

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in Neurofisiologia
XVIII ciclo

Tesi di Dottorato

**Mappe funzionali nervose
delle modificazioni del ciclo veglia-sonno
indotte da esposizione a
bassa temperatura ambientale**

Dott.ssa Daniela Dentico

Tutor:
Dott.ssa Christine Jones

BIO/09

Coordinatore:
Prof. Claudio Galletti

Dipartimento di Fisiologia umana e generale
Bologna, 2007

Indice generale

Indice delle abbreviazioni	4
Lista dei fornitori	12

Introduzione 15

Attività elettrica cerebrale nel ciclo veglia-sonno	21
Fenotipo chimico dei neuroni implicati nel controllo del ciclo veglia-sonno .	25
Meccanismi ipotetici del controllo nervoso del sonno nei mammiferi	27
Omeostasi <i>del</i> sonno	32
Omeostasi <i>nel</i> sonno	36
La termoregolazione dipende dagli stati comportamentali	37
Il ruolo della PO-AH nella termoregolazione e nel sonno	38
Metodi di deprivazione ipnica	40
Risultati molecolari della intensificazione dei processi della veglia e del sonno	45
Ulteriori modalità molecolari di studio del sonno e scopo della ricerca	46
c-Fos come marcatore dei processi della veglia e del sonno nel ratto	55

Materiali e metodi 61

Fase di messa a punto delle metodiche sperimentali	63
Anestesia	63
Fissazione tissutale	65
Crioprotezione	69
Congelamento	69
Preparazione dei vetrini	72
Taglio	72
Colorazione istologica	74
Metodica immunistoichimica	77

Aspetti generali.....	77
Uso di un modello noto di attivazione tissutale per controllare i parametri della tecnica immunoistochimica	79
Studio di un modello specifico di incremento dell'attivazione tissutale.....	83
Elaborazioni successive e affinamento tecnico del protocollo immunoistochimico	86
Studi di competizione	89
Fase sperimentale	91
Condizioni sperimentali	91
Processamento immunoistochimico	93
Analisi dei dati	96
Acquisizione delle immagini in forma digitale.....	96
Sistema a scansione manuale (fase pre-sperimentale).....	96
Sistema a scansione automatica (fase sperimentale)	101
Correzione della vignettatura.....	104
Riferimenti anatomici.....	109
Griglie per il conteggio dei nuclei marcati	116
Metodo di conteggio dei nuclei marcati.....	120
Elaborazione dei dati.....	126
Analisi statistica	127
<i>Risultati</i>.....	129
Immunoreattività per c-Fos.....	131
Conta dei nuclei marcati	131
Pattern caratteristici	134
Analisi relative ai parametri area e intensità.....	136
<i>Discussione</i>	139

Considerazioni metodologiche	141
Modalità di campionamento dalle aree nervose prescelte.....	141
Immunoreattività attribuibile al c-Fos in condizioni prolungate di stimolazione	141
Analisi dell'immunoreazione.....	142
Correlazione tra i parametri area e intensità media degli oggetti sopra soglia	143
Considerazioni sui risultati delle analisi dell'area e dell'intensità degli nuclei positivi	146
Interpretazione funzionale dei dati sperimentali.....	148
Analisi della citoarchitettura e delle connessioni del VLPO	148
Analisi della citoarchitettura e delle connessioni del MnPO.....	156
Influenze del ciclo circadiano.....	163
Influenze del controllo della temperature corporea	164
Influenze del controllo dell'osmolalità dei liquidi corporei	172
Influenze dello stress	179
Influenze della regolazione ipnica	181
La relazione tra l'immunoreattività per il c-Fos e l'accumulazione di cAMP	196
Una possibile interpretazione dell'immunoreattività citoplasmatica per c-Fos	199
Conclusioni	203
<i>Tabelle</i>	205
<i>Figure</i>	217
<i>Bibliografia</i>	291

Indice delle abbreviazioni

3V*, terzo ventricolo

5HT-ir, immunoreattività per la serotonina

A, area dei nuclei marcati

AA, aminoacidi

ABC, avidin-biotinylated enzyme complex

ac*, commessura anteriore

Ac, anticorpi

acer*, arteria cerebrale anteriore

ADA, adenosina deaminasi

ADH, ormone antidiuretico o vasopressina

ADP*, nucleo anterodorsale preottico

Ag, antigene

AH*, area ipotalamo anteriore

AHA*, area ipotalamica anteriore, parte anteriore

AHC*, area ipotalamica anteriore, parte centrale

AHP*, area ipotalamica anteriore, parte posteriore

Al*, nucleo alare

AP-1, activating protein 1

Aq*, acquedotto di Silvio

Arc, nucleo arcuato

ATF, activating transcription factor

AV*, nucleo anteroventrale talamico

AVP, nucleo preottico anteroventrale

AVPe*, nucleo periventricolare anteroventrale

BF, prosencefalo basale

BkG, valore dell'intensità moda dei pixel dell'immagine acquisita corrispondente
al background

BSA, sieroalbumina bovina

BST*, nucleo della stria terminalis

C, controllo
C, unità catalitica dell'enzima
C24, condizione sperimentale di controllo a ZT0
C4, condizione sperimentale di controllo a ZT4,5
CaMK, calmodulina chinasi
cAMP, adenosin monofosfato ciclico
CaRE, Ca^{++} response element
CBP, CREB-binding protein
Ce*, nucleo centrale dell'amigdala
c-Fos-ir, immunoreattività per la proteina c-Fos
cg*, corteccia del cingolo
CG*, grigio centrale
ChAT-ir, immunoreattività per la colinacetiltransferasi
CI*, nucleo interstiziale caudale del fascicolo longitudinale mediale
CL*, nucleo talamico centrolaterale
CM*, nucleo talamico centromediale
cMnPO, parte caudale del nucleo preottico mediano
CPu*, putamen caudato (striato)
CRE, Ca^{++} /cAMP response element
CREB, Ca^{++} /cAMP response element-binding protein
CREM, cAMP-responsive-element modulator
CRH, fattore ipofisario di rilascio della corticotropina
CTB, subunità beta della tossina colerica
CxA*, zona di transizione corteccia-amigdala
DA, area ipotalamica dorsale
DAB, 3,3'-Diaminobenzidina
DAG, diacilglicerolo
DAT-ir, immunoreattività per il trasportatore della dopamina
DB*, banda diagonale del Broca
DEn*, nucleo endopiriforme dorsale
DM*, nucleo ipotalamico dorsomediale

dMnPO, parte dorsale del nucleo preottico mediano

DR*, nucleo dorsale del rafe

dSCh, suddivisione dorsale del nucleo soprachiasmatico

DW, sostanza bianca compatta

E24, condizione sperimentale di esposizione a -10 °C per 24 h

E24R4, condizione sperimentale di recupero a 23,5 °C per 4,5 h, dopo 24 h di esposizione a -10 °C

E4, condizione sperimentale di esposizione a -10 °C per 4,5 h

E48, condizione sperimentale di esposizione a -10 °C per 48 h

E48R4, condizione sperimentale di recupero a 23,5 °C per 4,5 h, dopo 48 h di esposizione a -10 °C

EEG, elettroencefalogramma

EW*, nucleo di Edinger-Westphal

f*, fornice

FAP, fos AP-1 binding site

FLI, Fos-like immunoreactivity

Fra, Fos-related antigens

FTI, fattore di trascrizione inducibile

Fu*, nucleo del letto della stria terminale, parte fusiforme

GAD, decarbossilasi dell'acido glutammico

GHRH, fattore ipofisario di rilascio dell'ormone della crescita

Gi*, nucleo reticolare gigantocellulare

GnRH, fattore di rilascio delle gonadotropine

Gran, strato dei granuli

H, ipossia

HDB*, ramo orizzontale della banda diagonale del Broca

HSI, modalità digitale di codifica dei colori della saturazione e della luminosità (hue-saturation-intensity)

HSL, modalità digitale di codifica dei colori della saturazione e della luminosità (hue-saturation-luminance)

I, intensità media di un nucleo marcato

i.c.v., intracerebroventricolare
i.m., intramuscolo
i.p., intraperitoneo
IAM*, nucleo inter-anteromediale talamico
IEG, immediate early gene
Ig, immunoglobuline
IGL, lembo intergenicolato del talamo
IP₃, inositolo 1,4,5-trifosfato
IPAC*, nucleo interstiziale del ramo posteriore della commessura anteriore
LA*, nucleo lateroanteriore ipotalamico
LB, luce-buio
LC*, locus coeruleus
LDT, nucleo del tegmento laterodorsale
Leu, leucina
LH*, ipotalamo laterale
LHb*, nucleo abenulare laterale
LHRH, fattore di rilascio dell'ormone luteotropo
LOT*, nucleo del tratto olfattivo laterale
LPO*, area preottica laterale
LS*, nucleo laterale del setto
LSD*, nucleo laterale del setto, parte dorsale
LSI*, nucleo laterale del setto, parte intermedia
LSV*, nucleo laterale del setto, parte ventrale
M1*, corteccia motoria primaria
M2*, corteccia motoria secondaria
MAPK, Ras/mitogen-activated protein kinase
MCH-ir, immunoreattività per l'ormone concentrante la melanina
MCPO*, nucleo preottico magnocellulare
MD*, nucleo mediodorsale talamico
MnPO*, nucleo preottico mediano
Mol, strato molecolare

MPA*, area preottica mediale
MPO*, nucleo preottico mediale
MPOL*, nucleo preottico mediale, parte laterale
MPOM*, nucleo preottico mediale, parte mediale
MS*, nucleo del setto mediale
NGF, fattore di crescita neuronale
NGS, siero normale di capra (normal goat serum)
NREM, non rapid-eye-movements
NRS, siero normale di coniglio (normal rabbit serum)
och*, chiasma ottico
P-CREB, forma fosforilata attiva di CREB
Pa*, nucleo paraventricolare ipotalamico
PaDC*, nucleo paraventricolare ipotalamico, calotta dorsale
PAG*, grigio periacqueduttale
PaLM*, nucleo paraventricolare ipotalamico, parte laterale magnocellulare
PaMP*, nucleo paraventricolare ipotalamico, parte mediale parvicellulare
PaV*, nucleo paraventricolare ipotalamico, parte ventrale
PBP*, nucleo parabrachiale
PBS, tampone fosfato (phosphate buffer in saline)
PBSN, tampone fosfato con azide sodica
PBSNT, tampone fosfato con azide sodica e Triton X-100
PBST, tampone fosfato con Triton X-100
PC*, nucleo paracentrale talamico
Pe*, nucleo periventricolare ipotalamico
PEG, polietilenglicole
PF/LH, area ipotalamica laterale perifornicale
PGO, onde ponto-genicolo-occipitali
PH*, nucleo ipotalamico posteriore
PHA*, area ipotalamica posteriore
PHAL, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin
Pir*, corteccia piriforme

PKA C, subunità catalitica della protein chinasi A
PKA, protein chinasi A
PKC, protein chinasi C
PLH*, parte peduncolare dell'ipotalamo laterale
PMV*, nucleo premammillare ventrale
POA, area preottica
PO-AH, area preottica e area ipotalamica anteriore
PP, protein fosfatasi
PPTg*, nucleo del tegmento peduncolo pontino
PS*, nucleo parastriale
PT*, nucleo parateniale talamico
Purk, strato delle cellule di Purkinje
PVA, nucleo paraventricolare talamico
R, unità regolatrice dell'enzima
R1, rettangolo di conta dei nuclei centrale per il rMnPO
R2, rettangolo di conta dei nuclei sinistro per il rMnPO
R3, rettangolo di conta dei nuclei destro per il rMnPO
RCh*, area retrochiasmatica
Re*, nucleo reuniens talamico
REM, rapid-eye-movements
RGB, modalità digitale additiva di codifica dei colori (red-green-blue)
RIP*, nucleo del rafe interposito
rMnPO, parte rostrale del nucleo preottico mediano
Rt*, nucleo reticolare talamico
S*, subicolo
S1*, corteccia somatosensoriale primaria
S2*, corteccia somatosensoriale secondaria
SCh*, nucleo soprachiasmatico
Ser, serina
SFO, organo subfornicale
SHy*, nucleo settoipotalamico

SI*, sostanza innominata
SIB*, sostanza innominata, parte basale
SIE, c-Sis-inducible element
SNC, sistema nervoso centrale
SO*, nucleo sopraottico
Sol*, nucleo del tratto solitario
SPa*, zona subparaventricolare dell'ipotalamo
SRE, serum response element
StA*, parte striata dell'area preottica
STI*, nucleo del letto della stria terminale, divisione intermedia
STLV*, nucleo del letto della stria terminale, divisione laterale, parte ventrale
STMAM*, nucleo del letto della stria terminale, divisione mediale, parte anteromediale
STMV*, nucleo del letto della stria terminale, divisione mediale, parte ventrale
STLP*, nucleo del letto della stria terminale, divisione laterale, parte posteriore
SuM*, nucle supramammillare
SWA, attività EEG ad onde lente (slow-wave activity)
Ta, temperatura ambientale
TA, temperatura ambiente
TB, tampone TRIS base
Tc, temperatura corporea
TH-ir, immunoreattività per la tirosina idrossilasi
TM, nucleo tuberomammillare
TRH, fattore ipofisario di rilascio della tireotropina
TTS, tempo totale di sonno
Tu*, tubercolo olfattivo
TuLH*, regione tuberale dell'ipotalamo laterale
VDB*, ramo verticale della banda diagonale del Broca
VE_n*, nucleo endopiriforme ventrale
VIP, peptide intestinale vasoattivo
VLH*, nucleo ventrolaterale ipotalamico

VLPO dx, nucleo preottico ventrolaterale, destro
VLPO sx, nucleo preottico ventrolaterale, sinistro
VLPO*, nucleo preottico ventrolaterale
VLPOcor, core del nucleo preottico ventrolaterale
VLPOdor, estensione dorsale del nucleo preottico ventrolaterale
VLPOmed, estensione mediale del nucleo preottico ventrolaterale
VMH*, nucleo ventromediale ipotalamico
vMnPO, parte ventrale del nucleo preottico mediano
VMPO*, nucleo preottico ventromediale
VOLT*, organo vascoloso della lamina terminale
VP, pallido ventrale
VTA, area tegmentale ventrale
VTM*, nucleo tuberomamillare ventrale
ZI*, zona incerta
ZT, tempo circadiano (zeitgeber time)

* Paxinos e Watson, 2005

Lista dei fornitori

3M ESPE, Sede 3M Italia, Segrate (Mi), Italia
Adobe, San Jose, CA, USA
Bio-Optica Milano S.p.A., Milano (Mi), Italia
Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA
Cole Parmer, East Bunker Court, Vernon Hills, IL, USA
Corning Incorporated Costar, NY, USA
David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Delta Med s.r.l., 46019 Viadana (Mn), Italia
Exacta+Optech Labcenter S.p.A., S. Prospero (Mo), Italia
Fluka Chemie GmbH CH9471 Buchs, Svizzera
Greiner Bio-One International AG Kresmünster, Austria
Heidolph Instruments GMBH & CO. KG, Schwabach, Germania
Kodak S.p.A., Cinisello Balsamo (Mi), Italia
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania
Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germania
Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar-Steindorf, Germania
Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA
Merk KGaA Darmstadt, Germania
National Instruments Corporation, Austin, TX, USA
NITAL S.p.A., Torino (To), Italia
Packer Products & Packer Systems, Basildon, Inghilterra
SIAD Società Italiana Acetilene e Derivati S.p.A., Bergamo (BG), Italia
Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
Tecniplast S.p.A., Milano (Mi), Italia
Upstate, Lake Placid, NY
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Whatman International Ltd, Maidstone, Inghilterra

Introduzione

Il ciclo ultradiano veglia-sonno è definito dall'alternarsi di tre stati comportamentali, costituiti da: veglia, distinta a sua volta in veglia quieta e veglia attiva, sonno NREM (non-rapid eye movement) e sonno REM (Parmeggiani, 2005). Il sonno è stato descritto come uno stato comportamentale reversibile, caratterizzato da isolamento percettivo e assenza di responsività agli stimoli ambientali, ma rappresenta al tempo stesso un complesso amalgama di processi fisiologici e comportamentali (Carskadon e Dement, 2005).

Sul piano somatico, il sonno NREM è caratterizzato dall'assunzione di una postura termoregolatoria, associata ad un decremento dell'attività dei muscoli antigravitari. Peculiari del sonno REM sono invece atonia muscolare, movimenti oculari rapidi e contrazioni muscolari involontarie a tipo di mioclonie.

Sul piano autonomico, nel sonno NREM è evidente una prevalenza funzionale delle influenze parasimpatiche, associate a quiescenza dell'attività simpatica. Il sonno REM rivela al contrario una elevata variabilità nei livelli di attività simpatica, insieme a fasi interruzioni dell'attività di scarica tonica del parasimpatico (Parmeggiani, 2005).

Volendo compendiare in un aforisma il sonno NREM, si può parlare di un cervello relativamente inattivo ma capace di regolazioni attive in un corpo in grado di muoversi, cui fa da contraltare, nel sonno REM, un cervello fortemente attivo in un corpo paralizzato (Carskadon and Dement, 2005).

E' sorprendente come a circa ottant'anni dalla scoperta dell'elettroencefalogramma (EEG) da parte di Berger (nel 1929) e settanta dalla sua applicazione all'indagine dei meccanismi del sonno da parte di Bremer (nel 1936) la funzione del sonno rimanga ad oggi sconosciuta. Questa carenza contrasta con il l'attuale notevole accumulo di dati concernenti l'analisi di meccanismi coinvolti nella regolazione ipnica, che sono per lo più descritti sul piano del dettaglio dell'intervento di diversi sistemi neuronali. Infatti, ciò che abbiamo sul piano generale non è molto diverso da quanto ci fornisce, da tempo immemorabile, il senso comune, vale a dire che il sonno comporta per l'organismo una qualche forma di recupero (Tobler, 2005). Per questo, ci limiteremo a tratteggiare solo alcuni aspetti salienti delle cosiddette teorie del

sonno in relazione a uno degli approcci più generali dell'analisi delle funzioni biologiche, che è quello filogenetico.

Il ciclo del sonno compare sul piano evolutivo in associazione con il fenomeno dell'*endotermia*, cioè con la capacità di mantenere una temperatura corporea elevata e costante grazie al metabolismo interno, che è propria soltanto di mammiferi e uccelli e che offre loro il vantaggio di poter occupare nicchie ecologiche notturne, nonché di sopravvivere a climi freddi. L'alternanza tra le fasi di REM e di NREM non è ancora stata spiegata, ma è possibile che il ciclo si sia evoluto in maniera indipendente (in parallelo) in mammiferi e uccelli oppure nei loro immediati progenitori (i rettili più vicini ai mammiferi). Studi su varie specie esistenti di rettili, basati sull'osservazione del sonno comportamentale, ma anche su registrazioni di attività elettrica corticale nonché di strutture profonde troncoencefaliche, non hanno prodotto evidenze convincenti della presenza di sonno REM o di un'organizzazione ipnica che possa far pensare ad un ciclo (Zepelin et al, 2005).

A favore dell'ipotesi che l'emergenza del sonno REM sia stata relativamente recente, cioè che esso non sia esistito nei rettili, ma si sia evoluto rapidamente con la comparsa dell'*endotermia*, va inoltre il riscontro della sua assenza nell'*echidna Tachyglossus*, una delle tre specie superstiti di monotremi (mammiferi ovipari), che diversero precocemente dal ramo evolutivo principale dei mammiferi, in cui peraltro è presente sonno NREM. D'altra parte, in alcuni momenti in cui l'*echidna* dorme in sonno NREM, registrato elettroencefalograficamente, si possono evidenziare scariche di attività neuronale a livello troncoencefalico, simili all'attività caratteristica del sonno REM nei mammiferi terii (marsupiali e placentati). Questo potrebbe indicare che il sonno REM e NREM non si siano evoluti in maniera sequenziale, ma come differenziazione a partire da uno stato ipnico primitivo che avrebbe avuto in sé i semi di entrambi. A riprova, vi è ora l'evidenza inequivocabile, in un'altra delle tre specie di monotremi sopravvissute, il *platipo*, della presenza di stato di REM, occupante 6-8 ore al giorno (quindi più che in ogni altro mammifero) e accompagnato da movimenti oculari, atonia, contrazioni muscolari fasiche e

un'elevata soglia di risveglio, benché con un voltaggio dell'EEG simile a quello che caratterizza il sonno NREM nei mammiferi euplacentati (Zepelin et al, 2005).

In realtà, un elemento che complica la speculazione sulla storia evolutiva del sonno REM è il riscontro della sua assenza nei delfini delle specie *Tursiops truncatus* e *Phocoena phocoena*, mammiferi che non possono essere considerati primitivi. I mammiferi marini presentano pattern di sonno peculiari, con sonno ad onde lente caratteristicamente uniemisferico associato ad attività desincronizzata tipica della veglia nell'emisfero controlaterale. La presenza inequivocabile di sonno REM, identificata tramite registrazione elettroencefalo- ed elettromiografica, associata all'evidenza di una soglia di risveglio elevata, non è stata dimostrata in nessun cetaceo; la ricerca di eventi fasici durante stati di quiescenza, per esempio di eventi muscolari a tipo di spasmi involontari, ne ha mostrato la presenza solo in quantità dell'ordine di 10-100 al giorno, contro le migliaia osservate nei mammiferi terrestri, principalmente nel corso del sonno REM. Se anche tali eventi muscolari fossero sinonimo di sonno REM e non costituissero l'analogo delle mioclonie che si possono verificare durante il sonno NREM, la quantità di sonno REM nei cetacei sarebbe di gran lunga la più bassa tra tutte le specie di mammiferi. Ulteriori ricerche sul sonno nei cetacei, rivolte a quantificare e comprendere la natura della fenomenologia fasica che richiama lo stato di sonno REM, potrebbero fornire importanti chiavi di lettura dell'evoluzione e funzione di tale stato comportamentale (Zepelin et al, 2005).

Secondo alcuni autori, la prospettiva evuzionistica ha fortemente indebolito l'influenza dominante della visione che attribuisce al sonno una funzione di ristoro e di riparazione dei danni corporei o particolarmente cerebrali, causati dall'attività di veglia (*teoria ristorativa*), in quanto questa visione non spiega facilmente la notevole variabilità interspecie delle quote di sonno tra i mammiferi (Zepelin et al, 2005). Recentemente, tuttavia, Savage e West hanno riconsiderato il sonno nei mammiferi, tramite l'applicazione di un modello matematico, in prospettiva della funzione di riparazione cellulare cerebrale, nonché di riorganizzazione corticale ed elaborazione delle informazioni associate all'apprendimento e alla memoria (Savage e West, 2007).

Una fondamentale teoria alternativa considera il sonno come rivolto alla *conservazione energetica*, così come suggerito dalla sua associazione con l'endotermia. L'ipotesi di Berger invoca il sonno come una modalità per ridurre la spesa energetica al di sotto dei valori ottenibili con il semplice riposo (Berger, 1975); l'interdipendenza tra sonno NREM ed endotermia sarebbe dedotta dalla loro contemporanea maturazione nell'evoluzione dei mammiferi, nonché dall'ininterrotto operare di processi termoregolatori ad un ridotto livello di temperatura corporea durante il sonno NREM. Tuttavia, il risparmio energetico durante il sonno è stato stimato ad appena il 5-11% nella specie umana, considerando l'effetto dei movimenti corporei e dei risvegli; d'altra parte, un'argomentazione forte contro tale ipotesi è il movimento continuo dei delfini durante il sonno (Zepelin et al, 2005).

Una seconda versione della teoria della conservazione energetica considera di secondaria importanza la riduzione del metabolismo durante il sonno e pone la sua principale funzione nel fissare un limite all'attività e alla spesa energetica, tale da rientrare nel bilancio della spesa energetica sostenibile dalla specie. Specie con quote di sonno giornaliere elevate dovrebbero avere un'elevata aspettativa di vita, dato che beneficiano di una riduzione del metabolismo durante il sonno. In realtà è proprio vero il contrario: le specie che dormono più a lungo hanno tipicamente vita più breve. Inoltre esse tendono ad essere di piccola taglia e ad avere un elevato metabolismo basale o di riposo per unità di peso corporeo, con un'impressionante indice di correlazione (0,63) tra quantità di sonno e tasso metabolico. La pressione al sonno, quindi, risulta invece minore nelle specie più grandi, a causa delle maggiori riserve energetiche e della minore conduttanza termica (più basso rapporto superficie-volume) (Zepelin et al, 2005).

Il sonno è stato definito come la fase consumatoria di un tipico comportamento istintivo da G. Moruzzi (1969), la cui fase appetitiva è costituita dalla veglia., caratterizzata dalla ricerca di una nicchia ecologica sicura e termicamente confortevole e nella preparazione del corpo (anche attraverso la tipica attività di pulizia che l'animale compie o *grooming*) per la postura naturale del sonno (Parmeggiani, 2005; Zepelin et al, 2005).

La fase appetitiva del comportamento dipenderebbe da un bisogno interno all'organismo, in genere derivante da necessità omeostatiche, ovvero corrisponderebbe alla crescita della pressione omeostatica di una variabile fisiologica, che la fase consumatoria riporterebbe ai valori basali (Moruzzi, 1969).

Quindi, le regolazioni fisiologiche possono includere l'utilizzo di una risposta comportamentale per compensare o evitare perturbazioni dei parametri omeostatici di origine interna o ambientale. Sul piano comportamentale si può cioè osmoregolare (tramite l'assunzione di acqua e cibo), termoregolare (tramite comportamenti motori, volti alla ricerca di ambienti protetti o zone d'ombra, o all'istituzione di comportamenti sociali, quali il raggrupparsi insieme ad altri individui), regolare il metabolismo (comportamento alimentare).

Moruzzi utilizzò il livello dell'attività reticolare per riconoscere: a) comportamenti che richiedono tono reticolare elevato (comportamenti di veglia); b) comportamenti che si verificano con tono reticolare ridotto (comportamenti di sonno). Tuttavia, nel 1972 Parmeggiani avanzò l'ipotesi che fosse la dualità del sonno ad adattarsi più pienamente alle caratteristiche fenomenologiche del comportamento e propose che il sonno ad onde lente o NREM costituisse la fase appetitiva e il sonno REM la fase consumatoria del comportamento istintivo (Parmeggiani et al., 1973)

La variabile fisiologica regolata dal comportamento sonno (inteso nel suo insieme o nelle sue fasi) rimane comunque ad oggi sconosciuta.

Attività elettrica cerebrale nel ciclo veglia-sonno

Vari tipi di ritmi cerebrali caratterizzano la veglia, il sonno NREM e il sonno REM. In particolare, da un punto di vista elettroencefalografico, si distinguono nettamente il sonno NREM da un lato e la veglia e il sonno REM dall'altro (Steriade, 2005).

Il ritmo elettroencefalografico del sonno NREM è caratterizzato da tre tipi di oscillazioni:

a) Fusi (7-14 Hz): onde di ampiezza progressivamente crescente e poi decrescente, raggruppate in sequenze di 1-2 sec; ricorrono periodicamente con un ritmo lento di 0,1-0,3 Hz. Generati a livello talamico, la corteccia svolge comunque un ruolo importante nella loro sincronizzazione e nella loro comparsa, virtualmente simultanea in ampie regioni talamiche e corticali, in cui gioca un ruolo fondamentale il polo rostrale del complesso nucleare reticolare GABAergico. I fusi rappresentano un fenomeno di plasticità sinaptica, ovvero un meccanismo attraverso il quale tracce mnesiche, acquisite durante la veglia, sono consolidate durante il sonno NREM (esperimenti nella specie umana mostrano incremento della densità dei fusi dopo un training su un compito di apprendimento legato alla memoria dichiarativa ed inoltre un miglioramento notturno delle capacità discriminative dovuto agli stadi precoci di sonno).

b) Onde Delta (1-4 Hz): appaiono in stadi di sonno più tardivi, sono caratterizzate da due componenti. Una componente *corticale*, che sopravvive alla talamectomia totale, è caratterizzata dalla presenza di complessi-K (caratteristici dello stadio 2 nella specie umana: stessi stimoli che producono risveglio nello stadio 1, spesso risultano in un complesso-K evocato, in assenza di risveglio, nello stadio 2). Una componente *talamica*, stereotipata, ritmica, risulta dall'interazione, conseguente ad iperpolarizzazione, tra due correnti intrinseche (I_h e I_t) di neuroni di relais talamo-corticali.

Nei neuroni talamo-corticali, le onde delta appaiono ad un potenziale di membrana più iperpolarizzato rispetto ai fusi. Per cui, con l'incrementare dell'iperpolarizzazione di cellule talamo-corticali durante il sonno, a causa del progressivo ridursi della frequenza di scarica di neuroni attivanti troncoencefalo-talamici (in particolare colinergici), la frequenza e l'ampiezza dei fusi sono ampiamente diminuite durante gli stadi profondi di sonno, mentre le onde delta talamiche aumentano gradualmente. Verso la fine del periodo di sonno NREM, la ricomparsa dei fusi è attribuibile ad una depolarizzazione relativa delle cellule talamo-corticali, per l'incrementata frequenza di scarica di neuroni reticolari troncoencefalo-talamici (i quali mostrano incremento dell'attività di scarica spontanea da 30 a 60 secondi prima dell'inizio del SREM).

c) Onde lente (0,5-1 Hz): sono un fenomeno corticale; neuroni corticali (molti di essi con afferenze ed efferenze talamiche e callosali) lungo gli strati II - VI mostrano un'oscillazione spontanea, consistente in prolungate componenti depolarizzanti e iperpolarizzanti. Tutte le maggiori classi cellulari della corteccia cerebrale presentano l'oscillazione lenta; nell'ambito dell'EEG, l'onda verso l'alto coincide con una iperpolarizzazione dei neuroni corticali, il picco verso il basso con una depolarizzazione (a meno che non si tratti di una sinapsi superficiale).

Sebbene la suddivisione dei ritmi EEGrafici in tre categorie (fusi, onde delta, onde lente) sia utile a scopo didattico, in realtà in cervelli umani e animali intatti, le onde durante il sonno NREM non si possono considerare isolate, ma vengono modulate e raggruppate dalla oscillazione lenta, generata a livello corticale.

Tuttavia, l'oscillazione lenta raggruppa anche ritmi rapidi (beta/gamma), tradizionalmente associati a veglia e sonno REM. Infatti, i ritmi rapidi (20-50 Hz), essendo voltaggio dipendenti, si manifestano durante la fase di depolarizzazione dell'onda lenta. Più in particolare, onde rapide, localizzate spazialmente, sono presenti nell'attività elettrica di background, senza necessariamente richiedere specifici stimoli sensoriali, in tutti gli stati di vigilanza, incluso il sonno NREM e l'anestesia profonda, con sospensione della coscienza. Esse dipendono dalla depolarizzazione di neuroni talamici e corticali, che si verifica in maniera transitoria (ma, appunto, prevedibile) durante la fase di depolarizzazione dell'onda lenta, e in maniera continua durante gli stati di incremento tonico dell'eccitabilità cerebrale (veglia e sonno REM). Quindi non sono generate esclusivamente a livello corticale, ma coinvolgono anche neuroni talamici, e vengono sincronizzate in reti cortico-talamiche.

Per concludere, durante il sonno NREM, diversi ritmi (sia di bassa sia di elevata frequenza) vengono raggruppati in sequenze complesse di onde dall'oscillazione lenta.

Durante il sonno REM, l'EEG di fondo è caratterizzato da attività a frequenza mista e di basso voltaggio (Walczak e Chokroverty, 2000). Sono spesso presenti frequenze alfa (8-14 Hz): a partenza dalle regioni posteriori del cervello, sono caratteristiche della veglia quieta ad occhi chiusi; durante il sonno REM, di solito, hanno una frequenza inferiore di 1-2 Hz a quella tipica del ritmo del soggetto in stato di veglia. Caratteristiche *onde a dente di sega* possono essere osservate in corrispondenza del vertice o delle regioni frontali, con una frequenza di 2-3 Hz (Peraita-Adrados, 2005; Walczak e Chokroverty, 2000), che secondo alcuni autori si colloca nel rango del ritmo theta (4-8 Hz per alcuni studiosi, mentre altri includono anche la banda che va da 2 a 4 Hz). In studi di registrazione con elettrodi profondi, il ritmo theta ippocampale, un ritmo regolare alla frequenza di 4-8 Hz, costituisce uno dei correlati tipici del sonno REM (Rodenbeck et al., 2006). Vi sono studi, condotti a livello del nucleo genicolato laterale del gatto, che indicano come le onde nella banda di frequenza alfa e theta possano condividere una base cellulare comune (Rodenbeck et al., 2006).

La sostituzione del ritmo sincronizzato, caratteristico del sonno NREM, con l'attivazione dell'EEG, durante gli stati di veglia e sonno REM, è associata ad una facilitazione della trasmissione sinaptica attraverso le più importanti stazioni di relais talamiche. La formazione reticolare troncoencefalica potrebbe avere un ruolo importante nel bloccare i ritmi EEG di bassa frequenza: proiezioni colinergiche troncoencefaliche (dalla formazione reticolare mesencefalica nella regione del nucleo peribrachiale) agirebbero sia attraverso un'eccitazione diretta dei neuroni talamo-corticali, sia mediante un'inibizione dei neuroni reticolari talamici (che costituiscono il pacemaker dei fusi), con conseguente disinibizione dei neuroni talamo-corticali e blocco dei fusi. La depolarizzazione prolungata delle cellule talamo-corticali in risposta alla stimolazione colinergica troncoencefalica si associa dunque ad attivazione elettroencefalografica, con analogo evoluzione temporale, e ad un incremento dell'eccitabilità neuronale. Quest'associazione è considerata alla base del passaggio dallo stato di sonno del "closed brain" allo stato attivato, caratterizzato da attività di scarica tonica ed aumentata responsività a livello sinaptico (Steriade, 2005).

Durante il sonno REM, inoltre, il ruolo della formazione reticolare rostrale nell'attivazione dell'EEG (caratteristico della veglia) si esplica in maniera sinergica con il ruolo giocato dalle proiezioni al talamo dei neuroni reticolari bulbari, che costituiscono una fonte di attivazione aggiuntiva (la distruzione della formazione reticolare mesencefalica è stata trovata, infatti, essere più efficace nel peggiorare l'attivazione dell'EEG durante la veglia che nel sonno REM). Questi neuroni reticolari bulbari proiettano a nuclei talamici a proiezione corticale diffusa e incrementano significativamente la loro frequenza di scarica approssimativamente 30-60 secondi prima del primo segno di attivazione dell'EEG durante la transizione da ritmo sincronizzato a sonno REM (Steriade, 2005).

Durante entrambi gli stati di attivazione elettroencefalografica (veglia e sonno REM), l'attivazione colinergica della corteccia cerebrale aumenta. Il meccanismo che soggiace a questo fenomeno è ancora in corso di studio: i neuroni talamo-corticali, infatti, usano aspartato o glutammato, non acetilcolina. Tuttavia, esistono evidenze che documentano l'esistenza di proiezioni dirette da parte del core della formazione reticolare del tronco dell'encefalo rostrale ai nuclei colinergici del prosencefalo basale, che sono noti avere proiezioni corticali diffuse. Quindi, oltre all'attivazione non colinergica talamo-corticale, esiste un'attivazione colinergica da parte di neuroni del prosencefalo basale, guidati da neuroni reticolari troncoencefalici (Steriade, 2005).

Fenotipo chimico dei neuroni implicati nel controllo del ciclo veglia-sonno

I sistemi neuronali che governano l'alternanza ciclica tra sonno e veglia sono contenuti nel core cerebrale, in una zona che si estende dal bulbo, attraverso il tronco dell'encefalo e l'ipotalamo, fino al prosencefalo basale. Nessuna struttura in questo core si è dimostrata coinvolta in maniera unitaria o monolitica nel controllo di uno stato comportamentale. Al contrario, neuroni diversi nell'ambito della stessa struttura o campo di cellule sono importanti per il sonno o per la veglia. Tuttavia, nonostante tale commistione di neuroni "sleep-active" e "wake-

active", regioni diverse presentano una differente concentrazione di tali fenotipi. Appare evidente che i neuroni implicati nel mantenere lo stato di attivazione sono concentrati nel tegmento pontino orale e centrale del mesencefalo, ma anche a livello dell'ipotalamo posterolaterale (in strutture che presentano un'estesa sovrapposizione con i sistemi che regolano il simpatico autonomo), mentre cellule che esercitano un'importante influenza nel promuovere il sonno sono concentrate sulla linea mediana del tronco dell'encefalo (nucleo del tratto solitario) e a livello della formazione reticolare dorsolaterale del bulbo, oltre che nell'area preottica - ipotalamica anteriore (PO-AH) (forte sovrapposizione rispetto ai sistemi regolatori autonomi, particolarmente parasimpatici), con possibile mescolanza dei due fenotipi nel prosencefalo basale. Così come, inoltre, cellule con differenti profili di attività e distinti ruoli funzionali primari sono codistribuite in tali regioni, cellule con diverse proiezioni, ascendenti e discendenti, sono frammiste nella stessa area, potendo quindi modulare l'attività sia del prosencefalo sia del midollo durante il ciclo veglia-sonno (Jones, 2005).

Allo stesso modo, cellule contenenti differenti sostanze neuroattive sono frammiste nelle stesse regioni. La specificità di azione, dunque, deriverà non solo dal profilo di attività e dal tipo di proiezioni, ma anche dal fenotipo neurotrasmettitoriale. Sebbene non sia possibile attribuire una specificità di regolazione comportamentale ai piccoli neurotrasmettitori aminoacidici (glutammato, GABA), che sono presenti e agiscono a livello di una grande varietà di circuiti neurali locali, tale concetto si può applicare ai neurotrasmettitori, o meglio neuromodulatori, aminici, incluse catecolamine, acetilcolina, istamina e serotonina, che sono contenute in ristretti aggregati neuronali a livello del core reticolare e inviano estese proiezioni sia al prosencefalo sia al midollo spinale. Questi sistemi possono simultaneamente influenzare o modificare l'attività di intere popolazioni neuronali nel contesto del sistema nervoso centrale. Inoltre, molecole peptidiche (*sostanza P*, *peptide intestinale vasoattivo* (VIP), *neurotensina*, *fattori ipofisari di rilascio della corticotropina* (CRH) e *della tireotropina* (TRH), *oressina* o *ipocretina*, su un versante e peptidi oppiacei quali *encefalina* e *beta-endorfina*, *somatostatina*, *cortistatina*, *galanina*, *fattore di*

rilascio dell'ormone della crescita (GHRH) sull'altro) possono fungere da neuromodulatori o anche neurormoni e rendersi responsabili di alterazioni anche prolungate dell'attività neuronale, quali quelle che possono sottostare al ciclo veglia-sonno e al mantenimento dei rispettivi stati comportamentali. Ad oggi, comunque, nessuno specifico neurotrasmettitore, neuromodulatore o neurormone è stato identificato come necessario o sufficiente per la generazione e il mantenimento del sonno o della veglia, ma, al contrario, i fattori e i sistemi coinvolti sono molteplici (Jones, 2005).

Meccanismi ipotetici del controllo nervoso del sonno nei mammiferi

Vi sono evidenze dell'esistenza di meccanismi in grado di promuovere il sonno a tutti i livelli del neurasse, includendo sia il prosencefalo sia il tronco dell'encefalo. Strutture presenti a tutti i livelli del sistema nervoso dei mammiferi, dalla neocorteccia al bulbo, hanno quindi la capacità di facilitare stati comportamentali di sonno e di veglia e di modulare la quantità di sonno.

Esperimenti di lesione, condotti a molteplici livelli, comprendenti il bulbo, il mesencefalo, l'area preottica (POA), il talamo e l'intera neocorteccia, hanno prodotto tutti una riduzione marcata della quantità di sonno NREM, suggerendo che questo stato richiede l'attività di processi funzionali inibitori a tutti i livelli del cervello (McGinty e Szymusiak, 2005). D'altra parte, il ponte si è dimostrato una regione cruciale nella genesi del sonno REM, in quanto sufficiente a generarne i segni pontini (il pattern periodico delle onde ponto-genicolo-occipitali, PGO, e la caratteristica attività neuronale irregolare), tuttavia è altrettanto evidente che il ponte da solo non genera il sonno REM, in quanto l'atonia richiede l'attivazione di sistemi inibitori dell'attività motoria a livello del bulbo e soprattutto, nell'animale intatto, i meccanismi prosencefalici interagiscono con i meccanismi pontini nel regolare l'ampiezza e la periodicità delle onde PGO (Siegel, 2005).

Un interesse crescente si sta focalizzando sui neuroni considerati "sleep-active" della POA e sull'interazione di tale area con i gruppi neuronali "wake-

active" localizzati nella formazione reticolare pontina e mesencefalica, nonché a livello dell'ipotalamo posteriore (area ipotalamica posteriore, PHA) e laterale (area ipotalamica laterale, LH) e del prosencefalo basale (BF dall'inglese "Basal Forebrain"). Questo modello è supportato da dati derivanti da una estesa varietà di metodiche sperimentali, incluse lesioni, registrazioni dell'attività neuronale, stimolazioni locali di tipo chimico, elettrico e termico, marcatori per le vie nervose e, infine, risposte a manipolazioni fisiologiche del sonno (McGinty e Szymusiak, 2005).

L'esistenza di un'area a livello della POA in grado di favorire il sonno fu proposta per la prima volta più di 70 anni fa sulla base dell'osservazione che, in pazienti con encefalite e insonnia severa, erano state riscontrate dopo il decesso lesioni infiammatorie in quest'area; mentre pazienti con ipersonnia avevano mostrato lesioni in corrispondenza della PHA. Queste osservazioni hanno suggerito il concetto della presenza a livello ipotalamico di opposti meccanismi, favorenti rispettivamente il sonno e la veglia. Transezioni bilaterali e simmetriche in ratti sono state seguite da completa insonnia se praticate a livello della POA, da continua sonnolenza se praticate in corrispondenza della PHA. In questo secondo caso, la veglia poteva essere comunque indotta da stimoli sensoriali, come nel sonno normale. Peraltro, presentavano sonnolenza continua anche ratti in cui venivano praticate entrambe le transezioni. Questo venne interpretato come dovuto ad una modalità di interazione in cui la POA in condizioni normali inibirebbe la regione attivante la veglia sita nella PHA (McGinty e Szymusiak, 2005).

Uno studio recente ha suggerito che l'insonnia prodotta da lesioni della POA sia dovuta alla distruzione di neuroni contenenti galanina a livello della porzione ventrolaterale della POA (nucleo preottico ventrolaterale, VLPO). Questo insieme di cellule è stato inizialmente identificato in quanto contiene neuroni esprimenti la proteina c-Fos durante il sonno. In realtà, nessuno ha potuto dimostrare che lesioni specificamente limitate ad un particolare nucleo o sottoregione della POA producano una significativa alterazione ipnica, piuttosto la severità della perdita di sonno in seguito a lesioni della POA che interessino o che

risparmino il VLPO sembra essere correlata con il volume totale della lesione. Il concetto di un sistema del sonno diffuso a livello della POA è supportato da studi elettrofisiologici e immunoistochimici (McGinty e Szymusiak, 2005).

Vale qui la pena di sottolineare che le lesioni della POA risultano anche in anomalie transitorie del comportamento alimentare, del peso corporeo e della termoregolazione, ma l'insonnia supera di gran lunga per durata tali alterazioni: questo sta ad indicare da un lato la complessità funzionale di questa regione, dall'altro che l'insonnia indotta negli esperimenti di lesione non è secondaria a tali ulteriori deficit (McGinty e Szymusiak, 2005).

McGinty e Szymusiak hanno proposto un modello di interazione dei sistemi "sleep-active" della POA con sistemi neuronali "wake-active" per spiegare l'orchestrazione del processo del sonno da parte della POA (McGinty e Szymusiak, 2005).

I neuroni "sleep-active" della POA sono GABAergici e distribuiscono proiezioni discendenti verso gruppi neuronali correlati alla veglia a livello di mesencefalo, PHA e LH. Il rilascio di GABA è incrementato durante il sonno NREM ed ancor più in REM in corrispondenza della PHA, del nucleo dorsale del rafe (DR) e del locus coeruleus (LC), tutti siti correlati alla veglia.

L'attivazione di neuroni sensibili alla stimolazione termica (warm-sensitive) durante il sonno può essere uno dei meccanismi alla base dell'inibizione dei sistemi della veglia. La stimolazione locale di tali neuroni provoca l'inibizione di neuroni "wake-active" in corrispondenza della PHA, del DR e del LC.

L'inattivazione reversibile o lesioni della PHA neutralizzano l'insonnia conseguente a lesioni della POA, suggerendo che le proiezioni ad attività favorente il sonno della POA siano dirette a neuroni della PHA con funzioni promuoventi la veglia.

Inoltre, neuroni "sleep-active" appartenenti a due nuclei della POA, il VLPO e il nucleo preottico mediano (MnPO), esibiscono profili di scarica lungo il ciclo veglia - sonno NREM - sonno REM che sono reciproci rispetto a quelli dei neuroni "wake-active" dei gruppi istaminergico della PHA, serotoninergico del

DR, noradrenergico del LC e di neuroni non identificati nel campo neuronale oressinergico della LH.

Tutte queste evidenze supportano l'ipotesi che i neuroni "sleep-active" della POA inibiscono molteplici sistemi di veglia (McGinty e Szymusiak, 2005).

I neuroni GABAergici della regione VLPO sono inibiti da acetilcolina, serotonina e norepinefrina, neurotrasmettitori dei sistemi di vigilanza. I neuroni del MnPO sono inibiti dalla norepinefrina (McGinty e Szymusiak, 2005).

Quindi, i sistemi che promuovono rispettivamente il sonno e la veglia si possono considerare come mutuamente inibitori, suggerendo un modello di alternanza veglia-sonno a "flip-flop". L'attivazione, cioè, dei sistemi di vigilanza inibirebbe i neuroni "sleep-active", rimuovendo così l'inibizione da essi esercitata e facilitando di conseguenza episodi stabili di veglia. D'altra parte, l'attivazione di neuroni "sleep-active" inibirebbe i neuroni "wake-active", rimuovendo l'inibizione sui neuroni del sonno, con il risultato di rinforzare e consolidare gli episodi di sonno. Un modello come questo fornisce un meccanismo per la stabilizzazione sia dello stato di veglia sia dello stato di sonno. Alterazioni in una o più delle componenti di tale sistema risulterebbero in un ciclo veglia-sonno instabile, una caratteristica tipica dei disordini del sonno in cui è presente insonnia, o sull'altro versante in patologie quali la narcolessia (McGinty e Szymusiak, 2005).

La POA presenta caratteristiche anatomiche e fisiologiche che possono porre le basi per l'orchestrazione delle componenti principali del processo del sonno. Il sistema promuovente il sonno della POA può regolare il pattern elettroencefalografico attraverso due vie, una rappresentata da proiezioni dirette al talamo, l'altra dall'azione inibitoria sui neuroni monoaminergici e oressinergici che a loro volta inviano proiezioni al talamo. Poiché l'attività di tali neuroni facilita la depolarizzazione talamica, la loro inibizione risulta nell'iperpolarizzazione dei neuroni talamici, con conseguente attivazione delle correnti di membrana voltaggio-dipendenti che sono alla base dell'attività dei fusi e dell'attività ad onde lente.

L'inibizione GABAergica delle aree PHA e LH, implicate nell'attivazione motoria e autonoma, fornisce una base funzionale per l'inattivazione di tali funzioni durante il sonno. In particolare, la POA potrebbe svolgere un'azione facilitante sugli episodi di sonno REM attraverso la parziale inibizione dei neuroni serotoninergici e noradrenergici che si verifica in sonno NREM. E' stato proposto che tale inibizione possa innescare l'attivazione dei circuiti neuronali troncoencefalici che a loro volta generano il sonno REM (McGinty e Szymusiak, 2005).

A livello della POA è anche presente un nucleo, il soprachiasmatico (Sch), che costituisce un importante substrato del pattern circadiano del ciclo veglia-sonno. Un sito di proiezione primario del Sch, la zona subparaventricolare, lesioni della quale provocano la scomparsa del ritmo circadiano del ciclo veglia-sonno, proietta a sua volta a VLPO, MnPO e ad altre regioni della POA in maniera indiretta attraverso il nucleo ipotalamico dorsomediale (DM) e invia proiezioni dirette al MnPO. Sono state identificate anche vie che vanno dal Sch a VLPO e MnPO passando per l'area preottica mediale (MPA). In animali diurni, l'efferenza dal Sch potrebbe inibire i neuroni "sleep-active" durante la fase di luce oppure avere su di essi un'azione facilitante nella fase di buio del ciclo luce-buio (McGinty e Szymusiak, 2005).

Un ruolo centrale della POA nell'orchestrazione del sonno è quindi supportato da tutta una serie di evidenze, inclusa l'insorgenza di insonnia nella specie umana in associazione con processi neuropatologici che coinvolgono la POA. Tuttavia, un comportamento simile al sonno può essere generato da un rombencefalo isolato e, d'altronde, il sonno è facilitato da mesencefalo, talamo e neocorteccia. Per dare un'interpretazione unitaria di tutta questa serie eterogenea di dati, può essere utile, secondo la visione di McGinty e Szymusiak, prendere in considerazione un concetto di controllo gerarchico, come quello che è già stato applicato alla termoregolazione. In questa concettualizzazione, un comportamento fondamentale, quale il ciclo attività-riposo o veglia-sonno è organizzato a tutti i

livelli del nevrasse, così come cicli di attività-riposo sono presenti in tutti gli ordini di animali. La POA può agire come sito principale di regolazione, integrando i circuiti del sonno con i processi omeostatici del sonno (si veda il prossimo paragrafo), oltre che con altri sistemi di regolazione comportamentale e ormonale e con segnali circadiani. Il sistema limbico e la neocorteccia costituiscono probabili ulteriori fonti di regolazione, correlate a contingenze comportamentali più complesse, comprendenti comportamenti appresi (come la localizzazione di tane sicure), comportamenti istintivi e stimoli sensoriali. Queste informazioni possono poi convergere sull'ipotalamo mediante proiezioni dalla neocorteccia e dal sistema limbico (McGinty e Szymusiak, 2005).

Omeostasi *del* sonno

L'esistenza di un elevato numero di circuiti responsabili del controllo del ciclo veglia-sonno può essere ben compresa nell'ambito di un'organizzazione di carattere fondamentale, quale quella rappresentata dall'esistenza di un fine controllo omeostatico del sonno (Tobler, 2005)

Il concetto di omeostasi, definito in ambito fisiologico da Cannon nel 1929 come "l'insieme coordinato dei processi fisiologici che mantengono molti degli *stati* organici in condizioni di stabilità" (Cannon, 1929), venne applicato per la prima volta al sonno da Borbély nel 1980, che postulò che il sonno tende a mantenersi ad un livello costante variando la sua *durata* e la sua *intensità* (Borbély, 1980).

Egli delineò un modello di regolazione basato su due processi:

a) processo S o processo omeostatico del sonno (inteso come NREM), che incrementa durante la veglia, per poi declinare durante il sonno, tale che un deficit di sonno induce un incremento compensatore in termini di intensità e durata, mentre un eccesso riduce la propensione al sonno: è come se vi sia una pressione al sonno, che viene mantenuta entro un range delimitato da una soglia minima e una massima;

b) processo C o circadiano, indipendente dalla veglia e dal sonno, che contribuisce alla modulazione della distribuzione temporale degli episodi e della propensione al sonno (Borbély e Achermann, 2005)

Accanto dunque ad un'omeostasi delle variabili fisiologiche all'interno del sonno, inteso come stato comportamentale, esiste quindi una regolazione omeostatica del sonno, inteso esso stesso come variabile omeostaticamente regolata.

Un parametro (elettro)fisiologico utilizzato come indicatore dell'omeostasi del sonno NREM è costituito dalla attività elettroencefalografica ad onde lente (SWA nell'acronimo inglese, da "Slow Wave Activity"), equivalente all'attività delta, che comprende componenti dello spettro di frequenze elettroencefalografiche approssimativamente nel rango 0,5-4,5 Hz (si veda paragrafo *Meccanismi del sonno: attività elettrica cerebrale*). E' plausibile assumere che il "bisogno di sonno" sia alto durante la parte iniziale dell'episodio di sonno e gradualmente declini con il progredire di quest'ultimo: in accordo con questo assunto, soglia di risveglio e SWA sono entrambe elevate all'inizio, per poi decrescere con il proseguire dell'episodio di sonno (Borbély e Achermann, 2005). Inoltre, un gran numero di studi mostra che la soppressione del sonno ad onde lente determina un cospicuo incremento della SWA durante il successivo recupero (Borbély e Achermann, 2005). Da questa mole di dati, sia umani sia animali (Tobler, 2005), si evince che la SWA non è un mero epifenomeno del sonno, ma ne riflette importanti meccanismi di regolazione. Non è peraltro chiaro se siano lo stato di veglia in sé (inteso come assenza di sonno) o aspetti specifici dello stato di veglia ad essere responsabili dell'incremento della SWA (Tobler, 2005).

Correlati omeostatici sono stati trovati anche nell'EEG di veglia, in particolare l'attività theta (5,5-9,0 Hz): la potenza della banda theta correla positivamente con la sonnolenza ed è aumentata in seguito a deprivazione parziale o totale di sonno (Borbély e Achermann, 2005).

Un indicatore elettrofisiologico di intensità, comparabile alla SWA per il sonno ad onde lente (NREM), non è invece stato trovato per il sonno REM.

L'attività alfa (8,0-11,0 Hz) nella specie umana sembra piuttosto avere una correlazione inversa con la pressione al sonno REM e con la frazione del ciclo di sonno occupata dalla fase REM (Borbély e Achermann, 2005).

Il modello di regolazione di Borbély, basato sull'interazione dei processi S e C, con le sue successive elaborazioni, ha rivelato una stretta aderenza tra i dati empirici e i dati simulati, concernenti la SWA e il decorso temporale del sonno ad onde lente, in particolare il modello è in grado di predire le modificazioni indotte dal prolungamento della veglia o del sonno.

La distribuzione temporale del sonno (come anche peraltro le modificazioni dei livelli di vigilanza) è governata dall'interazione dei processi S e C. Durante la veglia, la crescente pressione omeostatica al sonno sembra essere compensata da un declino circadiano della propensione al sonno. Viceversa, durante il sonno, l'aumentare della propensione circadiana al sonno può servire a neutralizzare il progressivo ridursi della pressione omeostatica, assicurando così il mantenimento del sonno (Borbély e Achermann, 2005).

Nonostante vari modelli matematici si siano focalizzati sull'omeostasi del sonno NREM, sull'interazione tra sonno NREM e REM e sull'oscillatore circadiano, l'omeostasi del sonno REM è stata ampiamente trascurata. Da studi di deprivazione selettiva di sonno REM nella specie umana, sono scaturite due osservazioni importanti, ma difficili da conciliare tra loro: da una parte il notevole incremento, con il progredire della deprivazione durante la notte, della frequenza di interventi necessari a prevenire l'insorgenza di questo stato (indicativo di una forte pressione al sonno REM); dall'altra il soltanto modesto aumento nel numero di interventi necessari nelle successive tre notti di deprivazione e, soprattutto, la comparsa di un recupero di sonno REM del 40% durante la prima notte di recupero, insufficiente a compensare la quantità perduta durante la deprivazione (Borbély e Achermann, 2005). Sono state avanzate due ipotesi:

a) la pressione omeostatica per il sonno REM sarebbe forte, e questo spiegherebbe l'incremento del numero di risvegli imposti per impedire il suo manifestarsi; la veglia, d'altra parte, potrebbe parzialmente supplire al sonno

REM, giustificando il solo modesto incremento, durante le successive notti di deprivazione, del numero di interventi volti a prevenire l'insorgere di episodi REM, nonché il recupero modesto;

b) la pressione omeostatica per il sonno REM sarebbe debole, quindi l'incremento progressivo del numero di interventi andrebbe attribuito a fattori circadiani, oltre che ad una disinibizione della propensione al REM legata al sonno; questa visione darebbe conto del limitato incremento del numero di interventi tra le notti, nonché del recupero modesto (Borbély e Achermann, 2005).

Come risulta da quanto precedentemente esposto, il sonno NREM tende a regolare la sua omeostasi prevalentemente tramite variazione del parametro *intensità*: per molte specie, impegnarsi in lunghi periodi di sonno (o di veglia) durante la fase circadiana non pertinente può essere sfavorevole sul piano adattativo. In linea generale, un deficit di sonno viene compensato solo con lievi incrementi del tempo totale di sonno (Tobler, 2005).

La deprivazione sia totale sia selettiva di sonno REM suscita un susseguente incremento compensatore della quantità di sonno REM in una grande varietà di specie, inclusi gatto, cane, ratto, topo, mucca (Tobler, 2005). Il recupero di REM si riflette dunque sul parametro *durata* (Cerri et al., 2005).

In particolare, la quantità giornaliera di sonno REM è suddivisibile in una quota obbligata, che se perduta deve essere recuperata, e una quota facoltativa, che anche se perduta non deve essere recuperata; se la deprivazione intacca la quota obbligata si ingenera un "debito" specifico di sonno, che viene "pagato" durante il recupero, assieme alla quota obbligata di quest'ultima condizione (Parmeggiani et al., 1969; Parmeggiani e Rabini, 1970). Nel gatto, la quota obbligata ammonterebbe ai due terzi della quota totale oraria e, ovviamente, quella facoltativa, a un terzo (Parmeggiani et al., 1980).

Un ulteriore aspetto dell'omeostasi del sonno REM è che il recupero avviene aumentando non la durata ma il numero (frequenza) dei singoli episodi (Cerri et al, 2005).

Non è invece chiaro se il sonno REM si caratterizzi anche per una dimensione *intensità*, sebbene vi siano dati, nel ratto e nel topo, che mostrano un

potenziamento dell'attività theta durante il REM dopo 24 ore di deprivazione ipnica, associato ad un progressivo decremento durante il successivo recupero (Tobler, 2005; Cerri et al., 2005).

Omeostasi *nel* sonno

Secondo il principio dell'omeostasi, l'essere vivente è visto come un sistema aperto, che ha numerose relazioni con l'ambiente che lo circonda. Cambiamenti nelle condizioni ambientali provocano disturbi all'interno di questo sistema, i quali vengono generalmente confinati entro limiti ristretti, grazie a correzioni automatiche che prevengono oscillazioni ampie dei principali parametri fisiologici che, grazie a queste reazioni, sono mantenuti a valori pressoché costanti. Per designare la costanza di tali condizioni, si potrebbe parlare di *equilibrio*, ma questo termine risulta essere di più proprio utilizzo se impiegato per stati chimico-fisici relativamente semplici caratterizzati da forze note che si bilanciano in sistemi chiusi. Nel designare le reazioni di natura fisiologica, piuttosto che fisica, volte a mantenere la costanza dell'ambiente interno (Bernard, 1878-9), Cannon derivò il termine di omeostasi, dal greco *hómoios* 'simile' e *stásis*, 'condizione' (Cannon, 1929).

La regolazione omeostatica delle variabili fisiologiche fu portata nell'ambito del sonno da Parmeggiani e Rabini che, nel 1967, osservarono che il sonno REM era caratterizzato dalla sospensione della regolazione della temperatura corporea. Poiché la termoregolazione è soprattutto regolata a livello ipotalamico, la sua abolizione fu interpretata come segno di una modificazione dell'attività integrativa di questa struttura. Questa interpretazione spiegava anche la possibile origine delle anomalie dell'intera regolazione autonoma, che si manifestano in concomitanza della comparsa e durante il sonno REM (Parmeggiani, 2003).

La termoregolazione dipende dagli stati comportamentali

La temperatura corporea (T_c) appare regolata a livelli più bassi nel sonno NREM rispetto alla veglia e non efficacemente controllata durante il passaggio da sonno NREM a sonno REM (Heller, 2005). Tuttavia, i dati sperimentali indicano che lo schema generale appena delineato è forse più complesso di quanto possa a prima vista apparire, sia per il tipo di risposta termoregolatoria, sia per la specie considerata. Per esempio, l'aumento della temperatura ambientale (T_a) provoca una polipnea termica nel sonno NREM di grado maggiore rispetto alla veglia, ma non suscita questa risposta durante il sonno REM fino a che l'incremento di T_a non risulta abbastanza elevato: il 52% degli episodi di sonno REM sono caratterizzati da polipnea termica nel gatto mantenuto a 35°C (Amini-Sereshki e Morrison, 1988; Heller, 2005).

Al contrario, il brivido, che è presente a T_a bassa in veglia e in sonno NREM, è sempre abolito durante il sonno REM (Heller, 2005). Una modificazione del brivido e della sudorazione in relazione agli stati comportamentali è ampiamente documentata anche nella specie umana. Tuttavia, nell'uomo esposto a bassa T_a il brivido è presente solo negli stadi 1 e 2 del sonno NREM, ma non in quelli 3 e 4 e nel sonno REM. Al contrario, il tasso di sudorazione è più elevato negli stadi 3 e 4 di sonno NREM rispetto agli stadi 1 e 2, declina nella transizione al sonno REM fino a raggiungere un livello minimo dal quale ricomincia a salire nettamente prima che questa fase di sonno sia terminata (Heller, 2005).

La relazione tra stati comportamentali e termoregolazione è ben documentata dalla profonda influenza che la temperatura ambientale esercita sulla struttura del sonno. Parmeggiani e collaboratori sono stati i primi a dimostrare che nei gatti il tempo totale di sonno (TTS) è massimo nella zona termoneutrale e decresce al di sotto e al di sopra della stessa. Inoltre, quando il valore di T_a si allontana dalla termoneutralità, il rapporto NREM - REM incrementa, prevalentemente in seguito a riduzione nel numero di episodi REM (Parmeggiani

et al., 1969; Parmeggiani e Rabini, 1970). Il sonno REM appare dunque più sensibile del NREM a variazioni della Ta al di fuori del rango termoneutrale. Il sonno REM è influenzato dalla Ta anche nel rango termoneutrale: infatti, mentre il sonno NREM non varia sostanzialmente per Ta comprese tra 23 e 31°C, la quantità di sonno REM varia in maniera significativa in questo rango, con un picco spostato verso il limite più elevato della zona termoneutrale (Ta di 29°C) (Szymusiak e Satinoff, 1981).

Il ruolo della PO-AH nella termoregolazione e nel sonno

Un'ampia messe di dati ha permesso di localizzare il principale sistema di controllo della temperatura corporea a livello della PO-AH (Nagashima et al., 2000; Romanovsky, 2007). Questa precisa localizzazione ha anche consentito di dimostrare che le modificazioni della regolazione della temperatura corporea in relazione agli stati comportamentali dipendono da variazioni di attività ascrivibili a questa struttura centrale. Per esempio, Parmeggiani e collaboratori (1973) dimostrarono che il riscaldamento diretto della PO-AH induceva la polipnea termica durante la veglia e il sonno NREM, ma non durante il sonno REM. Allo stesso modo, Glotzbach ed Heller nel 1976 dimostrarono che il raffreddamento diretto della PO-AH provocava un aumento del metabolismo in veglia e in sonno NREM, ma non in sonno REM.

Registrazioni di singole unità hanno mostrato che neuroni verosimilmente termosensibili sono influenzati dallo stato di vigilanza. Innanzitutto, la termosensibilità neuronale risulta in linea generale abolita in sonno REM; fa parzialmente eccezione uno studio in cui i neuroni sensibili al calore si dimostrano meno propensi a perdere la termosensibilità rispetto ai neuroni sensibili al freddo. Inoltre, le registrazioni da singole unità neuronali supportano ampiamente il concetto di una regolazione verso il basso dei meccanismi termoregolatori ipotalamici durante il sonno NREM. La maggior parte dei neuroni sensibili al caldo incrementa la frequenza di scarica spontanea nella transizione da veglia a sonno NREM (e dimostrano al tempo stesso un incremento della

termosensibilità), mentre i neuroni sensibili al freddo si comportano in maniera opposta (McGinty e Szymusiak, 2001; Heller, 2005).

Tutte queste evidenze sperimentali si possono leggere da due punti di vista: uno è che lo stato di vigilanza potrebbe influenzare le reti neurali termoregolatorie, l'altro è che le cellule della PO-AH che partecipano alla regolazione degli stati di vigilanza sarebbero anche sensibili alla temperatura. Questo spiegherebbe gli effetti dei cambiamenti della T_a sul sonno. A supporto di tale ipotesi, numerosi studi hanno mostrato che manipolazioni della temperatura della PO-AH possono influenzare l'attività di cellule in altre aree note come implicate nella regolazione del ciclo veglia-sonno (formazione reticolare nel cane, prosencefalo basale magnocellulare e ipotalamo posteriore e laterale nel gatto, rafe dorsale e ipotalamo laterale nel ratto). Tali evidenze sono a favore di un ruolo chiave giocato dai neuroni della PO-AH sensibili al calore nella regolazione del sonno NREM (Heller, 2005).

Tuttavia, nonostante le prove convincenti del ruolo della PO-AH come sito strategico per la regolazione sia della T_c sia dei livelli di vigilanza, le basi neurali specifiche dell'interazione e dell'integrazione tra sonno e termoregolazione rimangono ancora poco definite (Heller, 2005).

Peraltro, l'interazione tra due regolazioni complesse, come quella termoregolatoria e ipnica, può avere importanti sviluppi perché essa si esplica sia nell'ambito fenomenologico generale, macroscopicamente descrivibile, sia in quello strutturale e funzionale di una sede nervosa, che può consentire approcci e descrizioni microscopiche, che possono andare dai sistemi cellulari a quelli molecolari.

Sul piano strutturale, le tecniche di indagine dei substrati neurali del sonno comprendono esperimenti di lesione (mediante tecniche di aspirazione, transezione del nervo, elettrolisi, riscaldamento localizzato tramite radiofrequenze, iniezione di citotossine), tecniche di stimolazione (elettrica, somministrazione di neurotrasmettitori agonisti e antagonisti grazie a microiniezione diretta o per diffusione attraverso una membrana di microdialisi), studi di registrazione (sia del pattern di rilascio di neurotrasmettitori, raccolti

attraverso un sistema di microdialisi, sia dell'attività elettrica della singola unità neuronale, il cui fenotipo neurotrasmettitoriale può essere identificato mediante l'uso di coloranti intracellulari e la conseguente immunomarcatura dei trasmettitori) (Siegel, 2005).

I due piani sopradescritti possono essere portati a interagire nella deprivazione e recupero di sonno, che rappresentano rispettivamente un'intensificazione fisiologica dei processi e, dunque, dei meccanismi cellulari e molecolari, di veglia e di sonno. Numerosi sono gli studi di deprivazione sia umani sia animali che si sono susseguiti nella storia scientifica del sonno (Horne, 1988). Tale modalità di approccio può essere completata dall'osservazione e analisi del successivo periodo di recupero, il cui interesse deriva principalmente dal fatto che, come abbiamo visto, il sonno è uno stato comportamentale omeostaticamente regolato.

Nel nostro approccio sperimentale al sonno, che si basa sul modello animale del ratto albino, le due prospettive si fondono: ad un modello comportamentale di deprivazione - recupero sono state applicate analisi prima di tipo biochimico, poi di tipo immunostochimico, con lo scopo di mappare i substrati neuronali delle alterazioni omeostatiche e funzionali precedentemente osservate e di fornire un ulteriore approfondimento della conoscenza delle aree funzionalmente implicate nell'alternanza veglia-sonno.

Metodi di deprivazione ipnica

Si può dire che lo studio sistematico della deprivazione ipnica si apra con gli esperimenti di Rechtschaffen nei primi anni '80 sui ratti (Rechtschaffen et al., 1983). Egli ideò un apparato per la deprivazione di sonno costituito da una piattaforma orizzontale rotante di forma circolare e diametro di 45 centimetri, circondata da acqua poco profonda. Una barriera verticale divideva la piattaforma in due metà: su un versante veniva allocato l'animale da deprivare, sull'altro l'animale di controllo. All'occorrenza, la piattaforma veniva fatta ruotare lentamente sotto la barriera e questo obbligava entrambi gli animali a muoversi

per evitare di venire gentilmente spinti nell'acqua circostante: poiché i ratti non amano bagnarsi, essi cercavano di evitare di cadere in acqua. Ogni animale veniva registrato e il suo EEG era costantemente monitorato digitalmente. Ai primi segni elettroencefalografici di sonno dell'animale da deprivare, la piattaforma veniva azionata, causando il risveglio dell'animale, che era costretto a muoversi lungo di essa. Anche il suo partner, che poteva nello stesso momento essere sia sveglio sia addormentato, veniva obbligato parimenti a uno spostamento della stessa entità. In generale, gli animali di controllo perdevano circa il 25% del loro sonno, rispetto al 92% circa degli animali deprivati. Si trattava di una procedura che induceva in entrambi gli animali uno stato di stress, che risultava in analoghi incrementi della secrezione di cortisolo e del peso delle ghiandole surrenaliche (Horne, 1988; Rechtschaffen e Bergmann, 2002; Cirelli et al., 2006)

Questa tecnica, oltre a permettere deprivazioni totali di sonno, consentiva grazie al monitoraggio elettroencefalografico la deprivazione *selettiva* di una fase e venne applicata da Rechtschaffen per la privazione di sonno REM. La piattaforma veniva messa in movimento ai primi segni di transizione NREM - REM, ottenendo in tal modo una deprivazione di sonno REM virtualmente totale (99%).

In realtà, il concetto di deprivazione selettiva non è così lineare: già al tempo di Rechtschaffen, si evidenziarono effetti non voluti della privazione di sonno REM, consistenti nella perdita inevitabile di circa metà del sonno NREM di elevata ampiezza (corrispondente agli stadi 3 e 4 nella specie umana). Anche la deprivazione selettiva del sonno NREM "più profondo" portava con sé una riduzione del 60% circa del sonno REM. Il sonno REM e il sonno NREM più profondo sembrano, quindi, fortemente interconnessi e non si può deprivare totalmente dell'uno senza in qualche modo disturbare l'altro.

L'approccio di Rechtschaffen costituisce un miglioramento della tecnica di deprivazione selettiva di sonno REM ideata da Jouvet, detta del *flower pot*, che sfruttava la scoperta dell'atonìa associata al sonno REM (Vimont-Vicary et al., 1966).

Un'altra tecnica classica di deprivazione è costituita dal metodo della locomozione forzata in tamburo rotante (un cilindro che gira lentamente, compiendo una rivoluzione ogni 45 secondi) di Borbély (Tobler e Jaggi, 1987).

In epoca moderna, le tecniche di deprivazione generalmente utilizzate nei vari laboratori che studiano il sonno non sono molto cambiate nel complesso dai tempi di Jouvet e di Rechtschaffen e Borbély. I metodi del *disc over water* (Cirelli et al., 2006) e del *flower pot* (Maloney et al., 2000; Bignotto et al., 2006), nonché del tamburo rotante (*slowly rotating drum*) (Guo et al., 2004), sono ancora attualmente utilizzati. Il *disc over water* è ancora considerato il sistema più efficace e controllato per indurre deprivazioni prolungate negli animali (Rechtschaffen e Bergmann, 2002).

Una maggiore attenzione si pone però complessivamente nel minimizzare lo stress introdotto con la metodica di deprivazione, con l'intenzione di meglio separare gli effetti dello stress dagli effetti della perdita di sonno. Sempre più utilizzate sono le tecniche cosiddette di manipolazione gentile, utilizzando tutta una serie di stimoli che mantengono sveglio l'animale in maniera delicata: bussare alla parete della gabbia, scuoterla dolcemente (Gvilia et al., 2006a), manipolare delicatamente l'animale (Tobler e Jaggi, 1987), toccarlo delicatamente con la punta di un pennello, passato attraverso la griglia di copertura della gabbia, al momento della chiusura degli occhi (Modirrousta et al., 2004). Il gruppo di Tobler ha ottenuto deprivazioni di 6 ore in ratti introducendo una varietà di oggetti (pezzi di legno, carta e tessuto) nella gabbia oltre che tamburellando sulle pareti ogni qualvolta l'animale si mostrasse sonnolento o comparissero segni di sincronizzazione sull'EEG e inoltre cambiando la gabbia a metà del periodo di deprivazione per fornire una stimolazione addizionale (Vyazovskiy e Tobler, 2005).

Tutte queste tecniche dolci hanno però un evidente limite: non è possibile prolungare la deprivazione con queste modalità per più di poche ore, poiché la pressione al sonno, aumentando progressivamente con il prolungarsi del tempo di deprivazione, diventa rapidamente tale da ridurne drasticamente l'efficacia.

Il nostro laboratorio utilizza l'esposizione a bassa Ta come metodo di deprivazione ipnica; questo equivale a dire che viene sfruttata l'interferenza tra i processi di termoregolazione e i processi di regolazione omeostatica del sonno al fine di arrivare ad una migliore comprensione di questi ultimi.

La scelta di preferire le basse alle alte Ta è basata sulla considerazione che, essendo il valore della temperatura corporea dei mammiferi spostato verso la parte superiore dell'intervallo delle Ta fisiologicamente tollerate, gli studi di esposizione a bassa Ta consentono una più ampia gamma di condizioni sperimentali.

Risultati del nostro laboratorio hanno mostrato che il deterioramento sia del sonno NREM (prevalentemente in termini di decremento della potenza della banda delta) sia del REM (prevalentemente in termini di riduzione del numero degli episodi) dipende dal grado di attivazione termoregolatoria (Cerri et al., 2005). Quindi, il modello dell'esposizione a bassa Ta costituisce uno strumento che consente di esaminare il dato variando l'entità della deprivazione non (solo) tramite variazione della finestra temporale in cui avviene una deprivazione intesa come totale, ma anche grazie alla possibilità di variare l'entità della deprivazione all'interno di un dato periodo di deprivazione, proprio agendo sul *carico termico*.

Conseguenza immediata di questo ragionamento è la possibilità di deprivare lungo tutto l'*arco circadiano*, variando l'entità della deprivazione non in base al tempo di esposizione, ma alla variazione della Ta.

Un altro importante vantaggio offerto da un siffatto modello è quello di utilizzare uno stimolo al quale l'animale può trovarsi esposto nel suo ambiente naturale e per il quale, quindi, la specie ha selezionato, nel corso dell'evoluzione, un sistema di adattamento specifico. Si può considerare un modello *fisiologico* di deprivazione ipnica.

Ancora, esso consente di studiare le modificazioni del ciclo veglia-sonno *durante* il periodo di esposizione, ovvero di deprivazione.

Infine, le osservazioni così acquisite possono essere messe in relazione con le osservazioni effettuate durante la successiva fase di *recupero*.

Il complessivo incremento della veglia durante l'esposizione a bassa Ta può essere considerato, sia su un piano autonomico sia comportamentale, come un mezzo per ottimizzare la termoregolazione. L'incremento dell'attività simpatica che si verifica durante l'esposizione a bassa Ta si oppone al decremento del tono simpatico e al contemporaneo innalzamento del tono parasimpatico che caratterizza il sonno NREM e di conseguenza ne ostacola il manifestarsi. D'altro canto, il deterioramento delle risposte termoregolatorie che contraddistingue il sonno REM può essere considerato alla base della decisa e progressiva inibizione dello stesso, che risulta direttamente proporzionale al carico termico. In una condizione di laboratorio in cui non è possibile mettere in atto risposte termoregolatorie comportamentali, quali rifugiarsi in una tana, raggomitolarsi vicini ai propri compagni o migrare, la inibizione attiva del sonno REM può essere considerata un'alternativa ad un comportamento termoregolatorio (Cerri et al., 2005).

In alcune specie di mammiferi e nell'uomo gli intervalli REM presentano una distribuzione bimodale (Zamboni et al., 1999). Nel ratto, prendendo come riferimento discriminante la durata degli intervalli rappresentati dalla classe di confine tra le due mode, gli intervalli REM sono stati distinti in brevi, se inferiori o uguali a 3 minuti, e in lunghi, se superiori a 3 minuti (Amici et al., 1994); corrispondentemente, gli episodi di sonno REM sono stati suddivisi in episodi *sequenziali*, se separati da intervalli REM brevi, e in episodi *singoli*, se separati da intervalli REM lunghi; gli episodi sequenziali compaiono in aggregati (cluster), ovviamente preceduti e seguiti da un intervallo REM lungo.

Gli effetti più rilevanti dell'esposizione al freddo si sono osservati durante il periodo di luce del ciclo luce-buio. Ricordiamo qui che il ratto è un animale ad attività notturna.

Per esposizioni di 24 h e di 48 h a Ta basse di diversa entità (esposizioni di 24 h a 10°C, 5°C, 0°C e -10°C e di 48 h a 0°C e -10°C), si è visto che il sonno REM si riduce per modificazione della frequenza e non (salvo nelle prime 12 ore di esposizione) della durata media degli episodi. In particolare, il numero di

episodi REM, singoli e sequenziali, decade progressivamente con l'abbassarsi della Ta. La quota più sensibile è quella sotto forma di episodi sequenziali, che virtualmente si azzerava a Ta molto basse (-10°C); quella sotto forma di episodi singoli viene intaccata significativamente solo ai livelli più bassi di Ta. Durante il recupero alla normale Ta di laboratorio (24°C), vi è un incremento di sonno REM, proporzionale al carico termico, che si esplica parimenti in termini di frequenza piuttosto che di durata degli episodi ed è interamente a carico degli episodi sequenziali, con un ampio e significativo (eccetto che dopo esposizione a 10°C) incremento della frequenza degli episodi sequenziali durante il periodo di luce (Amici et al., 1994; Amici et al., 1998; Cerri et al., 2005).

Tuttavia, mentre il recupero di sonno REM successivo alla esposizione di 24 h alle Ta di 0°C e -10°C e quello successivo all'esposizione di 48 h alla Ta di 0°C sono proporzionali alla quantità di sonno perso, il recupero che segue 48 h di esposizione a -10°C è inferiore a quello che si riscontra dopo 24 h, nonostante l'entità della deprivazione, assai superiore (Amici et al., 1998).

Risultati molecolari della intensificazione dei processi della veglia e del sonno

In seguito all'esposizione di 48 h alla Ta di -10°C , il sistema biologico ha presentato delle risposte particolari, nel senso che non si è comportato secondo delle modalità lineari di risposta omeostatica. Questo potrebbe indurci a supporre che esso sia andato incontro ad una forma di modificazione plastica, tale da non consentire un ripristino rapido delle condizioni iniziali di funzionamento all'allontanamento dello stimolo; che, cioè, abbia conservato, in seguito al protrarsi del periodo di esposizione, una "memoria" dell'esperienza. Su questa linea di pensiero, sembra lecito supporre la presenza di modificazioni dell'espressione genica come substrato di questa forma di apprendimento.

Lo svolgersi del normale ciclo veglia-sonno, come dimostrato in esperimenti con dl-propranololo, un β -bloccante non specifico, sarebbe in qualche misura connesso ad una normale capacità di accumulo di adenosin monofosfato ciclico (cAMP) a livello ipotalamico, nella PO-AH (Zamboni et al., 2004). Ora,

alla fine del periodo di esposizione alla Ta di -10°C , il sistema di accumulo di cAMP risulta bloccato in PO-AH ad un livello di attività più basso di quello osservato nel controllo e, durante le prime ore di recupero, esso non sembra in grado di ripristinare i normali livelli di concentrazione del nucleotide. Questa variazione appare specifica perché la si riscontra a livello della regione coinvolta nella regolazione dei processi termoregolatori e ipnici, ma non a livello della corteccia cerebrale (Zamboni et al., 2004).

Ulteriori modalità molecolari di studio del sonno e scopo della ricerca

Metodiche quali la determinazione delle variazioni della concentrazione di secondi messaggeri (ad esempio cAMP) ma anche del livello di fosforilazione o di glicosilazione di proteine cellulari (si veda l'insieme di tecniche che fanno capo alla proteomica) sono utili nel valutare l'attività cellulare nell'ambito di un dominio temporale compatibile con la dinamica ultradiana dell'alternanza dei diversi stadi del ciclo veglia-sonno. D'altra parte, eventi quali le modificazioni dell'andamento del ciclo veglia-sonno in risposta a stimoli ambientali interferenti con la regolazione di variabili biologiche e con la modificazione plastica di circuiti nervosi costituiscono eventi stato-dipendenti più lunghi, esplorabili indagando la variazione dell'espressione di geni o, più correttamente, dei loro prodotti proteici (trascrizione genica non è sempre sinonimo di traduzione, quindi l'evidenziazione del messaggero non implica necessariamente la presenza del prodotto proteico attivo).

Il progetto di questo lavoro è stato di portare lo studio dei correlati molecolari dei processi ipnici sul piano dell'analisi morfo-funzionale. In altre parole, si è preso in esame il modello comportamentale dell'esposizione per 48 h a Ta -10°C che, come si è più sopra accennato, porta a una deprivazione di sonno REM seguita da un recupero particolare, entrambi caratterizzati da modificazioni specifiche della concentrazione cerebrale di secondi messaggeri. Lo studio si basa sulla determinazione delle variazioni di espressione di due marcatori nucleari: il prodotto proteico dell'Immediate Early Gene (IEG) c-fos (c-Fos), considerato un

indice aspecifico di attivazione neuronale, e la forma attiva del fattore di trascrizione costitutivo CREB (*Ca⁺⁺/cAMP response element-binding protein*), modificato covalentemente per fosforilazione da parte di protein-chinasi *Ca⁺⁺/cAMP*-dipendenti (P-CREB).

L'esecuzione del progetto ha portato a determinare la variazione dell'espressione dei due marcatori nucleari nelle seguenti aree cerebrali: PO-AH, LH, nucleo paraventricolare (Pa).

Tuttavia, la conduzione dello studio (messa a punto delle tecniche, esecuzione degli esperimenti, analisi dei dati) ha necessitato di un grande investimento di tempo ed energia. Per questo, ai fini della elaborazione della tesi di dottorato, è stato scelto di presentare i risultati completi concernenti l'espressione di uno solo dei due antigeni (c-Fos) in due nuclei ipotalamici, già noti in letteratura come implicati nella regolazione del ciclo veglia-sonno, il MnPO ed il VLPO (Szymusiak et al., 2007).

Un IEG è un gene di risposta primaria, caratterizzato dal non necessitare sintesi proteica *de novo* per la sua espressione in seguito all'arrivo alla cellula di segnali esterni. Nella definizione rientrano vari tipi di proteine a rapida e in genere transitoria induzione, quali alcuni prodotti destinati ad essere secreti (citochine, fattori chemotattici), enzimi citoplasmatici (fosfatasi, la ciclo-ossigenasi Cox-2) e fattori di trascrizione inducibili (FTI), come appunto Fos, ma anche Jun, Krox, Myb, Myc, NGFI-B, NGFI-C, SRF, che a loro volta vanno a modificare l'espressione di altri geni, responsabili delle caratteristiche fenotipiche della cellula. A questo gruppo di geni ci si riferisce anche come a proto-oncogeni, in quanto la loro mutazione è in grado di causare crescita cellulare incontrollata (Morgan, 1991).

Il gene *fos* venne isolato per la prima volta nel 1982 come oncogene del virus FBJ-MSV (*Finkel-Biskis-Jinkins murine osteogenic sarcoma virus*), cui deve il nome. La sua controparte cellulare, *c-fos* fu descritta a breve distanza temporale (Herdegen e Leah, 1998).

E' noto che la proteina c-Fos (56 kDa) si associa a formare un complesso dimerico con la proteina c-Jun (39 kDa), capace di legare con alta affinità una sequenza di DNA, chiamata sito di riconoscimento per l'AP-1 (*activator protein 1*). Si tratta di una sequenza di consenso richiesta per la trascrizione sia basale sia indotta di numerosi geni e c-Fos e c-Jun costituiscono i principali componenti dei complessi proteici di trascrizione AP-1. Questo fattore di trascrizione non corrisponde ad una singola entità molecolare, ma piuttosto ad una mescolanza di possibili dimeri; probabilmente caratterizzati da diverse affinità di legame alla sequenza di consenso AP-1 e/o da differenti effetti sulla velocità di trascrizione. La formazione di un dimero è necessaria per il verificarsi del legame alla sequenza di riconoscimento AP-1. Questo complesso può essere composto da Fos-Jun o Jun-Jun, mentre omodimeri Fos-Fos non possono formarsi per limiti strutturali. Inoltre, altri membri delle famiglie *fos* e *jun*, come Fra-1, Fra-2 (*Fos-related antigens*), Fos-B da un lato e Jun-B, Jun-D dall'altro, possono prendere il posto rispettivamente di Fos o Jun all'interno dell'eterodimero e anche, nel caso delle proteine strettamente correlate a Jun, formare omodimeri. L'associazione avviene tramite legami non covalenti (intense interazioni di Van der Waals) che si generano tra regioni omologhe caratterizzate da un elevato tenore in residui di leucina (Leu), le cosiddette "cerniere di Leu", strutture anfipatiche ad α -elica, che presentano una ripetizione di residui di Leu (5 nel caso di Fos e Jun) ogni sette aminoacidi (AA). Poiché un singolo giro di α -elica si verifica ogni 3,4 AA, ad ogni secondo giro dell'elica, un residuo di Leu viene a trovarsi sulla stessa faccia della struttura, costituendo un requisito essenziale per la dimerizzazione. Il dominio di legame al DNA risiede, invece, in una regione della proteina posta al di fuori della cerniera di Leu, verosimilmente a livello dell'estremità aminoterminali, e composta da un'elevata percentuale di residui aminoacidici basici, in primo luogo arginina. Un singolo dominio è insufficiente ad assicurare un'interazione stabile con la sequenza di consenso AP-1, per garantire la quale ne sono invece necessari due (Morgan, 1991; Herrera e Robertson, 1996).

Il gene *fos* risulta implicato in numerose vie di trasduzione del segnale, mediate dai secondi messaggeri cAMP, inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃),

diacilglicerolo (DAG), Ca^{++} . E' stata ampiamente studiata la sua inducibilità in seguito a diversi stimoli, che evocano tutta una serie di correlati fisiologici o patologici, apparentemente indipendenti: modelli di epilessia per induzione di episodi critici mediante agenti chimici, elettrostimolazioni o interventi chirurgici, studio dell'azione rigenerativa del fattore di crescita neuronale (NGF) in seguito ad insulti traumatici a livello cerebrale o a transezione di tronchi nervosi, trasduzione sensoriale conseguente a stimolazione nervosa periferica chimica o fisica, modelli di danno ischemico cerebrale (occlusioni carotidiche), modelli farmacologici di Parkinsonismo (somministrazione di antagonisti dei recettori dopaminergici D1), dipendenza da morfina o oppiacei. Particolarmente interessanti gli studi che vedono implicato il c-Fos in relazione ai normali processi fisiologici, piuttosto che a stati patologici o stimoli farmacologici: la sua espressione mostra una correlazione con alcuni ritmi biologici, essendo indotta in neuroni secernenti il fattore di rilascio dell'ormone luteotropo (LHRH), nella fase del ciclo estrale in cui è attivato il rilascio di tale fattore, nonché intervenendo il c-Fos nella regolazione del ritmo circadiano nei roditori, settato da un pace-maker a livello del nucleo SCh. L'espressione del c-Fos può inoltre essere coinvolta nella fisiologia della nocicezione, essendo indotta per stimolazione delle vie nocicettive periferiche e viscerali (Morgan, 1991; Herrera e Robertson, 1996).

Le vie di trasduzione del segnale attraverso le quali stimoli differenti possono indurre o silenziare l'espressione di *c-fos* a livello del SNC sono state ben caratterizzate. Il *promotore* del gene *c-fos* contiene almeno quattro specifiche sequenze regolatrici: SRE (*serum response element*), CRE o Ca/CRE o CaRE/CRE (Ca^{++} /*cAMP response element*), SIE (*c-Sis-inducible element*) e FAP (*fos AP-1 binding site*). In particolare l'elemento CRE (si veda oltre) sembra essere particolarmente importante per l'attivazione trascrizionale di *c-fos* (Morgan e Curran, 1991; Herdegen e Leah, 1998; Cirelli e Tononi, 2000).

L'inducibilità di c-Fos in seguito ad un'ampia varietà di stimoli (nocicettivi, somatosensoriali, fottici in relazione al ciclo circadiano, osmotici, stressogeni), quindi, è classicamente utilizzata come strumento per studiare l'attivazione neuronale in diversi sistemi cerebrali, proprio in quanto può fungere

da ponte tra segnali extracellulari e cambiamenti fenotipici a livello di cellule nervose, modificando l'espressione di altri geni (Morgan, 1991; Herrera e Robertson, 1996). Bisogna comunque considerare che l'espressione di c-Fos non è sempre garanzia di attivazione neuronale (Hoffman e Lyo, 2002).

Un'importante caratteristica degli IEG è rappresentata dalla loro rapida cinetica, ma essi possono anche presentare un'espressione ritardata o prolungata. Casi estremi sono rappresentati dalla sintesi quasi immediata del messaggero *krox-24* (entro 5 min) e dalla breve espressione della sua proteina (emivita di 30-60 min) in seguito a stimolazione sinaptica, la ritardata (24-36 h) ma prolungata (numerosi mesi) espressione di c-Jun dopo assotomia e la espressione per più di un anno di Fra (35 kDa) (Δ FosB o *Fra cronico*, considerato un mediatore molecolare di plasticità neuronale e comportamentale a lungo termine) dopo una singola crisi epilettica. Il declino dei livelli nucleari di c-Fos mostra una curva bifasica. Durante le prime 2 h dallo stimolo, c-Fos esibisce un rapidissimo decadimento con un'emivita di circa 45 min; in questa fase, solo il 20-30% delle molecole di c-Fos sono associate a proteine Jun. L'emivita diventa significativamente più lunga, 90-120 min, dopo la cessazione della sintesi della proteina. Questo incremento della stabilità coincide con il momento in cui più del 90% delle molecole di c-Fos risultano associate a proteine Jun (intorno al 70% con JunB, piccole frazioni con JunD e c-Jun). Inizialmente, peraltro, a causa della rapida sintesi di c-Fos e del ritardato incremento dei livelli di c-Jun e JunB in seguito alla stimolazione, si crea una finestra libera da Jun, nella quale le proteine c-Fos possono formare eterodimeri con ATF (*activating transcription factor*) e recettori per i glucocorticoidi. Questo può influenzare l'espressione genica nel periodo più sensibile e precoce immediatamente dopo la stimolazione (Herdegen e Leah, 1998).

Si è visto che i FTI possono avere tempi di espressione molto prolungati in conseguenza di una singola stimolazione, indipendentemente dalle emivite dei rispettivi mRNA (Herdegen e Leah, 1998). La cinetica di induzione del *c-fos* è identica in molte circostanze. L'attivazione trascrizionale avviene nel giro di 5 min e continua per 15-20 min. Il messaggero si accumula e raggiunge un picco a 30-45

min, quindi declina con una emivita relativamente breve, di circa 12 min (Morgan e Curran, 1991). I livelli di c-fos mRNA sono risultati aumentati nel giro dentato di ratto, in risposta alla somministrazione di un agente convulsivante, entro 15 min, raggiungendo i livelli massimi nel giro di 60 min, mentre erano appena rilevabili dopo 120 min (Saffen et al., 1988). Analoga cinetica è stata registrata in risposta a fattori di crescita (NGF ed EGF) in colture cellulari (linea di feocromocitoma di ratto PC12), con picco a 30 min (Greenberg et al., 1985). La sintesi della proteina segue l'espressione del messaggero e ha un'emivita di circa 2 h (Morgan e Curran, 1991). La sua induzione richiede in genere un periodo di circa 90 min e livelli elevati di c-Fos si possono osservare per varie ore, dopo le quali si assiste ad un progressivo declino. Ad esempio, in seguito ad un breve stimolo luminoso, della durata di 5 min, c-Fos manifesta un picco a livello del SCh dopo 1-2 h per poi ritornare ai livelli basali nel giro di 6 h (Cirelli e Tononi, 2000). In studi più recenti, tuttavia, è stato visto che la proteina c-Fos può essere misurata a livello neuronale entro 30 min dall'attivazione neuronale (McGinty e Szymusiak, 2001; Contestabile et al., 2005).

Stimoli continui o ripetuti, d'altra parte, possono provocare sia una sovraregolazione sia una sottoregolazione dell'espressione dei FTI. Per esempio, il ripetersi per giorni di insulti stressogeni determina un marcato decremento della capacità di indurre l'espressione di Fos, attraverso la medesima modalità. Crisi epilettiche ripetute, invece, possono sia sovraregolare sia sottoregolare l'espressione di FTI (Herdegen e Leah, 1998). Infine, uno stimolo ipoglicemico protratto, indotto da insulina, è risultato in grado di evocare espressione di c-Fos in neuroni paraventricolari ipotalamici secernenti CRH (fattore di rilascio dell'ormone corticotropo), sia in acuto, dopo 2 h, sia in cronico, dopo 5 giorni dall'inizio dell'ipoglicemia (Brown e Sawchenko, 1997). Tuttavia, alcuni autori ritengono che si sia generata confusione, riguardo alla durata dell'espressione della proteina Fos, a causa della mancanza di specificità degli antisieri policlonali, che possono cross-reagire con Fra. Anticorpi (Ac) monoclonali specifici per c-Fos permettevano di evidenziare immunoreattività per c-Fos in specifiche aree cerebrali fino a 4-8 h dall'inizio della somministrazione di uno stimolo osmotico

protratto, laddove con Ac policlonali veniva evidenziata fino a 24 h, oltre che fino a 7 giorni dal ripristino dell'accesso all'acqua (Sharp et al., 1991). Herrera e Robertson, 1996, usano il termine *Fos-like immunoreactivity* (FLI) dove non è stato stabilito attraverso il Western blot che l'Ac è selettivo per la proteina c-Fos di 56 kDa, e il termine *c-Fos-like immunoreactivity* quando c'è un ragionevole grado di certezza che sia coinvolta proprio la proteina c-Fos. Nello studio di Brown e Sawchenko, 1997, tuttavia, gli autori affermano di aver utilizzato un antisiero specifico diretto contro l'estremità aminoterminale di c-Fos e gli stessi Sharp et al., 1991, sostengono che il peptide sintetico (Fos 4-17) corrispondente all'estremità aminoterminale di c-Fos presenta scarsa omologia con i Fra noti. Da Herrera e Robertson, ciononostante, viene riportato che le forme presenti in commercio PC05 Anti-c-Fos, per cui il peptide immunogeno è rappresentato da una sequenza corrispondente agli AA 4-17 del c-Fos umano, oltre che Ab1, diretto contro un peptide corrispondente agli AA 128-152 del c-Fos umano (Oncogene Science, oggi Calbiochem) riconoscono Fra (Herrera e Robertson, 1996).

Anche la cessazione di uno stimolo prolungato può alterare l'espressione dei FTI: ratti tenuti in regime di luce continua per 8 giorni hanno mostrato un incremento nell'espressione di Jun e Fos a livello retinico una volta posti in regime di buio continuo, che manifestava un picco dopo 2 giorni, regredendo dopo oltre 7 giorni (Herdegen e Leah, 1998).

Il fattore di trascrizione CREB, del peso di 43 kDa, è dotato anch'esso di cerniera di Leu e agisce sotto forma di omodimero. Espresso in maniera costitutiva, rappresenta uno dei principali substrati della protein chinasi A (PKA). La PKA è costituita da due unità catalitiche (C) e due unità regolatrici (R). In assenza di cAMP il complesso R_2C_2 è inattivo. La produzione di cAMP, in seguito a segnali extracellulari che attivano l'adenil ciclasi accoppiata a proteine G, e il suo legame alle unità catalitiche della PKA, provoca il rilascio delle stesse, che sono attive in forma dissociata. LA PKA, attivata, va quindi a fosforilare specifici residui di serina e treonina su un'ampia gamma di bersagli, alterandone l'attività enzimatica. La fosforilazione di CREB ne promuove la dimerizzazione ed

incrementa la sua efficacia come attivatore della trascrizione genica. CREB è anche attivato dalla protein chinasi multifunzionale calmodulina chinasi II (CaMKII), dalla protein chinasi C (PKC) e da altre chinasi, il che suggerisce un suo ruolo nell'integrare molteplici segnali (Stryer, 1995).

Il sito di legame per P-CREB corrisponde ad una sequenza palindromica (TGACGTCA), nota come CRE (*cAMP-regulated enhancer*), a livello di geni inducibili dal secondo messaggero cAMP. L'espressione genica indotta attraverso questa via è importante in numerose risposte cellulari, incluse quelle coinvolte nell'instaurarsi della memoria a lungo termine. La subunità C della PKA (PKA C) va a fosforilare un residuo di serina, Ser-133, a livello di una breve sequenza posta tra due domini ricchi di glutamina in corrispondenza dell'estremità aminoterminale. Questa fosforilazione risulta in un incremento dell'attività di stimolazione della trascrizione, senza un significativo effetto sul legame al DNA. L'entità della fosforilazione della Ser-133 correla direttamente con la velocità di trascrizione dei geni indotti dalla via del cAMP. Tale fosforilazione promuove il legame della CBP (*CREB-binding protein*), una proteina di grosse dimensioni fornita di un dominio di attivazione che può interagire con il fattore di trascrizione TFIIB. Si ritiene che la CBP agisca come co-attivatore capace di legare il CREB al complesso della RNA polimerasi II (Hunter, 1995).

Sebbene i livelli di cAMP si innalzino rapidamente, la fosforilazione della Ser-133 si verifica in maniera relativamente lenta, raggiungendo un picco, in colture cellulari (linea di feocromocitoma di ratto PC12), solo dopo 30 minuti dallo stimolo. La cinetica di fosforilazione di CREB risulta molto più lenta di quella di altre proteine bersaglio della PKA: per la glicogeno fosforilasi, ad esempio, la velocità massima di fosforilazione si raggiunge entro pochi secondi. La velocità della fosforilazione di CREB è invece limitata dalla cinetica di ingresso della PKA C nel nucleo, che si verifica in un periodo di 30 minuti. In cellule non stimulate, gran parte delle proteine CREB si trovano nel compartimento cromatinico, legate alle sequenze CRE dei geni responsivi al cAMP, ma sembrano essere accessibili alla fosforilazione da parte della PKA C. Come per altri fattori di trascrizione, CREB è una proteina presente in quantità

relativamente poco abbondante e la PKA C è solo in lievissimo eccesso molare. Inoltre, CREB è un substrato relativamente poco efficiente per la PKA e questo, unito alla competizione per la PKA da parte di altri substrati nucleari e alla presenza della PKI, un piccolo inibitore proteico della PKA C, può contribuire a limitare la velocità della fosforilazione di CREB. Circa il 40% della proteina CREB costitutivamente espressa viene fosforilata in condizioni di attivazione massimale, anche se questo valore può essere incrementato da una sovraespressione della subunità C (Hunter, 1995).

La defosforilazione di CREB si verifica lentamente nel giro di alcune ore dopo lo stimolo ed è accompagnata da ridotta trascrizione dei geni responsivi al cAMP. Si ritiene che, per lo meno nei roditori, la PP1 sia la principale fosfatasi (PP sta appunto per *protein phosphatase*) implicata nella defosforilazione della Ser-133. Anche la PP2A potrebbe tuttavia avere un ruolo primario, verosimilmente in dipendenza dal tipo cellulare, dall'abbondanza degli inibitori della PP1 e dai livelli relativi di PP1 e PP2A nel nucleo. Il declino nella fosforilazione di CREB in seguito alla cessazione dello stimolo appare dovuto ad un lento decremento dell'attività della PKA C, combinato con un aumento dell'attività fosfatasica (Hunter, 1995).

La regolazione della fosforilazione di CREB è resa più complessa dal fatto che, come abbiamo visto, altre chinasi possono agire a livello della Ser-133, per vie quindi indipendenti dal cAMP. La fosforilazione da parte della CaMKII e della CaMKIV potrebbe spiegare come l'elevazione del Ca^{++} intracellulare induca la fosforilazione della Ser-133 e l'attivazione di geni regolati tramite la sequenza CRE, quali il c-Fos. In colture cellulari (PC12), tuttavia, si è visto che il Ca^{++} non è in grado di indurre l'espressione di c-Fos in assenza di una PKA funzionalmente attiva. Questo potrebbe essere legato alla necessità della fosforilazione PKA dipendente di un ulteriore fattore, quale la CBP. La CaMKIV potrebbe rivestire *in vivo* un ruolo di fondamentale importanza nell'attivazione di P-CREB, poiché la CaMKII risulta in grado di fosforilare non solo la Ser-133, ma anche la Ser142, che invece ha un'azione inibente (Hunter, 1995). Stimoli fisiologici a livello neuronale reclutano una via rapida che coinvolge la CaMKIV. Questa via precoce

può essere seguita da una più lenta, che dipende da MAPK (*Ras/mitogen-activated protein kinase*), a valle di CaMK. La via MAPK, dipendente da CaMK, potrebbe servire ad informare il nucleo sull'ampiezza dello stimolo, mentre la via rapida attraverso CaMKIV sarebbe più adatta a veicolare informazioni sulla distribuzione temporale precisa di stimoli sinaptici localizzati, data la sua maggiore rapidità e sensibilità. Una terza via, che implica la defosforilazione di P-CREB da parte di una PP-1, promossa dalla calcineurina, che può essere inattivata in seguito a stimolazioni prolungate, potrebbe infine convogliare informazioni sulla durata dello stimolo (Wu et al., 2001).

Molteplici differenti protein chinasi risultano dunque in grado di attivare il fattore di trascrizione CREB, rendendolo un punto di potenziale convergenza di molteplici vie intracellulari di trasduzione del segnale e sicuramente un elemento chiave nella regolazione dell'espressione genica (Wu et al., 2001). Non sorprende quindi come tutta una serie di evidenze sperimentali deponga a favore di un ruolo giocato da tale proteina nella regolazione del ciclo veglia-sonno (Graves et al., 2003).

c-Fos come marcatore dei processi della veglia e del sonno nel ratto

Lo studio dell'espressione del gene *c-fos* è stato ampiamente impiegato nell'indagare i meccanismi alla base del ciclo veglia-sonno, sia attraverso tecniche di ibridizzazione *in situ* per l'evidenziazione del messaggero, sia mediante rivelazione immunostochimica del suo prodotto proteico.

Il gruppo di Cirelli e Tononi ha studiato in maniera approfondita l'espressione cerebrale del *c-fos* mRNA durante il ciclo veglia-sonno nel ratto e in altri mammiferi, rendendo disponibile una mappa anatomica dettagliata dell'espressione cerebrale di *c-fos*. La principale evidenza risultante da queste ricerche è la correlazione positiva, in un numerose aree cerebrali, tra *c-fos* e veglia, sia spontanea sia conseguente a deprivazione ipnica, ad indicare l'associazione del *c-fos* con la veglia in quanto tale, piuttosto che con fattori circadiani o legati alla modalità di deprivazione. Si tratta di regioni neocorticali e

allocorticali, comprendenti le aree corticali frontale, motoria, parietale, temporale, occipitale, cingolata, insulare, piriforme, la corteccia entorinale; regioni ipotalamiche, quali MPA e area preottica laterale (LPO), PHA, nuclei sopramammillari (SuM); setto, ramo orizzontale e verticale della banda diagonale di Broca (HDB, VDB); amigdala; nuclei talamici a proiezione diffusa, sia della mediolinea (paraventricolare PVA, romboide, reuniens Re) sia intralaminari (centromediale CM e centrolaterale CL). A livello troncoencefalico, l'espressione di *c-fos* è elevata in veglia a livello di collicoli superiori e inferiori, grigio centrale (CG), DR, LC e nuclei parabrachiali (PBP). L'espressione di *c-fos* non è però proporzionale alla durata della veglia, con la sola eccezione della MPA, dove esso esprimerebbe una pressione al sonno. E' emersa inoltre da studi di lesione, implicanti la distruzione monolaterale del LC, una dissociazione tra espressione di *c-fos* e veglia sia elettroencefalografica sia comportamentale: afferenze noradrenergiche dal LC sono risultate determinanti per l'espressione in veglia di *c-fos* in molte aree, ma tuttavia non a livello ipotalamico (Cirelli e Tononi, 2000).

L'espressione del prodotto proteico del gene *c-fos* (c-Fos) è stata indagata a vari livelli lungo l'estensione del nevrasso. La seguente non vuole in alcun modo essere una trattazione esaustiva della materia, ma si focalizzerà su alcuni lavori indicativi, integrando la presentazione dei dati con alcune considerazioni sul valore stesso di tale strumento d'indagine.

Maloney e collaboratrici hanno utilizzato il c-Fos in quanto metodo complementare, accanto alla registrazione dell'attività elettrica, per studiare l'attivazione neuronale, che tuttavia presenta il vantaggio di permettere la contemporanea identificazione fenotipica neurotrasmettitoriale, tramite tecniche immunohistochimiche, dei neuroni studiati. Le autrici hanno tuttavia avuto cura di precisare che, malgrado l'espressione di c-Fos sia stata trovata associata a modificazioni della scarica nervosa e a flussi entranti di ioni Na^+ e Ca^{++} , essa può riflettere altri processi intracellulari stimolati da messaggeri chimici, non necessariamente implicanti attività neuronale di scarica, ma comunque dipendenti anch'essi dal cambiamento dei livelli intracellulari di Ca^{++} . Considerate tali

premesse, esse hanno dimostrato, in studi focalizzati sul tronco dell'encefalo, che durante il recupero di 3 h (ZT5-8, dove ZT sta per *zeitgeber time* o tempo circadiano) di sonno REM nel ratto, in seguito a 50 h di deprivazione eseguita tramite la tecnica del *flower pot*, il numero di cellule colinergiche che esprimono c-Fos incrementa nel tegmento ponto-mesencefalico, mentre il numero di neuroni monoaminergici marcati per c-Fos si riduce, suggerendo una modificazione reciproca nell'attività di tali gruppi cellulari. Inoltre, risultava aumentato il numero di cellule GABAergiche esprimenti c-Fos, suggerendo che esse possono essere attive in REM e coinvolte nell'inibire l'attività delle cellule monoaminergiche circostanti (Maloney et al., 1999). A livello della formazione reticolare bulbo-pontina e del rafe, l'unica regione in cui il numero complessivo delle cellule esprimenti c-Fos incrementava durante il sonno REM è risultata la parte orale dei nuclei reticolari pontini, in cui le cellule GABAergiche esprimenti c-Fos diminuiva significativamente in relazione al sonno REM. Nelle altre regioni studiate, comprendenti la parte caudale del nucleo reticolare pontino, il nucleo reticolare gigantocellulare, i nuclei del rafe (magno, oscuro, pallido), l'attivazione delle cellule serotoninergiche risultava correlata alla veglia e al tono muscolare, mentre quella delle cellule GABAergiche era inversamente correlata al tono muscolare. Tali cellule risultavano attive durante il sonno REM, essendo verosimilmente responsabili dell'inibizione di altri neuroni, la cui attività non sia compatibile con il sonno REM: si tratta probabilmente di interneuroni locali inibenti neuroni a proiezione eccitatoria reticolo-spinale o rafe-spinale e quindi in grado di provocare disfacilitazione dei neuroni motori durante il sonno REM, ma anche di neuroni GABAergici a proiezione spinale, capaci di esercitare un'influenza inibitoria diretta a livello del corno dorsale e del corno ventrale; durante l'atonìa associata al sonno REM, la disfacilitazione dei neuroni motori avverrebbe per mezzo di una rimozione dell'influenza serotoninergica e di un'inibizione GABAergica, accanto a quella glicinerica previamente documentata (Maloney et al., 2000).

La complementarietà tra studi elettrofisiologici e immunoistochimici è stata sottolineata anche dagli autori che hanno concentrato le loro indagini a

livello preottico-ipotalamico. Dalle loro osservazioni emerge come, da un lato, sia difficile ottenere una "mappatura" attraverso le sole tecniche elettrofisiologiche (Gong et al., 2000), dall'altro il metodo dell'evidenziazione della proteina c-Fos non offra una risoluzione temporale sufficiente a permettere la discriminazione di cambiamenti di attività durante le varie fasi del sonno (Szymusiak et al., 1998). La immunistochimica, cioè, avrebbe una limitata risoluzione temporale relativamente all'ultrastruttura del ciclo veglia-sonno, mentre lo studio dei pattern di scarica neuronali avrebbe una limitata capacità di offrire informazione nella dimensione spaziale.

A livello della POA, area di principale interesse del nostro studio, due nuclei hanno attratto principalmente l'attenzione degli studiosi del sonno, in base alla relazione della loro attività elettrica e immunoreattività per c-Fos con il ciclo veglia-sonno: il VLPO e il MnPO.

Il metodo della rilevazione della FLI è stato utilizzato in primo luogo in esperimenti di mappatura funzionale. Questi hanno permesso di confermare i dati ottenuti dal gruppo di Cirelli e Tononi con le tecniche di ibridizzazione in situ, poiché è stata riscontrata la presenza di un minor numero di cellule c-Fos-ir in cervelli di animali sacrificati durante il periodo di luce (ZT3 o ZT9), rispetto ad animali sacrificati nel periodo di buio (ZT15). Sono emerse, tuttavia, due strutture, il lembo intergenicolato del talamo (IGL) e la suddivisione dorsale del SCh (dSCh), presumibilmente implicate nella regolazione dei ritmi circadiani, oltre ad un gruppo di cellule nell'area preottica ventrolaterale (VLPO), che hanno mostrato un pronunciato e focale incremento nel numero di nuclei c-Fos-ir durante il periodo di luce (Sherin et al., 1996).

Il secondo gradino è stato rappresentato dall'effettuare delle analisi di correlazione tra i dati immunistochimici e i dati elettroencefalografici. E' stato così possibile discriminare che il numero di neuroni c-Fos-ir nel VLPO era più strettamente correlato alla recente esperienza di sonno che al momento del ciclo circadiano, come si poteva evincere da una piccolissima sottopopolazione di animali che aveva dormito, in periodo di luce, significativamente meno degli altri

e presentava una FLI significativamente inferiore a tale livello (Sherin et al., 1996).

D'altro canto, la possibilità di dissociare il comportamento ipnico dagli effetti del ciclo circadiano mediante deprivazione di sonno aveva confermato che, anche in animali deprivati, in dSch e IGL, il pattern di marcatura per c-Fos seguiva il ciclo circadiano, mentre nel VLPO rifletteva il recente comportamento ipnico, senza differenze significative tra 9 h (ZT0-9) e 12 h (ZT0-12) di deprivazione, ma con un incremento significativo durante il recupero (45, 90 e 180 min) (Sherin et al., 1996). Uno studio che si avvaleva della deprivazione ipnica aveva inoltre permesso di evidenziare originariamente il coinvolgimento nella regolazione del ciclo sonno-veglia di un altro raggruppamento nucleare dell'area preottica, il MnPO (Gong et al., 2000).

L'ulteriore passo è stato rappresentato dall'utilizzo combinato di traccianti retrogradi e della marcatura dell'antigene (Ag) nucleare c-Fos, che ha condotto ad una maggiore comprensione dei meccanismi con cui il MnPO e il VLPO possono contribuire alla regolazione del ciclo veglia-sonno, tramite lo studio delle loro proiezioni a regioni coinvolte nella regolazione della veglia comportamentale, elettroencefalografica o autonoma, quali il nucleo tuberomammillare (TM), la LH e il Pa (Sherin et al., 1996; Uschakov et al., 2006).

Per la sua opposta relazione con il ciclo veglia-sonno è stato indagato invece l'ipotalamo laterale. La espressione di c-Fos, in neuroni oressinergici dell'area perifornicale di ratti mantenuti in un normale ciclo luce-buio, era più elevata durante la notte e tale attivazione, in regime di buio continuo, permaneva durante la notte soggettiva. La FLI correlava positivamente, infine, con la quantità di veglia e negativamente con la quota di sonno NREM e REM delle 2 h precedenti il sacrificio, sia in condizioni di veglia spontanea, sia di deprivazione di sonno (Estabrooke et al., 2001).

L'espressione di c-Fos è stata utilizzata anche per esaminare l'attività cellulare in regioni colinergiche del prosencefalo basale al di fuori del diencefalo in seguito a deprivazione (ZT6-12) e recupero (ZT12-14) di sonno. Cellule colinergiche a livello di VDB e HDB hanno mostrato una FLI significativamente

più elevata dopo veglia prolungata rispetto al recupero. In questo caso, era evidente una correlazione negativa tra FLI e percentuale di tempo trascorsa in sonno durante l'ora precedente il sacrificio (Greco et al., 2000).

In conclusione, l'unica struttura in cui l'espressione di c-Fos è apparsa positivamente e inequivocabilmente correlata al sonno in atto, in particolare ad onde lente, è il VLPO. Il sonno REM spontaneo non è risultato invece correlato all'espressione di c-Fos, ma questo è da leggersi in relazione al ridotto potere di risoluzione temporale di questo marcatore di attività neuronale. Nel recupero in seguito a deprivazione selettiva, infatti, è stata trovata una correlazione positiva in numerose regioni prosencefaliche: corteccia cingolata anteriore, retrospleniale, entorinale, setto laterale, amigdala, SuM, giro dentato, regione CA1 dell'ippocampo ventrale e subicolo; oltre che a livello troncoencefalico: nuclei pretettali, strati profondi del collicolo superiore, nuclei pontini, nucleo laterale parabrachiale, nucleo subcoeruleo alfa, nucleo mesencefalico profondo, nuclei reticolari pontini orale e caudale e nucleo reticolare gigantocellulare, inclusa la porzione ventrale. In molte altre regioni (corteccia frontale, insulare, piriforme, parietale, temporale, peririnale e occipitale, striato, molti nuclei talamici), invece, nel recupero in seguito a deprivazione selettiva di sonno REM, l'espressione di c-Fos è apparsa a livelli basali, in forte contrasto con il pattern di espressione riscontrato in veglia tramite le tecniche di ibridizzazione in situ (Cirelli e Tononi, 2000).

Materiali e metodi

Fase di messa a punto delle metodiche sperimentali

Tutta una serie di esperimenti preliminari ha avuto luogo al fine di mettere a punto ognuna delle varie tappe delle procedure sperimentali necessarie allo svolgimento del progetto: anestesia, fissazione tissutale, crioprotezione, congelamento, taglio, colorazione istologica, metodica immunohistochimica.

Sono stati utilizzati ratti albini outbred del ceppo CD Sprague-Dawley (Charles River) di sesso maschile e del peso di 201-225 g al momento del loro arrivo. Gli animali, prima di essere sottoposti ad esperimento, venivano stabulati disposti a coppie all'interno di apposite gabbie di plastica trasparente (Tecniplast) e adattati per un periodo minimo di una settimana alle normali condizioni di laboratorio: temperatura ambientale (Ta) di $23 \pm 0,5$ °C, ciclo luce buio (LB) di 12 h:12 h (L9:00-21:00), intensità della luce a livello delle gabbie di 100 lux, acqua e cibo ad libitum. Nel complesso, questa fase sperimentale ha richiesto l'impiego di 105 animali.

Anestesia

I primi 52 degli animali impiegati negli esperimenti che hanno consentito la messa a punto delle diverse fasi della metodica sperimentale sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) di una miscela di Tiletamina cloridrato e Zolazepam cloridrato, forma commerciale Zoletil 100, alla dose di 100 µl/100 g di peso corporeo (per entrambi i principi attivi, 50 mg/kg), previa sedazione mediante iniezione intramuscolare (i.m.) di Diazepam, forma commerciale Valium in fiale da 10 mg/2 ml, alla dose di 100 µl/100 g (5 mg/kg). Tale metodica, tuttavia, non si è dimostrata molto efficiente, dal momento che ha comportato nel 50% dei casi la necessità di uno o più richiami di anestetico (fino a tre), con dosi scelte empiricamente a seconda della risposta dell'animale. Il tempo di anestesia risultava dunque variabile, con un minimo di circa 20 min (approssimativamente 10 min di attesa dopo somministrazione di Valium e 10 min per l'effetto dell'anestetico).

Si è reso perciò necessario ricorrere ad altra forma di anestesia, soprattutto al fine di minimizzare e standardizzare il tempo totale trascorso tra la fine dell'esposizione alla condizione sperimentale e l'inizio della procedura di fissazione tissutale. Tale necessità derivava soprattutto dalla cinetica molto breve di attivazione del P-CREB e dal conseguente rischio di sommare gli effetti dell'anestesia, della manipolazione o comunque degli stimoli ambientali aspecifici intervenenti dopo il termine dell'esposizione alla condizione sperimentale, a quelli specifici della stessa.

Sono stati testati, su un totale di 20 ratti, anestetici sia per via i.p. sia per via inalatoria. La Ketamina cloridrato, forma commerciale Ketavet 50 (5 g di principio attivo in 5 ml di soluzione iniettabile), alla dose di 400 µl/100 g di peso corporeo (400 mg/kg), per iniezione i.p., di efficacia già nota nel nostro laboratorio nel protocollo in cui era preceduta dall'iniezione i.m. di Valium alla dose di 100 µl/100 g (100 mg/kg), è stata sia ritestata nel protocollo suddetto, sia non preceduta dall'iniezione di Valium. Questa seconda alternativa, valutata al fine di ridurre i tempi di anestesia, si è dimostrata quasi inefficace. E' stata altresì tentata una tripla associazione, sempre in un'unica somministrazione per via i.p., comprendente: Valium 10 mg/2 ml (100 µl/100 g, pari a 5 mg/kg di principio attivo), Ketavet 50 (300 µl/100 g, pari a 300 mg/kg) e Tramadolo cloridrato (50 mg in 1 ml di soluzione iniettabile), forma commerciale Contramal, in dosi variabili tra 15 e 150 µl/100 g (7,5-75 mg/kg). Anche quest'associazione si è dimostrata scarsamente efficace, anche a causa della scarsa miscibilità del Valium, rendendo eventualmente necessari richiami di anestetico, oltre a causare depressione respiratoria e bradicardia per effetto del Contramal o dell'associazione Contramal Ketavet.

L'uso di un anestetico per via inalatoria, l'etere (Merk), si è dimostrato una validissima alternativa, permettendo di ridurre a circa 2 min il tempo di induzione dell'anestesia, che poi veniva efficacemente mantenuta grazie all'uso di una mascherina. L'animale, al termine della condizione sperimentale, veniva subito pesato, trasferito sotto cappa mobile e immerso in atmosfera saturata di etere all'interno di un contenitore cilindrico da 5 litri in plastica trasparente, provvisto di

coperchio. Tale recipiente era stato preparato ponendo sul fondo più strati di carta da laboratorio, che veniva imbevuta con etere. Era possibile monitorare il momento in cui il ratto perdeva i sensi, osservandone il comportamento attraverso le pareti del contenitore; dopo circa 1 minuto, veniva estratto dal recipiente e l'anestesia mantenuta tramite una mascherina, costituita da una provetta cilindroconica da 50 ml tipo Falcon (Corning), contenente sul fondo cotone idrofilo imbevuto di etere, che veniva tenuta appoggiata sul muso dell'animale.

Le prove preliminari hanno permesso di stabilire la quantità di etere necessaria (70 ml) per l'induzione dell'anestesia e per il mantenimento della stessa (25 ml), nonché il tempo di induzione dell'anestesia (circa 2 min). Nella casistica successiva, il tempo si è dimostrato variabile da un minimo di 1'30" ad un massimo di 2'50" a seconda del comportamento dell'animale, ma in genere è risultato compreso in un rango di 2 min \pm 20 sec.

Fissazione tissutale

Si articolava in due tappe: fissazione per perfusione transcardiaca e post-fissazione per immersione dell'encefalo nella soluzione di fissativo.

Per la metodica di fissazione per perfusione transcardiaca sono state testate due tecniche e diverse velocità di perfusione.

Qui di seguito verrà descritta nei dettagli la tecnica di perfusione poi prescelta e in coda la variante non più utilizzata.

Il campo operatorio - posto sotto cappa - era costituito da una vasca in plastica su cui si posava una rete di acciaio inossidabile, che permetteva lo scorrimento dei liquidi di perfusione nella vasca sottostante e sui cui veniva posto il tavolo operatorio, specifico per animali di piccola taglia. La perfusione era effettuata con una pompa peristaltica Masterflex, modello 77120-70, 200 rpm, dotata di un catetere Pharmed® (Cole Parmer, ID 0,28 mm) e la cui taratura veniva controllata utilizzando un cilindro graduato. Ad un'estremità del catetere veniva inserito un ago ipodermico (21 G) a punta smussa.

I liquidi di perfusione erano costituiti da un liquido di lavaggio - soluzione salina fredda (0°C) in tampone fosfato 0,01 M (PBS 8‰ NaCl, Tabella 1) - e una soluzione fissativa fredda (0°C) composta da paraformaldeide diluita al 4% in tampone fosfato 0.1 M (Tabella 1).

Al fine di garantirsi l'accesso al cuore, veniva operata una toracotomia, dopo aver anestetizzato l'animale e verificato l'assenza di risposta alle stimolazioni nocicettive. Si prendeva il cuore saldamente con la pinza emostatica, si pungeva con l'ago da perfusione il ventricolo sinistro dirigendone con cautela la punta in direzione dell'aorta. Appena si vedeva comparire la punta dell'ago nell'aorta, attraverso la parete vascolare, si serrava la pinza emostatica intorno al cuore, quindi si metteva in funzione la pompa di perfusione e si incideva prontamente l'auricola destra con le forbicine da dissezione in modo da creare una via di uscita al sangue e al liquido di perfusione, evitando sovraccarichi pressori.

Dal momento in cui il ratto veniva posto nel contenitore cilindrico in atmosfera saturata di etere fino all'inizio dell'infusione di PBS trascorrevano in media, a tecnica acquisita, 4-6 min.

La perfusione di PBS aveva una durata di circa 10 min (100 ml alla velocità di 10 ml/min). Quando 100 ml di PBS erano stati perfusi, si spegneva la pompa ed estraeva il catetere dal PBS per immergerlo prontamente nella paraformaldeide, quindi la pompa veniva riavviata.

La perfusione di paraformaldeide aveva una durata all'incirca di 30 min (300 ml alla velocità di 10 ml/min) e comportava irrigidimento del corpo dell'animale, che poteva diventare ligneo.

Nell'approntare la metodica, sono state testate diverse velocità di perfusione (25, 20, 15, 10 ml/min). Con velocità nettamente superiori ai 10 ml/min (20-25 ml/min), l'arrivo della paraformaldeide generalmente si accompagnava a fascicolazioni da depolarizzazione muscolare e contrazioni tonico-cloniche anche molto intense, eventualmente contrazione tonica in flessione-abduzione dei quattro arti, a volte con sollevamento della coda o addirittura della testa. Questi segni sono indice dell'arrivo della paraformaldeide ai tessuti e in

genere, ma non sempre sono spia di una fissazione molto buona del tessuto cerebrale.

Con una velocità di perfusione di 10 ml/min, generalmente si verificava un progressivo e intenso irrigidimento dell'animale, ma la fenomenologia suddetta risultava attenuata (anzi risultava pressoché assente nelle prove preliminari - nonostante il marcato irrigidimento dell'animale - e questo è stato attribuito ad una non ancora sufficiente rapidità nell'aprire la parete toracica e incannulare l'aorta, dando inizio alla perfusione). Con una bassa velocità di perfusione, tuttavia, si riduceva notevolmente il rischio di emorragie cerebrali, non si verificava rinorrea e si evitava il vasospasmo riflesso a livello cerebrale, che poteva comportare una cattiva perfusione locale, nonostante una fenomenologia generale promettente. Ad elevate velocità di perfusione, infatti, un complemento tecnico importante diveniva il taglio dei vasi epatici, previa incisura della parete addominale, al fine di ridurre la pressione di circolo. Nei primi casi, era stato sperimentato anche un intenso flusso iniziale di PBS alla velocità massima di 39 ml per pochi secondi, seguito da una riduzione della velocità di perfusione a 25 ml/min, ma questo protocollo è stato in seguito abbandonato.

Una volta terminata la perfusione, si sbloccava la pinza emostatica e si estraeva l'ago, facendo defluire la paraformaldeide rimasta nel lume del tubicino di perfusione, che veniva poi lavato con acqua distillata. Si procedeva quindi all'estrazione dell'encefalo dalla teca cranica.

Il ratto veniva appoggiato sull'addome e il tavolo operatorio ruotato in orizzontale. Con le forbici chirurgiche, si incideva la cute a livello della nuca, praticando un taglio trasversale all'asse maggiore del ratto, al fine di scoprire i piani muscolari nicali. Con una mano, si cercavano le scapole come punto di riferimento, subito al di sopra del quale si sezionavano con l'altra i piani muscolari nicali. Infine, facendo scorrere sottocute la lama appuntita delle forbici chirurgiche, si sezionava di netto il rachide cervicale. Quindi, si terminava lateralmente e ventralmente il taglio del piano cutaneo. Indi si procedeva ad incidere la cute del capo sulla linea mediana fino al naso e a divaricarne i lembi. I

piani muscolari nuchali venivano dunque asportati, sempre utilizzando le forbici chirurgiche, mentre con le forcicine da dissezione, si sezionavano e asportavano le ossa occipitali, scoprendo il cervelletto. Si incideva quindi la sutura parieto-temporale da entrambi i lati in modo da poter sollevare e asportare le ossa parietali, scoprendo gli emisferi cerebrali; si allargava poi la dissezione divaricando le ossa temporali e approfondendosi in avanti con l'asportazione delle frontali. Tutte le briglie meningeae venivano sezionate. Si faceva poi passare una piccola spatola tra i lobi frontali e i bulbi olfattori, separando dal resto del cervello questi ultimi, che non era necessario asportare. Seguiva quindi la fase più delicata dell'estrazione.

Si sollevava appena il cervello con la spatola per visualizzare i nervi ottici, che erano recisi. A questo punto, si potevano sollevare gli emisferi cerebrali, controllando che non rimanessero porzioni di nervi ottici ancora intatte e quindi finire di sezionare bilateralmente il trigemino e tutte le formazioni nervose, meningeae o ossee che ancora ancoravano l'encefalo, fino a completarne l'estrazione.

L'accorgimento di andare a recidere i nervi ottici senza quasi sollevare gli emisferi cerebrali impediva che il chiasma ottico (och) si staccasse dalla base dell'ipotalamo e con esso una parte più o meno ampia dell'area preottica ventrale. Abbiamo attribuito questo fenomeno (tra l'altro riscontrato anche presso altri autori; si veda ad esempio l'atlante di Paxinos e Watson, 2005, tavole 30-33) all'effetto di trazione esercitato sullo och dal sollevamento degli emisferi cerebrali e alla presenza di un'area di minor resistenza nella porzione immediatamente sovraottica dell'area preottica.

L'encefalo estratto veniva post-fissato per immersione nello stesso fissativo (paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0,1 M), all'interno di un contenitore cilindrico da 20 ml, riempito per approssimativamente i 2/3. Erano riportati sul tappo il numero dell'animale e sulla parete, oltre al numero, condizione sperimentale e data. L'encefalo veniva lasciato nel post-fissativo per 4-6 h a 4°C su agitatore (Titramax 100, Heidolph Instruments) a bassa velocità.

In corso di estrazione dell'encefalo, se ne valutavano e annotavano consistenza, colore e simmetria. (Tabella 2).

Crioprotezione

Dopo una permanenza di 4-6 h in paraformaldeide, l'encefalo veniva lavato in un becker da 50 ml contenente circa 20 ml di tampone fosfato 0,1 M (Tabella 1) freddo (4°C), per 2 min su agitatore, ad una velocità di circa 300 rpm, tale che il cervello fluttuasse nel liquido; quindi veniva posto in 50 ml di saccarosio 20% in tampone fosfato 0,1 M (si veda Tabella 1) a 4°C su agitatore a bassa velocità. Il becker veniva contrassegnato con un'etichetta riportante numero dell'animale, condizione sperimentale, data e tipo di soluzione.

Il tempo di permanenza in saccarosio è stato fissato a 60-72 h. La soluzione veniva rinnovata mediamente ogni 24 h.

Al fine di migliorare l'effetto crioprotettivo erano stati testati anche i seguenti protocolli, sempre previa lavaggio in tampone fosfato: saccarosio 30% in tampone fosfato; saccarosio 10% oppure 20% in tampone fosfato per un periodo di 3 h, poi trasferimento in una soluzione contenente saccarosio 20% e polietilenglicole (PEG, p.m. 8000, Merk) 3% (eventualmente con l'aggiunta di azide sodica allo 0,01%) in tampone fosfato. Tali protocolli, tuttavia, non sono stati proseguiti in quanto rendevano il cervello di consistenza quasi "appiccicosa" al taglio, rendendo difficile ottenere delle buone sezioni.

Congelamento

I pezzi istologici venivano congelati per immersione in isopentano (Fluka) a basse temperature: separatamente cervello da un lato, tronco dell'encefalo e cervelletto dall'altro. Sono stati sperimentati due metodi. Nel primo, l'isopentano veniva raffreddato in azoto liquido (-196°C). Il protocollo prevedeva che il pezzo venisse lavato per 5 min in isopentano a 4°C, posto su supporto di sughero per

l'intermezzo di uno strato di Killik (mezzo d'inclusione per criostato, Bio-Optica) e abbondantemente rivestito da Killik (funzione crioprotettiva). Il pezzo veniva quindi fatto "tuffare" in un becker da 100 ml riempito per circa la metà con isopentano e tenuto immerso in azoto liquido. Trascorso un tempo di 30 sec, veniva estratto e - se non tagliato immediatamente - rivestito con un foglio di alluminio e conservato a -80°C in contenitore in vetro a chiusura ermetica. Ciò che ci ha indotto a modificare il protocollo è stata l'incidenza non trascurabile (nel complesso di poco inferiore ad un 20%) di fratture o microfratture del cervello al momento dell'immersione in isopentano raffreddato in azoto liquido, per cui si è deciso di utilizzare, per il raffreddamento dell'isopentano, anidride carbonica solida. E' stata anche eliminata la fase di prelavaggio per 5 min in isopentano a 4°C. Sono stati testati tempi pari a 1, 5, 7, 10 e 15 min ed è stato trovato che 10 min costituivano un periodo sufficiente e sicuro per un congelamento totale e omogeneo del pezzo, mentre tempi inferiori (1 e 5 min) non garantivano lo stesso risultato (come si evidenziava da un colore più scuro delle porzioni più centrali del pezzo).

Qui di seguito viene riportato in dettaglio il protocollo definitivo.

Veniva utilizzato del ghiaccio secco in granuli o - se in blocchi - previamente triturato con un comune martello. Se ne ricopriva il fondo di una piccola vaschetta in plastica, su cui si appoggiava un becker da 100 ml, che veniva quindi circondato accuratamente con ghiaccio secco. Lavorando sotto cappa si versavano nel becker circa 40-50 ml di isopentano. Al fine di isolare il ghiaccio secco e ridurre l'evaporazione, si riponeva la vaschetta all'interno di un contenitore di polistirolo di grandezza adeguata. Affinché la temperatura dell'isopentano si equilibrasse con quella del ghiaccio secco, si attendeva un tempo, considerato sicuro, di circa 30 min.

Per separare il cervello da cervelletto e tronco, ci siamo avvalsi di un *brain blocker* (David Kopf Instruments, Figura 1), secondo le indicazioni riportate nell'atlante Paxinos e Watson, 1998. Tuttavia, mentre per realizzare l'atlante in questione erano stati utilizzati cervelli non fissati e quindi molli, che ben si

adattavano e si conformavano alle cavità del *brain blocker*, i cervelli fissati si comportavano come un pezzo rigido, il cui asse sagittale aveva un consistente gioco di oscillazione sul perno rappresentato dal bordo tra cavità cerebrale e cavità cerebellare dello stesso. Per superare questo inconveniente, abbiamo pensato di agevolare la stabilità dell'encefalo all'interno del *brain blocker*, ponendo una goccia di materiale dentistico da impronta (dispenser Garant Imprint, 3M ESPE, dotato di cartucce di materiale da impronta a base di vinil polisilossano e puntale miscelatore) in corrispondenza della parte posteriore della cavità destinata ad accogliere il cervelletto. Questo aveva lo scopo di fornire un appoggio stabile al cervelletto e impedire che l'intero encefalo oscillasse lungo l'asse maggiore facendo perno sul margine rilevato tra le due cavità.

Quindi, l'encefalo veniva adagiato all'interno delle cavità del *brain blocker* - nella più piccola il cervelletto, nella più ampia gli emisferi cerebrali - con la corteccia rivolta verso il basso. Molta cura veniva posta nel posizionarlo con la linea sagittale mediana il più possibile coincidente con l'asse longitudinale del *brain blocker* (in modo da rendere simmetrici al taglio i due emisferi) e con un'inclinazione della superficie ventrale il più possibile simile tra un cervello e l'altro (in modo da ottenere nelle sezioni coronali un'inclinazione dorso-ventrale riproducibile tra cervelli diversi). L'encefalo veniva fissato in posizione con due strisce di materiale da impronta, posteriormente e anteriormente rispetto al livello del taglio e si attendevano circa 8 min perché questo si solidificasse.

Si procedeva quindi al taglio seguendo, con una comune lama da rasoio di 0.08 mm di spessore, la guida del solco del *brain blocker* che era più prossimo alla fossa interpeduncolare, a livello mesencefalico. La porzione più rostrale del prosencefalo veniva asportata, sempre seguendo la guida di uno dei solchi del *brain blocker*, onde rendere più rapida la parte preliminare del taglio del pezzo al criostato.

Ognuno dei due pezzi veniva posto su una rondella di sughero - precedentemente passata su carta vetrata finissima, onde eliminare irregolarità di superficie, dopo aver disposto due strisce di Killik a croce sulla stessa. Il tutto si ricopriva poi abbondantemente con Killik, era immerso nell'isopentano e,

raggiunta la temperatura di equilibrio, veniva tirato fuori, rapidamente avvolto in un rettangolino di foglio di alluminio, etichettato e sigillato a caldo e, quindi, conservato a -80°C all'interno di barattoli di vetro con tappo a chiusura ermetica.

Preparazione dei vetrini

Tutti i vetrini (Vetrini porta oggetto, tagliati, 26 x 76 mm, Bio-Optica) venivano pretrattati per breve immersione in una soluzione di gelatina (da pelle porcina, tipo A, Sigma-Aldrich, Tabella 1), al fine di garantire l'adesione delle sezioni, prevenendone l'eventuale distacco e lasciati asciugare per almeno 24 h. La gelatina, 0,5 g in 100 ml di acqua bidistillata, con aggiunta di 0,05 g di Cromo Potassio Solfato dodecaidrato ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12(\text{H}_2\text{O})$) (Sigma-Aldrich), veniva posta ad agitare su piastra riscaldata a $50^{\circ}\text{-}60^{\circ}\text{C}$, lasciata raffreddare e filtrata con carta filtro Whatman 1. In seguito, per migliorare la solubilità della soluzione, si è deciso di aggiungere il $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ solo in un secondo tempo, una volta sciolta la gelatina. Le proprietà ossidative di tale composto si presume possano avere un'azione protettiva nei confronti della proliferazione batterica.

Inizialmente, il protocollo prevedeva un prelavaggio in 1000 ml di acqua bidistillata, in cui erano state aggiunte poche gocce di HCl (Merk) 1,0 M. Varie prove ci hanno tuttavia permesso di eliminare questa fase, perché risultata superflua.

Taglio

I pezzi istologici venivano sezionati al criostato (Frigocut-N 2800, dotato di microtomo modello 2040-C, Reichert-Jung, Leica Microsystems Nussloch). Al fine di acquisire una buona manualità, sono state inizialmente tagliate sezioni di spessore variabile da 8 a 60 μm , sia con il metodo della raccolta diretta su vetrino (8, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 μm da cervello; 20, 25, 30 e 40 μm da cervelletto e tronco dell'encefalo), sia con la tecnica del *free floating* (35 e 40 μm da cervello; 40 μm da cervelletto e tronco dell'encefalo). Nelle prove

preliminari, sono state tagliate sezioni coronali e sagittali. Ai fini sperimentali, tuttavia, le sezioni, coronali, erano tutte dello spessore di 40 μm : ogni quinta sezione veniva raccolta direttamente su vetrino e destinata alla colorazione istologica, al fine di evidenziare le strutture anatomiche, mentre le 4 intermedie venivano processate *free floating* per gli antigeni di interesse. Anche la prima sezione tagliata veniva raccolta su vetrino e colorata istologicamente ed era identificata con il numero zero. Poiché sia il pezzo corrispondente al prosencefalo sia quello corrispondente al rombencefalo venivano apposti sul supporto di sughero con la faccia mesencefalica, il prosencefalo veniva sezionato in direzione rostro-caudale, mentre il rombencefalo in direzione caudo-rostrale. Le sezioni su vetrino, destinate alla colorazione istologica, ovviamente, avevano l'orientamento opposto, quindi osservando una sezione di prosencefalo, la destra dell'immagine corrispondeva al lato destro dell'animale, mentre per cervelletto e tronco dell'encefalo corrispondeva al lato sinistro. Questo orientamento non cambiava per le sezioni *free floating*, che venivano montate su vetrino guardando il riferimento anatomico più vicino (empiricamente, il riconoscimento dell'orientamento delle sezioni *free floating* era agevolato dalla curvatura assunta dalle stesse in seguito al taglio).

Per quanto concerne il prosencefalo, costituendo l'ipotalamo la zona primaria di interesse, nelle prime prove sperimentali si utilizzava come punto di riferimento per l'inizio della raccolta la decussazione della commessura anteriore (ac), situata a livello dell'area preottica e di individuazione macroscopica estremamente agevole (Paxinos e Watson, 2005; tavola 34, bregma -0,12 mm). Successivamente, in corso di perfezionamento della procedura, si è deciso di iniziare la raccolta più rostralmente, in quanto il metodo descritto determinava la perdita di un'ampia porzione del MnPO. La sezione più rostrale in cui la ac decussava è stata spostata dal vetrino n. 0 al n. 15 e poi al n. 20. Poiché però l'unico riferimento anatomico affidabile nell'area preottica rimaneva la decussazione della ac, l'espedito tecnico adottato è stato quello di iniziare a raccogliere le sezioni, *free floating*, grossomodo tra bregma +0,96 mm e +0,72 mm (Paxinos e Watson, 2005; tavole 25-27), fino ad arrivare alla decussazione

della ac; quindi, la sezione corrispondente all'inizio di tale struttura o (in rari casi) immediatamente precedente veniva raccolta sul vetrino n. (15) - 20. Le sezioni precedenti venivano quindi assegnate a ritroso al rispettivo pozzetto o vetrino anatomico e quelle in eccedenza eliminate.

Colorazione istologica

E' stato seguito il protocollo indicato in Paxinos e Watson, 1988, modificato lievemente a seconda che si colorassero sezioni di prosencefalo o di tronco dell'encefalo.

Nel primo caso, i vetrini, inseriti verticalmente all'interno di appositi cestelli (set di colorazione per istologia e citologia, Bio-Optica Milano S.p.A.), venivano immersi per 5 min in ognuno dei seguenti reagenti: xilene (Sigma-Aldrich), xilene, alcool 100% (Sigma-Aldrich), alcool 100%, alcool 95%, alcool 70%. Quindi, dopo una breve immersione in acqua bidistillata, erano posti in una soluzione di cresil violetto per 30 min. Essi venivano quindi differenziati in acqua bidistillata per 4 min e disidratati seguendo una scala crescente di alcool: alcool 70% per 1 min, alcool 90% per 2 min, alcool 95% per 5 min, alcool 100% per 5 min, alcool 100% per 5 min. Infine, dopo 2 passaggi da 5 min l'uno in xilene, venivano montati con vetrini coprioggetto (0,13 – 0,16 mm, Bio-Optica) in DPX (Sigma-Aldrich), un mezzo di montaggio solubile in xilene (Figura 2A).

Qualora le sezioni provenissero dal tronco dell'encefalo e cervelletto, il tempo di differenziazione in acqua bidistillata era ridotto a 2 min e la disidratazione avveniva per passaggio in alcool 70% per 1 min, seguito da immersioni di 2 min in alcool 95%, alcool 100%, alcool 100% (Figura 2B).

Per la preparazione della soluzione di cresil violetto è stato utilizzato un reagente diverso da quello raccomandato in Paxinos e Watson, 1998, per cui il protocollo è stato modificato secondo Geisler et al., 2002. Invece di una soluzione di tampone acetato 100 mM, è stato utilizzato un tampone acetato 20 mM. Venivano disciolti 1,15 ml di acido acetico glaciale in 1000 ml di acqua bidistillata e si portava a pH 4.0 con una soluzione 1,0 M di idrossido di sodio

(NaOH). 1 g di cresil violetto acetato (Sigma-Aldrich) veniva quindi disciolto in 500 ml di tampone acetato e lasciato agitare al buio per 24-72 h, quindi filtrato con carta filtro Whatman 1. La soluzione veniva quindi conservata al buio e agitata nuovamente prima dell'uso.

Per quanto concerne le sezioni processate per gli antigeni di interesse, in particolare per il c-Fos, è stata inoltre messa a punto una metodica di colorazione di contrasto. Questa tecnica doveva avere lo scopo di migliorare il riconoscimento delle strutture anatomiche. In realtà essa non è stata poi conservata nel protocollo sperimentale definitivo, in quanto considerata infine superflua, alla luce del fatto che, dopo lunghi tentativi, siamo riusciti ad ottenere un ottimo segnale specifico per c-Fos, già di per sé sufficiente, insieme alla esperienza maturata e con il supporto delle sezioni adiacenti colorate con cresil violetto, ad un buon riconoscimento anatomico. Riportiamo comunque qui di seguito per completezza espositiva le tappe fondamentali dello sviluppo del metodo. Da notare che, essendo il P-CREB espresso in maniera ampiamente diffusa, non si è invece mai sentito necessario applicare una colorazione di contrasto anche alle sezioni marcate per tale Ag.

Le colorazioni sperimentate sono state l'ematossilina di Harris, l'ematossilina di Mayer, il cresil violetto e il verde di metile.

In tutti i protocolli, dopo la procedura immunostochimica, le sezioni venivano reidratate attraverso immersione per 5 min in ognuno dei seguenti reagenti: xilene, xilene, alcool 100%, alcool 100%, alcool 95%, alcool 70%.

Il primo protocollo prevedeva un lavaggio con acqua corrente per 30 sec, seguito da un'immersione di 10 sec in ematossilina di Harris (Sigma-Aldrich); le sezioni venivano quindi lavate con acqua corrente per 60 sec, differenziate attraverso 2-3 passaggi rapidi in una soluzione composta da 0,25 ml di HCl fumante e 99,75 ml di etanolo 70%, nuovamente lavate con acqua corrente per 60 sec, quindi con acqua minerale per 15 sec; infine, dopo un lavaggio di 10 min in acqua bidistillata, venivano disidratate attraverso immersioni di 5 min in una scala

crescente di alcool (20%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%), quindi xilene, xilene e montate in DPX (Figura 3A).

Il secondo protocollo prevedeva un lavaggio in acqua bidistillata per 10 min, seguito da una rapida immersione in ematossilina di Mayer (Sigma-Aldrich); le sezioni venivano quindi differenziate per 1 min in acqua di Scott (dalle caratteristiche proprietà lievemente alcaline) e poi lavate in acqua bidistillata per 2 min; quindi disidratate attraverso passaggi di 5 min in alcool 20%, alcool 50%, alcool 70%, alcool 90%, alcool 100%, alcool 100%, quindi xilene, xilene e montate in DPX (Figura 3B).

Per la colorazione di contrasto con cresil violetto è stato tentato un protocollo identico al precedente, tranne per il fatto che i passaggi dell'immersione in ematossilina di Mayer e della differenziazione in acqua di Scott erano sostituiti da un'incubazione in soluzione di cresil violetto per 5 min, ma la colorazione è stata quasi completamente dilavata e non sono state effettuate prove successive.

Il protocollo più appropriato di colorazione nucleare di contrasto è risultato quello con verde di metile (Sigma-Aldrich): esso ricalcava le tappe della colorazione con cresil violetto nella variante per il tronco dell'encefalo, in cui le fasi di incubazione in cresil violetto e differenziazione in acqua bidistillata erano sostituite da un'incubazione di 60 min in soluzione di verde di metile, preriscaldata alla temperatura di 37°C (60 sec a 160 W in forno a microonde). La soluzione veniva preparata ponendo 0,5 g di verde di metile in 100 ml di tampone acetato 100 mM (Sodio Acetato cristallino, p.m. 126,08, Merk), portato a pH 4,2 con l'aggiunta di poche gocce di acido acetico glaciale concentrato (11 = 1,05 Kg, p.m. 60,05, Merk); si lasciava agitare per 36 h al riparo dalla luce e si filtrava con carta filtro Whatman 1. La colorazione di contrasto con verde di metile (Figura 3C) aveva il vantaggio, rispetto alle precedenti, di poter essere sottratta digitalmente dalle immagini acquisite, in maniera pressoché completa, oltre che indipendente dalla colorazione marrone della marcatura specifica, parametro importante per un eventuale conteggio parzialmente digitale dei nuclei marcati.

Metodica immunoistochimica

Aspetti generali

Gli antigeni prescelti (c-Fos e P-CREB) venivano evidenziati tramite una reazione Ag - Ac.

L'Ac anti-c-Fos (Ac-5, Calbiochem) era costituito da un siero policlonale di coniglio, immunizzato verso la sequenza corrispondente agli aminoacidi 4-17 della proteina umana, reattivo anche nel ratto (oltre che nel topo) e privo di reazione crociata con la proteina Jun.

L'Ac anti-P-CREB (Upstate) era costituito da un'immunoglobulina (Ig), di classe IgG, purificata da siero di coniglio immunizzato verso un fosfopeptide di sintesi corrispondente ai residui 123-136 della proteina di ratto, fosforilato a livello della serina 133. Presentava la possibilità di reazioni crociate con peptidi da 30 e 38 kDa rispettivamente, verosimilmente le forme fosforilate dei fattori di trascrizione CREM (*cAMP-responsive-element modulator*) e ATF-1 (*cellular activating transcription factor 1*), che presentano significativa omologia con il peptide immunogeno.

Tuttavia, tranne nei casi di antigene “particellato” o con alto peso molecolare, che possa determinare la precipitazione visibile dell'immunocomplesso, la formazione di quest'ultimo non è mai facilmente rivelabile, né quantitativamente, né qualitativamente. Per entrambi gli Ag, quindi, l'immunocomplesso risultante veniva rilevato utilizzando il metodo costituito dal sistema biotina-avidina. Si tratta di una metodica caratterizzata da una elevata sensibilità, che ha rivoluzionato le tecniche analitiche di saggio, poiché ha introdotto un nuovo vantaggio di grande importanza: l'amplificazione del segnale. Prima dell'introduzione di questa tecnica, venivano impiegati, per l'evidenziazione di antigeni tissutali, anticorpi primari direttamente marcati, oppure anticorpi primari (Figura 4-1) o secondari (Figura 4-2) legati a molecole enzimatiche; tali metodiche dirette o indirette sono state poi superate dal metodo perossidasi-antiperossidasi (PAP, Figura 4-3), che permetteva già una discreta amplificazione del segnale. L'introduzione di un sistema basato sulla reazione di affinità biotina-

avidina ha permesso di ottenere un'amplificazione del segnale di gran lunga più importante. L'avidina è una glicoproteina ricavata dall'albume d'uovo e dotata di un'affinità estremamente elevata per la biotina (oltre un milione di volte più elevata rispetto a quella di molti Ac per i loro Ag!). Più molecole di biotina possono essere coniugate ad una molecola proteica, rendendo la proteina biotinilata in grado di legarsi a numerose molecole di avidina. Se, inoltre, la coniugazione è svolta con le dovute accortezze, l'attività biologica delle proteine viene preservata. Questo rende possibile legare più molecole di un enzima coniugato covalentemente con avidina ad un anticorpo biotinilato (metodo dell'avidina marcata, Figura 4-4) o, ancora, l'avidina può fungere da ponte tra un anticorpo biotinilato e numerose molecole di un enzima biotinilato, garantendo un'elevata amplificazione del segnale. Il metodo da noi impiegato, indicato con l'acronimo ABC (*Avidin-Biotinylated enzyme Complex*), sfrutta questo principio, aggiungendo ad un Ac primario (Figura 4-6) o - come nella nostra procedura - secondario (Figura 4-5) un complesso preformato tra avidina ed un enzima biotinilato. Si tratta di un metodo ad elevatissima sensibilità: il legame dell'avidina alla biotina è virtualmente irreversibile; l'avidina, inoltre, presenta quattro siti di legame per la biotina e molte proteine, incluse proteine enzimatiche, possono essere coniugate a più molecole di biotina; tali proprietà consentono la formazione di complessi macromolecolari tra avidina ed enzimi biotinilati, questo semplicemente mescolando, prima dell'uso, l'avidina e l'enzima biotinilato in una soluzione diluita e a concentrazione nota (Hsu et al., 1981).

L'enzima biotinilato era costituito nel nostro caso dalla perossidasi di rafano. Si definisce perossidasi una grande famiglia di enzimi largamente diffusi nel regno vegetale e presenti anche nel latte fresco, che hanno struttura di emoproteine e catalizzano una reazione nella forma: $ROOR' + \text{elettrone donatore} (2 e^-) + 2H^+ \rightarrow ROH + R'OH$. Esse catalizzano, quindi, l'ossidazione di numerosi composti organici e inorganici (donatori di elettroni), in genere con addizione di ossigeno. Per molti di questi enzimi, inclusa appunto la perossidasi di rafano, il substrato ottimale è il perossido di idrogeno (H_2O_2), che viene ridotto ad acqua. La natura del donatore di elettroni dipende molto dalla struttura dell'enzima. Per

esempio il sito attivo della perossidasi di rafano è tale che ci sia tutta una varietà di composti organici che possono fungere da elettroni donatori ed accettori. In particolare, esiste una serie di donatori che, quando sono ossidati, si trasformano in prodotti colorati e sono perciò detti *cromogeni*. Il substrato cromogeno da noi impiegato - e il più comunemente utilizzato nelle metodiche di immunoperossidasi - è rappresentato dalla 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich), che viene ossidata formando un precipitato di colore marrone, insolubile in acqua e in alcool e altri solventi organici.

Poiché si tratta di un agente ritenuto cancerogeno e mutageno sono state prese tutte le dovute precauzioni di sicurezza, lavorando sotto cappa con camice, guanti, mascherina e occhiali di protezione. La DAB veniva inattivata per incubazione di 24 h con eguali volumi di Permanganato di Potassio (KMnO₄) 0,2 M e Acido Solforico (H₂SO₄) 2,0 M (Tabella 1). Tutti gli oggetti contaminati venivano inattivati con Ipoclorito di Sodio (candeggina commerciale).

Uso di un modello noto di attivazione tissutale per controllare i parametri della tecnica immunoistochimica

Ora, al fine di stabilire i parametri relativi alle varie fasi della metodica di evidenziazione degli antigeni prescelti (c-Fos e P-CREB), è stato messo a punto un modello generale di controllo sulla base di dati di letteratura. E' noto che la somministrazione i.p. di etanolo induce un rapido incremento della forma fosforilata di CREB - a livello della corteccia cerebellare di ratto, in corrispondenza dello strato dei granuli, ma non delle cellule del Purkinje -, che raggiunge un picco dopo 30 min e declina ai livelli basali nel giro di 2 h (Yang et al., 1998). In seguito alla stessa tipologia di stimolo, l'immunoreattività per c-Fos (c-Fos-ir) è stata indotta in molteplici aree cerebrali e troncoencefaliche nel ratto, comprendenti il nucleo della stria terminalis (BST), il Pa, il nucleo centrale dell'amigdala (Ce), il nucleo di Edinger-Westphal (EW), il LC e il PBP, con cinetica di attivazione specifica per ciascun nucleo (Chang et al., 1995).

Abbiamo dunque somministrato per via i.p. 3,0 g di etanolo/kg di peso corporeo, al 15% vol/vol, diluiti in soluzione salina allo 0.9% di NaCl. Gli animali

sono stati fissati in tempi diversi - in numero di 4 dopo 30 min e di 3 dopo 2 h dall'iniezione - rispettivamente per l'evidenziazione di P-CREB e c-Fos. Gli encefali sono stati congelati per immersione in isopentano raffreddato in azoto liquido e, nel corso di successive sedute sperimentali, sono state tagliate sezioni di 40 μm , rispettivamente dal rombencefalo per gli animali fissati dopo 30 min dallo stimolo e dal prosencefalo per quelli fissati dopo 2 h. Le sezioni destinate al processamento immunostochimico sono state immerse *free floating* in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti (Greiner), riempiti con 3 ml di PBS 0,1 M, pH 7.4 (Tabella 1), in numero di 3 per ogni pozzetto. Le piastre erano provviste di reti (Corning) che permettevano un agevole trasferimento delle sezioni durante i vari passaggi del protocollo.

Il protocollo sperimentale prevedeva innanzitutto una serie di lavaggi di 15 min l'uno, al fine di dilavare il fissativo. Successivamente, i lavaggi sono stati portati da 2 a 3 e come liquido di lavaggio si è passati dal PBST al PBS (9‰ NaCl, Tabella 1) senza aggiunta di Triton X-100. In tutta la procedura immunostochimica veniva utilizzato un PBS con concentrazione di sodio più elevata, al fine di facilitare le diverse reazioni grazie all'aumento della forza ionica. Ognuna delle fasi descritte era condotta su agitatore a bassa velocità. Seguiva, al fine di abolire un'eventuale attività perossidasi endogena, un'incubazione di 30 min in H_2O_2 (Sigma-Aldrich) allo 0.3% in metanolo (Merk) freddo (4°C); quindi le sezioni venivano lavate 2 volte per 5 min in PBST, anche questo sostituito poi da PBS semplice. Con lo scopo di ridurre l'eventuale *background* dovuto al fissativo, si procedeva ad un'incubazione di 10 min con boroidrato di sodio (Sigma-Aldrich) all'1% in PBS (tale composto è usato comunemente per neutralizzare i gruppi aldeidici della glutaraldeide), seguita da una serie di lavaggi, di 5 min ognuno, che sono stati portati da 5 a 7 (al fine di eliminare tutto il boroidrato residuo), i primi condotti in PBS e gli ultimi in PBST, per preparare le sezioni alla successiva fase, consistente nella preincubazione in una soluzione di Siero Normale di Capra (NGS nell'acronimo inglese) al 10% in PBST (soluzione di blocco). Le sezioni venivano trasferite in provette da 2 ml (tipo Eppendorf), contenenti 1000 μl di soluzione di blocco. Questo trattamento

aveva lo scopo di saturare eventuali siti aspecifici di legame per l'anticorpo secondario (si veda oltre), nonché di permeabilizzare le membrane cellulari alla penetrazione dell'Ac primario, attraverso il Triton X-100, che è un agente ad azione detergente. I tempi sperimentati sono stati di 30 e di 60 min a Ta e sono stati testati sia il NGS presente all'interno del Vectastain ABC Kit Rabbit IgG (Vector), sia il reagente prodotto separatamente dalla stessa ditta, con la conclusione che entrambe le forme commerciali sono equivalenti. Successivamente, alla composizione della soluzione di blocco è stata aggiunta su base empirica una percentuale del 2% di latte (contiene biotina) commerciale in polvere, in quanto il NGS non è risultato sufficiente a ridurre in maniera significativa il *background* dovuto all'Ac secondario. A questo punto, le sezioni venivano trasferite in provette da 2 ml (tipo Eppendorf), contenenti 1000 µl di Ac primario e incubate a 4°C per 18 h oppure per 48 h. Per l'Ac anti-c-Fos sono state testate le seguenti diluizioni: 1:5000, 1:10000, 1:20000 (diluizione raccomandata), 1:40000, 1:80000. Per l'Ac anti-P-CREB sono state testate: 1:500, 1:1000 (diluizione raccomandata), 1:1500, 1:2000, 1:2500 ed è stata confermata la diluizione raccomandata di 1:1000. Quanto all'Ac anti-c-Fos, sono state selezionate e successivamente ritestate sia la diluizione 1:40000 sia la 1:20000 e la scelta finale è caduta su quest'ultima. Il liquido diluente era costituito da PBS con l'aggiunta di uno 0.01% di Azide Sodica (PBSNT, Tabella 1) e di un 1% di NGS. Come controllo, veniva utilizzata, in luogo dell'Ac specifico, la stessa soluzione diluente oppure delle Ig purificate da siero non immune di coniglio (Rabbit IgG, Vector), alla concentrazione di 0,25 µg/ml (scelta empiricamente nel rango delle diluizioni raccomandate: 0,1 - 1,0 µg/ml).

Le sezioni, quindi, previa lavaggio per 4 volte in PBST (sostituito poi da PBS) per 10 min, onde eliminare l'eventuale eccesso di Ac non legato al tessuto, venivano incubate per tutta una notte (18 h) a 4°C in 500 µl di Ac secondario (siero policlonale di capra, immunizzata nei confronti delle IgG di coniglio, Vectastain ABC Kit, Vector) in provette da 1,5 ml (tipo Eppendorf). Sono state testate, dopo incubazione in Ac primario anti-c-Fos 1:40000 o anti-P-CREB 1:1000, le diluizioni: 1:200, 1:300, 1:400, 1:600, 1:800. Nel testare le diluizioni

relative all'Ac primario era stata precedentemente utilizzata la diluizione raccomandata di 1:200 e la stessa è stata confermata nelle successive prove. Il liquido diluente era rappresentato in questo caso da una soluzione all'1% di NGS in PBS senza Azide Sodica: questo composto, potente antibatterico, va infatti evitato in tutte le tappe successive all'incubazione con Ac primario, in quanto in grado di inibire la reazione immunoperossidasi.

Di seguito, le sezioni venivano sottoposte a lavaggi di 10 min in PBST (poi sostituito con PBS), il cui numero è stato portato dai 5 iniziali a 3. Quindi, venivano incubate per 2 h a temperatura ambiente (TA) nel reagente ABC in provette da 1,5 ml (tipo Eppendorf), riempite con 535 µl di soluzione. La soluzione A (avidina DH) : B (perossidasi biotinilata) : PBS, in *ratio* 1:1:100, veniva preparata almeno 30 min prima dell'uso e lasciata a TA, in modo da permettere l'interazione tra i due reagenti. Sono stati testati PBS a diverse concentrazioni di NaCl, in modo da variarne la forza ionica, con molarità di NaCl corrispondenti oltre che a 0,15 M (9,00% NaCl), anche a 0,30 M (17,50% NaCl) e 0,50 M (27,22% NaCl), stabilendo di mantenere la prima.

Dopo 3 lavaggi di 10 min in PBS e 2 lavaggi di 10 min in TB 0,05 M (TRIS-Base, portato a pH 7.4 con aggiunta di HCl, Tabella 1), si procedeva all'incubazione in una soluzione allo 0.05% di DAB in TB a TA per 10 min (3 ml/pozzetto). Quindi la reazione veniva sviluppata con aggiunta di 30 µl di H₂O₂ all'1% in H₂O bidistillata, onde ottenere una concentrazione finale dello 0,01%, per un tempo che in questi esperimenti iniziali era di 3-5 min, valutato sulla comparsa macroscopica della marcatura (imbrunimento delle sezioni).

Allo scopo di studiare la presenza eventuale di interazioni tissutali aspecifiche nelle tappe della catena di rivelazione dell'immunocomplesso successive alla fase di legame dell'Ac secondario, è stata anche sperimentata la sostituzione delle fasi di incubazione con Ac primario e secondario con un'incubazione di 18 h in NGS all'1% in PBS: la totale assenza di *background* nelle sezioni così processate ha escluso tale eventualità. D'altronde, in questi esperimenti preliminari, oltre al controllo dato dall'assenza di Ac primario, venivano utilizzati controlli in cui mancava anche il secondario. Infine, sono

anche stati previsti controlli in cui mancavano tutte le fasi della catena di rilevazione dell'Ag (Ac primario e secondario, ABC), tranne l'incubazione con la DAB e l' H₂O₂: non è stata evidenziata attività perossidasi endogena, probabilmente perché assente nel tessuto (il cervello non è un organo ricco in perossidasi) o comunque perché abolita dalla precedente incubazione in H₂O₂ allo 0,3% in metanolo.

Alla reazione immunoperossidasi, seguivano 3 lavaggi di 10 min in TB. Inizialmente, al fine di testare la soluzione più appropriata per la successiva fase di trasferimento delle sezioni su vetrino, si procedeva con 2 ulteriori lavaggi di 10 min in PBS, oppure le sezioni venivano trasferite in H₂O bidistillata. Si è trovato che l'H₂O bidistillata tendeva a disidratare le sezioni, mentre il PBS non è risultato migliore del TB come soluzione da cui montare le sezioni su vetrino, ragion per cui è stato scelto il TB. Le sezioni venivano quindi lasciate asciugare per un'intera notte, poi sottoposte a lavaggio per 10 min in H₂O bidistillata, disidratazione in scala graduata di alcool, ognuno per 5 min: etanolo 20%, etanolo 50%, etanolo 70%, etanolo 90%, etanolo 100%, etanolo 100%, poi 2 passaggi di 5 min in xilene. Infine, venivano apposti i coprioggetti in DPX.

Studio di un modello specifico di incremento dell'attivazione tissutale

L'utilizzo di un modello di stimolazione dell'attività antigenica già noto ci ha permesso di settare inizialmente i parametri del protocollo immunocistochemico. Tuttavia, il nostro esperimento prevedeva un tipo di stimolazione con caratteristiche affatto differenti: non di tipo chimico e acuto, ma ambientale e prolungato nel tempo (cronico). Si trattava, peraltro, di un modello per il quale la letteratura non ci forniva punti di riferimento, in quanto mai esaminato precedentemente in altri lavori: anche quegli studi di tipo termoregulatorio che hanno esplorato l'espressione di c-Fos in seguito ad esposizione a bassa Ta non hanno investigato l'effetto di esposizioni a Ta inferiori ai 4°C (Baffi e Palkovits, 2000; Cano et al., 2003; Bratincsak e Palkovits, 2004).

Una tappa intermedia è stata quella di esporre gli animali ad uno stimolo ambientale di tipo acuto, elaborando un modello specifico sulla base di precedenti

dati neurochimici. E' stato osservato, infatti, che l'ipossia induce differenti (e transitori) profili di incremento nell'accumulo cerebrale di cAMP e IP₃ (Zamboni et al., 1996), verosimilmente dovuti ad un rilascio generalizzato di neurotrasmettitori innescato da un'accresciuta concentrazione citosolica di calcio nelle terminazioni nervose. In ragione di questo pattern di rilascio e della sua breve durata, la misura della concentrazione di secondi messaggeri in conseguenza di uno stimolo ipossico può essere considerata come un modo per stimare la capacità massima di accumulo di secondi messaggeri. Essa risulta dalla relazione tra i processi di sintesi (ad opera rispettivamente di adenil ciclasi e fosfolipasi C) e degradazione (fosfodiesterasi per cAMP e fosfatasi o chinasi per IP₃) attivati dall'occupazione, da parte dei neurotrasmettitori massivamente liberati, di recettori legati a proteine G. Le cinetiche di accumulo in corso di ipossia mostrano che, nel cervello dei roditori, la concentrazione di cAMP incrementa ad un livello relativamente più alto e declina più lentamente rispetto all'IP₃ (Zamboni et al., 2004). Poiché la cascata di secondi messaggeri determina a valle l'attivazione di fattori di trascrizione (fosforilazione di CREB, trascrizione del gene fos), abbiamo ritenuto ragionevole costruire e studiare un modello di attivazione dell'espressione tissutale di tali Ag basato sullo stimolo ipossico.

L'apparato di stimolazione prevedeva l'utilizzo di una campana in vetro, del volume di 4 litri, provvista di foro superiore e tappo di gomma, a tenuta, dello spessore di 38 mm, dotato di un'uscita per l'aria e un'entrata per un gas inerte, rappresentato da azoto puro alla pressione di 1,5 atmosfere. Il ratto veniva posto su un piano orizzontale, all'interno di un contenitore cilindrico trasparente, ampio e sufficientemente alto. Veniva quindi introdotta la campana forata appoggiandola delicatamente sul piano in modo da includere l'animale al suo interno. Al fine di minimizzare lo stress e di ottenere un'elevata riproducibilità dello stimolo, aspirazione e flusso di azoto venivano attivati prima della connessione del tappo all'apparato, quindi si chiudeva istantaneamente la campana, mantenendola premuta contro il piano d'appoggio e si avviava il cronometro. Prove preliminari hanno permesso di fissare il tempo di stimolazione a 21 sec, inteso come massima durata dell'ipossia che permetteva il recupero (assente dopo uno stimolo di 40

sec), senza peraltro scatenare crisi convulsive (presenti dopo 25 e 30 sec di ipossia). L'esposizione veniva terminata sollevando rapidamente la campana e lasciando l'animale recuperare *in loco* per alcuni min prima del trasferimento nella gabbia, in attesa della fissazione. I ratti venivano sacrificati in tempi diversi dalla cessazione dello stimolo, che veniva applicato su animali di controllo, ovvero non esposti a bassa Ta (si veda paragrafo *Condizioni sperimentali*). Le condizioni erano indicate con una H (dall'iniziale dell'inglese *hypoxia*) seguita dal tempo post-ipossico: rispettivamente H15', H30', H45', H60' e H90'. Un punto preliminare a 5 min dall'ipossia non aveva evidenziato incremento dell'espressione di c-Fos rispetto al controllo normossico (C), conformemente alla cinetica di attivazione descritta in letteratura, né un incremento valutabile dell'espressione di P-CREB. La prova sperimentale è stata condotta su 6 ratti, uno per ogni condizione, di cui sono state analizzate 35 sezioni di 40 µm a partire da bregma -0.12 mm (Paxinos e Watson, 2005). Ad un'analisi visiva generale, si è evidenziato un picco nell'espressione di c-Fos (Figura 6A) a 60 min dallo stimolo ipossico (Tabella 3), mentre il P-CREB (Figura 6B) sembrava già aver raggiunto dopo 15 min un picco di espressione, che rimaneva costante a 30 min, per poi decrescere dopo 45 min fino a trovarsi in 60 min al di sotto dei valori di C, che poi apparivano ripristinati a 90 min dallo stimolo.

Questo esperimento preliminare ha avuto il significato di confermare la validità della tecnica immunostochimica nell'evidenziare differenze nell'espressione degli Ag d'interesse anche in risposta ad uno stimolo ambientale e ci ha permesso di costruire una curva di espressione per entrambi gli Ag. In accordo con i dati precedentemente acquisiti nel nostro laboratorio che indicano, in seguito ad esposizioni di 24 e 48 h ad una Ta di -10°C, una riduzione della capacità massima di accumulo di cAMP in risposta all'ipossia, questo modello potrebbe inoltre rappresentare in futuro un metodo indiretto per accrescere la sensibilità del preparato immunostochimico alle differenze fra condizioni sperimentali. Questo avverrebbe applicando lo stimolo ipossico all'uscita da ogni condizione sperimentale e sacrificando l'animale dopo un tempo opportuno. Va tuttavia sottolineato che le cinetiche di attivazione sono tali da non consentire

l'utilizzo dello stesso punto della curva sia per c-Fos sia per P-CREB. Rimane anche da esplorare come gestire eventualmente il tempo post-ipossico, in particolare a quale Ta lasciare l'animale in attesa della fissazione tissutale.

Elaborazioni successive e affinamento tecnico del protocollo immunostochimico

Il protocollo elaborato sul modello noto di attivazione tissutale, rappresentato dalla somministrazione di etanolo, è stato applicato a punti selezionati del nostro modello sperimentale, sia su sezioni da prosencefalo (comprendenti la POA e l'ipotalamo), sia su sezioni da rombencefalo, ed è andato incontro a successive elaborazioni e rimaneggiamenti. Tali modifiche, oltre a riguardare aspetti tecnici generali, avevano in particolare due precise direzioni. L'una era rivolta a ridurre il *background* aspecifico dovuto, come visto precedentemente, all'Ac secondario. L'altra era rappresentata dalla necessità di incrementare l'intensità della marcatura specifica per l'Ag c-Fos, che nelle condizioni sperimentali testate sembrava essere un po' debole, benché presente, con un pattern caratteristico a cellule sparse. Poiché la deprivazione ipnica per esposizione a bassa Ta costituiva un modello mai precedentemente esplorato in letteratura con le tecniche immunostochimiche, era arduo discernere se la relativamente debole intensità della marcatura per l'Ag c-Fos era dovuta alla condizione sperimentale oppure a problemi tecnici. D'altra parte l'Ac anti-P-CREB marcava i nuclei cellulari in maniera intensa e con un pattern diffuso.

In questa serie di prove sperimentali, le sezioni *free-floating* sono state portate a 5 per pozzetto (eccezionalmente 6) per il prosencefalo e a 6 per pozzetto (eccezionalmente 7 o 8) per il rombencefalo. In realtà, il numero di sezioni per pozzetto non si è mai rivelato un fattore critico, purché ci fosse un controllo da parte dello sperimentatore che tutte fossero coperte da liquido. Per tutta la serie di passaggi che andavano dal taglio all'incubazione in Ac primario i liquidi erano aggiunti con Azide Sodica allo 0.01%, assente invece nella totalità dei passaggi successivi. Per le tappe di incubazione nei vari reagenti specifici, si è passati dall'utilizzo di provette tipo Eppendorf al trasferimento delle sezioni in piastre da 24 pozzetti (Greiner), contenenti i vari reagenti e corrispondenti ognuna a due

piastre da 12. L'esigenza ovvia per l'una e per l'altra modalità era quella di risparmiare reagenti e la seconda variante si è rivelata di più agevole manualità. Tutte le piastre erano opportunamente siglate in codice colore.

Sono stati testati vari tempi d'incubazione in Ac primario a 4°C: 24 h e 48 h per entrambi gli Ac, poi anche 72 h e 96 h per c-Fos. L'incubazione di 96 h non ha portato modifiche rispetto a quella di 72 h, risultata anche lievemente migliore delle due precedenti. Per l'Ac anti-P-CREB un tentativo di incubare le sezioni per 1 h a TA non ha prodotto marcatura specifica ed è stato definitivamente scelto il tempo di 48 h. Al fine di permettere lo sviluppo di tutte le sezioni contemporaneamente, nonostante le 24 h di differenza tra i tempi di incubazione per i due Ac, si è deciso di preincubare in soluzione di blocco tutta una notte a 4°C le sezioni destinate alla rilevazione dell'Ag c-Fos e ulteriori 24 h quelle destinate alla rilevazione dell'Ag P-CREB. L'incubazione in Ac secondario invece è stata portata a 2 h a TA.

In assenza di Ac primario, sono state utilizzate, come controllo corrispondente all'Ac anti-P-CREB, Rabbit IgG alla concentrazione di 1 µg/ml, scelta (assumendo una concentrazione di IgG purificate anti-P-CREB pari a 1 mg/ml) in maniera da corrispondere alla diluizione anticorpale di 1:1000. E' stato inoltre introdotto del siero non immune di coniglio (NRS nell'acronimo inglese, Vector) alla medesima diluizione (1:20000) dell'Ac anti-c-Fos, come controllo corrispondente.

I provvedimenti presi al fine di ridurre la marcatura aspecifica (*background*) possono essere riassunti come segue. La fase di incubazione in Boroidrato di Sodio, che ricordiamo era stata preventivamente introdotta allo scopo di ridurre un eventuale *background* dovuto al fissativo, considerata superflua, è stata eliminata. L'aggiunta di sieroalbumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) alla soluzione di blocco su sezioni provenienti da prosencefalo e da rombencefalo ha causato un'efficace riduzione della marcatura aspecifica. La BSA, testata inizialmente allo 0.01%, è stata poi portata all'1% (la concentrazione del 3%, aggiunta sia alla soluzione di blocco sia all'Ac primario, non ha prodotto

chiare differenze). E' stata inoltre aumentata dall'1% al 2% la concentrazione di NGS nell'Ac secondario.

Al fine di incrementare l'intensità della marcatura specifica, oltre a testare, come abbiamo visto, vari tempi di incubazione, abbiamo sperimentato su sezioni da rombencefalo un protocollo che prevedeva la preincubazione per 30 min in etanolo 50%, allo scopo di facilitare la penetrazione anticorpale nel tessuto, ma senza successo. Si è voluto inoltre studiare se la fase di inattivazione delle perossidasi endogene, condotta in metanolo, potesse creare una qualche interferenza con la marcatura specifica per c-Fos. E' stato riportato che il blocco delle perossidasi endogene può danneggiare alcuni Ag, in particolare gli Ag di superficie in sezioni congelate e in preparati con cellule intere (Van Noorden, 1993). La soppressione di questa fase nel nostro protocollo apparentemente aumentava il segnale specifico oltre a determinare un incremento del *background*, ma il dato poteva ragionevolmente essere attribuito ad una maggiore colorazione di tutta la sezione. E' stata condotta, su sezioni da prosencefalo di animali sottoposti a stimolo ipossico, una serie di prove in cui veniva mantenuta la fase di inattivazione delle perossidasi endogene, variando però l'esposizione delle sezioni al metanolo. Sono stati testati, in aggiunta al protocollo classico (incubazione di 30 min in H₂O₂ 0,3% in metanolo), tre protocolli anch'essi di 30 min (H₂O₂ 0,3% in PBS, H₂O₂ 0,3% in metanolo al 10% in PBS, H₂O₂ 0,9% in metanolo al 50% in PBS) ed uno della durata di soli 5 min, con incremento di un fattore dieci della concentrazione iniziale di H₂O₂ (3,0% in metanolo al 10% in PBS). Quest'ultimo protocollo è stato scartato in prima analisi, in quanto ha prodotto un'intensa marcatura aspecifica. I tre precedenti sembravano invece ravvivare la marcatura specifica, ma al prezzo di un aumento, anche se lieve, del *background*, che diventava più carico e comunque tendenzialmente irregolare tra una sezione e l'altra, man mano che si riduceva la concentrazione di metanolo. La differenza si notava in particolare tra il protocollo che utilizzava solo PBS e gli altri due a diverse concentrazioni di metanolo. Un'ulteriore prova è stata condotta, su sezioni mesencefaliche, provenienti sempre da animali sottoposti a stimolo ipossico, al fine di sperimentare l'effetto dello spostamento della fase di inattivazione delle

perossidasi endogene successivamente all'incubazione in Ac primario. Sono stati testati, rispetto al protocollo classico (M), due protocolli di medesima durata (H_2O_2 0.3% in metanolo al 70% in PBS o in H_2O bidistillata, indicati rispettivamente con le lettere S e H), collocando la tappa di inattivazione delle perossidasi endogene sia (1) prima della fase di incubazione con Ac primario, sia (2) immediatamente dopo. Per l'Ag c-Fos è stata utilizzata la condizione H90' (Figura 7A), per l'Ag P-CREB la H15' (Figura 7B). L'analisi dei risultati, condotta in cieco, ha mostrato un *background* disomogeneo per M e omogeneo e chiaro per S e H (lievemente migliore per S), corrispondentemente più chiaro, per ogni condizione, in 1 che in 2. La marcatura specifica per c-Fos è risultata tuttavia più leggibile in 2 che in 1, ragion per cui è stata preferita la condizione S2.

La variazione più sensibile nella qualità della marcatura specifica per l'Ag c-Fos è stata ad ogni modo registrata quando, in seguito all'esaurimento della riserva di Ac, abbiamo iniziato ad utilizzare un nuovo lotto dello stesso reagente. In una prova a diverse diluizioni (1:10000, 1:15000, 1:20000, 1:30000, 1:40000), abbiamo potuto riconfermare quella raccomandata di 1:20000, ma con qualità sensibilmente più elevata della marcatura specifica.

Il protocollo definitivo è descritto nella sezione seguente (*Fase sperimentale*). Tutti gli animali sono stati trattati con il nuovo lotto anticorpale.

Studi di competizione

Sono volti a determinare se una regione marcata in una sezione tissutale rappresenta una reazione anticorpale specifica o è dovuta ad effetti non specifici, quali reazioni aspecifiche nel corso delle fasi successive del processamento immunoistochimico. Sebbene, come abbiamo visto, numerosi controlli sperimentali siano possibili per differenziare tra reazione anticorpale specifica ed effetti non specifici, l'uso dell'inibizione competitiva è generalmente considerato di gran lunga la prova più valida. Utilizzando questo tipo di approccio, gli anticorpi vengono neutralizzati per mezzo di una preincubazione con un eccesso

di Ag di sintesi, in modo che la reazione specifica tra Ac e Ag tissutale venga fortemente attenuata o eliminata del tutto.

Come Ag corrispondente all'Ac anti-c-Fos è stato impiegato il peptide di sintesi c-Fos Peptide-2 (Calbiochem), sia alla diluizione raccomandata di 10 µg/1 µg di Ac, sia ad una diluizione, scelta su base empirica, 5 volte più alta. La quantità di siero policlonale da impiegare è stata calcolata assumendo che la concentrazione totale di Ac in un siero immune policlonale sia di 10 mg/ml e che l'Ac specifico rappresenti nella migliore delle ipotesi il 10% (1 mg/ml), quindi che 1 µl di siero contenga 1 µg di Ac specifico (Harlow e Lam, 1988).

Per la reazione di competizione relativa all'Ac anti-P-CREB è stato impiegato il fosfopeptide di sintesi corrispondente agli aminoacidi 123-136 della proteina CREB di ratto (*P-CREB immunizing peptide*, Upstate), del peso molecolare di 1924 Dalton. A differenza dell'Ac anti-c-Fos, l'Ac anti-P-CREB è un'Ig purificata, di cui comunque non è data la concentrazione. Possiamo tuttavia ipotizzare che la stragrande maggioranza di queste immunoglobuline siano IgG, caratteristiche della risposta immunitaria secondaria. Seguendo anche in questo caso l'assunto che l'Ac specifico abbia una concentrazione pari ad 1 mg/ml di soluzione anticorpale, poiché il peso molecolare delle IgG è di 160 KDa e quindi una concentrazione 1 mM equivale a 160000 mg/litro, avremo che 1000 mg/litro (o 1 mg/ml) corrispondono ad una concentrazione di 6,25 µM (1000 mg : 160000 mg = 0,00625). La diluizione raccomandata di 1:1000 avrebbe dunque una concentrazione di anticorpo specifico pari a 6,25 nMol/litro. Poiché le IgG sono Ac bivalenti, una tale concentrazione di Ac legherebbe stechiometricamente un Ag alla concentrazione di 12,50 nM. Noi abbiamo scelto due concentrazioni altamente saturanti di Ag, pari a 10 e 20 µM, quindi 800 e 1600 volte rispetto a 12,50 nM. Va qui detto che se anche si assumesse una concentrazione di Ac specifico 10 volte più elevata, avremmo una concentrazione teorica di IgG pari a 62,5 nM, corrispondenti ad una concentrazione 125 nM di Ag. Quindi le due concentrazioni di peptide utilizzate di 10 e 20 µM corrisponderebbero comunque rispettivamente a 80 e 160 volte la capacità legante dell'Ac specifico.

Lo studio di inibizione competitiva è stato effettuato su due condizioni sperimentali (E4 e E48R4, si veda par. *Condizioni sperimentali*). La marcatura nucleare, in seguito a preassorbimento di entrambi gli Ac primari con concentrazioni saturanti dei rispettivi Ag di sintesi, per periodi corrispondenti ai tempi di incubazione dei rispettivi Ac (72 h e 48 h rispettivamente), è risultata assente (Figure 8 e 9). Per quanto riguarda l'Ac anti-c-Fos, ha implicato la verifica del nuovo e qualitativamente migliore lotto anticorpale.

Fase sperimentale

Sono stati utilizzati 24 ratti albinici adattati alle normali condizioni di laboratorio (si veda la sezione *Fase di messa a punto delle metodiche sperimentali*).

Condizioni sperimentali

Sono state selezionate in totale 7 condizioni sperimentali (Figura 10). Le prime tre corrispondevano a tempi diversi di esposizione alla Ta di $-10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$: rispettivamente 4 h 30' (E4), 24 h (E24) e 48 h (E48). I tempi di 24 e 48 h sono stati scelti sulla base di precedenti dati comportamentali e biochimici del nostro laboratorio (Zamboni et al., 2004); il punto a 4 h 30' è stato introdotto, come condizione acuta, già studiata in letteratura sul piano della c-Fos-ir (Cano et al., 2003), al fine di avere un test interno all'esperimento del funzionamento della reazione anticorpale e permetteva di valutare gli effetti sul sistema di un'esposizione di breve durata. Vi erano poi due condizioni di recupero alla normale Ta di laboratorio ($23,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$), entrambe della durata di 4 h 30', anch'esse scelte sulla base di precedenti dati comportamentali e biochimici (Zamboni et al., 2004): una successiva ad un periodo di esposizione di 24 h (E24R4), l'altra dopo un'esposizione di 48 h (E48R4). Infine, poiché il sacrificio avveniva alle h 13:45 per le condizioni E4, E24R4 e E48R4 e alle h 09:15 per E24

ed E48, sono state pensate due condizioni di controllo alla normale Ta di laboratorio, rispettivamente C4 e C24, al fine di corrispondere correttamente ai tempi dei trattati. Questa scelta derivava dall'esigenza di tener conto di eventuali fluttuazioni circadiane degli Ag studiati. Gli animali, divisi in quattro blocchi da 6 ratti, sono stati assegnati in maniera casuale ad ognuna delle condizioni sperimentali. In particolare, alle condizioni E4, E24R4 e E48R4 sono stati assegnati 4 casi, alle altre esposizioni e ai controlli 3 casi.

Poiché non era possibile fissare più di due animali al giorno, le perfusioni erano distribuite su un arco di 3 o 4 giorni e questo determinava una variabilità nell'adattamento da un minimo di 6 ad un massimo di 11 giorni. Data la durata variabile dei trattamenti (da 4 h 30' a 52 h 30'), l'ingresso in esperimento era regolato da un calendario che prendeva a riferimento il giorno in cui l'animale sarebbe stato perfuso. Alle h 09:00 dell'ultimo giorno di adattamento l'animale veniva pesato e alloggiato singolarmente in una nuova gabbia, quindi trasferito in una camera termoregolata, mantenuta alla temperatura di $23,5 \pm 1,0$ °C. Tutti gli animali venivano pesati anche immediatamente prima della fissazione tissutale (Tabella 4). Il trasferimento in camera fredda avveniva all'interno della stessa gabbia in cui l'animale era stato posto durante l'ultimo giorno di adattamento e non venivano operati ulteriori cambi di lettiera nel corso del protocollo sperimentale.

La camera fredda, immediatamente adiacente a quella termoneutrale, veniva portata a temperatura in maniera progressiva, iniziando con 2 o 3 giorni di anticipo, in modo da essere sicuri che la Ta si fosse stabilizzata, prima dell'inizio dell'esposizione. Era stata allestita una copertura con pannelli in polistirolo al fine di proteggere i ratti dalla ventilazione del sistema di raffreddamento, che avrebbe incrementato in maniera significativa la termodispersione, producendo una temperatura percepita sensibilmente inferiore a quella stabilita. Analogamente a quella della camera fredda, veniva controllata la stabilità della temperatura nella camera mantenuta a Ta normale. Tutti gli animali vi soggiornavano durante il giorno di adattamento precedente l'esposizione, durante il recupero per le condizioni che lo prevedevano e durante l'intero periodo nel caso dei controlli.

Acqua e cibo erano disponibili *ad libitum* per tutte le condizioni sperimentali, ma durante l'esposizione a bassa Ta, l'acqua tendeva a congelare, generando di fatto una deprivazione idrica (e conseguentemente anoressia), nonostante si avesse cura di cambiare i biberon due volte al giorno.

Processamento immunoistochimico

Al termine di ogni condizione sperimentale, l'animale veniva prelevato, pesato, sottoposto ad anestesia eterea e perfuso secondo le modalità già descritte. L'inizio della perfusione con paraformaldeide 4% corrispondeva alle h 09:33 o 14:03 \pm 2 min. Sempre secondo le modalità precedentemente descritte, gli encefali, dopo l'estrazione, venivano sottoposti a post-fissazione per immersione nello stesso fissativo, crioprotetti e congelati in isopentano raffreddato con ghiaccio secco, separando prosencefalo e rombencefalo a livello mesencefalico.

Dal prosencefalo di ogni ratto sono state prodotte 81 consecutive sezioni coronali di 40 μ m, numerate da 0 a 80, approssimativamente da bregma +0,70 mm a bregma -2,50 mm (Paxinos e Watson, 2005, Figura 11). La sezione più rostrale contenente la decussazione della ac (bregma -0,12 mm, Paxinos e Watson, 2005) corrispondeva al vetrino n. 20 o raramente 21. Ricordiamo che la numero zero e poi ogni quinta sezione venivano raccolte direttamente su vetrino e colorate con cresil violetto per fungere da riferimento anatomico. Poiché le sezioni intermedie venivano alternatamente processate per la rilevazione degli Ag P-CREB e c-Fos, la differenza tra ogni sezione marcata e il suo più vicino (precedente o seguente) riferimento anatomico poteva essere di 40 o 80 μ m al massimo.

Le sezioni destinate al processamento immunoistochimico venivano raccolte *free floating* in PBSN in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti, provviste di reti per un agevole trasferimento nei successivi passaggi, in numero di 4 sezioni per pozzetto. Poiché da ogni cervello si ottenevano 64 sezioni *free floating* (equivalenti a 16 pozzetti), 4 piastre (48 pozzetti) corrispondevano a 3 animali (Figura 12). Quattro era il numero di posti per le piastre di cui era dotato

l'agitatore, su cui le sezioni venivano tenute in costante moto oscillatorio, per cui ogni gruppo di 6 animali veniva processato nel corso di 2 successive sessioni sperimentali. L'assegnazione dei cervelli alle piastre, quindi l'ordine di taglio, era casuale. Un pozzetto per ogni animale era assegnato, anch'esso in maniera casuale, al controllo corrispondente all'Ac anti-c-Fos (NRS) ed uno al controllo corrispondente all'Ac anti-P-CREB (Rabbit IgG). Entrambi venivano definiti *bianchi*, in quanto privi di Ac primario e quindi di rilevazione colorimetrica dell'Ag d'interesse.

Terminata la fase di taglio, le sezioni venivano sottoposte a 4 lavaggi di 10 min, i primi due in PBSN, i due seguenti in PBSNT (Tabella 1) e poste a preincubare a 4°C in blocking solution (NGS 10%, latte commerciale in polvere 2%, BSA 1% in PBSNT), in attesa della tappa successiva. Le sezioni venivano quindi trasferite in piastre da 24 pozzetti, riempiti con 880 µl di Ac primario, grazie a comuni pipette Pasteur, con estremità sottile lavorata a fiamma in modo da ottenere un uncino a punta arrotondata. Questo avveniva il mattino del giorno seguente per l'Ac anti-c-Fos e 24 h dopo per l'Ac anti-P-CREB, in modo da terminare l'incubazione di tutte le sezioni contemporaneamente. Ricordiamo che le diluizioni anticorpali venivano effettuate in PBSN contenente un 1% di NGS ed erano le seguenti: Ac anti-c-Fos, 1:20000; Ac anti-P-CREB, 1:1000; NRS, 1:20000. Per quanto concerne le Rabbit IgG, essendosi queste rivelate non stabili a -20°C (infatti, a distanza di due anni dal congelamento delle aliquote, la diluizione di 1 µg/ml iniziava a produrre una colorazione di fondo scura), si è deciso di ritornare alla diluizione scelta empiricamente nelle prime prove sperimentali di 0,25 µg/ml. Dopo 72 e 48 h di incubazione rispettivamente, a 4°C, le sezioni venivano trasferite nuovamente in piastre da 12 pozzetti dotate di reti, per i successivi 3 lavaggi di 10 min in PBS. Venivano quindi incubate per 30 min al riparo dalla luce in H₂O₂ allo 0,3% in metanolo 70% in PBS e successivamente lavate in PBS, 2 volte per 5 min e 2 per 10 min. Di nuovo le sezioni erano trasferite in piastre da 24 pozzetti, riempiti con 830 µl di Ac secondario diluito 1:200 in PBS con l'aggiunta di un 2% di NGS e incubate a TA per 2 h. Seguivano 3 lavaggi in PBS, dopo i quali le sezioni venivano incubate a TA per 2 h in 830 µl

di reagente ABC (A:B:PBS = 1:1:100), preparato almeno 30 min prima, sempre previa trasferimento in piastre da 24 pozzetti. Seguivano 3 lavaggi di 10 min in PBS e 2 sempre di 10 min in TB. Infine, le sezioni venivano incubate in DAB allo 0,05% in TB, poi trasferite nella medesima soluzione con l'aggiunta di H₂O₂ allo 0,01% e lasciate sviluppare per 4 min. Dopo 3 lavaggi di 10 min, le sezioni erano conservate a 4°C in attesa di essere montate su vetrino. Dopo il montaggio, venivano lasciate asciugare tutta una notte, immerse in H₂O bidistillata per 10 min, quindi disidratate per successivi passaggi di 5 min in una scala crescente di alcool: etanolo 20%, etanolo 50%, etanolo 70%, etanolo 90%, etanolo 100%, etanolo 100%; dopo altri 2 passaggi di 5 min in xilene, venivano apposti i vetrini coprioggetti in DPX.

Al fine di evitare qualsiasi possibilità di errore e confusione durante la serie di lavaggi e trasferimenti, ogni piastra da 12 pozzetti era contrassegnata al momento del taglio con un numero in codice colore posto in corrispondenza delle reti. Le piastre da 24 pozzetti, orientate verticalmente (4 x 6), corrispondevano ognuna a due piastre da 12 (4 x 3) orientate orizzontalmente, che venivano riportate graficamente su di esse rispettando il codice colore. Per l'incubazione in Ac primario, i *bianchi* erano anch'essi contrassegnati appositamente. Anche ai vetrini è stato assegnato un codice colore: banda gialla per l'Ag c-Fos, arancio per l'Ag P-CREB, verde per il NRS, rosa per le Rabbit IgG e blu per il cresil violetto. Tutti i vetrini processati per l'immunoistochimica erano siglati con un codice che permetteva di identificare in maniera inequivocabile l'animale di provenienza, senza tuttavia riportare la condizione sperimentale, in modo da poter condurre in cieco le operazioni di analisi. La sigla, scritta con inchiostro resistente ai solventi (penne per cassette resistenti ai solventi Securmark II, Bio-Optica), era composta dal numero del blocco sperimentale, seguito da una lettera (F, c-Fos; P, P-CREB; C per i *bianchi*), dal numero della piastra di assegnazione dell'animale (da 1 a 6), poi dalle coordinate del pozzetto e infine dal numero progressivo della sezione. Alcuni esempi sono riportati qui di seguito: 28 F5D4 19, 30 C3A2 2, 31 P2B1 46 o 29 C6C3 73. I vetrini anatomici, colorati con cresil violetto, venivano siglati con numero dell'esperimento e della piastra (che insieme identificavano un singolo

animale), data di taglio e numero progressivo della sezione, per esempio: 28 1 190106 25.

Analisi dei dati

Una volta rilevati gli Ag di interesse mediante la metodica immunoistochimica, i vetrini venivano analizzati passando attraverso una serie ordinata di fasi che andavano dall'acquisizione delle immagini delle sezioni in forma digitale, alla correzione della *vignettatura*, al posizionamento delle griglie per il conteggio dei nuclei marcati, fino alla conta e alle analisi statistiche dei risultati. La messa a punto delle procedure di analisi ha comportato tutta una serie di prove prima di ottenere un protocollo efficiente.

Acquisizione delle immagini in forma digitale

Sistema a scansione manuale (fase pre-sperimentale)

In un primo tempo, il laboratorio si è dotato di un sistema di acquisizione comprendente una fotocamera digitale Nikon Coolpix 4500 (NITAL), collegata al microscopio (Aus Jena, Jenaval) tramite raccordo ottico (Exacta+Optech) e il programma di analisi d'immagine Vision Assistant 7.1 (National Instruments). L'ingrandimento utilizzato per l'acquisizione risultava dall'uso a livello del microscopio di un obiettivo 12,5x, con commutatore d'ingrandimenti pari a 0,8x (per un prodotto eguale a 10,0x) e a livello della fotocamera di un obiettivo a lunghezza focale variabile da 7,85 mm a 32 mm (la lunghezza focale scelta, al fine di ridurre drasticamente la *vignettatura* derivante dall'ombra prodotta dal raccordo stesso, era di 19,8 mm).

Un collegamento video (tipo RCA, Connettore Video Composito per segnale analogico) al computer di acquisizione, dotato di apposita scheda, consentiva di visualizzare l'immagine da acquisire direttamente sullo schermo (19 pollici), facilitando le procedure di acquisizione rispetto all'uso del monitor della

fotocamera (1,5 pollici). Le immagini acquisite venivano calibrate accuratamente, utilizzando il programma Vision Assistant 7.1, sulla base di un micrometro oggetto (2 mm/0,01, Exacta+Optech), che veniva fotografato esattamente nelle stesse condizioni, quindi con medesimo obiettivo e stessa lunghezza focale. Immagini del micrometro oggetto venivano acquisite all'inizio di ogni seduta sperimentale, nonché per controllo anche alla fine, cioè ogni qualvolta la fotocamera veniva riaccordata al microscopio ottico, per tener conto di eventuali piccole imprecisioni dovute alla manovra stessa di posizionamento. Il campo così acquisibile per singola inquadratura era di 907 x 680 μm , alla risoluzione di 2272 x 1704 px (1 μm = 2,5 px). Questo comportava l'impossibilità di acquisire un campo di dimensioni tali da comprendere almeno tutta l'area ipotalamica di interesse. Problema non di minore importanza era l'impossibilità di aprire in Vision Assistant 7.1 più di una immagine contemporaneamente. Questo implicava la necessità di acquisire le immagini a più piccolo ingrandimento, calibrarle, disegnarvi le griglie per il conteggio dei nuclei marcati (si veda il paragrafo *Griglie per il conteggio dei nuclei marcati*) e, sulla base dei modelli così ottenuti, acquisire le immagini in modo che contenessero ognuna al loro interno uno o più poligoni di conta in maniera esatta. Tutta una serie di strategie è stata inizialmente tentata al fine di superare questi ostacoli.

L'acquisizione delle immagini a 32 ingrandimenti (obiettivo 3,2x, commutatore di ingrandimenti 1,0x, lente oculare 10,0x), con un campo di 2843 x 2132 μm , era sufficiente ad inquadrare un emi-ipotalamo, mentre l'acquisizione a 25,6 ingrandimenti (obiettivo 3,2x, commutatore di ingrandimenti 0,8x, lente oculare 10,0x), con un campo di circa 3532 x 2649 μm , permetteva di inquadrare quasi un intero ipotalamo, sacrificando le porzioni più laterali. Sull'immagine acquisita e calibrata potevano essere posizionate le griglie per il conteggio della PO-AH e del VLPO (si veda par. *Griglie per il conteggio dei nuclei marcati*). Una volta posizionate correttamente le griglie, per ogni vetrino si passava alla fase a medio ingrandimento. Nel fotografare le sezioni a 100 ingrandimenti (ottenuti, come abbiamo visto grazie alla combinazione di un obiettivo 12,5x con un commutatore di ingrandimenti 0,8x), si aveva cura di orientare la fotocamera

(provvista di possibilità di ruotare sull'asse del raccordo ottico) esattamente come per la foto iniziale a piccolo ingrandimento, confrontando attentamente l'immagine da acquisire, visualizzata nella finestra del programma di gestione della scheda video (AMCAP, una piccola applicazione gratuita che permette di catturare il segnale video, compatibile con tutti i sistemi Windows), con la foto acquisita a piccolo ingrandimento, riportante le griglie di conta, contemporaneamente aperta con Vision Assistant 7.1. Da ogni sezione venivano quindi acquisite varie immagini, in modo tale che in ogni foto risultasse inscrivibile uno dei rettangoli che componevano la griglia o che vi rientrasse un nucleo di cui delineare i contorni. Né il vetrino né la fotocamera dovevano subire anche minimi spostamenti lungo tutta questa fase. Infine, su ognuna delle porzioni di sezione fotografate, bisognava posizionare il o i rispettivi poligoni di conta, in modo che fossero esattamente corrispondenti a quelli disegnati sulla sezione acquisita a piccolo ingrandimento. A questo scopo, sono state elaborate inizialmente due metodiche, chiamate metodo dei campi stellati e metodo della sovrapposizione delle immagini.

Il primo metodo, riportato qui di seguito, deve il suo nome al fatto di riprodurre il procedimento utilizzato dagli astronomi per orientarsi in un campo stellato. Sull'immagine a piccolo ingrandimento (Figura 13A), si sceglieva un punto di riferimento (per es., un punto del bordo di un nucleo positivo) che fosse ben riconoscibile a 100 ingrandimenti e se ne misurava la distanza in pixel, sull'asse delle ascisse e sull'asse delle ordinate, rispetto ad uno dei vertici del rettangolo da trasporre a 100x (Figura 13B). Si convertivano le distanze in pixel corrispondenti all'ingrandimento 32x o 25,6x in distanze in pixel corrispondenti al 100x, moltiplicando le prime per il rapporto tra i fattori di conversione pixel/micron a 32x o 25,6x e 100x (rispettivamente $1 \text{ px} = 1,207\text{-}1,208 \text{ }\mu\text{m}$, $1,550\text{-}1,556 \text{ }\mu\text{m}$, $0,398\text{-}0,400 \text{ }\mu\text{m}$). Rispetto al rapportare tra loro i fattori di ingrandimento degli obiettivi, questo procedimento teneva in considerazione eventuali piccole differenze nel posizionamento della fotocamera tra una seduta di acquisizione e l'altra. Ottenute così le coordinate di uno dei vertici rispetto al punto di riferimento, si procedeva a riprodurre la posizione del vertice a partire

dal riferimento scelto (Figura 13D) e a ricostruire il rettangolo. Nel caso in cui, come in figura, fossero presenti intersezioni tra griglie (PO-AH e VLPO), bisognava ricostruire con lo stesso sistema le porzioni di altri rettangoli che intersecavano il rettangolo principale di conta. La griglia del VLPO, veniva cioè ricostruita nelle foto in cui si inscrivevano i rettangoli che componevano la griglia per la PO-AH (Figura 13E). Le cellule contate sarebbero state ovviamente assegnate ad una sola delle griglie che si intersecavano. Qualora vi fossero sovrapposizioni tra un nucleo che si pensava di analizzare delineandone i contorni (MnPO, Pa) e la griglia per la PO-AH, l'idea era quella di riportare il segmento di rettangolo interessato sulla foto su cui veniva disegnato il contorno del nucleo, contare separatamente le cellule della zona di sovrapposizione e andarle a sottrarre alla conta effettuata nell'area delimitata dal rettangolo. Da un punto di vista pratico, poiché Vision Assistant 7.1 non permetteva di aprire contemporaneamente due immagini per confrontarle tra loro, occorreva uno step intermedio, utilizzando un programma di visualizzazione d'immagini quale Paint, che permettesse di lavorare guardando allo stesso tempo il punto di riferimento scelto sulla foto panoramica 32x o 25,6x (visualizzata a forte ingrandimento per ottenere un'elevata precisione, Figura 13C) e la foto 100x su cui lo stesso punto andava accuratamente localizzato.

L'altra idea era quella di sovrapporre ognuna delle foto a 100 ingrandimenti di una stessa sezione sulla foto panoramica a piccolo ingrandimento, riportante le griglie per la conta cellulare, opportunamente ingrandita in modo da combaciare esattamente con le foto a 100 ingrandimenti; quindi nel ridisegnare ogni rettangolo, visualizzato in trasparenza, sulla rispettiva porzione di sezione a più forte ingrandimento. La possibilità di sovrapporre immagini in trasparenza e ridimensionare le immagini in modo finemente regolabile era offerta dal programma Photoshop Elements (Adobe). In alternativa (Figura 14), si poteva ingrandire la foto panoramica (32x o 25,6x) in maniera opportuna, in modo da sovrapporvi le foto 100x e disegnare i rettangoli delle griglie di conteggio ognuno direttamente sulla foto corrispondente, utilizzando le misure in pixel elaborate secondo la calibrazione 100x. Le immagini a 100

ingrandimenti, salvate con il o i rispettivi poligoni di conta, sarebbero poi state analizzate sempre in Vision Assistant 7.1.

Dall'idea del metodo della sovrapposizione delle immagini e dall'acquisizione degli strumenti per l'elaborazione delle immagini digitali offerti dal programma Photoshop Elements si è conseguentemente evoluta un'altra tecnica, che aveva già l'importante vantaggio di rendere non più necessaria la fase di acquisizione a piccolo ingrandimento. L'area ipotalamica di interesse veniva acquisita direttamente a 100 ingrandimenti come successione di *frame* adiacenti, spostandosi da sinistra a destra, poi in basso da destra a sinistra e così via. Si fotografava in sequenza in modo che *frame* confinanti avessero un bordo discreto in comune, basandosi su punti di riferimento (una cellula, il bordo di un vaso o di una struttura fibrosa) visualizzati sull'anteprima di acquisizione e spostando manualmente il piano portacampioni del microscopio in modo da portare tale riferimento da destra a sinistra e viceversa nell'anteprima di acquisizione quando ci si voleva spostare rispettivamente verso destra o verso sinistra e dal basso in alto o nel senso contrario se ci si voleva muovere sulla sezione rispettivamente verso il basso o verso l'alto. Quindi, sfruttando la possibilità di sovrapporre i bordi comuni, si ricomponeva l'intera immagine grazie agli strumenti di Photoshop Elements. Griglie calibrate precostruite venivano quindi correttamente posizionate direttamente sull'immagine acquisita a 10 ingrandimenti, che finalmente era unica e non più frammentata su foto diverse (Figura 15). Il rettangolo di conta poteva poi essere ritagliato e salvato per l'analisi successiva. In questo modo, ci si svincolava anche dalla necessità dell'elaborazione in Vision Assistant 7.1 delle foto prima a piccolo ingrandimento poi a 100 ingrandimenti e, dato che la funzione di posizionamento delle griglie obbligava alla conversione delle immagini in scala di grigi, vi era anche il vantaggio conseguente di poter effettuare la conta su immagini a colori. Potenzialmente, inoltre, fotografando piani focali diversi dello stesso *frame*, sarebbe stato possibile vedere più piani focali nella ricostruzione su Photoshop Elements.

Anche questo metodo, che pure era più rapido dei precedenti, rimaneva tuttavia oltremodo dispendioso in termini di tempo.

Sistema a scansione automatica (fase sperimentale)

La svolta è coincisa con la possibilità, gentilmente offerta dal Laboratorio di Neurofisiologia della Regione Ippocampica del Dipartimento (Prof.ssa Bartesaghi, Dott.ssa Ciani), di acquisire immagini mediante un sistema a scansione automatica. La strumentazione era costituita da una videocamera digitale a colori (CoolSNAP-Pro color, Media Cybernetics), adattata su un microscopio Leitz Diaplan (Leica Microsystems), dotato di piano motorizzato su tre assi (Märzhäuser Wetzlar), collegato al computer tramite un'interfaccia (Märzhäuser Wetzlar). Questo sistema (Figura 16), governato dal programma di analisi d'immagine Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics), permetteva di acquisire porzioni di sezione più estese del singolo campo inquadrato, tramite l'unione automatica, computerizzata, di più *frame* adiacenti (operazione di mosaicatura). Il passaggio a questo sistema avanzato di acquisizione ha permesso di estendere l'area acquisita per ogni sezione ed inoltre ha determinato anche il passaggio al programma di analisi d'immagine Image Pro Plus 4.5, molto più adatto alle necessità di analisi in campo biologico rispetto al Vision Assistant 7.1, rafforzando così peraltro l'idea di mettere a punto una metodica di conteggio dei nuclei marcati che si avvalesse dell'ausilio delle utilità del programma.

Grande attenzione è stata posta nello standardizzare le condizioni di acquisizione. I vetrini venivano puliti con molta accuratezza, avvalendosi di apposite cartine ottiche (Kodak), al fine di ridurre al massimo la presenza di macchie e impurità sulla superficie e posti attentamente sul piano portacampioni, bloccandoli con le apposite linguette metalliche, in modo da poter mettere contemporaneamente a fuoco tutta l'area di sezione selezionata; la messa a fuoco veniva controllata su più punti distanti della sezione. Il sistema permetteva di regolare la messa a fuoco finemente, sia grazie alle informazioni visualizzate sulla barra inferiore della finestra di anteprima, sia perché il programma era in grado di calcolare la coordinata z per ogni spostamento e di variare l'altezza del piano portacampioni anche di pochissimo impostando digitalmente il parametro z. Se punti estremi della sezione risultavano non parafoziali, si ricontrollava il

posizionamento del vetrino; tuttavia, in genere si trattava di impurità (residui di mezzo di montaggio) presenti sulla superficie inferiore del vetrino, che potevano essere facilmente asportate con un cotton fioc imbevuto di xilene.

Di fondamentale importanza, nell'ottica di sviluppare un metodo di conteggio non puramente manuale, era l'acquisire le sezioni tutte nelle stesse condizioni di luminosità, sia nell'ambito della stessa giornata sperimentale sia tra le diverse sedute sperimentali. Per standardizzare al meglio l'emissione di luce dal microscopio, ci siamo avvalsi dell'ausilio di un luxmetro, cioè di uno strumento di misura dell'intensità luminosa, ponendo il sensore direttamente in corrispondenza del collettore d'illuminazione situato alla base del microscopio (Figura 17A): questo accorgimento tecnico permetteva di regolare finemente l'emissione luminosa. Quando si accendeva il microscopio, si assisteva ad un picco di intensità luminosa seguito da un successivo decremento, rapidissimo e poi rapido nei primissimi secondi e minuti rispettivamente, quindi progressivamente più lento, in maniera asintotica; perché la luce si stabilizzasse sufficientemente potevano occorrere anche 3 h (Figura 17B). Per questa ragione il microscopio veniva acceso con sufficiente anticipo e veniva anche tenuto in considerazione il fatto che, ogni volta che si agiva sulla manopola che regola l'emissione luminosa, era comunque necessario un tempo di stabilizzazione, sia pur più breve che in seguito all'accensione. Era importante anche contenere le variazioni di luminosità ambientale (per esempio, acquisire sempre con le stesse lampade accese). Il rango di luminosità entro il quale tutte le immagini delle sezioni sperimentali sono state acquisite è stato di 140-155 lux, posizionando il sensore del luxmetro in corrispondenza del collettore d'illuminazione sempre nello stesso modo: l'escursione tra centro e periferia di tale fonte luminosa circolare era dell'ordine dei 20 lux.

Anche i parametri digitali erano standardizzati: il tempo di esposizione era regolato sempre a 000:00:00.058 (58 msec). All'inizio di ogni seduta sperimentale si effettuava il bilanciamento del bianco, procedura necessaria alla corretta calibrazione dei colori. Le video e foto camere digitali, infatti, non "vedono" allo stesso modo dell'occhio umano o dei corrispondenti analogici. E' necessario cioè

specificare quali oggetti sono bianchi, quali neri e quali colorati: questo procedimento è denominato bilanciamento del bianco. Il nero veniva impostato escludendo manualmente la sorgente di luce, per il bianco si utilizzava una parte del vetrino, con coprioggetto, su cui non c'era sezione. Un ulteriore controllo della intensità luminosa era dato dalla acquisizione di un singolo *frame* bianco, di cui si chiedevano al programma i valori di intensità minima, massima e media. Per tutte le sedute sperimentali, tali valori (misura dell'intensità percepita dalla videocamera) sono risultati compresi rispettivamente negli intervalli: 184-197, 226-243 e 209,38-226,85. Come si vede dai valori massimi di intensità dei bianchi, l'emissione luminosa era settata in modo da non saturare nel bianco (255 nella scala standard da 0 a 255) e analoghi controlli sono stati fatti per assicurarsi che anche i nuclei più intensamente marcati non saturassero nel nero (0 nella scala standard, si veda par. *Correzione della vignettatura*).

Le dimensioni del *frame* venivano regolate in modo che l'area acquisita corrispondesse al totale dell'area inquadrata dalla videocamera (1391 x 1039 px). Nell'operazione di mosaicatura, le dimensioni effettive di ogni *frame* risultavano leggermente inferiori (1382 x 1030 px), verosimilmente per sovrapposizione di un brevissimo bordo comune fra *frame* adiacenti. Con un obiettivo 10.0x, tale dimensione corrispondeva a 647 x 482 μm . La calibrazione è stata effettuata, con il programma Image Pro Plus 4.5, sempre sulla base di 9 immagini del micrometro oggetto, corrispondenti alle nuove condizioni di acquisizione, ricavando 2 misure per ognuna di esse. In questo caso, il sistema era fisso, per cui non era necessario calibrare le immagini per ogni seduta sperimentale. Il fattore di conversione pixel/micron è risultato essere pari a 2,136, con una perfetta riproducibilità delle misure (13 pari a 2,1360 e 5 pari a 2,1355).

L'acquisizione dell'area di interesse veniva impostata semplicemente dando al programma le informazioni corrispondenti alle coordinate dei punti in alto a sinistra e in basso a destra dell'inquadratura desiderata. Nelle prove preliminari, si è tentato di acquisire l'intera immagine della sezione, ma si è constatato che il sistema rallentava enormemente il processo di acquisizione o addirittura non permetteva di avviarlo per immagini più grandi di 200 *frame*;

poiché è stato scelto di acquisire anche le zone di corteccia corrispondenti dorsalmente alle aree ipotalamiche di interesse, ed una sezione fotografata a 10 ingrandimenti occupava in altezza 16-18 *frame*, si è deciso di standardizzare la larghezza dell'immagine a 11 *frame*, centrati sulla linea mediana. Questo equivaleva a non includere nell'immagine le porzioni più laterali del prosencefalo basale e dei gangli della base e buona parte della corteccia somatosensitiva, insulare e piriforme. Il tempo impiegato dal sistema per la scansione era di circa 22, 24 e 26 min rispettivamente per campi di 11 x 16, 11 x 17 e 11 x 18 *frame*.

Per ogni seduta sperimentale, in cui venivano acquisite da 12 a 20 sezioni, approssimativamente verso la metà della stessa, veniva scansionato un *bianco* (Figura 18A), cioè una porzione del vetrino, dotato di coprioggetto, su cui non c'era tessuto (da non confondere con il *bianco* inteso come controllo della reazione immunoistochimica). Anche per l'acquisizione dei *bianchi* (come pure per l'operazione di bilanciamento del bianco) era necessario mettere prima correttamente a fuoco sul tessuto. Questo implicava che non si potessero utilizzare vetrini con coprioggetto senza campione per fotografare i *bianchi*, ma solo porzioni del vetrino con coprioggetto, adiacenti al campione. Le dimensioni dovevano essere corrispondenti a quelle delle immagini delle sezioni. Tale operazione serviva alla standardizzazione digitale dei parametri di luminosità dell'immagine (si veda par. *Correzione della vignettatura*).

Tutte le immagini venivano salvate in formato TIFF. Ad ogni file veniva attribuito lo stesso nome del vetrino di origine, eventualmente (questo nelle prove preliminari) con l'aggiunta di specifiche particolari in caso di più di un'acquisizione dallo stesso vetrino. Le immagini del *bianco* venivano contrassegnate con la data.

Correzione della vignettatura

La vignettatura rappresenta una distorsione dell'immagine acquisita che si manifesta sotto forma di un gradiente di luminosità non presente nell'originale. In alcuni casi, questa gradazione deriva da una non uniforme sensibilità alla luce

della superficie del dispositivo di acquisizione. L'intensità e l'estensione di tale gradiente possono essere visualizzate esaminando un campo bianco uniformemente illuminato e analizzando l'omogeneità dei livelli di grigio nell'immagine. Anche un'illuminazione non appropriata può risultare in distorsioni dell'intensità luminosa, quali quelle derivanti da un non corretto allineamento sul cammino della luce del condensatore del microscopio (Smolen, 1990). Nel nostro caso, l'iniziale sistema di acquisizione, tramite fotocamera adattata al microscopio, era gravato da una fortissima vignettatura determinata dall'ombra creata dal raccordo ottico, che diventava più evidente incrementando l'intensità dell'illuminazione: questo ci aveva indotti a ridurre significativamente l'estensione del campo fotografato in modo da eliminare le zone periferiche e ad utilizzare una bassa intensità luminosa. La videocamera di cui era provvisto il sistema a scansione automatica ha rappresentato un notevole miglioramento anche su questo fronte, permettendo, come prima descritto, di acquisire tutta l'area inquadrata. Anch'esso, tuttavia, determinava la comparsa di un gradiente discreto d'intensità luminosa tra periferia e centro dell'immagine (Figura 18Aa-Ab).

Entrambi i tipi di distorsione dell'intensità possono essere corretti digitalmente attraverso un processo noto come sottrazione del *background*. E' necessario allo scopo acquisire un campo illuminato ma totalmente bianco e salvarlo in forma digitale (Smolen AJ, 1990). Ogni immagine digitale è composta da unità discrete dette pixel. Le informazioni colore veicolate da ogni singolo pixel possono essere descritte da valori compresi nell'intervallo 0-255, usato quando i colori sono codificati in 8 bit (*binary digit*, unità di misura di base della memoria informatica, che può assumere valore 0 o valore 1), la cui combinazione permette 2^8 , cioè 256, differenti valori. In una scala di grigi, lo 0 corrisponde al nero e il 255 al bianco. Nel sistema RGB, che rappresenta una modalità di codifica dei colori basata su un modello additivo, il cui nome deriva dall'inglese *Red Green Blue*, il rosso sarà rappresentato da 255, 0, 0, il verde da 0, 255, 0 e il blu da 0, 0, 255. Nel sistema HSI, dall'inglese *Hue Saturation Intensity*, detto anche HSL (*Luminance*), l'informazione legata al colore sarà codificata sempre su tre canali, come nel sistema RGB, ma il primo descriverà il colore, il secondo la

saturazione e il terzo l'intensità luminosa. Questo modello, rispetto al precedente che definisce il colore in termini di combinazione di primari, è più simile alla modalità con cui l'occhio umano percepisce i colori. Inoltre, come vedremo in seguito (si veda par. *Metodo di conteggio dei nuclei marcati*), esso è utile nelle tecniche analitiche di quantificazione della marcatura immunoistochimica.

Quando, dunque, l'immagine di un qualsiasi campo d'interesse viene acquisita, il computer può sottrarre il livello di grigio (corrispondente al livello di intensità luminosa) di ciascun pixel dell'immagine di *background* dal livello di grigio di ogni pixel corrispondente nell'immagine d'interesse. Poiché dalla sottrazione del *background* possono derivare valori di grigio che possono risultare numericamente inferiori a zero, è necessaria l'aggiunta di una costante al valore di grigio per ciascun pixel. Gli effetti della vignettatura derivante da disomogenea sensibilità alla luce della superficie del sensore sono moltiplicativi, a differenza di quelli dovuti a illuminazione non uniforme, che sono additivi. In questi casi, l'ombreggiatura andrebbe corretta dividendo il livello di grigio di ciascun pixel appartenente all'immagine da studiare per il valore del pixel corrispondente nell'immagine del bianco e moltiplicando quindi il valore risultante per 255 (Smolen, 1990).

Due algoritmi di correzione del *background* sono forniti da Image Pro Plus. L'opzione *Background Subtraction* è indicata per tutte le immagini eccetto quelle, acquisite in luce trasmessa, che devono essere impiegate per misurare la densità ottica. Per le applicazioni relative alla densità ottica, andrebbe invece utilizzata l'opzione *Background Correction*, la quale tiene conto del fatto che la densità ottica non è una funzione lineare della scala di grigi.

L'opzione *Background Subtraction* permette di comparare l'immagine attiva (cioè quella da correggere) con l'immagine di *background*, in modo tale che pixel considerati essere parte del *background* vengano sostituiti con un valore vicino alla intensità media dell'immagine di *background*. L'algoritmo si basa sulla formula: $CI_{x,y} = I_{x,y} - BI_{x,y} + M$, dove $I_{x,y}$ è il valore di un pixel di coordinate x,y dell'immagine originaria; $BI_{x,y}$ è il valore di un pixel di coordinate x,y dell'immagine di *background*; M rappresenta il valore medio dei pixel

dell'immagine di *background* e $CI_{x,y}$ è il nuovo valore attribuito al pixel nell'immagine corretta.

Dove si vuol misurare la densità ottica, l'opzione *Background Correction*, pur essendo simile alla precedente, usa una divisione invece che una sottrazione, per tenere in conto del fatto che la densità ottica non è una funzione lineare della scala di grigi. L'algoritmo si basa sulla seguente formula: $CI_{x,y} = [(I_{x,y} - BL)/(BI_{x,y} - BL) * (M - BL)] + BL$, dove BL è il livello corrispondente al nero, specificato dalla calibrazione corrente di intensità. Laddove l'intensità viene calibrata in modo che BL sia uguale a zero, diventa: $CI_{x,y} = (I_{x,y}/BI_{x,y} * M)$.

Nel nostro caso, ognuno dei *frame* di cui era composta un'immagine acquisita col sistema automatizzato, utilizzato nella fase sperimentale, presentava un'ombreggiatura (Figura 18A-B). Tale gradazione non costituiva un mero problema estetico, in quanto creava un gradiente artificiale di intensità luminosa: un oggetto, quale un nucleo marcato, se inquadrato nella zona periferica del *frame* risultava più scuro (quindi più intenso!) rispetto al medesimo oggetto inquadrato nella zona centrale. Questo poteva risultare solo parzialmente disturbante per un'analisi visiva, ma interferiva significativamente con le procedure di quantificazione digitali. Nella prospettiva di avvalerci dell'ausilio del programma di analisi d'immagine nelle procedure di conteggio dei nuclei marcati, tutte le immagini acquisite sono state corrette tramite sottrazione del *bianco* (Figura 18C). Poiché non vi era l'intenzione di effettuare misure di densità ottica e poiché la vignettatura è stata attribuita ad una illuminazione non uniforme dovuta ad una non perfetta congruenza tra videocamera e microscopio, sulla scia dell'esperienza maturata con il raccordo ottico della fotocamera, si è scelto di utilizzare la funzione di correzione *Background Subtraction*.

Da un punto di vista pratico, veniva acquisito un *bianco* (Figura 18A) per ogni seduta sperimentale, in modo da riprodurre esattamente le stesse condizioni di illuminazione delle sezioni scansionate, che potevano variare, anche se lievemente, tra sedute diverse. Ricordiamo che l'illuminazione era regolata nell'ambito di un intervallo di 140-155 lux (si veda il paragrafo *Acquisizione delle immagini in forma digitale - Sistema a scansione automatica*). Tutte le condizioni

di acquisizione erano identiche a quelle impiegate per i campioni, in particolare il tempo di esposizione, nonché l'obiettivo del microscopio e l'area dei singoli *frame*, inoltre le dimensioni erano compatibili con quelle delle immagini da correggere (medesimo numero di *frame*).

Per quanto accuratamente si pulissero i vetrini, era tuttavia impossibile scansionare una superficie così ampia senza che si evidenziassero anche minime tracce di polvere. Nel processo di sottrazione, la traccia di sporco crea sull'immagine una macchia chiara (viceversa in caso di impurità biancastre). Per evitare la formazione di tali macchie e la conseguente interferenza col processo di analisi digitale, per l'alterata distribuzione d'intensità dei pixel nella corrispondente microarea marcata, si procedeva nel modo seguente. Si visualizzava l'immagine del *bianco* ad un ingrandimento adeguato, la si scorreva da destra a sinistra e viceversa, procedendo dall'alto verso il basso e prendendo in considerazione solo le macchie che non si ripetevano in maniera sistematica: quelle che si riproponevano invariate su ogni singolo *frame*, infatti, erano causate da polveri presenti sul cammino della luce (non sempre agevoli da rimuovere) e non sul vetrino, quindi non venivano corrette, perché si assumeva fossero presenti anche sull'immagine del campione, da cui sarebbero poi state sottratte, al pari della vignettatura. Per ogni macchia non sistematica che si incontrava si disegnava una selezione rettangolare quanto più piccola possibile tale da coprire la totalità della macchia, quindi si spostava la selezione rettangolare nelle regioni immediatamente adiacenti e se ne misurava l'intensità media; su due lati opposti della macchia, a destra e sinistra o in alto e in basso o obliquamente, a seconda della sua posizione all'interno del singolo *frame* (per esempio a destra e sinistra se la macchia si trovava adiacente alla porzione centrale del bordo superiore o inferiore), le intensità medie risultavano praticamente coincidenti, per cui il loro valore diveniva predittivo dell'intensità che la zona intermedia tra di esse avrebbe avuto senza la macchia; quindi si incollava sulla macchia la regione adiacente più verisimilmente uguale per intensità e una volta esaminato e pulito tutto il *bianco* si salvava il file.

Poiché la funzione *Background Subtraction* poteva essere utilizzata solo se venivano contemporaneamente aperte l'immagine da correggere e l'immagine del *bianco* e poiché il sistema di elaborazione di cui disponevamo non riusciva a gestire più di 200 *frame* contemporaneamente, non era possibile sottrarre il *bianco* in un'unica operazione, ma era necessario suddividere in due il file originario, aprendone una parte per volta. La sezione veniva divisa in una porzione ventrale e una dorsale (entrambe di 11 x 8 o 11 x 9 *frame* oppure l'una di 11 x 8 e l'altra di 11 x 9, a seconda dell'altezza dell'immagine), avendo cura per quanto possibile di rispettare le strutture anatomiche. Tutti i file corretti mediante sottrazione del *bianco* venivano salvati con lo stesso nome del vetrino d'origine, seguito da una H (dall'inglese *Hypothalamus*) per la porzione ventrale della sezione o una C (*Cortex*) per quella dorsale.

Riferimenti anatomici

Per le procedure di acquisizione, la serie di vetrini da scansionare per ogni animale è stata selezionata tramite una valutazione rapida delle strutture anatomiche, in maniera che l'area d'interesse fosse sicuramente compresa nelle immagini acquisite. Il punto di riferimento iniziale della serie era immediatamente rostrale all'origine del MnPO (~ bregma +0,50 mm) e il punto di riferimento terminale corrispondeva al livello in cui le due porzioni destra e sinistra del PVA si incontravano sulla linea mediana (~ bregma -1,00 mm) (Paxinos e Watson, 2005). Quest'area comprendeva *in toto* l'estensione della POA, mentre non includeva la maggior parte dell'AH e del Pa, la cui acquisizione è stata programmata per un secondo tempo. Sono stati al momento acquisiti solo i vetrini marcati per c-Fos.

Un'analisi più fine dell'anatomia delle sezioni occorreva invece per il corretto posizionamento delle griglie di conteggio dei nuclei marcati. Al fine di una corretta individuazione delle strutture anatomiche, sono stati consultati tre atlanti stereotassici del cervello di ratto (Paxinos e Watson, 1998; Swanson, 2004; Paxinos e Watson, 2005).

Tutte le coordinate stereotassiche indicate in questo lavoro, salvo diversa precisazione, si riferiscono all'atlante Paxinos e Watson (2005). Tuttavia, la precedente edizione (1998) è il riferimento finora più universalmente adottato dalla letteratura scientifica pertinente al nostro ambito di ricerca. La più recente edizione (2005), pur mancando di sezioni sagittali e trasversali, ha il merito di campionare il cervello di ratto con una maggiore frequenza (una sezione coronale di 40 μm ogni tre) colmando delle importanti lacune presenti nella precedente versione, in particolare nelle porzioni più rostrali della lamina terminale e della POA, ma presenta alcune differenze nelle coordinate stereotassiche di cui bisogna tener conto. In particolare la ac decussa nell'edizione del 1998 a bregma -0,26 mm e in quella del 2005 a bregma -0,12 mm (Figura 19A). Inoltre, il VLPO compare a bregma +0,00 mm invece che a bregma -0,30 mm come nella precedente edizione. Le differenze riscontrate, a parte forse risentire di una certa variabilità tra individui, andrebbero ricondotte ad una revisione complessiva nella delineazione delle aree cerebrali effettuata dagli autori, come da essi precisato nella sezione introduttiva alla quinta edizione. Per rendere confrontabili le due edizioni dell'atlante, può tuttavia rivelarsi utile interpretare - esclusivamente a fini pragmatici - le differenze osservate come dovute ad una lieve variazione nell'orientamento del taglio coronale delle sezioni: quindi, se la linea blu nella Figura 19B (che rappresenta una sezione sagittale paramediana di cervello di ratto) ricalca l'orientamento delle sezioni sagittali nel Paxinos and Watson (1998), la linea verde rappresenterebbe l'orientamento del taglio delle sezioni coronali nel Paxinos and Watson (2005). Le tre scale orizzontali sono poste a livello, rispettivamente, dello och, della ac e del punto in cui il bregma zero coinciderebbe sui due atlanti (che apparirebbe situarsi in posizione immediatamente sottocorticale). Tengo a rimarcare che questa costruzione avrebbe la sola utilità di rendere immediata la ricerca delle strutture d'interesse sui due atlanti e facilitare la consultazione comparata delle due edizioni, la quarta perché di riferimento nella letteratura pregressa, la quinta perché più completa. Essa permetterebbe di confrontare rapidamente le due edizioni dell'atlante per quanto concerne le strutture ipotalamiche, nel senso che una formazione, appartenente all'ipotalamo

dorsale, riportata a x mm dal bregma nell'edizione del 1998, si troverà a circa $x - 0,15$ mm dal bregma nell'edizione del 2005, per l'ipotalamo ventrale a circa $x - 0,30$ mm. Tale piccolo calcolo non si rivela però altrettanto utile nel caso di altre strutture anatomiche, ad esempio di alcuni nuclei talamici.

L'atlante Swanson, 2004, che peraltro descrive un ratto Sprague-Dawley (quindi dello stesso ceppo da noi impiegato) piuttosto che Wistar, è approssimativamente corrispondente alla quarta edizione del Paxinos e Watson in termini di definizione delle coordinate anatomiche e non presenta la completezza della versione successiva dello stesso.

Un aspetto pratico di cui tener conto nella consultazione di un atlante è che, per quanta attenzione si sia posta nel sezionare tutti i cervelli, al momento del congelamento, secondo il medesimo piano di taglio, anche imprecisioni dell'ordine di poche centinaia di micron, visivamente piuttosto difficili da controllare, fanno la differenza a livello microscopico.

Quando l'inclinazione del taglio coronale corrispondeva precisamente a quella dell'atlante di riferimento (Paxinos and Watson, 2005), tutta la sezione "giaceva" su una tavola anatomica o comunque adiacente ad essa, cioè immediatamente precedeva o seguiva una sezione rappresentata (ricordiamo che tra una tavola e l'altra c'è un intervallo di due sezioni). Questo, tuttavia, accadeva raramente, mentre con maggiore frequenza l'inclinazione di taglio era obliqua rispetto all'atlante, per cui la nostra sezione poteva "attraversare" dorso-ventralmente più di una tavola dell'atlante. Ora, se consideriamo l'ipotalamo suddiviso dorso-ventralmente in tre porzioni, dorsale, intermedia e ventrale, era importante confrontarle con le tavole anatomiche separatamente, in modo da tener conto dell'eventuale diversa inclinazione del taglio rispetto alle sezioni dell'atlante. Venivano scelte le strutture facilmente identificabili ad un'analisi morfologica: si poteva trattare di nuclei (ad esempio il MnPO), ma anche di formazioni di sostanza bianca (quali ac e och).

L'analisi anatomica fine della morfologia delle sezioni, allo scopo di collocare correttamente le griglie di conteggio a livello delle strutture di interesse, si è sviluppata attraverso due modalità principali.

La prima modalità consisteva nel confrontare la morfologia dei vetrini anatomici (colorati con cresil violetto) con le tavole degli atlanti e riportare le osservazioni derivanti su un file di Excel preimpostato, scrivendo accanto al numero dei vetrini anatomici, laddove si rilevava una corrispondenza con la morfologia di una delle tavole di un atlante, la distanza dal bregma relativa alla tavola selezionata. Poiché l'inclinazione dorso-ventrale del nostro piano di sezione non coincideva sempre perfettamente con quella dell'atlante, questa operazione veniva effettuata sia per la porzione ventrale dell'area ipotalamica (prendendo riferimenti quali la morfologia dello och, il nucleo sopraottico SO, il SCh, la regione retrochiasmatica RCh), sia per la porzione dorsale (ac, Pa, fornice f e così via). La sezione più rostrale in cui la ac decussava sulla linea mediana costituiva il punto di riferimento più affidabile. Per le altre sezioni a livello ipotalamico dorsale e in tutte a livello ventrale, in genere era difficile attribuire una corrispondenza altrettanto precisa con una tavola dell'atlante, ma ciò era possibile in modo approssimativo o comunque si poteva affermare che sicuramente quella sezione veniva prima di una tavola anatomica o sicuramente dopo un'altra. Tutte queste osservazioni venivano annotate e poi integrate nel modo più congruente.

Infatti, dopo aver in tal modo confrontato la morfologia delle sezioni anatomiche con quella delle tavole dell'atlante, si procedeva ad attribuire per ogni sezione e per 3 diversi livelli dorsoventrali ipotalamici (ventrale, intermedio, dorsale) un valore attendibile di distanza dal bregma. Si trattava di una serie di valori calcolati, teorici, che interpretasse nel modo più congruente possibile le osservazioni morfologiche effettuate. Ogni valore x attribuito stava a significare che su quella sezione il terzo dorsale (o ventrale) dell'ipotalamo si presentava simile alla sezione coronale, riportata sull'atlante, distante x mm dal bregma. Per il livello ventrale e il livello dorsale ci si basava sull'analisi delle osservazioni scaturite dal confronto delle sezioni anatomiche con le tavole dell'atlante. Al

livello intermedio si attribuiva il valore medio tra i valori dei livelli dorsale e ventrale per quella determinata sezione. Per la porzione del MnPO situata dorsalmente alla ac, si considerava un quarto livello, dorsale al superiore, il cui valore teorico di distanza dal bregma veniva calcolato analogamente a quello del livello intermedio. In termini pratici, veniva calcolata la distanza in micron tra le due sezioni più distanti cui era stato attribuito un riferimento anatomico (sia per il livello ipotalamico ventrale sia per quello dorsale) e si divideva per il numero di sezioni tra di esse. Era importante scegliere le sezioni più distanti possibile tra quelle considerate più corrispondenti alla rispettiva tavola anatomica. In genere, le dimensioni del cervello in esame erano comparabili con quelle dell'atlante. In questo caso il rapporto così calcolato era di 40 μm . Viceversa, il cervello poteva risultare più grande o più piccolo, nel qual caso le sezioni avevano uno *spessore apparente* rispettivamente $< 40 \mu\text{m}$ o $> 40 \mu\text{m}$. A partire, quindi, dalla sezione con il riferimento anatomico considerato più attendibile (per l'ipotalamo dorsale, ricordiamo che il punto di riferimento di più agevole reperibilità su una sezione coronale, colorata con cresil violetto o marcata con un'immunoreazione, era il margine rostrale della decussazione della ac), si attribuiva un valore di distanza dal bregma ad ogni sezione situata più rostralmente o più caudalmente aggiungendo o sottraendo il valore dello *spessore apparente* e si controllava che i valori così calcolati fossero congruenti con l'insieme delle osservazioni morfologiche compiute. Viceversa si operavano le dovute correzioni, fino a trovare l'interpretazione "numerica" più congruente delle valutazioni morfologiche.

Oppure si procedeva dal riferimento più affidabile e sicuro, quindi a partire dall'ipotalamo dorsale, per calcolare il valore teorico di distanza dal bregma per ogni sezione situata più rostralmente o più caudalmente, aggiungendo o sottraendo lo spessore di 40 μm . Si valutava se c'era una buona corrispondenza tra i riferimenti così attribuiti e le osservazioni anatomiche. In caso affermativo, si procedeva in modo analogo per l'ipotalamo ventrale prendendo come riferimento quello considerato più attendibile. Si attribuiva quindi per ogni sezione la media dei due precedenti valori al livello ipotalamico intermedio. Se invece

allontanandosi dal riferimento, si riscontravano incongruenze, ciò stava a significare che il cervello in esame aveva dimensioni apprezzabilmente diverse da quelle riportate sull'atlante. In tal caso, si procedeva come nel metodo precedente.

Questo secondo modo di procedere risentiva meno degli errori dovuti all'approssimazione con cui si attribuiva la corrispondenza tra le sezioni anatomiche e le tavole dell'atlante.

In una nota si riportava la presenza di eventuali lievi asimmetrie tra lato destro e sinistro, dovute alla presenza di un angolo tra il piano coronale trasverso e il piano di sezione reale. Essendo l'ipotalamo una struttura situata tutto intorno alla linea mediana, in linea generale era possibile approssimare il piano di sezione ad un piano coronale perpendicolare all'asse longitudinale, anche laddove non lo fosse perfettamente.

Questa modalità rappresentava un'ottima linea guida per decidere su quali sezioni contare via via ogni nucleo o area. Ovviamente, per quanto la corrispondenza tra distanza dal bregma così calcolata in rapporto all'atlante e strutture anatomiche sulla sezione fosse a volte sorprendentemente coerente, la morfologia veniva comunque riosservata su ogni sezione al momento del posizionamento delle griglie, in modo da tener conto di anche piccole incongruenze dovute alla variabilità individuale.

Poiché tuttavia, tale analisi poteva risultare indaginosa, con il tempo e l'esperienza si è sviluppata una seconda modalità di selezione dei vetrini, molto più immediata. Una ragione era che non si riusciva facilmente ad applicare un'analisi morfologica sistematica come quella descritta ad aree cerebrali molto distanti tra loro e che comunque bisognava sempre considerare la variabilità individuale nei rapporti reciproci tra le strutture. Il passaggio ad una modalità più rapida di scelta dei vetrini su cui contare ciascun nucleo è stato enormemente agevolato allorché si è reso possibile affidarsi alla nuova edizione dell'atlante di riferimento, finalmente completa e dettagliata anche nelle parti precedentemente lacunose.

E' stata costruita una matrice (Figura 20) in cui le righe corrispondevano ai 24 casi sperimentali, individuati con il numero dell'esperimento e il numero della

piastra (ad esempio 29 pl3, dove *pl* sta per piastra, dall'inglese *plate*) e le colonne, numerate da 0 a 80 ed evidenziate in codice colore, ai vetrini: celeste per il cresil violetto, arancio per P-CREB, giallo per c-Fos, mentre in bianco erano riportati i rispettivi controlli (Rabbit IgG e NRS), assegnati in maniera casuale. Tale matrice era riproducibile per ognuno dei nuclei (o aree) da contare, di cui veniva riportata l'estensione totale e il numero di vetrini contati.

Per il MnPO, ogni animale corrispondeva a tre righe (Figura 21, in alto), quella inferiore alla porzione rostrale (rMnPO) e le due superiori alla porzione caudale (cMnPO) del nucleo, suddivisa in ventrale (vMnPO) e dorsale (dMnPO) in rapporto alla ac. Sul Paxinos e Watson (2005), l'intero nucleo si estende da bregma +0,48 mm a bregma -0,24 mm per un totale di 19 sezioni; poiché l'errore massimo che si può compiere nel definire l'inizio e la fine di un nucleo basandosi su questo atlante è di due volte 2 sezioni e la media tra errore = 0 ed errore = 4 è di 2 sezioni, noi abbiamo considerato un'estensione totale del nucleo di 21 vetrini, da bregma +0,52 mm a -0,28 mm. Il limite tra porzione rostrale e caudale è stato posto a bregma +0,12 mm, per cui il rMnPO corrispondeva ai primi 10 vetrini, di cui nella conta venivano eliminati i primi tre perché il nucleo nascente aveva dimensioni ancora troppo esigue, inferiori a quelle dei poligoni di conta (si veda par. *Griglie per il conteggio dei nuclei marcati*); l'inizio della porzione caudale dorsale corrispondeva a bregma +0,04 mm, quindi il vMnPO corrispondeva a 11 vetrini e il dMnPO agli ultimi 9. Poiché l'orientamento del taglio coronale non sempre coincideva con quello dell'atlante e poiché lo sviluppo in senso rostrocaudale del nucleo si associava ad uno sviluppo in direzione ventrodorsale, in pratica per il rMnPO si iniziava a contare dal quarto vetrino dalla prima comparsa del nucleo, per il vMnPO e il dMnPO si iniziava a contare rispettivamente da 6 e da 4 vetrini prima della decussazione della ac. In caso di obliquità dell'orientamento del piano coronale rispetto all'atlante, vi poteva essere coincidenza del rMnPO (situato ventralmente) e del cMnPO (situato dorsalmente) sulla stessa sezione o viceversa il nucleo si allungava su un maggior numero di sezioni; in quest'ultimo caso, peraltro raro, i vetrini centrali in più venivano attribuiti equamente a rMnPO e cMnPO.

Per il VLPO, ogni animale corrispondeva a due righe (Figura 21, in basso), quella inferiore al piano ventrale, comprendente il core (VLPOcor) e l'estensione mediale (VLPOmed) del nucleo e quella superiore al piano dell'estensione dorsale (VLPOdor). Sul Paxinos e Watson (2005), il VLPO è rappresentato da bregma +0,00 mm a bregma -0,60 mm, per un totale di 16 vetrini. In questo caso, non è stato considerato il possibile errore di cui sopra nel definirne gli estremi, essendo già difficile individuare il VLPO sulle nostre sezioni per un'estensione di 16 vetrini. A differenza del MnPO, che è un nucleo dalla morfologia facilmente identificabile e che peraltro nei nostri animali presentava un'estensione caudale maggiore di quella riportata sull'atlante (anche il terzo ventricolo, 3V, compariva, nel triangolo tra colonne del f e ac, solo alcune sezioni dopo), il VLPO non ha confini distinti. Acquisita una certa esperienza, il core è divenuto identificabile in circa il 75% del numero teorico di vetrini, indicato sull'atlante. Per le porzioni iniziale e terminale del nucleo ci si basava su riferimenti indiretti. All'interno delle 16 sezioni identificate in questo modo, venivano contati i 5 vetrini c-Fos e i 5 P-CREB centrali, corrispondenti a $500 \pm 20 \mu\text{m}$ (considerando i vetrini anatomici). Anche in questo caso, si correggeva il piano dell'estensione nucleare dorsale in caso di significativa inclinazione del taglio coronale rispetto all'atlante, ma poiché tutta l'estensione nucleare del VLPO rimane comunque confinata all'ipotalamo ventrale, i casi in cui questo si è rivelato necessario sono stati rarissimi (Figura 21H).

Nel complesso, nelle estensioni così delineate, i vetrini marcati per c-Fos erano 3 o 2 (in un caso 4) per il rMnPO, 5 o 4 per il vMnPO (in un caso 6), 4 (in un caso 5) per il dMnPO, 5 per il VLPO. Qualora uno di essi coincidesse con un bianco (NRS), gli veniva attribuito il valore medio del conteggio delle altre sezioni del medesimo animale.

Griglie per il conteggio dei nuclei marcati

Le aree e i nuclei considerati di principale interesse comprendevano l'area preottica mediale (MPA), l'area preottica laterale (LPO), l'area ipotalamica

anteriore (AH, nelle suddivisioni: anteriore AHA, centrale AHC, posteriore AHP, nucleo ipotalamico lateroanteriore LA), il VLPO, il MnPO, il Pa. L'idea iniziale era quella di effettuare la conta dei nuclei positivi all'interno di contorni delineati manualmente per i nuclei MnPO e Pa, che presentano una morfologia più agevolmente identificabile, mentre per tutte le altre strutture (MPA, LPO, AH e VLPO), dotate di confini indistinti e quindi non delimitabili ad un'analisi visiva del preparato o addirittura con limiti anatomici ancora non ben definiti dalla letteratura scientifica, si pensava di applicare maschere prefissate, costituite da rettangoli di dimensioni note.

In particolare, era stata costruita per la PO-AH una griglia formata da un ampio rettangolo con base di 1400 μm ed altezza di 1600 μm , ulteriormente suddiviso in due colonne uguali (mediale e laterale), aventi una base di 700 μm . In ogni colonna si evidenziavano poi un rettangolo superiore di 600 μm di altezza (definiti "med sup" e "lat sup" rispettivamente) e un rettangolo inferiore di 1000 μm di altezza, ulteriormente suddiviso in due metà di 500 μm ("med med", "med inf" e "lat med", "lat inf" rispettivamente, Figura 22A). Una costruzione di questo tipo era nata per descrivere la POA nella regione della decussazione della ac e veniva iscritta tra och ventralmente e ac dorsalmente, con il lato mediale della griglia posizionato in corrispondenza del bordo del 3V (Figura 22B). In questa zona dell'ipotalamo, i rettangoli inferiori e intermedi della griglia corrispondevano all'area preottica propriamente detta e la divisione in due colonne, mediale e laterale poteva essere considerata approssimativamente corrispondente alla distinzione tra MPA e LPO. Nei rettangoli "med med" e "med inf" rientrava il nucleo preottico mediale (MPO). I principali nuclei che venivano ad iscriversi nei rettangoli superiori erano il nucleo anterodorsale preottico (ADP) e il nucleo parastriale (PS), rispettivamente nella colonna mediale e nella colonna laterale (Figura 22C). Era stato condotto uno studio al fine di applicare la stessa struttura di conteggio a tutta l'estensione della PO-AH, quindi anche rostralmente e dorsalmente rispetto alla zona di decussazione della ac. Per ovviare al conseguente venir meno della corrispondenza funzionale con le strutture oggetto

di analisi e soprattutto a causa della marcata differenziazione funzionale a livello ipotalamico tra strutture anatomiche anche molto vicine e circoscritte, si è immaginato di suddividere ulteriormente ognuno dei 6 rettangoli di conta in 4 parti uguali, nonché autonome nell'analisi. Nelle sezioni più rostrali, in corrispondenza delle nascenti LPO e MPA, sarebbero state operate ulteriori scomposizioni mediante diagonali. In questo modo, sarebbero stati esclusi dalla conta i rettangoli o porzioni di rettangolo in cui fossero risultate iscritte strutture diverse da quelle oggetto di studio. Nelle zone più caudali, a livello della AH e della LH, dove l'ipotalamo presentava un'estensione mediolaterale superiore alla larghezza complessiva della griglia, si sarebbero potuti aggiungere lateralmente ulteriori moduli. Nel tempo, questo tentativo sistematico di analisi della PO-AH è stato abbandonato a favore di un approccio più analitico rivolto ad ogni singola struttura anatomica componente tale regione. Questo anche a causa della sovrapposizione nella POA tra la griglia e il VLPO (Figura 13), che sarebbe stato comunque contato separatamente.

Per il VLPO è stata adottata, sulla base della letteratura, una composizione di tre rettangoli di conta (Lu et al, 2002), basata sulla distribuzione dei neuroni galaninergici (Sherin et al., 1998; Gaus et al, 2002): il primo, di 300 x 300 μm , posto lungo la base del cervello, centrato sul core GABA-galaninergico (VLPOcor), con il bordo laterale sito a 400 μm dal margine laterale dello och, subito medialmente rispetto alla banda diagonale di Broca; il secondo, con base di 400 μm e altezza di 300 μm , situato medialmente al precedente e corrispondente al VLPOmed; il terzo, con base di 200 μm e altezza di 300 μm , posizionato al di sopra dei primi due e centrato sul margine fra di essi, equivalente al VLPOdor (Figura 23). Nel posizionamento dei rettangoli sulla linea che definiva la base del cervello, nei casi in cui non era disposta orizzontalmente, ma in maniera curvilinea o diagonale, poiché il programma non permetteva di ruotare le griglie di conta per adattarle alle situazioni specifiche, si prendeva come riferimento il punto centrale della base del VLPOcor (o del VLPOmed nei casi in cui era questo che si ritrovava posizionato più ventralmente). Grande attenzione era posta

affinché le cellule del SO non rientrassero all'interno della griglia di conta. Nei casi in cui all'interno di un poligono di conta cadevano delle piccole lacerazioni tissutali, causate dal lungo permanere in ambiente liquido attraverso le varie tappe del protocollo immunohistochimico, l'area dello stesso veniva corretta proporzionalmente. La stessa accortezza è stata adottata per tutte le strutture contate. L'analisi del VLPO è stata condotta bilateralmente (Figura 21D, H, N).

Anche per la quantificazione dell'immunoreazione nell'ambito del MnPO, che inizialmente si pensava di analizzare delineandone manualmente i confini, si è in seguito deciso di utilizzare dei poligoni di conta al fine di una maggiore standardizzazione del metodo (Figura 23). È stato modificato allo scopo un modello già presente in letteratura (Gong et al., 2000). Il rMnPO è stato contato all'interno di una griglia costituita da 3 elementi quadrati di 300 µm di lato, disposti a ferro di cavallo a circondare simmetricamente l'organo vascolare della lamina terminale (VOLT) intorno al 3V. I due elementi laterali, R2 (sinistro) ed R3 (destra), erano dislocati 150 µm inferiormente rispetto al centrale R1. Questa griglia di conta descriveva bene il rMnPO (Figura 21A, E-F, I), tranne che nella porzione nascente del nucleo, che è stata esclusa dalla conta (si veda il paragrafo *Riferimenti anatomici*). Per il cMnPO, sono state analizzate sia la porzione sottocommissurale sia la porzione sovra commissurale, lungo tutta la rispettiva estensione. Si è pensato per questo ad un sistema modulare di rettangoli di 300 µm di base e di altezza pari a multipli di 100 µm (da 1 a 8 per il vMnPO, 1 o 2 per il dMnPO), al fine di seguire l'evoluzione rostrocaudale del profilo nucleare e nel contempo considerare la sua eventuale dissimile dissezione tra diversi cervelli dovuta a inclinazioni del taglio coronale lievemente differenti, ma comunque significative per una struttura il cui profilo varia considerevolmente nello spazio di poche decine di micron. I rettangoli venivano centrati sulla linea mediana, con la base posizionata in corrispondenza dell'apice del 3V nel caso del vMnPO (Figura 21B- C, G, L-N), subito dorsalmente alla decussazione della ac per il dMnPO (Figura 21G); nella zona immediatamente precommissurale (da bregma +0,04 mm a bregma <-0,12 mm), la griglia per il dMnPO poggiava

immediatamente sopra quella per il vMnPO e la distinzione tra porzione sovra e sottocommessurale era effettuata in base al segmento immaginario di congiunzione tra i punti più mediali dei due tratti fibrosi ai lati della linea mediana (Figura 21C, E-F, M-N). Inoltre, laddove l'obliquità del taglio coronale era tale da incontrare sulla stessa sezione ventralmente il rMnPO e dorsalmente il cMnPO, la griglia del vMnPO poggiava immediatamente sopra quella per il rMnPO (Figura 21E-F).

Questo metodo di campionamento è stato poi confrontato con il metodo di delineazione manuale dei contorni del nucleo, su tre animali, scelti in maniera casuale tra i 24 sperimentali. Le due procedure hanno presentato un'elevata correlazione (Figura 24). L'area totale media per animale, campionata con il metodo delle griglie è risultata pari al $59,93 \pm 2,44$ % di quella campionata mediante delineazione manuale. Essendo il conteggio di cellule espresso come densità di nuclei marcati su unità di superficie (mm^2), la differenza percentuale media fra le due misure di densità nei tre animali considerati è risultata molto bassa ($7,14 \pm 3,98$ %).

Metodo di conteggio dei nuclei marcati

La marcatura nucleare per c-Fos ha le caratteristiche di un fenomeno che, lungi dall'essere del tutto o nulla, si presenta come un pattern continuo che va dal francamente positivo al francamente negativo, attraverso una scala di intensità decrescente, nella quale è difficile porre una soglia certa, ma soprattutto standardizzabile tra sezioni, sedute sperimentali e strutture anatomiche diverse. L'idea di avvalersi dell'ausilio del programma di analisi d'immagine è stata sviluppata al fine di stabilire il più obiettivamente possibile la soglia di marcatura positiva delle cellule.

Image Pro Plus 4.5 permetteva di duplicare la porzione di tessuto inquadrata in un poligono di conta e salvarla in un file distinto. Tali file, sempre in formato TIFF, assumevano il nome del vetrino di origine, seguito dalla specifica

della griglia di appartenenza: rMnPO1 (elemento centrale), rMnPO2 (elemento a sinistra), rMnPO3 (elemento a destra), vMnPO x (con x variabile da 1 a 8 a significare il numero degli elementi modulari, quindi l'altezza del poligono di conta), dMnPO x (con x pari a 1 o 2), VLPOcord x , VLPOmedd x , VLPOdord x , VLPOcors x , VLPOmeds x , VLPOdors x . Per ciascun file d'immagine era possibile chiedere al programma la distribuzione di frequenza dei pixel relativa ad ognuno dei tre livelli di informazione colore, sia nel sistema RGB, sia nel sistema HSI. Ai fini della quantificazione dell'immunoreattività eravamo interessati a distinguere i nuclei marcati non per il livello di una singola componente colore (RGB), ma in base all'intensità del segnale, considerando il colore come parametro unitario (HSI). L'esame di un considerevole numero di curve di distribuzione di frequenza dei pixel in relazione al parametro intensità (Figura 25), ha mostrato la presenza di una skewness negativa: la massa della distribuzione era concentrata sulla destra della figura e la coda sinistra era più lunga, cioè vi erano più dati nella coda sinistra di quelli attesi in una distribuzione normale. Non solo tale coda si rivelava sempre più rappresentata della destra, ma presentava anche un'ampia variabilità tra casi. Le curve, peraltro, se allineate sullo stesso valore di picco, tendevano a coincidere, fatto salvo il fenomeno che quanto più rappresentata era la coda sinistra, tanto più basso era il picco. Ricordiamo che il valore 0 corrisponde al nero e il valore 255 al bianco (si veda il paragrafo *Correzione della vignettatura*), quindi a destra avremo i pixel chiari e a sinistra quelli scuri. Il picco della curva, cioè il valore di intensità più rappresentato o moda, per la totalità dei poligoni di conta analizzati (più di 1000), è stato sempre compreso tra un minimo di 175 e un massimo di 215, quindi spostato a destra. Poiché l'immunoreazione per c-Fos produce un pattern di nuclei più o meno scuri su fondo chiaro, si presumeva che la coda sinistra rappresentasse i nuclei marcati, la cui intensità si distaccava progressivamente da quella della curva di distribuzione dei pixel costituenti il *background*. Questo avrebbe spiegato anche perché la coda sinistra risultava così variabile tra casi, esprimendo la diversa entità della immunoreazione, mentre per il resto i profili delle curve erano similmente distribuiti intorno al valore moda, con un picco inversamente proporzionale alla coda sinistra. Abbiamo potuto

testare la veridicità di questa intuizione grazie ad una funzione del programma di analisi nota col termine di *segmentazione*.

La segmentazione (Figura 26) è un processo attraverso il quale alcuni colori (o livelli di grigio) in un'immagine possono essere identificati visivamente e isolati. Questa funzione può essere impiegata per separare entità o oggetti di interesse dal *rumore di fondo*. Le aree segmentate possono essere lasciate nel loro colore originario o visualizzate in falso colore. Nel nostro caso abbiamo visualizzato in falso colore per tappe successive i pixel aventi valori di intensità corrispondenti al valore moda, nonché all'intervallo di valori rispettivamente a destra e a sinistra dello stesso. In particolare la porzione della curva a sinistra del valore moda è stata segmentata per intervalli di 10 unità di intensità. Ne è risultato che il picco della curva rappresentava sempre pixel appartenenti al *background* (Figura 26A, G). Così anche tutta la parte alla destra della moda, corrispondente ai pixel più chiari del *background* e di tutta l'immagine (Figura 26B). Segmentando la porzione sinistra, nelle prime 3 classi da 10 unità si ritrovavano sempre pixel appartenenti al *background*, ma un po' più scuri del valore moda, e così pure quegli aloni nucleari corrispondenti a cellule non marcate (Figura 26C-E). La quarta classe di intensità a partire dalla moda, invece, corrispondeva ai contorni dei nuclei marcati (Figura 26F, G). Procedendo nell'operazione di segmentazione, sempre verso sinistra, lungo la coda dei valori più scuri, si evidenziavano, dai bordi al centro, i nuclei via via più marcati (Figura 26I-V). Se indichiamo il valore moda come BkG, la classe d'intensità BkG - (31-40) corrispondeva sempre ai contorni dei nuclei positivi, sia in condizioni più sia meno marcate e a livello di entrambi i nuclei analizzati (Figura 26H). Abbiamo pertanto stabilito di considerare positivi gli oggetti sopra la soglia di e cioè numericamente inferiori a: BkG - 35 (valore medio nella classe 31-40). In questo modo si ottiene una standardizzazione della soglia di positività rispetto al valore moda, considerato il più rappresentativo del *background*. Il programma raggruppa i pixel sopra soglia confinanti in oggetti che è in grado di numerare, fornendoci il conteggio nucleare.

Soprattutto nelle condizioni più marcate, tuttavia, non è affatto infrequente riscontrare raggruppamenti di nuclei vicini o anche parzialmente sovrapposti

(considerati i diversi piani nucleari possibili in una sezione di 40 μm), che vengono elaborati dal sistema come un unico oggetto. Ognuno degli oggetti sopra soglia, evidenziati dal programma con il metodo di segmentazione relativa al parametro intensità nel sistema HSI, veniva esaminato mediante osservazione comparata dell'immagine digitale e della sezione al microscopio e le cellule separate manualmente secondo i seguenti criteri: nuclei parzialmente sovrapposti di simile intensità venivano separati dividendo a metà l'area di sovrapposizione; se di diversa intensità, si seguiva in maniera molto aderente il contorno del più marcato, in modo tale da evitare di rendere più intensi oggetti chiari; due nuclei completamente sovrapposti in genere non venivano separati, a meno che non vi fosse una forte differenza di superficie tra di essi. La funzione utilizzata, *split objects*, permetteva di separare manualmente singoli oggetti raggruppati, tracciando una linea di separazione tra gli oggetti da dividere. Essa non poteva ovviamente vicariare eventuali errori di interpretazione dell'operatore di fronte all'immagine acquisita, che potevano derivare dal fatto che le sezioni erano spesse 40 μm e quindi corrispondevano a più piani di nuclei e a più piani focali a 10 ingrandimenti, mentre l'immagine acquisita è bidimensionale. La pratica di controllare tutti gli oggetti al microscopio è derivata proprio dall'esigenza di un corretto discernimento. Si è scelta questa linea nonostante il programma fornisse la possibilità di separare automaticamente oggetti raggruppati, tramite funzioni che avrebbero permesso un notevolissimo risparmio di tempo. Le seguenti in particolare sono state esaminate e confrontate con il metodo manuale. La funzione *Auto-Split* si basa sulla presenza di concavità nell'oggetto per determinare linee di separazione: essa prevede che ogni oggetto singolo abbia forma convessa (è la situazione in cui tutte le linee congiungenti due punti del profilo, o *outline*, cadono all'interno dell'oggetto) e che i singoli oggetti non si sovrappongano per più del 30%; inoltre, l'intersezione tra due oggetti singoli che presentano un'area di sovrapposizione deve essere identificabile per mezzo di due punti concavi; infine, le *outline* dell'oggetto devono essere abbastanza regolari da permettere di distinguere agevolmente una concavità creata dalla sovrapposizione da una facente semplicemente parte della forma dell'oggetto. La funzione *Watershed*-

Split non si basa sulla presenza di concavità nell'oggetto per determinare linee di separazione, ma sul principio di erodere un oggetto fino a farlo scomparire e quindi dilatarlo nuovamente fino alla sua dimensione iniziale, senza però permettere che tocchi gli oggetti vicini. Entrambi i metodi di separazione automatica dei raggruppamenti di nuclei marcati sono risultati meno validi (Tabella 5) e l'osservazione al microscopio ha ulteriormente innalzato la precisione della procedura.

Si è cioè voluto elaborare un metodo che permettesse di contare esattamente i nuclei che avremmo contato visivamente, ma avente caratteristiche di elevata standardizzazione e riproducibilità. Era possibile inoltre richiedere al programma informazioni sugli oggetti selezionati. In particolare è stato da noi considerato interessante assumere i parametri Area (A) e Intensità media (I): le informazioni relative ad ognuno dei singoli oggetti venivano importate in Excel. A questo proposito, i criteri suddetti di separazione degli oggetti raggruppati erano proprio orientati ad alterare il meno possibile i parametri di superficie e intensità dei singoli nuclei, all'interno di una rappresentazione necessariamente bidimensionale.

Abbiamo infine tenuto in conto la seguente considerazione: poiché le porzioni centrali dei nuclei risultavano, come abbiamo visto nel procedimento di segmentazione, sempre più scure dei bordi, era possibile che alcuni pixel centrali appartenenti ad aloni di nuclei considerati non positivi andassero di poco sopra soglia. Al fine di evitare una sovrastima del numero di nuclei positivi in seguito a questo fenomeno, è stato studiato un sistema per filtrare tali oggetti indesiderati, che avevano la caratteristica di essere poco intensi ed anche di piccole dimensioni.

E' stata fatta una valutazione empirica, prendendo coppie di oggetti sopra soglia, vicini tra loro per intensità, di cui uno corrispondeva al più debole che sarebbe stato considerato positivo ad una valutazione visiva ed uno al meno debole che sarebbe stato scartato come negativo. Dopo una serie di prove, è stato scelto di applicare un filtro d'area di $10 \mu\text{m}^2$, cioè di eliminare dal conteggio tutti gli oggetti sopra soglia più piccoli di $10 \mu\text{m}^2$ (Figura 27A). In realtà, mettendo in correlazione i parametri A e I, si è visto che esiste una correlazione lineare, che

risulta altamente significativa per i valori più bassi (Figura 27B-C). Il filtro d'area corrisponde cioè ad un filtro d'intensità.

Sono stati considerati bordi di esclusione l'inferiore e il destro. Nel conteggio manuale classico tutti i nuclei positivi interni o esterni alla griglia che toccano un bordo d'esclusione non vengono contati, mentre rientrano nel conteggio tutti i nuclei positivi interni o esterni alla griglia che toccano un bordo d'inclusione. Il programma però si riferiva strettamente all'area delimitata all'interno della griglia di conta. Poiché il filtro d'area prescelto eliminava tutti gli oggetti caratterizzati da un'area sopra soglia inferiore a $10 \mu\text{m}^2$, anche i nuclei positivi tagliati a livello di un bordo d'inclusione risultavano esclusi. Per questo, nel nostro caso, il criterio di eliminazione è stato relativo solo a tutti gli oggetti la cui area sopra soglia oltre un bordo d'esclusione era maggiore o uguale a $10 \mu\text{m}^2$. Quindi, un nucleo positivo che, pur toccando un bordo d'esclusione, non sarebbe stato contato in un'immaginaria o reale griglia adiacente, era incluso nel conteggio.

Riepilogando, quindi, i parametri del metodo di conteggio elaborato erano i seguenti: la soglia di positività era posta 35 unità a sinistra del valore moda (BkG - 35), la separazione degli oggetti raggruppati veniva effettuata manualmente osservando ciascun oggetto sopra soglia al microscopio, un filtro d'area di $10 \mu\text{m}^2$ permetteva di eliminare dal conteggio porzioni centrali di nuclei non marcati risultanti di intensità poco oltre la soglia, bordi di esclusione erano considerati l'inferiore e il destro. Tale metodo aveva caratteristiche di riproducibilità e la soglia d'intensità era standardizzata sul *background*; ognuno degli oggetti contati veniva sottoposto a controllo visivo da parte dello sperimentatore, in tal modo operando già una validazione interna alla procedura. Tuttavia, prevedendo comunque l'ausilio di un programma di analisi d'immagine, per correttezza metodologica, si è ritenuto opportuno effettuare una validazione tramite conteggio puramente visivo. In Tabella 6, sono riportati i dati comparati. Come si può vedere, c'è una buona corrispondenza, anche se tendenzialmente con il conteggio classico il numero delle cellule considerate positive è risultato inferiore. Questa differenza è da attribuirsi al fatto che l'immunoistochimico che

ha analizzato i vetrini ha considerato una soglia di positività più alta rispetto a quella su cui è stato costruito il metodo. Peraltro, nell'unico caso in cui le cellule marcate erano rade e poco intense, il numero di nuclei contati è risultato superiore con il metodo classico. Questo potrebbe far pensare che l'occhio umano tenda ad abbassare la soglia di positività quando la maggior parte degli oggetti visualizzati risulta più chiara o quando il punto di riferimento più intenso si sposta in basso.

Elaborazione dei dati

Per ciascuna divisione anatomica, i valori risultanti dal conteggio dei nuclei marcati venivano mediati in modo da ottenere una singola misura per animale. Per il rMnPO, i conteggi venivano riferiti ad un'area pari a 3 volte $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ ($900 \times 300 \mu\text{m}^2$); si sommano cioè per ogni sezione i conteggi risultanti dai tre elementi quadrati disposti a ferro di cavallo e i valori così ottenuti venivano mediati per ogni animale. Nel caso di vMnPO e dMnPO, i risultati venivano standardizzati per aree rispettivamente di $300 \times 600 \mu\text{m}^2$ e $300 \times 200 \mu\text{m}^2$: si procedeva alla somma dei valori di ogni singola misura effettuata e la si divideva per il numero dei moduli di $300 \times 100 \mu\text{m}^2$ complessivamente usati per campionare l'animale, moltiplicando quindi per 6 o per 2 rispettivamente. Per VLPOcor, VLPOmed e VLPOdor, i risultati per animale venivano riferiti ai rispettivi poligoni di conta.

Ottenuta così una misura per ogni caso, i risultati per condizione erano espressi come media di tali misure \pm errore standard della media.

Dal momento, poi, che il programma di analisi d'immagine rendeva agevolmente disponibili per ognuno dei nuclei contati i valori di area sopra soglia (A) e intensità media (I), è stata effettuata un'analisi preliminare al fine di valutare il possibile interesse in futuro di una suddivisione dei conteggi per classi d'intensità, in modo da ottenere informazioni più dettagliate sullo stato di attivazione delle strutture studiate: ricordiamo che la marcatura nucleare per l'Agc-Fos presenta un pattern di continuità dal più al meno intensamente positivo e che tutte le cellule considerate positive sono state conteggiate insieme,

indipendentemente dal grado di intensità della marcatura. L'intensità media di ogni nucleo è stata misurata come differenza rispetto al valore moda della curva di distribuzione di frequenza dell'intensità dei pixel (riferita alla rispettiva area di conta), rappresentativo del background; quindi, in questo caso, valori numerici più grandi corrispondono ad intensità più elevate. Sono stati calcolati, per ciascun animale e divisione anatomica, numero dei casi (nuclei positivi) e area totale campionata e, per entrambi i parametri A e I, media, mediana, deviazione standard ed errore standard della media.

Come per i conteggi, i risultati di tale analisi sono stati espressi, sia per A sia per I, come media dei valori medi risultanti da ciascun animale \pm errore standard della media.

Analisi statistica

La valutazione statistica dei dati è stata affrontata mediante l'analisi della varianza (ANOVA) univariata, considerando singolarmente le popolazioni definite dai poligoni di conta, ovvero dalle suddivisioni nucleari prese in esame: per il MnPO si sono considerate le tre popolazioni corrispondenti a rMnPO ($F_{6,17} = 6,044$, $p < 0,01$), vMnPO ($F_{6,17} = 5,558$, $p < 0,01$) e dMnPO ($F_{6,17} = 6,025$, $p < 0,01$); per il VLPO le tre popolazioni definite da VLPOcor ($F_{6,17} = 7,073$, $p < 0,01$), VLPOmed ($F_{6,17} = 7,932$, $p < 0,01$) e VLPOdor ($F_{6,17} = 5,655$, $p < 0,01$). Di seguito all'ANOVA, sono stati eseguiti dei confronti pre-pianificati utilizzando il metodo dei contrasti, singolarmente definiti come riassunto in Tabella 7. La popolazione di controlli è stata confrontata contro quella dei trattati. All'interno del gruppo dei trattati, l'esposizione breve è stata confrontata contro la popolazione costituita dall'insieme delle esposizioni prolungate e dei rispettivi recuperi. Quindi, la popolazione delle esposizioni prolungate è stata confrontata contro quella dei recuperi. Infine, sono stati confrontati tra loro i due controlli, le due esposizioni prolungate e i due recuperi.

Per ogni popolazione di dati, inoltre, sono stati condotti dei confronti post-hoc utilizzando il *t*-test modificato e correggendo il livello di significatività secondo il metodo del Bonferroni sequenziale (Holm, 1979; Wallenstein et al., 1980). Tali confronti post-hoc, in particolare, erano i seguenti: E4 vs C4, E24 vs C24, E48 vs C24, E24R4 vs C4, E48R4 vs C4, E24R4 vs E24 e E48R4 vs E48. In essi, le due condizioni di controllo sono state considerate come una popolazione unica.

Il livello di significatività era definito per $p < 0,05$.

Risultati

Immunoreattività per c-Fos

Le Figure 28 - 30 mostrano esempi dell'immunoreazione nucleare per l'Ag c-Fos a livello delle aree studiate e nelle diverse condizioni sperimentali.

In Figura 28, si può osservare il rMnPO a ~ bregma +0,30 mm. Come si può notare, le condizioni di controllo risultavano entrambe poco marcate, mentre le cellule positive aumentavano dopo 4,5 h di esposizione a bassa Ta e risultavano ancora più numerose dopo 24 e 48 h di esposizione, mantenendosi elevate durante il recupero a Ta normale.

La Figura 29 mostra il cMnPO a ~ bregma -0,20 mm. Anche quest'area risultava poco attiva nelle condizioni di controllo e la marcatura sembrava aumentare con la durata dell'esposizione e ridursi durante il periodo di recupero: questo effetto appariva più evidente nella porzione dorsale del nucleo.

Il VLPO è rappresentato, in Figura 30, a ~ bregma -0,30 mm. Le condizioni di controllo apparivano poco marcate in tutte le suddivisioni del nucleo. Al contrario, dopo 4,5 h di esposizione a -10°C, si assisteva ad un aumento dell'espressione di c-Fos caratteristicamente a livello dell'estensione mediale e dorsale del nucleo. Durante le esposizioni prolungate, tale incremento tendeva a mantenersi invariato nel VLPO_{odor}, mentre appariva meno evidente nel VLPO_{med}. Il core era costantemente risparmiato durante tutta la durata dell'esposizione. Il successivo recupero vedeva una marcatura ben evidente su tutta l'estensione nucleare.

Conta dei nuclei marcati

La rappresentazione grafica della conta nucleare è illustrata in Figura 31 e Figura 32, rispettivamente per MnPO e VLPO, nelle loro suddivisioni anatomiche. I risultati dei conteggi effettuati sono mostrati in grafico per ogni

struttura con due distinte modalità e cioè sia tramite istogrammi sia anche attraverso una rappresentazione più analitica dei singoli casi.

Le due condizioni di controllo studiate risultavano omogeneamente poco attive in tutte le porzioni del MnPO e nel VLPO_{odor}. Si notava nel VLPO_{med} una lieve differenza, che diventava più accentuata a livello del core. Tali differenze non raggiungevano in nessun caso la significatività statistica. Per tale motivo, nei confronti post-hoc, i controlli sono stati considerati come una popolazione unica.

A livello del rMnPO, l'ANOVA univariata è risultata significativa ($F_{6, 17} = 6,044$, $p < 0,01$). La c-Fos-ir nella globalità delle condizioni sperimentali di esposizione e di recupero è apparsa più elevata rispetto ai controlli e la differenza è risultata statisticamente significativa ($t_{17} = -5,412$, $p < 0,01$), ma nell'esposizione breve è risultata significativamente inferiore rispetto alle altre condizioni di trattamento ($t_8 = -2,667$, $p < 0,05$). I confronti post-hoc hanno confermato un significativo incremento del numero di nuclei positivi, in relazione alle condizioni di controllo, dopo le esposizioni prolungate e i rispettivi recuperi, ma non dopo l'esposizione breve (E24 vs C, $t_{17} = 4,316$, $p < 0,01$; E48 vs C, $t_{17} = 4,005$, $p < 0,01$; E24R4 vs C, $t_{17} = 3,888$, $p < 0,01$; E48R4 vs C, $t_{17} = 4,724$, $p < 0,01$). Nessuna differenza nel conteggio dei nuclei marcati si è osservata tra esposizioni prolungate e condizioni di recupero.

Anche per le due divisioni del cMnPO, l'ANOVA univariata è risultata significativa (vMnPO, $F_{6, 17} = 5,558$, $p < 0,01$; dMnPO $F_{6, 17} = 6,025$, $p < 0,01$). Si è osservato un significativo incremento della marcatura per c-Fos nella globalità dei trattati rispetto ai controlli (vMnPO, $t_{17} = -5,329$, $p < 0,01$; dMnPO, $t_{17} = -5,164$, $p < 0,01$). In particolare per il dMnPO, l'entità dell'incremento tendeva ad aumentare con la durata dell'esposizione. Durante il successivo recupero, la marcatura specifica decrementava in relazione alle esposizioni prolungate, in modo molto lieve a livello del vMnPO e in maniera considerevole nella porzione dorsale del nucleo, dove tale decremento raggiungeva la significatività statistica ($t_{17} = 2,971$, $p < 0,01$). I confronti post-hoc hanno mostrato come, a livello del vMnPO, ognuna delle condizioni di trattamento abbia presentato un incremento significativo dell'espressione di c-Fos rispetto alla popolazione di controllo, tranne

E4 (E24 vs C, $t_{17} = 4,083$, $p < 0,01$; E48 vs C, $t_{17} = 4,553$, $p < 0,01$; E24R4 vs C, $t_{17} = 3,889$, $p < 0,01$; E48R4 vs C, $t_{17} = 3,860$, $p < 0,01$). Per il dMnPO, invece, la differenza rispetto ai controlli ha raggiunto la significatività statistica solo per le condizioni E24, E48, E48R4 (E24 vs C, $t_{17} = 4,312$, $p < 0,01$; E48 vs C, $t_{17} = 5,348$, $p < 0,01$; E48R4 vs C, $t_{17} = 3,104$, $p < 0,05$).

In tutte le suddivisioni anatomiche del VLPO, come nel caso del MnPO, l'ANOVA univariata è risultata significativa (VLPOcor, $F_{6, 17} = 7,073$, $p < 0,01$; VLPOmed, $F_{6, 17} = 7,932$, $p < 0,01$; VLPOdor $F_{6, 17} = 5,655$, $p < 0,01$). La globalità dei trattamenti si differenziava in maniera significativa dalla popolazione di controllo per un incremento dell'attività specifica (VLPOcor, $t_{17} = -3,410$, $p < 0,01$; VLPOmed, $t_{17} = -5,634$, $p < 0,01$; VLPOdor, $t_{17} = -5,585$, $p < 0,01$).

Nel core, tuttavia, le condizioni di esposizione si mantenevano vicine ai valori di controllo, mentre i recuperi mostravano un significativo innalzamento dell'espressione di c-Fos rispetto alle esposizioni prolungate ($t_{17} = -4,521$, $p < 0,01$). Dai confronti post-hoc, tale incrementata attività specifica in E24R4 ed E48R4 è risultata significativa sia rispetto alla popolazione di controllo sia nei confronti delle rispettive condizioni di esposizione (E24R4 vs C, $t_{17} = 4,058$, $p < 0,01$; E48R4 vs C, $t_{17} = 5,229$, $p < 0,01$; E24R4 vs E24, $t_{17} = 3,337$, $p < 0,05$; E48R4 vs E48, $t_{17} = 3,056$, $p < 0,05$).

A livello dell'estensione mediale, si è notato un effetto acuto dell'esposizione al freddo, che tendeva a regredire col prolungarsi della stessa. Durante il successivo recupero, si tornava ad osservare un incremento dell'espressione antigenica e la differenza tra le popolazioni delle esposizioni prolungate e dei recuperi è risultata statisticamente significativa ($t_{17} = -2,472$, $p < 0,05$). I confronti individuali post-hoc hanno mostrato come l'incremento rispetto ai controlli sia risultato statisticamente significativo per l'esposizione breve e per entrambe le condizioni di recupero (E4 vs C, $t_{17} = 5,863$, $p < 0,01$; E24R4 vs C, $t_{17} = 5,050$, $p < 0,01$; E48R4 vs C, $t_{17} = 4,396$, $p < 0,01$).

Nell'estensione dorsale, i trattati hanno mostrato nel complesso un'omogeneità dell'incremento rispetto ai controlli, tranne che per la condizione E24R4, in cui l'innalzamento del c-Fos è apparso lievemente meno marcato che

nella rispettiva esposizione e nel recupero successivo all'esposizione più prolungata. Da un punto di vista statistico, l'incremento delle singole condizioni di trattamento rispetto ai controlli è risultato sempre statisticamente significativo, ma non si è registrata alcuna significativa differenza tra recuperi e rispettive esposizioni (E4 vs C, $t_{17} = 4,597$, $p < 0,01$; E24 vs C, $t_{17} = 3,536$, $p < 0,05$; E48 vs C, $t_{17} = 3,995$, $p < 0,01$; E24R4 vs C, $t_{17} = 3,082$, $p < 0,05$; E48R4 vs C, $t_{17} = 4,519$, $p < 0,01$).

Pattern caratteristici

Un ulteriore piano di approfondimento nell'analisi delle differenze tra le condizioni sperimentali studiate, emerse dalla conta dei nuclei marcati, è stato quello di verificare la presenza di eventuali pattern caratteristici attraverso un'osservazione più fine della distribuzione anatomica degli stessi.

Eravamo in particolare interessati a discernere se l'incremento del c-Fos riscontrato, nel recupero dopo deprivazione ipnica, a livello dell'area di conta del VLPOcor, fosse da ascrivere ad una popolazione neuronale specifica. Dall'esame comparato delle aree di conta nelle varie condizioni sperimentali è emerso che, durante l'esposizione al freddo, i nuclei marcati tendevano ad "evitare" la parte dell'area di conta più vicina alla base del cervello e subito laterale al SO, mentre durante il successivo recupero, andavano caratteristicamente a "riempire" quest'area (Figura 33). Esiste una fortissima corrispondenza tra tale popolazione neuronale, la cui attività era soppressa durante la deprivazione ipnica, e l'area triangolare, avente base di 200 μm e altezza di 250 μm e posizionata lungo la base del cervello a partire dal bordo laterale del SO, utilizzata dal gruppo di Saper per la conta dei neuroni del core nucleare, sulle sezioni in cui essi venivano evidenziati mediante colorazione di Nissl (Lu et al., 2000).

A livello del MnPO, al contrario, precisamente sulla linea di confine tra MnPO e VOLT, strutture appartenenti entrambe alla lamina terminale, si assisteva di frequente ad un caratteristico pattern di distribuzione dei nuclei positivi durante

le esposizioni prolungate, nelle quali questi tendevano a disporsi a cappuccio: è verisimile che tale attivazione corrispondesse ad una suddivisione del VOLT, nota come cappuccio dorsale (Uschakov et al., 2006, Figura 28).

Infine, la griglia di conteggio del VLPO_{odor} assumeva rapporto con un pattern di attivazione della POA che si manifestava caratteristicamente durante l'esposizione a -10°C. Esso si presentava, in maniera più evidente nelle sezioni rostrali della POA, come una banda cellulare a concavità mediale, che la attraversava dorsoventralmente, sul confine tra MPA e LPO, tendendo ad evitare MPO e AVPe (nucleo periventricolare anteroventrale), che venivano ad essere circondati da questo arco; la marcatura si estendeva dorsalmente a coinvolgere i nuclei della POA dorsale, in particolare il parastriale (PS), mentre tendeva ad evitare ventralmente il core del VLPO. Tale pattern, assente nei controlli e particolarmente pronunciato in E4, era conservato durante le esposizioni prolungate, dove si accentuava ulteriormente la soppressione dell'espressione di c-Fos a livello di MPO e AVPe, mentre tendeva a regredire nei recuperi, in particolare in E24R4 (Figura 30). Nelle porzioni più rostrali, la concavità di tale banda di attivazione era rivolta più esattamente in senso medioventrale, approssimando anche in questo caso il confine tra MPA e LPO delineato sul Paxinos e Watson, 2005.

Un'altra osservazione molto peculiare è stata la rilevazione di immunoreattività citoplasmatica per c-Fos, a livello di soma e prolungamenti di singoli o più raramente di reti di neuroni nell'ambito di popolazioni attive (Figure 34 e 35). Tale reperto era caratteristico del rMnPO nella condizione E4, in cui la delineazione di soma e prolungamenti neuronali, compreso il cono d'emergenza e l'assone stesso, nonché ramificazioni dendritiche, raggiungeva livelli eclatanti. Più raramente e in maniera meno pronunciata, era possibile osservare tali neuroni anche a livello dell'estensione del VLPO (mai nel core, la cui attività era soppressa durante le esposizioni). Reperti molto interessanti sono stati riscontrati però in aree vicine, nell'ambito della POA, nonché a livello talamico (PVA). Del tutto infrequenti e appena accennati (soma e porzione iniziale di qualche

prolungamento, verosimilmente l'assone) simili rilevamenti in E24 (POA e PVA) ed E48 (POA). Non è stata osservata immunoreattività citoplasmatica nelle condizioni di controllo e nei recuperi.

Analisi relative ai parametri area e intensità

La rappresentazione grafica dei valori medi dell'area dei nuclei marcati e dell'intensità di marcatura è illustrata in Figura 36, per MnPO e VLPO, nelle loro suddivisioni anatomiche. In tutti i casi, i risultati relativi alle aree dei nuclei marcati costituiscono la serie in basso (tondini), mentre quelli relativi alle intensità medie costituiscono la serie in alto (barrette). In generale, questo tipo di analisi ha mostrato minori differenze statisticamente significative per le aree rispetto a ciò che è risultato per le intensità; peraltro, l'andamento, nelle varie condizioni sperimentali, tendeva a seguire quello dei valori di intensità. I contrasti dell'ANOVA hanno mostrato, in questa analisi, una differenza tra le due condizioni di controllo, per l'area nel dMnPO e per l'intensità nel VLPOcor, pertanto i valori di controllo sono stati considerati separatamente per le due condizioni, in tutti i confronti post-hoc.

Per quanto riguarda il MnPO, nella sua parte rostrale, soltanto per le intensità il test dell'ANOVA univariata è risultato statisticamente significativo ($F_{6, 17} = 9,878$, $p < 0,01$). Per le aree, sono risultati comunque significativi alcuni contrasti, in particolare la differenza tra i due controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -2,639$, $p < 0,05$) e quella tra le esposizioni prolungate e le condizioni di recupero ($t_{17} = 2,618$, $p < 0,05$); per le intensità, invece, risultavano differenti, statisticamente, i controlli rispetto a tutti i trattamenti ($t_{17} = -5,640$, $p < 0,01$), l'esposizione breve rispetto a tutti gli altri trattamenti ($t_{17} = 4,281$, $p < 0,01$), le esposizioni prolungate rispetto ai recuperi ($t_{17} = 2,566$, $p < 0,05$); inoltre, tutti i trattamenti sono risultati diversi dai controlli, così come E24R4 era differente dal rispettivo valore di esposizione (E4 vs C4, $t_{17} = 5,774$, $p < 0,01$; E24 vs C24, $t_{17} = 3,996$, $p < 0,01$; E48 vs C24, $t_{17} = 3,231$, $p < 0,05$; E48R4 vs C4, $t_{17} = 2,657$, $p <$

0,05; E24R4 vs E24, $t_{17} = 3,742$, $p < 0,01$). Nel vMnPO, nuovamente, abbiamo trovato il test dell'ANOVA univariata significativo solo per le intensità ($F_{6, 17} = 5,100$, $p < 0,01$); per le aree, invece, risultava significativo il solo contrasto relativo al confronto tra le esposizioni prolungate e i recuperi ($t_{17} = 2,470$, $p < 0,05$); per le intensità, in particolare, risultavano significativamente differenti i controlli rispetto a tutti i trattamenti ($t_{17} = -3,682$, $p < 0,01$) e le esposizioni prolungate rispetto ai recuperi ($t_{17} = 4,057$, $p < 0,01$); in questa area nucleare, i confronti post-hoc risultavano significativi, rispetto ai relativi controlli, per E4 e per E24, inoltre E24R4 risultava differente da E24 (E4 vs C, $t_{17} = 3,190$, $p < 0,05$; E24 vs C, $t_{17} = 3,046$, $p < 0,05$; E24R4 vs E24, $t_{17} = -3,298$, $p < 0,05$). L'ANOVA univariata per il dMnPO ha ricalcato i precedenti risultati, ovvero era significativa solo per le intensità ($F_{6, 17} = 3,568$, $p < 0,05$). Dall'analisi delle aree, invece, sono risultate essere significative le differenze tra le due condizioni di controllo ($t_{17} = -2,178$, $p < 0,05$) e tra le esposizioni prolungate e i recuperi ($t_{17} = 2,269$, $p < 0,05$). Relativamente alla stessa sezione del MnPO, per le intensità è risultata significativa la differenza tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -2,744$, $p < 0,05$) e tra le esposizioni prolungate e i recuperi ($t_{17} = 2,973$, $p < 0,01$); nei confronti post-hoc l'unica differenza statisticamente rilevante è stata quella tra E4 e C4 ($t_{17} = 3,112$, $p < 0,05$).

Prendendo in considerazione l'analisi condotta sul VLPO, per il core, il test dell'ANOVA univariata è risultato significativo solo per le intensità ($F_{6, 17} = 8,262$, $p < 0,01$); per le aree, l'unica differenza statisticamente significativa è stata quella trovata tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -2,539$, $p < 0,05$). Per quanto riguarda le intensità, invece, sono risultate positive ai test statistici le differenze tra le due condizioni di controllo ($t_{17} = -3,523$, $p < 0,01$) e tra la popolazione dei controlli e quella dei trattati ($t_{17} = -5,379$, $p < 0,01$); mentre nei confronti post-hoc sono risultate significative le differenze, rispettivamente al controllo, di E4, di E24R4 e di E48R4 (E4 vs C4, $t_{17} = 6,004$, $p < 0,01$; E24R4 vs C4, $t_{17} = 4,185$, $p < 0,01$; E48R4 vs C4, $t_{17} = 4,318$, $p < 0,01$). Anche per il VLPOmed, il test dell'ANOVA univariata era significativo solo per le intensità ($F_{6, 17} = 8,131$, $p < 0,01$). I valori medi delle aree sono risultati differenti, statisticamente, soltanto

tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -3,680$, $p < 0,01$); per i valori di intensità, invece, sono state trovate differenze statisticamente significative tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -6,185$, $p < 0,01$), tra l'esposizione breve e tutti gli altri trattamenti ($t_{17} = 2,706$, $p < 0,05$) e, in riferimento al valore di controllo, di E4, di E24R4 e di E48R4 (rispettivamente: $t_{17} = 6,076$, $p < 0,01$; $t_{17} = 4,185$, $p < 0,01$; $t_{17} = 4,318$, $p < 0,01$). Nella sezione dorsale del VLPO, l'ANOVA univariata è risultata significativa per entrambe le misure di area e di intensità (rispettivamente: $F_{6,17} = 3,915$, $p < 0,05$; $F_{6,17} = 5,395$, $p < 0,01$); in particolare, le aree sono risultate differenti tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -3,637$, $p < 0,01$), tra le esposizioni prolungate e i recuperi ($t_{17} = 2,301$, $p < 0,05$) e tra E4 e C4 ($t_{17} = 4,023$, $p < 0,01$); per le intensità i risultati indicavano differenze significative tra i controlli e tutti i trattamenti ($t_{17} = -4,507$, $p < 0,01$), tra le esposizioni prolungate e i recuperi ($t_{17} = 2,132$, $p < 0,05$) e, relativamente a C4, delle due condizioni E4 e E48R4 (rispettivamente; $t_{17} = 4,822$, $p < 0,01$; $t_{17} = 3,324$, $p < 0,05$).

Discussione

Considerazioni metodologiche

Modalità di campionamento dalle aree nervose prescelte

Il campionamento dalle diverse aree presenti in ogni sezione analizzata è stato condotto, in accordo con altri autori (Gong et al., 2000; Lu et al., 2002), tramite griglie di conta standardizzate. Questo al fine di ridurre il possibile errore nel definire analiticamente in visione libera l'area di conteggio in una struttura come l'ipotalamo, in cui i confini delle suddivisioni anatomo-funzionali o nucleari sono per la maggior parte poco definiti. Una prova di delineazione in visione libera dei contorni nucleari è stata comunque condotta a livello di uno dei due nuclei al momento analizzati, il MnPO, la cui maggiore densità cellulare rispetto all'area circostante rende un po' più agevole la distinzione dei confini nucleari (si veda il paragrafo *Griglie per il conteggio dei nuclei marcati* nella sezione Materiali e Metodi). I due metodi sono risultati sostanzialmente equivalenti (Figura 24).

Immunoreattività attribuibile al c-Fos in condizioni prolungate di stimolazione

Abbiamo applicato l'analisi dell'espressione del prodotto proteico dell'IEG *c-fos* anche allo studio di condizioni di prolungata stimolazione (E24 ed E48). Sebbene l'espressione degli IEG sia considerata transitoria, è stato già dimostrato in altri lavori che tale proteina può rivelarsi un utile marcatore anche in situazioni di stimolazioni prolungate. In particolare, un'espressione transitoria della proteina c-Fos può rivelare un veloce adattamento cellulare ad una stimolazione fisiologica, modificazioni rapide di componenti o dell'architettura delle cellule. Un'attivazione persistente della sua espressione è stata invece associata alla prolungata attivazione cellulare nel corso dello sviluppo o in fenomeni di

plasticità neuronale, al fine di strutturare i componenti e/o l'architettura dei neuroni (Miyata et al., 1994; Miyata et al., 1995; Patronas et al., 1998).

Analisi dell'immunoreazione

Come riportato nella sezione Materiali e Metodi (si veda il paragrafo *Metodo di conteggio dei nuclei marcati*), la marcatura nucleare per c-Fos ha le caratteristiche di un fenomeno graduato in modo continuo, tale da rendere difficile porre una soglia di positività certa e standardizzabile. L'ausilio del programma di analisi d'immagine ci ha permesso di analizzare i dati stabilendo il più obiettivamente possibile la soglia di marcatura positiva delle cellule.

Dato che i *bianchi* (NRS) presentavano un background molto chiaro e la reazione di competizione con il peptide specifico non ha evidenziato marcatura aspecifica, eccetto in strutture circoscritte ad elevato background quali il SO (Figura 8), la marcatura presente sulle sezioni processate per l'evidenziazione dell'immunoreazione per il c-Fos è stata considerata specifica e i parametri di analisi sono stati stabiliti in modo da includere nel conteggio tutte le cellule marcate, ad esclusione degli aloni nucleari, ritrovati anche nei *bianchi* (NRS) e delle cellule che esibivano una marcatura particolarmente debole.

In letteratura non viene fatta in genere alcuna menzione ai criteri con cui si considera la soglia di positività e quando vengono date delle indicazioni, esse sono del tutto insufficientemente dettagliate. Per esempio, in un lavoro di Peterfi e collaboratori, che utilizzavano il metodo di intensificazione della DAB con cloruro di nickel, si legge che sono state considerate come nuclei marcati tutte le macchie nere o grigie, tonde o ovoidali, più grandi di 4 μm (Peterfi et al., 2004). Questo ci fa capire che sono stati contati nuclei a diversa intensità di marcatura, ma non ci dà ragguagli sulla soglia di positività.

Il nostro non è il primo lavoro che utilizza un metodo in forma digitale per l'analisi delle cellule marcate. Bratincsak e Palkovits hanno analizzato foto digitali delle loro sezioni mediante l'applicazione di una soglia che divideva i pixel in positivi o negativi. A seconda dell'ingrandimento, venivano considerati positivi - e

contati in maniera automatica - gli oggetti al di sopra di 5, 10, 20 o 40 pixel, rispettivamente a 2,5, 5, 10 o 20 ingrandimenti (presumibilmente dell'obiettivo del microscopio). Trattandosi di aree, si presume anche che il sistema misurasse dei px^2 . Se consideriamo il nostro filtro d'area, pari a $10 \mu\text{m}^2$, applicato ad immagini acquisite a 100 ingrandimenti, quindi con un obiettivo 10x, poiché $1 \mu\text{m}$ corrisponde a 2,14 px, troviamo che il nostro valore ($21,4 \text{ px}^2$) è molto vicino a quello del filtro d'area applicato da Bratincsak e Palkovits per lo stesso ingrandimento (Bratincsak e Palkovits, 2004). La stessa descrizione del metodo sopra riportato di Peterfi e collaboratori ci fa pensare all'impiego di un sistema digitale (Peterfi et al., 2004). Anche le immagini pubblicate nel lavoro di Uschakov e collaboratori (2006) permettono di verificare che venivano considerati positivi sia nuclei fortemente e moderatamente marcati, sia nuclei debolmente marcati, con un pattern di positività sovrapponibile a quello da noi considerato.

Nel nostro caso, l'impiego di un programma di analisi d'immagine aveva l'obiettivo primario di rendere confrontabili e riproducibili i parametri di analisi tra sezioni, sedute sperimentali e strutture anatomiche diverse. Il metodo prevedeva il controllo visivo al microscopio di ogni oggetto contato. Peraltro, la possibilità di acquisire rapidamente parametri relativi ai nuclei contati, quali l'area e l'intensità media degli oggetti sopra soglia, ci ha permesso di applicare ai nostri dati ulteriori livelli di analisi e di intraprendere l'esplorazione di un terreno poco conosciuto.

Correlazione tra i parametri area e intensità media degli oggetti sopra soglia

Un osservatore che ha lavorato in cieco, attraverso l'esame delle porzioni di tessuto incluse nelle griglie di conteggio del MnPO e in particolare del rMnPO, si è rivelato in grado di suddividere i 24 casi sperimentali in 4 classi, in base all'entità della marcatura misurata con il numero di oggetti marcati sopra una soglia determinata dall'osservatore: condizioni poco marcate, condizioni mediamente marcate, condizioni intensamente marcate, condizioni con presenza di marcatura citoplasmatica. Tutti i controlli sono rientrati nel primo gruppo, tutti i

recuperi nel secondo, le esposizioni prolungate nel terzo e le esposizioni brevi nel quarto. Attraverso il conteggio dei nuclei marcati non è stato possibile, invece, differenziare nella stessa regione i recuperi dalle esposizioni prolungate. Deve essere presente, quindi, un'ulteriore variabile, oltre al numero, in grado di dare informazione sull'entità della marcatura, verosimilmente l'intensità.

Al fine di valutare l'eventualità di applicare ai nostri dati di conteggio una divisione per classi sulla base dell'intensità di marcatura dei nuclei positivi, è stata effettuata un'analisi preliminare dei valori di intensità media degli stessi forniti dal programma. Sono stati parallelamente analizzati anche i dati relativi all'area di ciascun oggetto contato. Ne è innanzitutto emerso (Figura 36) che il profilo di distribuzione dei dati di intensità attraverso le condizioni sperimentali, nelle sei suddivisioni nucleari indagate, mostrava una marcata tendenza a decorrere parallelamente rispetto a quello dei dati relativi al parametro area. Questo andamento era in linea con l'osservazione, condotta nel percorso di messa a punto della metodica di conteggio, dell'esistenza di una correlazione tra i parametri di area e intensità media degli oggetti sopra soglia. Nel grafico in Figura 27B, in seguito all'eliminazione degli oggetti piccoli di intensità più elevate prodotti artificialmente nell'operazione di separazione manuale dei raggruppamenti di nuclei vicini, il coefficiente di determinazione R^2 risultava pari a 0,65. La correlazione tendeva ad aumentare nelle condizioni meno marcate. Per esempio, rispettivamente agli oggetti sopra soglia, relativi alla griglia rMnPO1, applicata alla sezione 28 F1C2 12 (condizione C4), il valore di R^2 saliva a 0,75. Inoltre il valore assoluto del coefficiente di regressione risultava più basso (-0,26 invece che -0,62), quindi la pendenza della retta era minore.

La prima idea interpretativa era stata che, più un nucleo era attivo, maggiore era l'area che superava la soglia di intensità. Questo concetto prevedeva l'assunto che le dimensioni anatomiche dei nuclei cellulari di una stessa struttura variassero all'interno di un rango contenuto e che la frazione sopra soglia aumentasse con l'entità dell'espressione di c-Fos e della conseguente marcatura. Due osservazioni giocavano, però, contro questa ipotesi. La prima era che in un campione casuale di 25 nuclei di cellule del MnPO, la cui area era stata misurata

su una sezione colorata con cresil violetto, le dimensioni risultavano molto variabili, in un rango di ampiezza sovrapponibile, anche se spostato verso valori più bassi, rispetto ad un analogo campione proveniente dalla sezione adiacente marcata per c-Fos. La seconda era che i nuclei non marcati erano caratteristicamente visibili, sotto forma di aloni sul background tissutale (Figura 26). Questo implicava che qualora fosse risultata sopra soglia solo una frazione del nucleo, si sarebbe dovuta vedere la porzione restante dell'area nucleare come alone intorno all'area sopra soglia: questo nella larga maggioranza dei casi non si verificava, cioè l'area sopra soglia si estendeva fino ai margini dei nuclei positivi, ed era vero soltanto nel caso di nuclei debolmente marcati.

Altre due ipotesi possono essere avanzate. Più un nucleo è grande, più - per qualche ragione - tenderebbe a colorarsi nella immunoreazione. Un nucleo, per esempio, potrebbe legare a sé più molecole di Ac, a parità di attivazione dell'espressione di c-Fos, quanto maggiori sono le sue dimensioni. In questo caso, l'intensità di marcatura nucleare rappresenterebbe in qualche misura un indice indiretto di area o comunque sarebbe spiegata in parte dalla dimensione del nucleo.

In alternativa: più molecole di c-Fos sono presenti nel nucleo, maggiore sarebbe "l'amplificazione" risultante dal procedimento di rilevazione immunoistochimico, quindi più "grosso" diventerebbe il nucleo nel processo di marcatura. Se si potesse, cioè, misurare l'area anatomica dei singoli nuclei marcati, si assisterebbe ad un aumento percentuale maggiore nelle condizioni più attive. In questo caso, l'area nucleare sopra soglia sarebbe una misura indiretta dell'espressione di c-Fos. A favore di questa interpretazione andrebbe l'osservazione che, per il parametro area, il valore della deviazione standard della media, per ogni caso sperimentale e per ogni suddivisione anatomica, tendeva ad aumentare con l'incrementare del valore stesso della media. Questo potrebbe indicare che c'è un incremento percentuale dell'area dovuto all'amplificazione del segnale prodotta dalla cascata di rilevazione dell'Ag, tale che più Ag i nuclei contengono, più si "ingrossano" nell'immunoreazione e quindi aumenta l'intervallo tra il valore minimo e il valore massimo. In altre parole, due nuclei

grandi rispettivamente 40 e 80, che si attivano tanto da crescere, per così dire, del 2% diventeranno pari a 40,8 e 81,6, se del 4% diventeranno pari a 41,6 e 83,2. Le medie saranno rispettivamente 61,2 e 62,4 e le deviazioni standard 28,85 nel primo caso e 29,42 nel secondo. Ovviamente, non tutti i nuclei in un'area marcata si attivano contemporaneamente con la stessa intensità, soprattutto nelle condizioni più marcate, in cui troviamo cellule da molto a poco intensamente attivate. Inoltre, in una condizione di marcata attivazione, la riduzione del coefficiente R^2 , quindi della correlazione tra area e intensità, potrebbe implicare un maggiore errore percentuale del sistema di rilevazione dell'Ag, forse dovuto a fattori sterici.

Bisogna tuttavia considerare anche un altro fattore. Abbiamo visto come il centro di ogni nucleo risulti più scuro delle porzioni periferiche. Questo è agevolmente interpretabile considerando che noi proiettiamo su una rappresentazione grafica bidimensionale un maggior numero di strati colorati a livello della porzione centrale del nucleo che a livello dei bordi. Per lo stesso principio di sovrapposizione di più strati, a parità di densità di proteina all'interno del nucleo, un nucleo più grande, quindi di maggiore spessore, apparirebbe più scuro di uno più piccolo. Che cosa significhi poi da un punto di vista biologico tutto questo, a partire dal fatto che i nuclei possano avere dimensioni così variabili, è un terreno ancora tutto da esplorare.

Considerazioni sui risultati delle analisi dell'area e dell'intensità degli nuclei positivi

Mentre il profilo di distribuzione dei dati di intensità tendeva sempre a decorrere parallelamente rispetto a quello dei dati relativi al parametro area, lo stesso non avveniva in relazione ai risultati del conteggio del numero dei nuclei positivi (Figure 31 e 32). Questo era particolarmente vero a livello del MnPO. Prendiamo in considerazione alcuni esempi. Nel rMnPO, la condizione E4 mostrava un conteggio dei nuclei marcati significativamente inferiore a tutti gli altri trattati e non diverso dai controlli; l'intensità media delle cellule che si

attivavano risultava però significativamente più elevata rispetto ai valori di controllo, ad indicare che l'attivazione in risposta alla condizione di esposizione era progressiva in termini di cellule reclutate, ma le cellule che rispondevano tendevano a rispondere subito in maniera massimale. A livello del VLPOcor la condizione C24, che mostrava una tendenza, sebbene non significativa, ad attivare un minor numero di cellule della condizione C4, risultava però significativamente più intensa, in media, rispetto ad essa. Nel VLPOmed, d'altro canto, le esposizioni prolungate reclutavano un minor numero di cellule dei recuperi, ma non meno intensamente.

Ritorniamo su questi dati più oltre nel corso della discussione (si veda il paragrafo *La relazione tra l'immunoreattività per il c-Fos e l'accumulazione di cAMP*). Per ora, ci limitiamo ad evidenziare che la rilevazione in alcune condizioni di una dissociazione tra il conteggio e la valutazione media di intensità dei nuclei marcati può suggerire l'eventuale interesse per un futuro di una suddivisione del conteggio per classi di intensità.

Al momento, data la nostra ancora scarsa padronanza del concetto di intensità di attivazione e del suo significato biologico (si veda paragrafo *Correlazione tra i parametri area e intensità media degli oggetti sopra soglia*), affronteremo la discussione prendendo in considerazione esclusivamente il dato del conteggio numerico.

Interpretazione funzionale dei dati sperimentali

Abbiamo utilizzato un modello fisiologico complesso con il fine primario di acquisire dati relativi alle strutture che regolano i meccanismi alla base del ciclo veglia-sonno. Questo implica il coinvolgimento di vari aspetti delle regolazioni fisiologiche e rende al contempo particolarmente articolata l'interpretazione dei dati, che non può non tenere in considerazione la complessità del modello biologico impiegato e la molteplicità delle variabili in gioco. La lettura dei dati non può prescindere cioè da un ragionamento fisiologico complesso che tenga in conto del fatto che più sistemi di regolazione sono al contempo coinvolti.

Si cercherà ove possibile di scindere i contributi relativi ai diversi sistemi implicati in modo da enucleare e mettere in luce gli aspetti più primariamente legati al ciclo veglia-sonno, ma bisogna considerare che le interazioni e le integrazioni tra sistemi di regolazione fisiologica renderanno quest'opera tutt'altro che facile. L'organismo può presentare un modo di funzionare complesso relativo ad una data situazione ambientale, senza che i singoli contributi siano necessariamente separabili. Peraltro, una medesima struttura può essere implicata in più funzioni: si tratta di sottopopolazioni cellulari diverse, anche in agglomerati relativamente confinati nello spazio, oppure sono le stesse cellule che partecipano a processi regolatori che noi classifichiamo come distinti (per esempio termoregolazione e controllo dell'omeostasi ipnica, osmoregolazione e termoregolazione), ma condividono aspetti di cui quelle cellule esprimono il significato?

Analisi della citoarchitettura e delle connessioni del VLPO

Sebbene difficile da demarcare esclusivamente su basi citoarchitettiche, il VLPO può essere distinto su sezioni coronali colorate con la metodica di Nissl, come un piccolo raggruppamento cellulare, di forma grossolanamente triangolare, con la base che si estende per 100-300 μm lungo la superficie ventrale dell'area

preottica, lateralmente al chiasma ottico e subito medialmente alla banda diagonale di Broca, e con simile estensione dorsale. I neuroni che lo compongono sono addensati lungo il bordo mediale del ramo orizzontale del nucleo della banda diagonale, da cui sono spesso separati da un piccolo vaso sanguigno penetrante. Il VLPO è più pronunciato nella metà caudale dell'area preottica e si pone dorsolateralmente rispetto al SO. Si estende caudalmente approssimativamente fino al polo rostrale del SCh, rispetto al quale si trova in posizione di circa 1 mm più laterale.

Il VLPO è stato inizialmente definito attraverso uno studio di marcatura retrograda dal TM, che aveva mostrato un raggruppamento distinto di neuroni marcati nell'ambito dell'area preottica laterale, circa la metà dei quali esprimevano la proteina c-Fos durante il sonno, ma non durante la veglia.

Può essere più facilmente delineato grazie alla sua immunoreattività per galanina in animali pretrattati con colchicina. Più dell'80% dei neuroni del VLPO che esprimono c-Fos durante il sonno, infatti, sono stati dimostrati essere galaninergici e circa il 50% dei neuroni galaninergici in quest'area esprimono c-Fos durante il sonno. La distribuzione della galanina rivela la presenza di due sottoregioni, il core e l'estensione del VLPO. Entrambi questi sottogruppi esprimono la proteina Fos durante il sonno e proiettano al TM, ad indicare che le due regioni sono correlate funzionalmente, anatomicamente e chimicamente. Il core del VLPO contiene la più elevata densità di neuroni attivi in sonno, mentre i neuroni galaninergici dell'estensione nucleare sono diffusamente sparsi fino a 400 μm dorsalmente e medialmente al core. Tali cellule risultano frammiste a numerosi neuroni non galaninergici che potrebbero non essere attivi durante il sonno. I neuroni dell'estensione del VLPO non possono essere distinti mediante colorazione di Nissl (Sherin et al., 1996; Sherin et al., 1998; Chou et al., 2002).

E' stata inoltre dimostrata la co-localizzazione di GABA e galanina in questo raggruppamento neuronale. Virtualmente tutti i neuroni galaninergici del VLPO erano anche positivi per la decarbossilasi dell'acido glutammico o GAD (Sherin et al., 1998). Il numero di neuroni GABAergici esprimenti c-Fos è

risultato correlato al tempo totale trascorso in sonno nelle 2 h precedenti il sacrificio (Gaus et al., 2002; Gong et al., 2004).

D'altra parte, la stessa capacità peculiare di esprimere c-Fos dopo periodi di sonno è stata considerata da vari autori in sé sufficiente ad identificare in maniera specifica il raggruppamento del core del VLPO in assenza di marcatura per la galanina (Sherin et al., 1998; Wagner et al., 2000; Uschakov et al., 2006).

Le proiezioni afferenti ed efferenti del VLPO sono state finemente dettagliate.

Iniettando destrano biotinilato (un tracciante anterogrado) a livello del core, è stato possibile seguirne le fibre di proiezione, che si allontanavano dal sito di iniezione attraverso tre vie: mediale (periventricolare), dorsale (stria midollare) e laterale (fascicolo prosencefalico mediale). Proiezioni controlaterali minori attraversavano la linea mediana a livello della commessura sopraottica ventrale per assicurare una simile distribuzione all'altro lato dell'encefalo. Fibre ascendenti al telencefalo si ramificavano attraverso il prosencefalo basale e il complesso nucleare del setto e della banda diagonale. Fibre locali e ascendenti nel contesto del diencefalo infiltravano numerose strutture preottiche, in particolare l'area preottica ventromediale e il MnPO, mentre molto rade erano le proiezioni al Sch. Fibre discendenti (che costituivano il contingente di fibre più consistente in seguito a iniezione del tracciante nel core del VLPO), attraversavano l'ipotalamo lungo il fascicolo prosencefalico mediale e raggiungevano numerosi nuclei dell'ipotalamo anteriore, laterale e posteriore. L'innervazione ipotalamica risultava particolarmente pronunciata a livello dell'area perifornicale, dell'area ipotalamica tuberale laterale (TuLH), del Pa parvicellulare, della regione sopramammillare e di tutte le divisioni del TM, situato nell'ipotalamo caudolaterale. Particolarmente impressionante risultava un denso plesso di fibre e terminali che "ingolfava" il core magnocellulare del nucleo tuberomammillare ventrale (VTM). Si riscontrava una innervazione densa anche a livello dei nuclei laterali dell'abenula, mentre più esigua in corrispondenza dei nuclei intralaminari e della mediolinea talamica. Alcune fibre si spingevano poi più caudalmente nel tronco dell'encefalo,

attraverso il fascicolo prosencefalico mediale e la via periventricolare, assicurando proiezioni all'area tegmentale ventrale e alla substantia nigra, così come alle porzioni ventrale e ventrolaterale della sostanza grigia periacqueduttale mesencefalo-pontina. Fibre marcate raggiungevano ognuno dei nuclei del rafe del tronco dell'encefalo rostrale e terminavano con particolare densità a livello delle divisioni dorsale, mediana e della linea centrale. Inoltre, erano innervati il nucleo laterale parabrachiale e i nuclei tegmentali peduncolopontino e laterodorsale, oltre al core del LC, in cui erano evidenti molti bottoni terminali. Fibre marcate raggiungevano i nuclei del rafe bulbare ed anche la formazione reticolare bulbare ventromediale e ventrolaterale, mentre non si riscontravano assoni marcati a livello spinale (Sherin et al., 1998).

Laddove il sito di iniezione era posizionato nell'area preottica laterale, dorsale al core, le fibre marcate discendevano in forma più diffusa attraverso l'ipotalamo posterolaterale, fornendo un input meno specifico, che includeva, a livello TM, anche strutture immediatamente adiacenti alla regione densa di cellule del core. Assoni marcati si tracciavano anche nel tronco dell'encefalo attraverso i sistemi di fibre periventricolare e tegmentale ventrale e alcune fibre si ritrovavano nei nuclei del rafe, nei nuclei tegmentali peduncolopontino e laterodorsale e a livello del LC, con sparse terminazioni assonali (Sherin et al., 1998).

Attraverso studi di doppia marcatura, è stato possibile verificare inoltre che a livello del nucleo della banda diagonale, così come a livello dei nuclei tegmentali peduncolopontino e laterodorsale, chiare apposizioni tra fibre marcate e cellule ChAT-ir (immunoreattive per colinacetiltransferasi e quindi colinergiche) erano molto rare, sebbene fibre marcate erano identificabili in stretta prossimità di soma e dendriti di cellule colinergiche. Simili pattern erano osservabili in corrispondenza dei neuroni MCH-ir (immunoreattivi per l'ormone concentrante la melanina) nella TuLH. A livello ipotalamico caudale, invece, numerose apposizioni erano osservabili tra fibre marcate e soma e dendriti di neuroni TM identificati tramite marcatura per l'adenosina deaminasi (selettiva per i neuroni istaminergici). Tale fenomeno era particolarmente eclatante a livello del core del VTM e confermato da osservazioni in microscopia elettronica. A livello

troncoencefalico, le relazioni delle fibre marcate con tipi cellulari specifici erano generalmente meno chiare che nel TM, sebbene fossero visibili alcune apposizioni con cellule TH-ir (immunoreattive per tirosina idrossilasi e quindi monoaminergiche) dell'area tegmentale ventrale dopaminergica, spesso presenti bottoni sinaptici in apposizione ai corpi cellulari e ai dendriti di grosso calibro delle cellule 5HT-ir (serotoninergiche) nei nuclei del rafe dorsale (DR) e mediano e fibre marcate, inoltre, fossero presenti a livello del LC noradrenergico fra corpi cellulari TH-ir vicini e prendessero rapporto con grossi dendriti immunoreattivi (Sherin et al., 1998).

Mediante l'uso di traccianti retrogradi, iniettati a livello del TM, unica fonte di innervazione istaminergica del SNC nei mammiferi (numerose evidenze sperimentali depongono a favore di un ruolo importante giocato dall'attività istaminergica nel mantenere la vigilanza), si è potuto confermare lo stretto rapporto tra VLPO e TM, suggerendo un'organizzazione topografica delle proiezioni. Il core del VLPO costituiva la principale fonte di afferenze al core cellulare denso del VTM e, in particolare, la quantità di marcatura retrograda nel core del VLPO corrispondeva in maniera consistente al grado di interessamento del core del VTM nell'iniezione del tracciante, nei casi in cui il sito di iniezione comprendeva anche zone adiacenti. Input addizionali erano principalmente rivolti a TM mediale e dorsale a partire dalla MPA e al VTM dalla LPO dorsale (Sherin et al., 1998).

Tutta questa serie di osservazioni dimostra come il VLPO costituisca, per i sistemi ascendenti di vigilanza, una importante fonte di afferenze, di tipo inibitorio, considerato che, ad esempio, il 70-80% dei neuroni di proiezione al core del VTM sono GABA-galaninergici. Tale nucleo appare quindi collocato in una posizione strategica per iperpolarizzare simultaneamente le componenti monoaminergiche del sistema attivante ascendente (Sherin et al., 1998).

D'altra parte, le afferenze più cospicue che il VLPO riceve sono intraipotalamiche. In seguito ad iniezione di tossina colerica (subunità beta, CTB), localizzata a livello del core nucleare, all'area ipotalamica laterale corrispondeva il

18% dei neuroni marcati in via retrograda, il più elevato contingente osservato; tali cellule erano collocate soprattutto nelle regioni poste dorsomedialmente e ventrolateralmente rispetto al fornice e subito caudalmente al VLPO stesso. I neuroni marcati a livello del MnPO e del DM rappresentavano rispettivamente il 9 e 12% delle cellule ipsilaterali marcate, che si mostravano particolarmente fitte, corrispondendo a circa un quinto del totale delle cellule di tali nuclei, il cui profilo era reso visibile con una colorazione Nissl di contrasto. In particolare, nel MnPO, i neuroni marcati con CTB erano fortemente rappresentati in ogni parte del nucleo, mentre nel DM si disponevano principalmente a livello delle porzioni caudali e laterali ventralmente alla *pars compacta* e tendevano ad evitare tale sottoregione. Dalla combinazione dell'uso di un tracciante anterogrado iniettato a livello di MnPO o DM con l'immunoreazione per la galanina, si è potuto anche osservare come assoni e bottoni sinaptici a partire da questi due nuclei prendano contatto con neuroni galaninergici a livello sia del core sia dell'estensione nucleare (Chou et al., 2002).

Un numero moderato di neuroni marcati era osservabile a livello di nucleo preottico mediale (MPO), area ipotalamica anteriore (AH), zona subparaventricolare (SPa), nucleo ipotalamico ventromediale (VMH), area ipotalamica dorsale (DA) e nucleo sopramammillare (SuM). Ognuna di tali strutture rendeva conto del 1,5-3% dei neuroni ipsilaterali marcati dal tracciante. Solo poche cellule erano rilevabili a livello di nucleo arcuato (Arc), organo subfornicale (SFO) e SCh dorsomediale, che contenevano meno del 1,5% del totale di neuroni marcati. L'iniezione di tracciante anterogrado a livello di MPO, Sch, SPa, VMH e SuM, oltre che nell'amigdala mediale, ha rivelato tuttavia che la maggior parte di tali fibre si ferma appena fuori dal core e solo pochissime sono rilevabili al suo interno (Chou et al., 2002). Sono tuttavia documentate afferenze indirette dal SCh, attraverso la MPA rostrale, il DM caudale e in maniera più esigua dalla SPa, tutte strutture note come siti principali di proiezione da parte del SCh (Deurveilher e Semba, 2003).

Un numero moderato di neuroni marcati per via retrograda era, infine, presente immediatamente dorsalmente e medialmente al sito di iniezione: poiché,

tuttavia, tali cellule potrebbero essere state marcate dalla captazione dendritica del tracciante, è difficile determinare la loro reale connessione con il core nucleare. L'ipotalamo contiene molteplici gruppi cellulari TH-ir (immunoreattivi per la tirosina idrossilasi, l'enzima che controlla la velocità della sintesi delle monoamine), presumibilmente dopaminergici, i quali però non erano mai marcati per via retrograda con CTB, neanche a livello dei gruppi dopaminergici A11 e A13 dell'ipotalamo dorsale, dove neuroni marcati con CTB occasionalmente si trovavano frammisti a neuroni TH-ir. Gli unici pochi neuroni che presentavano doppia marcatura per TH erano proprio quelli situati subito medialmente al sito di iniezione, che tuttavia potrebbero essere stati marcati aspecificamente per captazione dendritica del tracciante. A livello della LH, solo pochi neuroni (4%) evidenziati per via retrograda erano oressinergici, mentre una percentuale più ampia (21%) risultava MCH-ir. Molti di essi non sono stati tuttavia identificati sul piano neurochimico (Chou et al., 2002).

A livello telencefalico, il V strato della corteccia infralimbica, il LS e il subicolo (S) ventrale spiegavano circa il 5, 15 e 6%, rispettivamente, dei neuroni ipsilaterali evidenziati dal tracciante. Anche gli strati profondi della regione dorsale della tenia tecta, subito ventralmente alla corteccia infralimbica, contenevano neuroni marcati. Sono stati evidenziati da pochi a moderati neuroni di proiezione (2-3%) a livello del nucleo mediale dell'amigdala, del claustrum e della corteccia insulare e peririnale, mentre non erano mai presenti a livello di striato, ippocampo o regioni neocorticali e molto rari nei nuclei colinergici della banda diagonale e mediale del setto, in cui i pochi neuroni evidenziati non avevano comunque la morfologia magnocellulare tipica dei neuroni colinergici.

Un piccolo numero di neuroni veniva evidenziato per via retrograda a livello talamico ed epitalamico, in PVA, Re, LHb e IGL.

Un denso raggruppamento di neuroni marcati dalla CTB era presente nella divisione centrale laterale del PBP e qualcuno era visibile anche nelle divisioni dorsolaterale e laterale esterna. Un modesto quantitativo di neuroni marcati per via retrograda era presente a livello del nucleo dorsale del rafe, soprattutto nelle parti laterali, dove molti di essi erano 5HT-ir, mentre un numero minore era

visibile nei nuclei del rafe della linea centrale e mediano e nel nucleo del rafe magno; in quest'ultimo non vi era mai doppia marcatura per la serotonina. Erano invece assenti nelle sottoregioni più caudali, quali il rafe pallido o oscuro. In ogni caso, benché tali neuroni non fossero raggruppati ad un particolare livello del tronco dell'encefalo, ma dispersi lungo l'estensione rostrocaudale dei nuclei coinvolti, il loro numero complessivo approssimava quello dei neuroni evidenziati nel TM, dove un più distinto raggruppamento cellulare proiettava al VLPO. La doppia marcatura per ADA (adenosina deaminasi) rivelava che molti di tali neuroni, trovati in tutte le sottoregioni nucleari, comprese la ventrolaterale, rostrale, mediale e caudale, erano istaminergici. Pochi neuroni marcati per via retrograda si ritrovavano a livello ventrolaterale nel bulbo, in aree che si sovrapponevano ai campi C1 e A1, rispettivamente adrenergico e noradrenergico, nonché nel grigio periacqueduttale (PAG) ventrolaterale, nel LC e nel Sol, il cui rispettivo contributo era inferiore al 1% del totale ipsilaterale. Molti dei neuroni marcati dalla CTB nel LC, nel bulbo ventrolaterale (sia C1 sia A1) e nel Sol erano TH-ir, mentre una minoranza di essi mancava della doppia marcatura per TH in Sol e bulbo ventrolaterale. Estremamente rari i neuroni evidenziati nella VTA (area dopaminergica) e nei campi centrali del tegmento. A sottolineare la scarsissima innervazione dopaminergica del VLPO, non è stata evidenziata nessuna proiezione dalla substantia nigra (Chou et al., 2002).

Anche l'innervazione colinergica risultava rara o inesistente. Anche in seguito ad iniezioni ampie in corrispondenza del VLPO, non si evidenziavano cellule colinergiche marcate per via retrograda in nessuna area cerebrale, neanche a livello di MS, DB, sostanza innominata (SI) e regioni troncoencefaliche quali LDTg o PPTg. Il core del VLPO risultava invece densamente innervato da fibre immunoreattive per marcatori di assoni istaminergici, noradrenergici e serotoninergici, mentre la densità di fibre e bottoni sinaptici oressinergici risultava scarsa o moderata, vi erano solo sparse fibre ChAT-ir e virtualmente nessuna DAT-ir (immunoreattiva per il trasportatore della dopamina) (Chou et al., 2002).

Se il sito di iniezione del tracciante era immediatamente dorsale o mediale al core, con probabile coinvolgimento di neuroni dell'estensione nucleare, il pattern di cellule marcate per via retrograda risultava pressoché identico. L'estensione nucleare, come abbiamo visto, contiene numerosi neuroni galaninergici, attivi in sonno, che potrebbero essere chimicamente e funzionalmente simili a quelli del core. Poiché, tuttavia, tali neuroni non costituiscono un fitto raggruppamento, come nel core, ma sono sparsi tra altre popolazioni neuronali, non galaninergiche, sono necessari ulteriori studi con traccianti anterogradi in siti specifici per determinare l'effettiva condivisione di afferenze di tali neuroni con quelli del core (Chou et al., 2002).

Analisi della citoarchitettura e delle connessioni del MnPO

Il MnPO è definito da Thompson e Swanson come un gruppo cellulare sottile, orientato verticalmente, che si estende lungo la linea mediana all'estremità rostrale dell'ipotalamo, in corrispondenza di ciò che rimane della struttura embrionale della lamina terminale. Andrebbe, in sostanza, a formare il polo rostrale dell'ipotalamo, estendendosi dorsalmente dal recesso preottico del terzo ventricolo a circondare la faccia rostrale della ac e terminare in corrispondenza del forame interventricolare (sormontato dal nucleo triangolare del setto). L'organo vascolare della lamina terminale, una regione circumventricolare mancante di barriera ematoencefalica, risulta incastonato nella terminazione ventrale del MnPO (Thompson e Swanson, 2003). La chemoarchitettura del MnPO non è stata dettagliata, ma studi del gruppo di McGinty hanno rivelato anche in questo nucleo la presenza di una popolazione GABAergica attiva durante il sonno. Il numero di cellule GABAergiche c-Fos-ir risultava positivamente correlato con il tempo totale di sonno nelle due ore precedenti il sacrificio (Gong et al., 2004). La popolazione GABAergica del MnPO, indagato a livello caudale, è risultata inibita dalla deplezione acuta di acqua e sodio indotta mediante somministrazione di furosemide, mentre lo stesso stimolo produceva incrementata espressione di c-Fos in un'altra sottopopolazione nucleare, a fenotipo glutammatergico (Grob et al.,

2003). Il glutammato non è il solo neurotrasmettitore ad azione eccitatoria presente nel MnPO. Una popolazione di neuroni colinergici è stata dimostrata distribuita omogeneamente su tutta l'estensione nucleare, a partire dal cappuccio dorsale del VOLT fino alla porzione più caudale del vMnPO; nel dMnPO è stata localizzata solo qualche cellula sparsa. E' stato osservato che i neuroni colinergici del MnPO esprimono c-Fos in risposta ad uno stimolo ipertonico acuto (Xu et al., 2003). Inoltre, anche nel contesto del MnPO è stata riscontrata la presenza di cellule positive per il fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH), che si trovano diffuse a livello prosencefalico in numerosi aggregati cellulari, la cui proiezione su un piano disegna la forma di una V rovesciata dissecata dal terzo ventricolo (King et al, 1982). Come in altre sedi all'interno della POA, infine, anche a livello del MnPO caudale, ventrale e dorsale, la somministrazione di agonisti dei recettori GABAergici ha indotto una risposta termogenetica, di entità lieve, probabilmente mediante l'inibizione di neuroni che tonicamente sopprimono la termogenesi (Osaka, 2004).

Le proiezioni afferenti ed efferenti del MnPO non sono state mappate in maniera altrettanto sistematica e particolareggiata come nel caso del VLPO.

Lo studio più dettagliato delle efferenze di questo nucleo si riferisce ad una iniezione di PHAL (*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*) finemente localizzata a livello del MnPO caudale ventrale (Thompson e Swanson, 2003). Dal sito di iniezione, assoni marcati si dirigevano lateralmente a fornire un denso input all'intera MPA, rendendo difficile evidenziare specifici pattern di terminazione. Ciononostante, è stato possibile identificare siti specifici di terminazione, dei quali il primo degno di nota era rappresentato dallo stesso MnPO, attraversato da un denso plesso di fibre marcate lungo tutta la sua estensione, dal polo rostroventrale al polo caudodorsale, comprese quindi regioni in cui non erano presenti corpi neuronali marcati dall'iniezione. Al contrario, nonostante la densissima innervazione dell'area circostante, il VOLT riceveva solo scarse terminazioni, mentre molto dense erano le afferenze a SCh e PS e ad un altro raggruppamento cellulare, dagli autori definito nucleo preottico anteroventrale (AVP), che

corrisponderebbe in realtà alla porzione più rostrale del VLPO. L'ADP riceveva solo una scarsa innervazione, mentre AVPe e MPO erano quasi completamente evitati dalle fibre provenienti dal MnPO.

Una componente separata di fibre, invece, lasciava il nucleo dorsalmente e ascendeva lungo la linea mediana, generando numerose varicosità e bottoni sinaptici di passaggio, nonostante la morfologia non ramificata, fino a raggiungere lo SFO, dove generavano un modesto campo terminale.

Caudalmente alla regione preottica, gruppi distinti di fibre potevano essere chiaramente identificati a livello delle vie propioipotalamiche periventricolare, laterale e ventrale.

Attraverso la via periventricolare, esse generavano densi campi terminali in tutte le strutture intimamente connesse con il 3V: nucleo periventricolare (Pe) anteriore, regione perisoprachiasmatica (dorsale e mediale, ma non laterale), Pa, DM (soprattutto nella sua porzione anteriore, più scarsamente alle divisioni ventrale e posteriore), regione indifferenziata dorsale ai nuclei mediali e polo rostrale del nucleo ipotalamico posteriore (PH); facevano eccezione Arc, Pe intermedio e posteriore, TM dorsale e ventrale, che ricevevano solo un input moderato. Solo pochi assoni erano osservabili all'interno del SCh, nella regione dorsomediale.

All'interno del Pa, la distribuzione, benché ubiquitaria, non era tuttavia omogenea. Il MnPO generava un campo terminale densissimo nella porzione parvicellulare anteriore, soprattutto in prossimità del polo rostrale. A questo livello, le fibre marcate si concentravano dorsalmente, evitando ampiamente i neuroni magnocellulari. Nella porzione caudale più rostrale, erano osservabili dense terminazioni, oltre che nella componente parvicellulare dorsale, anche nelle porzioni ventrale, forniceale, laterale e periventricolare, mentre erano meno dense nella divisione mediale. Il MnPO proiettava anche alla componente magnocellulare del Pa, generando un denso input alle divisioni mediale, rostrale e ventrale della regione laterale, mentre le regioni magnocellulari anteriore e laterale dorsale ricevevano solo un modesto input.

Infine, alla estremità caudale della via periventricolare, era difficile discernere se i pochi assoni rimanenti terminavano nella capsula intorno ai nuclei mammillari o continuavano nel mesencefalo per unirsi alla via troncoencefalica ventrale.

Il fascicolo prosencefalico mediale (via proprioipotalamica laterale), invece, in linea generale, non dava luogo a proiezioni specifiche, ma contribuiva alla generazione di campi terminali a livello di Pa (porzioni parvicellulari laterale e fornicaie) e PH. La maggioranza di tali assoni aveva l'aspetto di fibre di passaggio, che occasionalmente generavano bottoni sinaptici a livello di LPO e LH. Un sito di proiezione abbastanza specifico era invece costituito dalla zona laterale della componente magnocellulare posteriore del Pa e dalla regione laterale perifornica a questo livello. Caudalmente al Pa parvicellulare fornicaie, il fascicolo prosencefalico mediale si divideva in una componente dorsale, che forniva una circoscritta innervazione alla regione perifornica dorsale compresa tra la divisione fornicaie del Pa e il polo rostrale del DM e terminava a livello del PH (innervando una porzione più laterale e dorsale rispetto alla via periventricolare), e una componente ventrale, che procedeva, senza generare specifiche terminazioni, fino alla estremità caudale dell'area ipotalamica laterale, dove passava nella VTA per unirsi alla via troncoencefalica ventrale.

Quasi tutte le proiezioni dal MnPO che viaggiavano lungo la via proprioipotalamica ventrale erano discendenti. Esse fornivano un importante input ai nuclei SCh e SO e un'innervazione minore al nucleo ipotalamico anteriore, alla RCh e alla TuLH; d'altronde numerose di tali fibre generavano frequenti bottoni sinaptici di passaggio e occasionali brevi ramificazioni con bottoni terminali, indicando che il MnPO forniva almeno una lieve innervazione a regioni situate lungo la superficie ventrale dell'ipotalamo. Caudalmente al Pa, la maggior parte delle fibre della via ventrale si congiungeva lateralmente al fascicolo prosencefalico mediale. Solo pochi assoni rimanevano in prossimità della superficie ventrale dell'ipotalamo e fornivano una lieve innervazione alla regione sita ventralmente ai nuclei mediali e nel VTM, per poi terminare nella capsula intorno ai nuclei mammillari (Thompson e Swanson, 2003). Le fibre che dal

MnPO raggiungevano il SO sono state dimostrate essere di natura colinergica (Xu et al., 2003).

In generale, le proiezioni extraipotalamiche del MnPO risultavano sostanzialmente meno ricche, nonostante numerose fibre raggiungessero comunque varie strutture nel telencefalo, nel talamo e nel tronco dell'encefalo.

Le proiezioni telencefaliche erano nel complesso rare, poco ramificate e con scarsi bottoni terminali. Piccoli gruppi di fibre erano tuttavia osservabili a livello del nucleo laterale del setto (LS), di numerose suddivisioni del BST, della SI e dell'amigdala (porzione mediale del nucleo centrale e anterodorsale del nucleo mediale).

Le proiezioni talamiche erano modeste e limitate ai nuclei PVA e Re, mentre alle regioni mediali della zona incerta (ZI) rostrale giungevano assoni che avevano l'aspetto di fibre di passaggio.

Sebbene fibre discendenti al tronco dell'encefalo fossero nel complesso molto inferiori rispetto a quelle destinate a strutture intraipotalamiche, originavano dal MnPO assoni per entrambe le vie troncoencefaliche, dorsale e ventrale, che generavano una modesta innervazione a livello mesencefalico e pontino.

La via troncoencefalica dorsale forniva un'innervazione al grigio periacqueduttale che, benché modesta, era distribuita lungo tutta l'estensione rostrocaudale dello stesso; raggiungeva inoltre il rafe dorsale e una regione limitata dei nuclei reticolari mesencefalici. Tali fibre, superata la giunzione mesencefalo-pontina, terminavano a livello del PBP (limitatamente alla porzione centrolaterale) e del CG pontino.

Le componenti mediale e laterale della via troncoencefalica ventrale generavano occasionali varicosità e bottoni sinaptici di passaggio a livello rispettivamente dei nuclei del rafe interfascicolare e lineare rostrale e delle regioni mediali della VTA, per poi congiungersi sulla linea mediana ed innervare i nuclei del rafe lineare centrale e centrale superiore, oltre al nucleo del rafe dorsale ed infine al nucleo centrale superiore del rafe (nella sua porzione mediale).

La distribuzione delle fibre delineata presenta qualche differenza rispetto a quella osservata in un altro lavoro, dove la iniezione di PHAL era avvenuta ad un livello un po' più rostroventrale, suggerendo una possibile organizzazione topografica delle proiezioni del MnPO. In vari studi, sono state descritte proiezioni marcate per via anterograda mediante PHAL o retrograda con varie sostanze. Esse includono proiezioni relativamente dense a SFO, PH, VTM e SuM; relativamente moderate al Pa parvicellulare e al SO, al DM e al grigio periacqueduttale; relativamente esigue, infine, a rafe dorsale, LC, nucleo di Barrington e PBP (Thompson e Swanson, 2003).

In conclusione, le proiezioni del MnPO sono prevalentemente inraipotalamiche e terminano principalmente a livello di POA, Pa e SO, DM, PH. Al contrario, proiezioni al di fuori dell'ipotalamo sono considerevolmente meno dense, sebbene vi siano numerose vie che raggiungono una varietà di strutture telencefaliche, talamiche e troncoencefaliche (Thompson e Swanson, 2003). In particolare, il MnPO proietta a numerose regioni prosencefaliche e troncoencefaliche implicate nella regolazione dello stato di vigilanza, inclusi gruppi cellulari monoaminergici del tronco dell'encefalo, quali rafe dorsale e LC (Zardetto-Smith e Johnson, 1995) e neuroni colinergici e ipocretinergici nel prosencefalo (Deurveilher e Semba, 2003). La maggior parte dei neuroni dell'area ipotalamica laterale perifornicale (PF/LH), attivi in veglia, riceve afferenze inibitorie dal MnPO. Molto probabilmente, la sorgente di queste afferenze è costituita dalla popolazione GABAergica attiva nel sonno del MnPO. Esisterebbe anche un meccanismo complementare, dato dall'eccitazione di cellule PF/LH attive nel sonno, che a loro volta potrebbero inibire neuroni attivi in veglia a livello di PF/LH o di altre regioni che promuovono la veglia (Suntsova et al., 2007).

Come il VLPO, quindi, anche il MnPO potrebbe agire promovendo il sonno attraverso la modulazione inibitoria di numerosi sistemi di vigilanza (Uschakov et al., 2006).

A sua volta, il MnPO riceve proiezioni da SFO, VOLT e strutture integrative cardiovascolari del tronco dell'encefalo, le stesse che proiettano anche a SO, Pa e LPO/LH (Travis e Johnson 1993) e inoltre dal nucleo magnocellulare della stria terminale, presumibilmente parte di una differenziazione corticostriatopallidale, che modula e coordina le funzioni pelviche con il mantenimento dell'omeostasi dei nutrienti e dei fluidi corporei (Dong e Swanson, 2006b). L'input massivo dallo SFO, associato ad una varietà di altre evidenze, ne implica la partecipazione al circuito che regola l'omeostasi dei fluidi corporei (Zardetto-Smith et al., 1993). Anche il nucleo dorsomediale della stria terminale, fonte del più denso input diretto al sistema neuroendocrino rispetto a qualsiasi altra struttura cerebrale, invia fibre al MnPO (Dong e Swanson, 2006a).

Sono documentate afferenze da cellule del nucleo arcuato (Arc) che coesprimono dinorfina e neurochinina B, neuroni già noti come implicati nella regolazione del comportamento riproduttivo (Burke et al., 2006). L'iniezione del tracciante retrogrado Fluorogold in corrispondenza del MnPO, scelto in base al suo contenuto in neuroni GnRH-ir, e precisamente a livello rostrale, ha evidenziato la presenza di neuroni esprimenti mRNA per CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*), marcati per via retrograda a livello di Arc, nucleo ventromediale (VMH) e nucleo premammillare ventrale (PMV) (Rondini et al., 2004). Sebbene sia possibile, che quest'ultima struttura si sia marcata per diffusione del tracciante in zone immediatamente adiacenti, essendovi uno studio che documenta come l'iniezione di PHAL nel PMV, che marca fibre dirette a molte regioni dell'ipotalamo periventricolare, fa eccezione per alcune importanti strutture, tra cui appunto il MnPO (Canteras et al., 1992), in uno studio successivo verrebbe confermata, tuttavia, un'estesa marcatura retrograda, per iniezione di CTB nel MnPO, del PMV ed inoltre di nucleo ipotalamico ventromediale (VMH) e nuclei mediali dell'amigdala (Chou et al., 2002).

Giungono al MnPO anche fibre di neuroni dinorfinergici della divisione dorsolaterale del PBP, che esprimono FLI in risposta a stimoli nocicettivi; tale formazione costituisce il principale destinatario delle informazioni nocicettive ascendenti dal midollo spinale (Hermanson et al., 1998).

Sono testimoniate afferenze dalla zona incerta mediale, contenente neuroni dopaminergici A13 (Wagner et al., 1995), nonché dalla cosiddetta "grooming area", costituita da porzioni del Pa e dell'area ipotalamica dorsale (Roeling et al., 1993).

Come il VLPO, riceve inoltre afferenze indirette dal SCh, attraverso la MPA rostrale, piuttosto che intermedia e caudale, il DM caudale e, in maniera considerevolmente più marcata rispetto al VLPO, dalla SPa mediale, ma non laterale, unitamente al nucleo periventricolare (Pe) anteriore. Queste vie potrebbero essere coinvolte nella regolazione circadiana oltre che del ciclo veglia-sonno, anche del sistema cardiovascolare e della temperatura, funzioni autonome che mostrano anch'esse ritmi circadiani (Deurveilher e Semba, 2003).

Ricordiamo, infine, che MnPO e VLPO sono reciprocamente interconnessi (Sherin et al., 1998; Chou et al., 2002).

Influenze del ciclo circadiano

L'espressione di c-Fos nel ratto a livello sia del MnPO sia del VLPO ha mostrato variazioni circadiane, con un maggior numero di neuroni c-Fos-ir nel periodo di luce (ZT8) che nel periodo di buio (ZT20) (Peterfi et al., 2004). Il numero di neuroni c-Fos-ir a livello del VLPO, misurato in un'area di 200 x 200 μm^2 , corrispondente al core, è risultato significativamente più elevato a ZT5 e ZT12.5 rispetto a ZT1 e ZT17, quindi verso la metà e appena dopo la fine del periodo di luce, quando gli animali sono in genere o sono appena stati inattivi e addormentati (Novak e Nunez, 1998).

L'espressione di c-Fos a livello del VLPO, in un'area di 190 x 190 μm^2 , di cui la metà della base corrispondeva superiormente al bordo laterale dello och, è apparsa influenzata dall'interazione tra due variabili: momento del ciclo circadiano e stato di sonno comportamentale (Schwartz e Smale, 2005). Tuttavia, la FLI misurata in un settore demarcato dalla base del cervello, con estensione dorsale pari a 300 μm e mediolaterale compresa tra 1 mm dalla mediolinea e il

marginale del tubercolo olfattorio, è apparsa correlata con il comportamento di sonno e non con la fase del ciclo circadiano (Sherin et al., 1996). Per inciso, oltre ad essere diversa la posizione anatomica della griglia (nel primo caso cadeva presumibilmente nell'estensione mediale del nucleo e non in corrispondenza del core), nel lavoro di Schwartz e Smale era utilizzata una specie diversa di ratti (*Arvicanthis niloticus* e non il ceppo Sprague-Dowley, albino, della specie *Rattus Norvegicus*). Un'ulteriore conferma della correlazione della FLI a livello del VLPO con il sonno, indipendentemente dalla fase del ciclo circadiano, è data dal suo significativo incremento durante il recupero in periodo di buio (ZT12-14), in seguito a 6 h di deprivazione, unita alla positiva correlazione anche in questa fase circadiana tra percentuale di neuroni c-Fos-ir e percentuale di tempo trascorsa in sonno nell'ora precedente il sacrificio (Greco et al., 2000).

Nel nostro esperimento, non si sono rilevate differenze significative nell'espressione di c-Fos tra ZT0 (C24) e ZT4,5 (C4) a livello di MnPO e VLPO, in nessuna divisione nucleare. Tuttavia, a livello del core del VLPO e, in maniera meno pronunciata, della sua estensione mediale, è stato registrato un trend verso una quantità maggiore di cellule marcate in C4 rispetto a C24, spiegabile con la nozione che a ZT0 il periodo di riposo è appena iniziato e gli animali stanno uscendo da una fase di attività, mentre a ZT4,5 esso è consolidato. Questa differenza non raggiunge mai comunque la significatività, motivo per cui abbiamo considerato i controlli come una popolazione unica ai fini statistici. In ogni caso, il dato che l'espressione di c-Fos a livello del core è espressione del sonno effettivamente dormito appare ormai consolidato in letteratura.

In conclusione, è possibile escludere l'influenza di fattori circadiani sui nostri dati.

Influenze del controllo della temperature corporea

Poiché lo strumento utilizzato per indurre la deprivazione di sonno in questo lavoro è rappresentato dall'esposizione a bassa Ta, diventa importante

separare i due aspetti al fine di ottenere una corretta analisi del peso dei due fattori sull'attivazione dell'espressione di c-Fos nelle condizioni sperimentali studiate. La principale difficoltà di questa operazione è costituita dallo stretto livello di integrazione tra termoregolazione e omeostasi ipnica. Inoltre, sebbene vi sia in letteratura più di una topografia dell'espressione di c-Fos a livello cerebrale in seguito ad esposizione a bassa Ta, la PO-AH, fondamentale centro di integrazione dei processi termoregolatori (Nagashima et al., 2000; Romanovsky, 2007), tende ad essere considerata nel suo insieme; oppure, nei casi in cui si parla più analiticamente di singoli nuclei preottici, non sono specificati i metodi di campionamento, rendendo difficile, soprattutto per il VLPO, considerato solo marginalmente dalla letteratura sull'argomento e solo negli studi più recenti, l'interpretazione dei dati esposti. Inoltre, nessuno ha mai indagato Ta al di sotto dei 4°C e i tempi di studio sono nella maggior parte dei casi limitati tra 2 e 4 h di esposizione.

I dati sulla responsività del MnPO al freddo, valutata mediante l'espressione di c-Fos, non sono unanimemente concordi, mentre sembra invece universalmente dimostrata la risposta del MnPO all'innalzamento della Ta (Scammell et al., 1993; McKittrik, 2000; Bratincsak e Palkovits, 2004; Yoshida et al., 2005). Dati *in vitro* indicano la presenza a livello del MnPO di una sottopopolazione di neuroni che risponde all'innalzamento della temperatura del mezzo di perfusione con un'aumentata frequenza di scarica e di un limitato numero di neuroni, in proporzione 1:10, che incrementa, invece, la propria frequenza di scarica all'abbassamento della stessa (Travis e Johnson, 1993).

In un esperimento volto ad identificare le aree cerebrali termosensibili, Scammell e collaboratori hanno esposto ratti Long-Evans a Ta calde (36-37°C), fredde (6-8°C) o termoneutrali (23-25°C) per 2 h. Gli animali venivano abituati alla rispettiva camera termoregolata nei 5 giorni precedenti l'esposizione, trascorrendo in essa brevi periodi (20 min), tali comunque da non permettere, secondo gli autori, un adattamento termoregolatorio. Negli animali esposti al caldo, il MnPO, nella sua intera estensione, rappresentava la parte più densamente marcata di tutto il diencefalo; la maggior parte della FLI della POA era

concentrata a livello della regione anteromediale, con marcatura scarsa o assente nelle aree posterolaterali; anche la LPO mostrava un incremento solo moderato dei neuroni c-Fos-ir. Negli animali esposti al freddo, invece, era visibile in tutte queste aree solo una lieve marcatura, che era virtualmente assente nei controlli (Scammell et al., 1993).

D'altra parte, in seguito ad esposizione per 3 h a 33°C o 10°C, ottenuta abbassando nel giro di 15 min la Ta della camera di stimolazione, alla quale gli animali (ratti Wistar) erano stati adattati da almeno 10 giorni, sono stati descritti numerosi neuroni c-Fos-ir a livello della POA in entrambe le esposizioni. Dall'iconografia del lavoro, si può osservare come sia la MPA sia la LPO siano coinvolte; inoltre, nella rappresentazione grafica, ottenuta riportando la distribuzione dei neuroni c-Fos-ir su immagini schematiche delle sezioni, appaiono interessati il cMnPO, in particolare il dMnPO e l'estensione, soprattutto mediale, del VLPO. Non è possibile distinguerne invece il core (Kiyohara et al., 1995).

Il primo riferimento esplicito ad una risposta del MnPO all'esposizione a bassa Ta coincide con la pubblicazione nel 2000 di un lavoro volto a delineare una fine mappatura delle aree cerebrali attivate dall'esposizione acuta al freddo utilizzando l'espressione di c-Fos come indice di attivazione neuronale. In questo studio, ratti Wistar-Kyoto venivano trasferiti in ambiente termoregolato a 4°C per 3 h (a partire da ZT2-ZT3). Gli autori hanno descritto un'intensa marcatura a livello della POA, in particolar modo della divisione laterale del MPO, della LPO e in numerose cellule periventricolari, identificate nella discussione come appartenenti al MnPO (Baffi e Palkovits, 2000).

In un altro lavoro contemporaneo al precedente, tuttavia, condotto su ratti Wistar anestetizzati con uretano, la MPA incrementava moderatamente la FLI in seguito a 10 min e a 60 min di esposizione a Ta elevata (47°C), ma solo debolmente dopo 60 min e non dopo 20 min di esposizione a bassa Ta (5°C). Un'area, comprendente MnPO, LPO e VLPO (dall'iconografia sembra che gli autori ne abbiano analizzato l'estensione mediale), rispondeva con un incremento

lieve e poi moderato della FLI all'esposizione per 10 min e 60 min a 47°C, mentre rimaneva ai livelli di controllo nelle esposizioni a 5°C (McKitrik, 2000).

La risposta del MnPO all'esposizione ad elevata ma non a bassa Ta appare confermata anche, in uno studio sul topo, da Bachtell e collaboratori, in un protocollo che prevedeva stimolazioni acute (90 min) o ripetute su 7 giorni (da 30 a 90 min) e in cui gli animali erano precedentemente abituati al trasferimento nell'ambiente di stimolazione. Il MnPO rispondeva con un significativo incremento della FLI alla stimolazione sia acuta sia ripetuta al caldo (34°C), ma non al freddo (10°C); MPA e LPO si mantenevano ai livelli di controllo in tutte le condizioni sperimentali, mentre il MPO incrementava il numero di neuroni marcati a 34°C in entrambi i protocolli, ma a 10°C si verificava una risposta solo al trattamento acuto, che andava incontro ad adattamento con il ripetersi delle esposizioni (Bachtell et al., 2003).

Contemporaneamente, tuttavia, in uno studio finalizzato alla definizione dei substrati anatomici del controllo centrale delle afferenze simpatiche al tessuto adiposo bruno interscapolare durante l'esposizione a bassa Ta, in ratti Sprague-Dawley posti a 4°C per 4 h, veniva descritto un aumento significativo del numero di neuroni esprimenti c-Fos a livello di LPO, MnPO e VLPO, rispetto ai controlli, trasferiti in identico ambiente a 21,5°C. Poiché la modalità con cui venivano delineate le aree di studio non viene esplicitata nel lavoro, non è possibile definire il tipo di coinvolgimento delle suddivisioni anatomo-funzionali di tali strutture, ma è difficile che in un lavoro di mappatura si siano concentrati sul core del VLPO (Cano et al., 2003).

Anche nel terzo dei lavori che presentano dati sulla risposta del VLPO, oltre che di numerose altre aree cerebrali, agli stimoli termici ambientali, non viene descritto nei metodi se non che il campionamento è avvenuto per delineazione dei contorni dei nuclei e delle aree analizzate. Dalla iconografia, però, è possibile identificare nell'area descritta come VLPO l'estensione nucleare mediale. Gli autori hanno esposto ratti Spague-Dawley a 37°C, 4°C o 23°C. Gli animali venivano ospitati in gabbie singole almeno 4 giorni prima del trasferimento nell'ambiente di stimolazione e manipolati quotidianamente al fine

di evitare che la procedura sperimentale in sé introducesse stimoli stressogeni. Dopo 2 h di esposizione, il numero di neuroni c-Fos-ir aumentava rispetto ai controlli nel VLPO, che rispondeva intensamente al caldo e moderatamente al freddo, nel MnPO, che invece rispondeva intensamente al freddo e moderatamente al caldo, oltre che a livello preottico laterale, con moderata risposta nelle due condizioni, ma non nella MPA. Si tratta peraltro dell'unico dato disponibile secondo cui il MnPO non solo risponde anche al freddo con un innalzamento della FLI, ma l'intensità dell'attivazione risulta addirittura maggiore che al caldo (Bratincsak e Palkovits, 2004).

L'attivazione del MnPO per entrambi gli stimoli termoregolatori viene confermata anche successivamente da Yoshida e collaboratori: in ratti crj-Wistar, adattati alle camere climatizzate per 7 giorni e quindi esposti a 33°C, 10°C o 26°C per 2,5 h (la Ta veniva variata nel giro di 10-20 min), è stata descritta FLI nel MnPO, con particolare densità a livello della ac, nella MPA e nel MPO, dopo esposizione ad elevata Ta, ma ancora nel MnPO e nella MPA e non in MPO e LPO, dopo esposizione a bassa Ta (Yoshida et al., 2005).

Da questa letteratura emerge come l'attivazione o meno del MnPO in risposta all'esposizione acuta a bassa Ta non dipenda del carico termico (è stata descritta sia la risposta dopo 2 h a 4°C e a 10°C, sia la non attivazione dopo 2 h a 6-8°C) e probabilmente neanche dall'anticorpo utilizzato, dato che sia in Scammell da una parte, sia in Kiyohara, Cano e Yoshida dall'altra, è specificato l'impiego di un Ac diretto contro i residui 4-17 della proteina Fos; sembra però correlato al modello animale e al disegno sperimentale. Infatti, degli studi in cui il MnPO non si attivava in risposta al freddo, uno prevedeva che l'animale venisse mantenuto sotto anestesia, l'altro impiegava il ceppo Long-Evans e infine il terzo era condotto sul topo. Non sappiamo, inoltre, se la procedura di abituare gli animali alla rispettiva camera termoregolata, tramite brevi permanenze nei 5 giorni precedenti l'esposizione, che secondo gli autori, non permettevano comunque un adattamento termoregolatorio, non abbia potuto influenzare il dato. Di sicuro, nelle stesse condizioni, gli animali rispondevano al caldo (Scammell et al., 1993).

I pochi dati sul VLPO sono invece concordi nell'affermare l'attivazione dell'espressione di c-Fos in risposta all'esposizione a bassa Ta, tranne che in animali anestetizzati. Bisogna però considerare che in questi lavori non si fa riferimento al core nucleare e che con ogni probabilità, quando gli autori parlano di VLPO, si riferiscono alla sua estensione, specialmente mediale.

L'unico dato presente in letteratura sull'esposizione cronica a bassa Ta è quello di Miyata e collaboratori, che hanno indagato l'attivazione cerebrale in ratti Wistar in risposta a 0 h (controlli), 3 h, 24 h e 14 giorni di esposizione a 10°C. Anche in questo lavoro, come nel nostro, è stato utilizzato un Ac diretto contro i residui 4-17 della proteina Fos e il preassorbimento con il rispettivo peptide di sintesi eliminava l'immunoreazione. Il disegno sperimentale prevedeva che gli animali venissero adattati alla camera di stimolazione, a Ta di 23°C, per almeno 10 giorni, prima dell'abbassamento della Ta, che avveniva nel giro di 15 min. Gli autori hanno riscontrato la presenza di numerose cellule c-Fos-ir a livello della POA dopo 3 h di esposizione. La POA risultava inoltre tra le aree che ancora esprimevano c-Fos dopo 24 h e 14 giorni, in maniera significativamente più elevata che nei controlli. In questo studio MnPO e VLPO non sono stati specificamente indagati, ma nella rappresentazione grafica, il MnPO (raffigurato a livello commessurale, quindi caudale) appariva coinvolto in maniera importante a 3 h e solo scarsamente dopo 24 h e 14 d. Ad ogni modo, la stessa POA, indagata nel suo insieme, pur mantenendosi attivata in tutti i tempi sperimentali indagati, riduceva la sua attivazione con il tempo di esposizione (Miyata et al., 1995).

Nel nostro caso, la marcatura per c-Fos dopo 4,5 h di esposizione a -10°C tendeva ad aumentare nel MnPO rispetto alle condizioni di controllo, ma senza mai raggiungere la significatività statistica. Col prolungarsi dello stimolo, la differenza tra esposizioni e controlli diventava significativa; tuttavia, pur rivestendo sicuramente il MnPO un importante ruolo termoregolatorio nella risposta all'innalzamento della Ta, data la nozione dell'incerta responsività dello stesso all'esposizione a bassa Ta e considerato che l'unico dato cronico sembra non confermare l'attivazione dell'espressione di c-Fos in quest'area dopo 24 h e 14

giorni, mentre mostra che il livello di attivazione generale della POA decresce col prolungarsi dell'esposizione, è ragionevole pensare che l'incremento significativo osservato dopo 24 e 48 h di esposizione nei nostri animali non sia da attribuirsi ad una risposta al freddo.

A livello del VLPO, la condizione E4 risultava invece praticamente identica alla popolazione di controllo nel core, indicando che lo stimolo ambientale non aveva effetto su tale popolazione neuronale.

Viceversa, la marcatura presentava un'impennata a livello dell'estensione mediale: questo dato appare in accordo con la benché scarsa letteratura in materia. L'attivazione del VLPOmed, tuttavia, con il progredire dell'esposizione tendeva a ritornare ai livelli di controllo, denunciando un adattamento cellulare alla condizione sperimentale. Questa regione, cioè, parteciperebbe alla risposta precoce allo stimolo ambientale, andando successivamente incontro ad una forma di adattamento.

L'estensione dorsale, infine, mostrava un incremento significativo dell'espressione di c-Fos rispetto ai controlli lungo tutta la durata della deprivazione. Una attivazione persistente di c-Fos è stata posta in relazione con la prolungata attivazione delle cellule coinvolte in fenomeni di plasticità nervosa. E' pertanto possibile che neuroni presenti in tale regione siano persistentemente attivati per adattare gli animali alla stimolazione ambientale (Miyata et al., 1995). L'estensione dorsale viene a trovarsi sul confine tra MPA e LPO; potrebbe pertanto avere una qualche utilità confrontare il nostro pattern di marcatura (descritto nel paragrafo *Pattern caratteristici in Materiali e Metodi*) con i precedenti studi che analizzano queste due aree. Nella maggioranza dei casi, come abbiamo visto (tranne nei tre dei lavori esaminati in cui è contemporaneamente descritta la mancata attivazione del MnPO in risposta all'esposizione a bassa Ta), è riportata l'attivazione della LPO, mentre i dati a proposito della MPA sono discordanti. Nel lavoro di Miyata e collaboratori, sebbene dopo 3 h il pattern di attivazione coinvolgesse la POA in maniera diffusa, comprendendo la MPA e il MPO, dopo 24 h esso tendeva ad apparire più corrispondente al nostro: in particolare, il pattern dorsale e ventrale apparivano simili; tuttavia, nella

rappresentazione grafica non erano raffigurate proprio le cellule attivate, nel nostro modello, tra le due zone, lungo il confine tra MPA e LPO. Queste differenze potrebbero ascriversi al fatto che non è detto che una Ta di -10°C sia immediatamente paragonabile nei suoi effetti ad una Ta di 10°C, sebbene si possa ragionevolmente supporre che le aree termoregolatorie attivate coincidano; si potrebbe argomentare che un carico termico di -10°C per 4 h sia meglio rapportabile ad un carico termico di 10°C per 24 h che per 4 h. Ciononostante, un punto da non trascurare è il diverso ceppo di ratti impiegato, considerando che dati sul pattern di attivazione della POA, successivamente ottenuti dallo stesso gruppo di ricerca (Baffi e Palkovits, 2000; Bratincsak e Palkovits, 2004), in studi che utilizzavano rispettivamente ratti Wistar-Kyoto e Sprague-Dawley, sono risultati diversi tra loro, ma concordi con altri lavori in dipendenza dal ceppo in studio (Kiyohara et al., 1995; Miyata et al., 1995; Cano et al., 2003). Pertanto, potrebbe avere più rilievo confrontare i nostri dati con quelli derivanti da ratti dello stesso ceppo, benché limitati ad esposizioni acute (Cano et al., 2003; Bratincsak e Palkovits, 2004). Ricordiamo che, in entrambi i lavori citati, la attivazione non coinvolge il MPO e la MPA, mentre gli autori riportano una risposta della LPO. Questo pattern di marcatura apparirebbe più congruente con quello da noi trovato. Tuttavia, nessuna precisa descrizione dello stesso è riportata in letteratura.

La griglia di conteggio del VLPO_{odor} veniva a cadere lungo la banda di attivazione cellulare descritta (si veda il paragrafo *Pattern caratteristici in Materiali e Metodi*), con cui assumeva però un rapporto incostante, essendo più spostata verso l'interno di essa nelle sezioni più rostrali e verso l'esterno in quelle più caudali (si confronti l'evoluzione rostrocaudale del rapporto anatomico del VLPO con la linea di confine tra MPA e LPO sulle tavole 33-38 del Paxinos e Watson, 2005). Il dato potrebbe dunque essere spiegato dalla parziale intersezione dell'area indagata con questa più estesa popolazione cellulare della POA, verosimilmente attivata in maniera persistente in relazione alla risposta plastica neuronale all'esposizione a bassa Ta.

Due ulteriori aspetti andrebbero presi in considerazione in questa analisi del modello sperimentale di esposizione a bassa Ta in relazione ai dati di letteratura.

Nessuno studio sui processi termoregolatori centrali ha esaminato l'espressione di c-Fos durante il recupero a Ta termoneutrale. L'espressione di c-Fos, tuttavia, è generalmente considerata in stretta relazione allo stimolo. Per cui, è ragionevole supporre che essa rientri nella norma alla sospensione dello stesso. Ad esempio, in neuroni magnocellulari del SO e del Pa, l'immunoreattività per c-Fos si è rivelata transitoria in seguito ad uno stimolo osmotico acuto (iniezione i.p. di soluzione salina ipertonica) e persistente in relazione ad uno stimolo osmotico cronico (deprivazione idrica o somministrazione di salina ipertonica da bere), cessando però alla rimozione dello stesso (Miyata et al., 1994). Dopo 2 h dal ripristino dell'accesso all'acqua, la FLI, significativamente incrementata dopo 22 h e 46 h di deprivazione idrica, era rientrata nella norma a livello del SO (Ji et al., 2005; Gottlieb et al., 2006).

Inoltre, nessuno nei lavori analizzati ha preso in considerazione la stretta relazione tra termoregolazione e omeostasi ipnica. L'esposizione al freddo provoca, in realtà, nell'animale una concomitante deprivazione di sonno. Questo effetto è stato osservato già durante le primissime ore di esposizione a un rango di Ta variabili da 10°C a -10°C (Cerri et al., 2005). Quindi, è verisimile che i protocolli di esposizione a bassa Ta esplorino inconsapevolmente animali deprivati di sonno. Questo sarebbe da tenere in considerazione nell'esame degli studi di mappatura dei centri attivati dall'esposizione al freddo, che individuano certamente aree termoregatorie, ma anche più generalmente aree implicate nei processi di vigilanza e di inibizione delle strutture attive durante il sonno. Le due funzioni potrebbero peraltro coesistere nell'ambito di un medesimo nucleo o area.

Influenze del controllo dell'osmolalità dei liquidi corporei

Come riportato nei Materiali e metodi (si veda il paragrafo *Condizioni sperimentali*), acqua e cibo erano disponibili *ad libitum* durante tutte le fasi del

protocollo sperimentale, ma durante l'esposizione a bassa Ta, l'acqua tendeva a congelare, generando di fatto una parziale deprivazione idrica e, verosimilmente, una conseguente anoressia da disidratazione.

Il confronto tra il valore della pesata effettuata all'uscita dalla fase sperimentale e quello misurato alle ore 9:00 dell'ultimo giorno di adattamento (Tabella 4) rivelava una perdita di peso che tendeva a stabilizzarsi con il prolungarsi dell'esposizione, pari a $-6,25 \text{ g} \pm 1,55$; $-20,00 \text{ g} \pm 4,51$; $-25,67 \text{ g} \pm 6,39$, rispettivamente per le condizioni E4, E24 ed E48. Negli animali posti a recuperare dopo 24 h e 48 h di esposizione, la perdita di peso si riduceva a $-7,25 \text{ g} \pm 1,70$ e $-10,00 \text{ g} \pm 4,56$, rispettivamente per E24R4 ed E48R4. La condizione C24 invece era caratterizzata da un incremento pari a $13,33 \text{ g} \pm 4,70$, mentre la condizione C4 mostrava un peso quasi invariato, che risentiva presumibilmente ancora del calo durante il precedente giorno di adattamento ($-3,33 \text{ g} \pm 0,33$). Dati del nostro laboratorio non ancora pubblicati, ottenuti da 9 animali sottoposti a 72 h di totale deprivazione idrica, hanno mostrato una perdita di peso pari a $-27,89 \pm 1,21 \text{ g}$ e $-44,00 \pm 1,71 \text{ g}$ rispettivamente dopo 24 h e 48 h, misurata relativamente alle ore 9:00 del primo giorno di deprivazione, il che conferma che la deprivazione idrica nel nostro modello sperimentale era solo parziale. Inoltre, un unico dato preliminare, ottenuto da un singolo animale in un nuovo allestimento sperimentale che non permette all'acqua di congelare durante l'esposizione a -10°C , recentemente messo a punto nel nostro laboratorio, ha mostrato una perdita di peso pari a 14 g e 17 g rispettivamente dopo 24 h e 48 h a bassa Ta, relativamente alle ore 9:00 del primo giorno di esposizione. Dopo 24 h di recupero, il valore del calo ponderale decresceva a 7 g. E' stato misurato durante l'esposizione che l'introito di acqua era sovrapponibile e l'introito di cibo maggiore rispetto al valore basale.

La perdita di peso in condizione di deprivazione idrica totale risultava, dunque, progressivamente ingravescente, mediamente più cospicua dopo 24 h, ma molto più elevata dopo 48 h, se confrontata con quella registrata nel protocollo di esposizione a bassa Ta. In quest'ultimo, invece, il calo ponderale tendeva ad un adattamento e rifletteva lo stesso profilo del dato preliminare ottenuto nell'animale

posto a -10°C con possibilità di bere acqua mantenuta alla temperatura di circa $2,5^{\circ}\text{C}$, sebbene fosse più pronunciata rispetto ad esso. Se questo singolo dato venisse confermato, se ne dedurrebbe che la esposizione a -10°C è sufficiente di per sé a spiegare almeno una parte del calo di peso osservato nei nostri animali. La deprivazione idrica conseguente al congelamento dell'acqua all'interno dei biberon sarebbe probabilmente solo di lieve entità e comunque meno pronunciata durante il secondo giorno di esposizione, dove l'animale tendeva forse ad approfittare maggiormente del cambio dei biberon, effettuato due volte nelle 24 h.

D'altra parte, durante le prime ore di recupero, dopo 48 h di esposizione a -10°C nel più recente allestimento (gabbia metabolica), l'introito di acqua e cibo risultava nella norma. Abbiamo, tuttavia, dei dati relativi alla fase di messa a punto del nuovo allestimento sperimentale, in cui l'acqua tendeva a gocciolare fuori dal biberon, costruendo un ponte ghiacciato con la gabbia metabolica, per cui l'animale veniva comunque parzialmente deprivato d'acqua. In questo caso, si assisteva durante il recupero ad una cospicua assunzione di cibo ed acqua nel corso della prima ora, rispetto ai valori basali, segno evidente della precedente deprivazione. E' presumibile che il nostro modello ricalchi questa situazione. A supporto di questa ipotesi, dati del nostro laboratorio non ancora pubblicati hanno indicato un incremento dei valori di osmolarità ed ematocrito dopo 48 h di esposizione a -10°C . Lo stato di disidratazione dei nostri animali sarebbe confermato dall'intensa attivazione dell'espressione di c-Fos a livello del SO, nonché del cappuccio dorsale e del bordo laterale, ma non nella regione vascolarizzata centrale, del VOLT (Figura 28), pattern già associato alla deprivazione idrica (Rowland, 1998).

Non conoscendo, tuttavia, l'effettiva entità della deprivazione idrica negli animali esposti a bassa T_a nel nostro modello sperimentale e poiché comunque non sono riportati in letteratura studi di deprivazione idrica parziale, è possibile soltanto raccogliere informazioni sulla risposta del c-Fos alla deprivazione idrica totale, al fine di discernere la possibilità di un eventuale ruolo di questo fattore nello spiegare il nostro dato.

Il VLPO non è considerato coinvolto nella regolazione dell'omeostasi dei liquidi corporei e non sono stati condotti studi che indagano la risposta dello stesso alla deprivazione idrica. Dal lavoro di Patronas e collaboratori, che ha coinvolto approssimativamente l'intera PO-AH, tuttavia, emerge come la MPA non risponda a 24 h di deprivazione idrica, ma un'area definita dagli autori come area preottica ventromediale, situata ventralmente nella MPA, mostrava un lieve aumento dell'espressione di c-Fos rispetto al controllo, che raggiungeva la significatività. Sembra che tale regione si intersechi parzialmente con quella che noi definiamo come estensione mediale del VLPO (Patronas et al., 1998). E' del tutto improbabile, invece, che la risposta della zona perinucleare del SO alla reidratazione, rappresentata da un significativo incremento della FLI rispetto al valore di controllo e di deprivazione idrica (Gottlieb et al., 2006), possa avere una qualsiasi influenza sul nostro dato di recupero, a causa del fatto che la zona indicata dagli autori è caudale rispetto a quella in cui è presente il VLPO, che prende rapporto solo con le porzioni più rostrali del SO, un nucleo dalla considerevole estensione rostrocaudale (Paxinos e Watson, 2005).

Un'analisi dell'aspetto osmoregatorio è invece fondamentale per comprendere il dato sul MnPO, struttura cruciale per l'omeostasi idrico salina dell'organismo. E' stato mostrato, in ratti Sprague-Dawley, come la deprivazione idrica prolungata per 24 h e 48 h determini un significativo incremento dell'espressione di c-Fos nel MnPO, studiato a livello caudale, sia dorsale sia ventrale (McKinley et al., 1994; Ji et al., 2005; Gottlieb et al., 2006). In ratti Sabra, in cui era indagata, a detta degli autori, l'intera estensione nucleare, 24 h di deprivazione idrica hanno provocato un incremento del numero di neuroni c-Fos pari a 10 volte i valori di controllo. In realtà, tuttavia, in base all'iconografia e alla descrizione del campionamento, è molto probabile che le porzioni rostrali del nucleo non siano state prese in considerazione (Patronas et al., 1998).

La reintroduzione dell'accesso all'acqua per 2 h dopo 22 h e 46 h di deprivazione, pur riportando nella norma i valori di vasopressina (o ormone antidiuretico, ADH) circolante, osmolalità (che in un lavoro risultava addirittura ridotta rispetto ai valori di controllo), ematocrito (almeno in uno su due lavori),

proteine plasmatiche, nonché l'espressione di c-Fos a livello del SO, non modificava la FLI a livello del MnPO. L'incremento nel gruppo 48 h è risultato significativamente più elevato rispetto a quello del gruppo 24 h, con o senza ripristino dell'accesso all'acqua (Ji et al., 2005; Gottlieb et al., 2006). Inoltre, mentre l'accesso all'acqua preveniva l'incremento della FLI indotto dall'iniezione i.c.v. di angiotensina II a livello del SO e del Pa, quindi delle strutture neuroendocrine del sistema osmoregatorio, deputate al rilascio di ADH, esso non aveva effetto sull'incremento misurato, dopo 1 h dall'iniezione, nel MnPO e nel VOLT, strutture recettive e integrative, implicate nell'omeostasi dei fluidi corporei e coinvolte nella generazione del comportamento di assunzione di acqua e dell'appetito per il sale (Morian e Rowland, 1995). Un dato parzialmente contrastante vedeva invece la riduzione significativa della FLI anche nel MnPO, a 2 h dal ripristino dell'accesso all'acqua dopo 30 h (ZT4-34) di deprivazione; essa era tuttavia meno pronunciata che nel SO, tanto che il valore della FLI durante il recupero risultava comunque significativamente più elevato che nel controllo (De Luca et al., 2002).

Quindi, dall'analisi dei dati di letteratura emerge che il MnPO, indagato a livello caudale, nelle porzioni ventrale e dorsale, risponde con un incremento significativo della FLI a tutta una serie di stimoli, cronici e acuti, compresi la deprivazione idrica, la somministrazione di soluzione salina ipertonica da bere (Gottlieb et al., 2006), la somministrazione i.p. di salina ipertonica (Miyata et al., 1994), la somministrazione i.c.v. di angiotensina II. L'incremento della FLI rispetto ai controlli si intensifica col prolungarsi della deprivazione idrica nel MnPO caudale analizzato nel suo insieme (Ji et al., 2005) e nel dMnPO (Morian et al., 1999). Mancano dati sulla relazione tra rMnPO e deprivazione idrica, ma è stato descritto che, in seguito a somministrazione i.c.v. di angiotensina II, un gran numero di neuroni esprimevano c-Fos nel vMnPO e nel dMnPO e il numero e l'intensità delle cellule marcate era particolarmente elevato nelle immediate vicinanze del 3V, mentre un minor numero di cellule marcate era presente nella porzione sita rostralmente alla ac (McKinley et al., 1995). Il dato non è purtroppo meglio specificato e non ci permette in sé di pensare ad una ridotta risposta del

rMnPO alla deprivazione idrica, considerando che nella nostra suddivisione, la regione immediatamente rostrale alla ac è già considerata come caudale, mentre per rMnPO intendiamo la metà rostrale della sua estensione, a stretto rapporto di contiguità con il VOLT.

Il recupero dopo deprivazione idrica non modifica la FLI misurata a livello del MnPO caudale a 2 h dalla reintroduzione dell'acqua o la riduce solo parzialmente, senza riportarla ai valori di controllo: trattandosi di un comportamento specifico del MnPO (e di VOLT e SFO), che non ritroviamo invece nel SO, il dato non sarebbe legato ad una persistenza del c-Fos a distanza di 2 h dalla fine della somministrazione dello stimolo, ma implicherebbe la partecipazione del MnPO non soltanto alla risposta dell'organismo alla mancata assunzione di acqua durante la deprivazione, per esempio tramite input volti a stimolare la secrezione di ADH da parte dei neuroni magnocellulari del SO e del Pa (McKinley et al., 1994), ma anche all'attività volta al ripristino delle condizioni normali durante il recupero, per esempio alla regolazione del comportamento del bere (McKinley e Johnson, 2004).

Alla luce di questa analisi, non è possibile escludere un ruolo, probabilmente importante, della deprivazione idrica nella stimolazione dell'espressione di c-Fos nel MnPO durante l'esposizione a bassa Ta. Non è possibile neanche, in linea teorica, escludere con sicurezza l'influenza dei meccanismi osmoregolatori sul dato delle 4,5 h di recupero. Va considerato, però, che non sono stati studiati in letteratura recuperi più lunghi di 2 h e che è stato osservato, dopo 72 h di deprivazione idrica totale, che il ratto impegna la quasi totalità del tempo nell'assunzione di acqua (e cibo) soltanto durante la prima ora di recupero (dati del nostro laboratorio non ancora pubblicati), dato che si ripresenta, come visto, nel modello iniziale della gabbia metabolica.

Infine, abbiamo osservato, avendo fatto un'analisi differenziata delle tre parti, che una di queste, il dMnPO, inizia a modificarsi in recupero prima delle altre.

Gli effetti osmoregolatori e termoregolatori derivanti dal nostro modello sperimentale possono interagire.

Studi *in vitro* hanno mostrato la contemporanea presenza a livello del MnPO di neuroni sensibili a vari tipi di stimoli. Abbiamo già parlato della sensibilità termica nel paragrafo precedente. Nello stesso lavoro sono descritti neuroni sensibili alla variazione della pressione osmotica (19 su 75 registrati) e all'aggiunta di angiotensina II (11 su 55) al mezzo di perfusione. Per inciso, la maggior parte dei neuroni che rispondevano al mezzo iposmotico, lo facevano tramite un incremento della loro frequenza di scarica, mentre tutti i neuroni campionati che rispondevano al mezzo iperosmotico, lo facevano tramite una riduzione della loro frequenza di scarica; la maggior parte dei neuroni che rispondevano all'angiotensina II, infine, incrementavano la propria frequenza di scarica. Un dato interessante è che i vari fattori potevano interagire tra loro nel determinare variazioni dell'attività elettrica di singoli neuroni. E' stato visto, cioè, benché su un campione esiguo, che la termosensibilità di una piccola percentuale di neuroni sensibili all'aumento della temperatura del mezzo, ma non di neuroni sensibili alla sua diminuzione, poteva essere influenzata dall'aggiunta di angiotensina II al mezzo di perfusione. D'altra parte l'aggiunta di angiotensina II poteva determinare l'insorgenza di variazioni della frequenza di scarica in risposta a variazioni della temperatura del mezzo in neuroni viceversa non termosensibili (Travis e Johnson, 1993).

D'altro canto, è noto che sia l'esposizione a bassa T_a sia la disidratazione incrementano il tono simpatico (Westfall et al., 2005; Scrogin et al., 1999). Peraltro, in animali anestetizzati, la ipotermia determina un effetto diuretico e natriuretico, nonostante la caduta della velocità di filtrazione glomerulare, dovuto presumibilmente ad una conseguenza della riduzione della temperatura corporea sui processi di riassorbimento a livello del tubulo prossimale e del tratto spesso della branca ascendente dell'ansa di Henle, associato ad una riduzione del rilascio di ADH (Sabharwal et al., 2004). Infine, la risposta dipsogenica e l'elevazione della FLI (misurata a livello di SFO, SO e Pa) secondarie ad infusione endovenosa di angiotensina II erano significativamente incrementate in ratti esposti per 7

settimane a 5°C, rispetto ai controlli a 25°C (Sun et al., 1996). D'altra parte, e' stato dimostrato un coinvolgimento del MnPO nel comportamento di evitamento delle Ta elevate e ricerca del freddo in condizione di carico salino sistemico (iniezione sottocutanea di salina ipertonica, unita a deprivazione di acqua e cibo durante le 3 h di durata della seduta sperimentale) nel ratto (Konishi et al., 2007).

Influenze dello stress

L'analisi funzionale dello *stress* è stata introdotta negli anni settanta del secolo scorso da Selye per indicare una risposta non specifica (rivelata dopo sottrazione delle componenti specifiche dalla risposta complessiva) del corpo ad un gran numero di eventi, quali infezioni batteriche, tossine, radiazioni e vari stimoli fisici come gli interventi chirurgici e l'esercizio muscolare. Egli non negava l'esistenza di pattern di risposta specifici; enfatizzava, tuttavia, l'idea che questa risposta non costituisse stress, che invece corrispondeva solo alla componente comune non specifica. Tale concetto di aspecificità, peraltro non condiviso da Cannon, il padre del termine *omeostasi*, è stato messo in discussione in tempi più recenti. E' stata dimostrata, testando diversi agenti stressogeni (immobilizzazione, emorragia, esposizione al freddo, dolore, ipoglicemia), una marcata eterogeneità delle risposte neuroendocrine e l'esistenza di uno specifico contrassegno neuroendocrino per ciascun agente (Pacák e Palkovits, 2001). Dagli stessi autori è stata avanzata la definizione di stress come di uno stato di minaccia, concreta o soggettivamente percepita, all'omeostasi. Durante lo stress, verrebbe attivata una risposta compensatoria adattiva dell'organismo di tipo specifico, volta a sostenere l'equilibrio omeostatico: essa rifletterebbe l'attivazione di circuiti centrali specifici e sarebbe geneticamente programmata e costantemente modulata da fattori ambientali. Lo stesso Cannon, in una prospettiva evuzionistica, aveva messo in discussione il carattere adattivo di un pattern di risposta stereotipato, sostenendo che una risposta non specifica non avrebbe fornito un vantaggio nella selezione naturale e quindi non sarebbe evoluta. Attraverso l'esame dell'espressione di c-Fos, è stato possibile delineare una mappa delle vie centrali

di risposta ai diversi agenti stressogeni e rilevarne la specificità per ognuno degli stimoli indagati (Pacák e Palkovits, 2001).

Questo comporta la conseguenza rilevante di ricondurre il concetto di stress allo specifico stimolo che lo ha prodotto, quindi nel nostro modello sperimentale all'esposizione a bassa Ta e alla condizione di parziale deprivazione idrica, con attivazione di vie specifiche, la cui trattazione è già stata condotta nei precedenti paragrafi.

Ulteriori effetti potrebbero tuttavia essere prodotti da altri aspetti del protocollo sperimentale, quali il trasferimento per i trattati in un nuovo ambiente (nel caso specifico, la camera fredda) e probabilmente il rumore prodotto episodicamente dalle ventole di raffreddamento durante l'esposizione. Altrimenti, i ratti venivano lasciati indisturbati nelle proprie gabbie lungo tutta la durata dell'esperimento.

Il trasferimento in ambiente non familiare è considerato di per sé un moderato stress psicologico, capace di indurre l'espressione di c-Fos in alcune aree cerebrali. A 2 h dal trasferimento in un contesto non noto all'interno delle proprie gabbie, ratti Sprague-Dawley mostravano rispetto ai controlli un incremento della FLI, indagata nell'area preottica e nell'ipotalamo, esclusivamente a livello dell'ipotalamo anteriore e lateroanteriore, ma nessuna struttura della POA risultava coinvolta, differentemente rispetto ad altri tipi di stress di tipo fisico e di maggiore intensità (Briski e Gillen, 2001). Ad ogni modo, è ragionevole pensare, data la natura dello stimolo, che l'attivazione dell'espressione di c-Fos possa regredire in tempi relativamente brevi.

Esperimenti preliminari in cui erano state ricavate sezioni da tronco dell'encefalo hanno mostrato, invece, un'intensa attivazione dei nuclei cocleari in un ratto esposto a -10°C . Non c'è ragione, tuttavia, di pensare ad un coinvolgimento del MnPO e del VLPO in questo tipo di risposta. Infatti, benché MPO, MPA e LPO possano presentare un incremento dell'espressione del mRNA per c-Fos in seguito a stimoli acustici molto intensi (80-110 dB), il rumore delle ventole della camera fredda era sicuramente ben al di sotto di questa soglia (anche

se nessuna misura è stata effettuata); peraltro, il rumore prodotto dalle ventole dell'alloggiamento dell'animale (circa 60 dB) è stato precedentemente utilizzato come livello di background, in quanto dello stesso ordine di grandezza di quello presente in una colonia (Burow et al., 2005). D'altra parte, il perdurare della stimolazione uditiva riduce la produzione di c-Fos, estremamente intensa all'applicazione di un nuovo stimolo, a livello dei nuclei cocleari e suoni familiari evocano una minore produzione di c-Fos a livello della corteccia associativa uditiva rispetto a suoni non conosciuti (Kandiel et al., 1999; Wan et al., 2001), indicando la possibilità di un adattamento al ripetersi di uno stesso stimolo uditivo. La possibilità di un'associazione da parte dell'animale del rumore delle ventole all'esacerbarsi dello stress termico non può invece essere esclusa, ma non ci sono evidenze a favore di un coinvolgimento delle strutture preottiche in questo tipo di risposte (Pezzone et al., 1992; Newton et al., 2004).

Infine, le operazioni di acquisizione del peso e induzione dell'anestesia per la perfusione erano molto rapide (l'inizio dell'infusione di PBS avveniva nel giro di 8 ± 2 min dal prelievo dell'animale), sicuramente inferiori ai tempi richiesti per un'eventuale espressione della proteina c-Fos e comunque i controlli standardizzerebbero rispetto a questo fattore.

Influenze della regolazione ipnica

Come illustrato nell'Introduzione (si veda paragrafo *Metodi di deprivazione ipnica*), dati comportamentali acquisiti nel nostro laboratorio hanno evidenziato, durante l'esposizione a bassa T_a , un significativo incremento della quantità media di veglia e dell'attività motoria e un significativo decremento della quantità media di sonno NREM, sonno REM. Il decremento percentuale della quota di sonno REM era più ampio di quello osservato per il sonno NREM. Inoltre, l'entità della deprivazione risultava proporzionale al carico termico. L'esposizione per 24 h e 48 h a -10°C virtualmente azzerava il tempo trascorso in sonno REM. La quota di sonno NREM durante l'esposizione per 24 h a -10°C si riduceva di circa il 40% rispetto ai valori basali nel periodo di luce

(corrispondente alla fase circadiana di riposo nel ratto) e soprattutto si determinava un significativo decremento della potenza della banda delta (Amici et al., 1998; Cerri et al., 2005); i dati relativi alle 48 h non erano stati analizzati, ma da analisi preliminari, svolte nell'ambito di un recente esperimento, sembra emergere una forte depressione della potenza della banda delta (dati del nostro laboratorio non pubblicati).

Nelle prime 12 h di recupero successivo a 24 h di esposizione si manifestava in prima giornata un significativo incremento del tempo trascorso in sonno REM che risultava pari a circa il 60% del valore basale. L'incremento registrato dopo 48 h di esposizione risultava invece di minor valore, nonostante la più elevata entità della deprivazione. Per il sonno NREM, anche in questo caso, era stato analizzato soltanto il recupero relativo alle 24 h di esposizione, che aveva dimostrato un incremento della potenza della banda delta rispetto al controllo, altamente significativo nella 3^a-4^a ora del periodo di luce (Amici et al., 1998; Cerri et al., 2005). Da analisi preliminari, su dati recentemente acquisiti, del recupero dopo 48 h a -10°C, non sembra, tuttavia, che la potenza della banda delta raggiunga un picco paragonabile a quello che si verifica dopo 24 h di deprivazione (dati del nostro laboratorio non pubblicati).

Sul piano biochimico, la capacità di accumulo del secondo messaggero cAMP, misurata a livello della PO-AH in animali stimolati tramite esposizione all'ipossia, una condizione depolarizzante che ne induce un'accumulazione massimale, si riduceva significativamente al di sotto dei valori di controllo durante entrambe le esposizioni. Durante le prime 4,5 h del periodo di recupero, essa ritornava ai livelli di controllo dopo 24 h, ma non dopo 48 h di esposizione (Zamboni et al., 1996; Zamboni et al., 2004).

Dai dati immunoistochimici riportati in questo lavoro emerge un chiaro effetto del recupero nell'incrementare la quantità di neuroni c-Fos-ir a livello del core e dell'estensione mediale del VLPO. Non emerge invece alcuna significativa differenza tra recuperi ed esposizioni di lunga durata nell'area del VLPOdor e neanche a livello del rMnPO e del vMnPO. Nel dMnPO, invece, si assiste ad un

significativo decremento della FLI durante i recuperi nei confronti delle esposizioni prolungate.

Il ruolo del VLPO nel promuovere il sonno è ampiamente riconosciuto in letteratura. Abbiamo già visto come il core nucleare sia stato identificato originariamente nel ratto come un piccolo raggruppamento triangolare, laterale al chiasma ottico, di neuroni che proiettavano al TM e la maggior parte dei quali esprimeva c-Fos, quindi era attiva, durante il sonno sia spontaneo sia conseguente a deprivazione ipnica (Sherin et al., 1996). Tuttavia, un più piccolo numero di neuroni che esprimevano c-Fos in relazione al sonno era presente anche nella regione dorsale e mediale al core del VLPO. Poiché alcuni neuroni in questa regione contenevano galanina e mostravano immunoreattività per la GAD, ne è stata ipotizzata l'appartenenza al VLPO, a costituirne una sorta di estensione funzionale nella regione preottica (Sherin et al., 1998; Lu et al., 2000). Le proiezioni, verosimilmente inibitorie, del VLPO a tutta una serie di strutture del sistema ascendente di vigilanza sono state ampiamente documentate (Sherin et al., 1998) e precedentemente riportate in questo scritto (si veda il paragrafo *Citoarchitettura e proiezioni del VLPO*). Studi elettrofisiologici hanno documentato il rapporto della frequenza di scarica durante il sonno NREM rispetto alla veglia in 105 cellule registrate lungo il passaggio di un microelettrodo attraverso la LPO in 7 ratti. Il tipo più frequente (circa il 27% del campione) mostrava una più elevata frequenza di scarica in veglia che in sonno NREM (rapporto compreso tra 0,01 e 0,39); il 22% circa presentava un'attività moderatamente più elevata in relazione alla veglia (rapporto compreso tra 0,40 e 0,79); un altro ampio gruppo (intorno al 24%) scaricava con frequenza simile nei due stati (rapporto compreso tra 0,80 e 1,19); la percentuale di neuroni che invece incrementavano la loro attività elettrica in sonno NREM era pari ad un 12% con moderata entità (13 cellule con rapporto compreso tra 1,20 e 1,99) e ad un 16% in maniera fortemente correlata al sonno NREM (17 cellule con rapporto superiore a 2,00). La distribuzione di tali cellule era eterogenea, ma i neuroni la cui attività era correlata al sonno risultavano concentrati nel terzo ventrale del percorso del

microelettrodo. In particolare, 23 su 41 cellule registrate a livello del VLPO si presentavano moderatamente (8) o fortemente (15) correlate al sonno NREM. Un dato rilevante era che durante la transizione dalla veglia al sonno NREM, l'incremento della frequenza di scarica precedeva di numerosi secondi la sincronizzazione elettroencefalografica. L'attività elettrica incrementava con la potenza della banda delta, sia nelle transizioni attraverso gli stadi del sonno spontaneo, sia nel recupero in seguito a deprivazione ipnica. In fase REM, la frequenza media di scarica nei neuroni registrati a livello del VLPO (compresa tra 0,20 e 3,53 Hz) non differiva significativamente da quella registrata in fase NREM (0,85-4,53 Hz), che era significativamente più elevata che in veglia (0,18-2,21 Hz). Non sono state osservate cellule con pattern di scarica selettivamente correlati al sonno REM (Szymusiak et al., 1998).

Alcuni studi hanno messo in luce una certa differenziazione funzionale tra il raggruppamento di cellule del core e le cellule attive in sonno sparse nell'adiacente regione preottica. Lesioni del core ottenute tramite microiniezioni di acido ibotenico, tali da determinare la perdita bilaterale dell'80-90% circa della popolazione neuronale determinavano un decremento pari al 50-60% del tempo trascorso in sonno NREM e al 60-70% della potenza della banda delta. Il numero dei neuroni c-Fos-ir rimanenti correlava positivamente con il tempo trascorso in sonno NREM e la potenza della banda delta, ma non con la quantità di sonno REM. Al contrario, lesioni nella regione mediale o dorsale rispetto al core causavano una riduzione di solo il 24,5% e 15% rispettivamente della quota di sonno NREM, mentre erano fortemente associate alla perdita di sonno REM. In particolare, ratti con lesioni coinvolgenti esclusivamente l'estensione dorsale mostravano una riduzione della quota di sonno REM pari al 35%, quindi doppia rispetto alla perdita di sonno NREM. Se le lesioni erano a carico dell'estensione mediale, la riduzione del sonno REM (31% circa) era di entità simile a quella a carico del sonno NREM, ma non raggiungeva la significatività statistica. In ogni caso, la perdita di neuroni c-Fos-ir in queste regioni mostrava una correlazione significativa con la riduzione del tempo trascorso in fase REM. L'insonnia causata

da lesioni bilaterali del VLPO, inoltre, persisteva per almeno tre settimane (Lu et al., 2000).

Al fine di identificare i neuroni attivi durante il sonno REM nella POA, gli stessi autori hanno analizzato l'espressione di c-Fos in animali esposti per 3 h ad un regime di buio prolungato, condizione in grado di indurre un incremento della quota di sonno REM. Il numero di cellule positive per c-Fos risultava correlato positivamente con il tempo trascorso in fase REM, ma non con la quota di sonno NREM a livello dell'estensione del VLPO, mentre accadeva l'inverso per i neuroni del core. L'iniezione di traccianti retrogradi a livello di LDT e LC rivelava la presenza nell'estensione nucleare di un maggior numero di cellule marcate rispetto al core, di cui circa il 50% risultava c-Fos-ir in animali esposti al buio prolungato. E' interessante notare, considerata la natura inibitoria (GABA-galaninergica) delle proiezioni del VLPO, che le fibre che proiettavano al LDT non prendevano rapporto diretto con i neuroni colinergici. Potrebbe rivestire un ruolo nella genesi e/o nel mantenimento del sonno REM anche un'intensa proiezione al PAG ventrolaterale, a livello del quale l'iniezione di agonisti GABAergici è stata dimostrata promuovere il sonno REM. D'altra parte, a sottolineare la differenza funzionale tra core ed estensione del VLPO, delle numerose cellule che proiettavano dall'estensione dorsomediale alla porzione centrale del DR, soltanto il 12-15% erano c-Fos-ir in animali in cui era stato indotto un incremento di sonno REM, mentre lo era il 64% dei neuroni che dal core proiettavano alle regioni laterali del DR. I neuroni che inviavano le loro fibre a livello del DR, così come del LC, prendevano, infine, contatto diretto con le cellule monoaminergiche di tali formazioni nucleari (Lu et al., 2002).

L'evidenziazione del rapporto del MnPO con il ciclo veglia-sonno è avvenuta in tempi più recenti rispetto a quella del VLPO. Studi di mappatura funzionale della POA, al fine di evidenziare la distribuzione anatomica e il numero dei neuroni la cui attività di scarica era correlata al sonno, hanno rilevato un incrementato numero di cellule c-Fos-ir nel sonno rispetto alla veglia non solo a livello del VLPO, ma anche attraverso l'estensione rostro-caudale del MnPO. Il paradigma sperimentale prevedeva il confronto tra ratti privati di sonno per 2 h

(ZT1-3), mediante somministrazione di stimoli uditivi o scuotimenti leggeri della gabbia, in corrispondenza dei primi segni elettroencefalografici di transizione veglia-sonno e animali di controllo, ai quali era permesso di dormire liberamente (Gong et al., 2000).

In 11 ratti registrati in sonno spontaneo per 2 h (ZT1-3), il numero di cellule c-Fos-ir a livello di rMnPO, vMnPO e VLPO (indagato mediante una griglia di 700 x 300 μm , posizionata lateralmente allo oco) risultava incrementato in maniera drammatica nel gruppo di animali che avevano trascorso più del 60% del tempo addormentati, rispetto al gruppo che aveva dormito per un tempo inferiore al 60% del periodo di registrazione. Inoltre, una chiara maggioranza, intorno all'80%, dei neuroni c-Fos-ir nel primo gruppo risultava anche marcata per la GAD. Al contrario, un numero significativo di neuroni GABAergici nel secondo gruppo, intorno al 50%, non esprimeva c-Fos. Considerando l'insieme degli animali, il numero di neuroni GABAergici c-Fos-ir correlava positivamente con la quota di sonno nelle 2 h di registrazione. Livelli più elevati di neuroni GABAergici c-Fos-ir sono stati riscontrati inoltre nel MnPO dopo 2 h (ZT1-3) di recupero in ratti deprivati di sonno per 24 h mediante locomozione forzata, rispetto agli animali sottoposti alla procedura di controllo per 24 h, seguite da 2 h di recupero e al gruppo di animali con sonno spontaneo superiore al 60%; nel VLPO la differenza risultava significativa solo nei confronti di questi ultimi. Nel recupero dopo deprivazione, le quote di sonno NREM e REM non differivano significativamente dai due gruppi di controllo, ma la potenza della banda delta era significativamente più elevata (Gong et al., 2004). Contemporaneamente, veniva dimostrato un più elevato numero di neuroni c-Fos-ir dopo 8 h di luce che dopo 8 h di buio a livello del MnPO, come del VLPO, quindi in animali che presumibilmente avevano spontaneamente dormito di più nelle ore precedenti al sacrificio (Peterfi et al., 2004).

Nel più recente dei lavori di Gong e collaboratori, è emerso anche che il numero di neuroni GABAergici c-Fos-ir, sebbene molto più basso che nel recupero, era significativamente più elevato dopo 26 h di deprivazione ipnica, rispetto al gruppo sottoposto alla procedura di controllo, che era andato incontro

ad una deprivazione soltanto di lieve entità. Questo avveniva a livello di entrambe le suddivisioni del MnPO, nonché nel VLPO, indagato mediante una griglia di 700 x 300 μm , posizionata lateralmente allo o.c.h. Si dimostrava quindi un ruolo dei neuroni GABAergici del MnPO e del VLPO nelle risposte omeostatiche alla deprivazione ipnica. In particolare, il VLPO rispondeva già a deprivazioni di lieve entità, ma non incrementava il numero di cellule GABAergiche c-Fos-ir con il grado di deprivazione; il rMnPO richiedeva invece una severa restrizione del tempo totale di sonno per incrementare l'attività dei neuroni GABAergici, mentre il vMnPO incrementava la sua risposta con l'entità della deprivazione. Nel complesso, l'intensità del controllo inibitorio dei sistemi ipotalamici e troncoencefalici di vigilanza da parte di questi due raggruppamenti nucleari della POA sarebbe incrementata come conseguenza del precedente tempo di veglia (Gong et al., 2004).

Studi più recenti hanno riportato la presenza di un maggior numero di neuroni c-Fos-ir a livello di rMnPO e vMnPO in ratti deprivati di sonno che in animali lasciati dormire spontaneamente. Questa osservazione appariva in netto contrasto con il dato di Gong e collaboratori del 2000. Anche in questo caso il paradigma sperimentale prevedeva la somministrazione per 2 h (ZT1-3) di stimoli gentili (colpetti sulle pareti e lievi movimenti della gabbia) ai primi segni di transizione veglia-sonno. Gli animali venivano tuttavia previamente adattati alla procedura di deprivazione e particolare attenzione era posta nel mantenere gli stimoli a livelli sogliari, in modo da non indurre negli animali stati di eccessiva vigilanza in risposta alla novità e intensità delle stimolazioni (Gvilia et al., 2006b). D'altra parte, il dato confermava e rafforzava una precedente osservazione, svolta in ratti sottoposti ad iniezione i.p. o i.c.v. di salina e deprivati per 2 h (ZT1-3) con le stesse modalità, dove la differenza diventava significativa però soltanto a livello del rMnPO, ma non del vMnPO (Gvilia et al., 2005). Un'ora di recupero non provocava modificazioni nel numero di neuroni c-Fos-ir, nonostante il significativo incremento della quota di sonno NREM rispetto ai deprivati e ai controlli (Gvilia et al., 2006b). Nello stesso studio, d'altra parte, a livello sia del core sia dell'estensione del VLPO, la conta delle cellule c-Fos-ir si

confermava significativamente ridotta in deprivazione (veglia) che in controllo (sonno spontaneo). Nel recupero del sonno essa aumentava rispetto alla deprivazione, fino a raggiungere i valori di controllo nel core, ma rimanendo al di sotto degli stessi nell'estensione del VLPO.

In un altro studio, tuttavia, il numero di cellule c-Fos-ir, in una griglia di $700 \times 300 \mu\text{m}^2$ il cui margine mediale corrispondeva al bordo laterale dello och, non si modificava, rispetto ai valori di controllo, con la durata della deprivazione (ZT0-3 o ZT0-8) indotta mediante stimoli gentili (dando colpetti sulle pareti della gabbia, agitando la lettiera), mentre dopo 3 h di recupero (ZT5-8) successive a deprivazione (ZT0-5), diventava significativamente più alto che nei controlli e nei deprivati (Peterfi et al., 2004). Quindi è presumibile che l'entità dell'incremento del c-Fos nel recupero nel VLPO dipenda dalla durata della deprivazione e/o dal momento del recupero in cui viene misurata. Va notato, ad esempio, che il sonno NREM tende ad essere recuperato per primo in seguito a deprivazione ipnica (Borbély e Achermann, 2005; Cerri et al., 2005) e questo potrebbe spiegare il dato, sopra riportato, registrato da Gvilia e collaboratori nell'estensione del VLPO, più fortemente implicata del core nella regolazione del sonno REM (Gvilia et al., 2006b).

Al fine di indagare la specifica implicazione dei neuroni preottici considerati attivi in sonno nella regolazione del sonno REM, Gvilia e collaboratori hanno esaminato l'espressione di c-Fos nel MnPO e nel VLPO in condizioni di sonno spontaneo, deprivazione selettiva e recupero. Sarebbe stata riscontrata in entrambi i nuclei una più forte relazione dell'espressione di c-Fos con le condizioni di più elevata pressione al sonno REM che con l'effettiva quota dormita. La proporzionalità della relazione della FLI con la pressione omeostatica al REM era più evidente a livello del MnPO, dove, a differenza del VLPO, la condizione di deprivazione con più elevata pressione al sonno REM risultava significativamente più marcata per il c-Fos della condizione di elevata quantità di sonno REM spontaneamente dormito. Inoltre, mentre l'incrementata pressione al REM, misurata come numero dei tentativi di ingresso in questa fase durante le procedure di deprivazione, attiverebbe nel MnPO prevalentemente neuroni non

GABAergici, a livello di tutte le suddivisioni del VLPO, il profilo di attivazione di questa sottopopolazione nelle diverse condizioni sperimentali mimava quello della conta totale della FLI. Analisi di correlazione, in ratti lasciati dormire indisturbati, hanno mostrato che il numero di cellule c-Fos-ir e c-Fos-ir / GAD-ir, misurato in rMnPO e vMnPO e in tutte le suddivisioni del VLPO, correlava positivamente con la percentuale di sonno REM calcolata nelle 2 h (ZT1-3) precedenti il sacrificio. Correlava inoltre positivamente, in ratti selettivamente privati di sonno REM, con il numero di tentativi di ingresso in fase REM durante le 2 h di deprivazione e con la percentuale di sonno REM calcolata durante la prima o la seconda ora recupero. Da queste osservazioni emergerebbe un'implicazione dell'attività di sottopopolazioni neuronali della POA, correlata al bisogno di sonno REM piuttosto che alla quota trascorsa in questo stadio, nella regolazione omeostatica del sonno REM (Gvilia et al., 2006a).

Abbiamo già accennato al possibile ruolo dei neuroni GABAergici del MnPO e del VLPO nelle risposte omeostatiche alla deprivazione ipnica (Gong et al., 2004). Non è ancora chiara, tuttavia, la rispettiva importanza dell'incremento della pressione al sonno o della quota effettivamente dormita nel determinare l'aumentata FLI nei neuroni GABAergici di MnPO e VLPO. A livello delle suddivisioni del VLPO, il numero dei neuroni GABAergici c-Fos-ir risultava significativamente più basso in ratti privati rispetto ai controlli e ai recuperi. Nel rMnPO e vMnPO, invece, esso è risultato aumentato rispetto ai controlli e ai recuperi in deprivazione totale di sonno. In particolare, nel recupero, dove la conta complessiva dei neuroni c-Fos-ir non differiva rispetto ai privati, il numero di neuroni GAD-ir / c-Fos-ir era significativamente più basso che in deprivazione, pur rimanendo significativamente più elevato rispetto ai controlli (Gvilia et al., 2006b).

Studi elettrofisiologici hanno classificato una popolazione di 89 neuroni registrati da 5 ratti attraverso l'estensione rostrocaudale e ventrodorsale del MnPO in ben 10 tra gruppi e sottogruppi, basandosi sulla dinamica della loro frequenza di scarica nelle varie fasi del ciclo veglia-sonno. La maggioranza delle cellule campionate (76,4%) esibiva una più elevata frequenza di scarica durante una o

entrambe le fasi del sonno rispetto alla veglia. Il 58,4% dei neuroni registrati mostrava una frequenza di scarica più elevata sia in sonno NREM sia in sonno REM e tali neuroni erano suddivisibili in 4 sottogruppi che differivano per la frequenza media. Tranne che nel primo sottogruppo, a più debole attività di scarica, la frequenza mostrava un ulteriore significativo incremento anche durante il sonno REM rispetto al sonno NREM. Reperto interessante era che l'attività di questo gruppo si modificava non solo in relazione agli stati diversi, ma anche con il decorso temporale di ogni singolo stato. Durante periodi di veglia sostenuti, l'attività di scarica tendeva ad aumentare col progredire dell'episodio, spesso in corrispondenza di riduzioni dell'ampiezza del tracciato elettromiografico; inoltre, la frequenza media di scarica durante il primo episodio di sonno NREM era significativamente più elevata che nell'ultimo di una serie e si verificava un declino significativo tra il primo e l'ultimo quarto all'interno di episodi sostenuti; questo declino, infine, si osservava anche nel corso degli episodi di sonno REM. Le cellule che incrementavano la loro attività in maniera specifica in corrispondenza o degli episodi NREM o degli episodi REM costituivano rispettivamente il 10,1% e il 7,9% del campione. Nell'ambito di entrambe le popolazioni neuronali, variava l'intensità dell'incremento dell'attività in relazione allo specifico stato, da lieve a moderato a intenso. Dei gruppi descritti, quello correlato in maniera specifica al sonno REM esibiva cambiamenti della frequenza di scarica nelle transizioni alla fase REM in stretta correlazione temporale con il pattern elettroencefalografico. Viceversa, i neuroni registrati presentavano una modalità di scarica tonica durante ogni stato del ciclo veglia-sonno e non mostravano cambiamenti nel pattern sincroni con l'attività sigma, delta o theta né, nel gruppo selettivo per il sonno NREM, variazioni che precedevano le transizioni di stato. Il 12,4% delle cellule campionate esibiva un pattern di attività tonico dalla frequenza di scarica, caratteristicamente più elevata in veglia e sonno REM rispetto al sonno NREM ed era suddiviso in due sottopopolazioni in base al livello medio di scarica; tali cellule modificavano la loro frequenza solo secondariamente alla comparsa dei correlati elettropoliografici del nuovo stato funzionale. Un'ultima popolazione, infine, pari al restante 11,2%, anch'essa suddivisa in due sottogruppi

in base all'attività media, esibiva un pattern tonico, continuamente aritmico, durante tutti gli stadi del ciclo veglia-sonno. Gli autori forniscono anche informazioni di particolare interesse sulla localizzazione delle cellule registrate: i neuroni specificamente correlati al sonno NREM avevano una netta distribuzione preferenziale a livello del rMnPO, mentre quelli selettivi per il sonno REM erano chiaramente distribuiti a livello caudale, in vMnPO e dMnPO; la ampia popolazione implicata in entrambi gli stadi di sonno presentava una prevalenza caudale e soprattutto dorsale: anche le cellule di questo tipo comunque presenti nel rMnPO si distribuivano dorsalmente, lontane dalla regione periventricolare. Le altre popolazioni non mostravano invece una distribuzione preferenziale (Suntsova et al., 2002).

In conclusione, si può delineare una differente caratterizzazione funzionale delle cellule che variano la loro attività in relazione al ciclo veglia-sonno nel MnPO e nel VLPO. Molti neuroni del VLPO attivi durante il sonno, mostrano un incremento dell'attività di scarica in corrispondenza della transizione dalla veglia al sonno e diventano progressivamente più attivi passando dagli stadi più leggeri a quelli più profondi. In seguito a deprivazione, la loro attività di scarica incrementa ulteriormente nella transizione al sonno e nell'approfondirsi dello stesso, ma non si modifica in veglia (Szymusiak et al., 1998). Al contrario, molti neuroni attivi in sonno nel MnPO mostrano un graduale incremento della frequenza di scarica con largo anticipo rispetto all'inizio dello stesso. Il picco di attività in questo caso si osserva precocemente nello sviluppo degli episodi di sonno NREM e si verifica poi un declino durante episodi di sonno sostenuti, in assenza di episodi di veglia intercorrenti (Suntsova et al., 2002).

Dai dati elettrofisiologici e dalla complessa serie di osservazioni immunoistochimiche già presenti in letteratura, quindi, sembra emergere come l'attivazione dell'espressione di c-Fos nel VLPO sia maggiormente legata alla condizione di sonno in quanto tale, spontanea o conseguente ad un'elevata pressione al sonno, quale quella che si realizza in seguito a deprivazione. Il comportamento del MnPO, invece, appare più strettamente legato al processo omeostatico del sonno, in particolare alla segnalazione di un incremento della

pressione al sonno. Un altro elemento è rappresentato dall'evidenziarsi di un ruolo di fondamentale importanza dei neuroni GABAergici in entrambe queste strutture nucleari. Nel loro insieme, i dati relativi a questa sottopopolazione neuronale suggeriscono che i neuroni GABAergici del MnPO incrementino progressivamente il loro stato di attivazione in risposta ad un'incrementata pressione omeostatica e abbiano un ruolo nel promuovere la transizione dalla veglia al sonno. L'attivazione dei neuroni GABAergici del VLPO, d'altra parte, potrebbe funzionare primariamente nel consolidare il sonno e nel regolare la profondità del sonno nel contesto dei vari episodi (Gvilia et al., 2006b).

I dati di questo lavoro trovano possibilità di interpretazione nell'ambito del panorama sperimentale appena delineato. Il profilo di incrementata attivazione del c-Fos nel rMnPO e vMnPO, rispetto alla condizione di controllo, durante le esposizioni prolungate e i recuperi, senza differenza tra deprivazione ipnica e recupero di sonno appare mimare il pattern di espressione di c-Fos descritto da Gvilia e collaboratori (Gvilia et al., 2006b). Esso potrebbe quindi indicare, su una scala temporale più lunga, la risposta cellulare all'incremento della propensione al sonno durante l'esposizione a bassa Ta nel nostro modello sperimentale e il verificarsi di sonno in condizione di forte pressione omeostatica durante il recupero. L'osservazione dei tracciati elettroencefalografici di animali esposti a -10°C ha documentato la presenza di un numero elevatissimo di transizioni dalla veglia al sonno NREM e la riduzione marcata della capacità di effettuare episodi sostenuti. Inoltre, la successione di sequenze di transizioni dal sonno NREM al sonno REM, non seguite da episodi di sonno REM, suggeriva non solo che la pressione al sonno REM era drammaticamente incrementata, ma anche che il ciclo veglia-sonno era apparentemente trasformato in una sequenza di tentativi ripetitivi di avviare un episodio di sonno REM. In altre parole, sembrava che gli animali entrassero in sonno NREM soprattutto al fine di poter effettuare transizioni al sonno REM, che però esitavano in un risveglio (Cerri et al., 2005). La documentazione da parte di Szymusiak e collaboratori di una distribuzione preferenziale caudale, ventrale e dorsale, delle cellule che incrementavano la

propria attività di scarica in stretta correlazione temporale con le transizioni al sonno REM e prevalentemente caudodorsale delle cellule attive in entrambi gli stadi di sonno, che comunque aumentavano il loro livello di attività in fase REM (Suntsova et al., 2002), potrebbe indurci ad ipotizzare un ruolo importante della pressione omeostatica al sonno REM nello spiegare il dato relativo al vMnPO e al dMnPO. Il profilo di attivazione di quest'ultima porzione del MnPO, in particolare, differiva in maniera sostanziale da quello osservato a livello del vMnPO e del rMnPO. L'espressione di c-Fos nel dMnPO mostrava una progressiva tendenza verso l'incremento con il prolungarsi dell'esposizione, che diventava significativa rispetto alla popolazione di controllo in E24 ed E48, come nelle altre suddivisioni nucleari; tuttavia, a differenza di queste, i recuperi risultavano significativamente meno marcati dei controlli. L'attivazione durante la deprivazione ipnica potrebbe riflettere l'elevato numero di transizioni al sonno REM in questa condizione, mentre la ridotta espressione di c-Fos nel recupero rifletterebbe la riduzione del numero di transizioni in conseguenza della possibilità di effettuare episodi sostenuti. A livello, invece, del rMnPO, l'incrementata espressione di c-Fos potrebbe esprimere più specificamente l'attivazione della popolazione cellulare selettiva per il sonno NREM.

Delle importanti differenze distinguono, tuttavia, il nostro dal modello di deprivazione impiegato da Gvilia e collaboratori (Gvilia et al., 2006b). Innanzitutto, la tempistica sperimentale, poiché quello da noi indagato è un modello cronico. Abbiamo già discusso, tuttavia, di come lo studio dell'espressione di c-Fos sia stato già applicato all'analisi della risposta a condizioni ambientali protratte (Miyata et al., 1995; Patronas et al. 1998) e di come la sua attivazione risulti aderente alla cinetica dello stimolo (Miyata et al., 1994). In secondo luogo, la modalità della deprivazione ipnica che, nel nostro caso, induceva disidratazione. Abbiamo visto come ragionevolmente l'incremento significativo della FLI osservato dopo 24 e 48 h di esposizione nei nostri animali non sia da attribuirsi ad una risposta al freddo (si veda il paragrafo *Influenze del controllo della temperatura corporea*). Potrebbe tuttavia esprimere la risposta allo stimolo iperosmotico e all'incremento della pressione al comportamento di

assunzione di acqua. La FLI in E24R4 ed E48R4 potrebbe ancora parzialmente riflettere il comportamento attivo del bere; poiché tuttavia i dati comportamentali evidenziano come esso sia prevalente rispetto al recupero di sonno solo nella prima ora dal ritorno a normale Ta, è presumibile che dopo 4,5 h la FLI legata al comportamento osmoregolatorio sia ridotta rispetto alle esposizioni e la maggior parte del dato rifletta il comportamento ipnico. In questo caso, si potrebbe inferire che il dMnPO partecipi al comportamento osmoregolatorio in deprivazione, ma non abbia un ruolo importante nel sonno. E' possibile, in realtà, che il comportamento ipnico e quello osmoregolatorio contribuiscano entrambi a spiegare l'incremento di attività neuronale osservato nelle diverse condizioni di trattamento e soprattutto nelle esposizioni, in una proporzione che purtroppo non possiamo identificare nel contesto di questo studio. Il dato elettrofisiologico che il 76,4% dei neuroni del MnPO presentava un'attività di scarica più elevata durante il sonno che in veglia (Suntsova et al., 2002) e l'osservazione che il 20% dei neuroni del MnPO testati *in vitro* rispondeva con una variazione dell'attività di scarica all'angiotensina II e il 25% a cambiamenti dell'osmolarità del mezzo (Travis e Johnson, 1993) fanno comunque pensare ad una possibile segregazione all'interno del MnPO tra le cellule che rispondono agli stimoli osmoregolatori e quelle coinvolte nel ciclo veglia-sonno. Questa segregazione cellulare è stata dimostrata più recentemente da Gvilia e collaboratori. In particolare, in animali in sonno spontaneo, sottoposti ad infusione i.c.v. di angiotensina II, la FLI del rMnPO e del vMnPO incrementava significativamente rispetto ai controlli non trattati o sottoposti ad infusione i.c.v. di salina isotonica; le tre condizioni non differivano per il tempo totale di sonno (benché i trattati mostrassero un significativo decremento del sonno REM). La doppia marcatura per GAD rilevava che l'incremento della FLI era a carico di neuroni non GABAergici, mentre la quota di neuroni GABAergici attivi nelle tre condizioni non differiva. Inoltre, a livello del rMnPO, le cellule c-Fos non GABAergiche avevano una prevalente distribuzione ventrale, quindi periventricolare (Gvilia et al., 2005). Considerando la distribuzione differenziale indicata dal dato elettrofisiologico (Suntsova et al., 2002) è ipotizzabile che la possibilità di separare i contributi rispettivamente

osmoregolatorio e ipnico faccia in futuro emergere una differenza funzionale tra un MnPO ventrorostrale, a più stretto rapporto con il 3V e un MnPO dorsocaudale.

A livello del VLPO, si sono delineati due opposti pattern di attivazione. Il core rispondeva in maniera selettiva alla condizione di recupero di sonno. L'estensione dorsale si attivava in tutte le condizioni di trattamento. L'estensione mediale, invece, sembrava rispondere ai cambiamenti di stato, attivandosi in maniera acuta durante l'esposizione, poi riducendo il livello di attivazione e di nuovo incrementandolo nei recuperi. In realtà, la cinetica di attivazione durante la deprivazione è compatibile con una cinetica di risposta alla bassa Ta (si veda il paragrafo *Aspetti termoregolatori*). L'incrementata attivazione in recupero rispetto alle esposizioni prolungate esprimerebbe, invece, il comportamento di sonno. Secondo la differenziazione funzionale proposta da Lu e collaboratori (Lu et al., 2000; Lu et al., 2002), probabilmente queste cellule sarebbero correlate all'espressione di sonno REM. Anche l'estensione dorsale del VLPO è considerata funzionalmente correlata al sonno REM. La attivazione sia in deprivazione sia in recupero potrebbe far ipotizzare un ruolo delle cellule del VLPO non solo nell'attuazione del sonno, ma anche nella rilevazione del debito di sonno. Questa interpretazione contrasta, tuttavia, con i dati elettrofisiologici (Szymusiak et al., 1998), ma anche con il profilo di incremento attraverso i tre tempi di esposizione, in quanto la FLI non tendeva ad aumentare di intensità con l'entità della deprivazione e non appariva, quindi, un indice di pressione omeostatica al sonno. Perché dunque, a livello dell'estensione dorsale del VLPO, il comportamento di sonno non sembra essere rilevato? La spiegazione verosimilmente risiede nel rapporto che la griglia di conta del VLPO assumeva con la banda di attivazione cellulare che sembrava segnare rostrocaudalmente e dorsoventralmente il confine tra MPA e LPO e che abbiamo considerato come una espressione di risposta alla bassa Ta. Le cellule attive in sonno dell'estensione del VLPO sono cellule sparse e relativamente poco numerose e il loro comportamento potrebbe essere mascherato da quello di una popolazione predominante termoregolatoria. Nel VLPO la non differenza tra esposizioni e recuperi è

probabilmente dovuta non al fatto che non vi sia un attivazione durante il recupero legata al sonno, ma alla metodica stessa di deprivazione che, attivando probabilmente cellule che rispondono all'esposizione a bassa Ta durante la deprivazione e rimangono ancora parzialmente attive durante il recupero, non farebbe emergere il dato relativo al sonno. Ricordiamo che la griglia di conta del VLPO_{odor} prendeva con questa popolazione cellulare un rapporto incostante, cioè non si identificava anatomicamente con il suo andamento rostrocaudale.

Un'ultima considerazione a proposito del VLPO_{cor}. La letteratura indica in questa struttura una ridotta espressione di c-Fos in deprivazione rispetto al sonno spontaneo (Gong et al., 2000; Gvilia et al., 2006b). Dai nostri dati, tuttavia, non emerge una depressione della FLI nelle esposizioni nei confronti dei controlli. Questa osservazione potrebbe essere spiegata dalla interazione tra la modalità di campionamento e la modalità di deprivazione. La griglia quadrata di conteggio proposta dal gruppo di Saper (Sherin et al., 1996; Lu et al., 2002) e più ampiamente impiegata nella recente letteratura (Gvilia et al., 2006a; Gvilia et al., 2006b), nonché in questo lavoro, ha in effetti dimensioni maggiori e forma diversa rispetto al raggruppamento nucleare del core (Figura 33). Dal nostro studio, in conformità ai dati di letteratura, emerge una forte specializzazione funzionale di questo gruppo di cellule, ma questo non è altrettanto valido per l'area circostante, in cui le cellule attive durante il sonno non sono aggregate, ma diffuse. Dato il ruolo fondamentale della PO-AH nella termoregolazione e quindi la sua incrementata espressione di c-Fos al freddo, nel nostro caso, l'utilizzo in futuro di una griglia più conforme alla morfologia del core del VLPO potrebbe fare emergere un profilo di attivazione lungo le diverse condizioni sperimentali lievemente differente, soprattutto evidenziando una più profonda inibizione dell'espressione di c-Fos in deprivazione.

La relazione tra l'immunoreattività per il c-Fos e l'accumulazione di cAMP

L'impiego della capacità massima di accumulo del cAMP come indice di funzionalità cellulare aveva fatto emergere, come esposto nel precedente

paragrafo, una ridotta capacità di recupero dopo 48 h di esposizione, che era stata messa in relazione al dato comportamentale della ridotta capacità di recuperare il sonno REM perduto. Nessuna differenza, tuttavia, è emersa in questo lavoro tra i recuperi e nel comportamento dei recuperi nei confronti delle relative esposizioni. L'unica differenza nel confronto con i controlli è stata rilevata nel dMnPO, dove entrambi tendono a tornare ai valori di controllo, ma E48R4 rimane ancora significativamente più elevato, mentre E24R4 non risulta significativamente diverso dai controlli. Inoltre, a livello del VLPOdor, la differenza rispetto alla popolazione di controllo è più altamente significativa in E48R4 che in E24R4.

Questa osservazione potrebbe essere ricondotta a più di una possibile spiegazione.

In primo luogo, l'area campionata nell'esperimento biochimico veniva prelevata su un taglio sagittale mediano per mezzo di un ago dal diametro interno di 0,8 mm, inserito nel contesto della PO-AH utilizzando come riferimento la decussazione della ac, rispetto alla quale il prelievo era sito in posizione ventrale e caudale. L'ago si spingeva per la profondità di 1 mm nel contesto della MPA. Quest'area potrebbe solo parzialmente coincidere con le due regioni al momento analizzate, il MnPO, in quanto si sviluppa soprattutto rostralmente al sito di prelievo e il VLPO, perché prevalentemente ventrale e laterale. In questa logica, ci possiamo aspettare che una differenza tra i recuperi eventualmente emerga nella futura estensione dell'analisi dei dati ad altre porzioni della PO-AH, in particolare al MPO, che dovrebbe aver costituito la porzione più cospicua del campione. Questo nucleo, tuttavia, se appare particolarmente inibito durante l'esposizione a bassa Ta, comunque tende ad esprimere poco c-Fos in tutte le condizioni sperimentali studiate.

In seconda istanza, l'espressione del c-Fos potrebbe risultare non un buon marcatore dell'indice biochimico. In tal senso, l'analisi dei dati relativi all'altro Ag studiato, il P-CREB, potrebbe rivelarsi più interessante.

Inoltre, il conteggio del numero dei nuclei marcati, indipendentemente da una valutazione di intensità, potrebbe non rappresentare un parametro pienamente adeguato ad esprimere il livello di attivazione di una determinata struttura. A

livello del rMnPO, l'intensità media dei nuclei marcati risultava significativamente inferiore, se confrontata con la rispettiva esposizione, in E24R4, dove ritornava ai livelli di controllo, che in E48R4, dove era ancora significativamente più elevata rispetto al controllo. Nel vMnPO, lo studio delle intensità medie ha indicato una differenza tra esposizioni prolungate e recuperi che il conteggio non aveva fatto emergere e, in particolare, l'intensità media di E24R4, ma non di E48R4, risultava significativamente inferiore a quella della rispettiva esposizione. Anche a livello del VLPOdor l'analisi del parametro intensità ha fatto emergere una differenza tra esposizioni prolungate e recuperi altrimenti non notata, ma in particolare E48R4 mostrava un'intensità media significativamente più elevata del controllo, mentre in E24R4 la differenza con il controllo non era significativa. Nel complesso, emergerebbe una minore intensità dell'attivazione dei nuclei che esprimono c-Fos nel recupero dopo 24 h rispetto a quello conseguente a 48 h di esposizione e, al contrario, una maggiore tendenza dell'attivazione in E48R4 a mantenersi al di sopra dei valori di controllo, che potrebbe essere interpretata nel senso di una più pronunciata propensione a conservare la memoria dell'informazione dell'esposizione là dove essa è stata più prolungata.

Infine, il modello animale attuale (Sprague-Dawley della ditta Charles-River) potrebbe in qualche forma differire dal modello animale impiegato nella serie di esperimenti biochimici (Sprague-Dawley della ditta Harlan-Nossan). Era stato osservato nel recupero di 12 h in seguito a 24 h di esposizione un significativo incremento della quota di sonno REM rispetto ai valori basali, mentre nel recupero dopo 48 h di esposizione l'aumento risultava meno marcato. Analisi preliminari sull'attuale modello animale non sembrano confermare questa differenza. Sembra che il recupero avvenga nello stesso modo a prescindere dalla durata della precedente esposizione. Non sappiamo, tuttavia, in quale misura l'indice biochimico correli con i dati elettroencefalografici. Questi aspetti rimangono quindi ancora ampiamente da indagare.

Una possibile interpretazione dell'immunoreattività citoplasmatica per c-Fos

Sebbene il fattore di trascrizione c-Fos sia una proteina caratteristicamente espressa nel nucleo, ne è stata rivelata la presenza a livello di soma e processi neuronali in più aree anatomiche durante l'esposizione a bassa Ta e peculiarmente in E4 (si veda paragrafo *Pattern caratteristici* nella sezione dei Risultati e Figure 34 e 35). Per quanto sorprendente, soprattutto per la nitidezza e l'intensità del fenomeno, un'approfondita indagine della letteratura sui fattori di trascrizione delle famiglie Fos e Jun ha rivelato come la nostra non sia la prima osservazione in merito, benché costituisca la prima dimostrazione del fenomeno a livello della POA di ratto e, in assoluto, il primo rilevamento nelle porzioni più rostrali della POA e nel MnPO in particolare.

Si parla di marcatura citoplasmatica già nel 1993, in un lavoro che esplorava la regolazione di c-Fos e proteine della famiglia Fra a livello di corteccia cerebrale, striato, ippocampo e cervelletto di ratto (Alcantara e Greenough, 1993)

Al fine di esaminare il ruolo delle fosfoproteine nucleari c-Fos e c-Jun nella funzione retinica sono stati utilizzati Ac policlonali nella tartaruga. In retine adattate al buio, trattate con cobalto per bloccare la trasmissione sinaptica, alcuni aminoacidi eccitatori incrementavano la FLI citoplasmatica nel soma e nei processi di cellule di grosse dimensioni nello strato delle cellule ganglionari (Yaquib et al., 1995).

La FLI può essere utilizzata come marcatore di attività citoplasmatica in pesci teleostei; mediante l'utilizzo di un Ac policlonale diretto verso una regione altamente conservata della sequenza della proteina c-Fos nei mammiferi, la FLI nei motoneuroni di trota arcobaleno si è rivelata interamente citoplasmatica, con un pattern simile a quello della colorazione di Nissl (Bosh et al., 1995).

Marcatura citoplasmatica per c-Fos, oltre che per c-Myc, è stata evidenziata in cellule di mesotelioma maligno e mesotelio pleurico non neoplastico: tutti i mesoteliomi maligni (36 casi) e alcuni dei 45 casi di mesotelio

non neoplastico, indagati mediante un Ac monoclonale murino, presentavano immunoreattività per c-Fos non solo a livello nucleare, ma anche citoplasmatico, in una larga percentuale di cellule (Ramael et al., 1995).

E' stata osservata in neuroni ischemici una intensa e persistente espressione del proto-oncogene c-Fos, considerata conseguenza di un eccessivo rilascio di glutammato in seguito all'insulto ischemico. La marcatura era concentrata all'interno dei nuclei e diffondeva a livello di pericario, dendriti e assoni (Chen et al., 1996).

In linee cellulari tumorali umane (MCF-7) c-Fos e c-Jun apparivano a livello nucleare e citoplasmatico perinucleare entro 60 min dal trattamento estrogenico (Mohamood et al., 1997).

L'espressione citoplasmatica di c-Fos e c-Jun è stata trovata associata ai mitocondri in pneumociti di tipo II e macrofagi del polmone di ratto e a livello dei granuli secretori nelle cellule di Clara dell'epitelio bronchiolare (Haase et al., 1997).

Immunoreattività per Fra-1 è stata riscontrata nelle fibre neuronali di tutti i principali tratti di fibre del cervello di ratto nel corso dello sviluppo, mentre era confinata principalmente a livello delle fibre muscolari dell'ippocampo nel cervello adulto, suggerendo un ruolo citoplasmatico di questa proteina nei neuroni, la quale sarebbe sintetizzata nel pericario e trasportata lungo le fibre (Pozas et al., 1999).

Una localizzazione citoplasmatica del c-Fos è stata osservata nella *Rana esculenta*, mediante reazione immunoistochimica con un antisiero policlonale e confermata dal fatto che estratti citoplasmatici legavano l'oligonucleotide AP-1. In relazione al periodo del ciclo sessuale, la presenza del c-Fos citosolica è stata riscontrata a livello della regione talamica anteriore, dello striato, del Pa e della regione caudale dell'area preottica anteriore (Cobellis et al., 1999). E' stata riscontrata inoltre nel compartimento citoplasmatico degli spermatogoni primari, nel periodo di riposo dell'annuale ciclo riproduttivo, utilizzando un Ac rivolto contro un dominio altamente conservato della famiglia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2). Il Western blot ha mostrato una banda a 52 kDa (Cobellis et al., 2002).

La marcatura per c-Fos e c-Jun era frequentemente localizzata a livello citoplasmatico in cellule di adenocarcinoma della prostata, ma non nell'iperplasia benigna; l'Ac anti-c-Fos era un policlonale diretto contro l'epitopo aminotermine umano e contro c-Jun sono stati impiegati sia un monoclonale sia un policlonale. L'immunoreattività dei relativi Ac era bloccata dalla preincubazione con il peptide immunogeno (Gavrilov et al., 2001). Gli stessi autori citano l'occasionale ritrovamento di marcatura citosolica per c-Fos e c-Jun in cellule tumorali di polmone, ovaio, vescica e mammella da parte di altri autori.

Tian e Bishop hanno riscontrato la presenza di diffusa marcatura di somi e dendriti primari a livello di cellule di Purkinje cerebellari in ratti di controllo e stimolati mediante somministrazione di ammalina, un MAO inibitore, utilizzando tre Ac anti-c-Fos della Santa Cruz, ma non con l'Ac Ab5 della Oncogene, considerato più specifico e lo stesso da noi impiegato. Gli autori concludono, anche grazie ad analisi di Western blot, che una proteina localizzata a livello citoplasmatico in somi e dendriti di cellule di Purkinje con sequenza simile a quella del c-Fos, ad identità non nota, verosimilmente diversa da Fra-1 e Fra-2 (Tian e Bishop, 2002).

Nella mucosa orale umana normale, immunoreattività citoplasmatica per c-Jun è stata rilevata negli strati basali più elevati, dove diventa nucleare nella transizione del tessuto da normale a neoplastico (de Sousa et al., 2002).

L'investigazione della distribuzione dei membri della famiglia AP-1 nell'ovaio porcino ha portato al rilevamento, tramite Western blot, di c-Fos nella frazione citoplasmatica del corpo luteo, nonché di Fos-B in quella delle cellule della granulosa e di Fra-1 in entrambe (Rusovici e LaVoie, 2003).

Attraverso la stessa tecnica, è stata rivelata l'espressione prevalentemente citoplasmatica di c-Fos e JunD in colture di linee cellulari promielocitiche umane (PLB-985) (Cloutier et al., 2003).

I livelli di espressione delle proteine c-Jun e Fra-1 sono risultate marcatamente più elevati in adenomi, adenocarcinoma e carcinomi neuroendocrini del colon retto nell'uomo rispetto alle cellule non neoplastiche. Inoltre, la

incrementata espressione di JunB era predominante a livello citoplasmatico (Zhang et al., 2005).

Recentemente, la modifica del pattern di espressione di Fra-1, da esclusivamente nucleare a contemporaneamente nucleare e citoplasmatico, è stata messa in relazione con la trasformazione maligna nei tumori mammari (Song et al., 2006).

Infine, la proteina c-Fos è stata trovata associata al reticolo endoplasmico, dove attiverebbe la sintesi di fosfolipidi durante la crescita e differenziazione cellulare (Portal et al., 2007).

Da questa rivisitazione della letteratura, emerge come la possibilità di marcatura citoplasmatica da parte di Ac rivolti nei confronti di membri della famiglia Fos e Jun sia relativamente rara considerata la mole elevatissima di lavori che studiano queste proteine o che, più spesso, utilizzano la rilevazione di questi Ag come strumento di analisi. Frequentemente essa è stata riscontrata in cellule trasformate, ma è stata anche associata a condizioni fisiologiche, primariamente a livello cerebrale, nel ratto e in altre specie. La specificità per c-Fos del pattern citoplasmatico in genere non è attestata, tuttavia in un lavoro è stato impiegato un Ac monoclonale (Ramael et al., 1995) e un altro studio avrebbe riconosciuto la presenza di c-Fos nella frazione citosolica di cellule del corpo luteo tramite Western blot (Rusovici e LaVoie, 2003). Inoltre, Tian e Bishop affermano di non aver potuto rilevare immunoreattività citoplasmatica in cellule di Purkinje cerebellari, proprio impiegando l'Ac da noi utilizzato, laddove questa era stata evidenziata mediante l'impiego di altri tre Ac, due dei quali considerati specifici per c-Fos (Tian e Bishop, 2002). Sebbene questi elementi siano indiziali di una maggiore specificità dell'Ac impiegato in questo lavoro, non si può escludere che un'altra molecola sia stata riconosciuta a livello di soma e prolungamenti di neuroni ipotalamici ed extra-ipotalamici di ratti esposti a bassa Ta. Ad ogni modo/In ogni caso, la sua espressione sarebbe attività-dipendente, non essendo rilevabile nei controlli, né nei recuperi e riducendosi drammaticamente con il perdurare dello stimolo.

Un emergente corpo di evidenze indicherebbe un possibile ruolo dei fattori di trascrizione in un sistema di comunicazione tra nucleo e sinapsi: il fattore di trascrizione inducibile NF- κ B è stato rilevato a livello di sinapsi di corteccia cerebrale e ippocampo, in maniera attività-dipendente; inoltre, è stato dimostrato che il messaggero del fattore di trascrizione costitutivo CREB e la proteina da esso codificata erano entrambi presenti in dendriti di neuroni dell'ippocampo in fase di sviluppo e che la fosforilazione della proteina CREB sul residuo Ser-133 poteva avvenire anche in dendriti isolati. La proteina CREB era presente a livello post-sinaptico e, se microperfusa in dendriti, veniva trasportata e concentrata nel nucleo di neuroni di ippocampo in coltura. E' stato suggerito che il trasporto retrogrado di fattori di trascrizione localizzati nei dendriti possa essere importante nel modulare l'espressione genica, aggirando diverse vie intracellulari di trasduzione del segnale che convergono sul nucleo. Inoltre, la ricerca di analoghe proprietà in membri della famiglia Fos ha fatto emergere la localizzazione di Fra-1 e dell'isoforma da 55 kDa della proteina c-Fos a livello sinaptico in ippocampo e corteccia cerebrale di ratto, mentre l'isoforma da 62-65 kDa era presente solo in estratti nucleari (Paratcha et al., 2000).

Conclusioni

Questo studio si inserisce nella linea di ricerca sui meccanismi alla base del ciclo veglia-sonno, che utilizzano come marcatore di attività neuronale l'espressione di c-Fos, al fine di ottenere una mappatura (anatomo-)funzionale delle aree implicate nella regolazione di tale ciclo, così universalmente diffuso tra i mammiferi.

L'originalità di questo studio consiste nell'aver applicato la tecnica immunocitochimica ad un modello che utilizza l'interferenza tra altri di sistemi di regolazione fisiologica e i sistemi che regolano l'omeostasi ipnica per manipolare il ciclo veglia-sonno, sulla scia delle tradizionali linee di ricerca del nostro laboratorio.

I primi dati disponibili, relativi all'analisi della marcatura per c-Fos a livello di due importanti nuclei della POA, il MnPO e il VLPO, hanno rafforzato precedenti osservazioni di carattere neurofisiologico sull'intervento di sottogruppi cellulari della POA nella regolazione del ciclo veglia-sonno.

Tabelle

	50 ml	100 ml	250 ml	500 ml	1000 ml	2000 ml
	PBS PBSN PBSNT 0,01M (pH 7,4)					
Na ₂ HPO ₄ (p.m. 141,96) ¹	-	-	0,2875 g	0,575 g	1,15 g	2,30 g
KH ₂ PO ₄ (p.m. 136,09) ²	-	-	0,05 g	0,10 g	0,20 g	0,40 g
NaCl (p.m. 58,44) ¹	-	-	2,00 g	4,00 g	8,00 g	16,00 g
	-	-	2,25 g*	4,50 g*	9,00 g*	18,00 g*
KCl (p.m. 74,56) ²	-	-	0,05 g	0,10 g	0,20 g	0,40 g
NaN ₃ 0,01% (p.m. 65,01) ¹	-	-	-	-	0,10 g	0,20 g
Triton X-100 0,3% ²	-	-	0,75 ml	1,50 ml	3,00 ml	6,00 ml
	Tampone PO₄ 0,1M (pH 7,4)					
NaH ₂ PO ₄ (p.m. 156,01) ³	-	-	0,78 g	1,56 g	3,12 g	6,24 g
Na ₂ HPO ₄ (p.m. 141,96) ¹	-	-	2,84 g	5,68 g	11,36 g	22,72 g
	PARAFORMALDEIDE 4% in tampone PO₄ 0,1M					
PARAFORMALDEIDE ¹	-	-	-	-	40,00 g	80,00 g
	SACCAROSIO 20% in tampone PO₄ 0,1M					
SACCAROSIO (p.m. 342,30) ¹	10,00 g	20,00 g	50,00 g	100,00 g	-	-
	TRIS - HCl 0,05 M (pH 7,4)					
TRIS base (p.m. 121,14) ¹	-	-	-	-	6,057 g	12,114 g
	portare a pH 7,4 con una soluzione di HCl 6,0 M					
	HCl 6,0 M					
HCl 37% (p.m. 36,47) ³ 1l = 1,19 kg	-	-	-	248,35 ml	-	-
	GELATINA					
GELATINA ¹	-	0,50 g	-	2,50 g	-	-
CrK(SO ₄) ₂ (p.m. 499,40) ¹	-	0,05 g	-	0,25 g	-	-
	KMnO₄ 0.2M					
KMnO ₄ (p.m. 158,04) ¹	-	-	-	-	-	63,214 g
	H₂SO₄ 2.0M					
H ₂ SO ₄ 95-97% (p.m. 96,08) ³ 1l = 1,84 Kg	-	-	-	-	-	227,7 ml

Tabella 1. Soluzioni di più comune impiego in laboratorio. 1, Sigma-Aldrich; 2, Fluka; 3, Merk; * concentrazione utilizzata per le reazioni immunostochimiche, quindi anche in PBSN e PBSNT. Per gli acronimi, si veda *Indice delle abbreviazioni*

Tabella 2. Consistenza, colore e simmetria dell'encefalo al momento dell'estrazione in 49 ratti (comprendenti i 24 della fase sperimentale) fissati con la tecnica di perfusione transcadiaca per incannulamento dell'aorta con ago smusso. La consistenza è valutata su una scala arbitraria da 1 a 10. F, lobo frontale; T, lobo temporale; P, lobo parietale; O, lobo occipitale; Fp parte posteriore del lobo frontale; Op, parte posteriore del lobo occipitale; +, assenza di asimmetrie evidenti; -, lievissima asimmetria tra i due emisferi; --, asimmetria evidente, tra parentesi l'emisfero di minore dimensione.

Blocco sperim	Ratto	Condiz sperim	Rigidità corporea	E n c e f a l o		
				consistenza	colore	simmetria
23	74	C4	+++	9	bianco	-- (FT dx)
23	77	C24	+++	9	bianco	non rilevata
23	78	E4	+++	8	bianco	+
24	83	E4	+++	8/9	bianco	+
24	84	C4	+++	9	bianco	+
24	86	C24	+++	8/9	bianco	-- (dx)
25	88	C4	+++	8/9	bianco	- (dx)
25	90	E4	+++	8/9	bianco	- (dx)
25	91	C24	+++	9	bianco	- (dx)
25	93	E48	+++	8/9	bianco	- (dx)
25	94	E48R4	+++	8/9	bianco	+/- (TP dx)
27	97	E48R4	+++	8/9	bianco	+
28	98	C24	+++	8	bianco	+
28	103	C4	+++	8/9	bianco	+
29	105	C24	+++	8	bianco	- (F _p dx)
29	106	E4	+++	8/9	bianco	- (dx)
29	108	E48R4	+++	8/9	bianco	- (+ espanso PTdx)
29	109	C24	+++	8	bianco	- (FTP sx)
30	111	E24R4	+++	8	bianco	- (sx, spt T)
30	113	E48R4	(++)/+++	8	bianco	- (sx + stretto e allung)
30	114	C24	+++	8	bianco	+
30	115	C4	+++	8/9	bianco	- (dx)
31	117	E4	+++	8/9	bianco	-- (Fdx)
31	118	E24	+++	9	bianco	-- (Tdx)
31	119	C4	+++/(++)	8	bianco	+
31	122	E24R4	+++	(8)/9	bianco	+
31	120	E48	+++/(++++)	8/9	appena rosaceo in F _p T	- (TPdx)
31	121	E4	+++	8	appena rosaceo in F _p T	+
28	102	E48	+++	8/9	lievemente rosato F _p PT	+/- (FPT dx)
29	110	E24R4	+++	8	lievemente rosato F _p dx	- (sx + stretto e allung)
23	75	E24	+++	6	rosaceo	non rilevata
23	76	E24R4	+++	8	rosa pallido	non rilevata
23	79	E48	+++	9	rosaceo PT	- (sx)
23	80	E48R4	+++	9	nuance rosata PT	- (dx)
24	82	E48	+++	8/9	nuance rosata PT	+
24	81	E24	+++	8/9	rosato PT	+
26	96	E48R4	+++(+)	7/8	rosaceo PT	-- (dx)
28	99	E24R4	+++	7	rosaceo	+
28	100	E24	++/+++	7/8	rosato F _p PTO _p	+
28	101	E48R4	+++	8/9	rosato Tdx	+
28	104	E4	+++	8/9	rosato F _p PTsx Tdx	- (FTP sx)
29	107	E48	+++	8/9	rosa sul confine FTdx	+/- (Fdx)
30	112	E24	++/+++	8	rosato in FT	- (dx, spt FTP)
30	116	E48R4	+++	9	rosato in FTP	+
24	85	E48R4	+++	7/8	rosa FIPO sx	- (sx)
24	87	E24R4	+++(+)	5/6	rosa diffuso	+
25	89	E24	+++	(7)/8	rosa TP	+/- (sx)
25	92	E24R4	+++	8	rosa FIPO dx	- (sx)
25	95	E24R4	+++	8/9	rosa TP	- (O _{sx})

	C O R T E C C I A									N U C L E I							
	Cg	M2	M1	S1	S2	Insula	Pir	CxA	Tu	LSV	LSI	LSD	CPu*	Cl	DEn	VEn	
C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H15'	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
H30'	-	+	-	-	+	-	++	-	-	+	+	-	-	++	+	++	
H45'	+++	++	++	++	++	++	++++	++	-	++++	-	-	+	+++	+++	+++	
H60'	+	++	++	++	++	++	++++	++++	++	++++	++	-	+	++	+++	++++	++++
H90'	++	++	+	+	+	+	++++	++++	++	++++	+	+	+	++	+++	+	

	I P O T A L A M O									
	ADP	StA	PS	MPA	LPO	VLPO	Pa	Pe	MPO	
C	-	-	-	+	+	-	+	-	-	
H15'	-	-	-	+	+	-	+	-	+	
H30'	++	-	-	++	++	-	++	+	++	
H45'	+++	-	+++	+++	++	++	++	++	+++	
H60'	+++++	+++++	++	+++++	++++	-	+++++	++	++++	
H90'	++++	++++	++++	++++	+++	-	+++	+	++	

Tabella 3. Metodo di incremento aspecifico dell'attivazione tissutale tramite esposizione ad uno stimolo ipossico acuto (21 sec). Analisi semiquantitativa dell'espressione dell'Ag nucleare c-Fos in diverse zone cerebrali. C, controllo

P R O F O N D I							T A L A M O								
IPAC	BST	SI	HDB/MCPO	Amigdala	LOT	ZI	PVA	PT	PC	CM	IAM	Re	AV	MD	Rt
-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
-	+	-	-	+	-	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
-	++	-	+	++	+	+++	++++	-	-	++	-	++	++	+	++
+	++	++	++	+	++	-	++++	++	+	-	-	++	++	-	++
-	+++	++	-	++++	+++	+++	++++	+	+++	++	+	++	++	++++	++
-	+++	++	-	+++	+++	-	++++	+	++	++	-	++	+	-	++

I P O T A L A M O											
VMPO	SCh	LA	SO	VLH	LH	AHA	AHC	AHP	RCh	TuLH	
+	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+	++	-	-	+	-	-
++	+	++	-	+	++	+	++	++	-	-	-
++	+	++++	+	++	++++	++	++	-	+++	-	-
++	+++	++++	+	+++	+++	+++	++++	+++	++	+++	+++
-	+	++++	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++

normossico; H15', H30', H45', H60', H90', stimolo ipossico seguito rispettivamente da 15, 30, 45, 60, 90 min di attesa prima del sacrificio; *, CPu periventricolare. Per gli acronimi, si veda *Indice delle abbreviazioni*.

Num progr ratto	Blocco sperim	Condizione	Adattamento (giorni)	Peso (g) h 09.00 ultimo giorno di adattamento	Peso (g) prima della perfusione h 09.15 o 13.45	Codice identif ratto
99	I	E24R4	7	273	269	28 pl2
100	I	E24	8	282	266	28 pl4
101	I	E48R4	7	280	262	28 pl5
102	I	E48	8	277	250	28 pl6
103	I	C4	10	294	291	28 pl1
104	I	E4	11	317	309	28 pl3
105	II	C24	7	258	275	29 pl3
106	II	E4	8	264	262	29 pl4
107	II	E48	7	270	256	29 pl1
108	II	E48R4	7	262	263	29 pl6
109	II	C24	9	282	286	29 pl5
110	II	E24R4	9	279	273	29 pl2
111	III	E24R4	6	256	249	30 pl3
112	III	E24	7	284	269	30 pl5
113	III	E48R4	6	274	257	30 pl1
114	III	C24	8	266	285	30 pl4
115	III	C4	9	283	279	30 pl2
116	III	E48R4	8	258	252	30 pl6
117	IV	E4	6	271	265	31 pl1
118	IV	E24	6	285	256	31 pl2
119	IV	C4	7	282	279	31 pl4
120	IV	E48	6	285	249	31 pl6
121	IV	E4	8	289	280	31 pl5
122	IV	E24R4	8	283	271	31 pl3

Tabella 4. Riassunto schematico della fase sperimentale. Gli animali, suddivisi in 4 blocchi, venivano assegnati alle condizioni sperimentali (si confronti la Figura 10) in maniera casuale. Poiché le perfusioni avvenivano solo in corrispondenza di due tempi precisi del ciclo LB (h 09:15 e 13:45), i giorni di adattamento presentavano una conseguente variabilità. Al momento del processamento immunoistochimico delle sezioni tissutali, ogni ratto riceveva un codice identificativo, composto dal numero del blocco sperimentale, seguito dal numero della piastra di assegnazione per il processamento immunoistochimico (pl, dall'inglese *plate*).

	griglia (μm)	N	N -10	SO	SO-10	AS	AS-10 (diff %)	WS	WS-10 (diff %)
28 F2A4 24	301 x 494	226	143	288	197	253	169 (-14.21)	264	172 (-12.69)
28 F2C4 14	615 x 600	1231	766	1534	1030	1362	881 (-14.47)	1440	921 (-10.58)
29 F2A4 24	300 x 387	287	172	334	205	304	186 (-9.27)	323	191 (-6.83)
30 F3C4 14	603 x 602	1072	486	1289	642	1189	565 (-11.99)	1293	602 (-6.23)
30 F3D2 17	602 x 604	892	516	1157	666	991	595 (-10.66)	1082	617 (-7.36)
30 F3D4 19	602 x 602	699	478	831	594	763	533 (-10.27)	794	544 (-8.42)

Tabella 5. Confronto tra diversi metodi di separazione di raggruppamenti di oggetti sopra soglia (nuclei marcati), mediante funzioni del programma di analisi d'immagine Image Pro Plus 4.5. N, numero di oggetti sopra soglia; SO, *Split Objects* (separazione manuale, in questo caso senza controllo al microscopio); AS, *Auto-Split*; WS, *Watershed Split* (entrambe funzioni automatiche); -10, applicazione di un filtro d'area pari a $10 \mu\text{m}^2$. Le funzioni AS e WS, dopo applicazione del filtro d'area, sono confrontate *versus* SO-10.

griglia di conteggio			m e t o d o	
dimensioni (μm)	vetrino	nome	classico	standardizzato
300 x 600	28 F3D2 17	vMnPO6	247	254
300 x 600	28 F1C4 14	vMnPO6	45	34
300 x 600	28 F4D4 19	vMnPO6	231	247
300 x 300	28 F5C2 12	rMnPO1	148	166
300 x 300	28 F4D2 17	rMnPO3	153	170
300 x 300	28 F2C4 14	rMnPO1	263	269

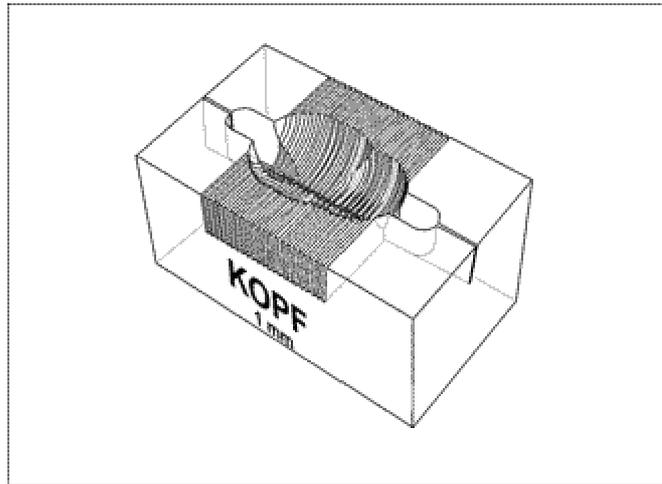
Tabella 6. Confronto tra metodo classico di conteggio, mediante analisi visiva dell'immagine da parte di un osservatore esperto in immunocistochimica, e il metodo di conteggio da noi elaborato, in cui la soglia di positività risultava standardizzata sul background, grazie a procedure digitali.

Contrasto	C4	C24	E4	E24	E48	E24R4	E48R4
1	2,5	2,5	-1	-1	-1	-1	-1
2	0	0	4	-1	-1	-1	-1
3	0	0	0	1	1	-1	-1
4	1	-1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	-1	0	0
6	0	0	0	0	0	1	-1

Tabella 7. Contrasti pre-pianificati: coefficienti di contrasto.

Figure

A



B

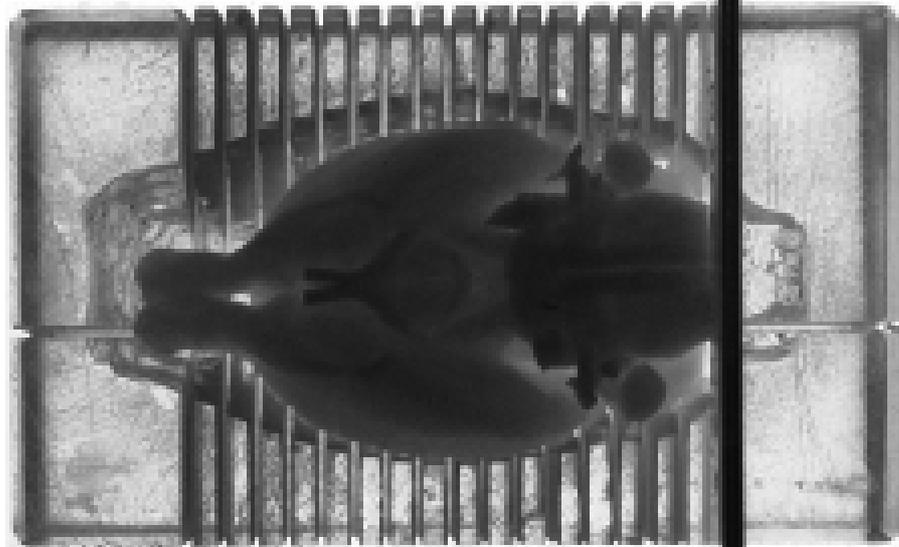
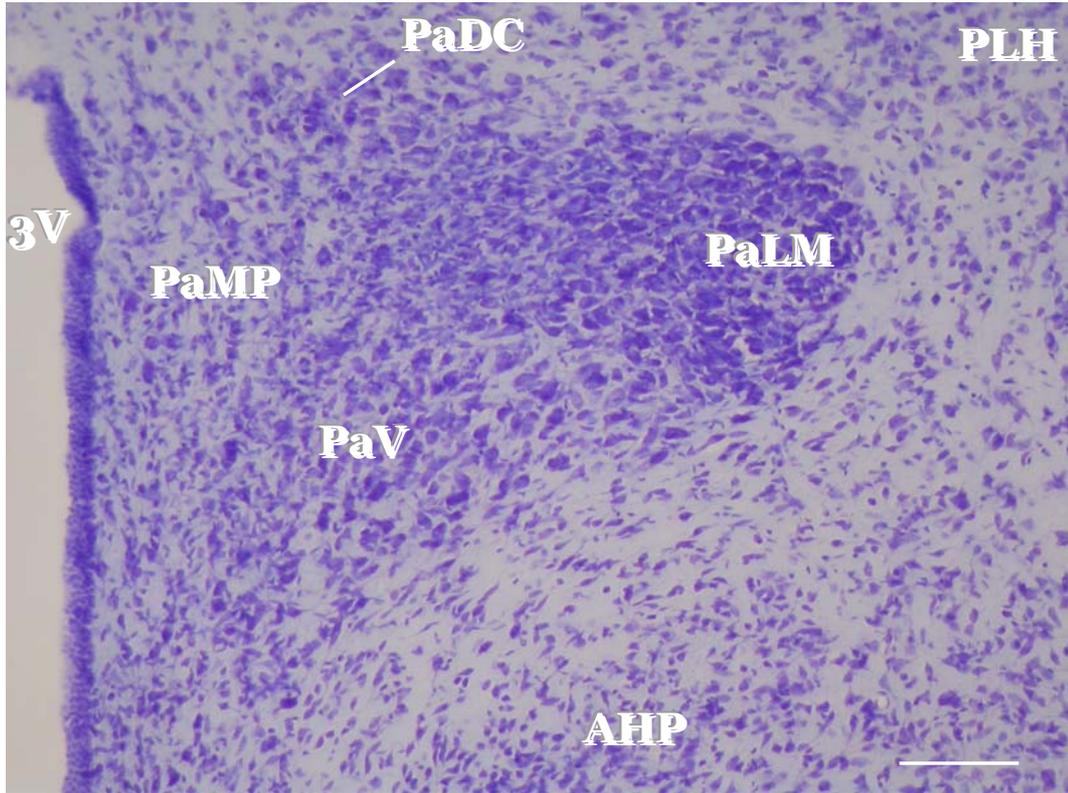


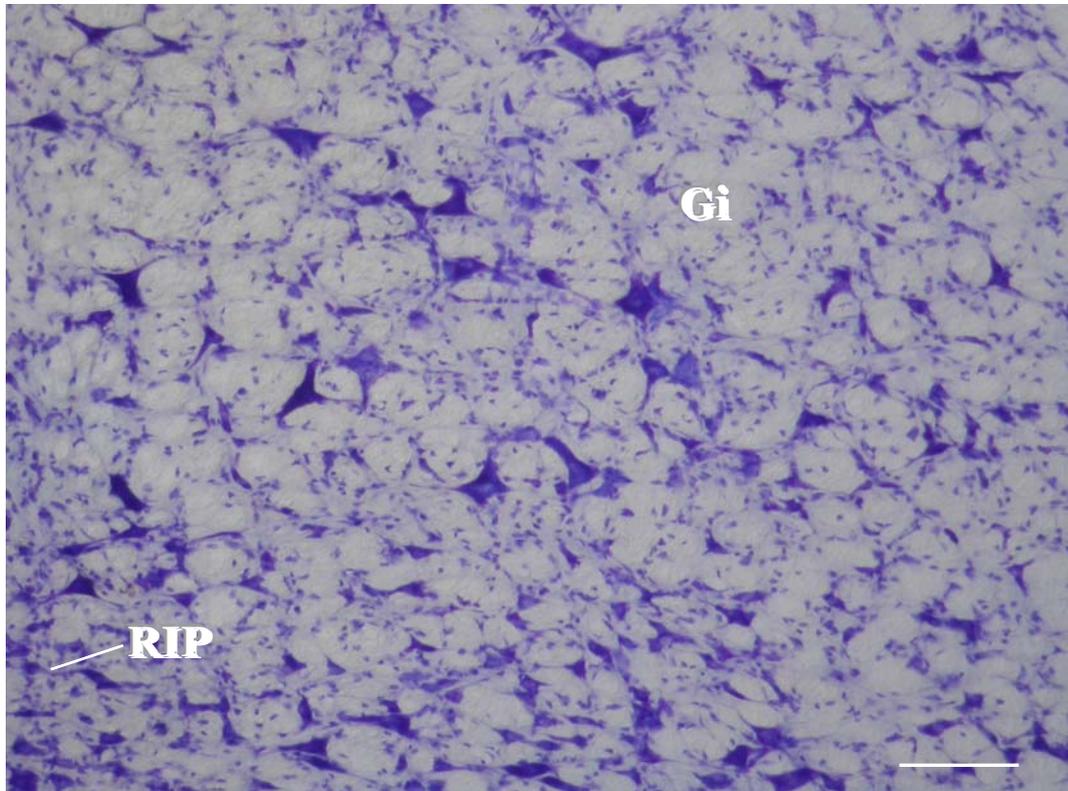
Figura 1. Brain blocker. **A** Disegno tratto da: www.kopfinstruments.com. **B** Fotografia tratta da Paxinos e Watson, 1998.

Figura 2. Sezioni coronali di encefalo di ratto colorate con cresil violetto. Le immagini sono state acquisite a 100 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 3x), collegata al microscopio ottico da apposito raccordo. **A** Prosencefalo: è visibile il nucleo paraventricolare ipotalamico. **B** Rombencefalo: formazione reticolare gigantocellulare bulbare, in prossimità della giunzione bulbo-pontina. Il riferimento in basso a destra equivale a 100 μm . Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

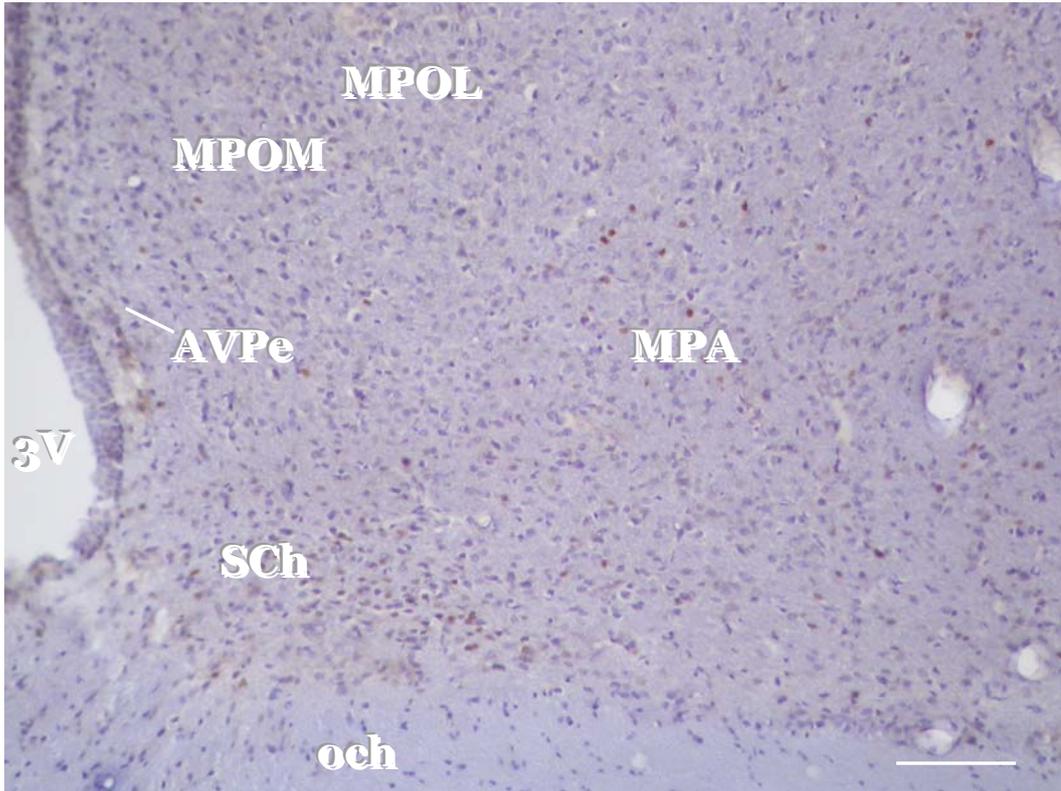
A



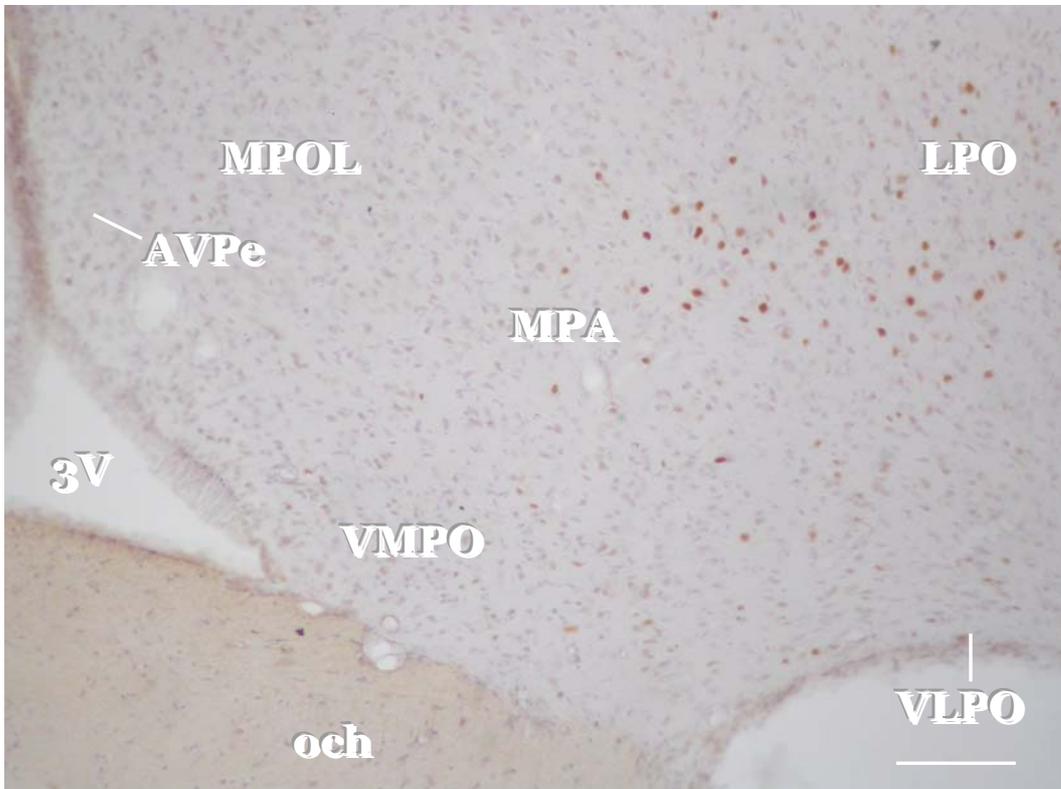
B



A



B



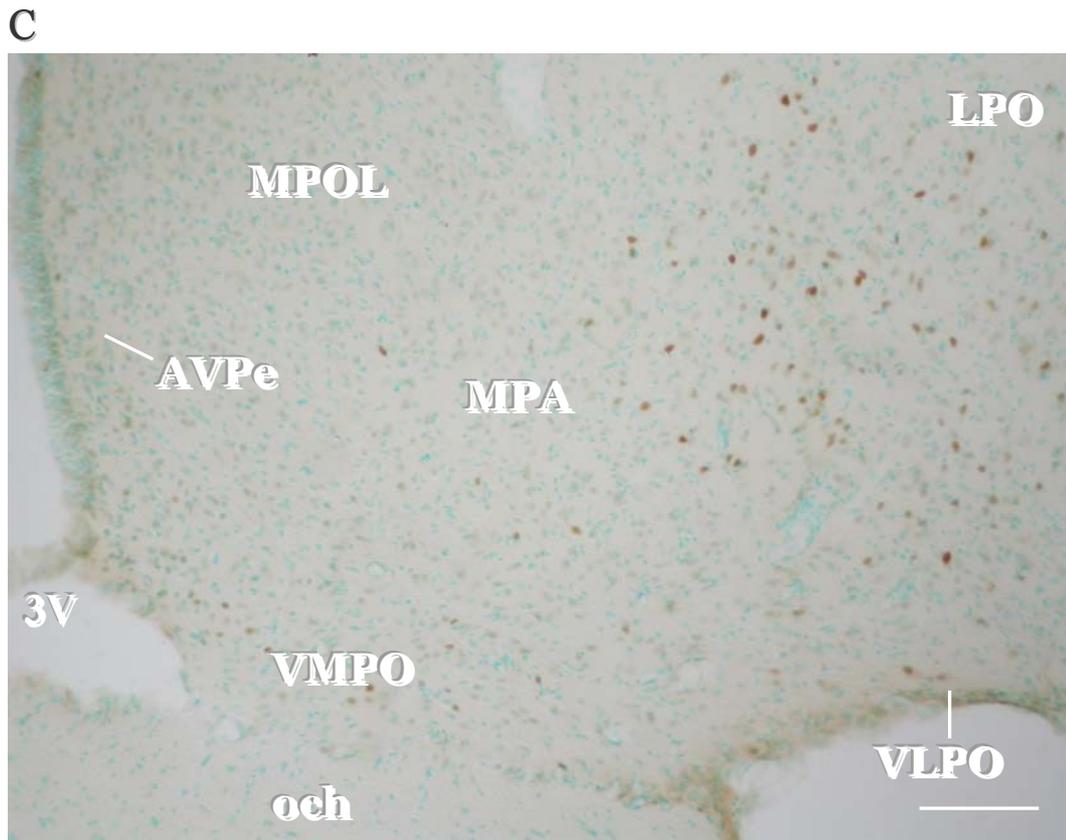


Figura 3. Colorazioni di contrasto su sezioni coronali marcate per l'Ag nucleare c-Fos. Le immagini sono state acquisite a 100 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 3x), collegata al microscopio ottico da apposito raccordo. **A** Ematossilina di Harris. **B** Ematossilina di Mayer. **C** Verde di metile. Il riferimento in basso a destra equivale a 100 μ m. Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

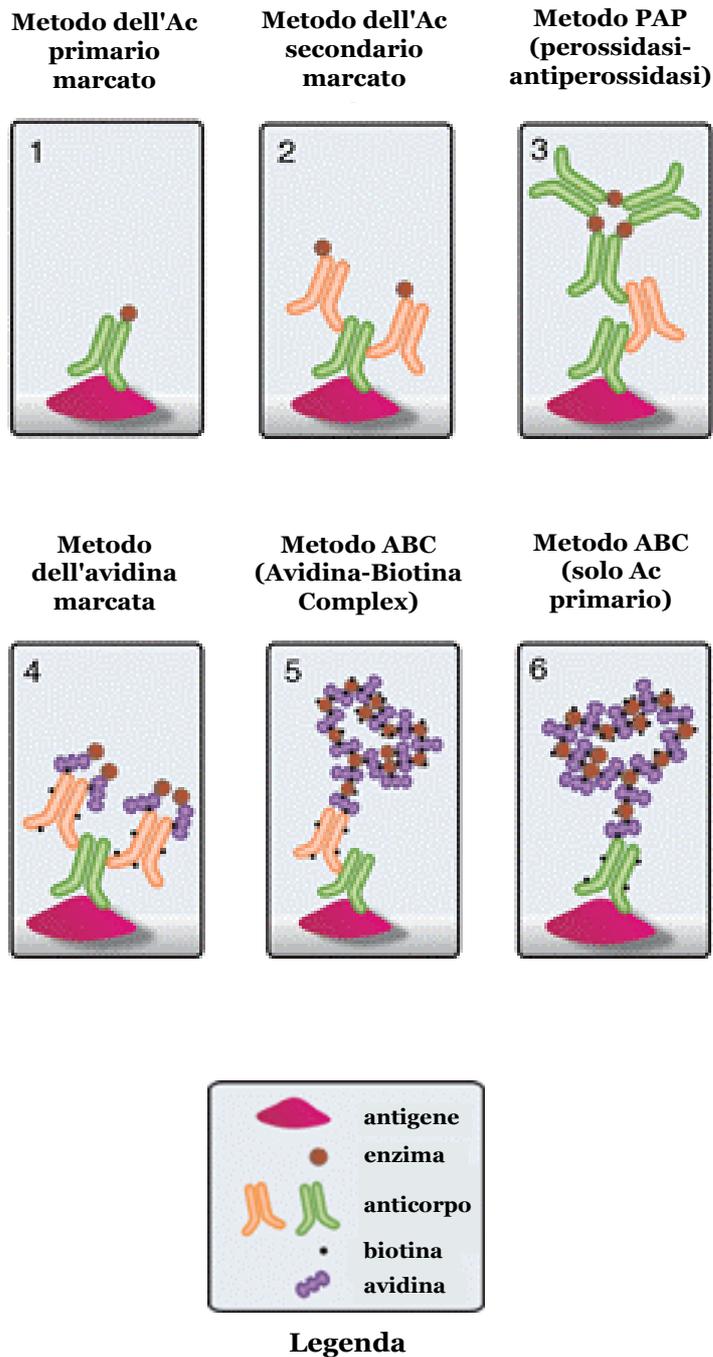


Figura 4. Metodi di evidenziazione dell'immunocomplesso derivante dalla reazione dell'antigene tissutale di interesse con l'anticorpo specifico (tratta da <http://www.vectorlabs.com>)

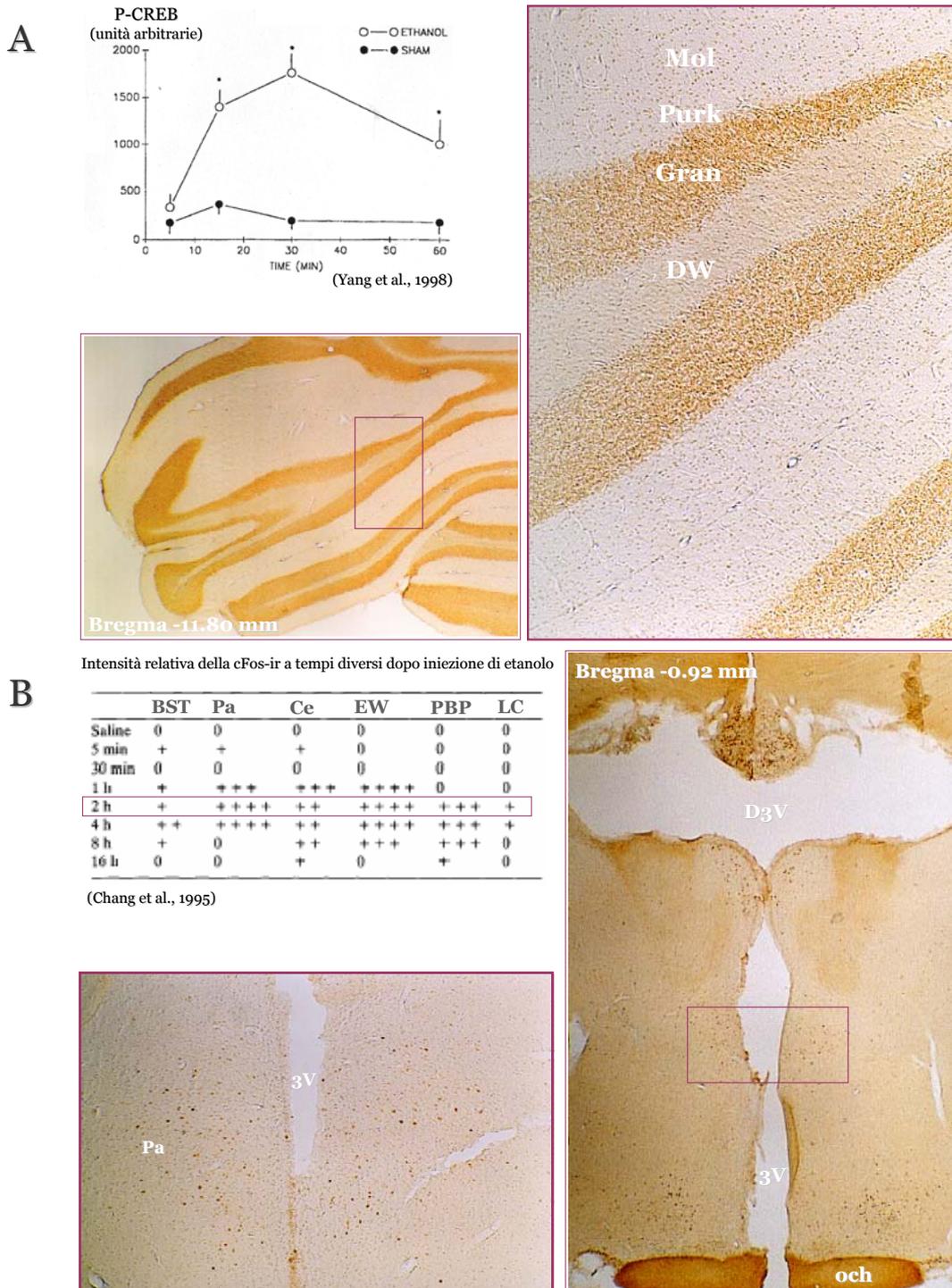


Figura 5. Modello di attivazione tissutale per somministrazione i.p. di etanolo (**A** P-CREB; **B** c-Fos). Le immagini sono state acquisite a 32 e 125 ingrandimenti con fotocamera analogica reflex, direttamente connessa al microscopio ottico. Nota: i riferimenti anatomici sono relativi all'atlante Paxinos e Watson, 1998. Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

A

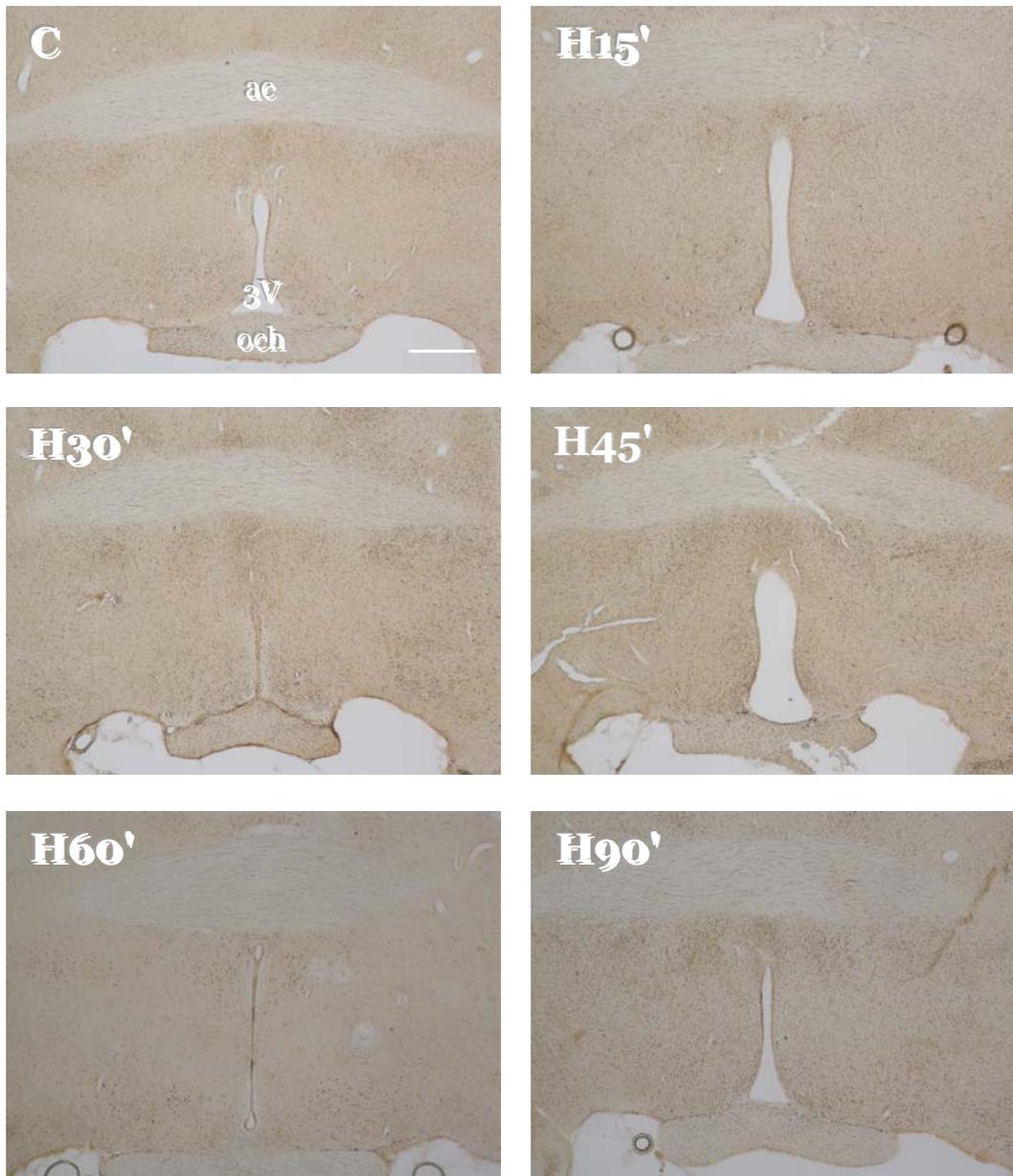
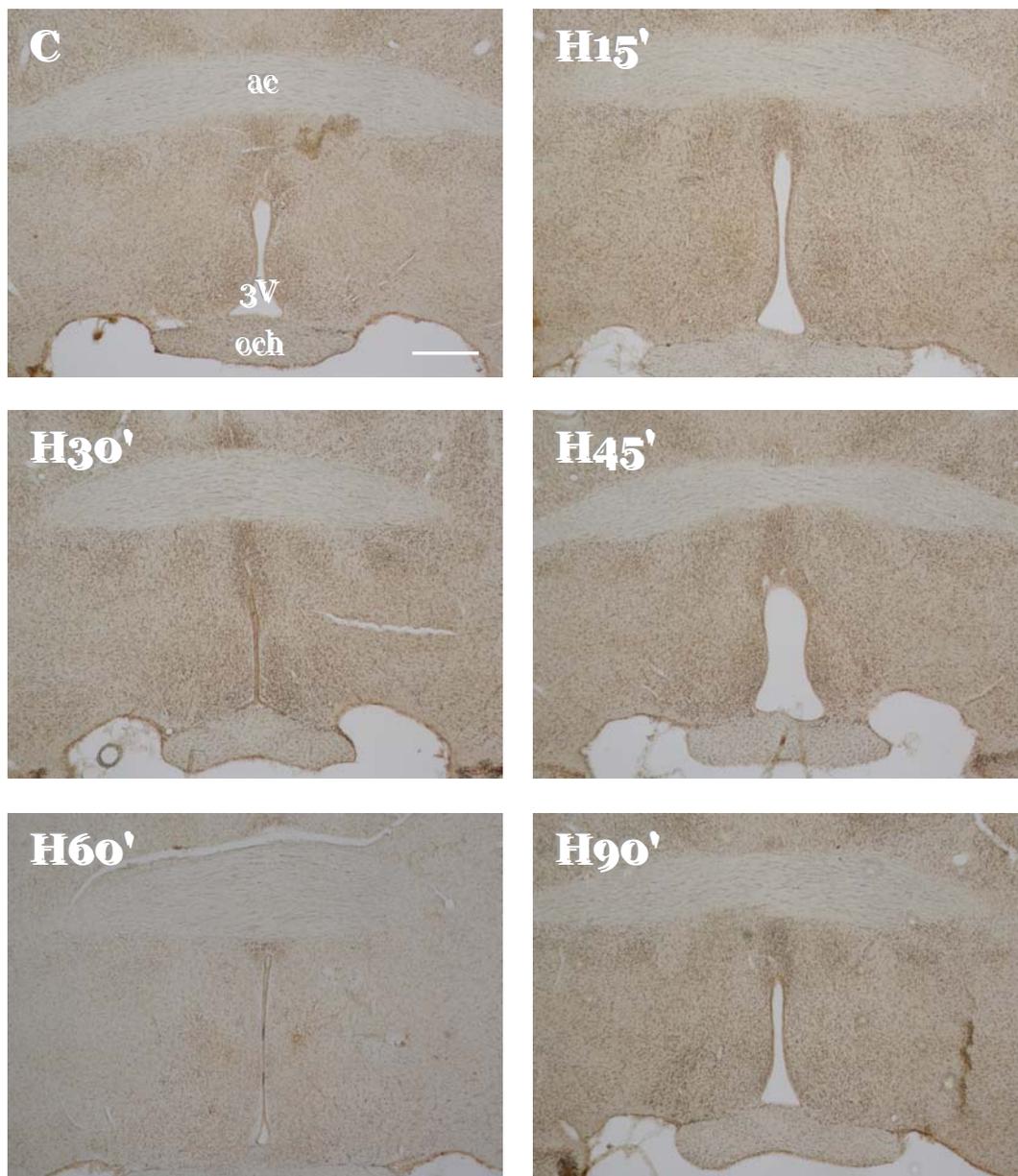


Figura 6. Metodo di incremento aspecifico dell'attivazione tissutale tramite esposizione ad uno stimolo ipossico acuto (21 sec). Immunoreattività per c-Fos (A) e P-CREB (B) su sezioni coronali di cervello di ratto a livello della PO-AH. Le immagini sono state acquisite a 32 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 2,6x), collegata al microscopio ottico da apposito raccordo. C, controllo,

B



normossico; H15', H30', H45', H60', H90', stimolo ipossico seguito rispettivamente da 15, 30, 45, 60, 90 min di attesa prima del sacrificio. Il riferimento in basso a destra nella prima immagine di ogni serie equivale a 500 μm . Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

A

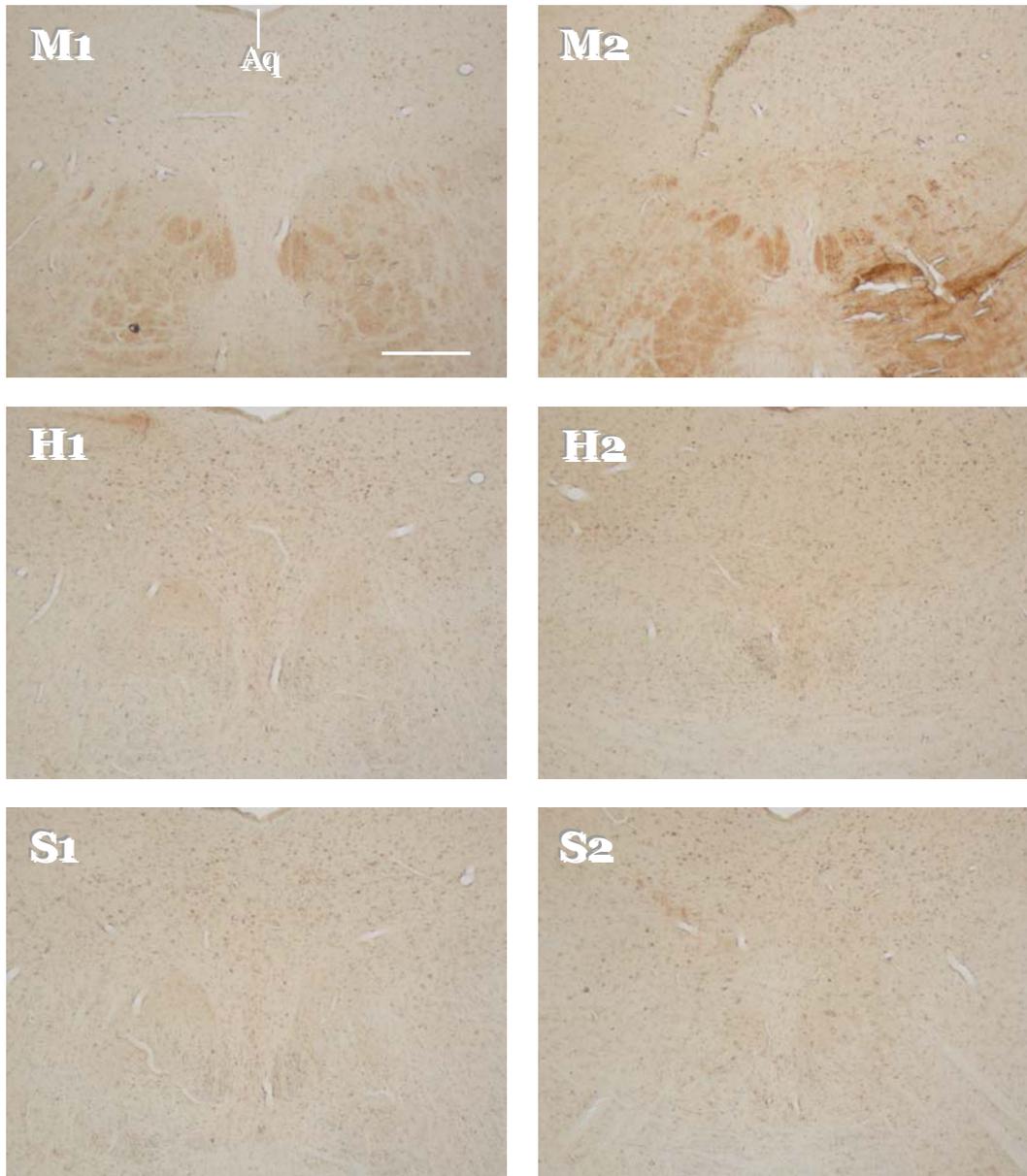
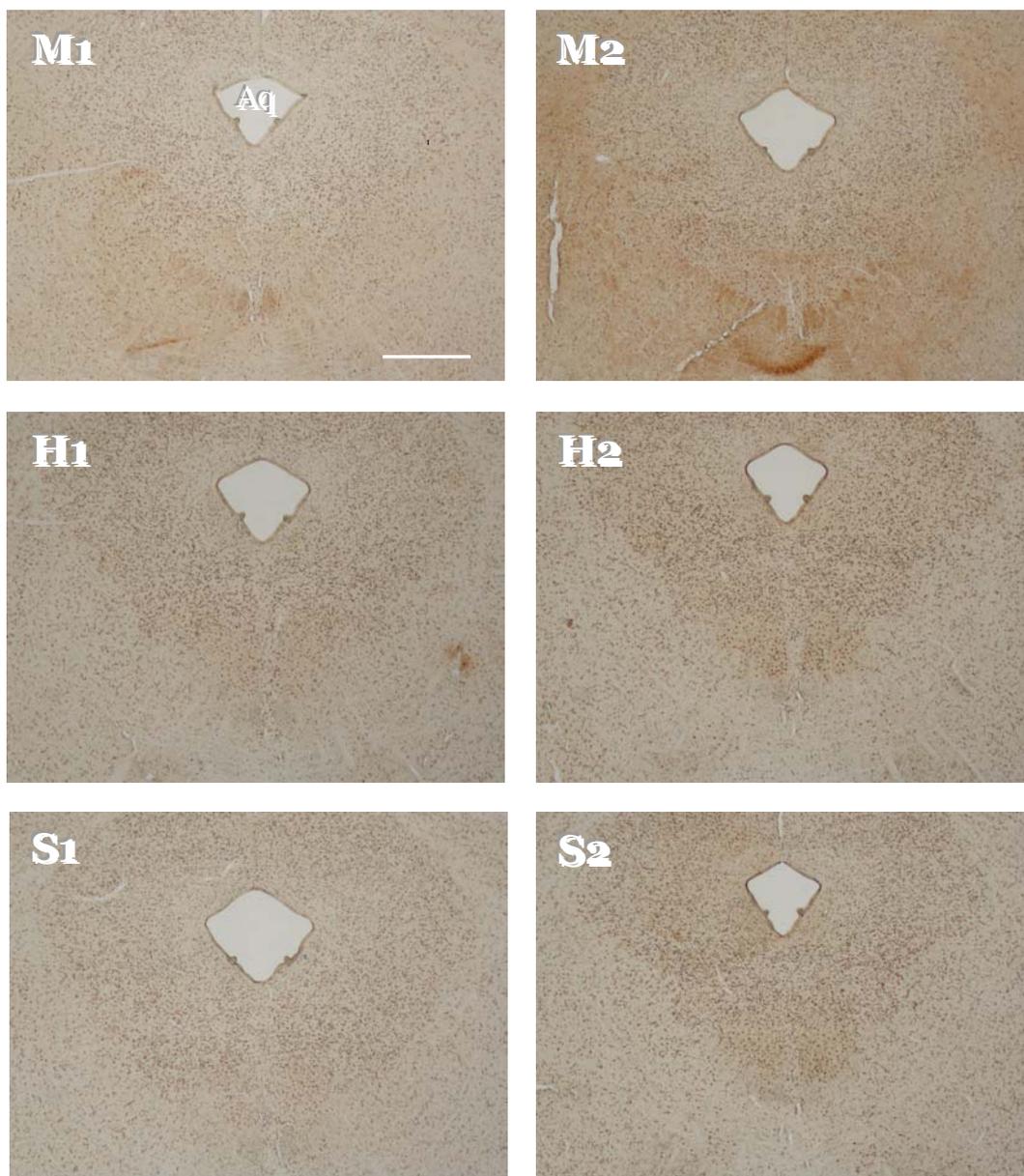


Figura 7. Studio della fase di inattivazione delle perossidasi endogene, su sezioni coronali mesencefaliche, provenienti da animali in condizione di controllo esposti a stimolo ipossico acuto, seguito da 90 min di attesa per c-Fos (H90', **A**) e da 15 min di attesa per P-CREB (H15', **B**). Effetti di diversi protocolli sulla marcatura specifica e aspecifica. Le immagini sono state acquisite a 100 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 3x), collegata al microscopio

B



ottico da apposito raccordo. M, H₂O₂ 0,3% in Metanolo; H, H₂O₂ 0,3% + Metanolo 70% in H₂O; S, H₂O₂ 0,3% + Metanolo 70% in PBS; 1: precedente all'incubazione con Ac primario; 2: seguente all'incubazione con Ac primario. Il riferimento in basso a destra nella prima immagine di ogni serie equivale a 100 μ m. Aq, acquedotto di Silvio.

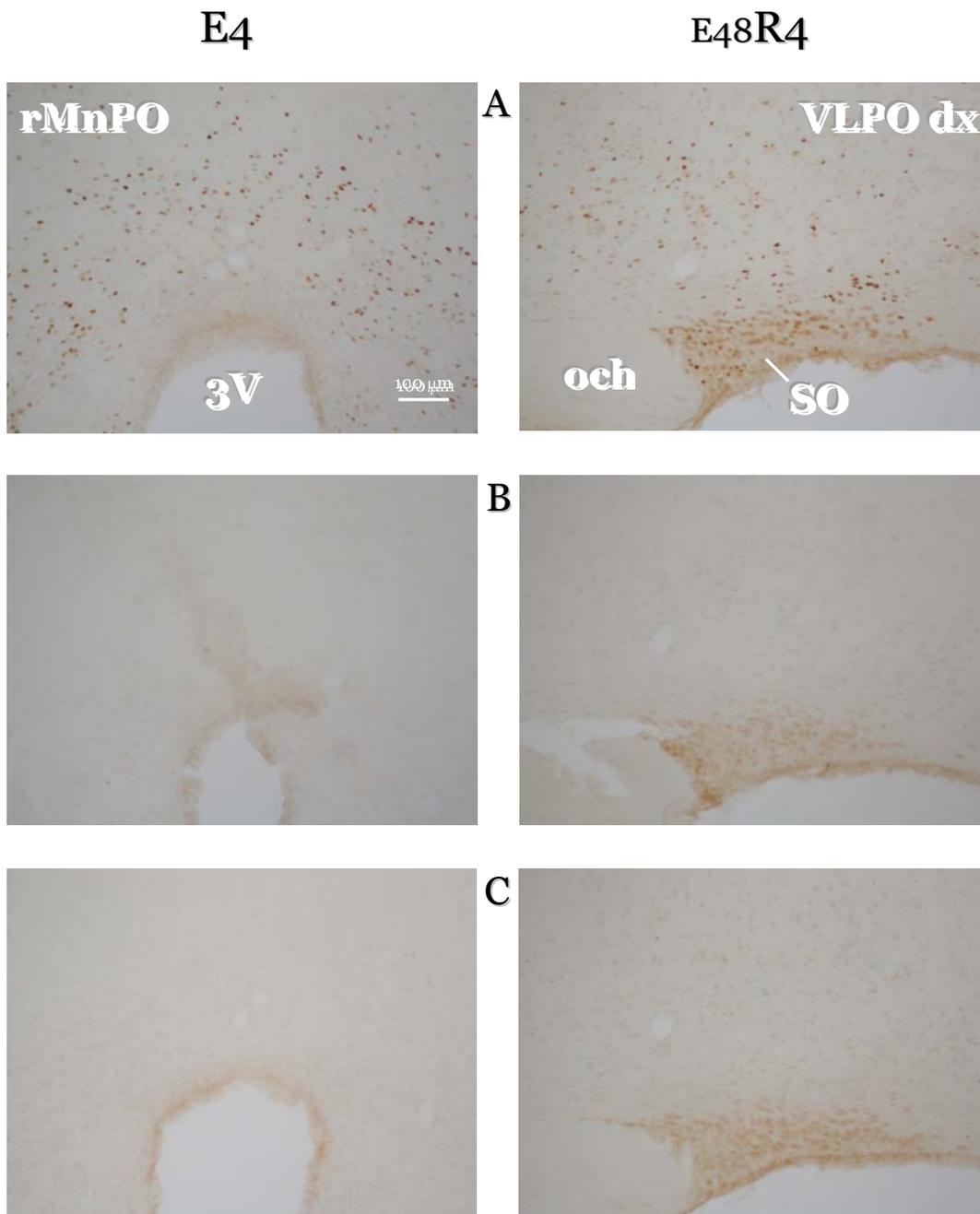


Figura 8. La marcatura nucleare per l'Ag c-Fos (A) è risultata abolita in seguito a preassorbimento dell'Ac primario con un eccesso del rispettivo antigene (peptide di sintesi, 10 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ di Ac, rispettivamente in E4 e E48R4, B), nonché in assenza di Ac primario (NRS, C). Lo studio di inibizione competitiva è stato effettuato su due condizioni sperimentali (E4 e E48R4) Le immagini sono state acquisite a 100 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 3x), collegata al microscopio ottico da apposito raccordo. Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

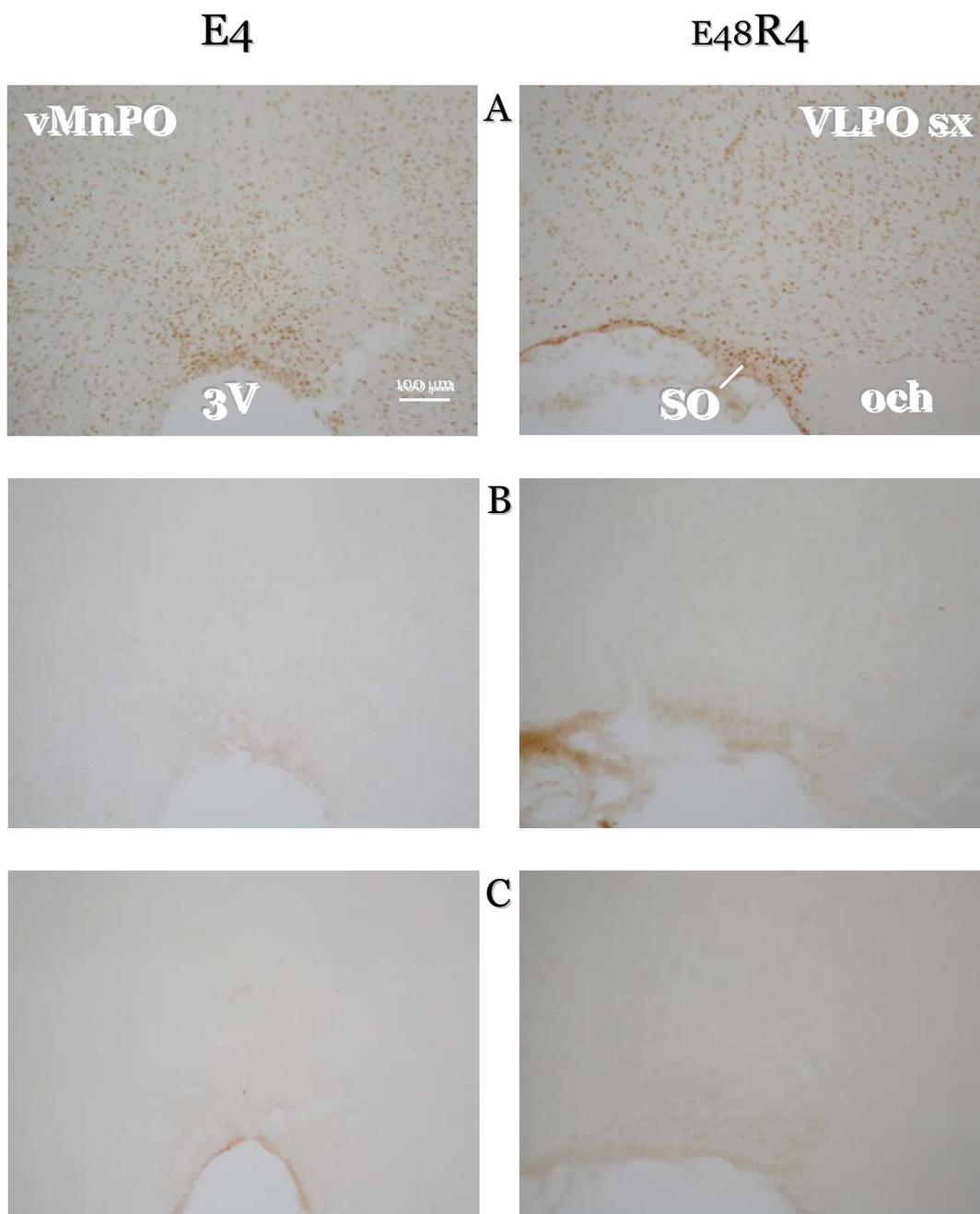


Figura 9. La marcatura nucleare per l'Ag P-CREB (**A**) è risultata abolita in seguito a preassorbimento dell'Ac primario con un eccesso del rispettivo antigene (peptide di sintesi, 10 e 20 μ M, rispettivamente in E4 e E48R4, **B**), nonché in assenza di Ac primario (Rabbit IgG, **C**). Lo studio di inibizione competitiva è stato effettuato su due condizioni sperimentali (E4 e E48R4) Le immagini sono state acquisite a 100 ingrandimenti tramite fotocamera digitale (zoom 3x), collegata al microscopio ottico da apposito raccordo. Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

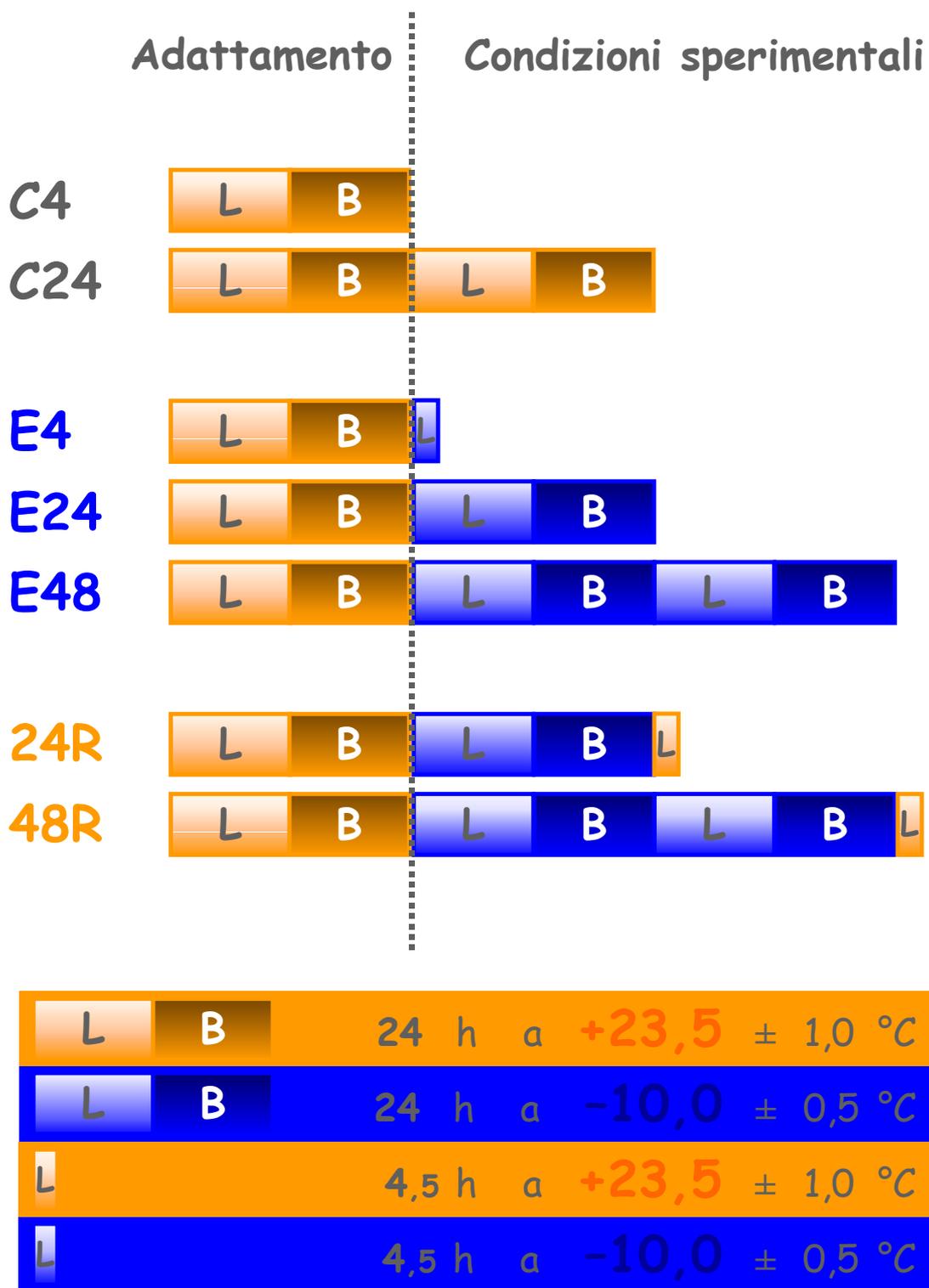


Figura 10. Rappresentazione delle condizioni sperimentali prescelte.

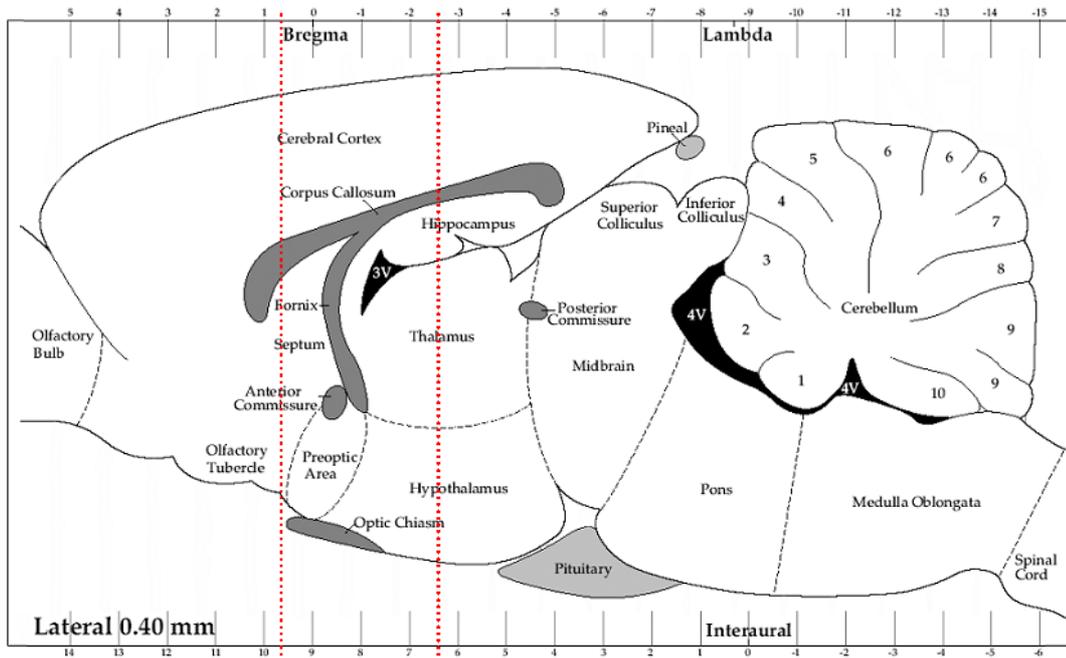


Figura 11. Sezione sagittale di encefalo di ratto; le linee tratteggiate indicano i limiti della regione d'interesse, che comprendeva la PO-AH. Per ogni animale, sono state prodotte 81 consecutive sezioni coronali di 40 μm , numerate da 0 a 80, approssimativamente da bregma +0,70 mm a bregma -2,50 mm (Paxinos e Watson, 2005). Immagine modificata da: Paxinos e Watson, 1998.

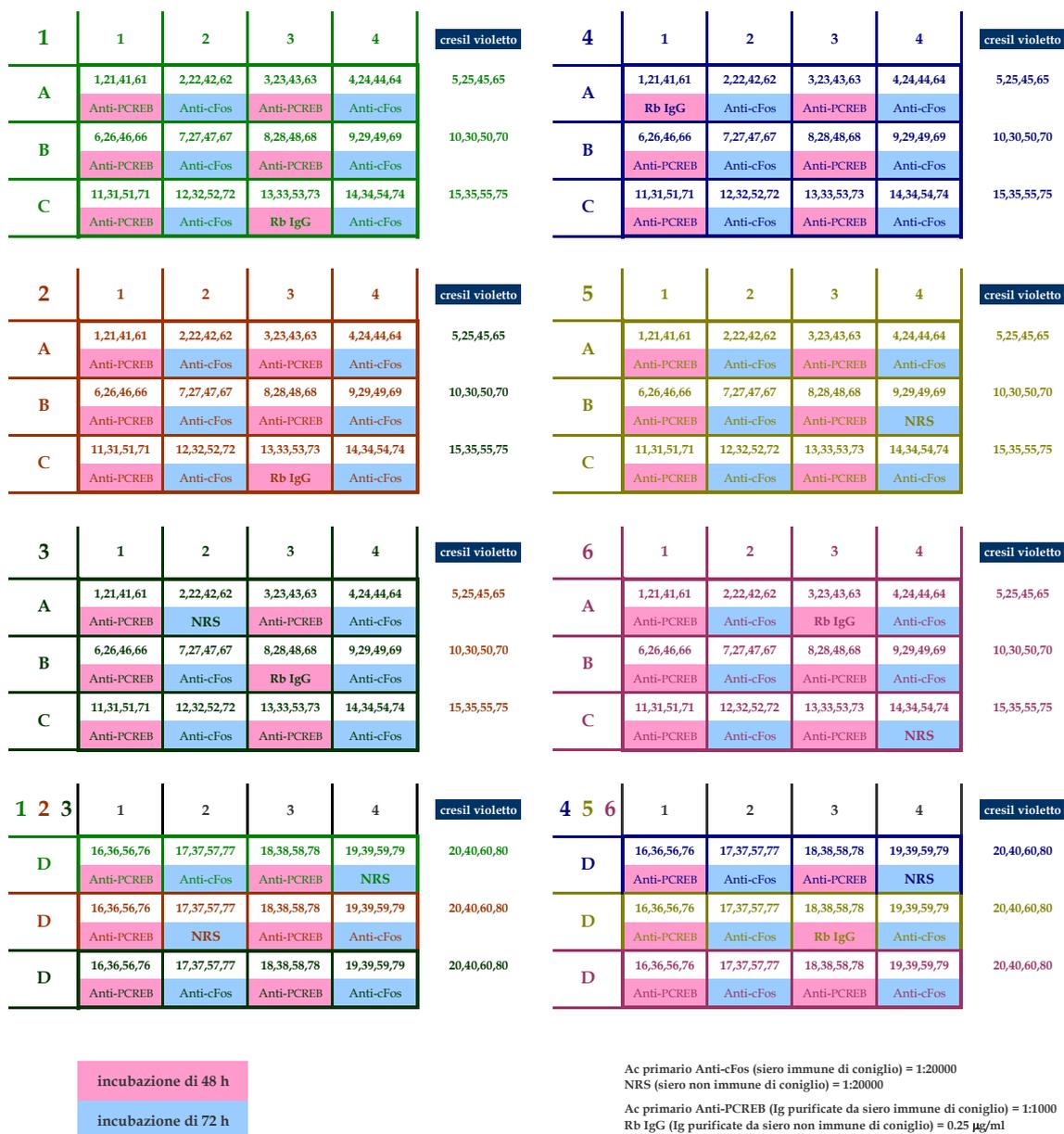
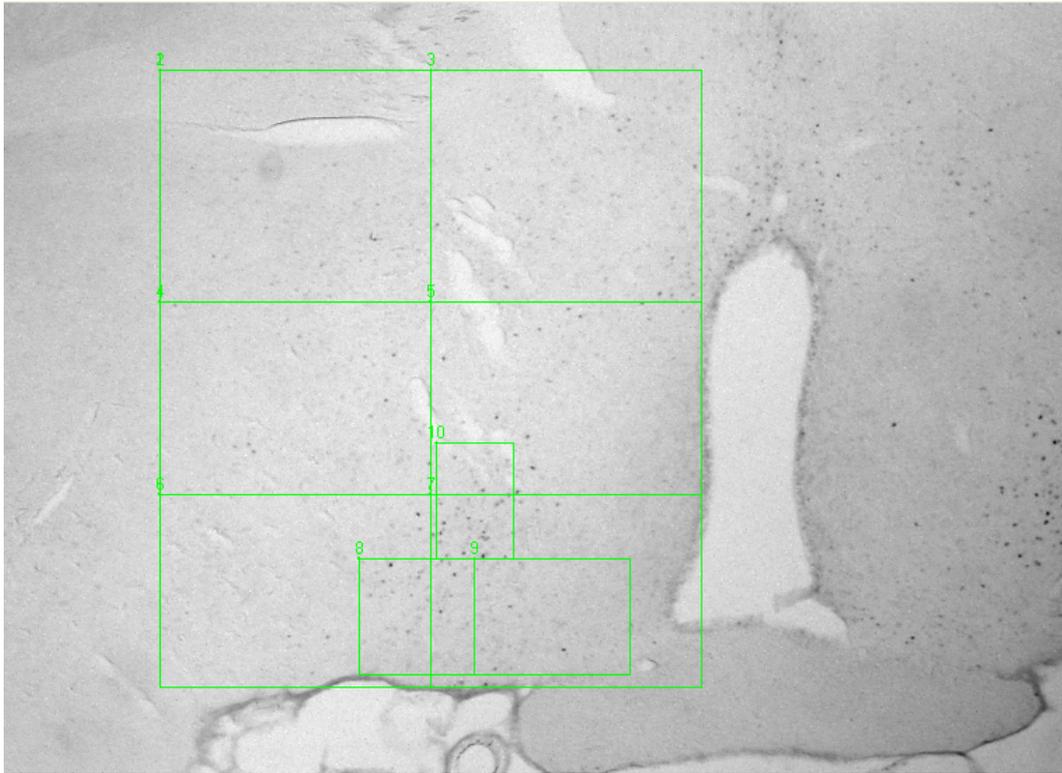
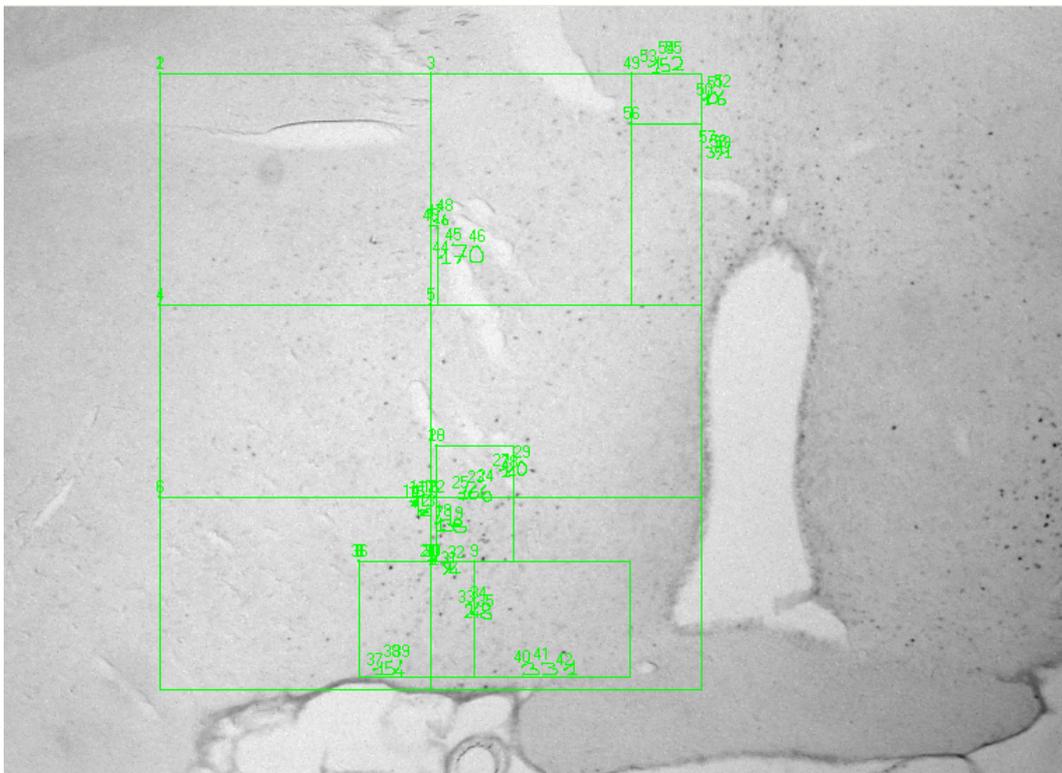


Figura 12. Modello schematico che illustra la distribuzione delle sezioni raccolte rispettivamente *free floating* e su vetrino per ogni blocco di 6 animali. Sia l'assegnazione dei cervelli alle rispettive piastre, sia la disposizione dei *bianchi*, due per ogni animale (NRS e Rabbit IgG), sono casuali. Il numero degli animali è indicato per ogni piastra in alto a sinistra. La sezione n. 0 non è rappresentata.

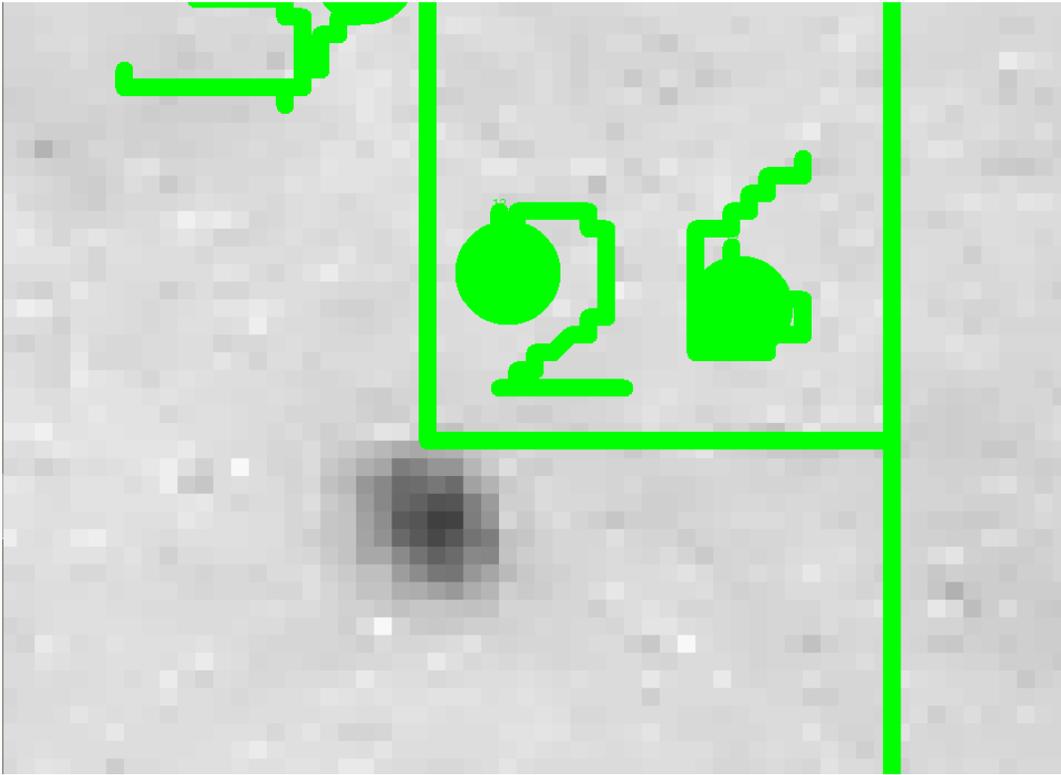
A



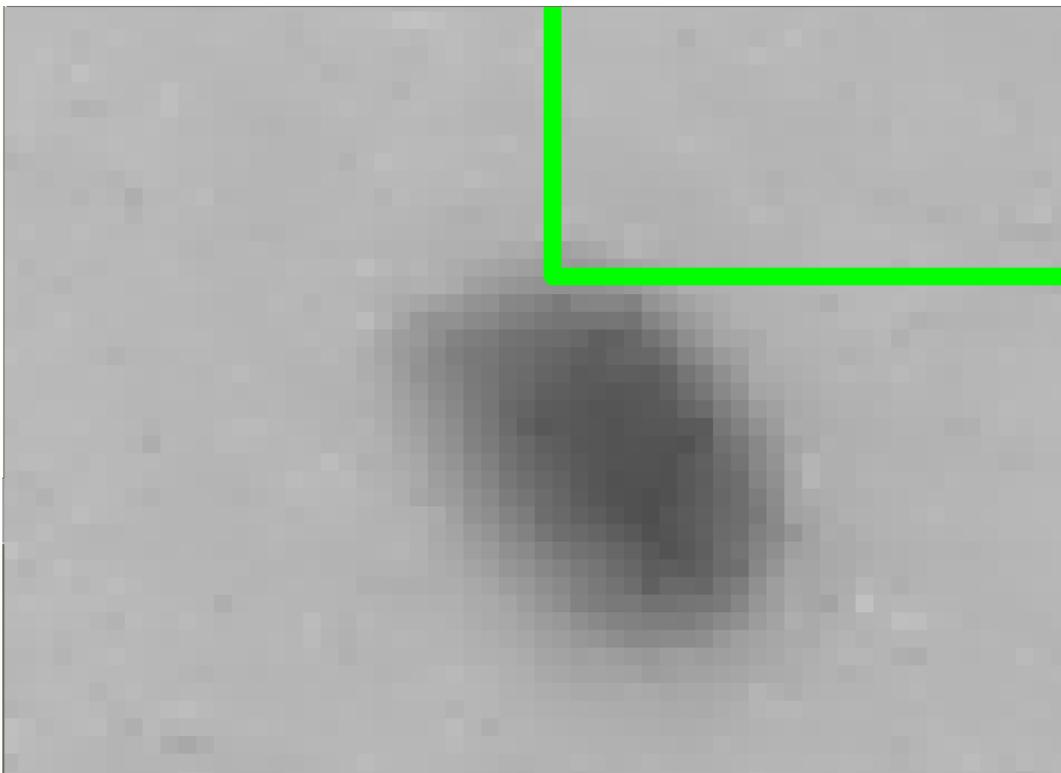
B



C



D



E

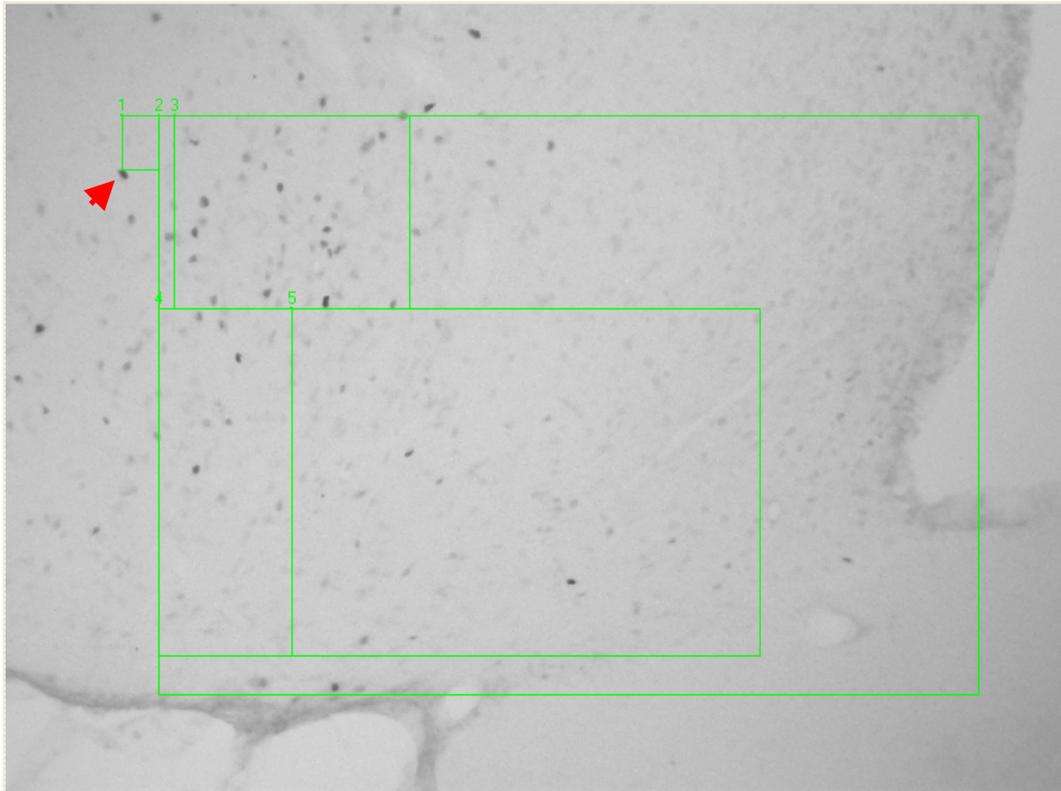
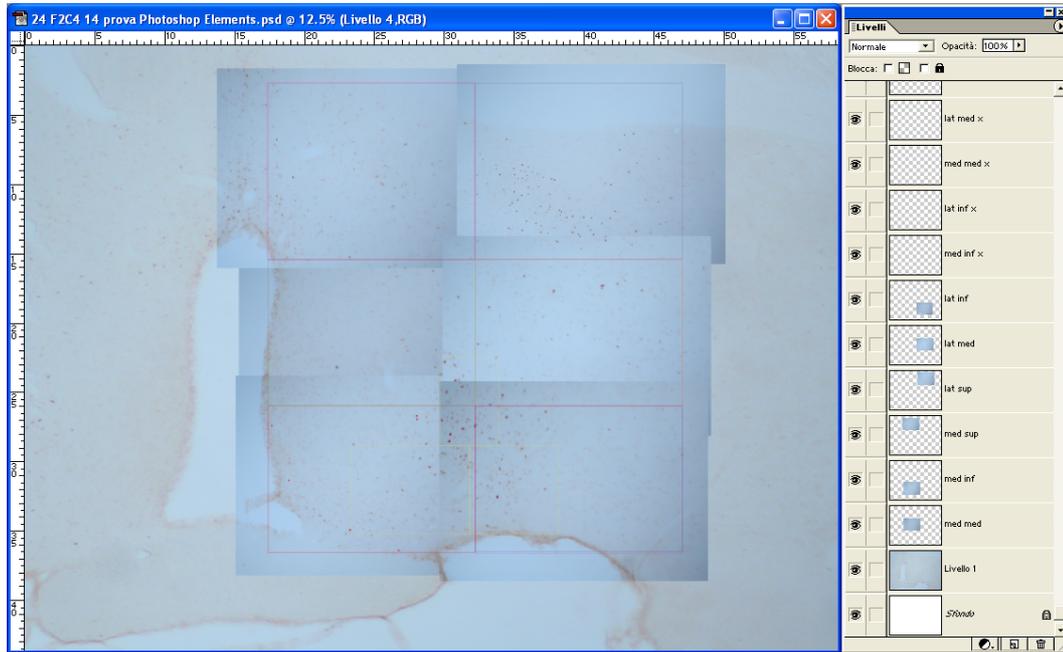


Figura 13. Metodo dei campi stellati per la ricostruzione delle griglie di conteggio su singoli fotogrammi acquisiti a 100 ingrandimenti mediante il sistema a scansione manuale. **A** Le griglie di conteggio venivano posizionate sull'immagine panoramica acquisita a piccolo ingrandimento. In questo caso, la griglia di conteggio per il VLPO si intersecava con la griglia per la POA. **B** Venivano selezionati dei punti di riferimento facilmente individuabili e se ne misuravano le coordinate (in pixel) rispetto ad uno dei vertici dei rettangoli di conta. **C** Punto di riferimento sull'immagine acquisita a piccolo ingrandimento. **D** Punto di riferimento sull'immagine acquisita a 100 ingrandimenti. **E** Ricostruzione a 100 ingrandimenti (la freccia indica il punto di riferimento) del rettangolo MPAinf sx della griglia di conteggio per la POA (si confronti la Figura 22) e di parte della griglia per il VLPO (si confronti la Figura 23). Le cellule contate sarebbero state assegnate ad una sola delle griglie che si intersecavano.

Figura 14. Metodo della sovrapposizione delle immagini per la ricostruzione delle griglie di conteggio su singoli fotogrammi acquisiti a 100 ingrandimenti, mediante il sistema a scansione manuale. **A** Ricostruzione in Photoshop Elements della regione ipotalamica di una sezione coronale scansionata a 100 ingrandimenti sul modello di una panoramica precedentemente acquisita a 32 ingrandimenti e proporzionalmente ingrandita, su cui era stata posizionata la griglia di conteggio per la POA (si confronti la Figura 22). In **B** è visibile, a titolo di esempio, la griglia corrispondente al rettangolo MPAinf dx, riportata sul rispettivo fotogramma a 100 ingrandimenti.

A



B

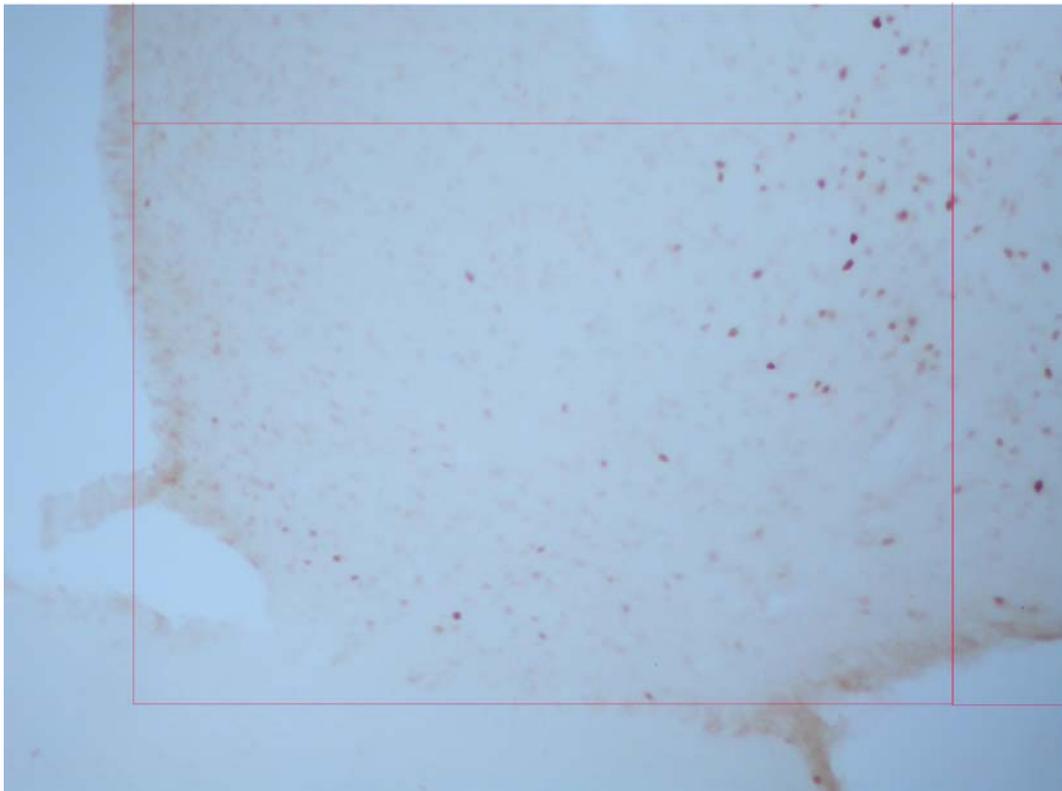
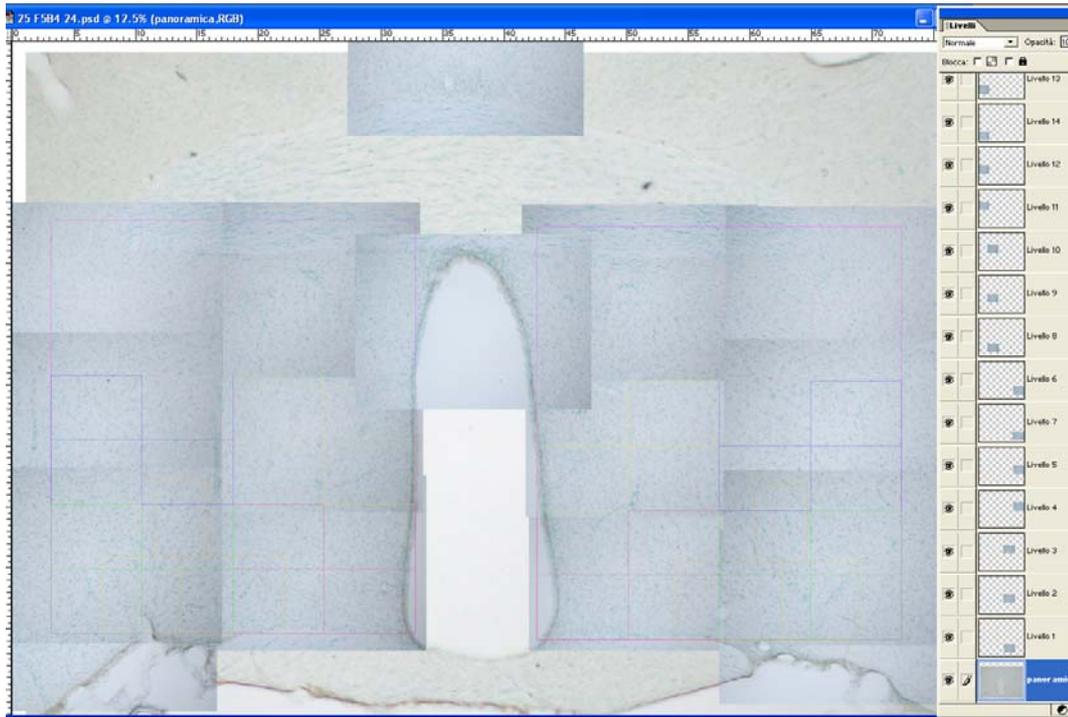


Figura 15. Evoluzione semplificata del metodo in Figura 14, per la ricomposizione di immagini acquisite mediante il sistema a scansione manuale. **A** Ricostruzione in Photoshop Elements della regione ipotalamica di una sezione coronale acquisita, a 100 ingrandimenti, come serie di fotogrammi adiacenti aventi un bordo di sovrapposizione in comune. Anche in questo caso è stata utilizzata come modello una foto panoramica a piccolo ingrandimento (25,6x) proporzionalmente ingrandita, ma i fotogrammi 100x sono stati acquisiti indipendentemente dal posizionamento delle griglie di conta, come si nota, nel particolare in **B**, dal fatto che le griglie non sono necessariamente comprese all'interno di una foto. Le frecce indicano il bordo di sovrapposizione tra due foto, identificabile a causa del fenomeno della vignettatura (gradiente di luminosità tra periferia e centro del fotogramma). E' stata evidenziata con un contorno più spesso una delle griglie di conteggio che si estende su due fotogrammi. Nota: la sezione presenta una colorazione di contrasto con verde di metile.

A



B



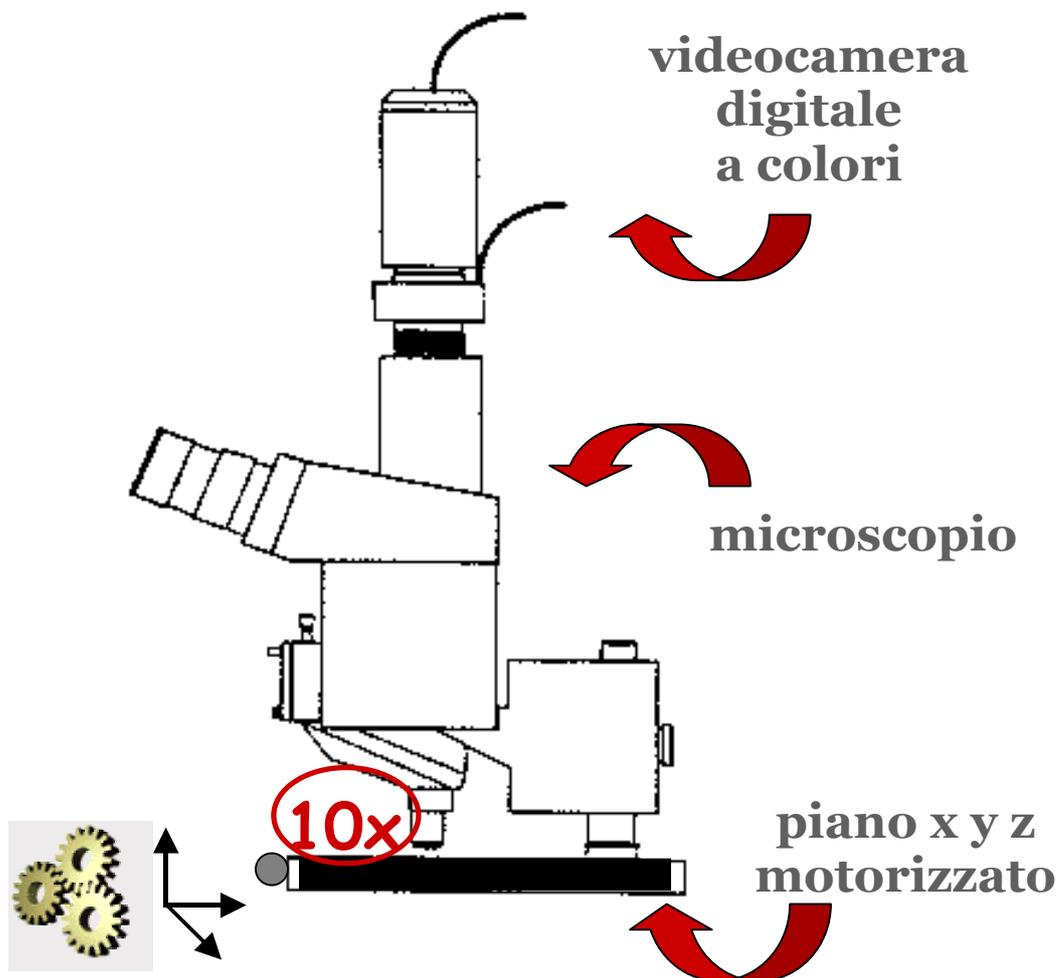
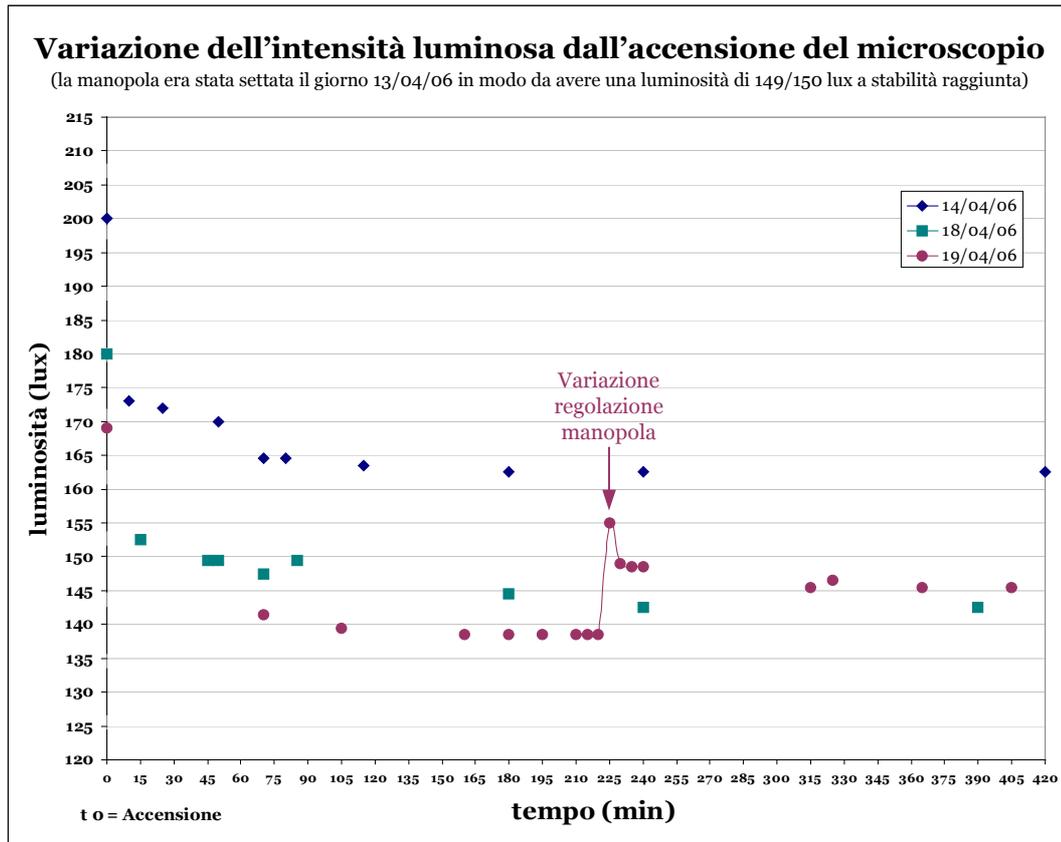


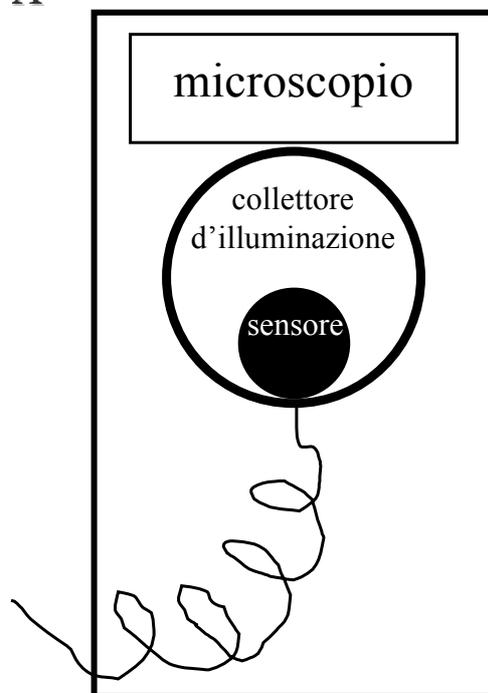
Figura 16. Rappresentazione schematica del sistema di acquisizione delle immagini a scansione automatica.



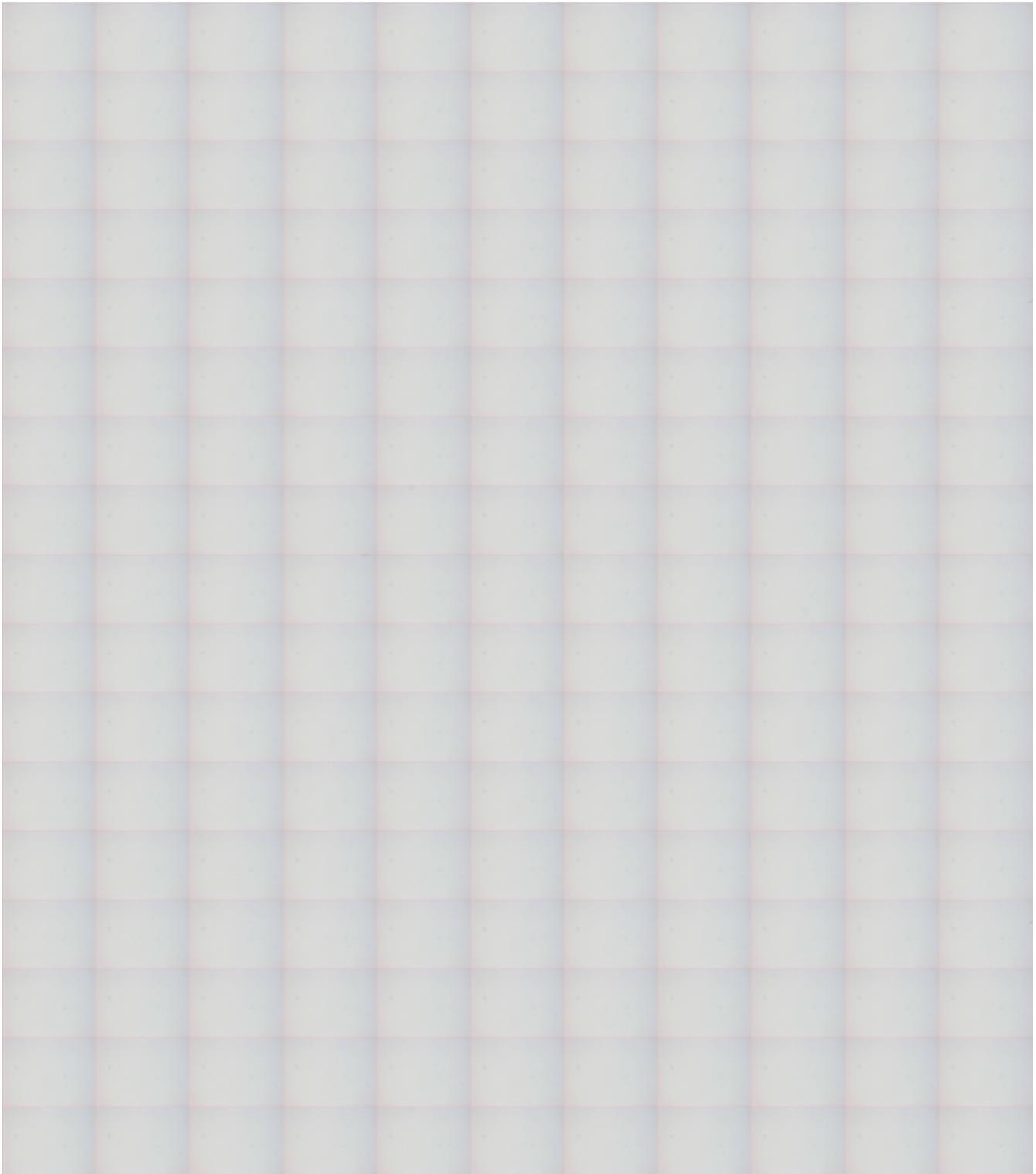
B

Figura 17. Standardizzazione dell'emissione di luce dal microscopio, mediante strumento di misura dell'intensità luminosa (luxmetro). **A** Il sensore veniva posizionato direttamente in corrispondenza del collettore d'illuminazione situato alla base del microscopio. Il rango di luminosità scelto per l'acquisizione era di 140-155 lux, per sensore posizionato come in figura e cioè adiacente al bordo più vicino allo sperimentatore. **B** Dopo l'accensione, occorreva attendere che l'emissione luminosa si stabilizzasse.

A



A



Aa

Figura 18. A Bianco di uguali dimensioni e stesso formato (TIFF) dell'immagine da correggere.

Aa Singolo frame, appartenente al medesimo bianco. In **Ab** lo stesso è stato trasformato in scala di grigi mediante estrazione della componente H

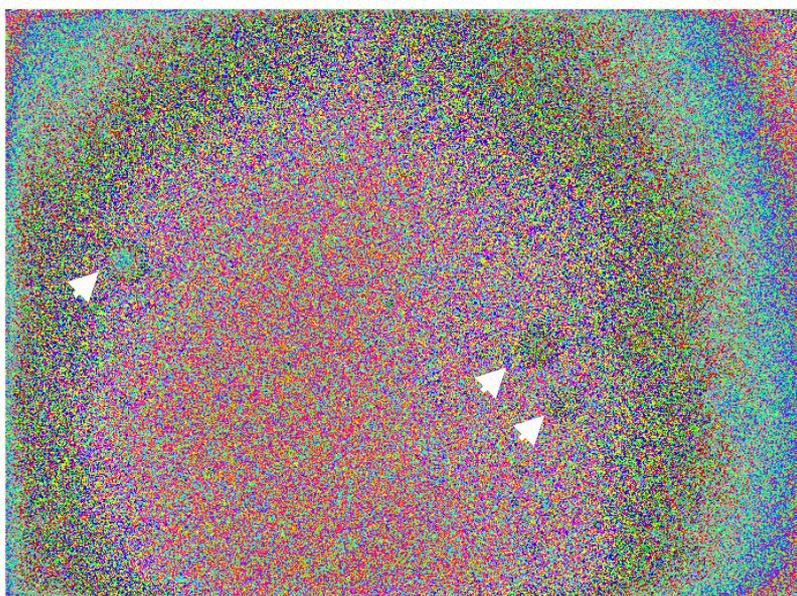
(intensità luminosa) in HSL e visualizzato in falsi colori. Le frecce indicano macchie periodiche, dovute a polveri interposte sul cammino ottico, non appartenenti al vetrino.

B (pag. seguente)

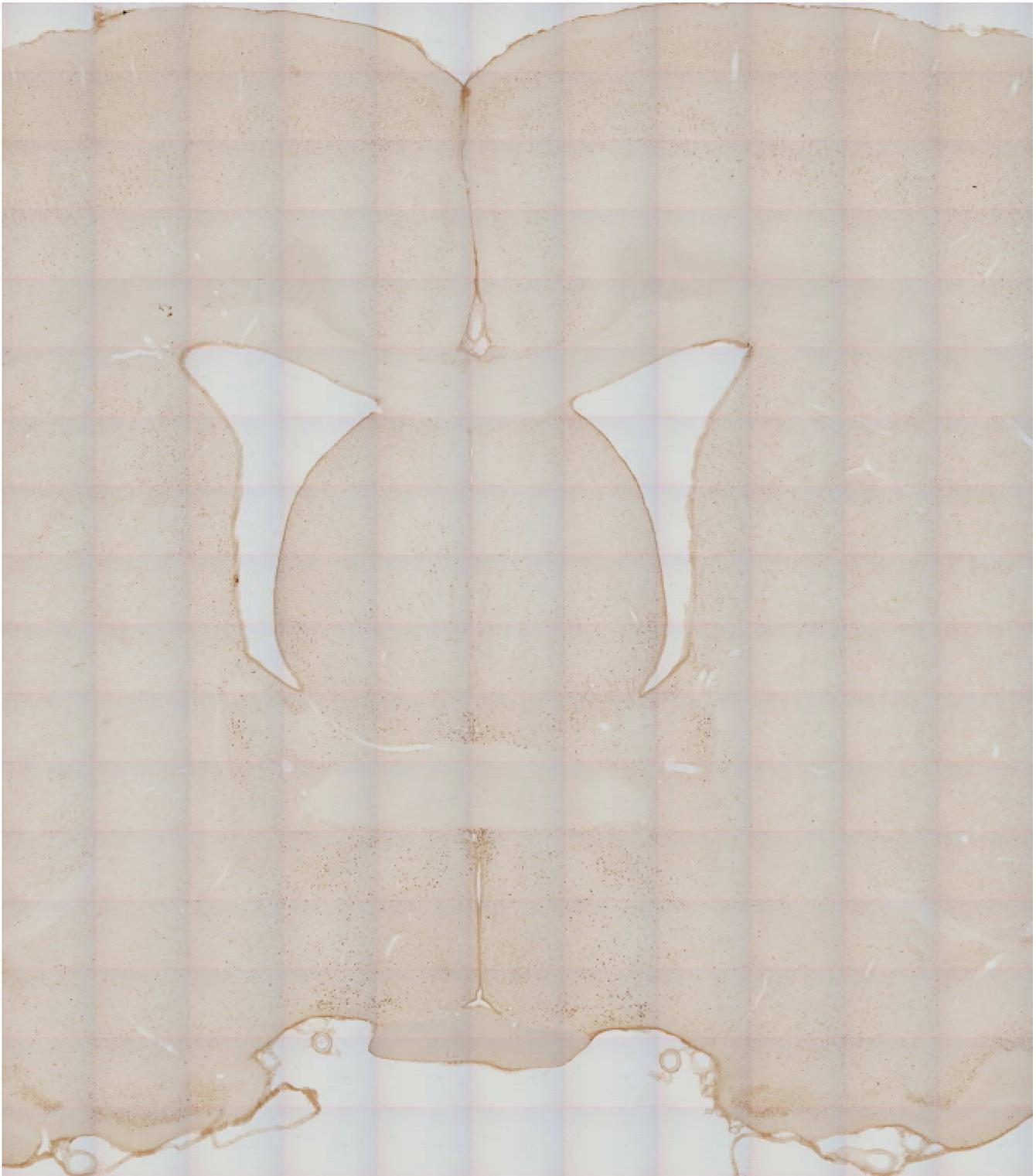
Immagine di una sezione coronale di cervello di ratto, marcata per l'Ag nucleare c-Fos. **C** La stessa dopo sottrazione del bianco ($C = B - A$). Il riferimento in basso a destra in A, in B e in C equivale a 500 μm .



Ab



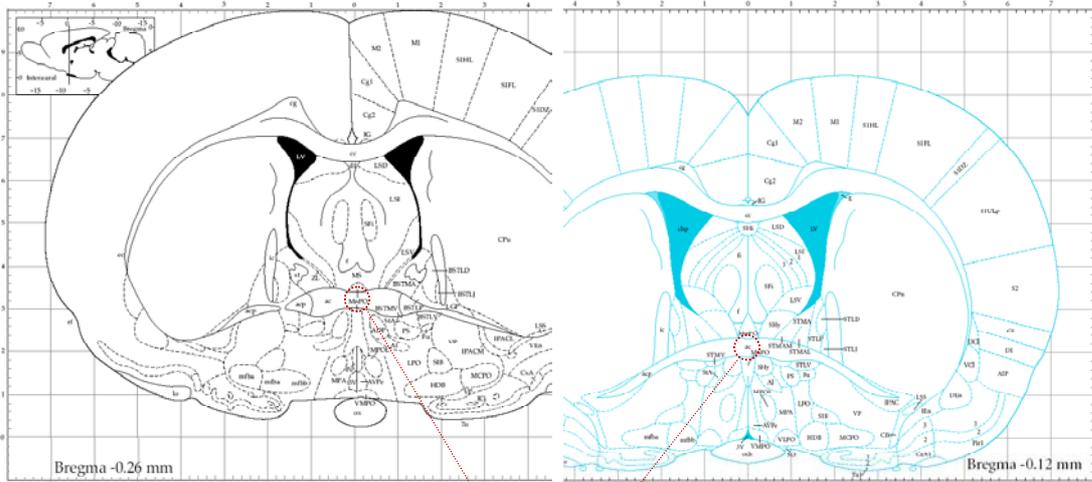
B



C



A



decussazione della commessura anteriore

B

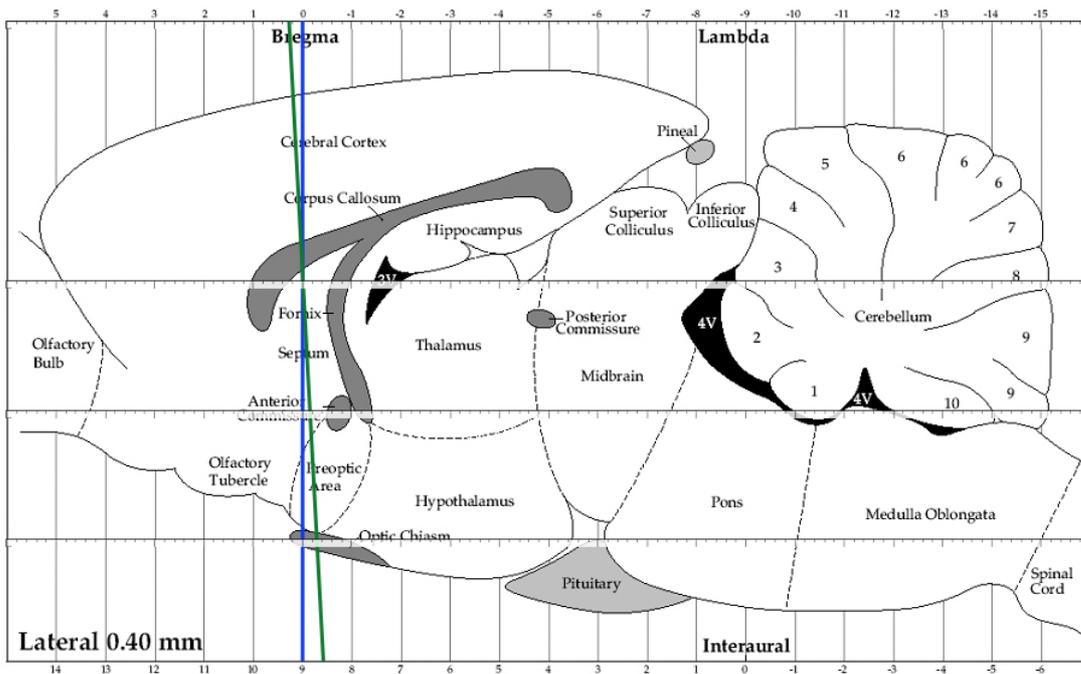


Figura 19. Confronto tra la quarta e la quinta edizione dell'atlante di encefalo di Paxinos e Watson, rispettivamente tavola in nero e tavola in azzurro in **A** (sezione coronale) e linea blu e verde nella costruzione in **B** (sezione sagittale). Si veda testo per l'interpretazione delle immagini.

Figura 20 (pagina seguente). Matrice per il selezionamento delle sezioni da contare per ognuno dei nuclei d'interesse. Le righe corrispondono ai 24 casi sperimentali, individuati con il numero dell'esperimento e il numero della piastra (ad esempio 29 pl3, dove *pl* sta per piastra, dall'inglese *plate*) e le colonne, numerate da 0 a 80 ed evidenziate in codice colore, ai vetrini: celeste per il cresil violetto, arancio per P-CREB, giallo per c-Fos, bianco per i rispettivi controlli (Rabbit IgG e NRS), assegnati in maniera casuale. Tale matrice è riproducibile per ognuno dei nuclei (o aree) da contare. Su di essa possono essere riportati graficamente la loro estensione totale e il numero di vetrini contati.

	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F	cv	P	F	C	F					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
28 p11																																								
28 p12																																								
28 p13																																								
28 p14																																								
28 p15																																								
28 p16																																								
29 p11																																								
29 p12																																								
29 p13																																								
29 p14																																								
29 p15																																								
29 p16																																								
30 p11																																								
30 p12																																								
30 p13																																								
30 p14																																								
30 p15																																								
30 p16																																								
31 p11																																								
31 p12																																								
31 p13																																								
31 p14																																								
31 p15																																								
31 p16																																								
31 p17																																								

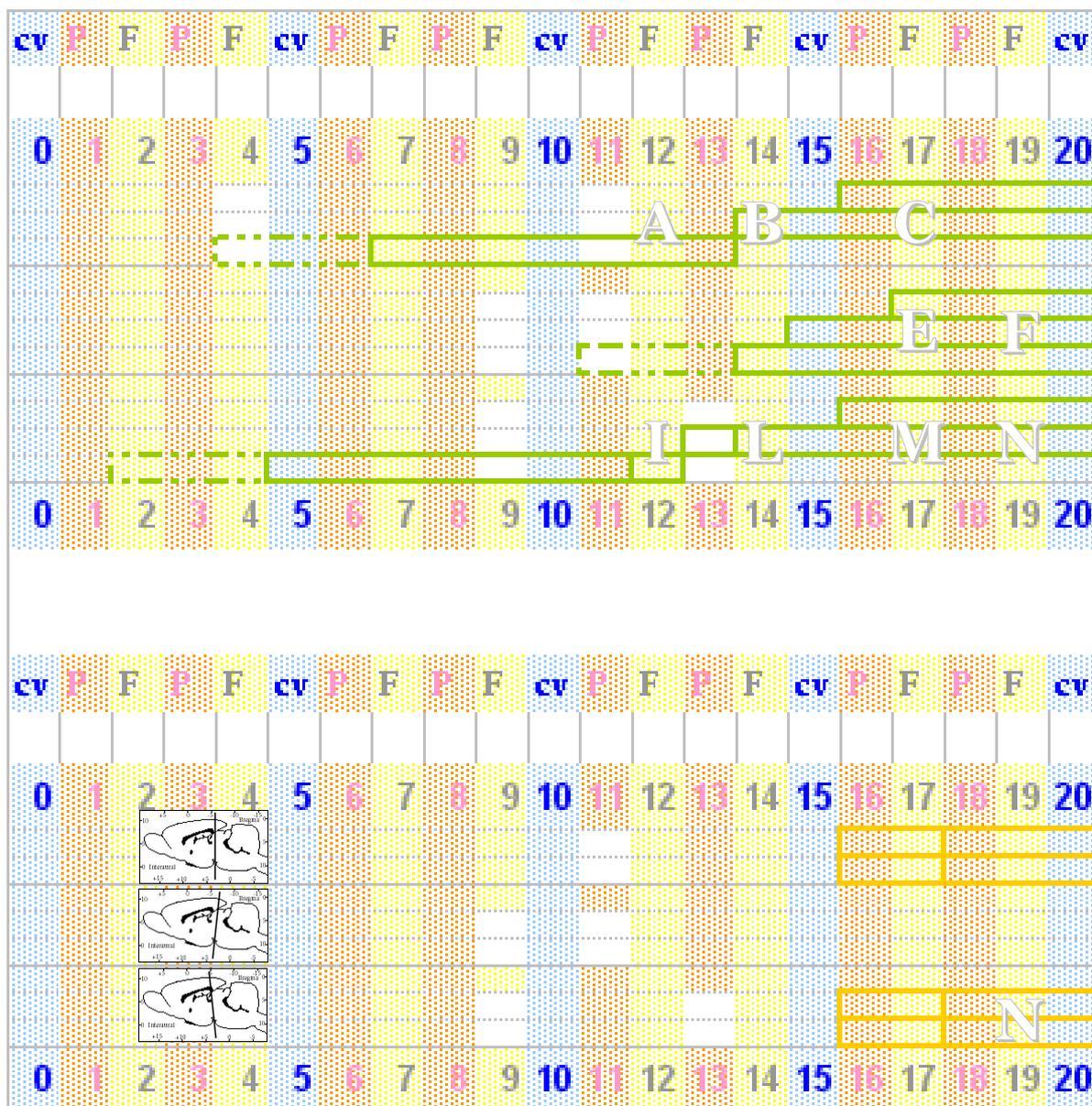
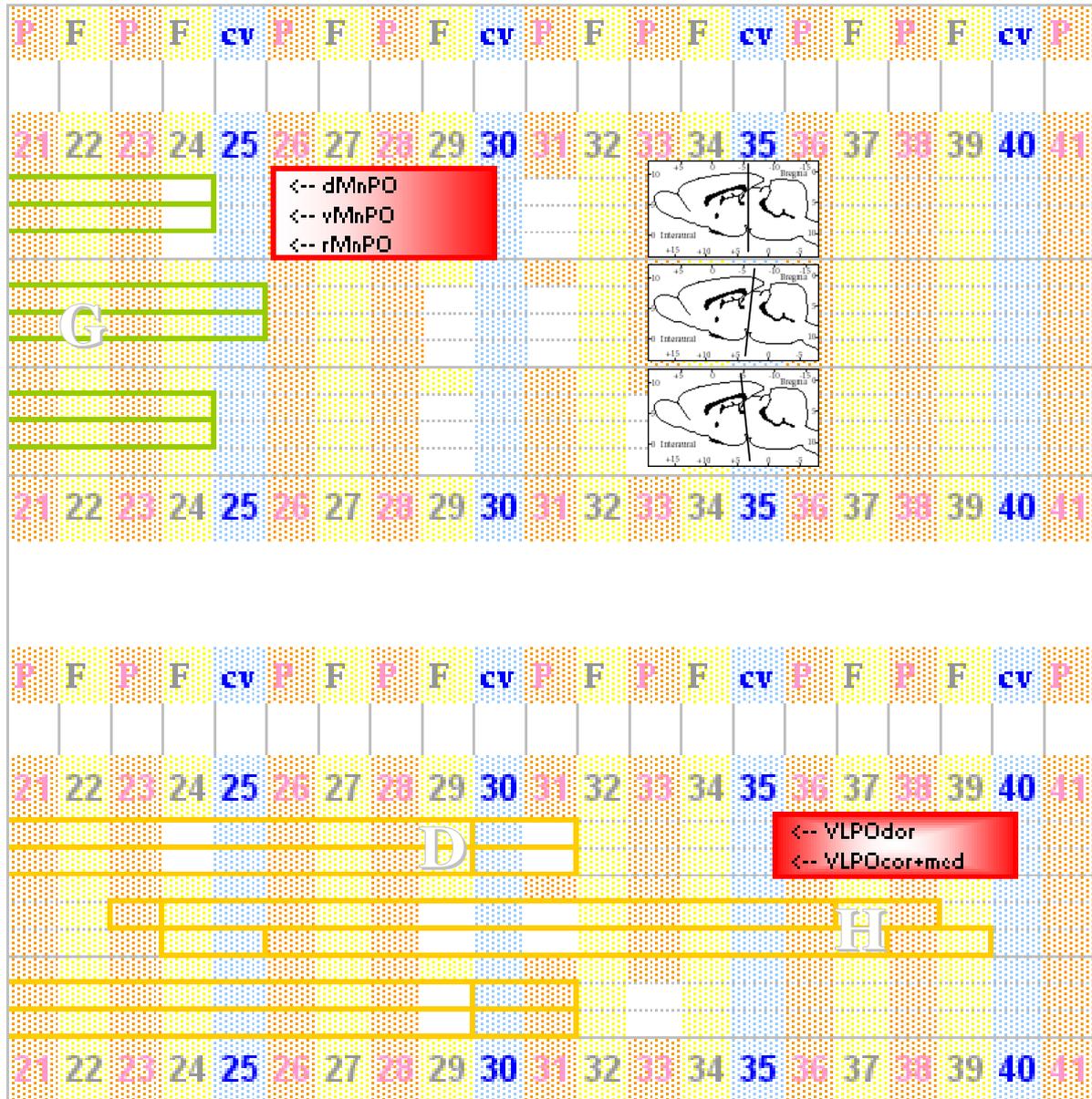
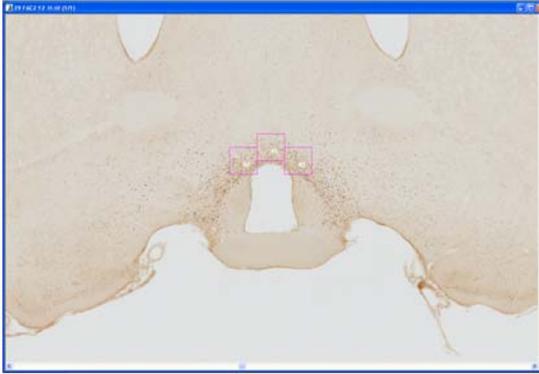


Figura 21. Esempio di applicazione della matrice, su tre animali, per il MnPO (in alto) e il VLPO (in basso). Ogni riga raffigura un piano dorsoventrale (3 per il MnPO e 2 per il VLPO). I rettangoli indicano l'estensione rostrocaudale del nucleo nelle sue diverse porzioni. Per il MnPO sono esclusi dal conteggio i vetrini più rostrali (tratteggiati). Per il VLPO, vengono escluse le due estremità del nucleo (barre laterali). Poiché il criostato non era provvisto di dispositivo con possibilità di orientamento del campione, il piano di taglio dipendeva dal



momento in cui si separavano cervello da troncoencefalo nella fase di congelamento. Nel primo animale rappresentato, il taglio coronale risultava perfettamente sovrapponibile a quello dell'atlante di riferimento (Paxinos e Watson, 2005). Nel secondo caso e nel terzo (condizione infrequente), variava leggermente. Le immagini A-D, E-H e I-N, nelle pagine seguenti, si riferiscono ai rispettivi vetrini del primo, secondo e terzo animale. Sulle sezioni sono rappresentate le griglie di conteggio per i due nuclei (si confronti la Figura 23).

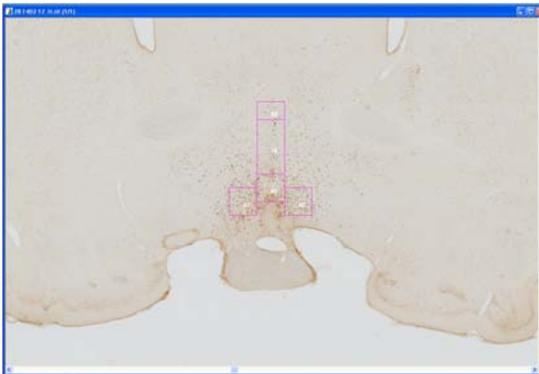
A



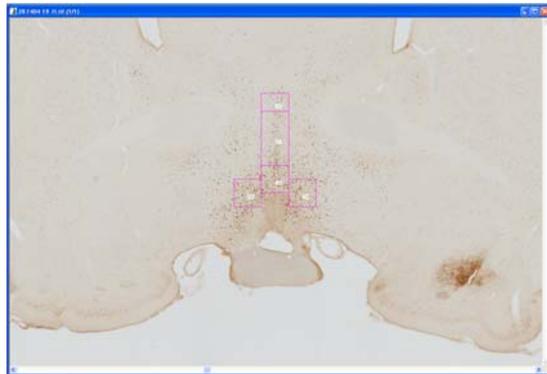
B



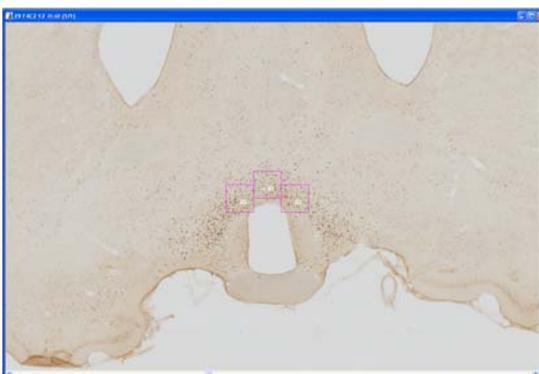
E



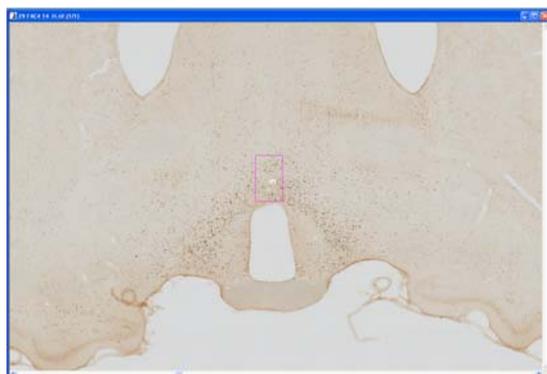
F



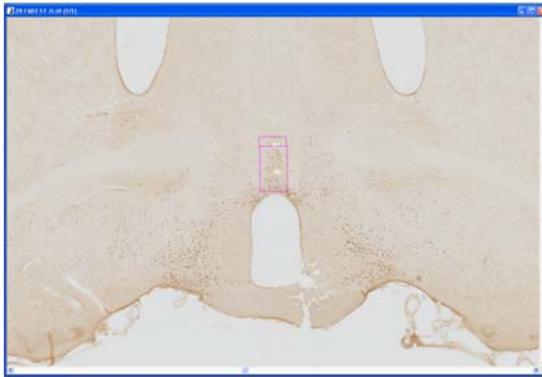
I



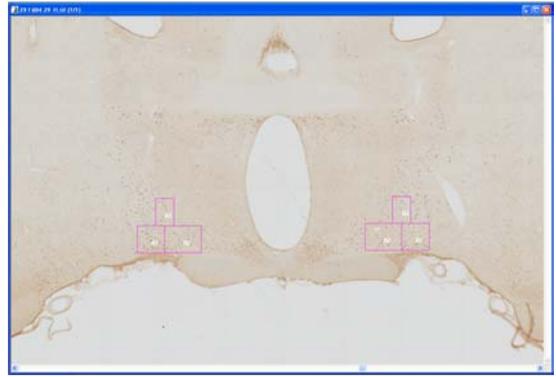
L



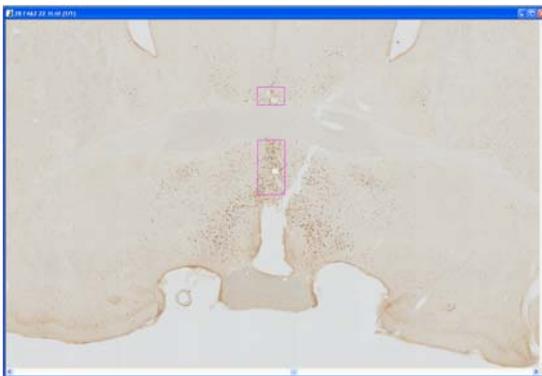
C



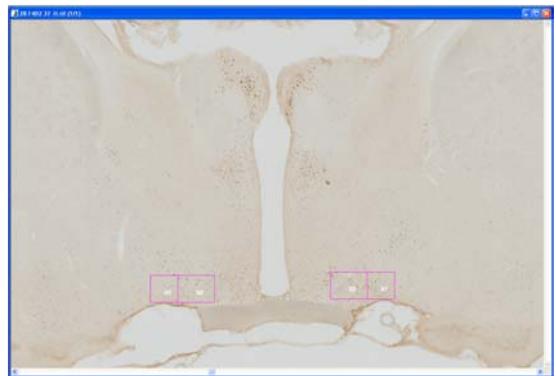
D



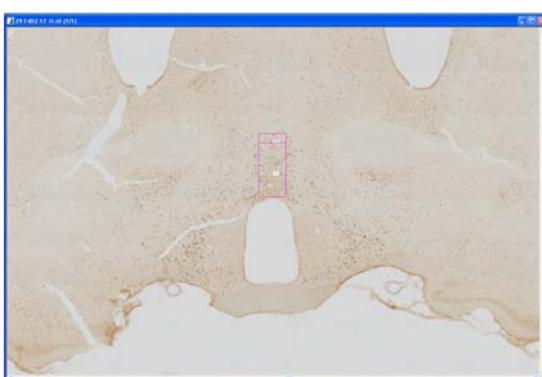
G



H



M



N



A

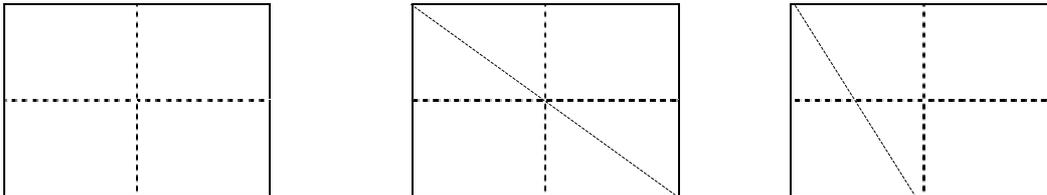
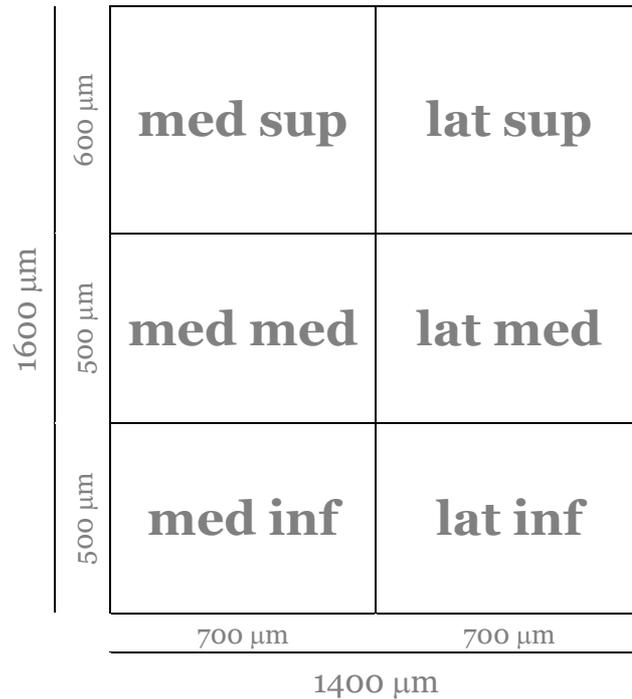
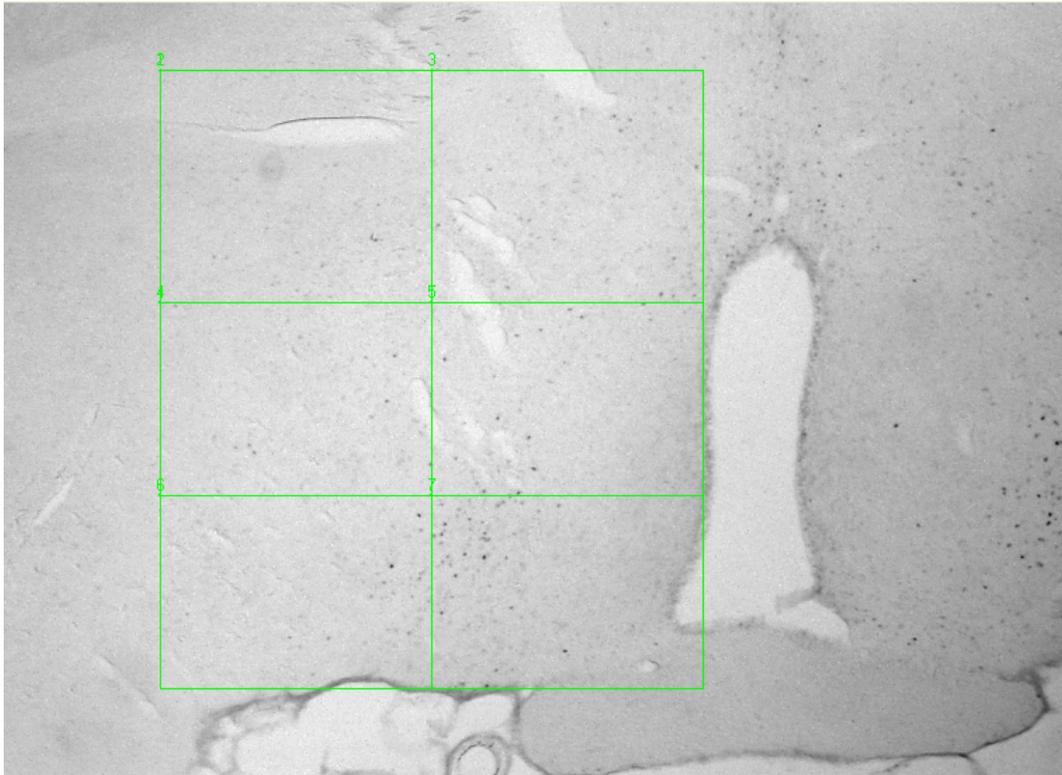
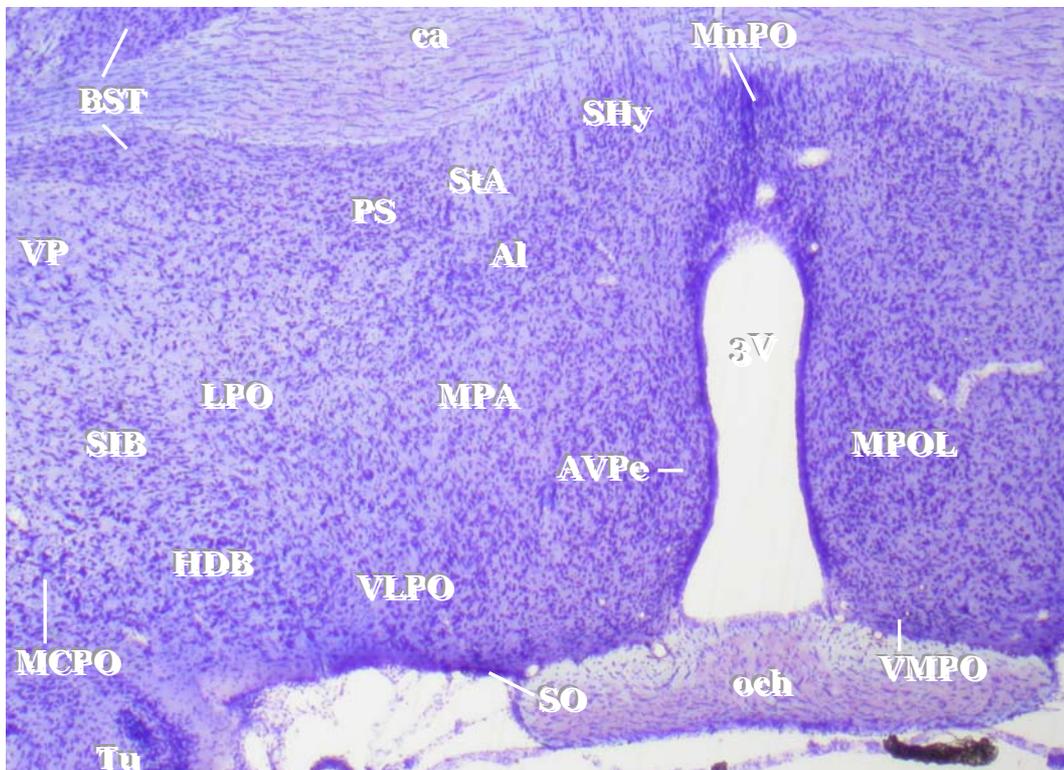


Figura 22. **A** Griglia principale costruita per la conta della POA nella regione della decussazione della commessura anteriore (~ bregma 0,00-0,50, Paxinos e Watson, 2005). Lo schema illustra la costruzione riferita alla parte destra della sezione. In basso, sono mostrate le possibili scomposizioni dei quadranti principali al fine di adattare la griglia anche a porzioni della PO-AH rostrali e caudali rispetto alla regione per cui la stessa era stata costruita. **B** Griglia di conteggio per la POA costruita su una sezione coronale a bregma -0,08 mm (Paxinos e Watson, 2005). **C** Sezione immediatamente caudale alla precedente, colorata con cresil violetto per l'evidenziazione delle strutture anatomiche). Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

B



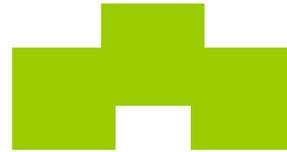
C



Nucleo preottico mediano (MnPO)

R
O
S
T
R
A
L
E

3 elementi di 300 x 300 μm



C
A
U
D
A
L
E

ventrale 300 x n*100 μm



dorsale 300 x n*100 μm



Nucleo Preottico Ventrolaterale (VLPO)

CORE (VLPOcor)

300 x 300 μm

ESTENSIONE MEDIALE (VLPOmed)

400 x 300 μm

ESTENSIONE DORSALE (VLPOdor)

200 x 300 μm

sinistra

destra



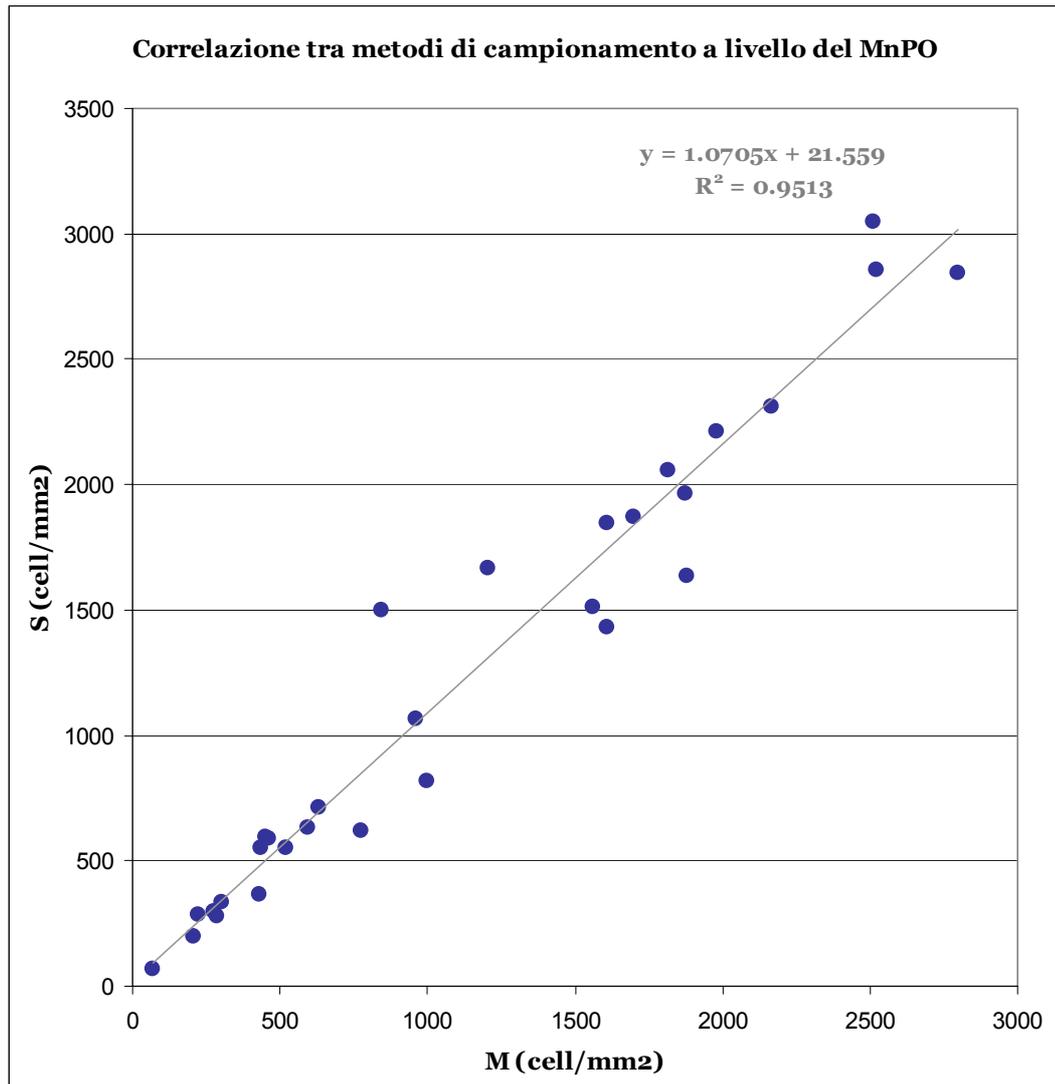


Figura 23 (a destra). Griglie utilizzate per la quantificazione dell'immunoreazione a livello dei nuclei MnPO (modificato da: Gong et al., 2000) e VLPO (Lu et al, 2002).

Figura 24. Confronto tra metodo di campionamento standardizzato mediante griglie (S) e procedura di delineazione manuale dei contorni nucleari (M), riferito al MnPO, condotto su 3 animali, scelti in maniera casuale tra i 24 sperimentali. I dati sono espressi come densità di nuclei, positivi all'immunoreazione per l'Ag nucleare c-Fos, su unità di superficie. Ogni punto rappresenta una singola misura.

Curve di distribuzione di frequenza dell'intensità dei pixel
allineate sul valore moda (picco)

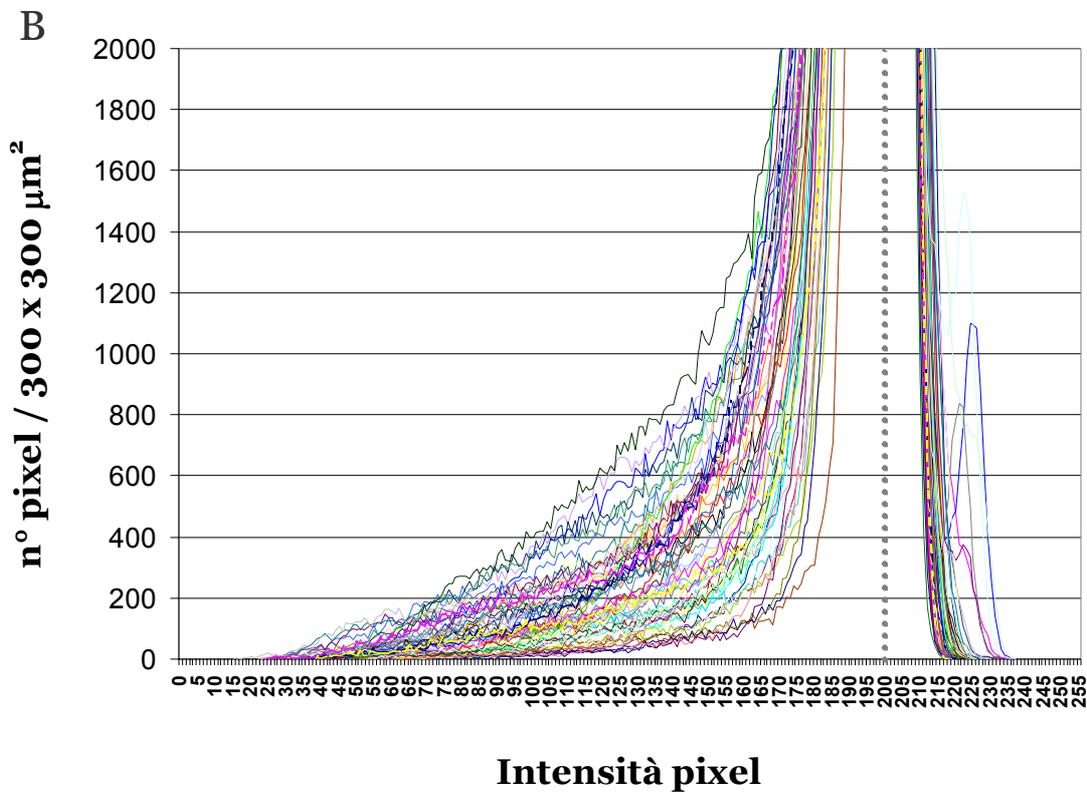
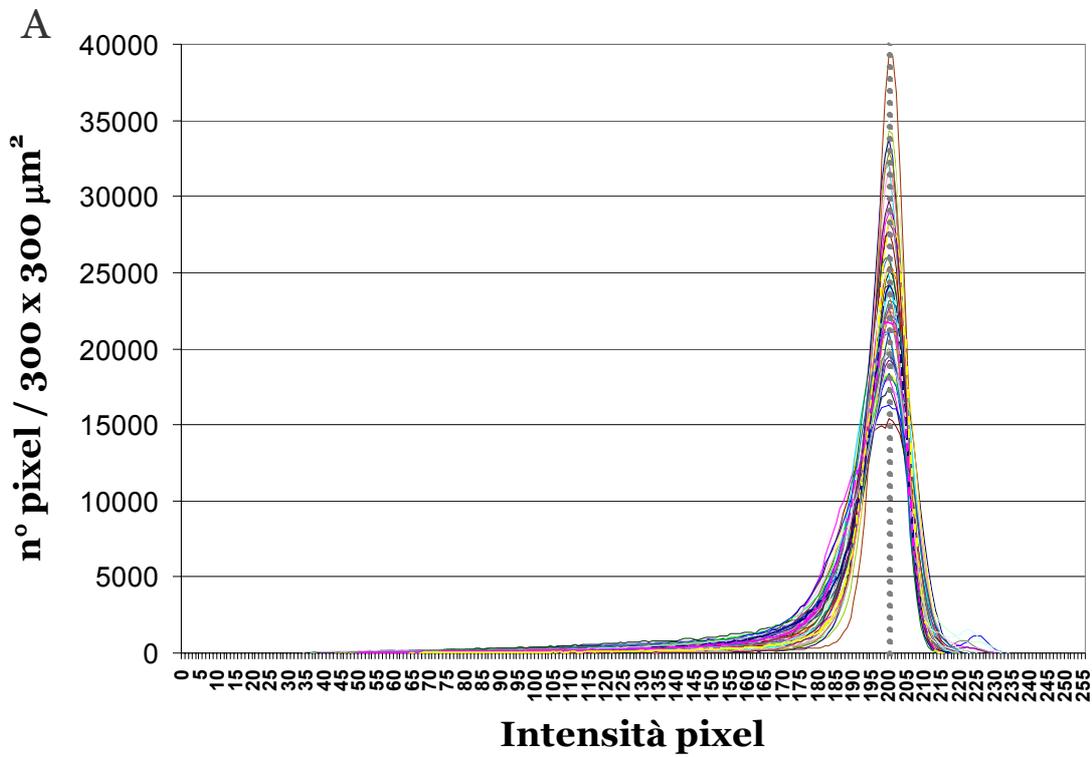


Figura 25 (a sinistra). **A** Sessanta curve di distribuzione di frequenza dell'intensità dei pixel nel sistema HSI. Il valore 0 corrisponde al nero e il valore 255 al bianco, quindi a destra avremo i pixel più chiari e a sinistra quelli più scuri. Le curve sono allineate, per poterle confrontare, in modo che la moda (il valore della variabile più rappresentato, graficamente il picco della curva), originariamente compresa tra 184 e 212, coincida per tutte con il valore di 200. Le 60 curve sono ricavate da 12 dei 24 casi sperimentali e si riferiscono a griglie quadrate di 300 μm di lato, appartenenti, per ogni animale, 3 al MnPO (rMnPO o vMnPO) e 2 al VLPOcor. In **B**, lo stesso grafico viene riproposto variando la scala delle ordinate, in modo da visualizzare meglio le code, in particolare la sinistra.

Figura 26 (pagine seguenti). Segmentazione di un'immagine riferita ad una porzione di tessuto di 100 x 100 μm^2 a livello di un vMnPO, marcata per l'Ag nucleare c-Fos. Sono visualizzati in falso colore per tappe successive i pixel aventi valori di intensità corrispondenti al valore moda della curva di distribuzione di frequenza dell'intensità, nonché all'intervallo di valori rispettivamente a destra e a sinistra dello stesso. In particolare, la porzione della curva a sinistra del valore moda è stata segmentata per intervalli di 10 unità di intensità. Ne è risultato che il picco della curva rappresentava pixel appartenenti al background (**A**, **G**). Così anche tutta la parte alla destra della moda, corrispondente ai pixel più chiari del background e di tutta l'immagine (**B**). Segmentando la porzione sinistra, nelle prime 3 classi da 10 unità si ritrovavano sempre pixel appartenenti al background, ma un po' più scuri del valore moda, e così pure quegli aloni nucleari corrispondenti a cellule non marcate (**C-E**). La quarta classe di intensità a partire dalla moda, invece, corrispondeva ai contorni dei nuclei marcati (**F**, **G**) e questo avveniva in condizioni sia più sia meno marcate e a livello di entrambi i nuclei analizzati (**H**). Procedendo nell'operazione di segmentazione, sempre verso sinistra, lungo la coda dei valori più scuri, si evidenziavano, dai bordi al centro, i nuclei via via più marcati (**I-V**).

A

Moda = BkG

Segmentation - 29 F3 22 MnPO.tif (1/1)

Histogram Based | Color Cube Based

Class 1 | New | Del | H | S | I | HSI

0 255

Show All

190

Preview

Current Class | Create Preview Image

Class Color on Transparent

File... New Mask Apply Mask Close

B

porzione destra della curva

Segmentation - 29 F3 22 MnPO.tif (1/1)

Histogram Based | Color Cube Based

Class 2 | New | Del | H | S | I | HSI

0 255

Show All

191

Preview

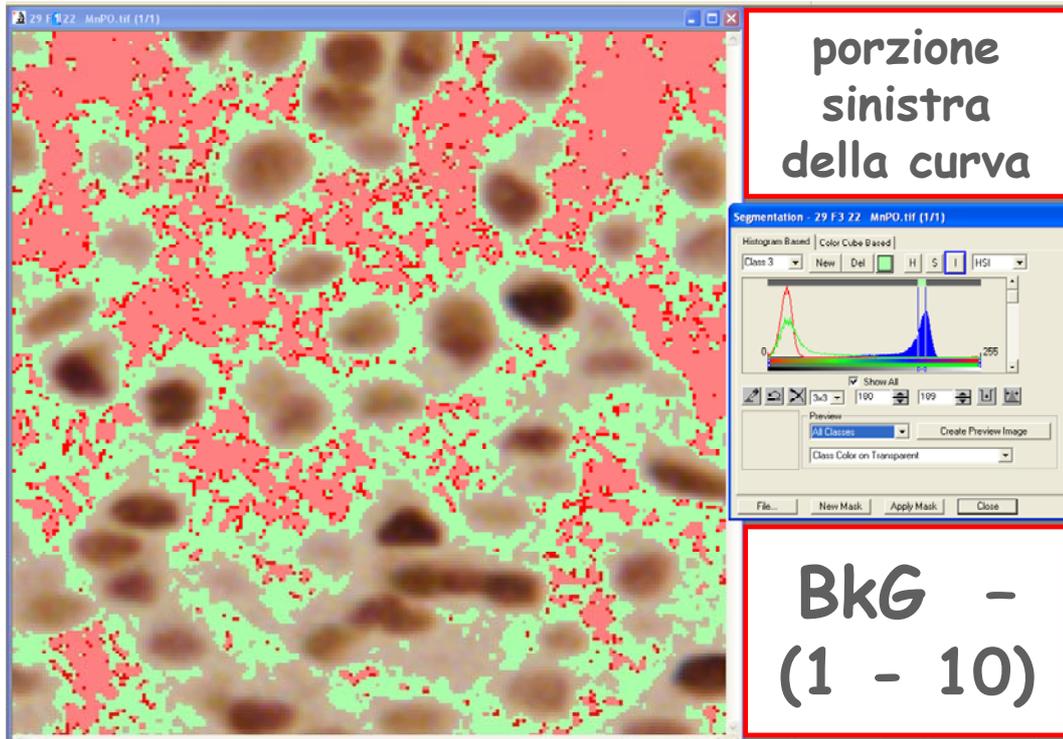
All Classes | Create Preview Image

Class Color on Transparent

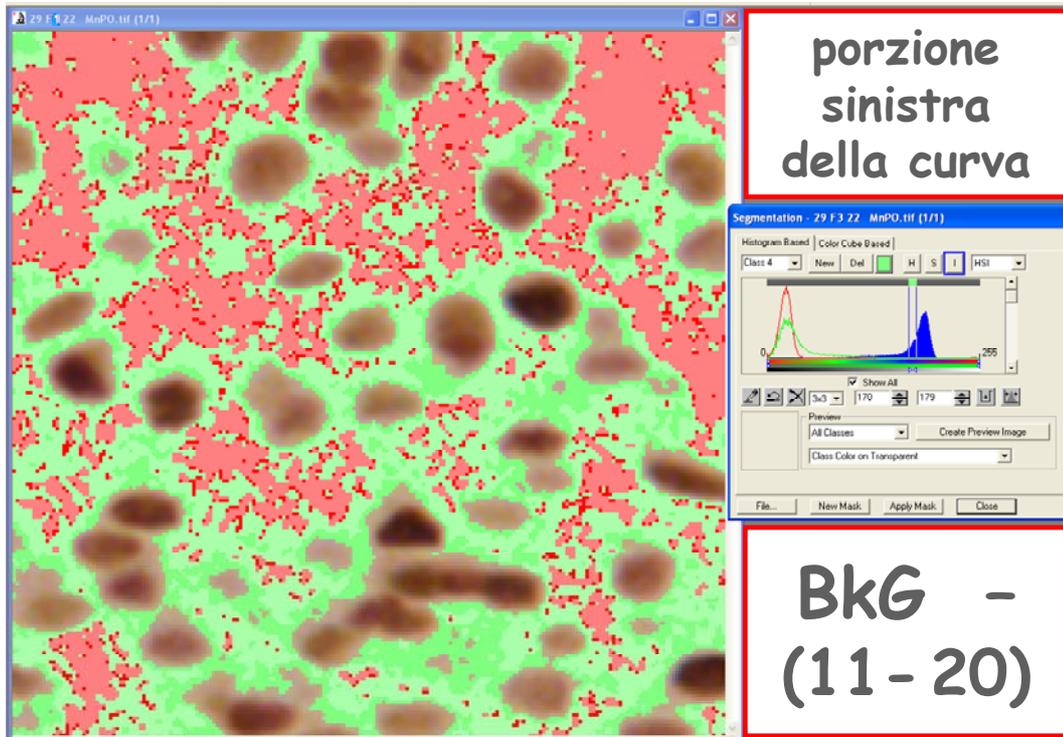
File... New Mask Apply Mask Close

BkG
--> 255

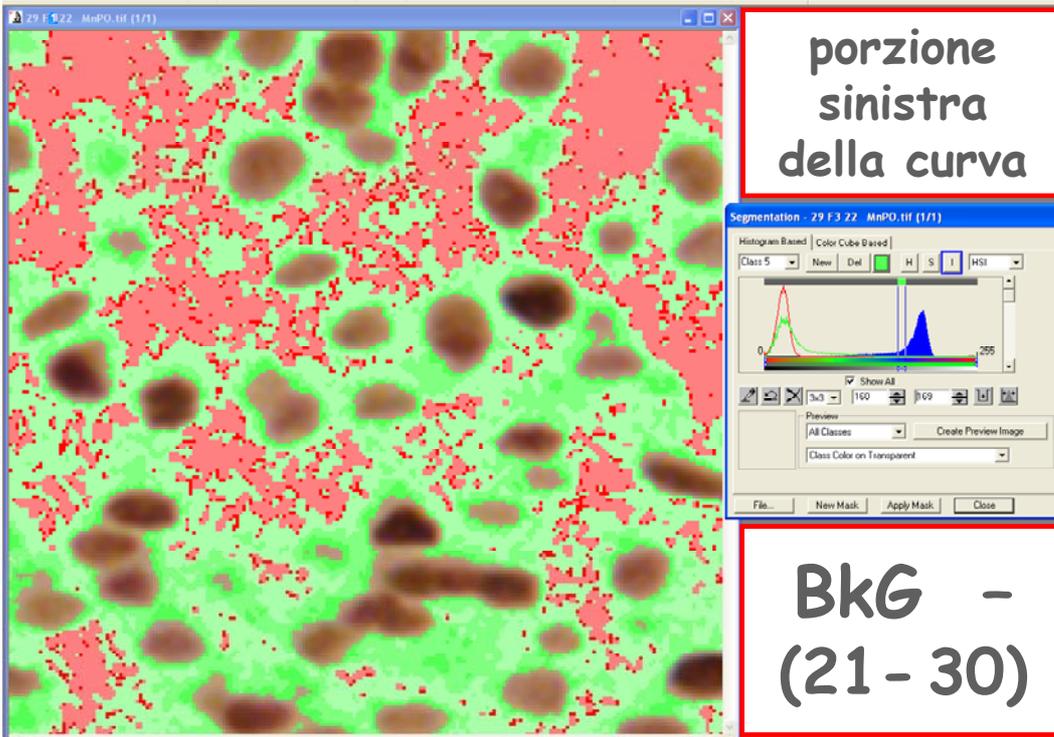
C



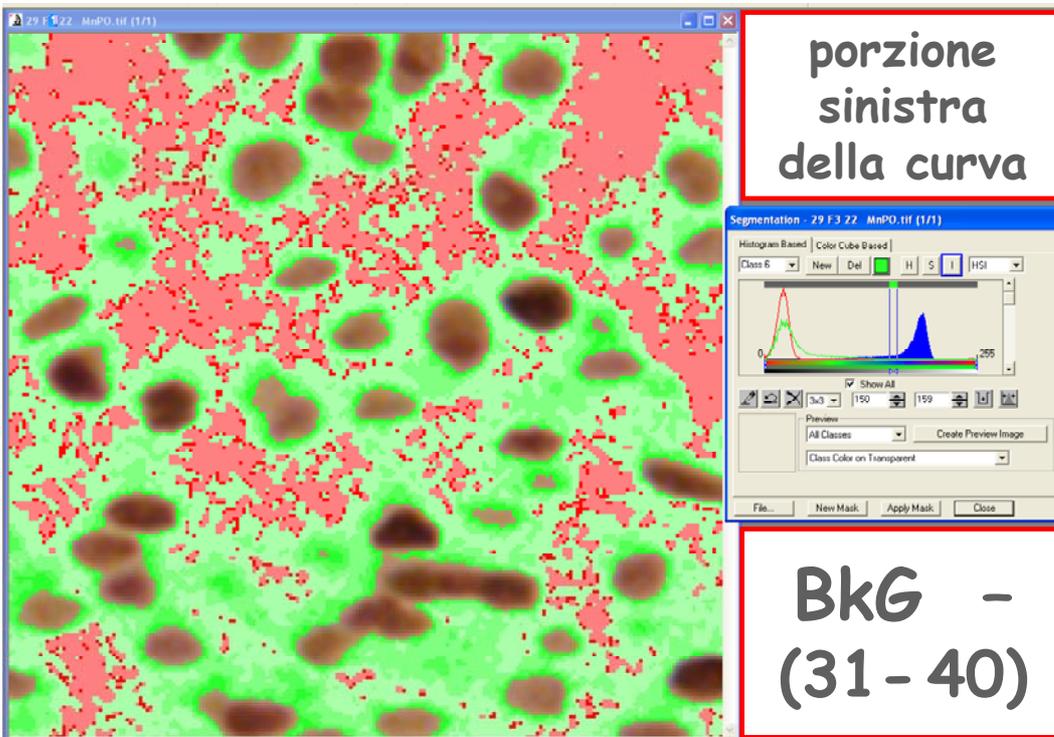
D



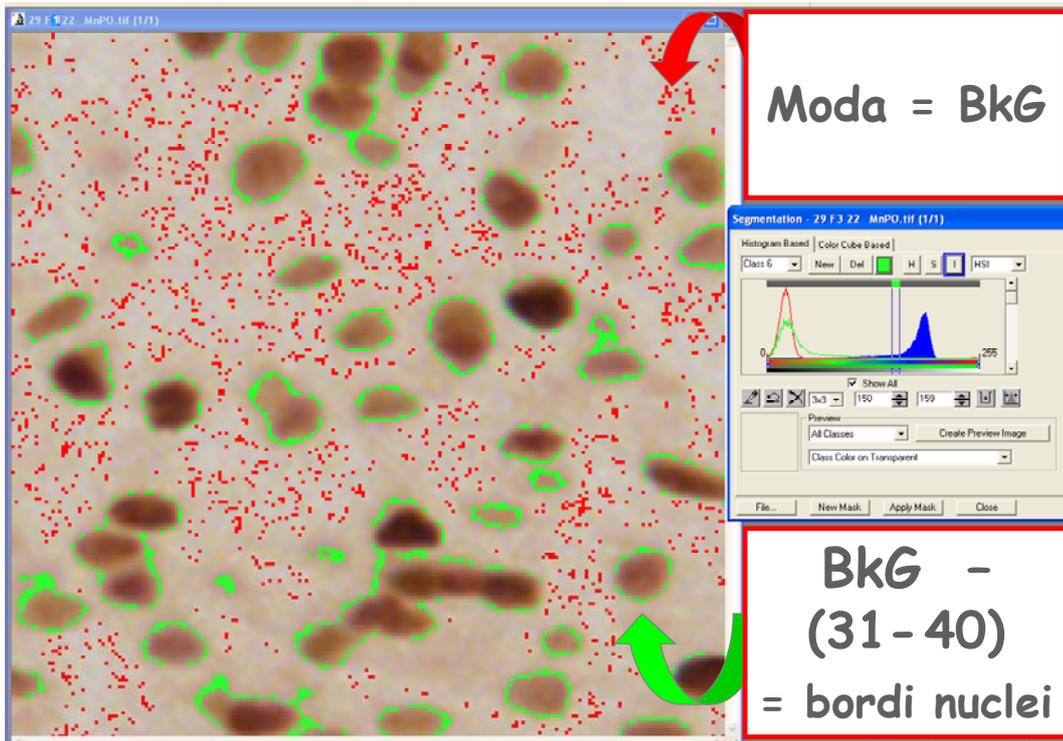
E



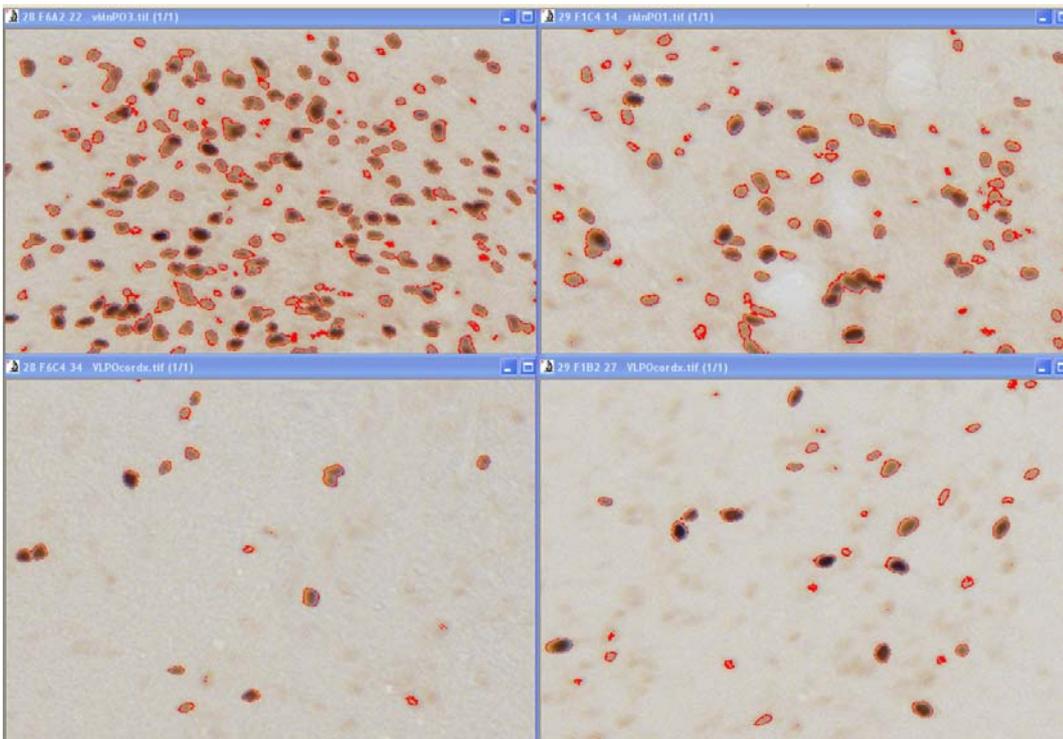
F



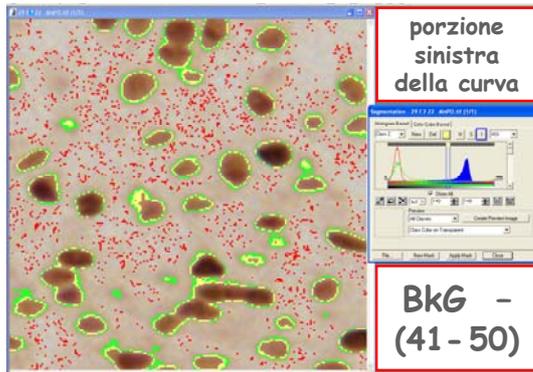
G



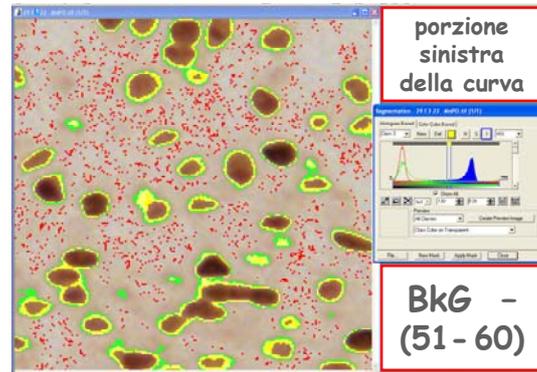
H



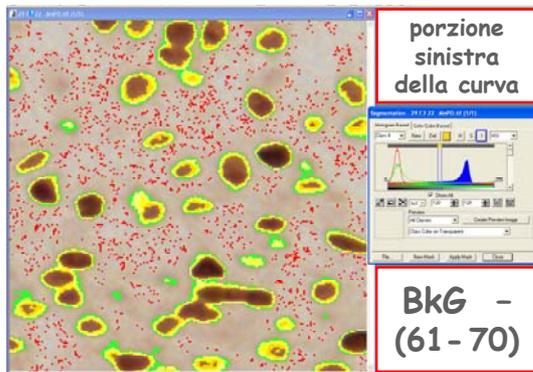
I



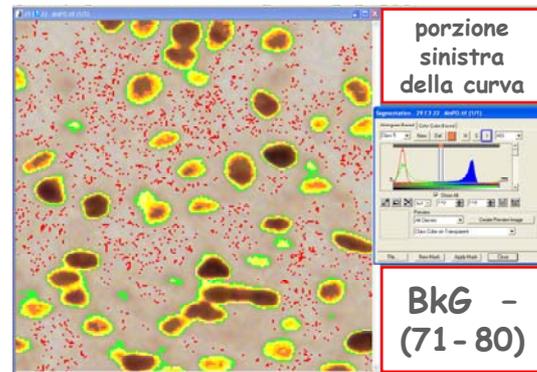
L



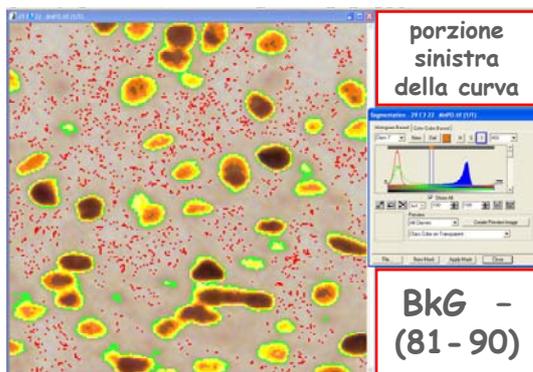
M



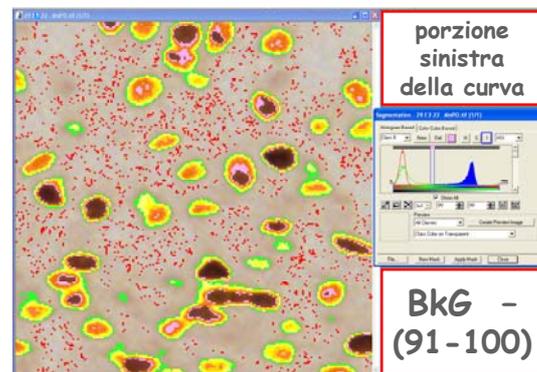
N



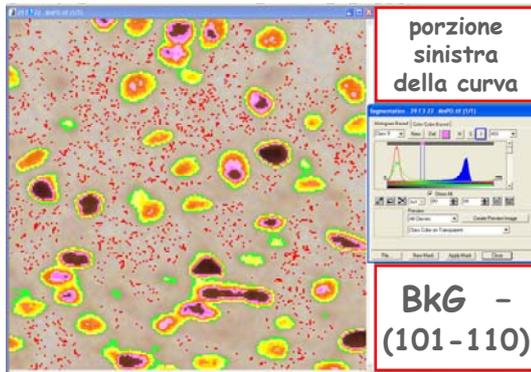
O



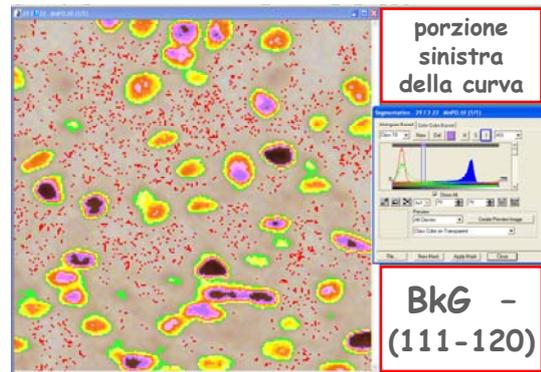
P



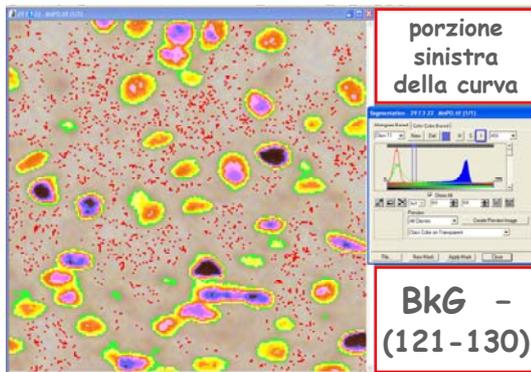
Q



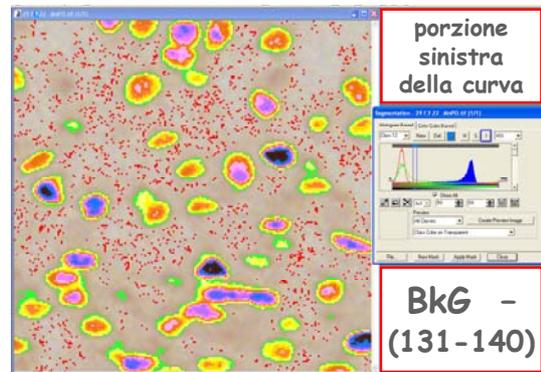
R



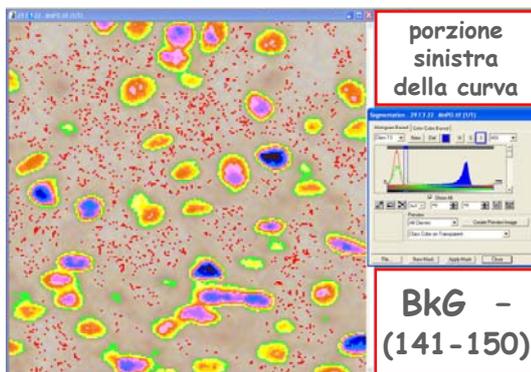
S



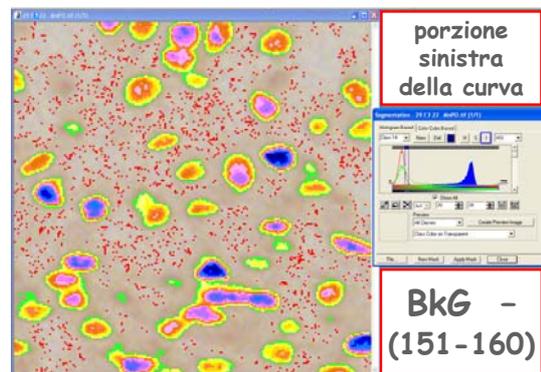
T



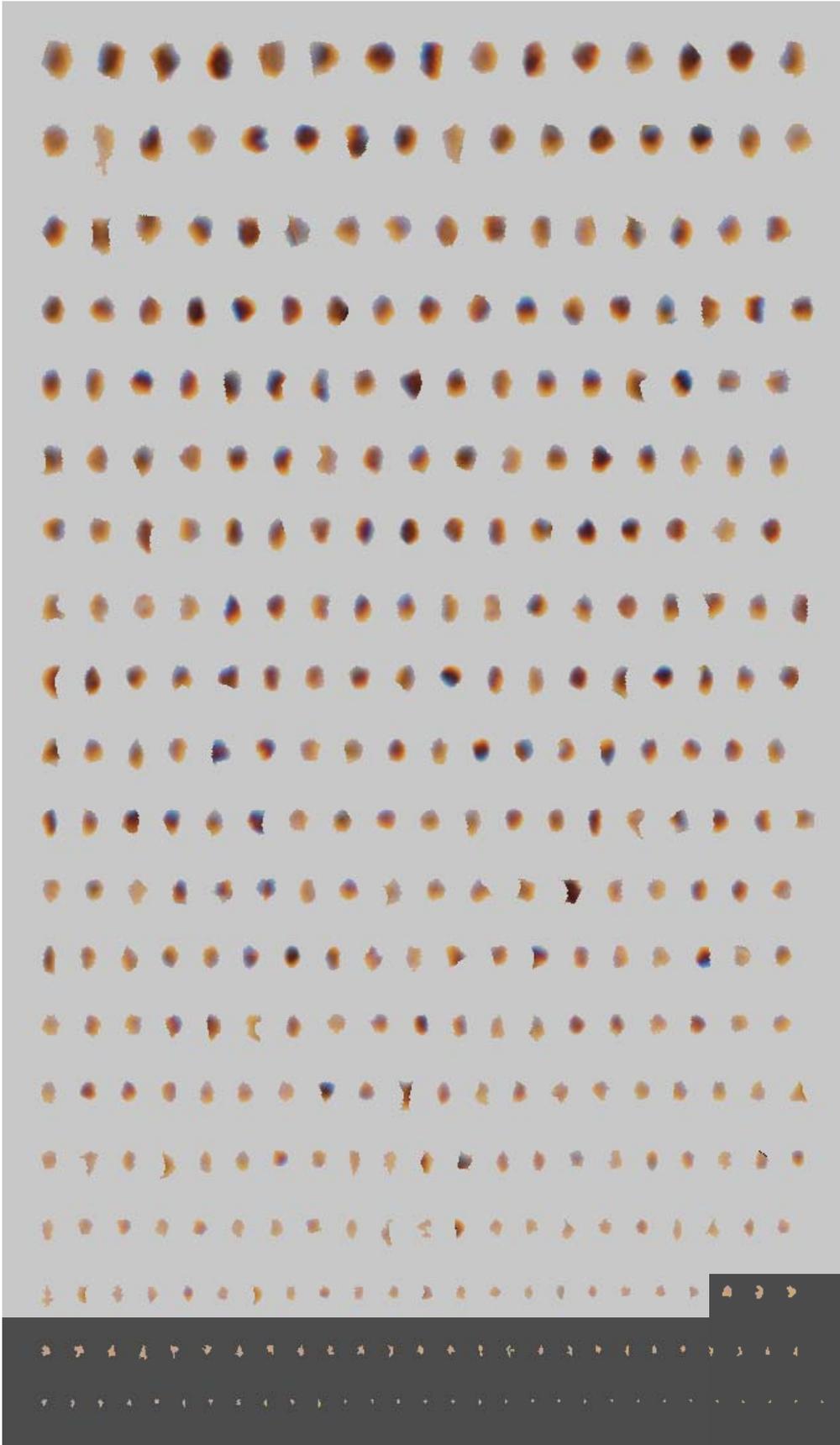
U



V



A



Correlazione tra area e intensità degli oggetti sopra soglia

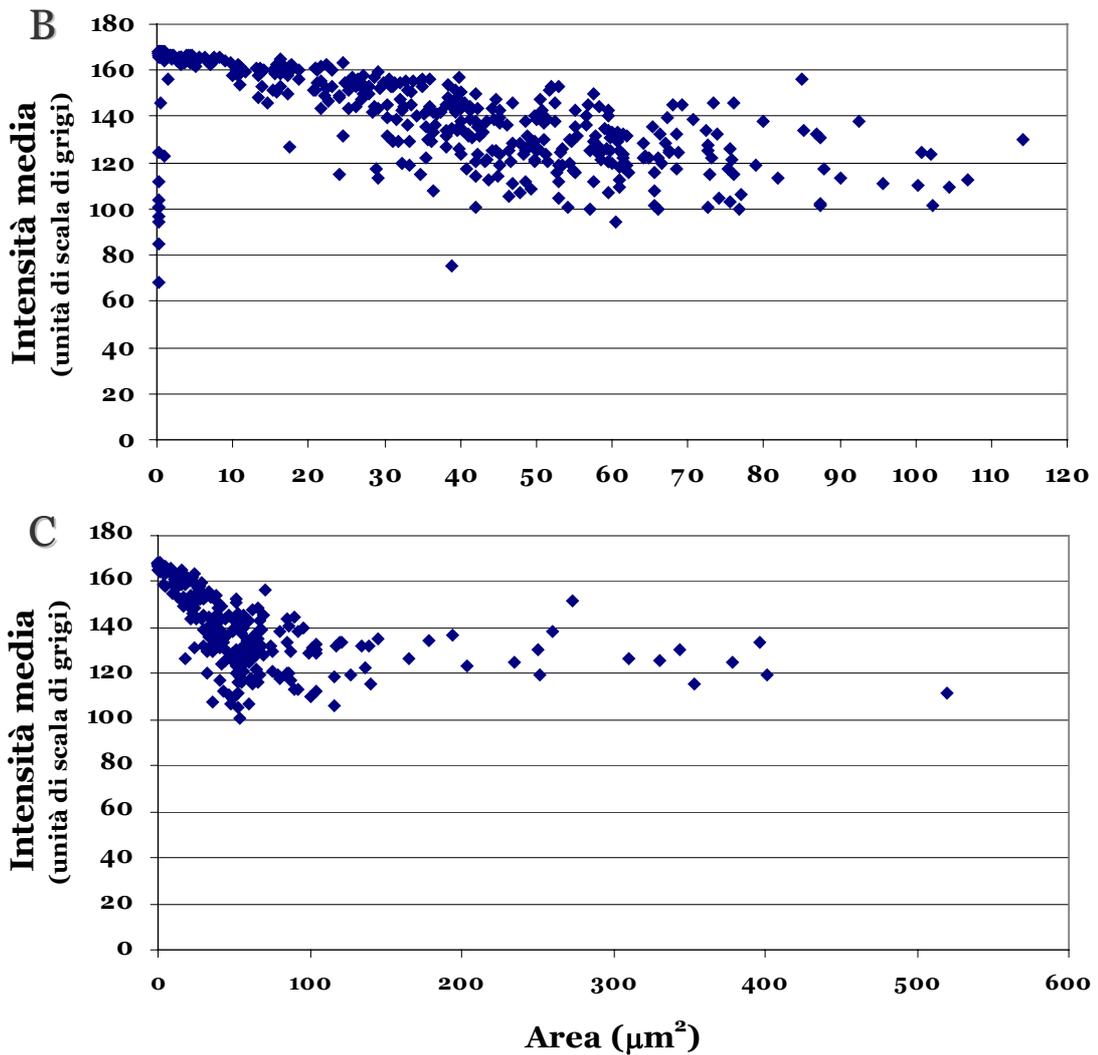


Figura 27. A Oggetti risultati sopra soglia, estrapolati dalla griglia vMnPO4, applicata alla sezione 28 F4A4 24. Su sfondo più scuro gli oggetti eliminati dal conteggio, applicando un filtro d'area pari a $10 \mu\text{m}^2$. B Correlazione tra area e intensità degli oggetti sopra soglia (168, per un BkG = 203) rappresentati in A. L'intensità è espressa in unità di scala di grigi, nella quale lo 0 corrisponde al nero e il 255 al bianco. Gli oggetti piccoli di intensità più elevate sono stati prodotti durante la separazione dei raggruppamenti di nuclei, come si evidenzia dal fatto che non sono presenti in C, cioè prima di tale operazione.

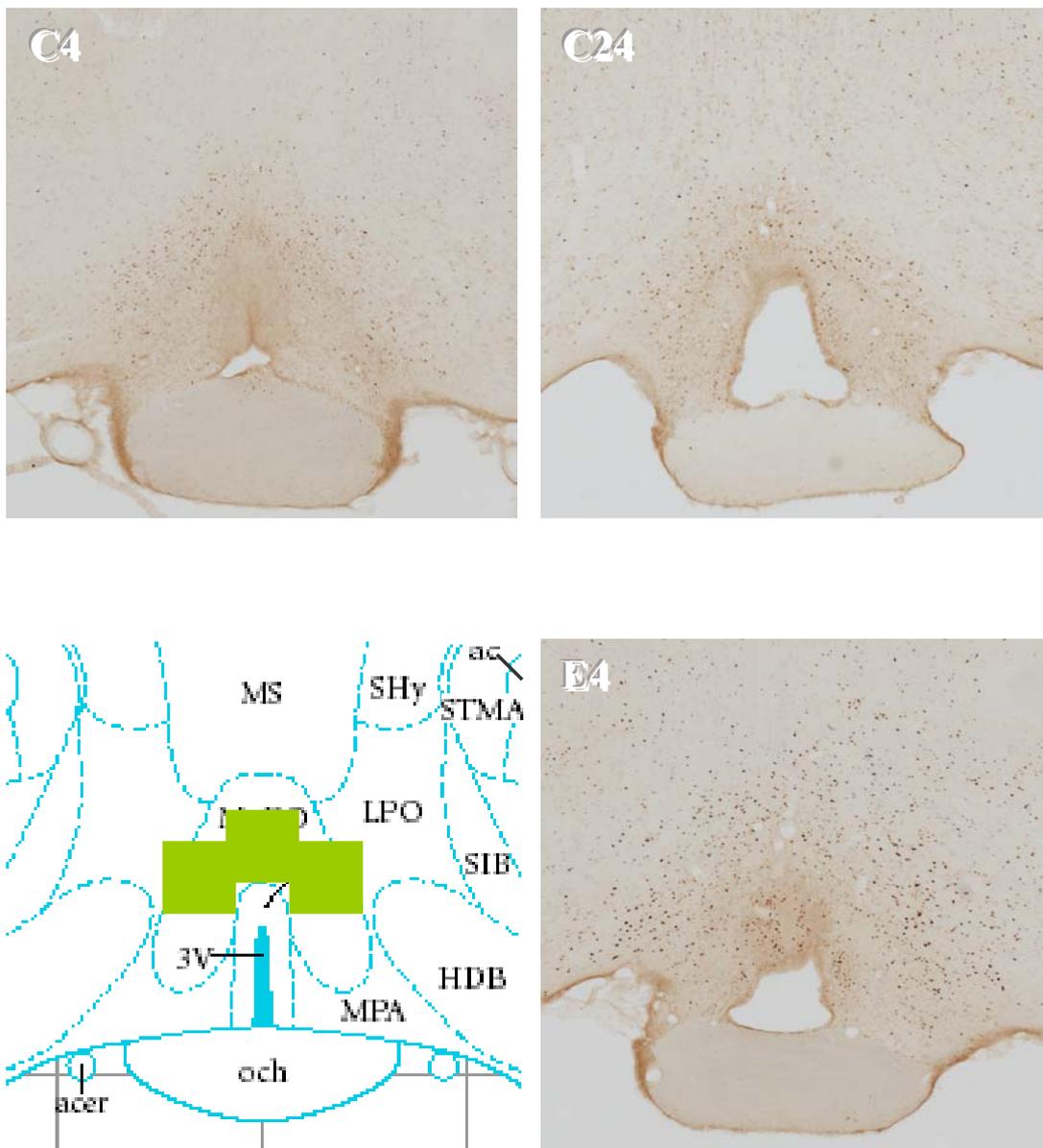
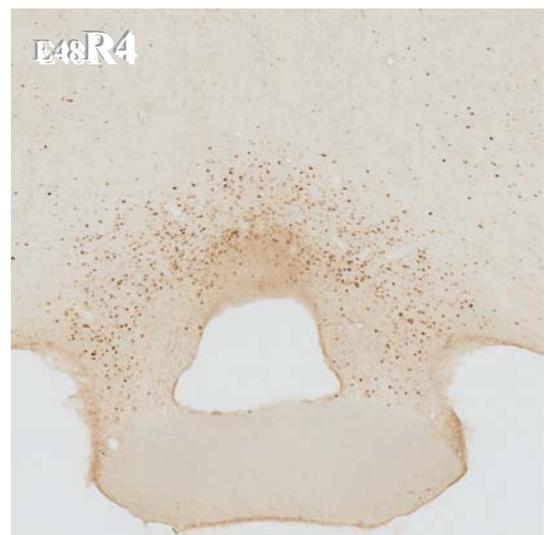
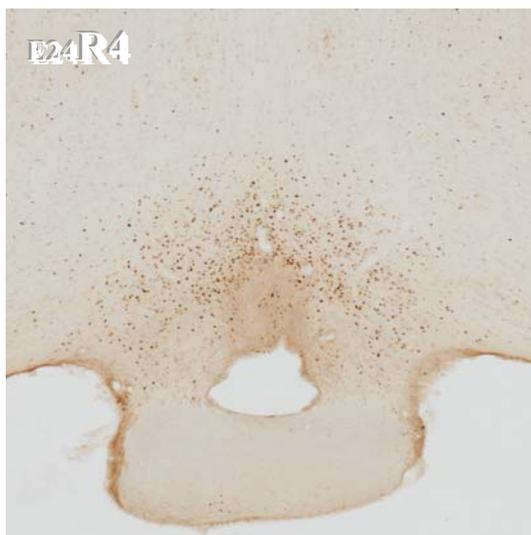
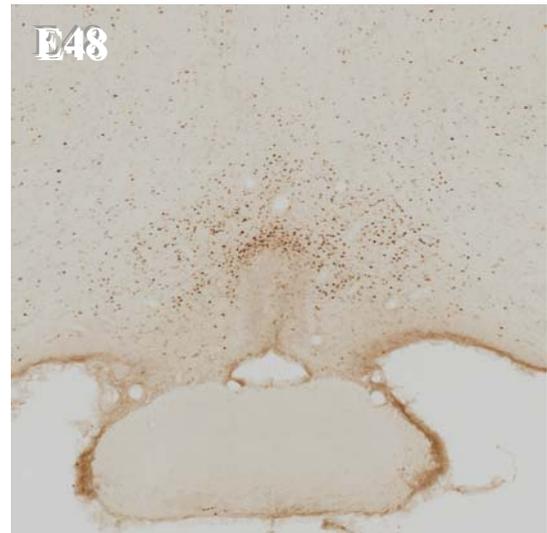
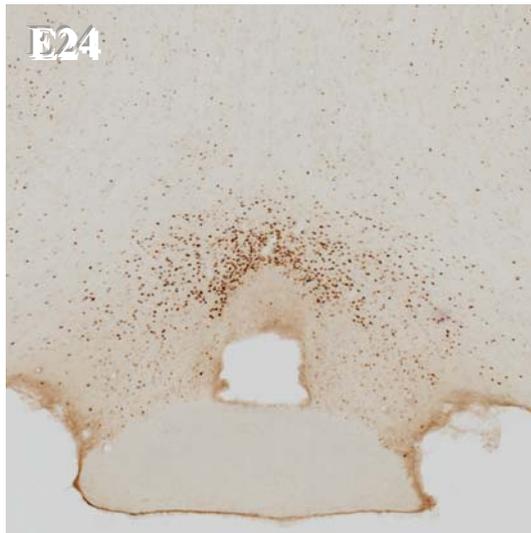


Figura 28. Esempi rappresentativi dell'immunoreattività per l'Ag c-Fos a livello del rMnPO (~ bregma +0,30 mm) nelle diverse condizioni sperimentali studiate, descritte in Figura 10. Nel riquadro in basso a sinistra, particolare della tavola 30



dell'atlante Paxinos e Watson, 2005 (bregma +0,36 mm), con rappresentazione schematica della griglia di conta. Per gli acronimi, si veda *l'Indice delle abbreviazioni*.

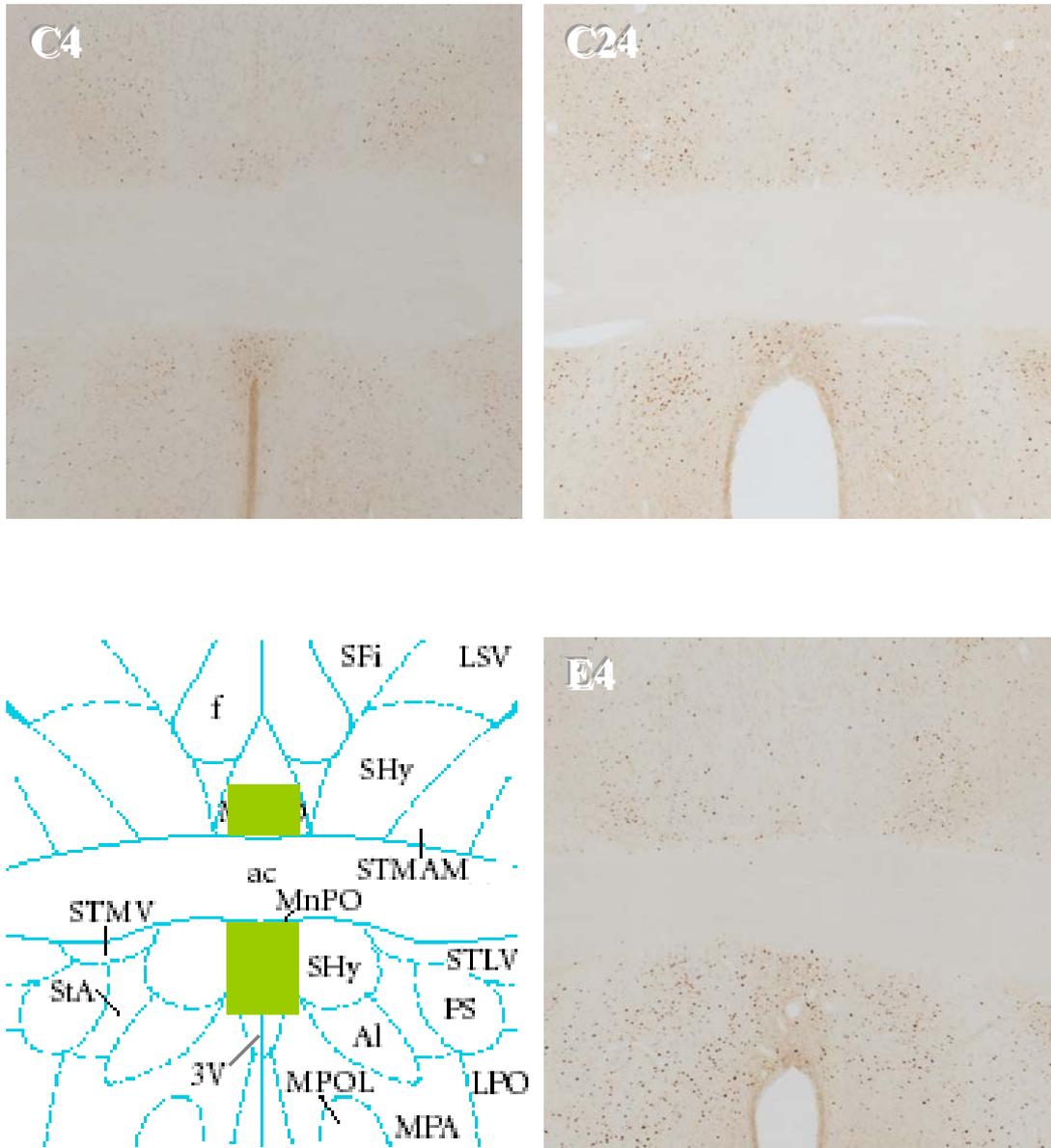
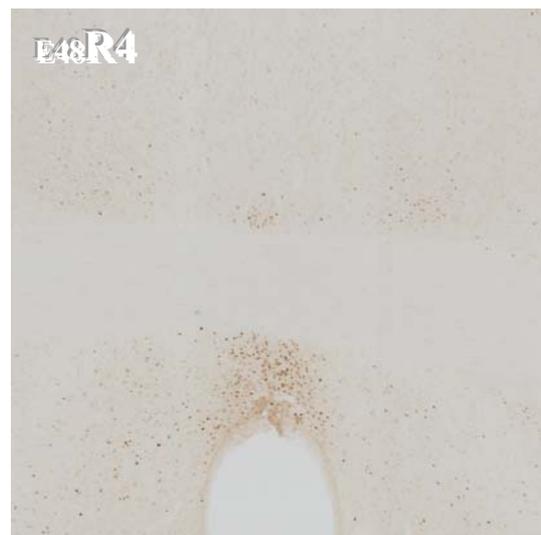
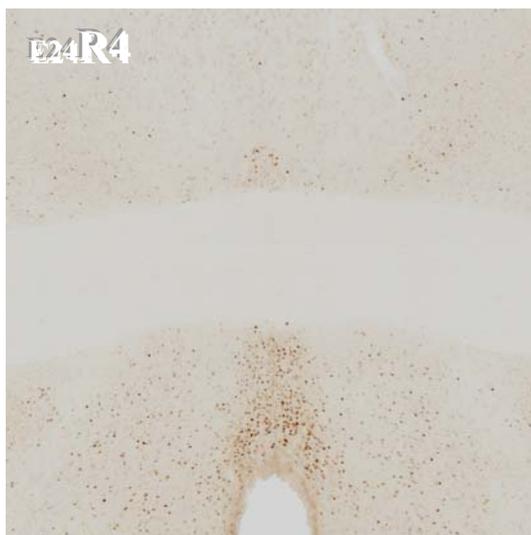


Figura 29. Esempi rappresentativi dell'immunoreattività per l'Ag c-Fos a livello del cMnPO (~ bregma -0,20 mm) nelle diverse condizioni sperimentali studiate, descritte in Figura 10. Nel riquadro in basso a sinistra, particolare della tavola 34 dell'atlante Paxinos e Watson, 2005 (bregma -0,12 mm), con rappresentazione



schematica della griglia di conta, suddivisa in porzione sottocommissurale (vMnPO) e sovracommissurale (dMnPO). Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

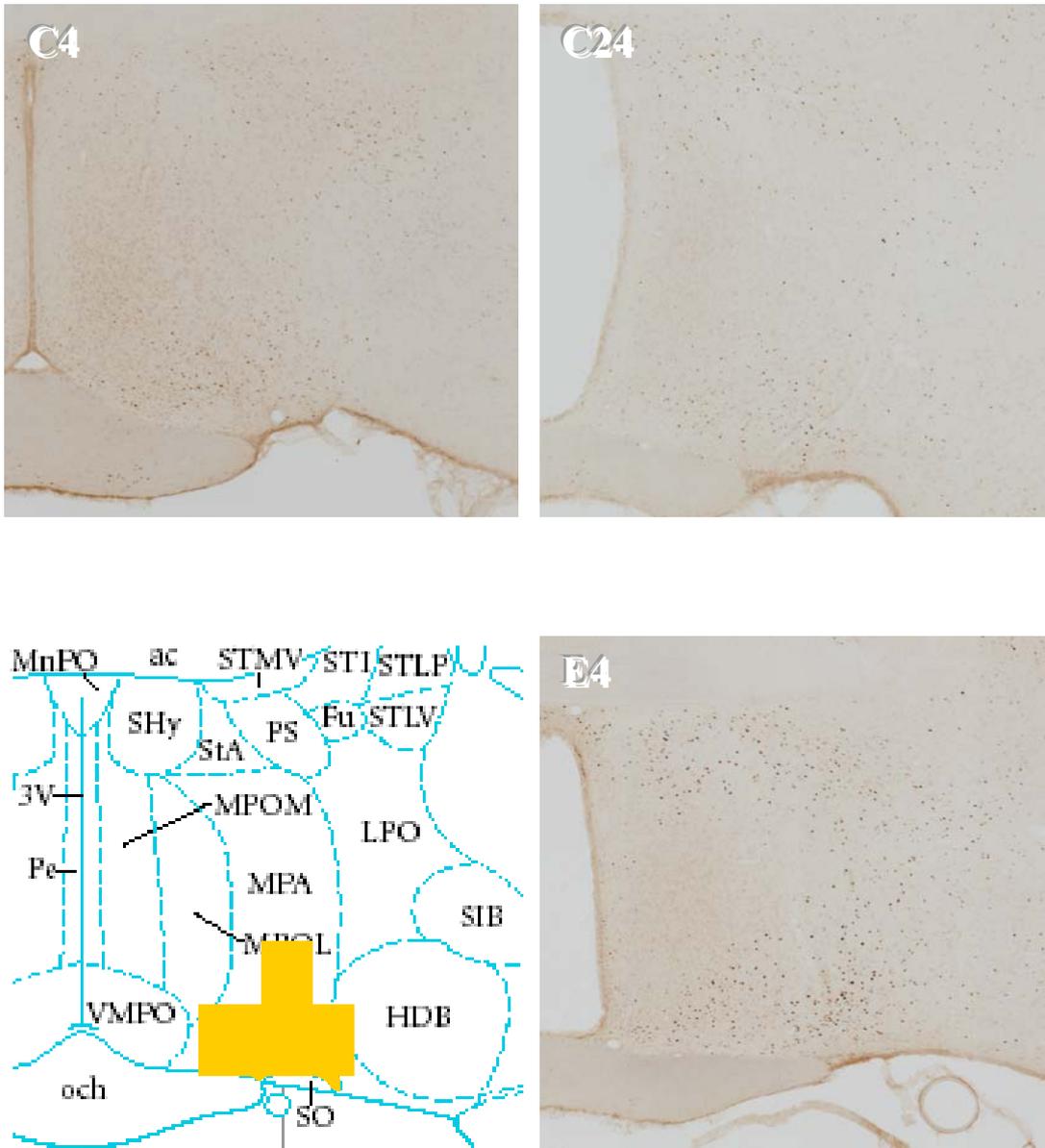
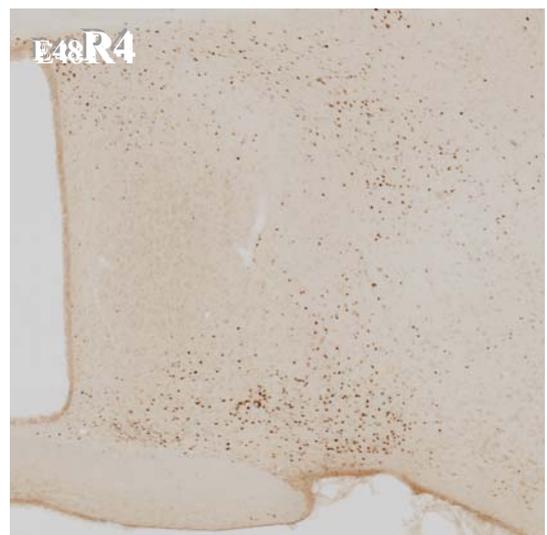
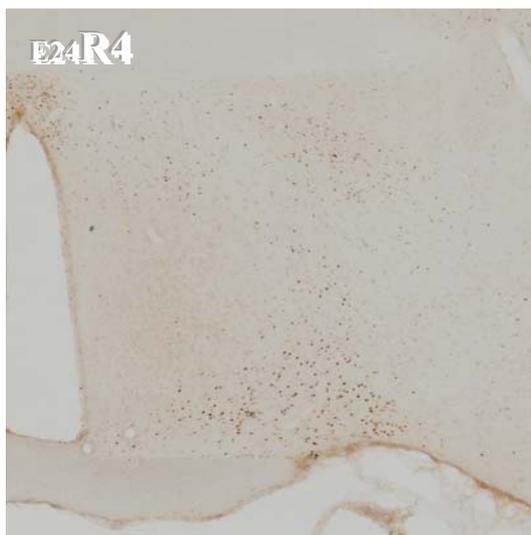
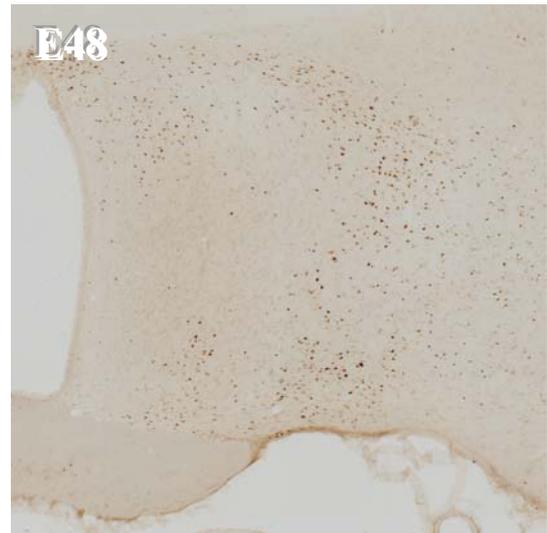
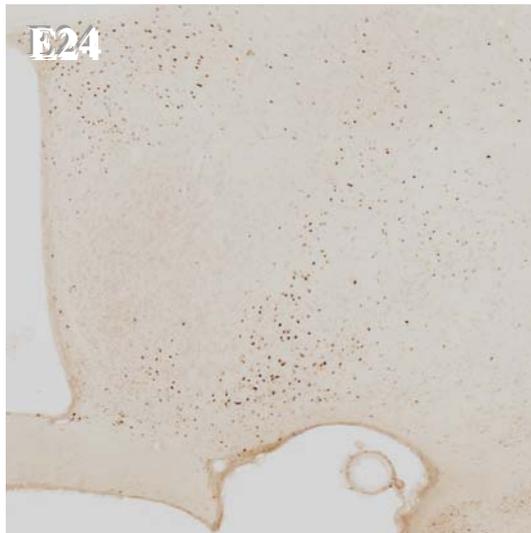


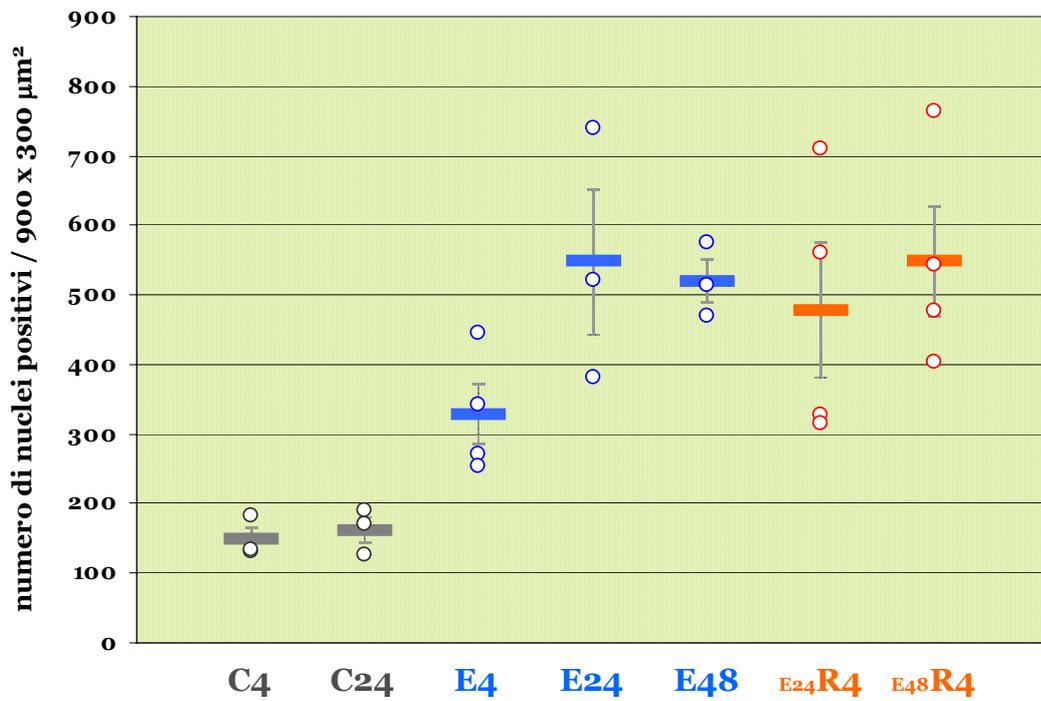
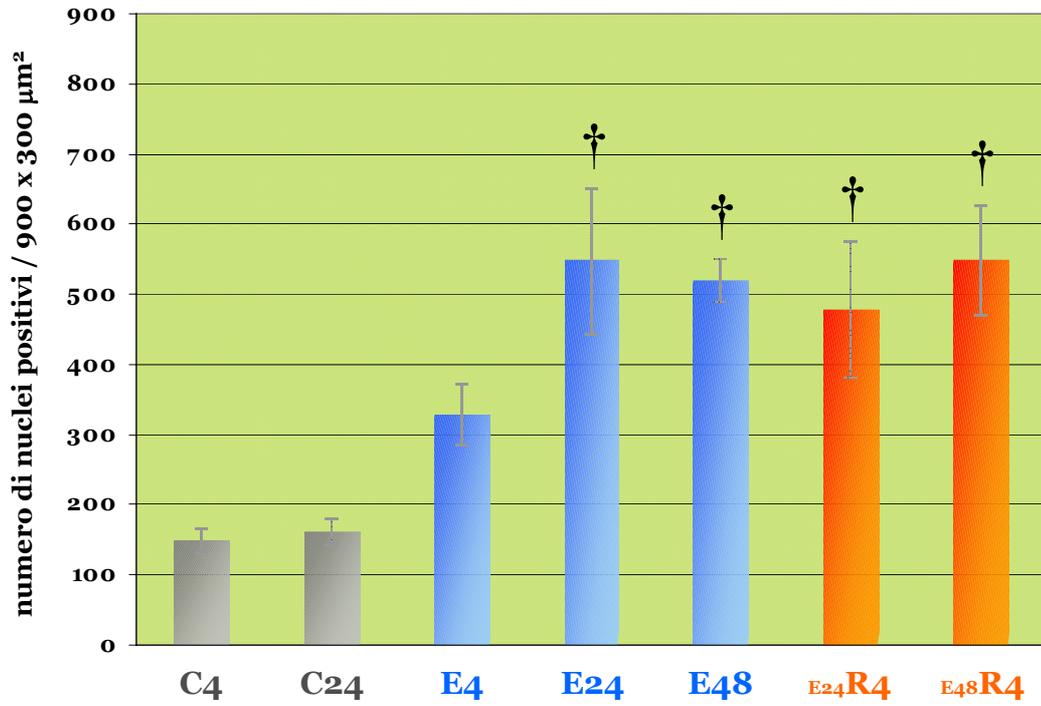
Figura 30. Esempi rappresentativi dell'immunoreattività per l'Ag c-Fos a livello del VLPO (~ bregma -0,30 mm) nelle diverse condizioni sperimentali studiate, descritte in Figura 10. Nel riquadro in basso a sinistra, particolare della tavola 35



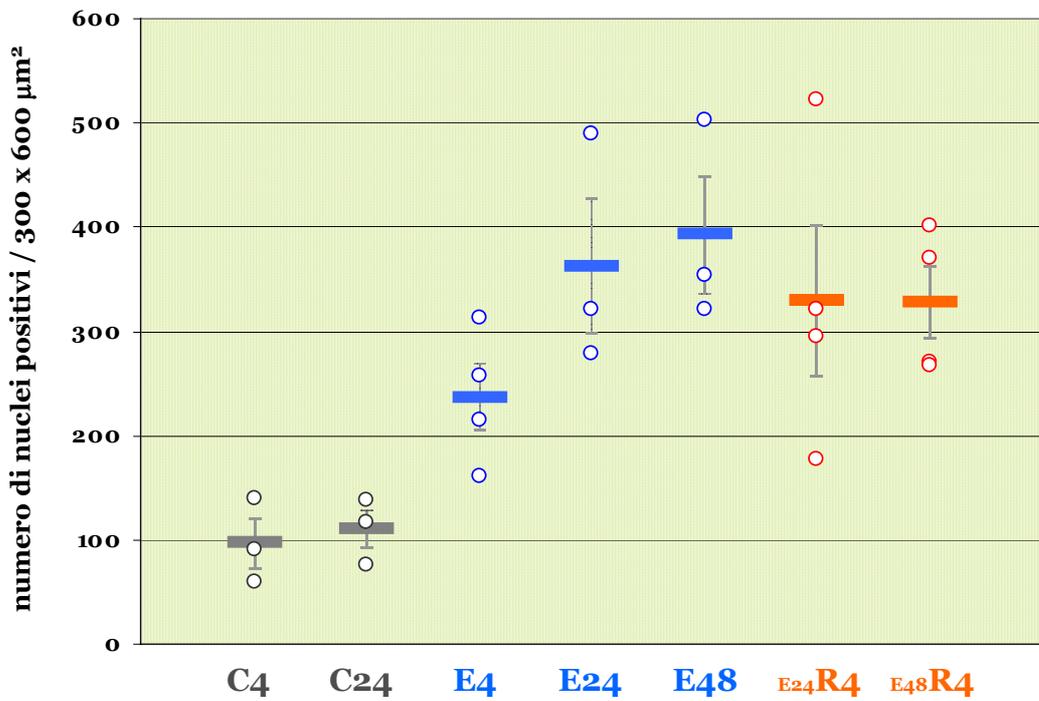
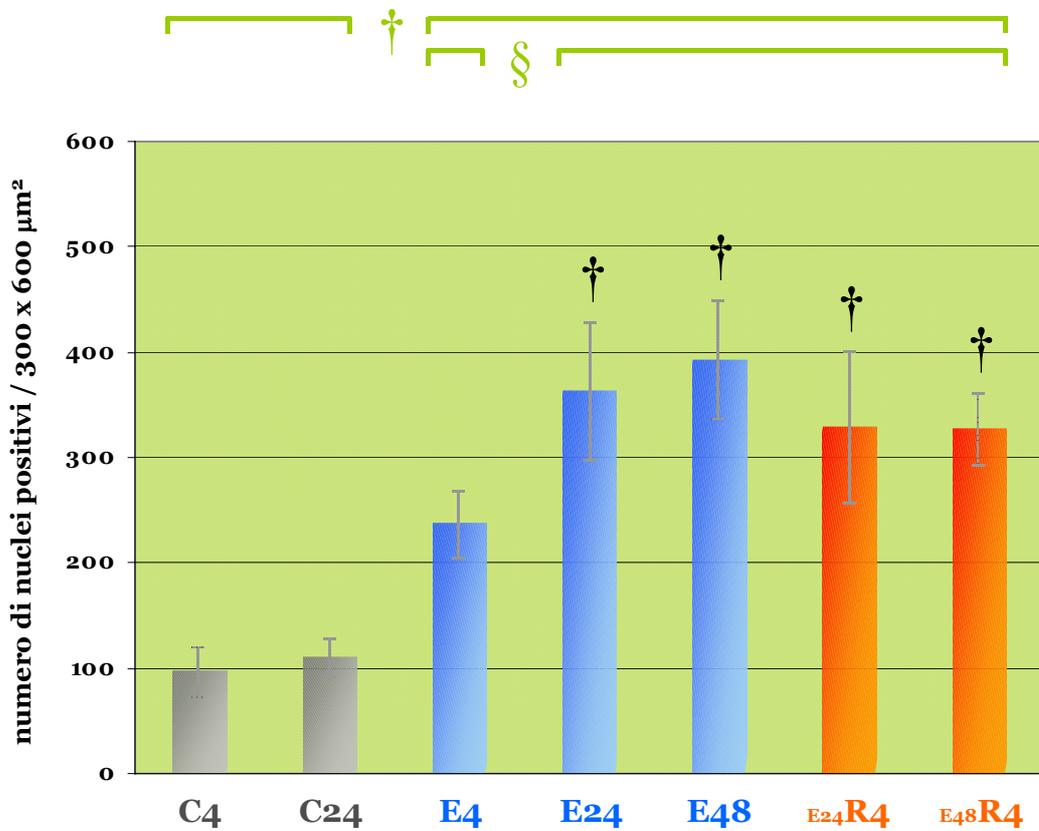
dell'atlante Paxinos e Watson, 2005 (bregma -0,24 mm), con rappresentazione schematica della griglia di conta, nelle suddivisioni: VLPOcor, VLPOmed e VLPOdor. Per gli acronimi, si veda l'*Indice delle abbreviazioni*.

Figura 31. Risultati dei conteggi dei nuclei positivi a livello del MnPO, nelle suddivisioni anatomiche rostrale, caudale ventrale e caudale dorsale. I dati, espressi come medie e relativi errori standard, sono presentati sotto due forme grafiche e cioè tramite istogrammi (in alto) e come dati singoli (in basso: le barrette orizzontali indicano i valori medi). I contrasti sono illustrati al di sopra del grafico, dove le parentesi quadre indicano i gruppi tra i quali è effettuato il contrasto; mentre i confronti post-hoc sono raffigurati al di sopra degli istogrammi, all'interno della cornice del grafico. Significatività statistiche per i contrasti: † = $p < 0.01$; § = $p < 0.05$. Per i confronti post-hoc, † = $p < 0.01$ *versus* Controlli; § = $p < 0.05$ *versus* Controlli.

MnPO rostrale



MnPO caudale ventrale



MnPO caudale dorsale

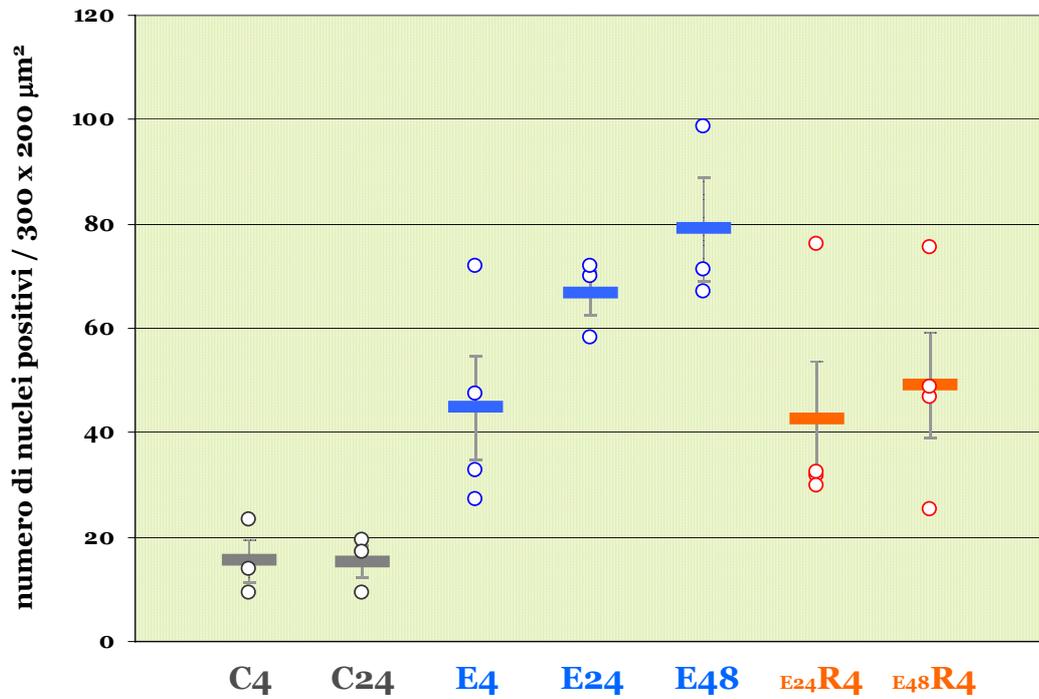
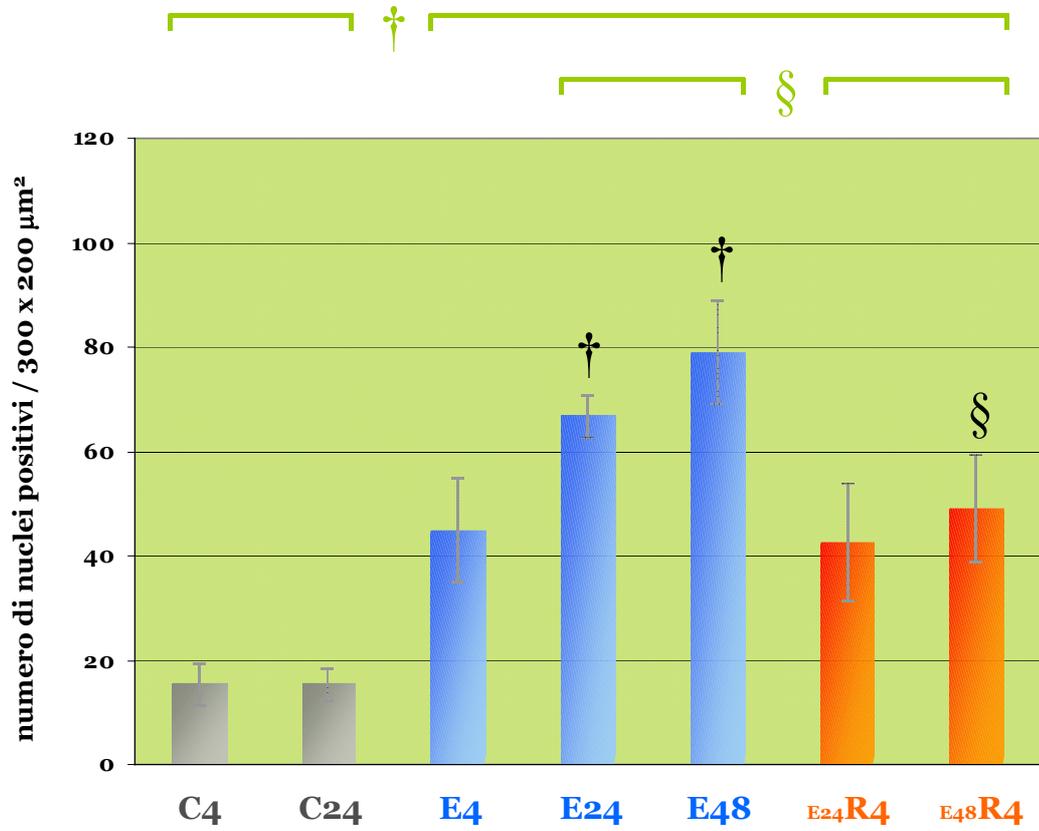
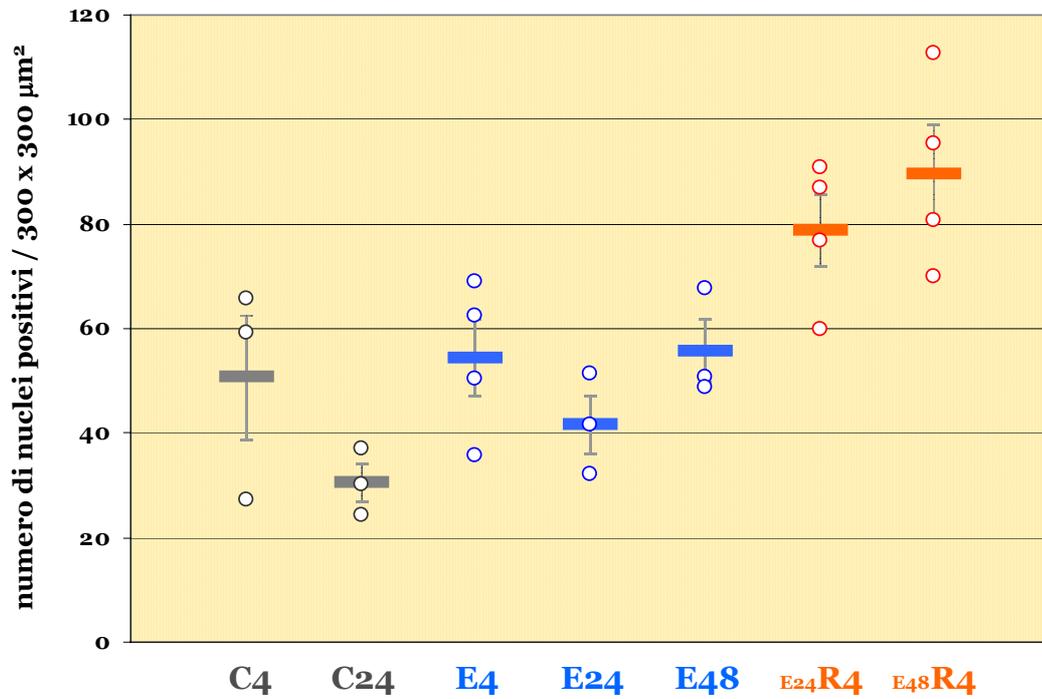
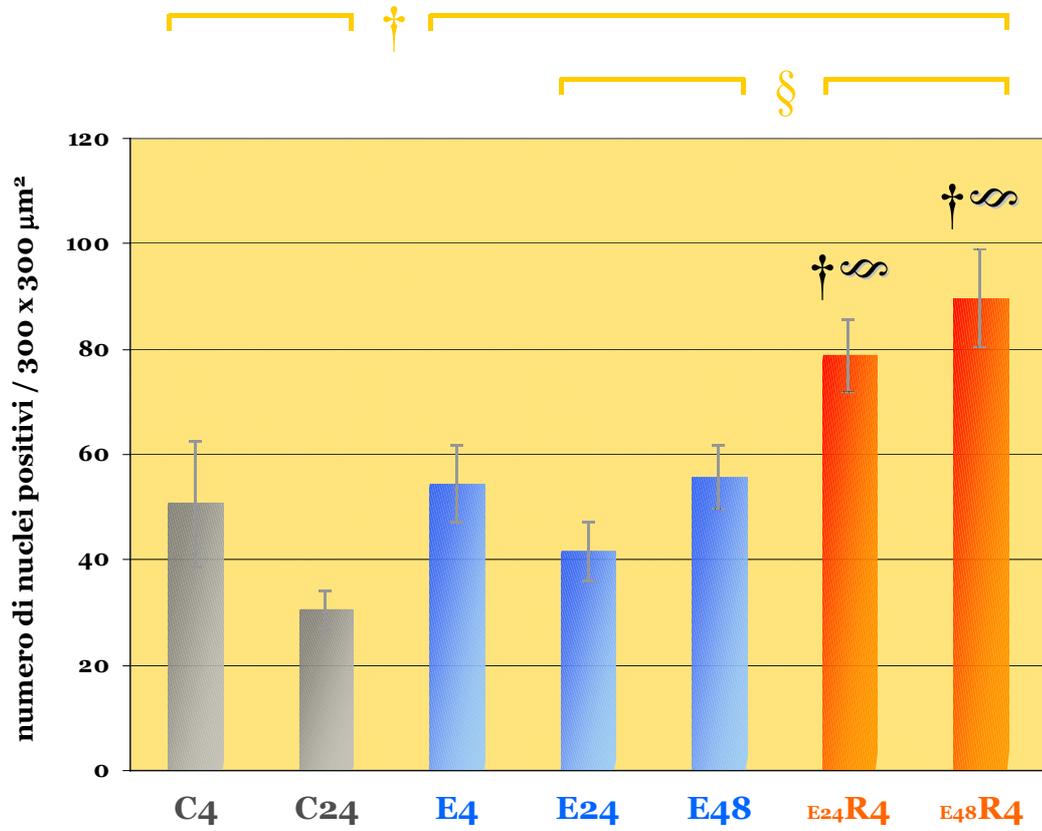
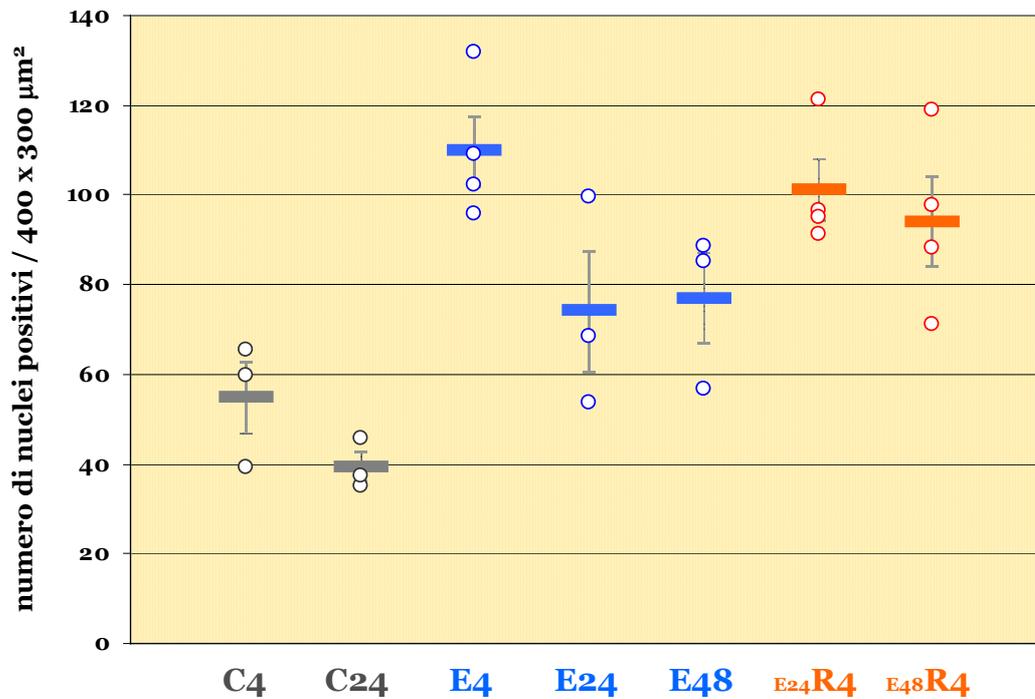
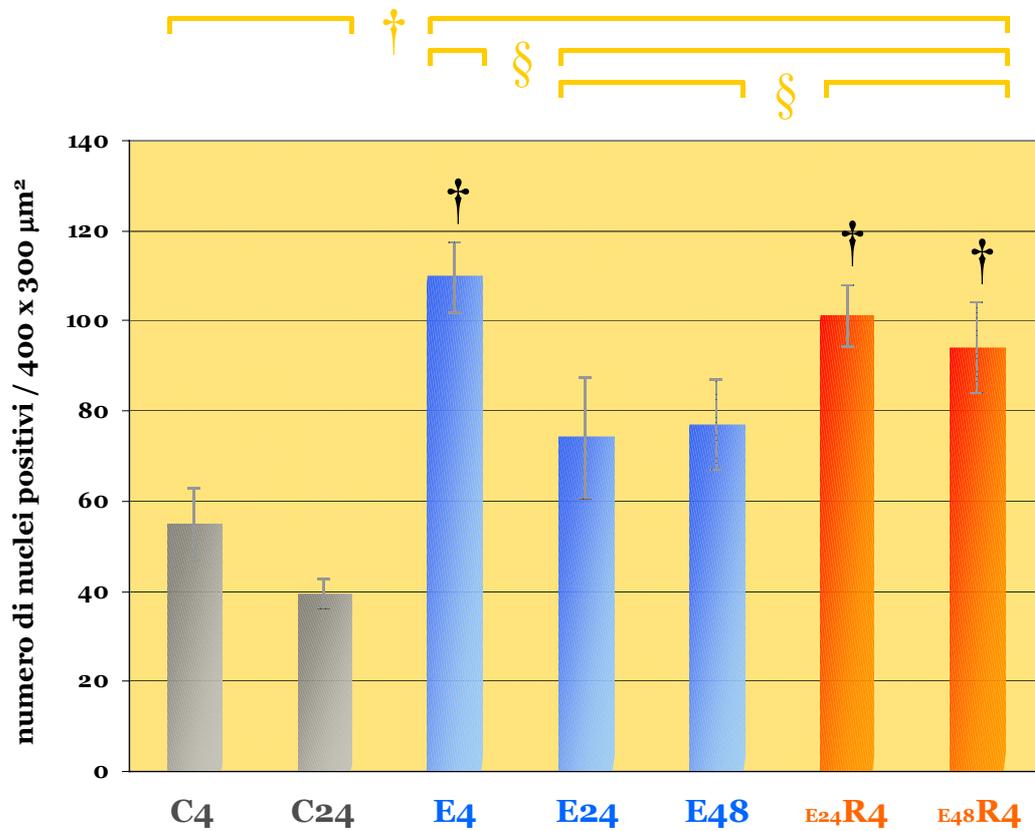


Figura 32. Risultati dei conteggi dei nuclei positivi a livello del VLPO, nelle suddivisioni anatomiche del core e dell'estensione mediale e dorsale. I dati, espressi come medie e relativi errori standard, sono presentati sotto due forme grafiche e cioè tramite istogrammi (in alto) e come dati singoli (in basso: le barrette orizzontali indicano i valori medi). I contrasti sono illustrati al di sopra del grafico, dove le parentesi quadre indicano i gruppi tra i quali è effettuato il contrasto; mentre i confronti post-hoc sono raffigurati al di sopra degli istogrammi, all'interno della cornice del grafico. Significatività statistiche per i contrasti: † = $p < 0.01$; § = $p < 0.05$. Per i confronti post-hoc, † = $p < 0.01$ *versus* Controlli; § = $p < 0.05$ *versus* Controlli; ∞ = $p < 0.05$ *versus* E24 (nel caso di E24R4) o *versus* E48 (nel caso di E48R4).

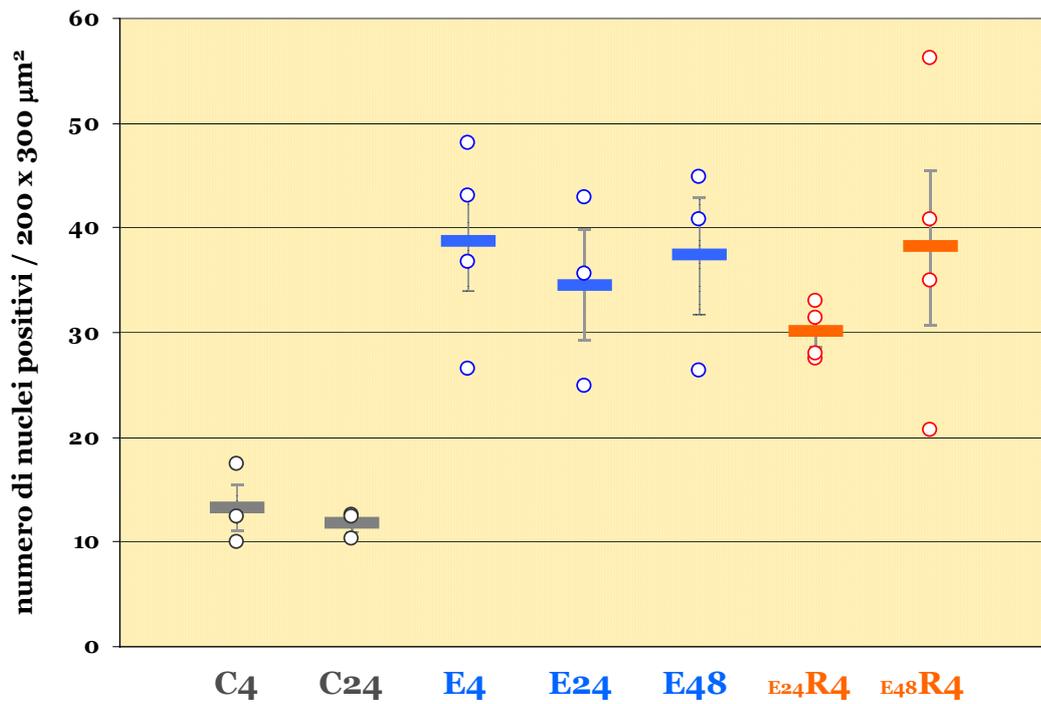
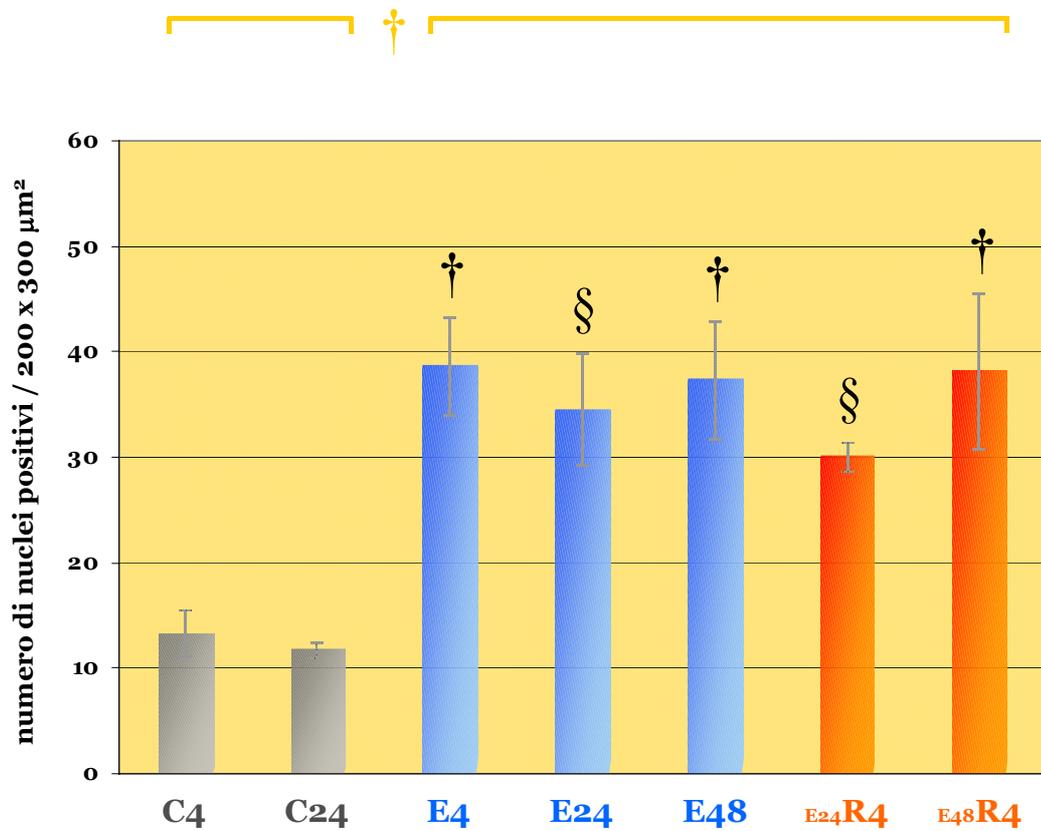
VLPO core



VLPO estensione mediale



VLPO estensione dorsale



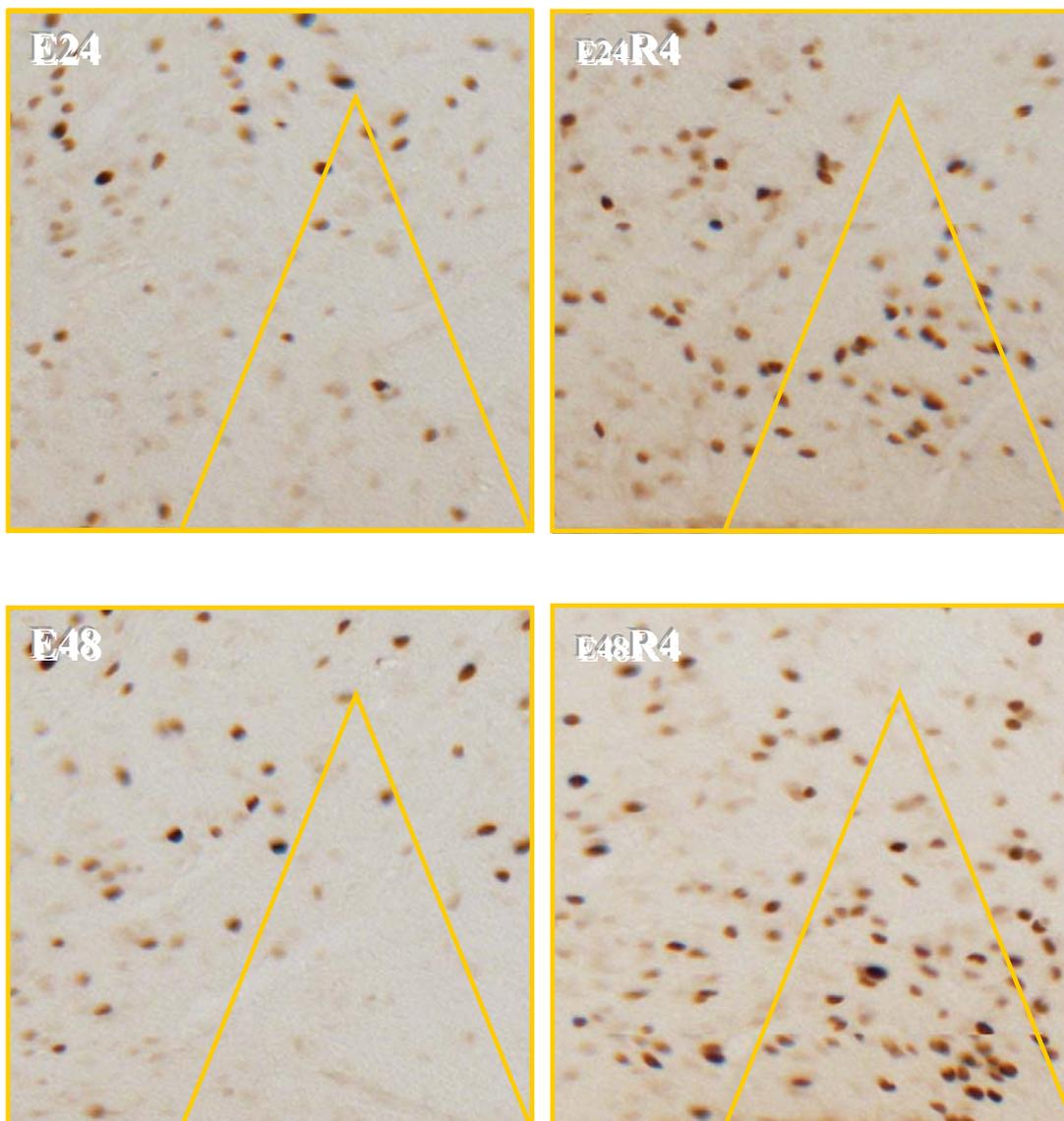


Figura 33. Core del VLPO (lato destro), campioni corrispondenti all'area di conta, di 300 μm di lato. Si notano i caratteristici pattern di distribuzione dei nuclei marcati, che nell'esposizione al freddo (E24 ed E48) tendono a disporsi nella parte alta rispetto all'area di conta, mentre durante il successivo recupero (E24R4 ed E48R4) vanno a riempire la parte bassa. Il triangolo indica l'area, avente base di 200 μm e altezza di 250 μm , posizionata lungo la base del cervello a partire dal bordo laterale del SO, considerata, in Lu et al., 2000, molto vicina per dimensioni, forma e posizione al raggruppamento cellulare che forma il core GABA-galaninergico del VLPO.

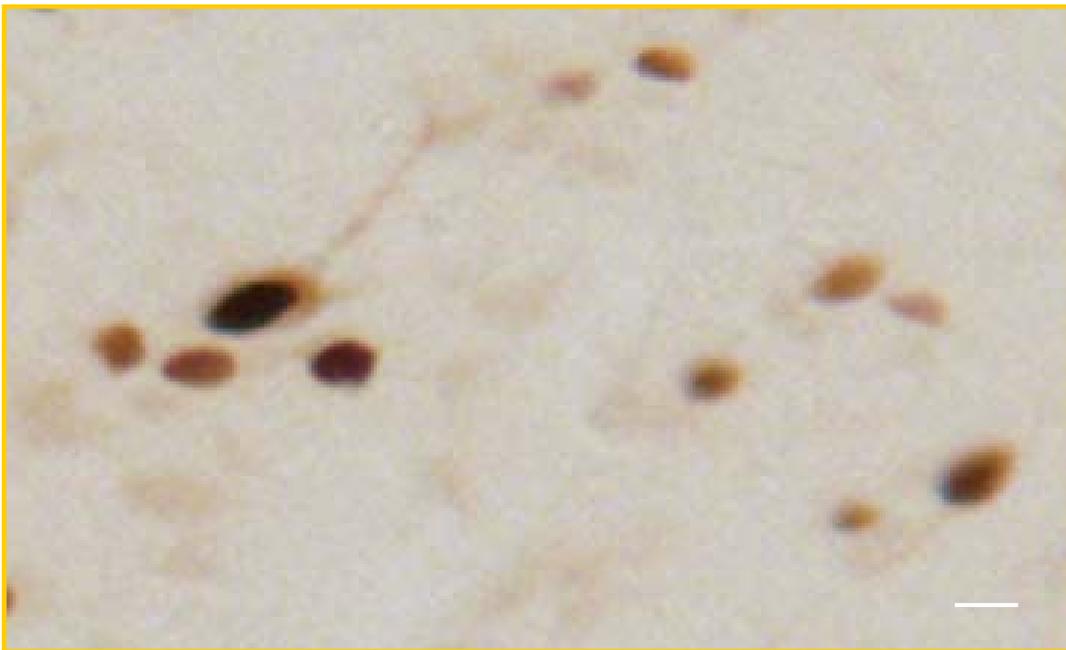
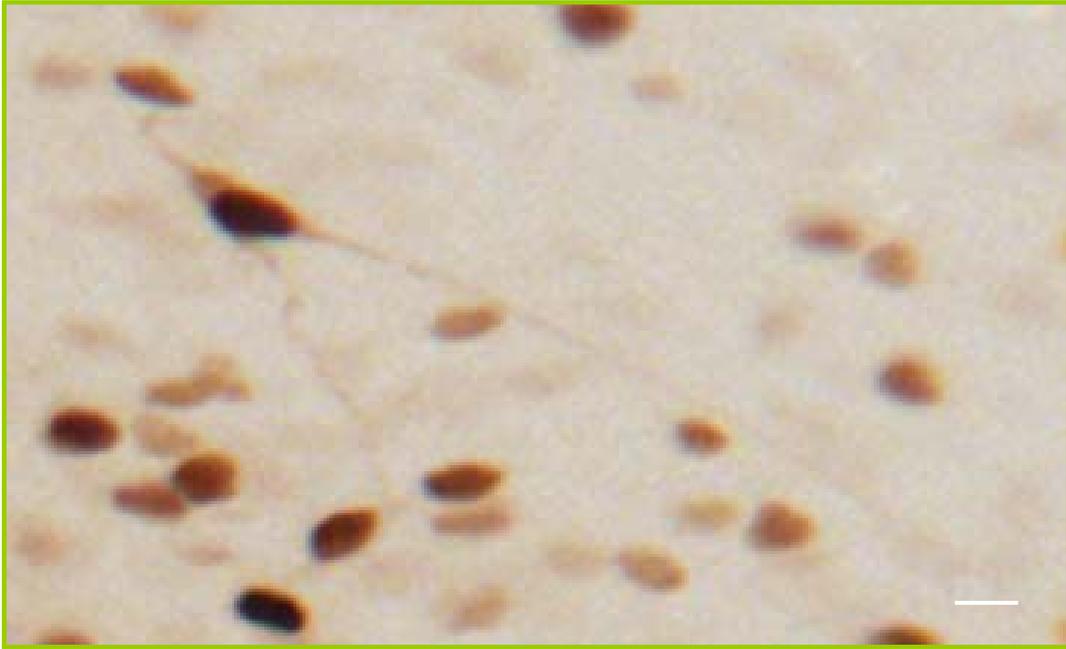


Figura 34. Reperto di immunoreattività citoplasmatica per c-Fos, caratteristico della condizione E4, a livello di soma e prolungamenti di singoli neuroni, nel contesto di popolazioni attive. In alto, MnPO. In basso, VLPO. Il riferimento in basso a destra per ogni riquadro equivale a 10 μ m.

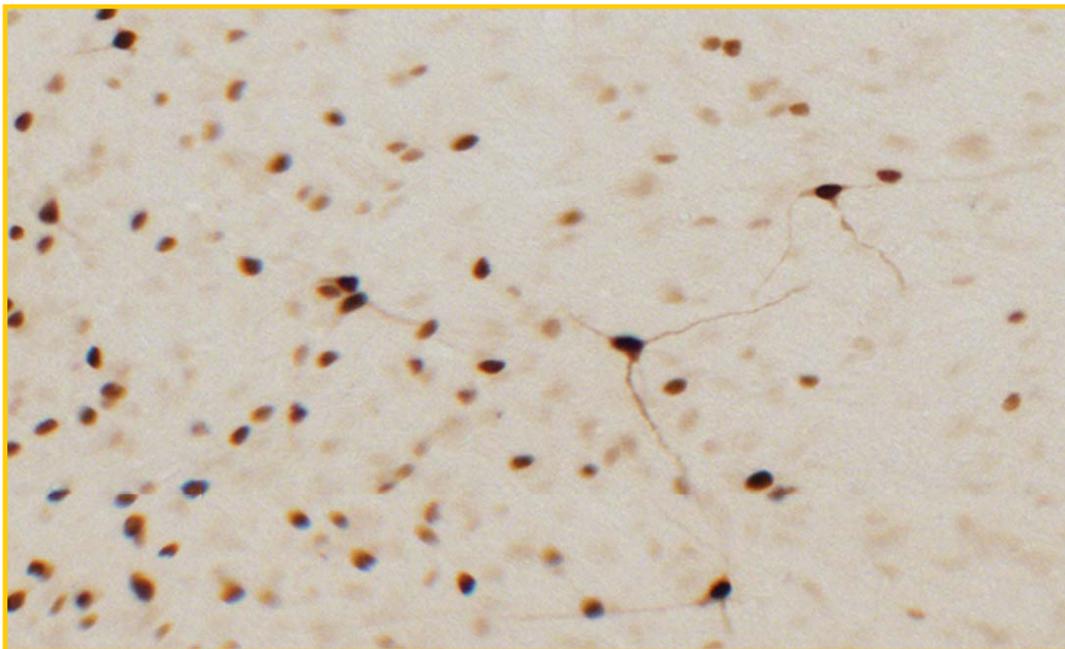
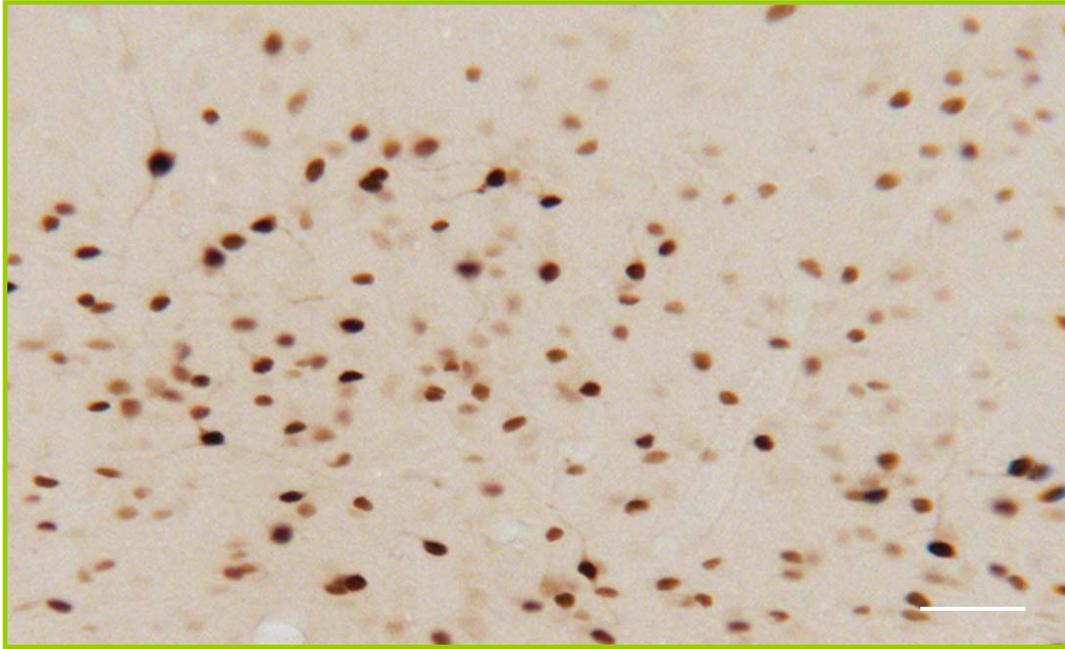
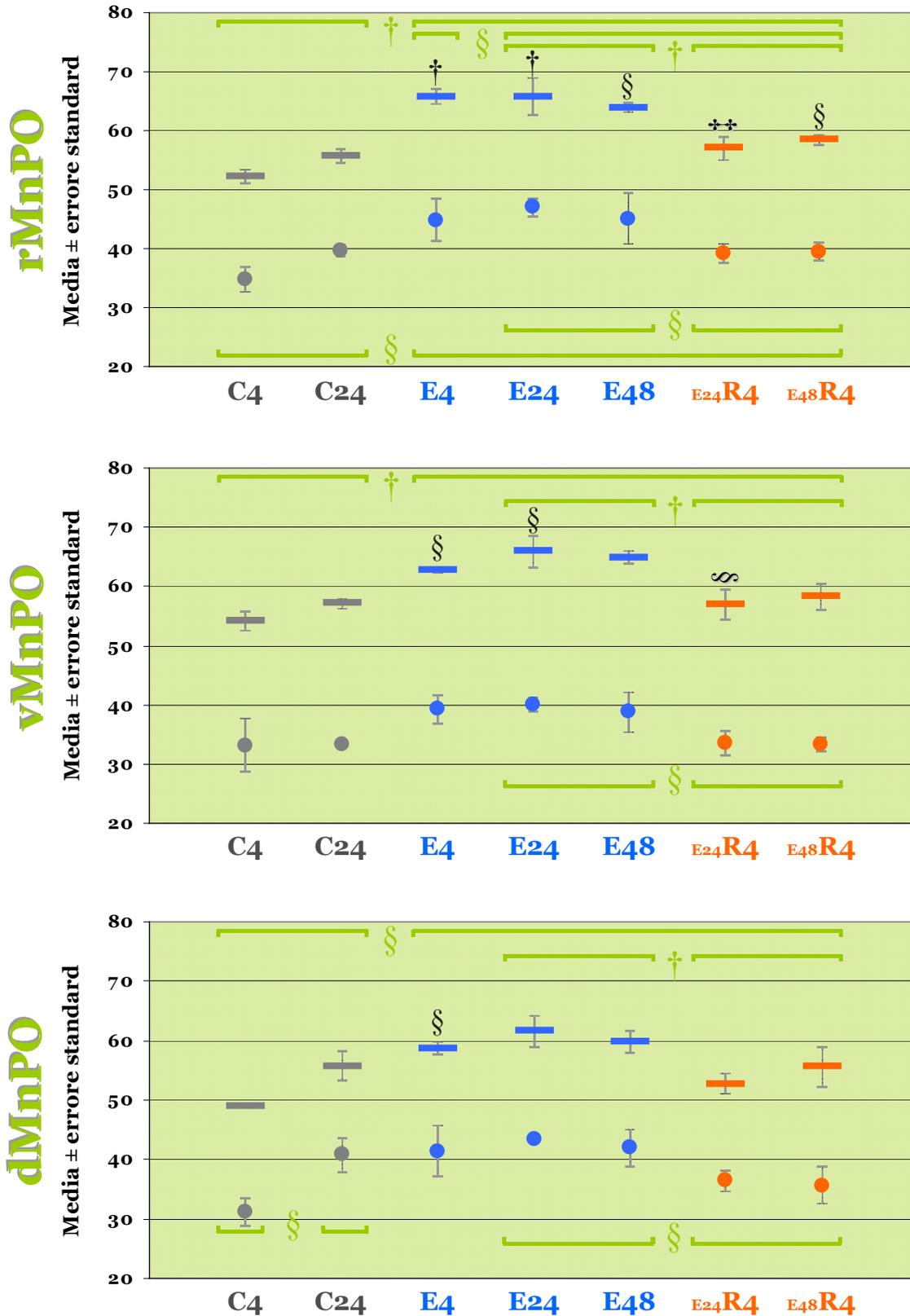


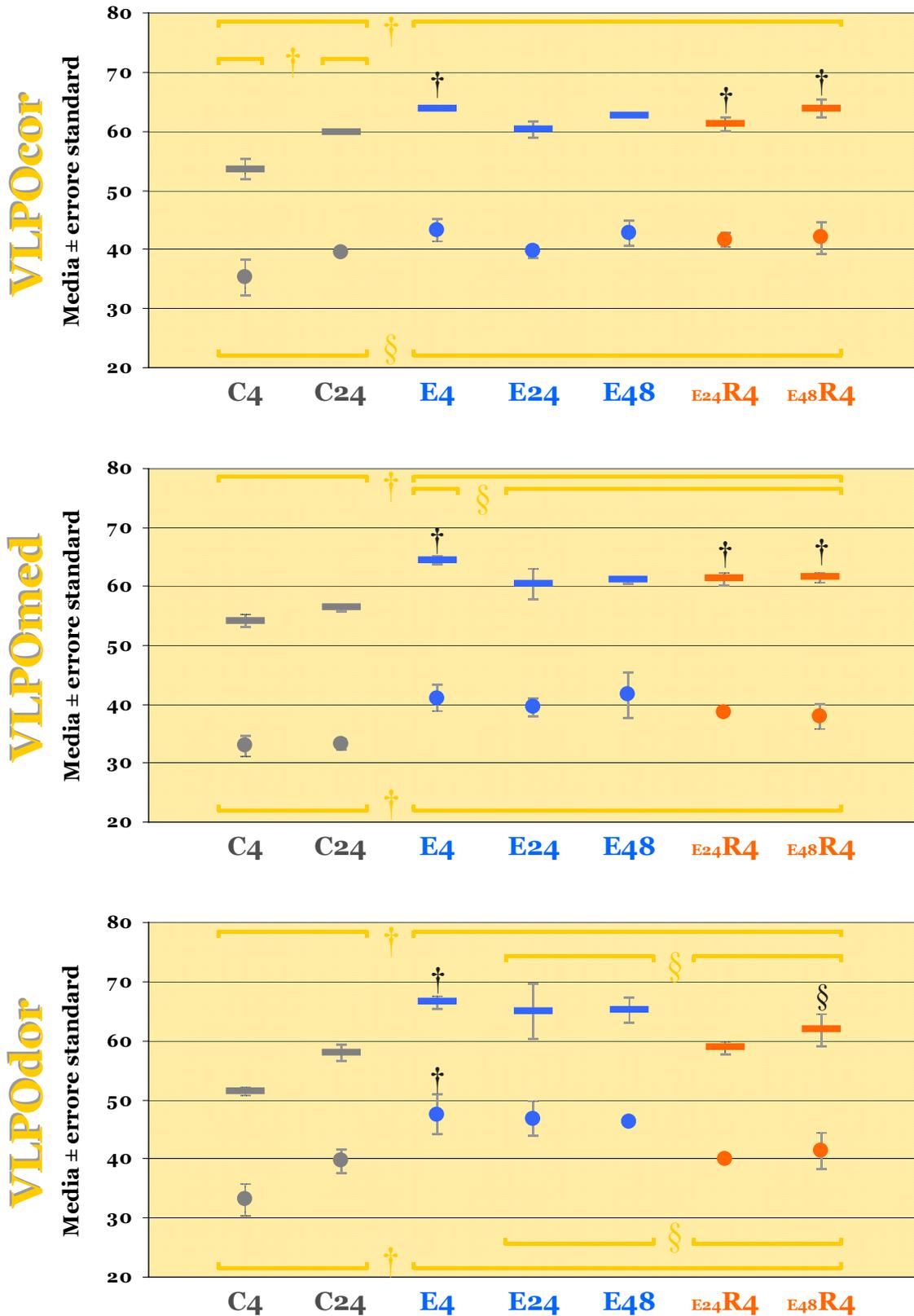
Figura 35. Reperto di immunoreattività citoplasmatica per c-Fos, caratteristico della condizione E4, a livello di soma e prolungamenti di reti di neuroni nel contesto di popolazioni attive. In alto, MnPO. In basso, POA, immediatamente adiacente al VLPO. Il riferimento in basso a destra per ogni riquadro equivale a 50 μm .

Figura 36. Analisi preliminare ad una suddivisione dei conteggi dei nuclei marcati in classi d'intensità. Per ognuno dei nuclei contati sono stati acquisiti i valori di area sopra soglia (A, tondini) e intensità media (I, barrette). L'intensità media di ogni nucleo, misurata in unità di scala di grigi (da 0 a 255) è riportata come differenza rispetto a BkG (valore moda della curva di distribuzione di frequenza dell'intensità dei pixel della rispettiva area di conta, rappresentativo del *background*); in questo caso, valori numerici più grandi corrispondono, quindi, ad intensità più elevate. Il parametro A è misurato in μm^2 . I risultati di tale analisi sono stati espressi, sia per A sia per I, come media dei valori medi risultanti da ciascun animale \pm errore standard. I contrasti sono illustrati all'interno dell'area grafico, in alto per I, in basso per A; le parentesi quadre indicano i gruppi tra i quali è effettuato il contrasto. I confronti post-hoc sono raffigurati subito al di sopra dei singoli indicatori. Significatività statistiche per i contrasti: † = $p < 0.01$; § = $p < 0.05$. Per i confronti post-hoc, † = $p < 0.01$ e § = $p < 0.05$ *versus* C4 (per E4, E24R4 ed E48R4) o *versus* C24 (per E24 ed E48); †† = $p < 0.01$ e ∞ = $p < 0.05$ *versus* E24 (per E24R4) o *versus* E48 (per E48R4).

Area e Intensità dei nuclei sopra soglia



Area e Intensità dei nuclei sopra soglia



Bibliografia

- Alcantara AA, Greenough WT.** *Developmental regulation of Fos and Fos-related antigens in cerebral cortex, striatum, hippocampus, and cerebellum of the rat.* J Comp Neurol. 1993 Aug 1;334(1):75-85.
- Amici R, Zamboni G, Perez E, Jones CA, Toni I I, Culin F, Parmeggiani PL.** *Pattern of desynchronized sleep during deprivation and recovery induced in the rat by changes in ambient temperature.* J Sleep Res. 1994 Dec;3(4):250-256.
- Amici R, Zamboni G, Perez E, Jones CA, Parmeggiani PL.** *The influence of a heavy thermal load on REM sleep in the rat.* Brain Res. 1998 Jan 19;781(1-2):252-8.
- Amini-Sereshki L, Morrison AR.** *Release of heat-loss responses in paradoxical sleep by thermal loads and by pontine tegmental lesions in cats.* Brain Res. 1988 May 31;450(1-2):9-17.
- Bachtell RK, Tsivkovskaia NO, Ryabinin AE.** *Identification of temperature-sensitive neural circuits in mice using c-Fos expression mapping.* Brain Res. 2003 Jan 17;960(1-2):157-64.
- Baffi JS, Palkovits M.** *Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats.* Neuroendocrinology. 2000 Aug;72(2):102-13.
- Berger RJ.** *Bioenergetic functions of sleep and activity rhythms and their possible relevance to aging.* Fed Proc 1975;34:97-102.
- Bernard C.** *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux.* 2 Vols. Paris: Baillière. 1878-9, pp.113-121.
- Bignotto M, de Andrade UJ, de Carvalho JG, Benedito MA.** *Rapid eye movement sleep deprivation induces changes in the high-affinity binding of [3H]-ouabain to the rat cortical membranes.* Neurosci Lett. 2006 Mar 27;396(2):143-7. Epub 2005 Dec 13.
- Borbély AA.** *Sleep: Circadian rhythm versus recovery process.* In: Koukkou M, Lehmann D, Angst J (eds): Functional States of the Brain: Their determinants. Amsterdam, Elsevier, 1980, pp.151-161.

- Borbély AA, Achermann P.** *Sleep Homeostasis and Models of Sleep Regulation.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.405-417.
- Bosch TJ, Maslam S, Roberts BL.** *A polyclonal antibody against mammalian FOS can be used as a cytoplasmic neuronal activity marker in a teleost fish.* J Neurosci Methods. 1995 May;58(1-2):173-9.
- Bratincsak A, Palkovits M.** *Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure.* Neuroscience. 2004;127(2):385-97.
- Briski K, Gillen E.** *Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress.* Brain Res Bull. 2001 Jun;55(3):401-8.
- Brown ER, Sawchenko PE.** *Hypophysiotropic CRF neurons display a sustained immediate-early gene response to chronic stress but not to adrenalectomy.* J Neuroendocrinol. 1997 Apr;9(4):307-16.
- Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE.** *Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus.* J Comp Neurol. 2006 Oct 10;498(5):712-26.
- Burow A, Day HE, Campeau S.** *A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation.* Brain Res. 2005 Nov 16;1062(1-2):63-73. Epub 2005 Oct 25.
- Cannon WB.** *Organization for physiological homeostasis.* Physiol Rev 1929;9:399-431.
- Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF.** *Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure.* J Comp Neurol. 2003 Jun 2;460(3):303-26.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW.** *Projections of the ventral premammillary nucleus.* J Comp Neurol. 1992 Oct 8;324(2):195-212.

- Carskadon MA, Dement WC.** *Normal Human Sleep: An Overview.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). *Principles and Practice of Sleep Medicine*, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.13-23.
- Cerri M, Ocampo-Garces A, Amici R, Baracchi F, Capitani P, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL, Zamboni G.** *Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram.* *Sleep.* 2005 Jun 1;28(6):694-705.
- Chang SL, Patel NA, Romero AA.** *Activation and desensitization of Fos immunoreactivity in the rat brain following ethanol administration.* *Brain Res.* 1995 May 8;679(1):89-98
- Chen HH, Liu HM.** *A new fluorescent histological marker for ischemic neurons, EA 50: correlated with Fos and Jun/AP-1 immunoreactivity.* *Histochem Cell Biol.* 1996 May;105(5):375-82.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB.** *Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus.* *J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):977-90.
- Cirelli C, Tononi G.** *On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle.* *Sleep.* 2000 Jun 15;23(4):453-69. Review.
- Cirelli C, Faraguna U, Tononi G.** *Changes in brain gene expression after long-term sleep deprivation.* *J Neurochem.* 2006 Sep;98(5):1632-45.
- Cloutier A, Ear T, Borissevitch O, Larivee P, McDonald PP.** *Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 signaling cascade in human neutrophils.* *J Immunol.* 2003 Oct 1;171(7):3751-61.
- Cobellis G, Vallarino M, Meccariello R, Pierantoni R, Masini MA, Mathieu M, Pernas-Alonso R, Chieffi P, Fasano S.** *Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of the frog, Rana esculenta, brain: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms.* *J Neuroendocrinol.* 1999 Sep;11(9):725-35.
- Cobellis G, Meccariello R, Fienga G, Pierantoni R, Fasano S.** *Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, Rana esculenta.* *Endocrinology.* 2002 Jan;143(1):163-70.

- Contestabile A, Fila T, Bartesaghi R, Ciani E.** *Cyclic AMP-mediated regulation of transcription factor *Lot1* expression in cerebellar granule cells.* J Biol Chem. 2005 Sep 30;280(39):33541-51. Epub 2005 Aug 1.
- De Luca LA Jr, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK.** *Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002 Feb;282(2):R552-9.
- de Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S.** *Immunolocalization of *c-Fos* and *c-Jun* in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med. 2002 Feb;31(2):78-81.
- Deurveilher S, Semba K.** *Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat.* Brain Res. 2003 Oct 10;987(1):100-6.
- Dong HW, Swanson LW.** *Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses.* J Comp Neurol. 2006a Jan 1;494(1):75-107.
- Dong HW, Swanson LW.** *Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection.* J Comp Neurol. 2006b Jan 1;494(1):108-41.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE.** **Fos* expression in orexin neurons varies with behavioral state.* J Neurosci. 2001 Mar 1;21(5):1656-62.
- Gaus SE, Strecker RE, Tate BA, Parker RA, Saper CB.** *Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species.* Neuroscience. 2002;115(1):285-94.
- Gavrilov D, Kenzior O, Evans M, Calaluce R, Folk WR.** *Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the *ets* family and *AP-1* complex transcription factors in high grade prostate cancers.* Eur J Cancer. 2001 May;37(8):1033-40.

- Geisler S, Heilmann H, Veh RW.** *An optimized method for simultaneous demonstration of neurons and myelinated fiber tracts for delineation of individual trunco- and palliothalamic nuclei in the mammalian brain.* Histochem Cell Biol. 2002 Jan;117(1):69-79. Epub 2001 Dec 21.
- Glotzbach SF, Heller HC.** *Central nervous regulation of body temperature during sleep.* Science. 1976 Oct 29;194(4264):537-9.
- Gong H, Szymusiak R, King J, Steininger T, McGinty D.** *Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 Dec;279(6):R2079-88.
- Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R.** *Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation.* J Physiol. 2004 May 1;556(Pt 3):935-46. Epub 2004 Feb 13.
- Gottlieb HB, Ji LL, Jones H, Penny ML, Fleming T, Cunningham JT.** *Differential effects of water and saline intake on water deprivation-induced c-Fos staining in the rat.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 May;290(5):R1251-61. Epub 2005 Nov 23.
- Graves LA, Hellman K, Veasey S, Blendy JA, Pack AI, Abel T.** *Genetic evidence for a role of CREB in sustained cortical arousal.* J Neurophysiol. 2003 Aug;90(2):1152-9. Epub 2003 Apr 23.
- Greco MA, Lu J, Wagner D, Shiromani PJ.** *c-Fos expression in the cholinergic basal forebrain after enforced wakefulness and recovery sleep.* Neuroreport. 2000 Feb 28;11(3):437-40.
- Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB.** *Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells.* J Biol Chem. 1985 Nov 15;260(26):14101-10.
- Grob M, Trottier JF, Drolet G, Mougnot D.** *Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge.* Neuroscience. 2003;122(1):247-57.

- Guo JS, Chau JF, Shen XZ, Cho CH, Luk JM, Koo MW.** *Over-expression of inducible heat shock protein 70 in the gastric mucosa of partially sleep-deprived rats.* Scand J Gastroenterol. 2004 Jun;39(6):510-5.
- Gvilia I, Angara C, McGinty D, Szymusiak R.** *Different neuronal populations of the rat median preoptic nucleus express c-fos during sleep and in response to hypertonic saline or angiotensin-II.* J Physiol. 2005 Dec 1;569(Pt 2):587-99. Epub 2005 Oct 6.
- Gvilia I, Turner A, McGinty D, Szymusiak R.** *Preoptic area neurons and the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep.* J Neurosci. 2006a Mar 15;26(11):3037-44.
- Gvilia I, Xu F, McGinty D, Szymusiak R.** *Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons.* J Neurosci. 2006b Sep 13;26(37):9426-33.
- Haase M, Koslowski R, Lengnick A, Hahn R, Wenzel KW, Schuh D, Kasper M, Muller M.** *Cellular distribution of c-Jun and c-Fos in rat lung before and after bleomycin induced injury.* Virchows Arch. 1997 Dec;431(6):441-8.
- Harlow E, Lam D.** *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, pp. 290-291.
- Heller HC.** *Temperature, Thermoregulation, and Sleep.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). *Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition.* Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.292-304.
- Herdegen T, Leah JD.** *Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins.* Brain Res Brain Res Rev. 1998 Dec;28(3):370-490. Review.
- Hermanson O, Telkov M, Geijer T, Hallbeck M, Blomqvist A.** *Preprodynorphin mRNA-expressing neurones in the rat parabrachial nucleus: subnuclear localization, hypothalamic projections and colocalization with noxious-evoked fos-like immunoreactivity.* Eur J Neurosci. 1998 Jan;10(1):358-67.
- Herrera DG, Robertson HA.** *Activation of c-fos in the brain.* Prog Neurobiol. 1996 Oct;50(2-3):83-107. Review.

- Hoffman GE, Lyo D.** *Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'?* J Neuroendocrinol. 2002 Apr;14(4):259-68. Review.
- Holm S.** *A simple sequentially rejective multiple test procedure.* Scand J Stat 6: 65-70, 1979.
- Horne J.** *Why We Sleep. The Function of Sleep in Humans and Other Mammals.* Oxford University Press, New York. 1988, pp.13-78.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H.** *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.* J Histochem Cytochem. 1981 Apr;29(4):577-80.
- Hunter T.** *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.* Cell. 1995 Jan 27;80(2):225-36. Review.
- Ji LL, Fleming T, Penny ML, Toney GM, Cunningham JT.** *Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005 Jan;288(1):R311-21. Epub 2004 Sep 30.
- Jones BE.** *Basic Mechanisms of Sleep-Wake States.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.136-153.
- Kandiel A, Chen S, Hillman DE.** *c-fos gene expression parallels auditory adaptation in the adult rat.* Brain Res. 1999 Aug 28;839(2):292-7.
- King JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA.** *LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis.* J Comp Neurol. 1982 Aug 10;209(3):287-300.
- Kiyohara T, Miyata S, Nakamura T, Shido O, Nakashima T, Shibata M.** *Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures.* Brain Res Bull. 1995;38(2):193-201.
- Konishi M, Kanosue K, Kano M, Kobayashi A, Nagashima K.** *The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/cold-seeking behavior during systemic salt loading in rats.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 Jan;292(1):R150-9. Epub 2006 Jul 13.

- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB.** *Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep.* J Neurosci. 2000 May 15;20(10):3830-42.
- Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB.** *Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep.* J Neurosci. 2002 Jun 1;22(11):4568-76.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE.** *Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery.* J Neurosci. 1999 Apr 15;19(8):3057-72.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE.** *c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery.* J Neurosci. 2000 Jun 15;20(12):4669-79.
- McGinty D, Szymusiak R.** *Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus.* Sleep Med Rev. 2001 Aug;5(4):323-342.
- McGinty DJ, Szymusiak R.** *Sleep-Promoting Mechanism in Mammals.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.169-184.
- McKinley MJ, Hards DK, Oldfield BJ.** *Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing.* Brain Res. 1994 Aug 8;653(1-2):305-14.
- McKinley MJ, Badoer E, Vivas L, Oldfield BJ.** *Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin.* Brain Res Bull. 1995;37(2):131-7.
- McKinley MJ, Johnson AK.** *The physiological regulation of thirst and fluid intake.* News Physiol Sci. 2004 Feb;19:1-6. Review.
- McKittrick DJ.** *Expression of fos in the hypothalamus of rats exposed to warm and cold temperatures.* Brain Res Bull. 2000 Oct;53(3):307-15.

- Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T.** *Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations.* Neurosci Lett. 1994 Jul 4;175(1-2):63-6.
- Miyata S, Ishiyama M, Shido O, Nakashima T, Shibata M, Kiyohara T.** *Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry.* Neurosci Res. 1995 May;22(2):209-18.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE.** *Gabaergic neurons with alpha2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep.* Neuroscience. 2004;129(3):803-10.
- Mohamood AS, Gyles P, Balan KV, Hollis VW, Eckberg WR, Asseffa A, Han Z, Wyche JH, Anderson WA.** *Estrogen receptor, growth factor receptor and protooncogene protein activities and possible signal transduction crosstalk in estrogen dependent and independent breast cancer cell lines.* J Submicrosc Cytol Pathol. 1997 Jan;29(1):1-17.
- Morgan JI.** *Proto-Oncogene Expression in the Nervous System.* In: Magistretti PJ (ed). Discussion in Neuroscience. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1991 Aug;7(4):34-47.
- Morgan JI, Curran T.** *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun.* Annu Rev Neurosci. 1991;14:421-51. Review.
- Morian KR, Rowland NE.** *Pregastric and postabsorptive inhibitory effects of water on angiotensin-induced Fos in rat brain.* Regul Pept. 1995 May 30;57(2):133-40.
- Morien A, Garrard L, Rowland NE.** *Expression of Fos immunoreactivity in rat brain during dehydration: effect of duration and timing of water deprivation.* Brain Res. 1999 Jan 16;816(1):1-7.
- Moruzzi G.** *Sleep and instinctive behavior.* Arch Ital Biol. 1969 Jul;107(2):175-216. Review.
- Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K.** *Neuronal circuitries involved in thermoregulation.* Auton Neurosci. 2000 Dec 20;85(1-3):18-25. Review.

- Newton JR, Ellsworth C, Miyakawa T, Tonegawa S, Sur M.** *Acceleration of visually cued conditioned fear through the auditory pathway.* Nat Neurosci. 2004 Sep;7(9):968-73. Epub 2004 Aug 22.
- Novak CM, Nunez AA.** *Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei.* Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1620-6.
- Osaka T.** *Cold-induced thermogenesis mediated by GABA in the preoptic area of anesthetized rats.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Aug;287(2):R306-13. Epub 2004 Mar 18.
- Pacák K, Palkovits M.** *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders.* Endocr Rev. 2001 Aug;22(4):502-48. Review.
- Paratcha G, de Stein ML, Szapiro G, Lopez M, Bevilaqua L, Cammarota M, de Iraldi AP, Izquierdo I, Medina JH.** *Experience-dependent decrease in synaptically localized Fra-1.* Brain Res Mol Brain Res. 2000 May 31;78(1-2):120-30.
- Parmeggiani PL, Rabini C, Cattalani M.** *Sleep phases at low environmental temperature.* Arch Sci Biol (Bologna). 1969 Oct-Dec;53(4):277-90.
- Parmeggiani PL, Rabini C.** *Sleep and environmental temperature.* Arch Ital Biol. 1970 Apr;108(2):369-87.
- Parmeggiani PL, Franzini C, Lenzi P, Zamboni G.** *Threshold of respiratory responses to preoptic heating during sleep in freely moving cats.* Brain Res. 1973 Mar 30;52:189-201.
- Parmeggiani PL, Cianci T, Calasso M, Zamboni G, Perez E.** *Quantitative analysis of short term deprivation and recovery of desynchronized sleep in cats.* Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1980 Nov;50(3-4):293-302.
- Parmeggiani PL.** *Thermoregulation and sleep.* Front Biosci. 2003 May 1;8:s557-67. Review.
- Parmeggiani PL.** *Physiologic Regulation in Sleep.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.185-191.

- Patronas P, Horowitz M, Simon E, Gerstberger R.** *Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration.* Brain Res. 1998 Jul 6;798(1-2):127-39.
- Paxinos G and Watson C.** (Eds). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Fourth Edition. Academic Press Australia, Sydney. 1998.
- Paxinos G and Watson C.** (Eds). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Fifth Edition. Academic Press Australia, Sydney. 2005.
- Peraita-Adrados R.** *Electroencephalography, Polysomnography, and Other Sleep Recordings Systems.* In: Parmeggiani PL, Veluti RA (eds). *The Physiologic Nature of Sleep.* Imperial College Press. 2005, pp.103-122.
- Peterfi Z, Churchill L, Hajdu I, Obal Jr F, Krueger JM, Parducz A.** *Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen.* Neuroscience. 2004;124(3):695-707.
- Pezzone MA, Lee WS, Hoffman GE, Rabin BS.** *Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli.* Brain Res. 1992 Nov 27;597(1):41-50.
- Portal MM, Ferrero GO, Caputto BL.** N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene.* 2007 May 24;26(24):3551-8. Epub 2006 Dec 11.
- Pozas E, Aguado F, Ferrer I.** *Fra-1 immunoreactivity in the rat brain during normal postnatal development and after injury in adulthood.* Neurosci Res. 1999 Feb;33(2):137-45.
- Ramael M, Van den Bossche J, Buysse C, Deblie I, Segers K, Van Marck E.** *Immunoreactivity for c-fos and c-myc protein with the monoclonal antibodies 14E10 and 6E10 in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium of the pleura.* Histol Histopathol. 1995 Jul;10(3):639-43.
- Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB.** *Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats.* Science. 1983 Jul 8;221(4606):182-4.

- Rechtschaffen A, Bergmann BM.** *Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper.* Sleep. 2002 Feb 1;25(1):18-24. Review.
- Rodenbeck A, Binder R, Geisler P, Danker-Hopfe H, Lund R, Raschke F, Weeß HG, Schulz H (Chairman).** *A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition according to Rechtschaffen and Kales. Eine Übersicht über Schlaf-EEG-Muster. Teil I: Eine Zusammenstellung mit ergänzenden Regeln zu deren visueller Analyse.* Somnologie. 2006 Nov;10(4):159–175.
- Roeling TA, Veening JG, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R.** *Efferent connections of the hypothalamic "grooming area" in the rat.* Neuroscience. 1993 Sep;56(1):199-225.
- Romanovsky AA.** *Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 Jan;292(1):R37-46. Epub 2006 Sep 28. Review.
- Rondini TA, Baddini SP, Sousa LF, Bittencourt JC, Elias CF.** *Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats.* Neuroscience. 2004;125(3):735-48.
- Rowland NE.** *Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping.* Neurosci Biobehav Rev. 1998;23(1):49-63. Review.
- Rusovici R, LaVoie HA.** *Expression and distribution of AP-1 transcription factors in the porcine ovary.* Biol Reprod. 2003 Jul;69(1):64-74. Epub 2003 Feb 19.
- Sabharwal R, Johns EJ, Egginton S.** *The influence of acute hypothermia on renal function of anaesthetized euthermic and acclimatized rats.* Exp Physiol. 2004 Jul;89(4):455-63. Epub 2004 May 6.
- Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM.** *Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Oct;85(20):7795-9.

- Savage VM, West GB.** *A quantitative, theoretical framework for understanding mammalian sleep.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 16;104(3):1051-6. Epub 2007 Jan 10.
- Scammell TE, Price KJ, Sagar SM.** *Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area.* Brain Res. 1993 Aug 6;618(2):303-7.
- Schwartz MD, Smale L.** *Individual differences in rhythms of behavioral sleep and its neural substrates in Nile grass rats.* J Biol Rhythms. 2005 Dec;20(6):526-37.
- Scrogin KE, Grygielko ET, Brooks VL.** *Osmolality: a physiological long-term regulator of lumbar sympathetic nerve activity and arterial pressure.* Am J Physiol. 1999 Jun;276(6 Pt 2):R1579-86.
- Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D, Hisanaga K.** *c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress.* J Neurosci. 1991 Aug;11(8):2321-31.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB.** *Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep.* Science. 1996 Jan 12;271(5246):216-9.
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB.** *Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat.* J Neurosci. 1998 Jun 15;18(12):4705-21.
- Siegel JM.** *REM Sleep.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.120-135.
- Smolen JA.** *Image Analytic Techniques for Quantification of Immunohistochemical Staining in the Nervous System.* In: Conn PM (ed) Methods in Neurosciences. Volume3. Quantitative and Qualitative Microscopy. Academic press, California, S. Diego. 1990, pp. 208-229.
- Song Y, Song S, Zhang D, Zhang Y, Chen L, Qian L, Shi M, Zhao H, Jiang Z, Guo N.** *An association of a simultaneous nuclear and cytoplasmic localization of Fra-1 with breast malignancy.* BMC Cancer. 2006 Dec 28;6:298.

- Steriade M.** *Brain Electrical Activity and Sensory Processing during Waking and Sleep States.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). *Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition.* Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.101-119.
- Stryer L.** *Biochemistry.* Fourth Edition. W H Freeman and Company, New York. 1995.
- Sun Z, Fregly MJ, Rowland NE, Cade JR.** *Comparison of changes in blood pressure and dipsogenic responsiveness to angiotensin II in male and female rats chronically exposed to cold.* *Physiol Behav.* 1996 Dec;60(6):1543-9.
- Suntsova N, Szymusiak R, Alam MN, Guzman-Marin R, McGinty D.** *Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats.* *J Physiol.* 2002 Sep 1;543(Pt 2):665-77.
- Suntsova N, Guzman-Marin R, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D.** *The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus.* *J Neurosci.* 2007 Feb 14;27(7):1616-30.
- Swanson L W.** (Ed). *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* Third Edition. Elsevier Academic Press UK, London. 2004.
- Szymusiak R, Satinoff E.** *Maximal REM sleep time defines a narrower thermoneutral zone than does minimal metabolic rate.* *Physiol Behav.* 1981 Apr;26(4):687-90.
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D.** *Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats.* *Brain Res.* 1998 Aug 24;803(1-2):178-88.
- Szymusiak R, Gvilia I, McGinty D.** *Hypothalamic control of sleep.* *Sleep Med.* 2007 Jun;8(4):291-301. Epub 2007 Apr 30.
- Thompson RH, Swanson LW.** *Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network.* *Brain Res Brain Res Rev.* 2003 Mar;41(2-3):153-202. Review.
- Tian JB, Bishop GA.** *Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum.* *J Chem Neuroanat.* 2002 Mar;23(3):157-70.

- Tobler I, Jaggi K.** *Sleep and EEG spectra in the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) under baseline conditions and following sleep deprivation.* J Comp Physiol [A]. 1987 Aug;161(3):449-59.
- Tobler I.** *Phylogeny of Sleep Regulation.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.77-90.
- Travis KA, Johnson AK.** *In vitro sensitivity of median preoptic neurons to angiotensin II, osmotic pressure, and temperature.* Am J Physiol. 1993 Jun;264(6 Pt 2):R1200-5.
- Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R.** *Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus.* Eur J Neurosci. 2006 Jun;23(12):3284-96.
- Van Noorden S.** *Problems and solutions.* In: Beesley JE (ed). Immunocytochemistry. A Practical Approach. Oxford University press, Oxford. 1993, pp. 207-239.
- Vimont-Vicary P., Jouvet-Mounier D., Delorme F.** *Effects EEG et comportementaux des privation de sommeil paradoxal chez le chat.* Electroenceph clin Neurophysiol. 1966;20:439-449.
- Vyazovskiy VV, Tobler I.** *Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat.* Brain Res. 2005 Jul 19;1050(1-2):64-71.
- Wagner CK, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ.** *Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat.* Brain Res. 1995 Apr 24;677(2):229-37.
- Wagner D, Salin-Pascual R, Greco MA, Shiromani PJ.** *Distribution of hypocretin-containing neurons in the lateral hypothalamus and C-fos-immunoreactive neurons in the VLPO.* Sleep Res Online. 2000;3(1):35-42.
- Walczak T, Chokroverty S.** *Elettroencefalografia, elettromiografia ed elettro-oculografia: principi generali e tecniche di base.* In: Chokroverty S (ed). I disturbi del sonno. Time Science. 2000, pp.185-215.

- Wallenstein S, Zucker CL and Fleiss JL.** *Some statistical methods useful in circulation research.* Circ Res 47: 1-9, 1980.
- Wan H, Warburton EC, Kusmieriek P, Aggleton JP, Kowalska DM, Brown MW.** *Fos imaging reveals differential neuronal activation of areas of rat temporal cortex by novel and familiar sounds.* Eur J Neurosci. 2001 Jul;14(1):118-24.
- Westfall TC, Yang CL, Chen X, Naes L, Vickery L, Macarthur H, Han S.** *A novel mechanism prevents the development of hypertension during chronic cold stress.* Auton Autacoid Pharmacol. 2005 Oct;25(4):171-7.
- Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW.** *Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2808-13. Epub 2001 Feb 20.
- Xu Z, Torday J, Yao J.** *Functional and anatomic relationship between cholinergic neurons in the median preoptic nucleus and the supraoptic cells.* Brain Res. 2003 Feb 28;964(2):171-8.
- Yang X, Horn K, Baraban JM, Wand GS.** *Chronic ethanol administration decreases phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in granule cells of rat cerebellum.* J Neurochem. 1998 Jan;70(1):224-32.
- Yaqub A, Guimaraes M, Eldred WD.** *Neurotransmitter modulation of Fos- and Jun-like proteins in the turtle retina.* J Comp Neurol. 1995 Apr 17;354(4):481-500.
- Yoshida K, Konishi M, Nagashima K, Saper CB, Kanosue K.** *Fos activation in hypothalamic neurons during cold or warm exposure: projections to periaqueductal gray matter.* Neuroscience. 2005;133(4):1039-46.
- Zamboni G, Jones CA, Amici R, Perez E, Parmeggiani PL.** *The capacity to accumulate cyclic AMP in the preoptic-anterior hypothalamic area of the rat is affected by the exposition to low ambient temperature and the subsequent recovery.* Exp Brain Res. 1996 Apr;109(1):164-8.

Zamboni G, Perez E, Amici R, Jones CA, Parmeggiani PL. *Control of REM sleep: an aspect of the regulation of physiological homeostasis.* Arch Ital Biol. 1999 Aug;137(4):249-62. Review.

Zamboni G, Jones CA, Domeniconi R, Amici R, Perez E, Luppi M, Cerri M, Parmeggiani PL. *Specific changes in cerebral second messenger accumulation underline REM sleep inhibition induced by the exposure to low ambient temperature.* Brain Res. 2004 Oct 1;1022(1-2):62-70.

Zardetto-Smith AM, Thunhorst RL, Cicha MZ, Johnson AK. *Afferent signaling and forebrain mechanisms in the behavioral control of extracellular fluid volume.* Ann N Y Acad Sci. 1993 Jul 22;689:161-76. Review.

Zardetto-Smith AM, Johnson AK. *Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat.* Neurosci Lett. 1995 Oct 27;199(3):215-9.

Zepelin H, Siegel JM, Tobler I. *Mammalian Sleep.* In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine, Fourth Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005, pp.91-100.

Zhang W, Hart J, McLeod HL, Wang HL. *Differential expression of the AP-1 transcription factor family members in human colorectal epithelial and neuroendocrine neoplasms.* Am J Clin Pathol. 2005 Jul;124(1):11-9.