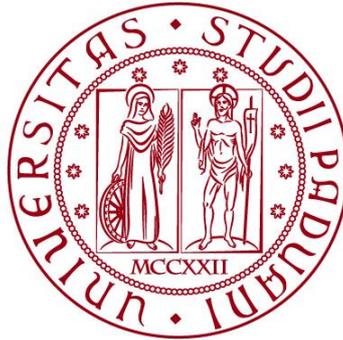


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Nutrirsi o corteggiare: la gerarchia di scelta dei comportamenti vitali e i  
rispettivi meccanismi neuronali**

**Tutor: Prof. Mauro Agostino Zordan  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Irene Zanovello**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Risultati</b>	<b>6</b>
2.1	La fame come priorità . . . . .	6
2.1.1	La scelta di <i>Drosophila</i> e i meccanismi molecolari . . .	6
2.1.2	Il "potere" della fame nel topo: promuove l'esplorazione e la memorizzazione, inibisce la paura e l'interazione sociale . . . . .	8
2.2	L'impatto del contesto esterno, della dieta, e dello stato interno	11
2.2.1	Livello di fame, desiderio sessuale, tipologia di alimento	11
2.2.2	Il comportamento di intrusi maschi e femmine e l'impatto della fame su di essi . . . . .	13
2.3	Alimentazione e fuga: gerarchia di priorità . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Discussione</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>19</b>
4.1	Esperimenti su <i>Drosophila</i> . . . . .	19
4.1.1	Soggetti . . . . .	19
4.1.2	Procedimento . . . . .	19
4.1.3	FlyPAD . . . . .	20
4.1.4	GAL4/UAS . . . . .	20
4.2	Esperimenti sui topi . . . . .	21
4.2.1	Soggetti . . . . .	21
4.2.2	Iniezione di virus Cre-dipendenti codificanti GFP o ChR2 . . . . .	21
4.2.3	Impianto di fibra ottica . . . . .	22
4.2.4	Fotostimolazione . . . . .	22

4.2.5	Protocollo intruso-residente, analisi del comportamen- to degli intrusi maschi e femmine . . . . .	23
4.3	Esperimenti sulle sanguisughe . . . . .	24
4.3.1	Soggetti . . . . .	24
4.3.2	Procedimento . . . . .	24

# 1 Introduzione

Lo psicologo statunitense Abraham Maslow, vissuto negli anni '60 del '900, formulò la teoria della “piramide dei bisogni”. Egli riteneva che i bisogni umani si disponessero a piramide, poiché prima dovevano essere soddisfatti quelli più basilari, primari, e solo poi si poteva “salire” e pensare a soddisfare anche gli altri. Secondo Maslow, i bisogni primari sono quelli fisiologici: fame, sete, sonno, . . . Poi c'è la ricerca di sicurezza e protezione. Seguono il bisogno di amore e di stima, e, infine, quello di autorealizzazione. Qualsiasi minaccia a uno dei bisogni di base farebbe vacillare tutta la piramide, scatenando risposte immediate, dirette a risolvere l'emergenza[3]. Svitati studi sul comportamento hanno confermato questo principio, dimostrando che c'è una gerarchia di priorità, che fa sì che vengano selezionati alcuni comportamenti rispetto ad altri. Infatti, ogni organismo vivente viene continuamente “bombardato” da stimoli esterni, che deve conciliare con il suo stato interno, e deve compiere delle scelte escludendo molte possibilità e prediligendone solo alcune. Uno studio su *Drosophila melanogaster*, ad esempio, ha dimostrato che maschi affamati e privati della possibilità di accoppiarsi per 24h, scelgono come prima cosa di nutrirsi, e poi di riprodursi[10]. È quindi evidente che c'è una gerarchia fra questi due bisogni: viene soddisfatto prima il più urgente, poi l'altro. Ovviamente, ci sono meccanismi neuronali che regolano questa scelta, e studi su *Drosophila*, organismo semplice con solo 100000 neuroni, hanno permesso di comprenderli. In questo caso, la scelta fra nutrirsi e riprodursi è guidata dalla tiramina (neuromodulatore derivato dalla tirosina) che, legandosi ai neuroni TyrR, promuove il senso di sazietà e fa sì che l'animale, dopo essersi nutrito a sufficienza, diriga la sua attenzione sulla femmina. Inoltre, la tiramina attiva i neuroni P1, iniziatori del corteggiamento[10]. Esaminando anche altri casi, sembra che la prioritizzazione della fame sia un meccanismo ubiquitario nel regno animale. Infatti, essa ha effetti sul sonno, interferendo con l'attività dei geni *Clock* e *Cycle*

che regolano i ritmi circadiani[8], e sulla locomozione[2]. Spesso è anche il motore di molteplici comportamenti, come: esplorazione, difesa, competizione, e molti altri. I neuroni localizzati nel nucleo arcuato del cervello dei mammiferi ( $ARC_{AgRP}$ ), sono stati identificati come la causa di questi comportamenti, oltre che della percezione della fame stessa[9]. Ma è sempre così in natura? Viene sempre data priorità alla fame rispetto a tutti gli altri bisogni della piramide? La risposta è: dipende. Come vedremo, il risultato di una scelta dipende da molti fattori, quali: lo stato interno dell'animale, gli stimoli esterni, caratteristiche specie-specifiche, ecc. Infatti, moscerini della frutta affamati si dirigono verso il cibo solo se questo è presente, mentre, in caso contrario, si comportano allo stesso modo di quelli sazi. Inoltre, il livello di fame è determinante, e si può definire un “punto di svolta” in cui nutrirsi diviene più urgente rispetto a riprodursi[10]. Allo stesso modo, anche sui topi, si è visto che un aumento dell'intensità della fame sopprime i comportamenti di interazione sociale, di aggressività, sete e autoconservazione in situazioni di paura, ma solo se la fonte di cibo è presente[9]. In organismi più semplici, come le sanguisughe, non sempre nutrirsi prevale sopprimendo tutti gli altri comportamenti o modificandoli. Le sanguisughe carnivore, se stimolate meccanicamente durante l'atto di nutrirsi, si allontanano dallo stimolo, indipendentemente dal livello di fame. Al contrario, le sanguivore, così come il mollusco marino *Pleurobranchaea*, bloccano ogni risposta agli stimoli meccanosensoriali[5, 6]. Qual è, dunque, la causa di queste differenze? E quali sono i fattori che possono determinare la scelta di un comportamento rispetto ad un altro? Finora ne abbiamo nominati solo alcuni, ma andremo ad approfondire lo studio analizzando diversi casi in natura e cercando di rispondere esaustivamente a queste domande.

## 2 Risultati

### 2.1 La fame come priorità

In questo capitolo esamineremo alcuni studi che mostrano come la fame riesca a surclassare molti altri comportamenti concorrenti, così come ne può essere il motivo. Cominceremo con il riassunto di uno studio fatto su *Drosophila melanogaster*, concentrandoci sui punti focali e sui risultati più importanti. Questo studio è un esempio di una situazione di scelta fra due bisogni della piramide di Maslow[3]: nutrirsi e riprodursi. Vedremo che, in linea con quanto affermato sopra, il moscerino dà priorità a soddisfare il proprio fabbisogno calorico[10]. In seguito, analizzeremo un altro studio che descrive situazioni simili, in cui, da una parte troviamo ugualmente la decisione di nutrirsi, ma dall'altra bisogni contrastanti diversi[9].

#### 2.1.1 La scelta di *Drosophila* e i meccanismi molecolari

Nello studio su *Drosophila* che andiamo ad analizzare, dei giovani maschi, subito dopo la schiusa delle uova, sono stati isolati e mantenuti in fiale con acqua per 24h, senza cibo né possibilità di riprodursi. Trascorso questo tempo, si è voluto testare se, in presenza di una femmina decapitata e vergine (particolarmente attraente per i maschi di *Drosophila*) e 100 mM di saccarosio, sceglieranno prima di nutrirsi o accoppiarsi. Essi sceglievano come prima cosa di saziare la loro fame, per poi, in seguito, rivolgere l'attenzione sulla femmina. Anche cambiando la fonte di zucchero (D-glucosio) e il tipo di femmina (una femmina intatta e mobile) il risultato era lo stesso. Vi era, quindi, una netta supremazia della fame rispetto al desiderio sessuale. Per comprendere i meccanismi molecolari alla base di questa gerarchia, gli scienziati hanno utilizzato il sistema GAL4/UAS per esprimere la TNT (catena leggera della tossina del tetano), la quale blocca la neurotrasmissione sinaptica. Un silenziamento dei neuroni TyrR mediante questa

tecnica, causava l'accoppiamento in maschi affamati, che avrebbero dovuto nutrirsi, mentre una loro attivazione induceva i maschi sazi a mangiare ulteriormente. Dovevano essere questi, dunque, i neuroni interessati, e la tiramina il loro neuromodulatore. Essa viene prodotta a partire dalla tirosina, attraverso la tirosina decarbossilasi (Tdc2), mentre un altro enzima: tiramina  $\beta$ -idrossilasi (T $\beta$ H) la può convertire ulteriormente in octopamina. Per capire il ruolo della tiramina nella scelta tra nutrirsi o accoppiarsi, hanno utilizzato mosche mutate per l'enzima Tdc2, che non producevano tiramina. Esse mostravano una gerarchia di priorità ribaltata, dal momento che, anche se si erano già nutrite, preferivano mangiare invece di corteggiare. Al contrario, aumentando l'espressione di Tdc2, i maschi affamati non percepivano la fame ed erano più propensi a soddisfare il bisogno sessuale. Da questi esperimenti si è arrivati alla conclusione che il neuromodulatore agisce da segnale di sazietà, inibendo i neuroni TyrR quando la *Drosophila* si è nutrita, facendo sì che essa lasci la fonte di cibo per accoppiarsi. In seguito, gli scienziati hanno voluto capire quale dei tre recettori su cui agisce la tiramina fosse quello che mediava l'interazione con i neuroni TyrR. Hanno utilizzato, a questo proposito, mutanti per tutti e tre i recettori: TAR1, TAR2, TAR3, e di questi, solo i mutanti per TAR3 o per TAR2/TAR3 mostravano comportamenti anomali: moscerini che avevano già mangiato, si nutrivano. Un'ulteriore osservazione è stata fatta sui mutanti per l'enzima T $\beta$ H, che permette la conversione da tiramina a octopamina: essi mostravano latenza a nutrirsi nonostante le 24h di assenza di cibo. Quindi, anche l'octopamina ha un ruolo nella promozione dell'alimentazione. La cosa interessante, però, era che, in presenza di una fonte di cibo e di una femmina, questi mutanti avevano comportamenti simili ai wild-type. Perciò, sembra che la tiramina sia l'unica protagonista della scelta iniziale fra nutrirsi o corteggiare. Inoltre, è stato visto che essa non agisce solo sui neuroni TyrR. Studi precedenti, infatti, avevano individuato i neuroni P1 come elementi importanti nell'iniziazione del corteggiamento in *Drosophila*, e la tiramina

ha un'azione anche su di essi. Attivandoli artificialmente si osserva un aumento della preferenza per il corteggiamento ed una riduzione della quantità di cibo consumato, ed è risultato che proprio la tiramina è in grado di attivarli. Anche i neuroni P1, infatti, esprimono TAR3, ed un knockdown del recettore riduce la preferenza per l'accoppiamento nei maschi nutriti. Quindi, la tiramina ha una doppia azione nell'influenzare la scelta iniziale di *Drosophila*: da un lato inibisce i neuroni TyrR spingendo la mosca che si è nutrita verso l'accoppiamento, dall'altro attiva i neuroni P1, promotori del corteggiamento[10]. In conclusione, ricapitolando brevemente questo primo studio, abbiamo constatato che la priorità viene data alla sazietà del bisogno calorico rispetto a quello sessuale, ed abbiamo visto che questa decisione viene finemente regolata a livello neuronale. La sopravvivenza dell'insetto in natura dipende da questi delicati meccanismi, che integrano input ambientali ed interni, e delineano la risposta più conveniente.

### **2.1.2 Il "potere" della fame nel topo: promuove l'esplorazione e la memorizzazione, inibisce la paura e l'interazione sociale**

Similmente a quanto visto in *Drosophila*[10], anche il topo è stato protagonista di uno studio riguardante la scelta fra nutrirsi ed altri comportamenti concorrenti. In questo caso, però, i protagonisti non sono più i neuroni TyrR o P1[10], bensì quelli del peptide correlato all'agouti (AgRP), localizzati nel nucleo arcuato (ARC), che mostrano cambiamenti di attività dipendenti dallo stato di appetito[9]. Per marcare e modulare questi neuroni, gli scienziati hanno iniettato virus Cre-dipendenti codificanti GFP o ChR2 (channelrhodopsin-2) nel nucleo arcuato di topo *Agrp-IRE5-Cre* [7, 11]. I topi sono stati poi divisi in 3 gruppi comportamentali:

- topi fisiologicamente sazi con accesso ad libitum al cibo trasdotti con  $GFP(fed^{GFP})$

- topi fisiologicamente affamati che hanno digiunato per 24 ore trasdotti con  $GFP(fasted^{GFP})$
- topi fisiologicamente sazi con accesso ad libitum al cibo trasdotti con  $ChR2(fed^{ChR2})$

La fotoattivazione di  $ARC_{AgRP}$  (nei  $fed^{ChR2}$ ) promuoveva un'alimentazione paragonabile agli animali a digiuno ( $fasted^{GFP}$ ). Per valutare come l'attività di questi neuroni influisse sull'esplorazione e il comportamento di foraggiamento, è stato utilizzato un apparato a tavola con fori. Prima, il test è stato eseguito con i 16 fori vuoti, poi ripieni di pellet di grano da 20mg.  $Fed^{ChR2}$  e  $fasted^{GFP}$  hanno mostrato una quantità di immersioni esplorative nei pozzi vuoti ed un consumo di pellet di grano nettamente superiore rispetto ai  $fed^{GFP}$ . Quindi, era evidente un accrescimento dell'attività esplorativa e del comportamento di foraggiamento nei topi con i neuroni  $ARC_{AgRP}$  attivati (fisiologicamente o artificialmente). In seguito, si è voluto testare se l'attività di  $ARC_{AgRP}$  fosse coinvolta anche nella memorizzazione della posizione del cibo. Per capirlo, hanno utilizzato un apparato a Y e condizionato i topi ad associare il compenso alimentare ad un determinato braccio. Prima del condizionamento, gli animali mostravano uguale preferenza per i due bracci. Poi sono stati ridotti all'85% del loro peso corporeo per aumentare la motivazione a ottenere il compenso. Infine, tutti i gruppi hanno mostrato un elevato apprendimento del compito. Dopo l'ultimo condizionamento, gli animali sono stati smistati e testati il giorno dopo in condizioni di fotostimolazione. I topi  $fed^{GFP}$  non mostravano preferenza per nessuno dei due bracci in particolare, mentre i  $fed^{ChR2}$  ed i  $fasted^{GFP}$  prediligevano il braccio con il compenso alimentare. In conclusione, era stato dimostrato che l'attività dei neuroni  $ARC_{AgRP}$  si estendeva anche all'apprendimento e al processo decisionale che riguardava l'esplorazione di un ambiente precedentemente associato al cibo. Constatato che questi neuroni, oltre ad essere i "sensori" della fame, promuovono una serie

di comportamenti ed abilità finalizzati al compenso calorico, interessante è capire come siano anche i responsabili dell'attenuazione di comportamenti concorrenti alla fame, come, ad esempio la paura. La paura innata è un meccanismo fondamentale mediante il quale gli organismi eludono il pericolo. Una sostanza chimica volatile: la trimetiltiazolina (TMT), quando viene rilevata dai topi, è in grado di suscitare comportamenti associati alla paura, quali la diminuzione dell'attività locomotoria e del tempo trascorso nella zona di rilevamento. Quando un oggetto non alimentare è stato posizionato in una zona TMT,  $fed^{GFP}$ ,  $fasted^{GFP}$  e  $fed^{ChR2}$  hanno mostrato una forte preferenza per il lato neutro della camera rispetto al lato accoppiato TMT. Tuttavia, la presentazione del cibo nella zona TMT ha aumentato significativamente la presenza dei topi fisiologicamente o artificialmente affamati ( $fasted^{GFP}$  e  $fed^{ChR2}$ ) nella zona stessa[9]. Infine, si può notare una forte somiglianza fra l'atteggiamento dei topi e quello di *Drosophila* nei confronti di una femmina ricettiva. Nel moscerino della frutta avevamo visto che i maschi affamati sceglievano prima di soddisfare il loro fabbisogno calorico e poi di riprodursi[10], nei topi è lo stesso: tutti i gruppi (affamati e non) dimostrano una preferenza per il lato della camera accoppiato ad una femmina ricettiva rispetto a quello accoppiato ad un oggetto.  $Fed^{GFP}$  ha continuato a mostrarla anche in presenza di cibo mentre  $fasted^{GFP}$  e  $fed^{ChR2}$  hanno invertito questa preferenza iniziale, trascorrendo una notevole quantità di tempo nella zona alimentare della camera. In questo esperimento sui topi, però, è stato osservato anche come varia il comportamento in presenza di un altro maschio, oltre che di una femmina.  $Fed^{GFP}$ ,  $fasted^{GFP}$  e  $fed^{ChR2}$  hanno rivelato una preferenza per il lato maschile della camera rispetto a quello abbinato all'oggetto. Mentre questa preferenza è rimasta intatta nel gruppo  $fed^{GFP}$ , gli affamati  $fasted^{GFP}$  e  $fed^{ChR2}$  si sono diretti verso il lato accoppiato al cibo, quando questo è stato introdotto, trascorrendo molto più tempo nella zona alimentare designata[9]. In conclusione, di fronte alle richieste concorrenti di fame ed interazione sociale (in generale, non solo

per quanto riguarda l'accoppiamento), i topi in deficit calorico prediligono consumare cibo, quando questo è accessibile, piuttosto che interagire con un loro conspecifico.

## **2.2 L'impatto del contesto esterno, della dieta, e dello stato interno**

Per semplificare lo studio del meccanismo neuronale che determina la scelta di soddisfare un bisogno piuttosto di un altro, gli studi sul comportamento vengono condotti in condizioni di isolamento dal contesto esterno. In natura, però, ogni decisione viene presa integrando moltissimi segnali, interni ed esterni, ed è dipendente dalla specie, dalla dieta, e dalla convenienza della decisione stessa[5, 6]. Finora abbiamo dimostrato l'importanza della fame come bisogno primario, ma adesso vedremo che essa non è sempre la prima nella gerarchia di priorità, bensì va contestualizzata.

### **2.2.1 Livello di fame, desiderio sessuale, tipologia di alimento**

Dopo aver constatato che drosofile affamate privilegiano il cibo rispetto all'accoppiamento[10], gli scienziati hanno voluto capire se esse si nutrissero fino a sazietà anche in presenza della femmina, oppure la presenza femminile in qualche modo avesse un effetto sulla loro alimentazione. Pertanto, hanno esposto sia individui nutriti che affamati a una fonte di cibo e una femmina per 15 minuti, per poi creare etogrammi del comportamento. Ne è risultato che i maschi affamati si nutrivano soltanto per la metà del tempo (4.5 minuti) per poi cambiare il loro obiettivo e focalizzarsi sulla femmina per i restanti 4 minuti. Quindi, il periodo di tempo dedicato all'alimentazione veniva ridotto in presenza di una femmina. Inoltre, grazie all'utilizzo di flyPAD (metodo automatico per quantificare il cibo ingerito in un determinato periodo di tempo), si è capito che anche la quantità di cibo consumato era minore. La cosa interessante era che ciò si verificava solo in

presenza di un esemplare di sesso femminile, in quanto gli stessi maschi a digiuno da 24h non riducevano significativamente il loro consumo di cibo in presenza di un altro maschio. Infine, i moscerini iniziavano a nutrirsi 4 volte più velocemente con una femmina vicino. Tutte queste differenze, però, erano osservabili solo quando la fonte alimentare era presente. Infatti, in assenza di cibo, il corteggiamento dei maschi affamati di *Drosophila* era paragonabile a quello dei nutriti. Per rendere ancora più completo lo studio sulle scelte comportamentali della mosca, gli scienziati hanno anche testato l'impatto di 3 fattori: il livello di fame, la tipologia di cibo e il desiderio sessuale. Utilizzando flyPAD si è visto che, con l'aumento delle ore trascorse senza mangiare, aumentava anche la scelta di nutrirsi rispetto a corteggiare. In particolare, un notevole cambiamento di rotta si poteva verificare a 15h senza cibo. Un altro aspetto interessante è emerso variando la tipologia di nutrimento: zuccheri poco calorici o non metabolizzabili erano poco apprezzati dall'insetto, aumentando la preferenza per la riproduzione negli affamati[10]. Ricordiamo, a questo proposito, i neuroni AgRP studiati sui topi. Sembra che essi siano "sintonizzati" per raggiungere la sufficienza calorica, determinando una preferenza per alimenti maggiormente calorici, e, soprattutto, metabolizzabili. Questa osservazione è frutto di un esperimento in cui i topi in questione sono stati acclimatati a riconoscere: 20mg di grano, saccarosio, e pellet di saccarina all'1%. I topi fisiologicamente sazi ma con  $ARC_{AgRP}$  stimolati dimostravano un aumentato desiderio di cibo, ma solo di quello nutriente, evitando la saccarina[9]. Infine, ritornando all'esperimento su *Drosophila*, per verificare quanto il desiderio sessuale maschile influisse nella scelta iniziale fra nutrirsi o corteggiare, è stato confrontato il comportamento di maschi che avevano copulato 1h prima dell'esperimento e maschi vergini. Entrambi a 3h di digiuno: periodo di tempo in cui ancora non si osserva una netta preferenza. Chiaramente, è risultata una preferenza per l'accoppiamento molto più alta nei i maschi che non si erano accoppiati rispetto agli altri[10]. In conclusione, tutti questi esperimenti di-

mostrano che la scelta di nutrirsi è inversamente proporzionale al desiderio sessuale e direttamente proporzionale al livello di fame. Inoltre, dipende dalla presenza e dalla qualità del cibo.

### **2.2.2 Il comportamento di intrusi maschi e femmine e l’impatto della fame su di essi**

Finora abbiamo visto che la fame frena l’accoppiamento e le interazioni sociali[10, 9], ma che la presenza della femmina influisce sulla quantità di cibo ingerito e sulle modalità di alimentazione. Al contrario, la presenza di un altro maschio non ha un impatto significativo. Inoltre, abbiamo compreso che la fame ha profondi effetti sui vantaggi copulativi maschili solo se il cibo è presente e nutriente[10]. Ma in caso contrario? Come si comporta una femmina ricettiva affamata rispetto ad una sazia? Ulteriori esperimenti sui topi ci permettono di rispondere a questa domanda. Nello studio in questione, gli scienziati hanno utilizzato un test residente-intruso, in cui femmine nutrite, a digiuno da 18 o 48h, o con  $ARC_{AgRP}$  fotostimolati, sono state poste dentro tre diverse gabbie:

- la propria gabbia domestica
- la gabbia di un residente maschio, territorializzata e vuota
- la gabbia di un residente maschio, territorializzata e occupata

Similmente a quanto già osservato nell’altro sesso, le femmine diminuivano la quantità di cibo consumato quando si trovavano nella gabbia del residente maschio territorializzata e vuota. Ancora di più nel caso della gabbia del residente maschio occupata e territorializzata. Inoltre, valutando comportamenti tipici della ricettività o, al contrario, del rifiuto (ad esempio la fuga), è stata osservata una riduzione della durata del comportamento di ricettività e del numero totale di soggetti coinvolti in comportamenti ricettivi nei topi a digiuno o con  $ARC_{AgRP}$  fotostimolati. Quindi, le femmine

affamate erano meno propense a riprodursi, così come accadeva nei maschi. Viceversa, la presenza di esemplari di sesso maschile aveva un impatto nella loro alimentazione, riducendo il consumo di cibo. Un'ultima situazione ancora non esaminata è quella che riguarda il comportamento di maschi intrusi all'interno di gabbie territorializzate. Interessante è capire se, anche in questo caso, la fame ne determini le azioni e si ponga al di sopra della gerarchia di priorità. Nell'esperimento eseguito, gli intrusi maschi erano più giovani e di peso inferiore rispetto ai residenti dominanti. Posizionati in una gabbia territorializzata e vuota, l'alimentazione degli intrusi veniva fortemente soppressa, indipendentemente dal livello di fame. Questo precipitoso calo dell'alimentazione era ancora più drastico nella gabbia del residente maschio occupata e territorializzata. Anche in questo caso, sono stati analizzati diversi comportamenti, ed è emerso che, a differenza delle femmine intruse, quasi tutti mostravano fuga e atteggiamenti difensivi, indipendentemente dal livello di fame[4]. È forse possibile, allora, che vi sia un bisogno primario ancora più prioritario rispetto alla fame? Nonostante, precedentemente, abbiamo affermato che la fame inibisca i comportamenti di autoconservazione[9], in questo caso sembra che non sia così. Gli intrusi maschi, infatti, anche se affamati, pensano a salvarsi la vita più che a mangiare. Sembra, dunque, che i due bisogni primari "concorrano" per il primo posto nella classifica delle priorità. Nel prossimo capitolo vedremo quali possono essere alcuni motivi per cui l'autoconservazione viene posta prima della fame, e viceversa.

### **2.3 Alimentazione e fuga: gerarchia di priorità**

Fin qui, abbiamo compreso che nutrirsi è una funzione necessaria per ogni animale, ma quando siamo in presenza di un potenziale pericolo, un animale che si nutre deve decidere se continuare a nutrirsi e rischiare di essere predato, oppure smettere e cercare di scappare[5]. Abbiamo visto che la fame può

inibire la paura[9], però anche che topi maschi, intrusi, inseriti in una gabbia territorializzata, non pensano a mangiare, bensì a fuggire dal pericolo nonostante la fame[4]. Un altro caso interessante è quello delle sanguisughe. Da studi passati sappiamo che *Hirudo medicinalis*, sanguivora obbligata, blocca tutte le risposte agli stimoli meccanici quando si nutre[2, 5, 6]. Ma vale la stessa cosa per tutte le specie di sanguisughe, carnivore comprese? In realtà, ci sono delle differenze, e la dieta ne è la causa principale. Per lo studio che andiamo ad analizzare, gli scienziati hanno preso in considerazione sei specie di sanguisughe: tre sanguivore e tre carnivore. Per le stimolazioni meccaniche hanno utilizzato un elettrodo manuale che deliberava scosse elettriche sul corpo dell'animale, trattenendolo durante lo stimolo. Ciò assicurava che la risposta fosse data dalla scossa e non dallo sfioramento dell'elettrodo. I dati raccolti dalle stimolazioni sulle sanguisughe finché si nutrivano sono stati comparati con quelli di quando non si stavano nutrendo. Quando non si nutrivano, tutte: sanguivore e carnivore, mostravano le stesse reazioni:

- Si accorciavano in risposta a stimolazione anteriore
- Si piegavano con stimolazione a metà del corpo
- Nuotavano o strisciavano via come conseguenza della stimolazione posteriore

Al contrario, quando si nutrivano, si notavano le seguenti differenze:

- Durante la stimolazione anteriore, le sanguivore non si accorciavano, al contrario delle carnivore, che abbandonavano il cibo più frequentemente.
- La stimolazione di metà corpo induceva il ripiegamento sia di carnivore che di sanguivore, però era ridotto
- Stimolate posteriormente, le sanguivore non reagivano mentre le carnivore si allontanavano dallo stimolo nuotando o strisciando via

Dai risultati ottenuti si è concluso che la locazione dello stimolo è il determinante principale quando le sanguisughe non si nutrono. In questo caso, quindi, non c'è dipendenza dalla specie. Però, durante il nutrimento, la specie diventa determinante. Infatti, le carnivore tendono ad abbandonare più spesso il cibo rispetto alle sanguivore, in cui si osserva solo il comportamento di ripiegamento, che non contrasta l'alimentazione. Questo perché le carnivore hanno una dieta correlata con l'atto di nuotare, strisciare, e altri comportamenti incompatibili con il nutrimento. La dieta delle sanguivore, invece, non prevede comportamenti che interferiscono con l'ingestione. Ci sono solo due stimoli, infatti, in grado di terminare prematuramente l'atto di nutrirsi nella sanguivora *Hirudo*: l'estensione del gozzo dell'animale, che modifica la percezione della quantità di cibo ingerito, e la manipolazione della fonte di cibo, con aggiunta di chinina o rimpiazzandola con acqua. Cioè stimoli che interferiscono direttamente con l'alimentazione. La gerarchia comportamentale di sanguivore e carnivore, quindi, è diversa: le prime danno priorità all'atto di nutrirsi, ignorando la maggior parte degli stimoli meccanici, mentre le altre sono più propense ad abbandonare la fonte di cibo a favore della fuga. Ma come può, una diversa dieta, essere la causa di una gerarchia dei comportamenti così divergente? In invertebrati e vertebrati la decisione di nutrirsi o evitare il pericolo viene calcolata con un'analisi dei costi e dei benefici, dettata dalla fame che si oppone a immediati o più ritardati rischi. Come nutritori episodici con diete specifiche, le sanguisughe sanguivore potrebbero dover sopportare lunghi periodi di fame. Senza il pasto, potrebbero non avanzare nel loro stadio di sviluppo successivo, ed ecco perché tanta priorità. Lo stesso vale anche per le zecche dure. Infatti, anch'esse sopportano molti abusi fisici senza staccarsi dalla fonte di sangue. Questo dimostra che un'alimentazione episodica ed una dieta molto specifica spingono l'organismo a minimizzare il rischio di morte dalla fame anche a costo di aumentare quello di predazione. Queste circostanze estreme sono rappresentate nel sistema nervoso da una totale soppressione dei compor-

tamenti incompatibili con il nutrimento. Al contrario, la disponibilità di prede non è un problema per le carnivore. Pertanto, la priorità viene data alla fuga dal pericolo[5].

### 3 Discussione

Quando esposti a stimoli e bisogni in competizione tra loro, gli animali sono forzati a sceglierne uno a discapito degli altri. Già nel 1906, Sherrington formulò il principio della “singolarità dell’azione”, ma ad oggi, su come comportamenti alternativi competano per l’espressione nel sistema nervoso, rimane ancora molto da scoprire[10]. Nello studio su *Drosophila* è stato simulato uno scenario in cui la mosca si trovava a scegliere fra i due bisogni concorrenti di nutrirsi o accoppiarsi. Il risultato è stato una prioritizzazione dello stimolo della fame su quello derivante da una femmina ricettiva[10]. Ciò è in linea con la teoria di Maslow, secondo cui i bisogni fisiologici basilari (cibo, acqua, sonno) vanno soddisfatti per primi, e solo in seguito vengono considerati quelli più "in alto" sulla piramide (accoppiamento e cooperazione)[3, 10]. Anche per i topi il principio è lo stesso: priorità a soddisfare il fabbisogno calorico prima di tutto. Un bisogno talmente importante da inibire la paura, le interazioni sociali di ogni genere, promuovere la memorizzazione legata al posizionamento del cibo, l’esplorazione, e molto altro[9]. Sempre più studi sembrano designare la fame come priorità assoluta nel regno animale, la prima sulla scala dei bisogni. In questo elaborato, però, abbiamo visto che per quanto una necessità sia vitale e primaria, va sempre contestualizzata. Anche se gli studi sul comportamento ci forniscono un’idea di come vengano selezionate alcune scelte rispetto ad altre, non sono reali rappresentazioni di ciò che accade in natura. In essa, infatti, gli stimoli da considerare sono numerosi: interni ed esterni, correlati alla specie, dieta, situazione in cui l’animale si trova a dover agire, e così via. E’ impossibile, in un contesto di laboratorio, riuscire a tenerli in considerazione tutti. Si

possono, però, com'è stato fatto, simulare alcuni parametri interni ed esterni grazie a manipolazioni molecolari e ambientali. Ad esempio, la decisione di nutrirsi piuttosto che corteggiare, tipica di drosofile affamate, può essere modificata aumentando o diminuendo il numero di ore di digiuno, o facendo accoppiare il moscerino un'ora prima dell'esperimento, diminuendo, così, il desiderio sessuale[10]. Inoltre, la scelta dipende dalla tipologia di cibo presente, dal suo valore calorico[10, 9], e dal ciclo vitale stesso dell'animale. A questo proposito, interessante è il caso delle sanguisughe sanguivore. Il loro ciclo vitale è molto particolare, caratterizzato da una dieta unica nel suo genere, tanto da rimodellare la gerarchia comportamentale osservata nelle loro simili: le sanguisughe carnivore. Le carnivore, infatti, dotate di un tipo di alimentazione che richiede abilità di caccia e nuoto e che non presenta difficoltà nel trovare le prede, quando sottoposte ad uno stimolo meccanosensoriale, tendono ad allontanarsi abbandonando la fonte di cibo. Al contrario, le sanguivore restano attaccate alla sorgente di sangue e resistono a molte perturbazioni meccaniche pur di non abbandonarla. Ciò è dovuto alla loro natura di esseri che si alimentano in modo episodico e di solo un tipo di alimento. Esse preferiscono rischiare di essere attaccate piuttosto che lasciare un pasto che potrebbe essere fondamentale per sviluppo e sopravvivenza[5]. Le sanguisughe sanguivore, dunque, sono un esempio a sostegno della nostra affermazione iniziale riguardante la supremazia della fame su ogni altro bisogno della piramide[3], ma sono più l'eccezione che la regola nella classe delle sanguisughe. Le specie carnivore, infatti, mettono in secondo piano l'alimentazione quando si tratta della propria incolumità[5]. L'autoconservazione, quindi, compete con la fame negli organismi viventi. Difficile definire cosa prevalga su cosa, di certo l'esperimento sui topi, in cui veniva testata la propensione a permanere in zone considerate pericolose (per via della presenza di TMT) dimostra un'inibizione della paura nei topi affamati, e quindi una maggiore probabilità di essere predati[9]. Inoltre, se pensiamo anche ad altre situazioni in natura, specialmente nel caso delle

prede, notiamo che ogni animale che voglia nutrirsi si espone al pericolo. È anche vero, però, che quando viene attaccato, non resta fermo come accade nel caso delle sanguisughe sanguivore, che addirittura bloccano la percezione agli stimoli meccanici[5], bensì fugge e si mette in salvo. Questo perché, in quel momento, diventa prioritario salvarsi la vita, e, in seguito, penserà a nutrirsi. Sarebbe interessante analizzare ulteriori bisogni che si escludono a vicenda, oppure altri che, invece di competere, sono correlati. Per questi ultimi occorre, forse, spostarsi più in alto nella piramide di Maslow[3], prendendo in considerazione bisogni come la cooperazione, ad esempio. Essa, infatti, è spesso correlata all'autoconservazione e al nutrimento.

## 4 Materiali e metodi

### 4.1 Esperimenti su *Drosophila*

#### 4.1.1 Soggetti

Per lo studio su *Drosophila*[10], gli scienziati hanno preso in considerazione 29 ceppi di mosche. I maschi sono stati allevati individualmente con cibo standard a base di farina di mais fino a 5-7 giorni di età. In seguito, sono stati messi a digiuno per 24h in fiale di agar all'1%. Le femmine vergini, di 3-8 giorni, sono state decapitate appena prima dell'esperimento. Come controllo, sono stati utilizzati maschi nutriti di 5-7 giorni.

#### 4.1.2 Procedimento

I maschi sono stati posti singolarmente in una soluzione di saccarosio 100mM, all'interno di camere di corteggiamento larghe 2 cm, insieme ad una femmine vergine decapitata e cibo (1% di agar e 0.4% di colorante blu FCF). Le mosche sono state riprese per 15 minuti con una videocamera Sony DCR-HC38, e la loro scelta iniziale è stata quantificata. Per gli esperimenti con una femmina mobile sono state usate camere larghe 5 cm. La scelta iniziale

della mosca è stata classificata come corteggiamento o alimentazione se ha eseguito uno dei due comportamenti per almeno 5 secondi. Solo le mosche che hanno toccato il cibo e sono passate anche accanto alla femmina prima di scegliere sono state considerate per l'analisi, perché hanno percepito entrambi gli stimoli. La percentuale di tempo in cui il maschio mostrava una qualsiasi fase del corteggiamento (seguire, picchiettare, stendere le ali, leccare, tentare la copula) nel corso dei 15 minuti di osservazione, definiva l'indice di corteggiamento. L'indice di alimentazione, invece, veniva calcolato come la percentuale di tempo in cui il maschio si nutriva estendendo la proboscide su o vicino alla zona di cibo. Infine, tramite il software BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) gli scienziati hanno potuto creare etogrammi del comportamento.

#### 4.1.3 FlyPAD

Singole mosche, nutrite o a digiuno da 24h, sono state aspirate delicatamente e poste in arene di alimentazione flyPAD, in cui uno dei due pozzetti era caricato con 100mM di saccarosio in 1% di agar, e sono state libere di nutrirsi per 30 minuti. Il loro comportamento è stato ripreso utilizzando la videocamera Sony DCR-HC38, e il numero totale di sorsi delle singole mosche durante 15 e 30 minuti è stato calcolato usando MATLAB.

#### 4.1.4 GAL4/UAS

Il sistema GAL4/UAS è un metodo biochimico che viene applicato per studiare l'espressione e la funzione di un gene. Si compone di due parti: il gene *GAL4*, che codifica per la proteina Gal4, attivatrice della trascrizione nel lievito, e l'UAS (Upstream Activation Sequence): breve sequenza del promotore alla quale Gal4 si lega per attivare la trascrizione. I genetisti hanno creato delle varietà genetiche di *Drosophila*, chiamate *linee GAL4*, che esprimono *GAL4* in alcuni tipi di tessuti. La presenza di *GAL4* in alcune cellule

non ha nessun effetto a livello fenotipico, dal momento che *Drosophila* non presenta regioni UAS alle quali Gal4 potrebbe legarsi. I moscerini, quindi, si comportano normalmente. Allo stesso modo, vengono create delle *linee reporter*, cioè ceppi di moscerini che presentano la regione UAS accanto a un gene desiderato (ad esempio la *GFP*, o la *channelrodopsina*). Anche queste sequenze non porteranno a nessun effetto, dal momento che in queste linee *GAL4* non è espresso, quindi la trascrizione del gene di interesse non potrà essere attivata. A questo punto, però, se si volesse localizzare una certa classe di neuroni nel moscerino, sarebbe sufficiente scegliere una linea che esprima *GAL4* in quella classe particolare di neuroni, ed incrociarla con una *linea reporter* che esprima *GFP*. Nella prole, il sottoinsieme di cellule desiderato produrrà *GAL4*, e questo si legherà alla regione UAS, consentendo la produzione di GFP. In questo modo le cellule diventeranno fluorescenti e potranno essere osservate al microscopio. In altri casi (come quello del nostro studio) la proteina di interesse può essere una tossina che, portando alla morte di un tipo specifico di cellule, permetterà di comprenderne meglio la funzione[1].

## 4.2 Esperimenti sui topi

### 4.2.1 Soggetti

Per entrambi gli esperimenti, i topi sono stati mantenuti a 22–24°C, con un ciclo di 12 ore di luce/12 ore di buio, cibo standard sotto forma di pellet, e acqua[9, 4]. Per lo studio sul comportamento di maschi e femmine intruse, sono stati utilizzati topi tra le 5 e 18 settimane, mantenuti in gruppo fino all’inizio degli esperimenti[4].

### 4.2.2 Iniezione di virus Cre-dipendenti codificanti GFP o ChR2

Dopo aver anestetizzato i topi con isoflurano, averli inseriti in un apparato stereotassico (Stoelting Just for Mice), e aver esposto il cranio tramite una

piccola incisione, è stato praticato un foro per l'iniezione. Una pipetta di vetro con punta del diametro di 20-40 mm è stata inserita nel cervello ed è stato iniettato il virus da un sistema di pressione dell'aria. Dopo 5 minuti dall'iniezione, la pipetta è stata ritirata. Per la cura post-operatoria, i topi sono stati iniettati per via intraperitoneale con meloxicam (0,5 mg per kg[9, 4]).

### 4.2.3 Impianto di fibra ottica

Le fibre ottiche sono state fissate al cranio usando C e B Metabond Quick Cement e acrilico dentale. In seguito, a tutti gli animali sono state concesse due settimane per il recupero, prima della manipolazione da parte dello sperimentatore della durata di una settimana[9, 4].

### 4.2.4 Fotostimolazione

I cavi in fibra ottica (200 mm di diametro e lenti doriche. 1 m di lunghezza per l'esperimento [4] e 1,5 m di lunghezza per l'esperimento [9]) sono stati saldamente fissati alle cannule in fibra ottica impiantate con manicotti in zirconia (lenti doriche), e accoppiati ai laser tramite un giunto rotante a fibre ottiche. La fotostimolazione è stata eseguita mediante treni di impulsi luminosi (10 ms a 20 Hz; 2 secondi accesi, 2 secondi spenti; 5 secondi accesi[9]. 5 ms a 20 Hz; 2 secondi accesi, 2 secondi spenti[9, 4]) programmati tramite generatori di forme d'onda (PCGU100; Valleman Instruments o piattaforma elettronica Arduino). Tali generatori fornivano l'input a un laser a luce blu (473 nm). La potenza luminosa del laser era regolata in modo che la potenza luminosa in uscita dal cavo fosse di 10-12 mW. Si stima che la potenza luminosa sull'ARC fosse di circa  $4,99mW/mm^2$ [9, 4].

#### **4.2.5 Protocollo intruso-residente, analisi del comportamento degli intrusi maschi e femmine**

A seguito dell'impianto, i topi residenti sono stati alloggiati singolarmente o con una femmina, mentre gli intrusi sono stati rimessi nelle loro gabbie di gruppo. Le gabbie domestiche sede degli esperimenti contenevano una telecamera e un distributore automatico di pellet. Tutti i residenti hanno vissuto nella gabbia per almeno due settimane prima dei test: tempo sufficiente per contrassegnarla con urina e feci, e stabilire il dominio territoriale. I test si componevano di tre fasi da 20 minuti: pre-fase, fase di prova e post-fase. Durante la pre-fase, sono stati selezionati intrusi di età compresa tra 6 e 14 settimane ed è stato effettuato l'impianto della fibra ottica. La fase di prova di 20 minuti è stata eseguita in tre diversi contesti: nella gabbia domestica, in una gabbia residente territorializzata e vuota, in una gabbia territorializzata con il residente presente. Durante l'alimentazione domestica in gabbia, i topi sono stati liberi di nutrirsi. Per la valutazione dell'assunzione di cibo nelle gabbie dei residenti vuote, i residenti e le loro eventuali conviventi sono stati spostati in un'altra gabbia fino a dopo il processo. Gli intrusi sono stati, quindi, introdotti nella gabbia vuota, e la loro alimentazione è stata valutata dopo 20 minuti. Infine, per la valutazione dell'alimentazione nella gabbia del residente occupata, gli intrusi sono stati introdotti nella gabbia e gli è stato fornito accesso al cibo in presenza del residente dominante. Dopo un periodo di interazione di 20 minuti, i residenti sono stati rimossi, pesati e spostati in un'altra gabbia fino alla fine della fase post-prova di 20 minuti, in cui all'intruso è stato fornito accesso al cibo in assenza del residente. Infine, gli intrusi sono stati rimossi dalle gabbie, pesati e rapidamente sottoposti a eutanasia tramite inalazione di anidride carbonica. I residenti, invece, sono stati riportati nelle loro gabbie. Tutti i topi sono stati valutati per tre comportamenti individuali: bere, pulirsi e mangiare, ma ogni topo era anche valutato per comportamenti interattivi,

come la chemioindagine naso-naso e anogenitale, indipendente dal sesso o dallo stato di residente/intruso. Le intruse femmine sono state valutate per fuga/tentativo di fuga e ricettività sessuale, mentre gli intrusi maschi sono stati valutati per fuga/tentativo di fuga e posizioni difensive. I dati sono stati raccolti ogni secondo durante i 20 minuti e, se l'animale aveva eseguito uno di questi comportamenti, veniva contrassegnato con l'ora e codificato a colori in modo appropriato. Infine, sono stati generati grafici e codici a barre comportamentali per ciascun animale. Se gli animali eseguivano altri comportamenti separati dal repertorio di azioni designato, quelle azioni particolari non venivano prese in considerazione.[4]

## 4.3 Esperimenti sulle sanguisughe

### 4.3.1 Soggetti

Le specie di sanguisughe considerate nello studio[5] erano le seguenti: *Hirudo verbana* L. (anche detta *Hirudo medicinalis*), *Haemopsis marmorata* Say, *Macrobdeella decora* Say, *Hirudinaria manillensis* L., *Semiscollex* sp., *Erpobdella obscura* Verrill, e *Placobdella rugosa* Verrill.

### 4.3.2 Procedimento

Tutte le sanguisughe sono state alimentate individualmente in contenitori separati e pesate prima e dopo ogni pasto. Le sanguisughe sanguivore sono state nutrite con sangue bovino fresco, a 38°C. La durata di un atto di alimentazione era rappresentata dal periodo che correva dall'attaccamento della ventosa anteriore fino al suo rilascio dopo l'ingestione di sangue. Le carnivore ricevevano pasti settimanali per assicurarsi che non morissero di fame. *Erpobdella obscura* veniva nutrita con fegato di bovino fresco e *Semiscollex* sp. con vermi neri vivi. Per garantire la loro motivazione a nutrirsi, tutte sono state private del cibo per 1 settimana prima del pre-test e poi per un'altra settimana tra le sessioni di pre-alimentazione e alimentazione,

tranne *E. obscura*, che è stata privata di cibo per 4 mesi prima degli esperimenti. Per le sanguisughe carnivore, come atto di alimentazione, è stato considerato il numero di morsi e l'aumento di massa durante un'esposizione di 30 minuti al cibo. Il protocollo di stimolazione consisteva in treni di scariche elettriche erogati sulla parete del corpo utilizzando un elettrodo portatile. I terminali dell'elettrodo erano costituiti da due fili d'argento rivestiti in teflon con le punte metalliche esposte e separate di circa 1 mm. Durante la stimolazione, gli scienziati sfioravano con i fili metallici la pelle della sanguisuga, mantenendola ferma per assicurarsi che la sua risposta fosse dovuta alla stimolazione elettrica dei terminali dei neuroni meccano-sensoriali, e non dal posizionamento dell'elettrodo. Le cellule attivate erano quelle della pressione, il che rendeva lo stimolo elettrico equivalente ad uno meccanico. La stimolazione veniva applicata fino a quando l'animale non rispondeva, o per un massimo di 2s, rispettivamente nella parte anteriore, centrale, e posteriore della sanguisuga. Nelle sessioni di pre-alimentazione, gli stimoli venivano erogati ogni 3 minuti per 45 minuti. Durante l'alimentazione, gli stimoli venivano somministrati alle sanguivore ogni 3 minuti per tutta la durata dell'atto di alimentazione. Nelle carnivore gli stimoli venivano forniti solo se la sanguisuga stava mordendo attivamente un alimento, anche se mai più frequentemente di una volta ogni 2 minuti.

## Riferimenti bibliografici

- [1] N. Perrimon A.H. Brand. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2):401–415, June 1993.
  
- [2] Kevin Mann; Michael D. Gordon and Kristin Scott. A pair of interneurons influences the choice between feeding and locomotion in drosophila. *Neuron*, 79:754–765, 21 August 2013.

- [3] Maslow; A. H. *A Dynamic Theory of Human Motivation*. C. L. Stacey; M. DeMartino, 1958.
- [4] C Joseph Burnett; Samuel C Funderburk; Jovana Navarrete; Alexander Sabol; Jing Liang-Guallpa; Theresa M Desrochers; Michael J Krashes. Need-based prioritization of behavior. *Neuroscience*, 25 March 2019.
- [5] Q. Gaudry; N. Ruiz; T. Huang; W. B. Kristan and W. B. Kristan; Jr. Behavioral choice across leech species: chacun à son goût. *The Journal of Experimental Biology*, 213:1356–1365, 15 December 2009.
- [6] William B. Kristan. Neuronal decision-making circuits. *Current Biology*, 18, 14 October 2008.
- [7] The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/strain/012899>.
- [8] Daniel M. McDonald and Alex C. Keene. The sleep-feeding conflict: Understanding behavioral integration through genetic analysis in drosophila. *AGING*, 2(8):519–522, August 2010.
- [9] C. Joseph Burnett; Chia Li; Emily Webber; Eva Tsaousidou; Stephen Y. Xue; Jens C. Bruning; Michael J. Krashes. Hunger-driven motivational state competition. *Neuron*, 92:187–201, 5 October 2016.
- [10] Sherry J. Cheriyaunkunel; Saloni Rose; Pedro F. Jacob; Patrick J. Moynihan; Scott Waddell; Carolina Rezaval. A neuronal mechanism controlling the choice between feeding and sexual behaviors in drosophila. *Current Biology*, 31:4231–4245, 11 October 2021.
- [11] Jones JE Elmquist JK Lowell Tong Q, Ye CP. Synaptic release of gaba by agrp neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience*, 11:998–1000, 2008.