:

Effetti dell'esposizione a xenoestrogeni:

- Sviluppo apparentemente normale,
- Comportamento sessuale femminile severamente alterato,
- Apprendimento spaziale alterato nei maschi,
- Sterilità completa (EE400) o fecondità alterata (EE4).

TEST DI AUTOVALUTAZIONE

1. Perché l'interferenza endocrina, seppure non rappresenti una vera tossicità, secondo alcuni è da considerarsi pericolosa?
2. Come si scelgono le variabili-spia (endpoints) da utilizzare per misurare gli effetti di processi di interferenza endocrina?
3. Perché la scelta del modello sperimentale influenza la esportabilità e la generalità di uno studio?

RISPOSTE

1. In quanto sono in grado di mimare le funzioni estrogeniche e quindi possono determinare conseguenze a livello endocrino, alterando gli equilibri ormonali.
2. Sono stati scelti tenendo conto dei possibili meccanismi con cui può interferire uno xenoestrogeno e quindi verificando le possibili alterazioni del sistema endocrino e di tutto ciò di cui è responsabile.
3. Perché se si sceglie un modello molto specifico è difficile riportare i risultati alla generalità, se il modello ha caratteristiche più generiche i risultati sono più esportabili. (ad Es. scelta di uno xenoestrogeno puro).

NAVIGAZIONE SPAZIALE DEL RATTO



Navigare significa conoscere la propria posizione nell'ambiente e sapere dove si deve andare. L'esempio più classico è la navigazione in mare. L'orientamento al contrario non implica la conoscenza della propria posizione.

Esistono diversi tipi di navigazione:

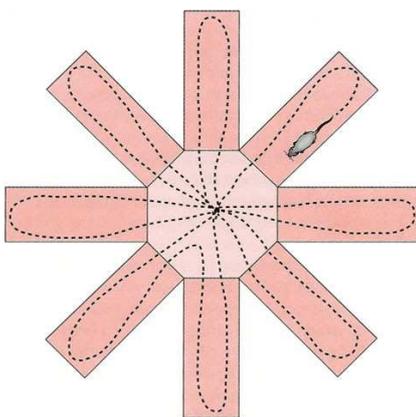
- Procedurale in cui le manovre effettuate sono quasi inconsce, si viene a instaurare dopo la memorizzazione di una serie di azioni in successione,
- Mappa e bussola avviene in assenza di punti di riferimento.

I punti di riferimento sono detti Landmarks.

La navigazione implica la necessità di memorizzare.

Le memorie usate sono differenti a seconda del tipo di navigazione:

- Procedurale che si sviluppa a seguito di un apprendimento schematico sempre uguale e frequente di un determinato processo.
- Cognitiva che permette la navigazione detta *integrazione del percorso* in cui non ci sono punti di riferimento (navigazione cieca) ma si è consci della propria posizione: si utilizza una mappa cognitiva.



12.1 Radial arm maze

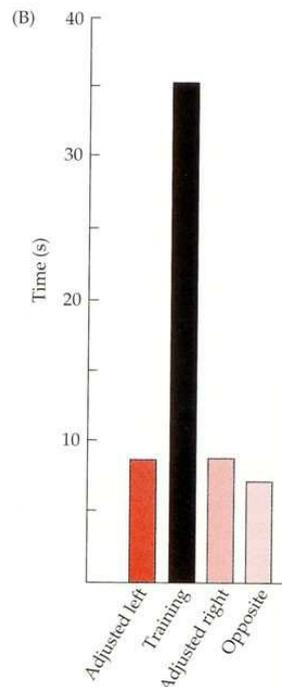
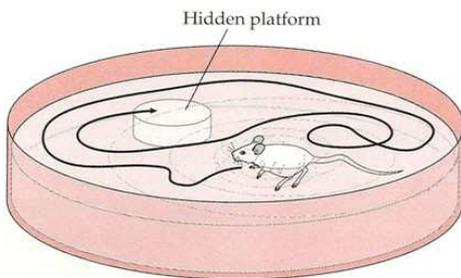
This top view of a rat running in a radial arm maze reveals its running strategy (indicated by the dashed lines). It has visited each of the eight arms in succession. After Olton 1977.

Lo studio della navigazione spaziale nel ratto (ottimo navigatore e permette esperimenti su scala ridotta) avviene con diversi protocolli tra cui il labirinto radiale. Il ratto segue una strategia di ricerca per ottimizzare il tempo.

Un ratto bravo nella navigazione entra in ogni braccio una volta sola. Il labirinto è controllato in modo che l'animale non lasci tracce odorose. In alcuni bracci viene nascosto il cibo in un pozzetto.

Un'altra delle procedure di studio è il labirinto acquatico di Morris:

(A) The Morris water maze



Nel test spaziale:

la piattaforma è nascosta sotto il pelo dell'acqua e il ratto deve trovarla utilizzando informazioni esterne alla vasca (extra maze cue). Vengono, infatti, applicati indizi esterni alla vasca.

Sono importanti due variabili:

- Una si verifica durante il training (addestramento); più il ratto esegue test nel labirinto maggiore sarà la sua conoscenza della posizione della piattaforma e quindi minore sarà il tempo che permette di raggiungerla,
- Il probe test che si effettua togliendo la

12.2 Water maze

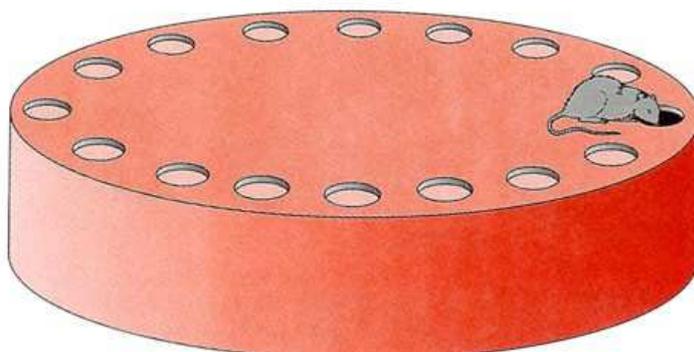
(A) In a water maze, the rat swims in the cloudy water until it encounters a hidden platform that allows it to climb out of the water. (B) In a probe trial, with the platform missing, the time spent swimming in different quadrants is plotted. The rat spends much more time in the "correct" quadrant than in the other three. After Morris 1981.

piattaforma e misurando quanto tempo impiega il ratto in ogni quadrante della vasca.

Un ratto addestrato sottoposto al probe test passa la maggior parte del tempo nel quadrante in cui era presente la piattaforma.

Esiste anche un cue test: un test di controllo dove la piattaforma è visibile utilizzato per verificare se il ratto presenta capacità semplici compromesse es. visive, sensoriali, motivazionali, motorie.

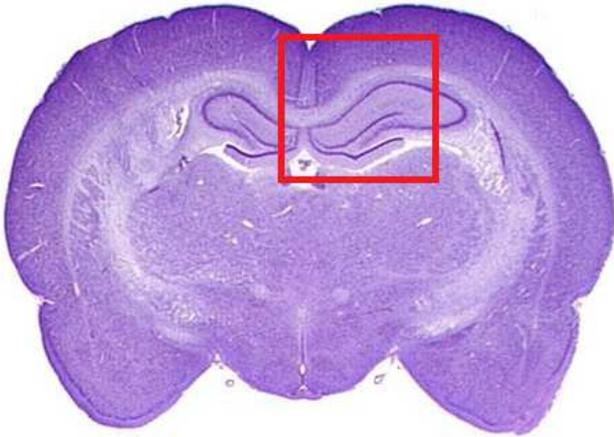
Esistono ulteriori test utilizzati in casi particolari ad es:



12.3 Circular platform maze

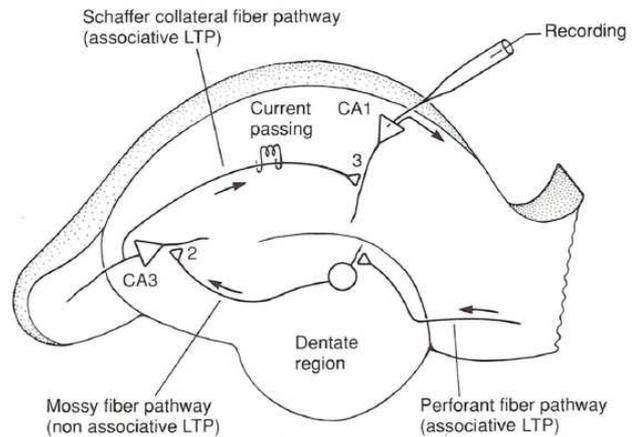
Only one of the holes in this circular maze gives access to a tunnel that allows the rat to escape from the exposed tabletop (which it finds aversive). After Barnes 1988.

Si utilizza nei topi che non amano molto stare in acqua ma adorano nascondersi al buio.



Ha la caratteristica di avere tutti i neuroni in uno strato cellulare singolo. Ha quindi una struttura molto chiaramente definita.

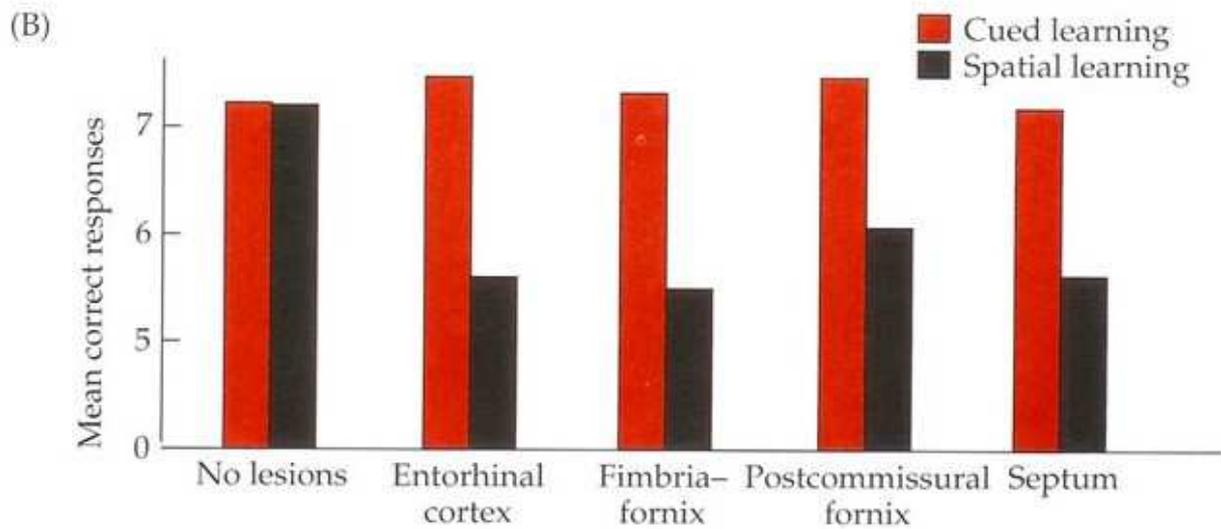
Il circuito trisinaptico



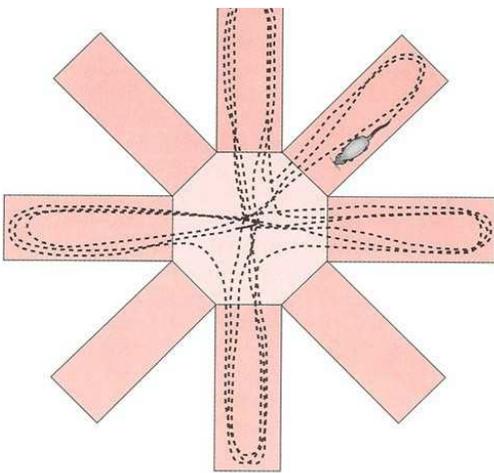
L'ippocampo è stato studiato molto in dettaglio anche da un punto di vista elettrofisiologico perché vi è presente il *circuito trisinaptico* (coinvolge tre sinapsi).

Si è capito che l'ippocampo è coinvolto nell'apprendimento spaziale osservando i pazienti che subiscono trauma cranico a livello dell'ippocampo: manifestavano chiari deficit cognitivi e in particolare deficit spaziali.

Tutto ciò fu verificato sperimentalmente lesionando gli animali sperimentali.



(A)



Il grafico mostra il risultato di un esperimento fatto con il labirinto radiale in un ratto lesionato a livello ippocampale.

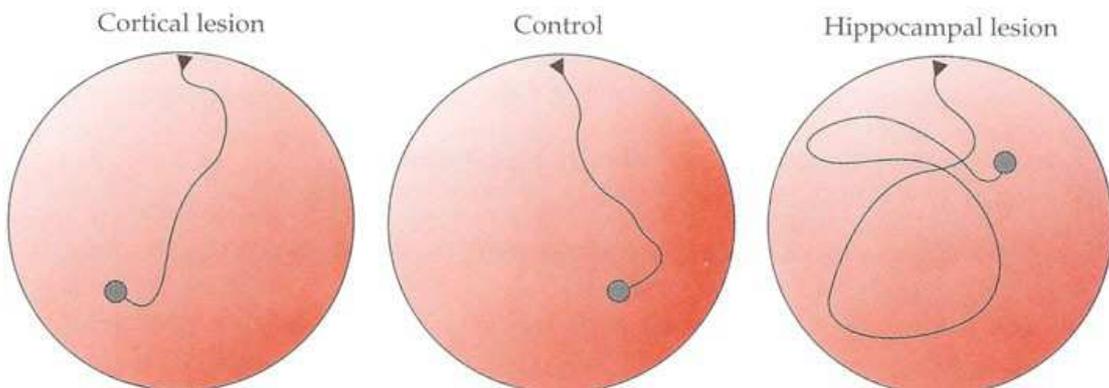
Il ratto mostra comportamento perseverante (torna più volte nello stesso braccio).

La capacità di memorizzazione spaziale si è indebolita e l'animale non ricorda più, dove è già stato.

Il ratto è in grado di effettuare il cued learning (apprendimento grazie ad indizi): riesce a

raggiungere la metà vedendola (in questo caso non è necessaria la memoria spaziale).

Lo stesso risultato si ottiene con il Morris water maze:

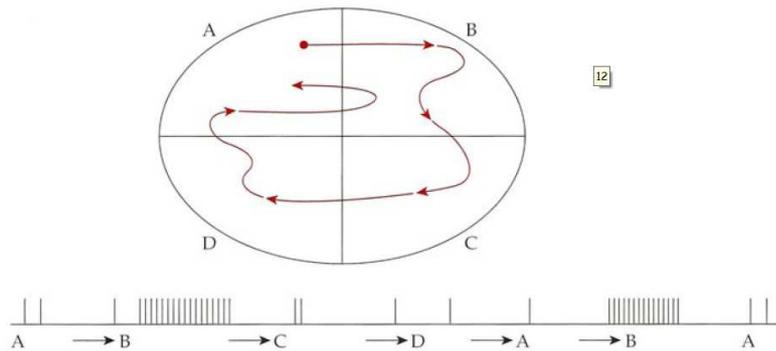


12.7 Hippocampal lesions alter the swimming pattern in a water maze

These diagrams show the paths taken in the water maze by rats with cortical lesions, normal rats, and rats with hippocampal lesions. Cortical-lesioned and control animals swim directly to the location of the hidden platform (triangles = starting point; dark circles = platform), hippocampal-lesioned animals swim erratically until they eventually encounter the platform. After Morris et al. 1982.

Negli anni '70-'80 sono state scoperte cellule dell'ippocampo del ratto dette cellule di posizione (place cells), che generano potenziale d'azione (scaricano) quando l'animale occupa una precisa posizione nello spazio. L'attivazione dei neuroni non dipende da nessun altro fattore se non la posizione in cui si trova il ratto. Se l'animale si sposta la scarica cessa.

Pattern di scarica di una ipotetica cellula di posizione

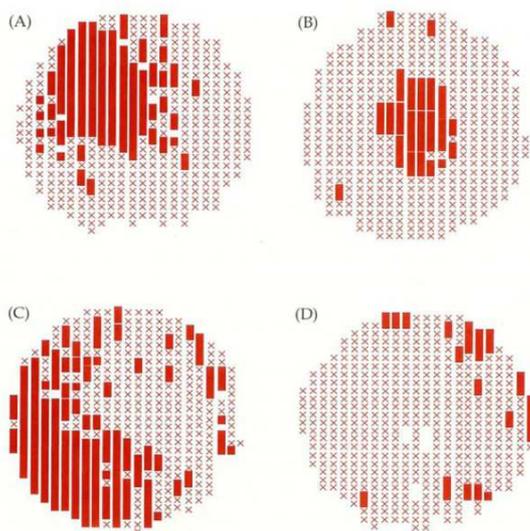


Il percorso del ratto in una camera ovale è mostrato in alto. In basso, la scarica di una cellula di posizione durante il percorso. Si nota una 'preferenza' per il quadrante B della camera.

Questa scoperta suggerisce che le cellule di posizione siano quelle che codificano per la memoria spaziale, in oltre si comportano esattamente come l'individuo. Sembrano essere la base fisiologica della capacità di conoscere l'ambiente in cui viviamo.

Per ogni particolare luogo dello spazio si pensa che ci sia un insieme di cellule di posizione che in quel momento scaricano, e la combinazione delle diverse cellule rappresenta il codice che individua una posizione.

Pattern di scarica di quattro cellule di posizione



In ogni punto dello spazio si può fare un'integrazione dell'informazione di quattro cellule di posizione diverse che comunicano una informazione sulla posizione che si occupa.

L'intensità della scarica in ciascuna posizione è indicata dall'ombreggiatura. Le cellule in (A), (B) e (C) mostrano differenti campi di scarica. La cellula in (D) non mostra invece preferenze di posizione. Da Muller, Kubie e Ranck 1987.

Le cellule di posizione hanno un processo di generazione della preferenza di scarica che va di pari passo con il processo di apprendimento dell'ambiente in cui ci si trova: se l'animale viene messo in un luogo nuovo le sue cellule di posizione non mostrano una preferenza di scarica, essa si sviluppa man mano che il ratto comincia a conoscere l'ambiente in cui si trova.

Il processo sembra essere una codificazione dell'ambiente spaziale che costruendosi costituisce la base fisiologica della nostra conoscenza del luogo a livello cognitivo.

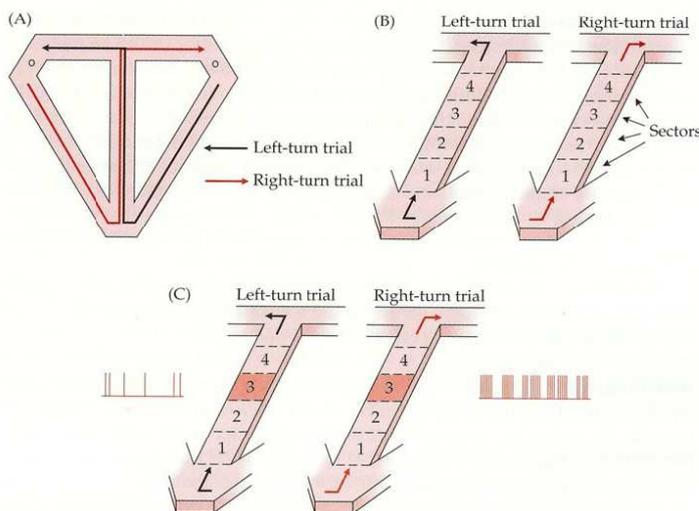
L'esperimento di verifica di questa ipotesi consiste nel posizionare il ratto al buio in un ambiente che conosce e verificare se le cellule di posizione mostrano le stesse preferenze che mostrava nell'ambiente alla luce.

Un ulteriore esperimento fu effettuato togliendo tutti gli indizi presenti nel luogo, se il ratto è in grado di mantenere coscienza della sua posizione le sue cellule continuano ad avere la stessa preferenza di scarica.

Disorientando l'animale al buio tramite delle rotazioni su se stesso, le cellule perdono la preferenza di scarica e quindi l'animale non sa più dov'è; riaccendendo la luce la preferenza si ripristina.

Sono state scoperte successivamente anche delle cellule di posizione che predicono il futuro :

Cellule di posizione che predicono il futuro!



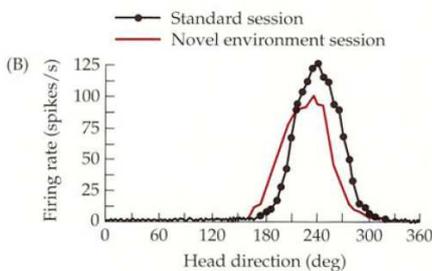
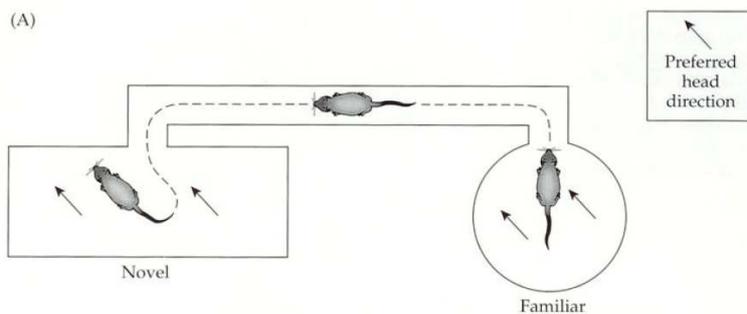
- (A) Un ratto è addestrato in un labirinto a T modificato. Per ricevere un premio – frutta – regolarmente, l'animale deve alternare svolte a sinistra (freccia nera) e a destra (freccia rossa).
- (B) Il tratto centrale della T è diviso in settori in cui si registra l'attività.
- (C) Quando l'animale passa nel settore 3 prima di girare a sinistra, la cellula non scarica. Quando invece passa nello stesso settore prima di girare a destra, la cellula scarica intensamente. Da Eichenbaum.

Nella figura A è rappresentato il *gioco della frutta* che consiste nell'far compiere all'animale un determinato percorso premiando con del cibo. Il ratto una volta deve girare a sinistra e quella successiva a destra. Dopo qualche ora di addestramento imparano bene il tragitto.

Durante il percorso, viene registrata l'attività di alcune cellule ippocampali. La parte centrale del tratto a forma di T è divisa in quattro settori (figura B). Le cellule scoperte mostravano preferenza per il luogo in cui si trovavano ma anche per la futura direzione intrapresa dall'animale. Le cellule di posizione in analisi avevano preferenza per il setto 3 (figura C) ma a differenza delle normali cellule di posizione queste cellule mostravano la preferenza solo se l'animale sarebbe andato in una direzione piuttosto che nell'altra (es. solo se sarebbero andati a destra). Quindi la loro preferenza di scarica dipende dal luogo in cui si trova il ratto e dal luogo in cui sarà nel futuro: per ciò dette cellule di posizione che predicono il futuro.

Esistono altri due tipi di cellule di posizione: il primo gruppo è detto cellule di direzione della testa e funzionano analogamente ad una bussola.

Cellule di direzione della testa



(A) Le cellule di direzione della testa mantengono una direzione preferita di scarica in un ambiente nuovo.

(B) Grafico della frequenza di scarica durante l'esperimento mostrato in (A).

Le cellule hanno la preferenza per una direzione della testa: nella figura A si vede il ratto in un ambiente familiare, la cellula studiata ha una preferenza per una determinata posizione della testa (nord-ovest), quando l'animale passa in un nuovo ambiente la stessa cellula mantiene la stessa direzione.

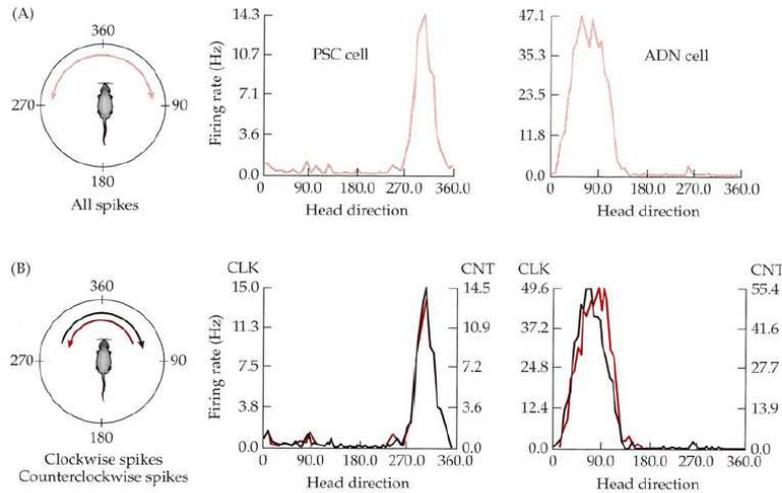
La scarica della cellula è graficata nella figura B.

La scarica si mantiene anche in un nuovo ambiente a condizione che l'animale non sia disorientato.

Si deduce che queste cellule di posizione permettono al ratto di sapere qual è il suo orientamento.

Il secondo gruppo è detto cellule di direzione che predicono il futuro:

Cellule che rispondono alla *futura* direzione della testa

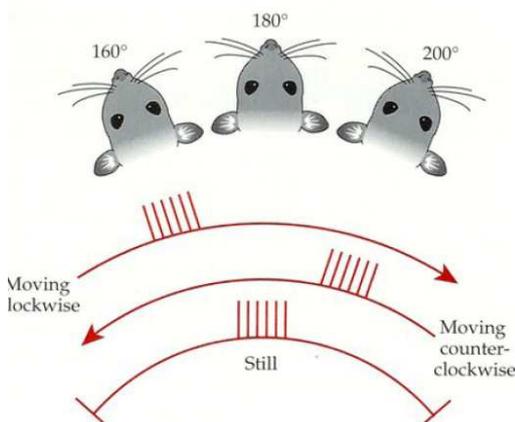


(A) Pattern di scarica dei neuroni della corteccia post-subicolare (PSC) e del nucleo anterodorsale (ADN). La risposta delle ADN mostra due picchi.

(B) Se si dividono le risposte in base alla direzione di provenienza, si osserva che la risposta delle ADN precede di poco la direzione preferita di scarica.

Le cellule PSC sono le classiche di direzione della cellula mentre le ADN predicono anche il futuro.

Caso simile alle cellule di posizione che predicono il futuro, con la differenza che queste cellule danno una preferenza di scarica per una direzione che dipende da quale lato si stanno avvicinando a tale direzione; predicono quindi la direzione futura della testa:



Se il compito della cellula è di segnalare al ratto che tra poco la testa sarà rivolto a 180°, questa cellula si attiverà intorno ai 160° se la direzione viene avvicinata in senso orario e a 200° se viene avvicinata in senso antiorario.

TEST DI AUTOVALUTAZIONE:

1. Che tipo di memoria viene utilizzata durante l'esecuzione di una procedura?
2. Che differenza c'è tra un place test (spaziale) e un cue test (indiziale)?
3. Perché si dice che alcune particolari cellule di direzione della testa predicono il futuro?

RISPOSTE

1. Si utilizza una memoria procedurale che si sviluppa a seguito di un apprendimento schematico di un'azione sempre uguale e frequente di un determinato processo. L'azione viene effettuata in modo quasi inconscio es. suonare uno strumento.
2. Un place test è dipendente da un addestramento in cui l'animale utilizza la memoria spaziale per crearsi una vera e propria mappa cognitiva dell'ambiente, nel cue test non è necessaria in quanto la meta è ben visibile.
3. Perché se si studiano si nota l'emissione di potenziale d'azione leggermente in anticipo rispetto al momento in cui l'animale posiziona la testa nella direzione preferita dalle cellule.

IL BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO
(consiglio appunti di Claudia Taffurelli)

TEST DI AUTOVALUTAZIONE

1. Per quali fattori ambientali la necessità dell'animale è spesso in contrasto con quella dello sperimentatore?
2. Come può intervenire lo sperimentatore per migliorare le condizioni dell'animale durante gli esperimenti?
3. Fare un esempio di arricchimento ambientale descrivendo le ragioni.

RISPOSTE

1. La vita sociale può essere causa di malattie e di danni negli animali ma anche l'isolamento stesso può essere rischioso psicofisiologicamente, per cui lo sperimentatore deve utilizzare accortezze per mantenere il benessere animale ma anche la validità dei dati sperimentali.
2. E' possibile escogitare metodi di analisi meno invasivi e stressanti ad esempio addestrando gli animali ad assumere sostanze previste dalla sperimentazione tramite siringhe invece che usare sonde esofagee.
3. Si può alimentare gli animali in maniera che utilizzino tempo e strategie per ottenerlo, ad es. fornendo a roditori noccioline da sgusciare. In questo modo ci si avvicina alla condizione naturale in cui l'animale impiega la maggior parte del suo tempo a cercare cibo e impedendo che si annoi in gabbia.

CONTROLLO ORMONALE DEL COMPORTAMENTO MIGRATORIO NEI PASSERIFORMI

La ricerca in questo caso viene effettuata in un ambito diverso dal laboratorio per motivi impliciti: Ricerca sul campo.

La riproducibilità completa in laboratorio non è possibile, ma alcuni aspetti della migrazione sono stati riprodotti; la difficoltà consiste nel fatto che gli uccelli in migrazione compiono migliaia di km.

La migrazione è uno dei fenomeni poco conosciuti dell'ambiente naturale perché ancora non si è in grado di seguire i piccoli uccelli (la più grande popolazione migratoria).

Conoscere le rotte migratorie è importante anche per la salute pubblica es. Allarme aviaria.

Ancora meno conosciute sono le strategie che gli animali utilizzano per passare da un posto all'altro:

Es. nell'immagine è mostrata la rotta di una specie che sverna in Africa orientale e si riproduce in Europa settentrionale.

Il percorso viene svolto due volte all'anno: una volta in primavera e una in autunno.

La difficoltà maggiore in questo caso è:

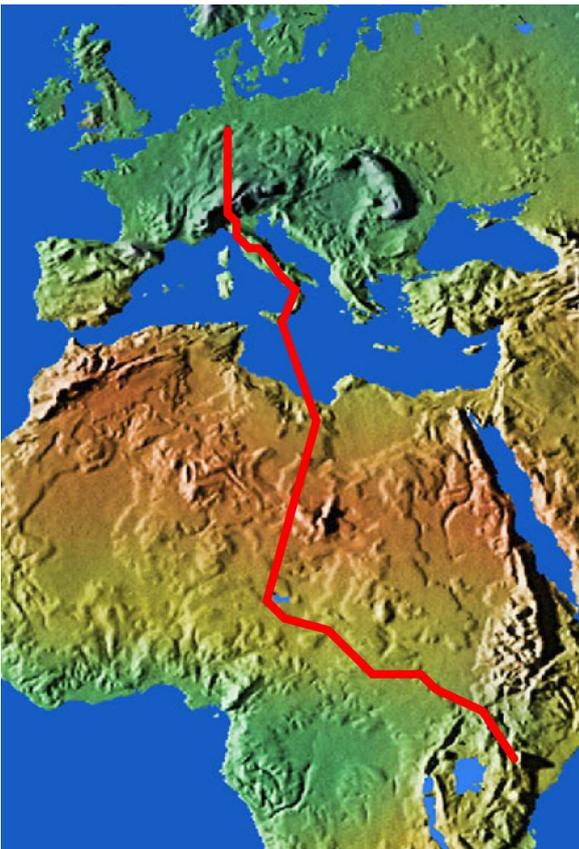
- Trovare la meta,
- Compiere un percorso così lungo.

Gli animali pesano da 10 ai 20 grammi, e il tragitto deve essere effettuato spesso in tempi brevi.

In oltre è necessario superare due barriere ecologiche importanti:

- Deserto del Sahara,
- Mar Mediterraneo

In entrambe le zone è difficile reperire cibo e trovare aree di riposo.



Gli studi che andiamo ad analizzare si sono concentrati sul sito di sosta (stopover site) ad es. un'oasi nel deserto, necessario per il riposo e l'alimentazione degli animali in migrazione.

I migratori possono contare solo su alcuni specifici siti di sosta.

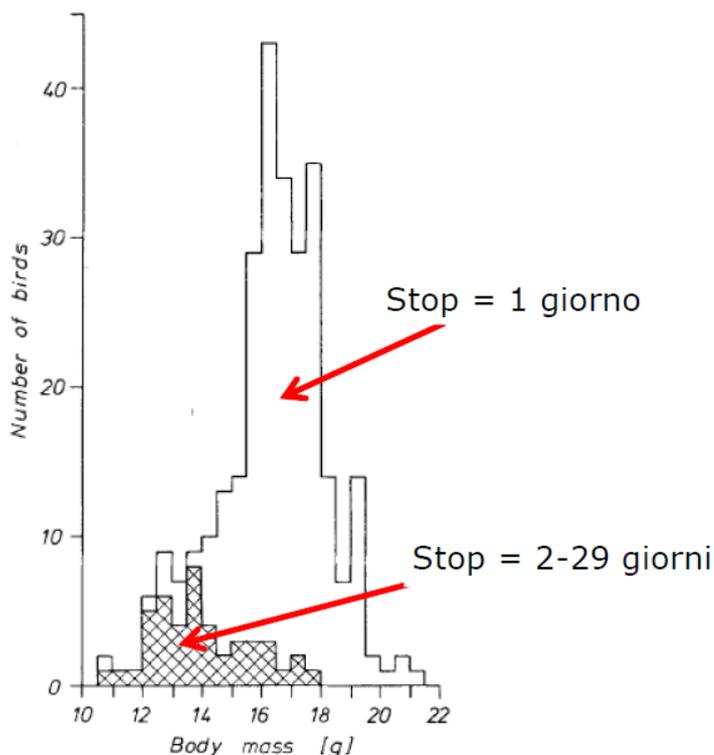
Negli anni '80 una prima serie di esperimenti eseguiti da un gruppo di ricercatori tedeschi nel deserto della Libia permette di identificare le basi degli avvenimenti durante il percorso migratorio.

Si capisce che gli stopover sono parte della strategia migratoria.

Ci si chiede, quindi, come un animale decide quando è il momento di fermarsi e quanto restare.

I ricercatori tedeschi (Biebach et al.) utilizzarono un sistema semplice ma classico detto *cattura e ricattura*: consiste nel mettere delle reti in una zona di sosta (oasi nel deserto), la prima volta che si cattura un esemplare viene misurato e marcato con anelli, se l'animale cade nella rete una seconda volta dopo uno o più giorni si considera come una ricattura. L'intervallo di tempo tra la cattura e la ricattura è la durata minima delle sosta.

Lo studio mostrò che la gran maggioranza degli animali faceva uno stopover di un solo giorno.



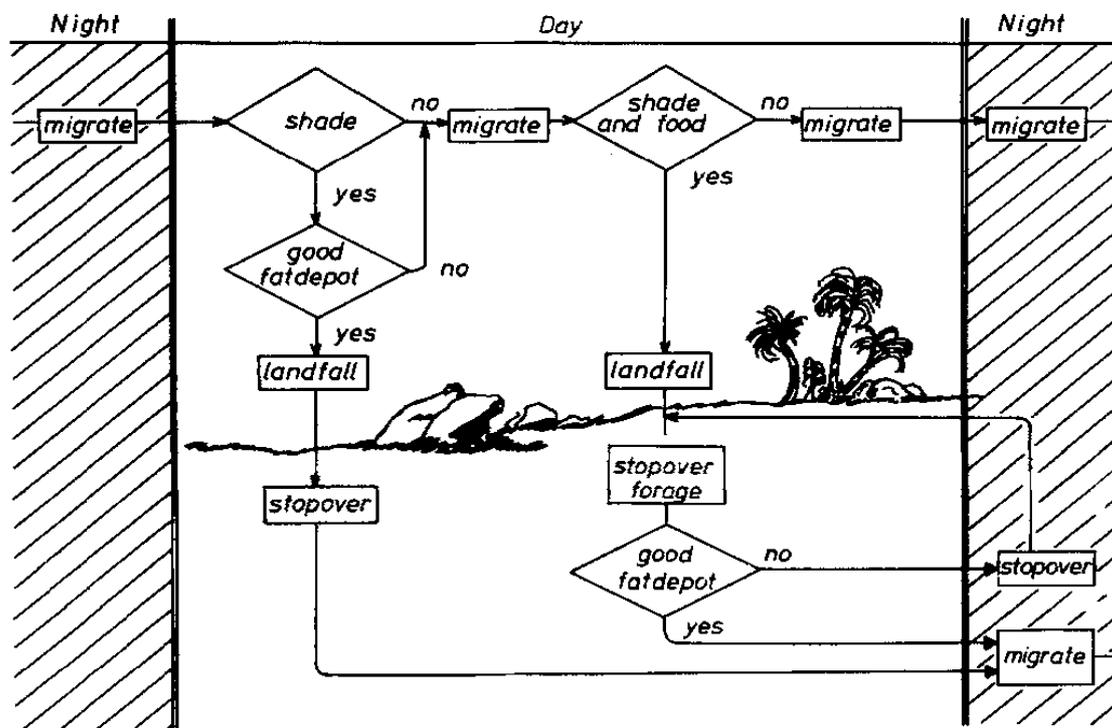
L'istogramma mostra il numero di animali per diverse classi di peso (indicazione della loro condizione).

La colonna più alta indica che 40 animali del peso di 17 g fanno uno stopover di un giorno, e solo 3 o 4 di questi rimane per più tempo.

Nel complesso il grafico suggerisce che gli animali con massa corporea minore permangono più a lungo nell'area di sosta, quindi che lo stopover è proporzionale al peso dell'animale.

E' noto che gli animali prima di partire per la migrazione attraversino una fase di iperfagia in cui ingrassano tantissimo (possono quasi raddoppiare il peso corporeo) in modo da stoccare le riserve per il viaggio.

Se il volo determina consumo di troppa energia (nel giro di un giorno un animale che non mangia perde 2g), gli animali fanno stopover.



Biebach et al. 1986

La maggior parte degli uccelli migratori viaggiano di notte, nonostante durante l'anno siano animali diurni.

Lo schema (diagramma a flusso in cui le losanghe presuppongono domande e i rettangoli definiscono l'azione compiuta) permette di interpretare i dati osservati prima:

- La migrazione avviene di notte;
- Durante il giorno gli uccelli verificano se i luoghi sorvolati presentano ombra, se l'ombra non c'è continuano a migrare, se l'ombra c'è si pongono una seconda domanda che riguarda le condizioni di grasso corporeo, se sono buone l'animale si ferma a riposare e riparte la sera stessa, se sono scarse l'animale continua a migrare;
- La migrazione continua finché l'animale non trova un luogo che presenta sia ombra che cibo, durante questo stopover avviene foraggiamento e riposo;
- La sosta si conclude quando le riserve di grasso sono ripristinate.

Come fanno gli animali a decidere se rimanere o ripartire?

La risposta a questa domanda può dipendere da fattori ambientali (cibo, ombra ecc..) e da fattori fisiologici (fame, sete, stanchezza ecc..).

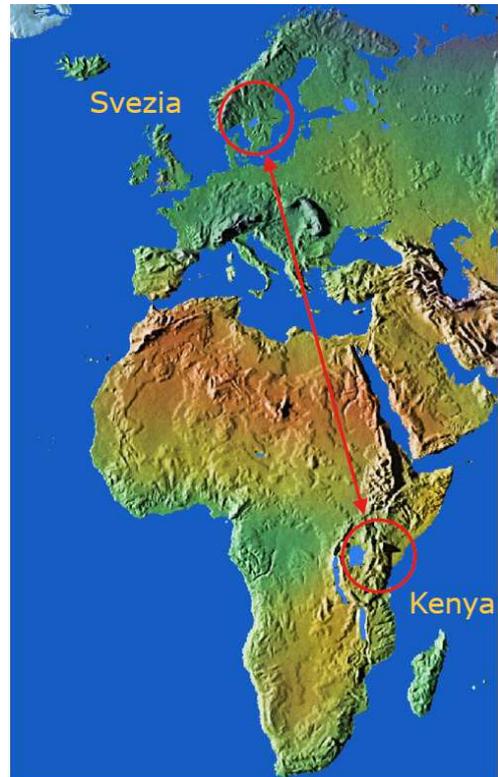
Un primo esperimento è stato effettuato con delle Capinere, specie migratoria molto abbondante in Europa.

La conoscenza del comportamento migratorio di questa specie è abbastanza ampia e tutto ciò rende la Capinera un buon modello.



Sylvia atricapilla

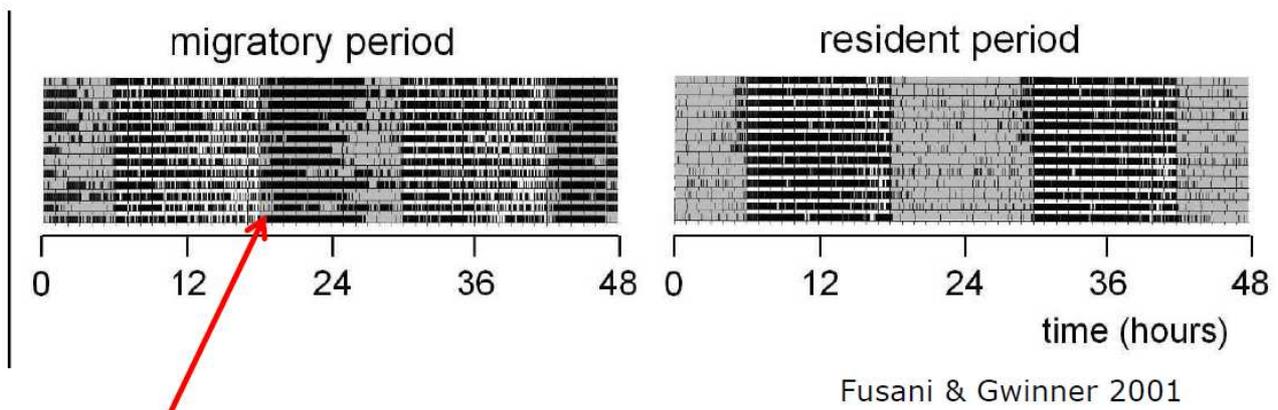
L'esperimento prevedeva la cattura degli animali in Svezia o in Kenya poco prima dell'inizio della migrazione. Venivano quindi posti in gabbie individuali dove veniva registrata la loro attività locomotoria la quale permetteva di capire qual era la loro condizione da un punto di vista migratorio.



Fusani & Gwinner 2004

Siccome gli animali sono notturni solo durante la migrazione si può verificare se sono in uno stato migratorio o meno guardando la loro attività locomotoria.

Inquietudine migratoria o "Zugunruhe"



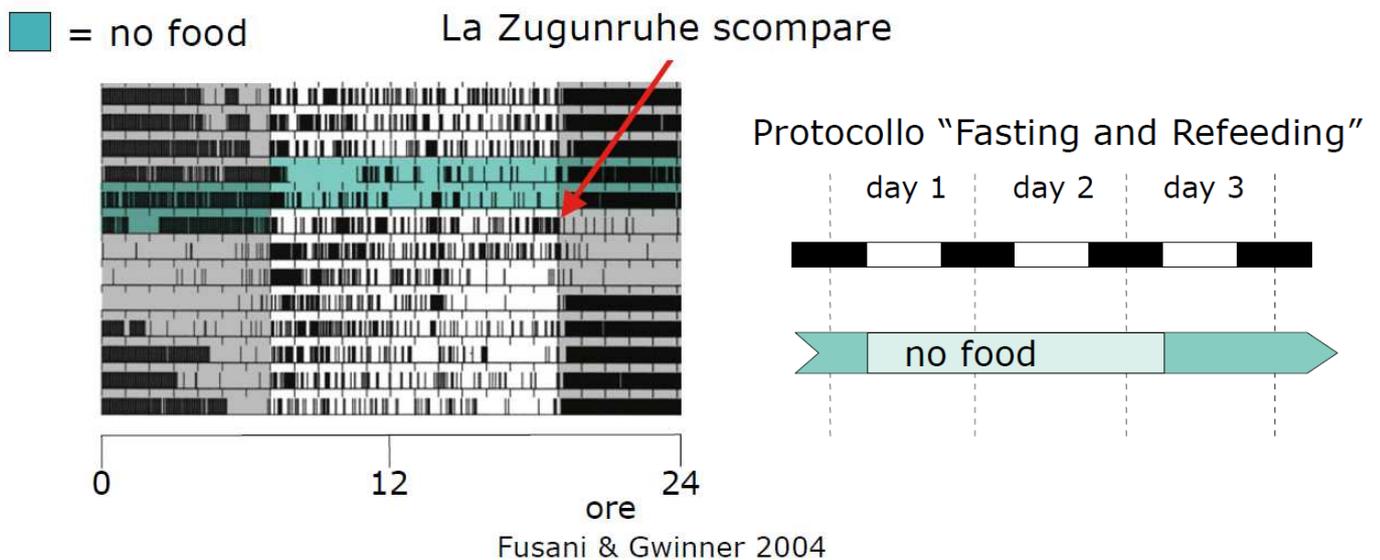
Dagli actogrammi (double plot) si deduce che, in un caso, la notte gli animali dormono con qualche attività sporadica e il giorno sono in continuo movimento (resident period), nell'altro caso, durante la notte, gli animali sono quasi più attivi che durante il giorno: condizione di Zugunruhe o inquietudine migratoria (migratory period).

Per misurare il parametro migrazione si sta utilizzando una variabile sperimentale che non è il parametro stesso ma è la tendenza migratoria dell'animale: la zugunruhe, si effettua quindi una approssimazione.

“Effetto Biebach”

La somministrazione di cibo dopo un periodo di restrizione induce la riduzione o la scomparsa della Zugunruhe: ('fasting-and-refeeding' protocol)

Il protocollo simula la situazione di un migratore che ha digiunato durante un lungo volo e interrompe la migrazione quando trova un luogo dove ricostituire le sue riserve energetiche.



Lasciando l'uccello in condizione migratoria senza cibo, per poi rifocillarlo al terzo giorno, si ottiene la soppressione della zugunruhe per tre giorni (actogramma). E' come se la capinera avesse trovato un area di sosta in cui si ferma finché non si rimette in forma.

L'effetto Biebach è un aspetto molto utile per le ricerche perché permette di riprodurre un fenomeno che avviene in natura in un modo molto semplice in laboratorio.

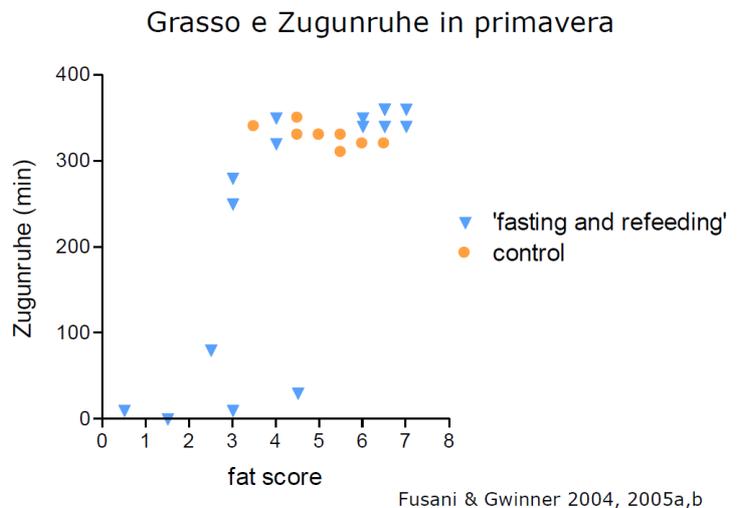
Il fenomeno si può quindi studiare in tutti i suoi aspetti tenendo conto che è una approssimazione di ciò che avviene in natura.

In ogni caso l'effetto Biebach conferisce numerosi vantaggi:

- Conoscenza delle condizioni precedenti degli individui studiati (alimentazione, peso, attività migratoria ecc..),
- Possibilità da parte dello sperimentatore di decidere quando l'animale arriva e quando riparte, e quindi decidere quando fare la raccolta dati.

Alla body mass fu sostituita da un punteggio che indicava la riserva di grasso (fat score):

In questo caso la zugunruhe cala in tutti gli animali che hanno riserve di grasso inferiori tre. Gli animali che hanno poco grasso sono quindi quelli che smettono di migrare.



Gli animali usati per questi esperimenti erano stati trasferiti in cattività e nutriti ad libitum, quindi si perdeva di vista la condizione naturale e i risultati ottenuti potevano essere molto diversi rispetto a quelli reali.

Per avvicinarsi più possibili alle condizioni naturali gli sperimentatori vanno sul campo in un noto sito di stopover di uccelli migratori passeriformi:

Sterpazzola (*Sylvia communis*)

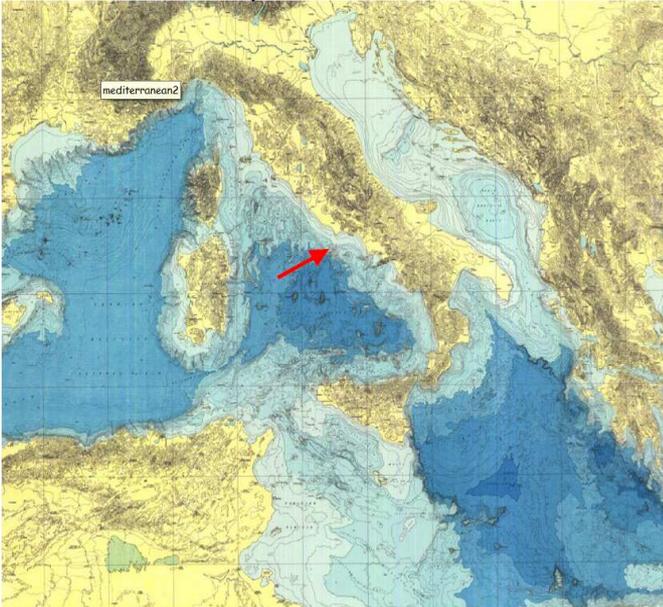


Beccafico (*Sylvia borin*)



L'area di sosta scelta è l'isola di Ponza:

Ponza: importante sito di sosta



Lo schema sperimentale prevedeva:

- Cattura degli animali alla mattina dalle 8 alle 11 grazie ad una stazione di inanellamento che utilizza reti fisse per monitorare il pellegrinaggio dell'avifauna.
- Rilevazione del peso, della quantità di grasso e di muscolo degli animali.
- Sistemazione degli animali in gabbie individuali di registrazione.
- Rilascio il mattino successivo.

Le gabbie sono fatte di tessuto per evitare agli animali la visione dei ricercatori permettendo in ogni caso la respirazione. All'interno delle gabbie è presente cibo, acqua e un sensore a infrarossi per registrare il movimento dei passerii.

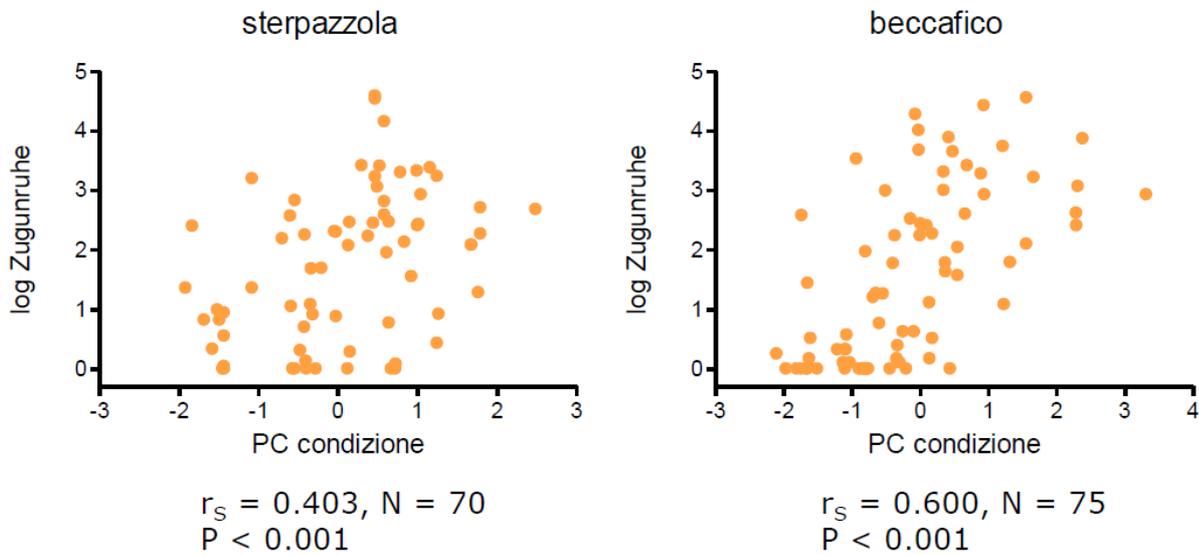


La procedura statistica usata è detta "*analisi delle componenti principali*" che permette di sintetizzare in un fattore diverse variabili.

Applicando il metodo statistico a peso, grasso e muscolo dell'animale si ottiene il fattore detto *Condizione*. Tutto ciò permette di semplificare l'interpretazione dei dati.

Gli animali che hanno condizioni peggiori, mostreranno meno inquietudine migratoria come nei dati ottenuti in laboratorio?

Le condizioni fisiche predicono la Zugunruhe



Fusani, Carere, Cardinale & Goymann 2009

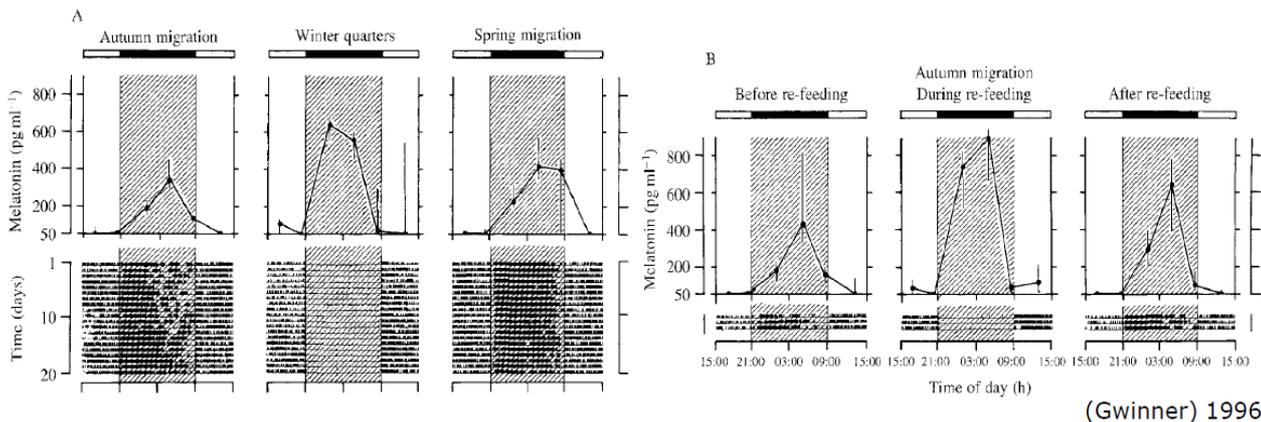
I risultati ottenuti indicano che il parametro *condizione* è in grado di predire l'inquietudine migratoria dell'animale:
Peggiori sono le condizioni degli animali minore sarà l'inquietudine migratoria.
Tutto ciò è verificato in entrambe le specie.
La risposta alla domanda è quindi Sì.

Si conclude deducendo che:

Le condizioni fisiche all'arrivo nell'area di sosta determinano la probabilità di rimanere o ripartire nella notte successiva.

MA: Qual' è il segnale che determina la decisione di rimanere o ripartire?

Nel 1996 si scoprì che durante la migrazione il picco notturno di Melatonina era ridotto:



In oltre, agli animali a cui veniva indotta una riduzione della migrazione con il protocollo "fasting and refeeding" mostravano dei livelli di melatonina più alti.

La melatonina è un ormone prodotto la notte anche negli animali notturni.

Si pensa che la correlazione possa evidenziare un rapporto effetto-causa tra la concentrazione di melatonina e la zugunruhe: l'ipotesi prevede che l'ormone causi la diminuzione della inquietudine migratoria.

Per validare l'ipotesi è necessario effettuare un test sperimentale ma in questo caso non è sufficiente utilizzare un pellet sottocutaneo per il rilascio ormonale o una iniezione di melatonina, in quanto l'ormone ha un rilascio ciclico nell'organismo ed è necessario mantenere questa condizione.

Fu sviluppata una pomata che contiene melatonina e che funziona semplicemente spalmandola sulla cute dell'animale in quantità note (50 µl).

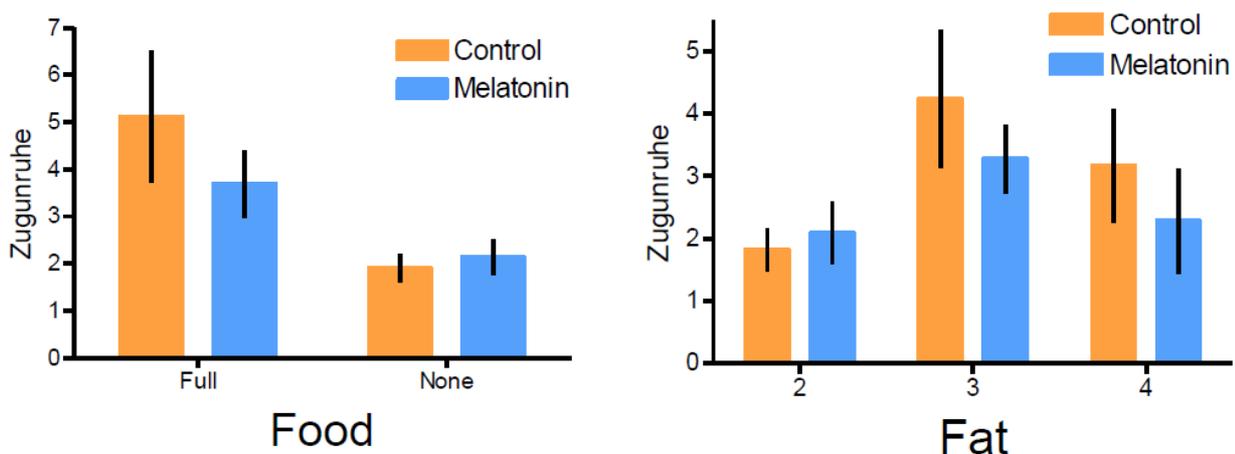
Il metodo è oltretutto non invasivo.

Se il trattamento viene effettuato poco prima di sera si ottiene un picco dell'ormone durante la notte molto simile a quello naturale.

Per verificare la funzione della melatonina si determinò un aumento del picco di melatonina in animali in stato di zugunruhe.

La pomata alla melatonina
LETTER
A Gentler Method to Raise Melatonin Levels in Birds
Wolfgang Goymann^{1,3}, Monika Trappschuh,² and Lesnida Fusani¹
¹Max-Planck-Institut für Ornithologie, Abteilung für Verhaltensneurobiologie,
Seewiesen, Germany, ²Università di Ferrara, Dipartimento di Biologia e Evoluzione, Ferrara, Italy
JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS, Vol. 23, No. 3, June 2008, 274-277
DOI: 10.1177/0929704908316349
© 2008 Sage Publications

Grasso e cibo influenzano la Zugunruhe ma non la melatonina



Fusani, Cardinale, Schwabl & Goymann, 2011

L'esperimento dimostra che la correlazione melatonina zugunruhe non è riportabile ad una causa-effetto in quanto all'aumento della concentrazione di melatonina, dovuto al trattamento, la zugunruhe non decresce significativamente, rimane pressoché costante.

L'informazione più importante scaturita da questi esperimenti è che la condizione dell'animale che arriva nell'area sosta è una dei principali fattori che determina la durata dello stopover.

Tutto ciò è stato ottenuto misurando non la migrazione ma un'altra variabile cioè la *zugunruhe*, e quindi tutte le deduzioni non si basano sui reali fatti.

Per superare questo problema si effettua un altro esperimento sull'Isola di Ventotene:



Quest'isola è molto piccola e è caratterizzata da un territorio piatto, che permette di utilizzare trasmettitori radio (piccoli e leggeri) per monitorare la durata della sosta degli animali.

Viene infatti incollato un trasmettitore compreso di antenna sulle penne del corpo dei passeri. Il trasmettitore rimane incollato per un massimo di due settimane.



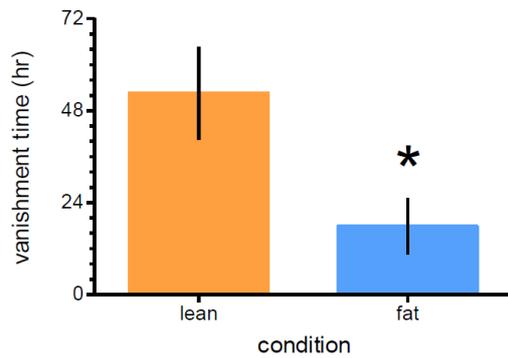
Si cerca di capire, grazie a questo esperimento, se veramente gli animali magri permangono sull'isola per maggior tempo.

Gli animali sono liberi e vengono monitorati tramite trasmettitori e antenne radio che per le caratteristiche piatte dell'isola erano in grado di coprire il 95% dell'intero territorio.

I migratori sono stati catturati alla mattina grazie ad una stazione di inanellamento, e selezionati in modo da averne 10 grassi e 10 magri (ci si basa sul fat score 2 o 4).

Si capisce quando gli animali lasciano l'isola perché si perde il segnale del trasmettitore.

I dati ottenuti erano quelli attesi: gli animali più grassi riprendono la migrazione



Goymann, Spina, Ferri & Fusani, 2010

prima, la partenza si verifica circa dopo 18 ore dall'arrivo quindi gli animali atterrati la mattina ripartono la sera stessa.

Gli animali magri mediamente sono rimasti sull'isola per 48 ore.

Questo esperimento conferma che la misura della tendenza migratoria degli animali tramite la zugunruhe era buona perché effettivamente i dati ottenuti con l'utilizzo dell'inquietudine migratoria come variabile corrispondevano a quelli riscontrati in campo.

Si conclude che con un sistema migliore, che permette di valutare la reale permanenza degli animali nei siti di sosta, si può dimostrare che i risultati precedenti erano attendibili e quindi che la zugunruhe è una buona misura del comportamento migratorio.

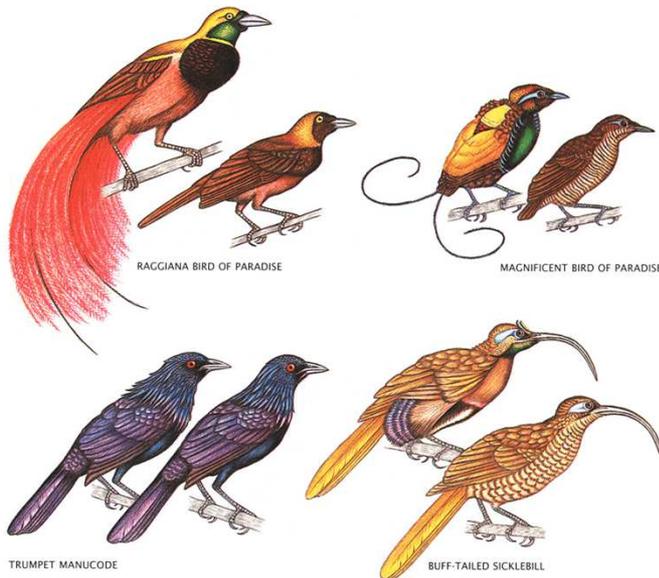
TEST DI AUTOVALUTAZIONE

1. Come si verifica se una variabile è una buona misura del parametro che ci interessa valutare?
2. Qual è il compromesso obbligato di ogni studio di laboratorio?
3. Cosa ci indica l'esistenza di una correlazione significativa tra due variabili?

RISPOSTE

1. Si valuta se la variabile utilizzata e il parametro reale rispondono in modo simile a variabili indipendenti. Ad esempio la zugunruhe è una buona variabile perché risponde in modo simile alla migrazione: dipendono entrambe dalla condizione dell'animale.
2. Togliendo l'oggetto di studio dal sistema naturale si facilita il controllo dell'esperimento ma si perde il riferimento al sistema reale. Si deve quindi scendere a conclusioni che non sono direttamente relazionabili alla situazione reale.
3. Non indica mai una sicura relazione causa-effetto, questa è possibile ma deve essere dimostrata con altri studi. La correlazione indica un'associazione tra le due variabili le quali possono anche essere dipendenti da un terzo fattore.

LA SELEZIONE SESSUALE E IL CORTEGGIAMENTO DEL MANACHINO COLLODORATO



In molte specie gli animali maschi presentano degli ornamenti elaborati che sembrano contraddire la selezione naturale in quanto causano maggiori costi energetici e maggior visibilità anche da parte dei predatori. La selezione sessuale viene proposta da Charles Darwin, e determina la premiazione dei fenotipi e genotipi che massimizzano il successo riproduttivo.

Se un tratto morfologico o fisiologico comporta un vantaggio dell'animale per

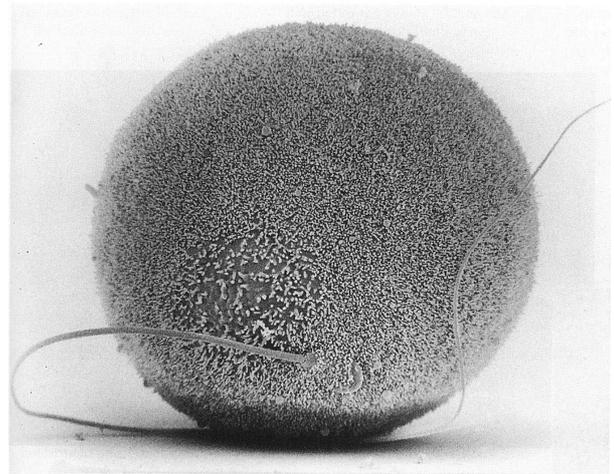
quanto riguarda la capacità di riprodursi, anche se è selezionato negativamente dalla selezione naturale, può comunque evolversi perché quello che conta è il bilancio: il successo riproduttivo è talmente grande da bilanciare gli svantaggi visti dalla prospettiva della selezione naturale.

Il fatto che i maschi presentino questi ornamenti e le femmine no, è spiegato dal fatto che i due genitori effettuano un *investimento parentale* estremamente sbilanciato.

Per investimento parentale si intende la quantità di risorse che ogni genitore impiega nella prole.

Le femmine investono molto più nella prole rispetto al maschio, e questo si manifesta soprattutto a livello gametico in quanto l'ovulo è grande e poco mobile mentre lo spermatozoo è piccolo e mobile, la spesa energetica della femmina è molto maggiore. Nei mammiferi il maggior investimento parentale a carico della femmina è la gestazione e l'allattamento.

Il maschio teoricamente può limitarsi alla copulazione (in alcune specie è proprio così), quindi l'investimento maschile risulterebbe quasi nullo.



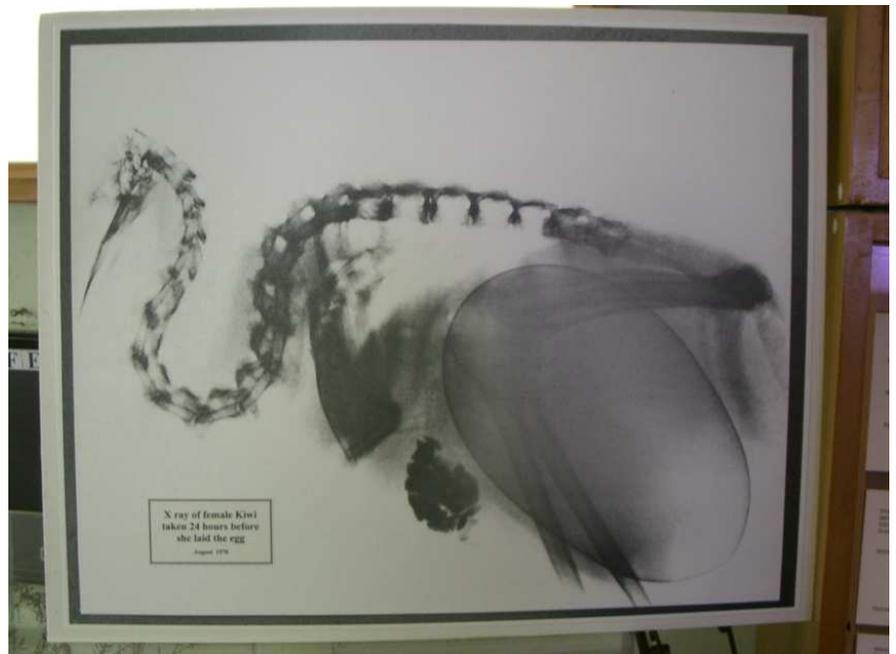
Le femmine hanno quindi il compito di scegliere il maschio con cui accoppiarsi; la scelta del partner è fondamentale per evitare di investire in modo svantaggioso importanti energie.

Il maschio per aver successo riproduttivo ha sviluppato tratti sessuali secondari per farsi notare e scegliere dalla femmina, le sue energie sono quindi utilizzate per il mantenimento di ornamenti che spesso sono penalizzanti nella lotta alla sopravvivenza.



Un altro esempio di investimento parentale sbilanciato a spese della femmina si ritrova nella specie dei kiwi dove l'uovo deposto pesa il 40% del peso della madre.

Dalla scelta del partner dipende il successo riproduttivo del discendente, ancora più importante nel caso che si deponga un unico uovo.



Nella maggior parte delle specie esiste un tipo di accoppiamento poligamo ed in alcuni casi ci sono situazioni estreme in cui il maschio dà contributo nullo nell'investimento parentale se non si considera lo sperma; in queste circostanze il maschio può investire molto negli ornamenti che diventano quindi estremamente appariscenti.

Successo riproduttivo diverso tra i sessi: solo alcuni maschi si riproducono

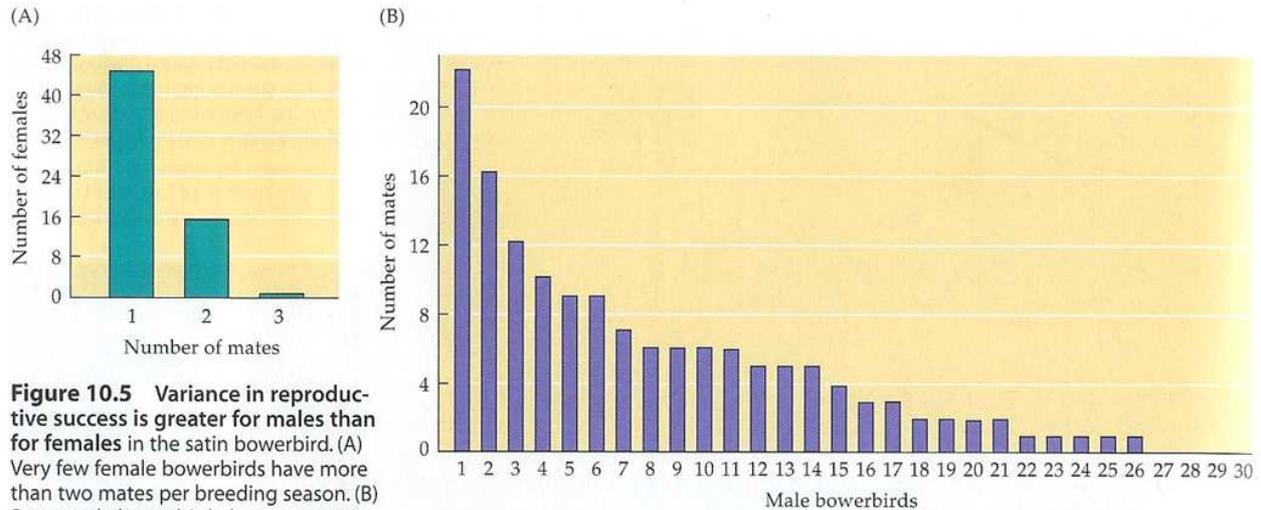


Figure 10.5 Variance in reproductive success is greater for males than for females in the satin bowerbird. (A) Very few female bowerbirds have more than two mates per breeding season. (B) Some male bowerbirds, however, mate with more than 20 females in a single season, while others do not mate at all. After Uy et al. [1224].

Se si studiano gli uccelli giardinieri si osserva che:

- la maggior parte delle femmine (42) ha avuto un solo partner, 16 femmine ne hanno avuti 2 e 1 sola femmina ne ha avuti 3;
- tra i maschi c'è un successo riproduttivo molto variabile, alcuni di loro si accoppiano tantissime volte, altri una o due volte se non addirittura zero.

Gli ornamenti non devono essere per forza morfologici ma possono essere anche comportamentali (es. tipi di canto), essi sono in grado di condizionare, anche in modo notevole, la fisiologia dell'animale (in alcuni animali la selezione sessuale può determinare la presenza di specializzazioni neuromuscolari estreme).

Manachino collodorato (*Manacus vitellinus*)



Specie distribuita nella parte più occidentale della Colombia, da Panama fino alla Costa Rica e vive nella foresta pluviale secondaria.

Il manachino presenta un dimorfismo sessuale sia morfologico(collodorato) che comportamentale.



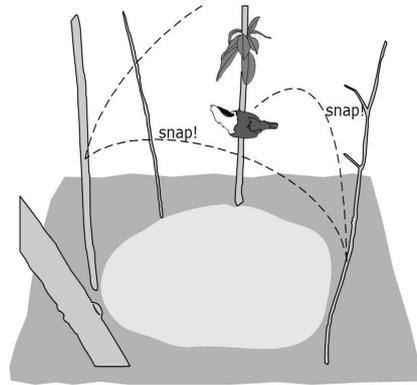
femmina / maschio
giovane



maschio
territoriale

Il comportamento di corteggiamento del manachino consiste nel:

- Giardinaggio: preparazione di un'area detta arena nuziale pulendola da rametti e foglie;
- Esibizione: Jump and snap display, i maschi saltano (jump) da un rametto ad un altro producendo degli schiocchi con le ali (snap) al di sopra dell'arena nuziale.



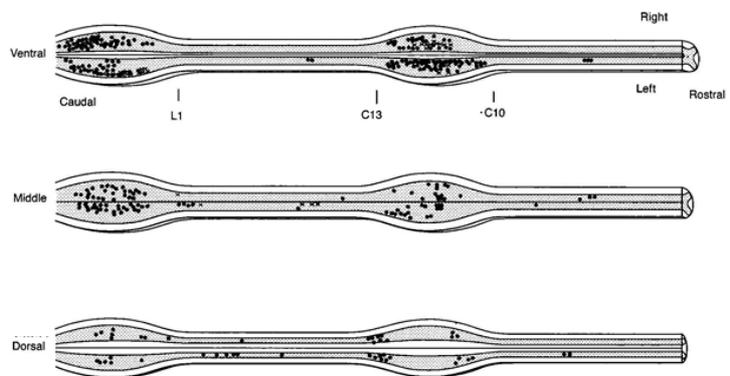
<http://youtu.be/JjTMIjZ43bq> :jump and snap display video.



To show the hypertrophy of some of the superficial dorsal muscles of *Manacus vitellinus*, after stripping off the skin.

Pattern di accumulazione degli steroidi nel midollo spinale

Neurobiology: Schultz and Schlinger

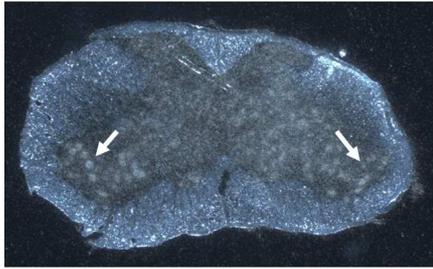


Schultz & Schlinger 1999

Lowe 1942

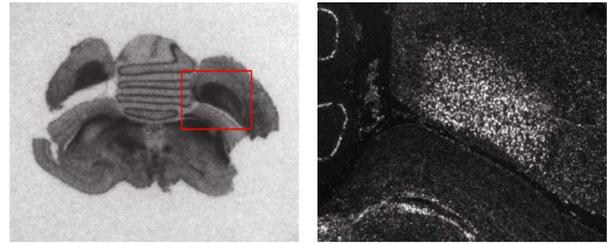
I manachini presentano muscoli ipertrofici al livello dei glutei e sul dorso. La muscolatura è specializzata per effettuare il display di corteggiamento. Schultz e Schilinger nel 1999 scoprirono che il tipo di organizzazione muscolare si estende anche alla parte del sistema nervoso centrale, infatti, i manachini hanno una particolare distribuzione dei recettori per il testosterone nel midollo spinale.

Espressione dei recettori per gli androgeni nel midollo spinale



Fusani et al. in preparazione

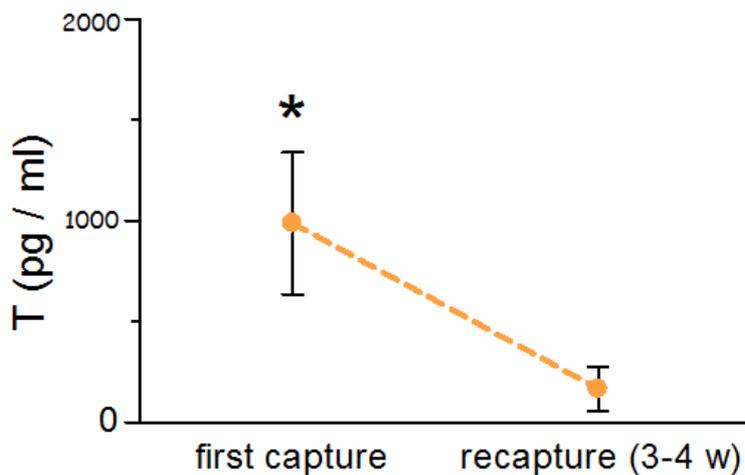
Espressione dei recettori per gli estrogeni nell'arcopallio



Fusani et al. in preparazione

Anche l'encefalo dei manachini mostra una particolare distribuzione per gli androgeni che non si vede in nessun'altra specie di uccelli.

Un primo studio evidenzia che i livelli di testosterone cambiano durante la stagione riproduttiva: nel periodo di fine gennaio inizio febbraio il testosterone è rilasciato in dosi maggiori mentre qualche settimana dopo le concentrazioni circolanti si abbassano.



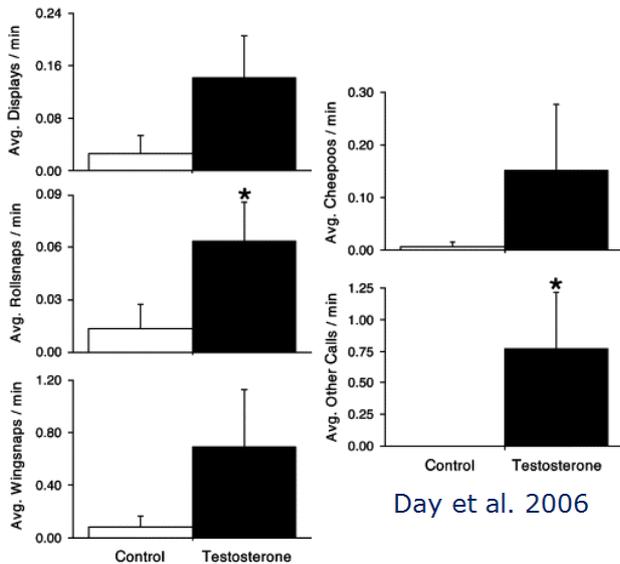
Fusani et al. 2007

Il risultato non era atteso perché, normalmente, in tutte le specie che hanno un comportamento di corteggiamento complesso, i maschi hanno dei livelli di testosterone elevati durante tutto il periodo della riproduzione e non solo all'inizio.

Il testosterone stimola nei maschi il comportamento di corteggiamento e quello sessuale ma ha anche delle conseguenze negative: ad esempio se permane per lunghi periodi a concentrazioni alte può determinare conseguenze a livello del sistema immunitario ed anche a livello comportamentale.

Il display dei manachini dura anche 6-8 mesi e se il testosterone fosse necessario per tutto il tempo a dosi elevate sicuramente avrebbe effetti dannosi sull'organismo. L'ipotesi fu che nei manachini si fosse sviluppato un sistema di controllo da parte dei neuroni per cui non era necessario tenere il testosterone elevato durante tutto il periodo riproduttivo.

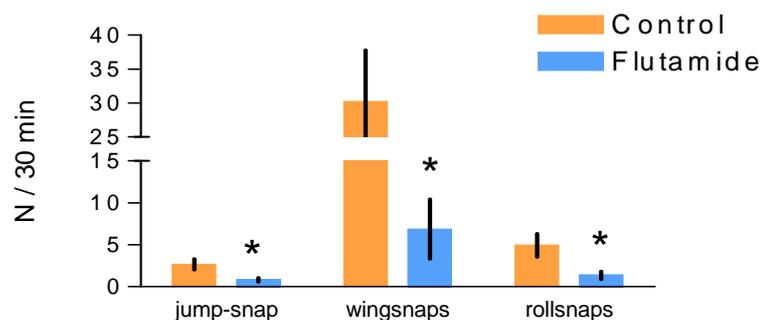
È noto che il testosterone è in grado di determinare attività di corteggiamento al di fuori della stagione riproduttiva.



Agli animali a cui viene somministrato testosterone al di fuori della stagione riproduttiva, aumenta in modo significativo il comportamento di corteggiamento, in tutti i suoi aspetti.

Day et al. 2006

Se invece viene bloccata l'azione del testosterone grazie ad un pellet sottocutaneo che rilascia flutamide (antagonista del testosterone), si ha una riduzione del parametro corteggiamento.



Fusani et al. 2007

Si voleva capire come mai le caratteristiche fisiologiche del manachino si fossero evolute, se davvero la selezione sessuale era responsabile e quindi quali degli ornamenti del maschio, la femmina scegliesse per decidere con chi accoppiarsi.

Osservando i diversi aspetti del corteggiamento si cerca di metterli in relazione con il successo riproduttivo dell'esemplare:

Aspetti del corteggiamento correlati con il successo riproduttivo

Brillantezza del piumaggio	+	Stein & Uy 2005
Centralita' dell'arena nel lek	+	Shorey 2000
Caratteristiche dell'arena	+	Stein & Uy 2005
Attivita' di corteggiamento	-	Shorey 2000
Struttura del corteggiamento	?	

I + indicano una correlazione i - non la indicano.

La riproduzione è quindi favorita dalla brillantezza del piumaggio, dalla centralità dell'arena nel lek e dalla pulizia dell'arena, ma sembra non essere influenzata dall'attività del corteggiamento.

Lo studio del comportamento del manachino è stato possibile grazie a una videocamera ad alta velocità (registra dalle 120 alle 10000 immagini al secondo contro le 25 registrate da una videocamera standard).

La utilizzo di questo strumento era necessario per visualizzare in modo chiaro in sequenza le azioni compiute dal maschio durante il display jump and snap.

<http://youtu.be/TovUXqEMHSU> :video rallentato 5x



Nel video rallentato è possibile notare che l'uccello compie delle azioni in serie:

- Salta da un ramo,
- Esegue lo snap,
- Plana assumendo forma affusolata,
- Apre le ali in vista dell'atterraggio,
- Atterra su un ramo,
- Assume la posizione beard-up (mostra la barbetta alla femmina).

Un primo studio evidenzia il fatto che i maschi non sono tutti uguali, condizione necessaria alla selezione sessuale che premia solo alcuni individui in base alle loro caratteristiche.

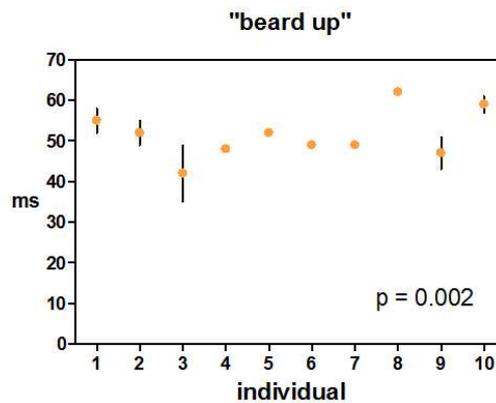
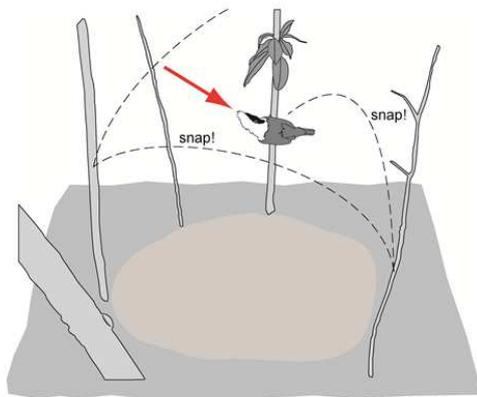
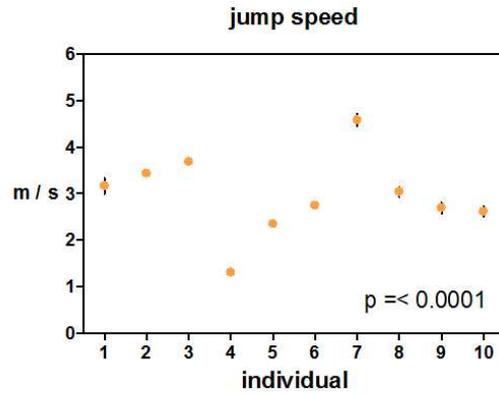
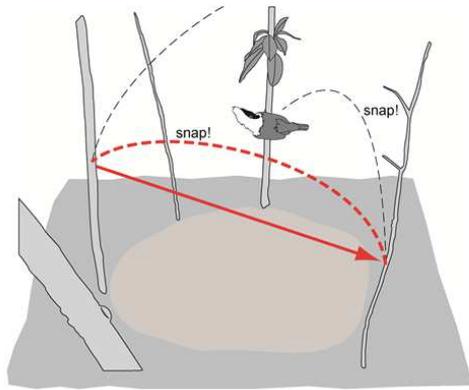
Se non c'è variabilità è difficile pensare che ci sia una scelta, le differenze devono anche essere ripetibili perché si possa parlare di vera e propria selezione.

Esistono due teorie che giustificano la scelta in base ai caratteri sessuali secondari (morfologia e/o comportamento):

- Teoria dei buoni geni: i maschi che mostrano le caratteristiche scelte dalla femmina sono maschi che hanno delle qualità genetiche migliori, gli ornamenti indicano quindi dei buoni geni che saranno ereditati dai figli.
- Teoria run away: tradotta come ricerca insensata, le femmine scelgono semplicemente il maschio più bello e quindi i figli saranno più belli e avranno maggior successo riproduttivo.

Le teorie si basano sulla presenza di caratteri ereditabili.

Differenze individuali nell'esecuzione del display



Fusani et al. 2007b

Furono studiati una decina di manachini maschi per registrarne, in primo luogo, la velocità del salto e successivamente la velocità di beard-up.

Nel primo grafico sono mostrate le diverse velocità di salto dei 10 esemplari, è notevole il fatto che gli errori standard sono molto piccoli e ciò indica che i valori sono estremamente ripetibili in ogni animale.

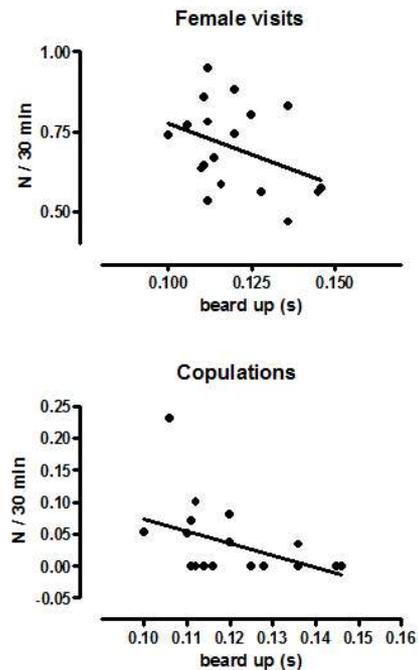
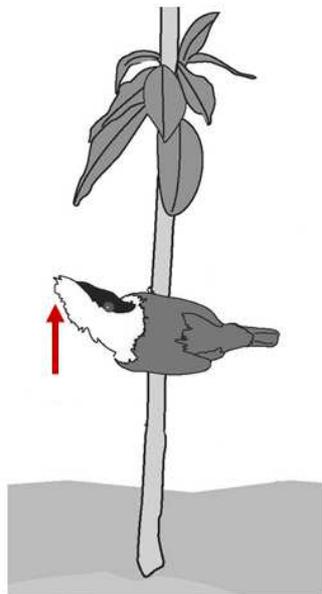
Un'animale è identificato da una precisa velocità di salto.

La stessa cosa si ritrova nel secondo grafico.

Entrambi i parametri potrebbero quindi essere utilizzati dalla femmina come criterio di scelta.

La fase successiva del progetto consisteva nel capire su che caratteri è basata la scelta della femmina:

La femmine di manachino preferiscono i maschi che si mettono in posa più rapidamente dopo ogni salto



Il numero di femmine che visitano il maschio e il numero di copulazioni sono relazionate alla velocità di beard-up: più i maschi sono rapidi nel mettersi in posa, maggiore è il numero di femmine che gli fanno visita e con cui avviene la copula.

Queste sono tutte indicazioni che gli aspetti di corteggiamento sono influenti sul modo in cui la femmina sceglie il proprio partner, insieme agli altri aspetti come la centralità dell'arena, la brillantezza del piumaggio ecc...

Grazie a queste evidenze si può pensare che lo sviluppo delle specializzazioni neuromuscolari nel manachino siano conseguenze della selezione sessuale e non di quella naturale.

Questi studi sarebbero stati estremamente difficili da effettuare in laboratorio in quanto il contesto sociale è piuttosto complesso come anche il contesto ambientale (la riproduzione di un tratto di foresta pluviale secondaria non è facile).

Spesso le informazioni raccolte a livello fisiologico o molecolare sono interessanti se viste in una prospettiva più ampia. Le scoperte effettuate in un qualsiasi livello di studio devono essere riportate al sistema nel suo complesso per avere un quadro completo delle informazioni.