

Obiettivi dello studio

Nella sindrome dell'X Fragile (FXS), la perdita del gene FMR1 è associata a sintomi autistici quali mancanza di comunicazione interpersonale e interazione sociale. L'Ossitocina (OXT) è un neuropeptide di estrema rilevanza nello sviluppo del cervello ed è coinvolto nelle relazioni interpersonali. OXT è prodotta nell'ipotalamo in risposta a diversi stimoli, inclusi il tatto e l'interazione sociale. Nonostante un importante lavoro abbia dimostrato che la perdita di OXT è un evento chiave nelle alterazioni neuronali coinvolte nella FXS (Tyzio et al. *Science* 2014), si conosce ancora poco circa il ruolo dell'OXT nei sintomi di interazione sociale in questa patologia. Il presente progetto ha lo scopo di indagare il legame tra la disfunzione del sistema OXT e il comportamento sociale nella FXS.

Nel dettaglio, gli obiettivi dello studio sono:

1. Indagare interazione sociale e comunicazione in un modello murino di FXS (topi FMR1ko) e
2. Misurare le variazioni dei livelli di OXT in relazione a stimoli sociali al fine di valutare possibili alterazioni nel rilascio di questo peptide nel modello FMR1ko.

Attività svolta

Per rispondere a queste domande sperimentali, ho misurato le variazioni di ossitocina in topi FMR1ko e relativi controlli wild type sottoposti a protocolli di interazione sociale.

In collaborazione con Susanna Pietropaolo, responsabile del laboratorio ospitante, ho sottoposto topi FMR1ko e relativi controlli Wt a un test di interazione sociale noto come *direct social interaction* (DSI) test (Oddi et al. *Neuropsychopharmacology* 2015; Lebreton et al. *PlosOne* 2015). Questa procedura, che consiste nell'esporre un topo sperimentale maschio a un topo stimolo femmina, misura la tendenza dell'animale sperimentale a stabilire contatti con un conspecifico e fornisce rilevanti informazioni su eventuali comportamenti autistici. Diversi parametri comportamentali riscontrati nel corso del protocollo comportamentale sono utilizzati come indici di interazione sociale e/o comunicazione. Le variabili

comportamentali misurate sono state: 1) il tempo speso in interazione sociale (che comprende diversi fenotipi comportamentali tipici, quali annusi, contatti, aggressioni, interazioni sessuali) e 2) le vocalizzazioni ultrasoniche registrate attraverso l'uso di adeguate apparecchiature.

Il comportamento degli animali sottoposti a DSI è stato video-registrato e quindi analizzato per identificare pattern comportamentali indicativi di anomalie tipiche dello spettro autistico. Analogamente, una dettagliata analisi dello spettrogramma di ultrasuoni emessi durante l'interazione è stato condotto per identificare eventuali parametri vocali tipici degli animali FMR1ko.

Al termine degli esperimenti comportamentali gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione o dislocazione cervicale al fine di prelevare campioni cerebrali da utilizzare rispettivamente in esperimenti di immunofluorescenza e genomica. Un gruppo indipendente di animali non sottoposti a test comportamentali (home cage) sono stati prelevati in parallelo al fine di misurare le variazioni di OXT associate a DSI.

Risultati ottenuti

Per indagare se topi FMR1ko mostrano deficit di interazione sociale, abbiamo condotto il test di DSI maschio-femmina e misurato le vocalizzazioni ultrasoniche oltre a una serie di comportamenti di interazione sociale che comprendono sniffing (annusare il conspecifico sul muso o nella zona ano-genitale), contatto, grooming (pulizia del corpo) e mounting (tentativo di monta).

Sebbene durante i primi minuti del DSI test topi FMR1ko hanno speso un tempo leggermente maggiore nel comportamento di ano-genital sniffing, tale comportamento è drasticamente ridotto rispetto ai controlli non mutanti (wild type) nelle fasi finali del test ($p < 0.05$). Questo dato indica una perdita di interesse da parte di topi FMR1ko nei confronti del conspecifico. Non sono state riscontrate differenze significative negli altri parametri indagati, quali nose-to-nose sniffing, mounting, grooming o contatti.

Inoltre, durante i sei minuti di interazione, non abbiamo riscontrato

differenze in termini di numero, frequenza, ampiezza o durata delle vocalizzazioni ultrasoniche emesse dai topi FMR1ko rispetto ai controlli Wild type. Ulteriori analisi attualmente in corso sono volte ad indagare eventuali differenze nel tipo di vocalizzazioni emesse o la loro correlazione con il comportamento di ano-genital sniffing.

L'analisi di immunofluorescenza condotta su campioni cerebrali di animali sottoposti a DSI e relativi controlli home cage ha mostrato i seguenti risultati: 1) una discreta proporzione di neuroni OXT è risultata positiva all'espressione del marcatore di attivazione neuronale cFos nel paraventricular ipotalamus e supraoptic nucleus, due regioni chiave nella produzione di OXT. 2) il numero di neuroni OXT che esprimono attivazione cFos aumenta significativamente a seguito di DSI rispetto ai controlli home cage ($p < 0.05$) e questo aumento è più marcato nei controlli wild type rispetto ai topi FMR1ko. Nel complesso, questi dati indicano che l'esposizione al test di DSI è sufficiente ad attivare i neuroni OXT, e che questa attivazione è ridotta nel modello di FXS. Inoltre, abbiamo riscontrato 3) l'attivazione di fibre OXT nella corteccia somatosensoriale di animali sottoposti a DSI, ad indicare il rilascio del peptide in una regione deputata al controllo delle stimolazioni sensoriali.

Sono attualmente in corso analisi mediante rtPCR per valutare l'espressione del gene dell'OXT in paraventricular ipotalamus e supraoptic nucleus e del suo recettore OXTr nella corteccia somatosensoriale.

Direzioni future

Lo scopo finale di questo progetto è indagare un possibile feedback negativo attraverso cui la perdita di OXT causa un ridotto comportamento di interazione sociale, che a sua volta ha un impatto sull'espressione e il rilascio dell'OXT (effetto priming). Nel complesso, I nostril studi possono fornire informazioni rilevanti per approcci terapeutici basati sulla somministrazione di OXT nel FXS o nelle relate sindromi autistiche.