

TRATTAMENTO PERINATALE CON UN AGONISTA SEROTONINERGICO E CAPACITÀ DI APPRENDIMENTO NEL RATTO ADOLESCENTE: INTERAZIONE CON UN'APRECOCE MANIPOLAZIONE POSTNATALE

GASPARE CANNIZZARO - ROBERTA ANTONA

Università degli Studi di Palermo - Dipartimento di Scienze Farmacologiche

[Perinatal treatment with a serotonin agonist and learning performance in adolescent rat: interaction with early postnatal handling]

RIASSUNTO

Modificazioni ambientali durante le prime fasi della vita possono influenzare lo sviluppo cerebrale e modificare le capacità cognitive della progenie. Mediante i suoi sotto-recettori 5-HT_{1A}, la serotonina ha un ruolo importante nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione. In particolare, una riduzione della risposta dei recettori 5-HT_{1A} migliora nel ratto le capacità cognitive. Il trattamento perinatale con 5-metossitriptamina (5-MT), un agonista serotoninergico non selettivo, e la manipolazione precoce postnatale riducono il numero di recettori 5-HT_{1A} nel ratto neonato e pre-pubere. Pertanto, scopo di questa ricerca è stato quello di studiare in ratti maschi adolescenti gli effetti del trattamento perinatale con 5-MT e la sua interazione con una precoce manipolazione postnatale sulle capacità cognitive della prole mediante il "Can test", un modello comportamentale motivato basato su stimoli tattili, visivi e spaziali non aversativi. I risultati ottenuti dimostrano che una singola iniezione giornaliera di 5-MT dal 12° al 21° giorno di gestazione alla madre (1 mg/kg, s. c.) e dal 2° al 18° giorno di vita ai piccoli (0,5 mg/kg s. c.) aumenta il livello di attività locomotoria, il numero di risposte corrette, e riduce gli errori della memoria di riferimento, rispetto ai ratti trattati durante il periodo perinatale con il veicolo. Effetti simili sono osservati in seguito alla manipolazione della progenie dal 2° al 21° giorno di vita. L'interazione tra 5-MT perinatale e manipolazione postnatale induce un significativo aumento degli effetti della manipolazione. Questi risultati suggeriscono che nella prole adolescente di ratto il trattamento perinatale con 5-MT aumenta la "performance" di apprendimento, probabilmente in seguito alla riduzione dei sotto-recettori 5-HT_{1A} nelle aree cerebrali che controllano le funzioni cognitive. Se gli effetti positivi dell'interazione tra 5-MT e manipolazione siano da attribuirsi ad un ulteriore "smorzamento" della risposta dei recettori 5-HT_{1A} è da stabilire, tuttavia i nostri risultati dimostrano che la combinazione tra 5-MT perinatale e manipolazione neonatale è in grado di indurre effetti sinergici persistenti sulle capacità di apprendimento nel ratto adolescente.

Parole chiave: Trattamento perinatale con 5-MT, manipolazione neonatale, apprendimento, ratto adolescente

SUMMARY

Environmental modifications during early stages of life can influence brain development and determine modifications in cognitive functions in offspring. Serotonin system plays an important role in learning and memory function by the 5-HT_{1A} subreceptors. In particular, a reduction of the 5-HT_{1A} response enhances learning and memory performance in rats. Perinatal treatment with 5-methoxytryptamine (5-MT), a non selective serotonergic agonist and early handling, reduces the number of 5-HT_{1A} receptors in neonatal and pre-pubertal rat progeny. Therefore, the aim of this study was to investigate in adolescent male rats the consequences of perinatal treatment with 5-MT and its interaction with early postnatal handling on learning performance in the "Can test", a motivated, non-aversive, spatial and tactile/visual task. Results show that a single daily injection of 5-MT from gestational day 12 to 21 (1mg/kg s.c.) and from postnatal day 2 to 18 to pups (0.5 mg/kg s.c.), increases the level of locomotor activity and the number of correct responses, and decreases the number of reference memory errors, compared to vehicle-treated rats. Similar effects are observed following to early, brief maternal separation of the progeny from postnatal day 2 until 21. The interaction between 5-MT and neonatal handling induces a significant increase in the effects of neonatal handling. These results suggest that in adolescent rat offspring, perinatal treatment with 5-MT enhances learning performance in the "Can test", probably due to a reduction of 5-HT_{1A} receptors in areas known to be of importance for cognitive function. Whether the positive effects of the interaction of perinatal 5-MT and neonatal handling could be related to a further damping of the 5-HT_{1A} receptor response is not yet addressed, but our data demonstrate that the combination of perinatal 5-MT and neonatal handling is able to induce long-term synergistic effects on learning ability in the adolescent rat offspring.

Key word: Perinatal 5-MT, neonatal handling, learning performance, adolescent rat

Introduzione

La serotonina nei mammiferi esercita la sua influenza su numerosi processi fisiologici e comportamentali. In particolare, la serotonina controlla

i processi cognitivi attraverso i sotto-recettori 5-HT_{1A}, il cui numero è particolarmente elevato nell'ippocampo, la principale struttura coinvolta nei processi di apprendimento e memorizzazione^(1,2).

Diverse ricerche hanno dimostrato che una riduzione della risposta dei sotto-recettori 5-HT_{1A} migliora le capacità cognitive, mentre un aumento ha effetti opposti^(5,10,16). Manipolazioni farmacologiche dei recettori serotoninergici durante l'embriogenesi cerebrale modificano il numero e l'attività funzionale dei recettori serotoninergici⁽¹⁵⁾.

Il composto più usato per studiare nel ratto la funzionalità dei recettori serotoninergici 5-HT_{1A} durante lo sviluppo ontogenetico cerebrale è la 5-metossitriptamina (5-MT), un agonista dei recettori 5-HT_{1A}/5-HT₂. Questa molecola, somministrata durante il periodo perinatale, riduce nel ratto il numero dei recettori 5-HT_{1A}^(9, 12, 13) e questo effetto si associa a precoci modificazioni comportamentali, tra cui una ipersensibilità delle funzioni motorie e sensoriali^(14,15).

Diversi studi indicano che le cure parentali durante i primi periodi di vita hanno un ruolo importante nel controllo del comportamento emozionale e delle capacità cognitive dell'individuo^(7,11,13). In particolare, nel ratto una maggiore attenzione materna riduce l'emozionalità ed aumenta la "performance" di apprendimento nella prole, e questi effetti si accompagnano ad una riduzione dei recettori 5-HT_{1A} nell'ippocampo^(9,12, 13).

Sulla base di queste osservazioni, ci siamo proposti di studiare nel ratto adolescente:

- gli effetti del trattamento perinatale con 5-MT sulle capacità di apprendimento, mediante un modello sperimentale di tipo operante, il "Can test", che impiega stimoli non avversativi di tipo spaziale, tattile, visivo;
- se il trattamento perinatale con 5-MT influenza gli effetti della manipolazione neonatale sulla "performance" di apprendimento.

Materiali e metodi

Coppie di femmine primipare di ceppo Wistar (Harlan, Italia) dell'età di 120 giorni sono state accoppiate con un maschio dell'età di 150 giorni. Tutte le nidiate sono state ridotte ad 8 soggetti, metà maschi e metà femmine, ed assegnate in maniera randomizzata ai diversi gruppi sperimentali.

Dopo la nascita ed al termine dello svezzamento (24° giorno di vita) non sono state osservate variazioni nella mortalità e nella crescita ponderale della prole. Al 42° giorno di vita i ratti maschi sono stati sottoposti al "Can test".

Gli esperimenti sono stati condotti in una camera silente, tra le ore 09:00 e 14:00, video registrati ed esaminati da uno sperimentatore non a conoscenza del tipo di trattamento a cui erano sottoposti gli animali.

Trattamento farmacologico

Le ratte, dal 12° al 21° giorno di gestazione, erano trattate s.c. con veicolo o 5-MT (1 mg/kg, Sigma-Aldrich, Italia). Dal 2° al 18° giorno d'età i rattini ricevevano s.c. veicolo o 5-MT (0,5 mg/kg).

Manipolazione neonatale

Metà dei neonati trattati con veicolo e metà di quelli trattati con 5-MT dal 2° al 21° giorno di vita erano separati dalla madre e posti per 15 minuti, ad una temperatura ambientale di 30°-32°C, dentro bicchierini di plastica contenenti segatura. Quindi, i rattini venivano trattati con il veicolo o la 5-MT e riuniti alla madre. La procedura veniva eseguita sempre nella stessa stanza, dallo stesso sperimentatore ed alla stessa ora (10:00 – 11:00 h).

"Can test"

Gli animali venivano posti in un compartimento di Plexiglas (100 cm x 100 cm x 43 cm) dentro il quale erano collocate sette lattine capovolte, dipinte di bianco; una delle lattine era avvolta con nastro adesivo bianco. Le lattine erano poste sopra un rialzo a semicerchio, che elevava il loro margine superiore all'altezza di 14 cm.

Il protocollo sperimentale consisteva di un periodo di addestramento e di un successivo periodo di apprendimento durante i quali i ratti, assetati da 23 ore, imparavano a riconoscere la lattina avvolta con nastro adesivo contenente l'acqua. Alla fine di ciascuna sessione i ratti potevano bere liberamente per 20 minuti.

Addestramento

La fase di addestramento durava due giorni. Il primo giorno i ratti venivano posti per 20 minuti nel compartimento contenente le 7 lattine, il cui fondo era riempito con 0,3 ml d'acqua. I ratti avevano a disposizione 20 minuti per esplorare l'arena e bere dalle lattine. Il giorno successivo, gli animali erano riposti nel compartimento; l'acqua era presente soltanto nella lattina centrale ed in altre due lattine scelte a caso. I ratti avevano a disposizione 10 minuti per visitare l'arena e bere. La prova veniva ripetuta dopo un intervallo di 15 s.

Apprendimento

La fase di apprendimento, della durata di 4 giorni, iniziava il giorno successivo alla fase di addestramento. Ciascuna sessione giornaliera consisteva di 10 prove, ciascuna della durata massima di 3 minuti, separate da un intervallo di 10 s; i ratti che bevevano durante la prova erano subito rimossi dal compartimento per 10 s. Tutti gli animali visitavano almeno 7 lattine durante le 10 prove di ciascuna sessione (attività locomotoria). Le risposte erano definite "corrette" se l'animale visitava per prima la lattina contenente l'acqua. Ogni prima visita ad una lattina priva di acqua veniva definita errore di memoria di riferimento.

Farmaci

La 5-MT era sciolta in soluzione fisiologica e somministrata in un volume di 2 ml/kg di peso corporeo.

Statistica

I dati sono stati analizzati mediante un Modello Lineare Generale di analisi per misure ripetute. Se l'analisi mostrava significative differenze tra i gruppi, veniva impiegato il test t di Student a due code per dati accoppiati con la correzione di Bonferroni ($\alpha = 0,001$) come analisi post hoc.

Risultati

La fig. 1 mostra la "performance" di apprendimento dei ratti trattati in periodo perinatale con veicolo. Come è possibile osservare, gli animali erano motivati a visitare in media una lattina 8 volte su 10 disponibili prove per sessione, mostrando pertanto un livello di attività locomotoria costantemente elevato nelle 4 sessioni. Durante la fase di apprendimento i ratti gradualmente miglioravano la loro capacità di riconoscere la lattina contenente l'acqua e riducevano gli errori di memoria di riferimento, mostrando pertanto un buon adattamento allo schema presentato.

Il trattamento perinatale con 5-MT ha indotto una maggiore attività locomotoria, un più alto numero di risposte corrette ed un minor numero di errori di memoria di riferimento, rispetto agli animali che ricevevano la soluzione veicolo.

Risultati simili sono stati osservati nei ratti che erano manipolati durante il periodo postnatale.

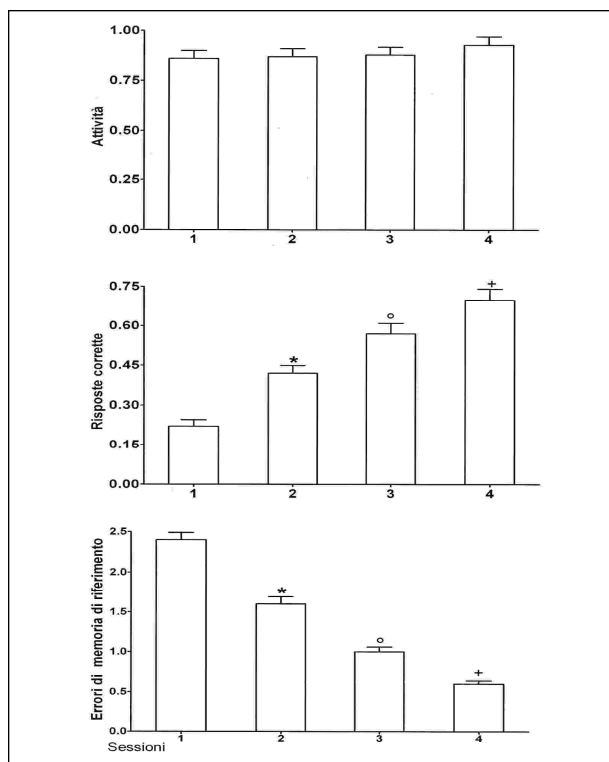


Fig. 1: Effetti del trattamento perinatale con veicolo nei ratti non manipolati sull'attività, il numero di risposte corrette ed il numero di errori di memoria di riferimento. Ogni valore rappresenta la media \pm D.S. N = 8. * = $P < 0,05$ vs. prima sessione; ^o = $P < 0,05$ vs. seconda sessione; + = $P < 0,05$ vs. terza sessione.

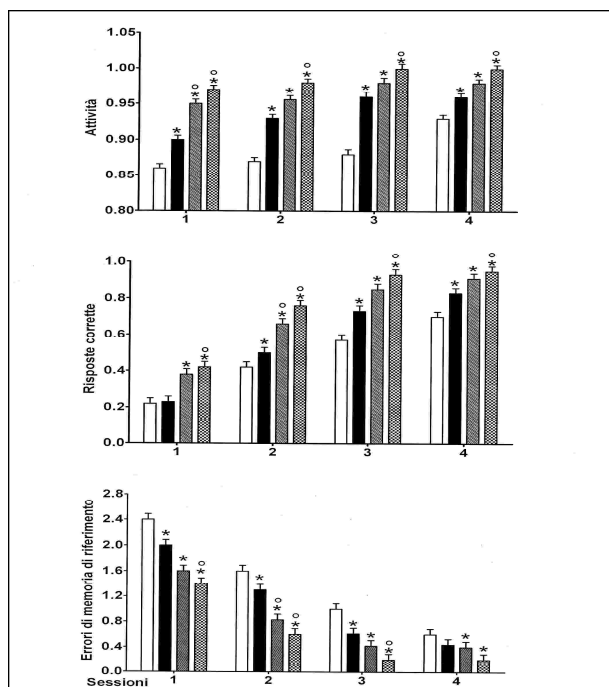


Fig. 2: Effetti del trattamento perinatale con 5-MT o veicolo, della manipolazione postnatale e della combinazione tra trattamento perinatale con 5-MT o veicolo e manipolazione postnatale sull'attività, il numero di risposte corrette ed il numero di errori di memoria di riferimento. Ogni valore rappresenta la media \pm D.S. N = 8. □ veicolo perinatale /non manipolati, ■ veicolo perinatale/ manipolati, ▨ 5-MT perinatale/non manipolati, ▩ 5-MT perinatale/manipolati. * = $P < 0,05$ vs. veicolo perinatale/non manipolati; ^o = $P < 0,05$ vs. veicolo perinatale/manipolati.

La combinazione del trattamento perinatale con 5-MT e della manipolazione postnatale ha ulteriormente accentuato, durante tutte le 4 sessioni, il livello di attività locomotoria ed il numero di risposte corrette e ridotto gli errori di memoria di riferimento, rispetto agli animali che avevano subito soltanto la manipolazione postnatale (Fig. 2).

Discussione

Questa ricerca ha indagato sulle conseguenze del trattamento perinatale con 5-MT e la sua interazione con una giornaliera, breve e ripetuta separazione materna sulla performance di apprendimento nel ratto maschio adolescente, valutata mediante un modello sperimentale di comportamento motivato di tipo operante, il "Can test", nel quale l'animale è sottoposto a stimoli spaziali, visuali e tattili non avversativi.

I risultati ottenuti indicano che l'esposizione perinatale alla 5-MT aumenta la "performance" di apprendimento nella progenie. Gli effetti sinergici della combinazione del trattamento perinatale con 5-MT e della manipolazione postnatale, inoltre, suggeriscono che la 5-MT accentua gli effetti positivi nel "Can test" della manipolazione neonatale sulla "performance" di apprendimento.

Numerose ricerche hanno dimostrato che nel ratto la somministrazione di basse dosi di farmaci agonisti dei sotto-recettori 5-HT1A o la loro infusione nel nucleo serotoninergico mediale del rafe, riducono la trasmissione serotoninergica nell'ippocampo e questo effetto si accompagna ad un aumento della capacità di apprendimento; risultati simili sono stati ottenuti dopo somministrazione sistemica di antagonisti dei recettori postsinaptici 5-HT1A, che riducono anch'essi la trasmissione serotoninergica.

E' noto che la serotonina esercita un effetto modulatore sui processi cognitivi attraverso la sua interazione con il sistema colinergico. In accordo con questa osservazione una riduzione della risposta dei recettori 5-HT1A previene il deficit cognitivo indotto dal blocco dei recettori colinergici muscarinici^(5, 16).

Nel ratto, la serotonina ha un ruolo fondamentale nel favorire la maturazione delle sue cellule bersaglio, ancor prima che essa assuma il ruolo di neuro-trasmittitore nel cervello maturo.

Tra i recettori serotoninergici espressi durante il periodo embrionale vi è il recettore 5-HT1A; l'espressione di tale recettore inizia durante le fasi iniziali di sviluppo del cervello, ippocampo e strutture para-ippocampali incluse, e si protrae nel periodo postnatale. Inoltre, i recettori 5-HT1A presenti nel cervello embrionale sono pienamente attivi, ed una loro eccessiva stimolazione, indotta dall'agonista serotoninergico 5-MT, riduce nel ratto neonato la loro espressione^(9,14).

Pertanto, alla luce di queste osservazioni, gli effetti facilitanti sulla "performance" apprendimento del ratto adolescente indotti dal trattamento perinatale con 5-MT osservati in questo studio sono verosimilmente la conseguenza di una riduzione della risposta dei sotto-recettori 5-HT1A nell'ippocampo e nelle strutture para-ippocampali. La minore risposta dei recettori 5-HT1A, facilitando la trasmissione colinergica, potenzierebbe i processi di integrazione sensoriale e di attenzione selettiva dell'animale^(6,7).

Diversi studi hanno dimostrato che una precoce manipolazione indotta da una breve, giornaliera separazione dalla madre durante le prime tre settimane di vita migliora le capacità di apprendimento della prole in diversi test comportamentali. In accordo con precedenti lavori^(3,4), i ratti manipolati precocemente durante il periodo postnatale hanno mostrato, rispetto ai non manipolati, un più elevato livello di attività locomotoria, un maggior numero di risposte corrette ed un minor numero di errori di memoria di riferimento, confermando così gli effetti di "arricchimento" della manipolazione neonatale anche nel nostro modello sperimentale che usa stimoli visivi, tattili e spaziali non avversativi⁽⁴⁾. Gli effetti della precoce manipolazione sui tre diversi parametri da noi studiati appaiono più intensi nei ratti trattati in periodo perinatale con la 5-MT che in quelli trattati con il veicolo.

Le attenzioni materne rappresentano il più importante fattore di regolazione dello sviluppo dei sistemi neurali che controllano le risposte neuro-endocrine, emozionali e cognitive allo stress, e sono il legame principale tra l'ambiente e l'individuo durante i primi periodi di vita post-natale. In particolare, una maggiore attenzione della madre, indotta da brevi periodi di separazione, durante l'allattamento, attenua le risposte emozionali ed aumenta i processi cognitivi nella prole di ratto.

Questi effetti si accompagnano ad una riduzione del numero dei sottorecettori serotoninergici 5-HT1A ippocampali e para-ippocampali^(11,12,13).

Pertanto, i risultati da noi ottenuti in questo studio suggeriscono che gli effetti sinergici indotti dalla combinazione del trattamento perinatale con 5-MT e della precoce manipolazione sulla "performance" di apprendimento della prole di ratto nel "Can test" dipendono verosimilmente dalla loro intrinseca proprietà di ulteriormente smorzare la risposta funzionale dei sotto-recettori 5-HT_{1A} ed indirettamente facilitare la trasmissione colinergica, potenziando così i processi di integrazione sensoriale e di attenzione selettiva dell'animale.

Bibliografia

- 1) Altman HJ, Normile HJ. *What is the nature of the role of the serotonergic nervous system in learning and memory? Prospects for development of an effective treatment strategy for senile dementia.* Neurobiol Aging 1988, 9, 627.
- 2) Barnes NM, Sharp T. *A review of central 5-HT receptors and their function.* Neuropharmacology 1999, 38, 1083.
- 3) Cannizzaro E, Martire M, Gagliano M, Plescia F, La Barbera M, Mantia G, Mineo E, Cannizzaro G, Cannizzaro C. *Reversal of prenatal diazepam-induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats.* Behav Brain Res 2005, 161, 320.
- 4) Cannizzaro, C., Plescia, F., Martire, M., Gagliano, M., Cannizzaro, G., Mantia, G., Cannizzaro, E., 2006. *Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: Interaction with a brief, daily maternal separation.* Behav. Brain Res. 169, 128-136.
- 5) Carli M, Bonalumi P, Samanin R. *WAY 100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal administration of scopolamine or 7-chloro-kynurenic acid.* Brain Res, 1997, 774, 167.
- 6) Cassel JC, Jeltsch H. *Serotonergic modulations of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications.* Neuroscience 1995, 69, 1.
- 7) Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. *Effects of pre and postnatal stimulation on developmental, emotional and cognitive aspects of rodents: a review.* Dev Psychobiol 2002, 41, 373.
- 8) Decker MW, McGaugh JL. *The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory.* Synapse 1991, 7, 151.
- 9) Lauder JM, Liu J, Grayson DR. *In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT(1A) receptor transcripts: A quantitative RT-PCR study.* Int J Dev Neurosci 2000, 18, 171.
- 10) Luttgen M, Elvander E, Madjid N, Ogren SO. *Analysis of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the rat.* Neuropsychopharmacology 2005, 48, 830.
- 11) Sotherman WP, Bell RW. *Maternal mediation of early experience.* In: Bell RW, Sotherman WP. (Eds), *Maternal influence and early behaviour*, Spectrum, New York, 1980, 445.
- 12) Stamatakis A, Mantelas A, Papaioannou A, Pondiki S, Fameli M, Stylianopoulou F. *Effect of neonatal handling on serotonin 1A sub-type receptors in the rat hippocampus.* Neuroscience 2006, 240, 1.
- 13) Vallèe M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W. *Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance.* Eur J Neurosci 1999, 11, 2906.
- 14) Whitaker-Azmitia PM. *Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases.* Brain Res Bull 2001, 56, 479.
- 15) Whitaker-Azmitia PM. *Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: A role in autism?* Int J Dev Neurosci 2005, 23, 75.
- 16) Winsauer PJ, Rodriguez FH, Cha AE, Moerschbaecher JM. *Full and partial 5-HT_{1A} receptor agonists disrupt learning and performance in rats.* J Pharmacol Exp Ther 1999, 288, 335.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Sig. Francesco Beninati per l'eccellente assistenza tecnica

Request reprints from:

Prof. GASPARE CANNIZZARO
Via A. De Gasperi, 90
90100 Palermo
(Italy)