

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**Scuola di Dottorato di Ricerca
in Scienze Mediche e Chirurgiche**

**Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche
Progetto formativo in Neurofisiologia**

XXIV ciclo

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: BIO/09

Settore concorsuale di afferenza: 05/D1

Tesi di Dottorato

**Aspetti ipnici e vegetativi dell'inibizione
del controllo nervoso centrale della
termogenesi nel ratto**

Dott. Marco Mastrotto

Coordinatore:
Prof. Lucio Cocco

Tutor:
Prof. Roberto Amici

Dipartimento di Fisiologia Umana e Generale
Esame finale anno 2012

INDICE

INDICE.....	3
INDICE DELLE ABBREVIAZIONI.....	7
1. INTRODUZIONE	9
1.1 IPOTERMIA E APPLICAZIONI CLINICHE.....	11
1.1.1 INDUZIONE DELL'IPOTERMIA.....	12
1.2 IBERNAZIONE, TORPORE ED ESTIVAZIONE	13
1.2.1 IPOTEMIA SPONTANEA.....	13
1.2.2 IBERNAZIONE.....	14
1.2.3 TORPORE	15
1.2.4 ESTIVAZIONE	17
1.3 CICLO SONNO-VEGLIA	18
1.3.1 OMEOSTASI DEL SONNO	21
1.4 SONNO E TORPORE.....	24
1.5 SIMULARE L'IBERNAZIONE.....	25
1.5.1 STATO DELL'ARTE.....	26
1.5.2 ACIDO SOLFIDRICO (H ₂ S).....	26
1.5.3 5'-ADENOSINA MONOFOSFATO	28
1.5.4 ORMONE TIROIDEO	29
1.5.5 ALTRI COMPOSTI DI POTENZIALE INTERESSE NELL'INDURRE IL TORPORE	30
1.5.6 INTERPRETAZIONE E IPOTESI ALTERNATIVE.....	31
1.6 TERMOREGOLAZIONE.....	32
1.6.1 TEROREGOLAZIONE COMPORTAMENTALE.....	33
1.6.2 TERMOREGOLAZIONE NON COMPORTAENTALE.....	34
1.7 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI FREDDI.....	35
1.7.1 TERMOGENESI DA BRIVIDO (SHIVERING).....	35
1.7.2 TERMOGENESI NON DIPENDENTE DA BRIVIDO (NOT- SHIVERING)	36
1.8 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI CALDI.....	38
1.8.1 REGOLAZIONE DEL FLUSSO EMATICO CUTANEO	38
1.8.2 SUDORAZIONE	38
1.8.3 POLIPNEA	38
1.9 CONTROLLO DELLA TERMOREGOLAZIONE	39
1.9.1 TERMOGENESI	39

1.9.2	VASODILATAZIONE	40
1.10	SISTEMA NERVOSO AUTONOMO (SNA).....	41
1.10.1	AFFERENZE AUTONOMICHE SIMPATICHE DIRETTE AL BAT.....	42
1.10.2	AFFERENZE AUTONOMICHE SIMPATICHE DIRETTE AI VASI.....	42
1.10.3	PREMOTONEURONI SIMPATICI	43
1.10.4	RVMM	44
1.11	ATTUALE MODELLO DI CONTROLLO DELLA TERMOREGOLAZIONE.....	45
2.	SCOPO.....	49
3.	MATERIALI E METODI.....	51
3.1	INTERVENTO CHIRURGICO	52
3.1.1	PREPARAZIONE ELETTRODI.....	52
3.1.2	TERMISTORI	53
3.1.3	CHIRURGIA	54
3.2	APPARATO DI REGISTRAZIONE.....	56
3.2.1	BOX DI REGISTRAZIONE.....	56
3.2.2	POSTAZIONI DI REGISTRAZIONE.....	57
3.2.3	AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEL SEGNALE.....	57
3.3	DISEGNO SPERIMENTALE	58
3.4	MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI.....	59
3.5	ISTOLOGIA	60
3.6	PIANO SPERIMENTALE	60
3.6.1	ESPERIMENTO A.....	60
3.6.2	ESPERIMENTO B	61
3.7	ANALISI STATISTICA.....	61
4.	RISULTATI.....	63
4.1	ASPETTI TERMICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM.....	64
4.1.1	TEMPERATURA IPOTALAMICA	64
4.1.2	TEMPERATURA DELLA CODA	67
4.1.3	INDICE DI PERDITA DI CALORE	67
4.2	ASPETTI CARDIOVASCOLARI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM.....	68
4.2.1	PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA	68
4.2.2	FREQUENZA CARDIACA	71

4.2.3	RAPPORTO TRA FUNZIONE CARDIOVASCOLARE E THY	74
4.3	ASPETTI ELETTROENCEFALOGRAFICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM	74
4.3.1	POTENZA TOTALE DELL'EEG	74
4.3.2	MODIFICAZIONI DELLO SPETTRO	77
4.3.3	ANALISI SPETTRALE EEG.....	78
4.4	ASPETTI IPNICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM 79	
4.4.1	SONNO NREM	79
4.4.2	SONNO REM	81
4.4.3	ANDAMENTO CUMULATIVO di SONNO NREM E REM	83
4.5	ASPETTI SPETTRALI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM	83
4.5.1	BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM.....	83
4.5.2	BANDA SIGMA DURANTE IL SONNO NREM	86
4.5.3	BANDA THETA IN VEGLIA	88
4.5.4	BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM.....	90
5.	DISCUSSIONE	93
5.1	CONCLUSIONI.....	100
6.	FIGURE.....	103
7.	BIBLIOGRAFIA	155

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

Le abbreviazioni sono in ordine alfabetico.

AVA: Anastomosi artero/venosa

BAT: Tessuto adiposo bruno

DMH: Ipotalamo dorso mediale

EEG: Elettroencefalogramma

FC: Frequenza cardiaca

IML: Colonna intermedio-laterale

LPBel: Nucleo Laterale Parabrachiale Esterno Laterale

nuEEG: Elettroencefalogramma nucale

PAM: Pressione arteriosa media

POA: Area preottica ipotalamica

PTE: Potenza totale dell'elettroencefalogramma

RVMM: Midollo rostro-ventro mediale

RVLM: Midollo rostro-ventro laterale

SNA: Sistema Nervoso Autonomo

SNC: Sistema Nervoso Centrale

SNS: sistema Nervoso Simpatico

SWA: Slow Wave Activity (attività ad onde lente)

Ta: Temperatura ambientale

TB: Tasso metabolico

Tc: Temperatura corporea

Thy: Temperatura ipotalamica

1. INTRODUZIONE

1.1 IPOTERMIA E APPLICAZIONI CLINICHE

L'induzione di uno stato ipometabolico è oggi molto importante in campo medico per ridurre i danni indotti da ischemia e ipossia tissutale, soprattutto nel trattamento dell'infarto del miocardio e dell'ictus cerebrale. Comunemente, si produce uno stato ipometabolico tramite l'induzione di uno stato di ipotermia, che è in grado di ridurre le richieste metaboliche cellulari; per questo la tendenza ad utilizzare l'ipotermia nella pratica clinica è in aumento.

L'interesse per l'ipotermia in medicina non è recente (le prime osservazioni risalgono agli anni '30, con alcuni aneddoti risalenti agli egizi, greci e romani) e negli ultimi anni si è assistito ad un aumento delle prove a supporto del ruolo neuroprotettivo dell'ipotermia nei pazienti con lesioni neurologiche. Studi su animali, hanno permesso di individuare alcuni dei meccanismi che sarebbero alla base degli effetti protettivi dell'ipotermia nei confronti dei danni provocati dall'ischemia; alcuni di questi meccanismi conserverebbero la loro azione anche durante la fase di riperfusione (ripresa del circolo e della perfusione), fino ad alcuni giorni dopo il danno primario. Gli effetti positivi indotti dall'ipotermia comprendono: riduzione della necrosi cellulare a favore dell'apoptosi (morte programmata), riduzione degli effetti negativi del calcio intracellulare, riduzione del rilascio di neurotrasmettitori eccitatori (glutammato), riduzione dell'infiammazione ischemica indotta, riduzione della produzione di radicali liberi, riduzione della permeabilità vascolare e della barriera emato-encefalica e quindi della formazione di edema, riduzione del metabolismo, del consumo di ossigeno cerebrale e del glucosio (Milde LN. 1992).

La possibilità di indurre ipotermia dipende da alcuni fattori fisici che regolano il flusso di calore dall'organismo all'ambiente: il rapporto superficie/volume, la quantità di pelo e grasso che fungono da isolanti e il gradiente di temperatura tra il corpo e l'ambiente.

L'ipotermia è stata classificata in vari modi:

- lieve, temperatura compresa tra i 36 e 33 °C
- moderata, temperatura compresa tra i 32 e 28 °C
- severa, temperatura compresa tra i 28 e 18 °C
- profonda, temperatura compresa tra i 18 e 5 °C
- ultra-profonda, temperatura inferiore dei 5 °C

E' interessante notare che alcuni mammiferi sono in grado di entrare spontaneamente in un profondo stato ipotermico, come per esempio l'ibernazione, in cui il metabolismo basale, il consumo di ossigeno e la frequenza cardiaca si riducono; la piena attività dell'animale viene ripristinata all'uscita da questo stato ipotermico, senza che si verifichi alcun danno da ri-perfusione o altri effetti nocivi. I meccanismi molecolari e biochimici alla base della riduzione dell'attività metabolica che innesca l'ibernazione rimangono in gran parte sconosciuti (Lee, 2008).

1.1.1 INDUZIONE DELL'IPOTERMIA

L'ipotermia va distinta in *accidentale* (spontanea, non controllata) ed *indotta* (controllata, terapeutica), ottenuta con il raffreddamento artificiale ed usata per prevenire o attenuare varie forme di danno neurologico.

Oggi l'ipotermia viene indotta primariamente tramite raffreddamento attivo del paziente e può però portare a conseguenti danni indotti dall'attività compensatoria che il sistema nervoso simpatico mette in atto per tentare di mantenere la temperatura corporea costante. Per contrastare il raffreddamento, il sistema nervoso simpatico provvede inizialmente ad indurre una vasocostrizione del distretto vascolare cutaneo. Questa risposta rende più difficoltosi i tentativi di indurre l'ipotermia terapeutica attraverso il raffreddamento esterno, in quanto il flusso di calore fra ambiente e corpo si riduce. Inoltre il sistema nervoso simpatico aumentata la produzione di calore tramite l'induzione di brivido e l'attivazione del tessuto adiposo bruno, che porta ad un incremento del metabolismo lipidico, dei

carboidrati e delle proteine. Il brivido può comportare un aumento del consumo di O₂ dal 40% fino al 100%, un effetto poco desiderabile soprattutto in pazienti con danno neurologico o post-anossico. Queste risposte possono essere contrastate dalla somministrazione di sedativi, anestetici, oppiacei e/o miorellassanti. La sedazione e l'anestesia inoltre aumentano il flusso ematico verso la periferia (per diminuzione delle resistenze periferiche) aumentando perciò il trasferimento di calore dal centro verso la periferia. La perdita di calore è inoltre favorita dalla cute umida o bagnata e dall'utilizzo di soluzioni a base di alcool. Da notare come la capacità e l'efficacia dei meccanismi di controllo della temperatura corporea diminuiscano con l'età.

L'induzione dell'ipotermia causa un gran numero di cambiamenti fisiologici coinvolgendo praticamente tutti gli apparati ed i sistemi dell'organismo. Purtroppo, l'uso dell'ipotermia clinica per ridurre i danni ischemici ed ipossici richiede che venga anche valutato il rischio che deriva dalla risposta compensatoria dell'organismo.

Per questo motivo, molta attenzione è oggi riservata allo studio di modalità di induzione di ipotermia che non comportino reazioni compensatorie da parte dell'organismo.

1.2 IBERNAZIONE, TORPORE ED ESTIVAZIONE

1.2.1 IPOTEMIA SPONTANEA

In natura esistono animali in grado di andare incontro a forme spontanee di ipotermia ed ipometabolismo. In questi animali si osserva una riduzione anche drastica della temperatura corporea (che può scendere fino a 1°C nello scoiattolo di terra artico, *Spermophilus parryii*), senza che nessuna risposta compensatoria venga messa in atto dall'organismo. Sono molti i mammiferi endotermi nei quali si è evoluto un meccanismo fisiologico che, in risposta ai cambiamenti dell'ambiente stagionali sfavorevoli, permette di entrare in uno stato

ipotermico/ipometabolico, aumentando di conseguenza le proprie possibilità di sopravvivenza.

Esistono tre principali stati di ipotermia spontanea nell'animale: l'ibernazione, il torpore e l'estivazione. Queste tre condizioni sono accumulate dalla stessa base fisiologica: come riporta il Prof. Heldmaier “Le proprietà fisiologiche del torpore, ibernazione e estivazione sono simili tra loro. La classificazione di ibernazione, torpore ed estivazione è rappresentata semplicemente da differenze di tempo, durata e dall'ampiezza dell'inibizione fisiologica (Heldmaier et al., 2004).

In breve, questi sono comportamenti ipometabolici utilizzati dagli animali per risparmiare energia (Lee CC, 2008).

1.2.2 IBERNAZIONE

L'ibernazione negli endodermi è un'efficace strategia per sopravvivere alla scarsità di risorse tipica della stagione invernale. L'ibernazione è un processo che si estende per la durata di alcuni mesi, ma che è in realtà il risultato della somma di singoli episodi di ipotermia della durata di circa due settimane, intervallati da brevi periodi di normotermia (figura 1), comunemente identificati come “risvegli” (Wilz and Heldmaier, 2000).

Le caratteristiche fisiologiche dell'ibernazione sono una marcata riduzione del tasso metabolico (TB) e la riduzione della temperatura corporea (T_c) vicino alla temperatura ambientale (T_a). Il ghiro, per esempio, è conosciuto come un vero ibernante, in autunno entra nella sua tana (l'ibernacolo) e vi rimane fino a primavera. Durante questo periodo il ghiro sopravvive grazie alle riserve del grasso corporeo accumulate nella stagione estiva (Wilz and Heldmaier, 2000). Anche la marmotta è un ibernante stagionale, la sua ibernazione può iniziare verso la fine di Settembre o i primi di Ottobre e durare fino alla fine di Marzo o agli inizi di Aprile. Anche per la marmotta l'intera stagione di letargo è costituita da diverse fasi ibernati. Queste fasi sono caratterizzate da quattro diversi stati, per una durata di circa 8-10 giorni: i) entrata in ibernazione; ii) mantenimento della

profonda ibernazione per diversi giorni; iii) risveglio; iv) periodo di eutermia o normotermia della durata di 1-2 giorni. L'intera stagione di ibernazione dura circa 6-7 mesi (per una media di 193 giorni) questi mesi sono caratterizzati da una sequenza di 15 - 20 fasi ibernanti. L'entrata in ibernazione è caratterizzata da una riduzione del tasso metabolico, fino ad un minimo di ($0.014 \text{ mlO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), che è solo una frazione ($1/25$) della spesa metabolica della fase di eutermia a riposo ($0.34 \text{ mlO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) La riduzione dell'attività metabolica è accompagnata da un rapido decremento della temperatura, che continua all'interno della fase di profonda ibernazione decrescendo esponenzialmente. La temperatura corporea della marmotta rimane sempre $1.5-3 \text{ }^\circ\text{C}$ al di sopra di quella ambientale. La profonda ibernazione viene terminata dal risveglio, durante il quale le marmotte alzano la loro temperatura fino a raggiungere la normotermia nel giro di circa 3 ore grazie ad un'elevata produzione di calore. Il tempo necessario per il risveglio dall'ibernazione, la durata del periodo eutermico e l'entrata in ibernazione mostrano solo piccole variazioni, mentre la durata delle fasi ibernanti dipende dalla durata del periodo di profonda ibernazione. Pattern simili sono stati osservati anche in altri ibernanti, come per esempio i marsupiali, nei mammiferi euteri e nei monotremi. I ripetuti risvegli e i periodi di eutermia sono brevi, ma energeticamente molto costosi.

Nella marmotta il 72 % di tutta l'energia accumulata per il periodo ibernante, viene spesa nei risvegli per il 17 % e per il 57 % nei periodi eutermici. Stime simili sono state ottenute per altri ibernanti. Le ragioni fisiologiche di queste spese energetiche per il risveglio sono ancora sconosciute. Tuttavia è chiaro che più l'ibernazione è estesa e profonda, più energia verrà spesa durante i periodi di risveglio (Heldmaier et al., 2004).

1.2.3 TORPORE

Tutti gli animali hanno bisogno di energia per sostenere le attività fisiologiche e i comportamenti abitudinali. La quantità e qualità del cibo può variare di giorno in giorno o di stagione in stagione, per questo la selezione

naturale ha favorito animali che meglio si adattano a questi cambiamenti. Il torpore è una strategia che molti animali usano per far fronte a periodi di scarsità di cibo (Melvin and Andrews, 2009).

I mammiferi, in quanto omeotermi, cercano di mantenere la temperatura corporea approssimativamente intorno ai 35-38°C, nonostante le continue variazioni di temperatura ambientale. La capacità di mantenere la temperatura corporea costante ha contribuito al successo evolutivo dei mammiferi, permettendo ad essi di invadere tutte gli habitat e di distribuirsi in tutto il mondo. Alcuni mammiferi sono in grado di abbassare la propria temperatura corporea per contrastare la mancanza di cibo in determinati periodi, per poi ritornare alla normotermia in periodi favorevoli. La possibilità di entrare in torpore è quindi influenzata dalla disponibilità di cibo; per esempio è ben noto come il topo, un endoterma facoltativo, riesca ad entrare in torpore durante il digiuno propugnato.

Il torpore, è caratterizzato da una durata inferiore alle 24 ore, dalla riduzione del tasso metabolico (TM) e della temperatura corporea che può essere compresa tra i 10 °C e i 25 °C; queste strategie sono usate per esempio dai criceti russi (*Phodopus sungorus*). (Wilz and Heldmair, 2000). Il torpore segue la stessa successione di eventi che avvengono nell'ibernazione: entrata in torpore, mantenimento del profondo torpore, risveglio e ritorno ad uno stato di normotermia (eutermia). A 13 °C di temperatura corporea, il criceto (30,8 g di peso) mostra un tasso metabolico durante l'attività notturna di 2.63 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹ (tasso metabolico minimo a riposo di 2.1 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹). Durante il periodo di riposo diurno il criceto entra nello stato di torpore abbassando il tasso metabolico a 0.5 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹ entro 40 minuti (tasso metabolico medio dell'intera durata del torpore è di 0.709 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹; valore minimo: 0.391 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹; in sintesi, il tasso metabolico viene ridotto a circa 1/4 del valore misurato durante il periodo eutermico.

La temperatura corporea decresce da 34,2 a 17,9°C verso la fine del periodo di torpore. Il torpore profondo viene mantenuto per circa 9 ore, termina con il risveglio, ed entro 30 minuti il criceto riporta la propria temperatura alla

normotermia. Durante il torpore, l'ipometabolismo e l'ipotermia sono meno pronunciati rispetto all'ipometabolismo osservato nell'ibernazione.

1.2.4 ESTIVAZIONE

Comportamenti simili, con prolungate fasi di dormienza, possono essere osservati anche a temperature più elevate e vengono identificati col termine estivazione (Wilz and Heldmaier, 2000).

L'estivazione è uno stato di torpore meglio definito come la strategia per sopravvivere a condizioni aride spesso associate alla mancanza di disponibilità di cibo/acqua ed alte temperature.

L'estivazione è uno stato associato sia a vertebrati che invertebrati. Tra i vertebrati sono inclusi pesci, anfibi (rane, rospi, salamandre), rettili (lucertole, coccodrilli, tartarughe), così come piccoli mammiferi; recentemente è stato dimostrato che anche un primate tropicale può entrare in uno stato ipometabolico (Dausmann et al., 2004).

L'estivazione può essere a breve o a lungo termine, ed è spesso impiegata per consentire all'organismo di sopravvivere alle lunghe stagioni secche e incompatibili con l'attività vitale. L'animale va in estivazione per circa 9-10 mesi all'anno, ma esistono esemplari la cui estivazione dura per più di 2 anni. I rospi (*Scaphiopus couchii*) del sud-ovest americano sono un buon esempio di estivazione annuale. Possono essere attivi sulla terra per meno di 20 notti l'anno. Il primo passo verso le tane del sottosuolo è dato dalle prime piogge torrenziali estive. Gli adulti diventano voraci mangiatori per ricostituire le riserve necessarie alla sopravvivenza nei lunghi giorni di estivazione. Adattamenti degli animali alla vita in ambienti stressanti tipicamente includono cambiamenti a più livelli, comportamentali, fisiologici e biochimici, e anche nell'estivazione avviene questo. Gli elementi critici durante l'estivazione sono: la capacità di accumulo di risorse idriche e di una riserva di cibo sufficiente per tutta la durata del periodo di

dormienza. A livello comportamentale le specie cercano luoghi riparati in cui possano assicurarsi la conservazione dell'acqua nel corpo, minimizzare la loro esposizione ad agenti atmosferici e nascondersi dai predatori.

La difesa dalla perdita di acqua durante la dormienza è importante; essa viene persa durante la respirazione e attraverso la superficie corporea, per questo l'animale entra in estivazione con un'elevata quantità di acqua che viene utilizzata per mantenere i tessuti idratati. Gli anuri, per esempio, hanno un'enorme riserva di acqua nella vescica che viene utilizzata per sostituire l'acqua persa dai tessuti con l'evaporazione.

Il metabolismo energetico degli animali che vanno in estivazione si basa principalmente sull'ossidazione aerobica dei lipidi insieme al catabolismo proteico ed un piccolo contributo dei carboidrati. La conservazione delle riserve energetiche per la sopravvivenza durante il periodo di dormienza è fondamentale e il tasso metabolico durante questo periodo si abbassa del 10-30 % rispetto al tasso metabolico dell'animale nel periodo di riposo. Maggiore è la riduzione del tasso metabolico, maggiore è il tempo in cui la riserva energetica può sostenere il metabolismo basale dell'animale nella fase di dormienza.

In conclusione possiamo dire che non vi sono differenze qualitative tra i vari stati di dormienza, ma solo quantitative. Questo suggerisce che ibernazione, torpore ed estivazione siano basate sugli stessi meccanismi fisiologici per regolare il metabolismo basale e la temperatura interna. Le differenze osservate riguardano sostanzialmente la durata delle fasi di ipometabolismo, più lunghe per quanto riguarda l'ibernazione e l'estivazione rispetto al torpore.

1.3 CICLO SONNO-VEGLIA

Il sonno fa parte del ciclo ultradiano sonno-veglia. I componenti principali di questo ciclo sono la veglia, che può essere distinta in veglia attiva e veglia quieta, ed il sonno, che si può classificare in due tipi distinti: sonno REM (dove REM è l'acronimo dell'inglese *rapid eye movement*) e sonno NREM (non-REM, Parmeggiani, 2005).

Il sonno è uno stato comportamentale caratterizzato da reversibilità, isolamento percettivo, ridotta risposta agli stimoli esterni e dall'assunzione di una postura che è specie specifica; in particolare il sonno NREM è caratterizzato da ipotonia muscolare, accompagnata da una riduzione del metabolismo che si evidenzia anche dalla riduzione della frequenza cardiaca e della temperatura corporea centrale concomitante con un aumento della temperatura cutanea. Il sonno REM è invece caratterizzato un'atonìa muscolare saltuariamente interrotta da contrazioni involontarie (mioclonie) e da movimenti oculari rapidi.

Dal punto di vista autonomico nel sonno NREM è caratterizzato da una prevalenza di attività parasimpatiche, mentre nel sonno REM si osserva un'elevata variabilità nei livelli di attività simpatica, insieme a fasiche attivazioni dell'attività di scarica tonica del parasimpatico (Parmeggiani, 2005).

Dal punto di vista termoregolatorio, questi due stati sono nettamente distinti: durante il sonno NREM si osserva una diminuzione dell'attività metabolica e una diminuzione della temperatura centrale correlata ad un lieve aumento della temperatura cutanea. Durante il sonno REM invece si verifica perdita del controllo omeostatico della temperatura: una serie di processi che durante le fasi di veglia e di sonno NREM sono attivi, sebbene con livelli di soglia e di risposta differenti, consentendo di controllare da dispersione di calore corporeo (piloerezione, polipnea e brivido, vedi capitolo "risposte termoregolatorie evocate dall'esposizione ad ambienti freddi"), durante il sonno REM scompaiono (Parmeggiani, 2003); inoltre durante il passaggio da una fase di sonno NREM ad una di sonno REM si assiste ad un fenomeno di termoregolazione paradossa per cui, per esempio, si osserva una vasocostrizione cutanea in animali esposti ad ambienti caldi.

Questa mancanza di risposta termoregolatoria durante il sonno REM è attribuibile ad una ridotta capacità integrativa dei neuroni dell'area preottica dell'ipotalamo durante questa fase del sonno; in passato studi condotti sul gatto hanno dimostrato come il riscaldamento e il raffreddamento dell'area preottica nel gatto durante la fase REM, non produca nessuna risposta termoregolatoria

(Parmeggiani and Franzini, 1971, Glotzbach and Heller, 1976), al contrario di quanto avviene durante la veglia e durante il sonno NREM.

Questa diminuita capacità integrativa dei neuroni ipotalamici durante il sonno REM non dipende però da un generalizzato blocco della regolazione dei processi omeostatici in questa fase: esperimenti condotti per saggiare la reattività dei neuroni ipotalamici a stress di tipo osmotico (la regolazione dell'osmolarità dei fluidi corporei nei mammiferi è controllato a livello ipotalamico) durante il sonno REM ne hanno provato il perdurare della funzionalità (Luppi, 2010).

Dal punto di vista elettroencefalografico, sonno NREM, sonno REM e veglia possono essere facilmente distinti in base alle frequenze che li caratterizzano. Il ritmo elettroencefalografico del sonno NREM è caratterizzato da tre tipi di oscillazioni:

a) Onde sigma (7-14 Hz): dette anche fusi, sono una sequenza di onde caratterizzate da un'ampiezza prima crescente poi decrescente, raggruppate in sequenze di 1-2 sec; ricorrono periodicamente con un ritmo lento di 0,1-0,3 Hz.

b) Onde Delta (1-4 Hz): sono le caratteristiche delle fasi più profonde del sonno e sono caratterizzate da due componenti: una componente è corticale e caratterizzata dalla presenza dei complessi-K; l'altra componente è talamica, stereotipata, ritmica, risulta dall'interazione conseguente ad iperpolarizzazione, tra due correnti intrinseche di neuroni di relais talamo-corticali (Massimini et al., 2003).

c) Onde lente (0,5-1 Hz): sono un fenomeno corticale; neuroni corticali 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).

Il ritmo elettroencefalografico del sonno REM appare fortemente desincronizzato ed è caratterizzato in massima parte dalla presenza di onde Theta: sono onde riconoscibili per un ritmo molto regolare con una frequenza di 4-8 Hz.

1.3.1 OMEOSTASI DEL SONNO

Il sonno è un'attività di vitale importanza, in quanto la sua assenza comporta spossatezza, sonnolenza, alterazione delle facoltà cognitive (Alhola, 2007) e del metabolismo (Taheri, 2004); il protrarsi di una privazione di sonno per periodi di tempo sufficientemente lunghi porta alla morte (Rechtschaffen and Bergmann, 2005).

La quantità di tempo spesa nello stato di sonno e le dinamiche del suo recupero in seguito a privazione sono quindi soggette ad una regolazione di tipo omeostatico; secondo il modello attuale, la propensione al sonno (od alla veglia) è dovuta all'interazione di due componenti (o processi, figura 2): il processo C (circadiano) ed il processo S (omeostatico).

Il processo C descrive come, a seconda della specie, varia la propensione a dormire durante i periodi di luce o di buio (Borbély and Achermann, 2005) e deriva dall'attività del nucleo suprachiasmatico.

Il processo S (omeostatico), descrive come la propensione al sonno aumenta in maniera proporzionale all'accumularsi di tempo passato in veglia e diminuisce invece in seguito a periodi di sonno (NREM); in questo modo un episodio di riduzione o privazione di sonno dovrebbe seguire un recupero di sonno, in durata od intensità, alla prima occasione disponibile.

Un parametro utilizzato come indicatore dell'intensità del sonno NREM, e quindi utilizzato per descriverne il processo omeostatico sottostante, è costituito dall'attività elettroencefalografia ad onde lente (SWA, l'acronimo inglese per *slow wave activity*), una componente a bassa frequenza della banda Delta. La SWA è particolarmente intensa all'inizio di una fase di sonno e si è osservato come periodi di privazione presentino intensa attività Delta durante i periodi di NREM immediatamente successivi (Borbély and Achermann, 2005, figura 3).

La SWA non è quindi solo un epifenomeno del sonno, ma ne riflette importanti meccanismi di regolazione, il cui significato è tuttora motivo di discussione; ad oggi la teoria più accreditata per spiegare l'omeostasi del Delta nel sonno NREM è quella dell'omeostasi sinaptica (Tononi and Cirelli, 2003, figura

5); questa teoria correla il potenziamento sinaptico durante la veglia con la SWA durante il sonno.

Nello specifico, le diverse attività svolte durante la veglia (come ad esempio: reazioni a stimoli sensoriali, attività motorie, associazioni mentali, pensieri, acquisizione di nuove esperienze) portano ad un aumento del numero e della forza delle connessioni sinaptiche tra i neuroni (potenziamento sinaptico); questo fenomeno è direttamente correlato con l'incremento della SWA durante la fase di sonno successiva, la cui funzione sarebbe quella di una rimodulazione dei pesi sinaptici al fine di ottimizzarne la funzionalità. Da questo punto di vista il progressivo declino dell'attività SWA durante il riposo rifletterebbe la corrispondente rimodulazione delle connessioni sinaptiche.

La funzione dell'attività ad onde lente durante il sonno NREM secondo questa teoria è quindi di evitare sovraccarichi di connessioni sinaptiche sulle cellule nervose, sfoltendo la densità delle connessioni ed al contempo migliorandone l'efficienza.

Questa ipotesi fatica a spiegare le osservazioni fatte su animali riemersi da periodi di ipotermia (vedi capitolo "sonno e torpore"), in cui si osserva un incremento della banda Delta dell'EEG durante il sonno NREM, nonostante l'animale sia reduce da un periodo caratterizzato da scarsa attività elettroencefalografica.

Altri sistemi possono essere coinvolti nell'incremento del Delta post-torpore: il ritorno alla normotermia richiede infatti un grosso sforzo a carico del SNS, che deve stimolare una intensa attivazione della termogenesi.

Possiamo tracciare una correlazione tra questa attivazione del SNS, necessaria per il ritorno alla termoneutralità, ed il successivo incremento della SWA nel NREM: alcuni studi dimostrano come l'intensificazione della SWA nel sonno NREM possa avvenire in seguito a stimolazioni di tipo stressorio (Meerlo et al., 2001).

In particolare esiste nel ratto un modello di stress particolarmente interessante, denominato "*social defeat*"; questo modello prevede l'utilizzo di uno stimolo negativo di tipo ambientale (la sconfitta da parte di un maschio

dominante), in grado di indurre nell'animale un forte stress di tipo sociale/emotivo. L'utilizzo di questo modello ha evidenziato come in seguito alla sconfitta si produca un forte spostamento dell'equilibrio autonomico verso una predominanza simpatica (caratterizzata da una persistente tachicardia blandamente contrastata a livello vagale, Sgoifo et al., 1999), ma soprattutto ha evidenziato come nelle successive fasi di sonno si verifichi un aumento dell'intensità del Delta nel NREM (Meerlo et al., 2001).

A differenza del sonno NREM, il sonno REM non presenta dinamiche di recupero basate sull'intensità, quanto piuttosto sulla durata del fenomeno (Cerri et al., 2005). Una procedura che ha permesso uno studio approfondito delle dinamiche del recupero del sonno REM, consiste nell'esposizione a basse temperature ambientali; la quantità perduta può essere influenzata sia dalla durata dell'esposizione che dall'impegno termoregolatorio causato (ad una T_a minore corrisponde un maggior sforzo termoregolatorio). Terminata l'esposizione alle basse temperature, nel ratto il processo di recupero del sonno REM appare dipendere soltanto dalla quantità di sonno REM persa durante la precedente deprivazione, seguendo una dinamica che appare indipendentemente dalla temperatura di esposizione (Amici et al. 2008). Queste procedure hanno consentito di dimostrare che il sonno REM perduto durante una giornata di esposizione a bassa temperatura ambientale viene completamente recuperato nei quattro giorni successivi attraverso un processo rapido, che nel giro di 24 ore porta l'animale che abbia perso il 100% del sonno REM durante la giornata di esposizione a colmare l'80% del debito contratto, distribuendo il recupero del restante 20% nei tre giorni successivi (Amici et al., 2008)

Da un'analisi comparativa della modalità con cui il sonno REM viene recuperato nel ratto (Cerri et al., 2005), nel gatto (Parmeggiani et al. 1980) e nella specie umana (Endo et al., 1998) è stata formulata un'ipotesi secondo la quale la dinamica del processo di deprivazione e recupero del sonno REM sarebbe determinata dalla massa corporea dell'animale. Nell'animale di taglia minore (e quindi con un rapporto superficie volume sfavorevole e un maggior metabolismo

basale per grammo di tessuto), il bisogno di recuperare il sonno REM perso si presenta infatti con maggiore forza ma all'aumentare della taglia dell'animale è necessario contrarre un debito di sonno REM maggiore per innescare il processo di recupero (Amici, et al. 2008).

Indipendente da quale che sia il significato funzionale del sonno REM, il fatto che la regolazione della sua comparsa sia collegato alla taglia dell'animale, che filogeneticamente esso sia comparso di pari passo con la comparsa dell'omotermia nei mammiferi e negli uccelli (Siegel 2005) e che la sua comparsa implichi una sospensione della termoregolazione, porta inevitabilmente a ipotizzare una stretta relazione tra il sonno REM e i processi fisiologici legati alla regolazione del metabolismo corporeo (Amici et al., 2008).

1.4 SONNO E TORPORE

Il fatto che ibernazione e torpore, similmente al sonno NREM, siano degli stati caratterizzati da una riduzione della temperatura corporea, da ridotta attività motoria e da ridotto metabolismo, ha portato in passato a sostenere l'ipotesi che questi stati ipotermico-ipometabolici fossero una sorta di sonno molto profondo o una sorta di prosecuzione del sonno.

In realtà l'analisi elettroencefalografica di questi stati e dei periodi di emersione da torpore e ibernazione hanno smentito questa ipotesi. Innanzitutto durante l'entrata in torpore si osserva una progressiva riduzione dell'attività elettroencefalografica e uno spostamento verso la regione lenta dello spettro di tutte le frequenze dell'EEG, anche in conseguenza della diminuzione della temperatura corporea. Durante il sonno invece, si assiste ad un'attività elettroencefalografica varia ed intensa, caratterizzata da un susseguirsi ciclico di fasi di sonno NREM, REM e brevi periodi di veglia.

Inoltre è stato osservato come animali emersi da periodi di torpore od ibernazione (rispettivamente il criceto russo e lo scoiattolo di terra, *Spermophilus*

lateralis) passino molto tempo dormendo di un sonno le cui caratteristiche elettroencefalografiche sono le stesse osservate nel sonno successivo a periodi di deprivazione (di sonno; Deboer and Tobler, 1994).

Gli animali deprivati di sonno, appena ne hanno la possibilità iniziano a dormire: in questi momenti il sonno è principalmente di tipo NREM ed è caratterizzato da un'intensa attività Delta, che in seguito diminuisce gradualmente fino a livelli normali.

Anche gli animali in grado di andare in ibernazione durante i mesi invernali, durante i brevi periodi di risveglio e di ritorno alla normotermia passano il 60% del loro tempo dormendo; questo non sarebbe necessario se l'ibernazione fosse assimilabile ad una specie di sonno profondo, mentre sembrerebbe che durante questi periodi ipotermico-ipometabolici ci sia un accumulo di necessità di dormire.

1.5 SIMULARE L'IBERNAZIONE

Sviluppare una procedura che possa permettere anche ad un non ibernante di entrare in ipotermia, senza l'instaurarsi di effetti autonomici compensatori avversi, potrebbe creare in ambito medico molti vantaggi.

L'ibernazione è un fenomeno evolutivamente conservato, che è stato descritto in molti ordini di mammiferi (figura 5), quindi diffusa in più classi e non in un'unica specie.

La possibile spiegazione di questa distribuzione eterogenea è che si tratti di un carattere ancestrale, e che quindi il corredo genetico adatto per sopravvivere in uno stato di ipometabolismo sia conservate in quasi tutti i mammiferi, ma che solo una parte di questi abbia sviluppato la capacità di sospendere le attività metaboliche e di sopravvivere in ipotermia ed all'ipotermia.

L'ampia distribuzione degli ibernanti nella filogenesi potrebbe far presupporre che sia possibile indurre quindi uno stato ipotermico/ipometabolico in tutti i mammiferi.

La possibilità di indurre farmacologicamente uno stato di pseudo-torpore in pazienti con arresto cardiaco, trapiantati d'organo, in pazienti operati a livello cerebrale e cardiaco, o in pazienti in terapia intensiva (IUC), potrebbe fornire un prezioso strumento per limitare i danni ischemici tissutali comunemente osservati in queste condizioni patologiche (Lee, 2008).

1.5.1 STATO DELL'ARTE

Al momento i meccanismi che sono alla base dell'ibernazione sono sconosciuti. Una combinazione tra fattori ambientali (la diminuzione di luce durante il giorno, abbassamento della temperatura ambientale, cambiamenti nella dieta) e fattori endogeni (aumento di alcuni ormoni e cambiamento di utilizzo della fonte energetica, da glucosio a lipidi) è stata suggerita esserne un possibile meccanismo (Carey et al., 2003).

Diversi composti farmacologici sono stati studiati e proposti come induttori di stati ipometabolici. In particolare tre importanti condotti nel topo studi hanno avuto successo nell'indurre uno stato di pseudo-torpore.

1.5.2 ACIDO SOLFIDRICO (H₂S)

L'acido solfidrico è una molecola endogena, prodotta in quantità basse, che funziona come molecola segnale per il sistema nervoso e il sistema vascolare. E' inoltre un potente inibitore reversibile del complesso IV (citocromo-c ossidasi) della fosforilazione ossidativa nel mitocondrio. L'H₂S compete con l'O₂ nel legame con la citocromo-c ossidasi, producendo un abbassamento del consumo di ossigeno cellulare e un'inibizione reversibile del metabolismo cellulare. E' inoltre stato trovato implicato nell'attivazione di sistemi anti-apoptotici e in meccanismi anti-ossidanti. (Calvert et al. 2010). Recenti dati hanno dimostrato che il trattamento con H₂S aumenta l'espressione di HSP90, HSP70 e membri anti-

apoptotici e pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2. Inoltre è stato dimostrato che l'H₂S aumenta i meccanismi antiossidanti tramite il fattore nucleare (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), che fa aumentare l'espressione di geni che codificano per diverse proteine antiossidanti. La combinazione tra la capacità di ridurre il metabolismo cellulare inibendo la citocromo-c ossidasi e le proprietà anti-apoptotiche e pro-apoptotiche, rende l'H₂S un promettente composto per indurre il torpore.

Nel 2005 Blackstone et al. (Blackstone et al.,2005) dimostrarono che l'esposizione nel topo ad H₂S gassoso produceva un abbassamento del metabolismo cellulare e della temperatura corporea (concentrazione da 20 a 80 ppm) nel topo. Dopo l'esposizione il metabolismo calava del 90% e la temperatura corporea arrivava a circa 2 °C sopra quella ambientale, con una temperatura corporea minima di 15 °C. Sei ore dopo l'esposizione all'H₂S, il topo lentamente si riscaldava e il metabolismo cellulare e la temperatura corporea ritornavano a valori normali. Somministrazione di H₂S in altri tipi di animali, più grandi, ha riportato risultati inconsistenti. Nel suino la somministrazione di H₂S induce, dopo 8 ore, un lieve ma significativo, abbassamento della frequenza cardiaca e della temperatura corporea. Inoltre il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ decrescono significativamente, indicando una riduzione del tasso metabolico. Altri esperimenti condotti in ratti, suini e pecore, non hanno però confermato la capacità dell'H₂S di indurre uno stato di pseudo-torpore.

Potrebbe essere possibile che in animali di massa corporea maggiore come le pecore, la differente regolazione del metabolismo in funzione della taglia maggiore, eviti una riduzione del tasso metabolico dopo somministrazione di H₂S (Bouma et al., 2011).

E' inoltre possibile ipotizzare che l'uso di un modello sperimentale come il topo possa non essere stata la scelta ottimale per questo approccio sperimentale. Come esposto prima, il topo è un endoterma facoltativo, ed è quindi in grado, nelle adeguate condizioni, di entrare in torpore. E' possibile che il topo, in risposta al blocco sistemico del citocromo-c ossidasi, abbia cercato di difendersi dalla subentrante ipossia cellulare, entrando in torpore.

1.5.3 5'-ADENOSINA MONOFOSFATO

La 5'-adenosina monofosfato (5'-AMP) è un metabolita dell'idrolisi dell'ATP ed è stato proposto come possibile inducente di uno stato di pseudo-torpore nel topo da laboratorio. In condizioni di digiuno e di buio costante, la somministrazione di 5'-AMP ha indotto nel topo uno stato di pseudo-torpore, con un'importante e subitanea bradicardia. Gli effetti cardiaci del 5'-AMP appaiono profondamente diversi da quelli osservati durante il torpore naturale, per cui è improbabile che il 5'-AMP sia coinvolto nella genesi dell'induzione del torpore in natura.

Ci sono due ipotesi che possono spiegare gli effetti farmacologici di 5'-AMP:

i) 5'-AMP è defosforilato ad adenosina, che attiva i recettori dell'adenosina e porta ad una riduzione del rendimento cardiaco, e di conseguenza ad una riduzione di temperatura.

ii) L'assorbimento di 5'-AMP porta all'attivazione dell'AMP proteina chinasi (AMPK), un enzima chiave coinvolto nella regolazione del metabolismo.

La somministrazione di adenosina, ADP o ATP può indurre una risposta ipotermica nel topo, che è coerente con la prima ipotesi. La seconda ipotesi descrive il ruolo di AMPK-intracellulare, un enzima che incrementa l'assorbimento del glucosio, l'ossidazione degli acidi grassi e inibisce la sintesi proteica, glucidica e degli acidi grassi, nell'induzione di uno stato di pseudo-torpore. In accordo con la seconda ipotesi, il 5'-AMP è capace di indurre una risposta ipotermica anche in topo ecto-5'-nucleasi-deficienti e in topi deficienti di un sottoinsieme di recettori per l'adenosina (A1, A2A, A2B, o A3). Anche se questo suggerisce un importante ruolo di AMPK nell'induzione di una risposta ipotermica, non è possibile escludere un ruolo per i recettori dell'adenosina. La sensibilità di AMPK al rapporto [AMP]:[ATP] lo rende un sensore per lo stato energetico cellulare. Il 5'-AMP, grazie al suo ruolo di regolazione del metabolismo e di attivazione di diversi meccanismi di protezione, potrebbe essere un promettente bersaglio nella medicina dei trapianti. La somministrazione di 5'-

AMP induce uno stato di risparmio energetico, evitando l'accumulo di lattato, attivando diversi pathways di protezione con conseguente produzione di fattori protettivi, come per esempio eNOS e NO ed evitando quindi i rischi ipossici durante l'ischemia. Tuttavia, l'attivazione di AMPK tramite infusione intracerebroventricolare di AICAR (specifico attivatore di AMPK) nella marmotta ibernata, incrementa l'assunzione di cibo e impedisce l'entrata in torpore. Anche se è difficile discriminare gli effetti diretti indotti da 5'-AMP e indiretti attraverso i suoi effetti ipotermici, la capacità di 5'-AMP di attivare AMPK e pathways di segnalazione del ciclo cellulare, fanno di questo un ottimo composto da utilizzare in campo medico. Tuttavia i dati riguardanti i meccanismi molecolari alla base di 5'-AMP sono ancora scarsi e il potenziale utilizzo clinico ha ancora bisogno di accertamenti (Bouma et al., 2011).

Il tentativo di usare il 5'-AMP in animali non ibernanti non ha funzionato completamente. La somministrazione di 5'AMP nel ratto ha infatti indotto solo un modesto stato di ipotermia ed ha prodotto molti problemi metabolici e cardiovascolari. Anche in questo caso è possibile che il topo, un endoterma facoltativo, abbia cercato di difendersi dalla somministrazione di 5'AMP entrando in torpore, cosa non possibile in animali non ibernanti.

1.5.4 ORMONE TIROIDEO

La 3-Iodiotiroammina (T1AM) è una recente scoperta. E' una sostanza derivata dall'ormone tiroideo ed è un potente agonista del recettore della proteina G e dell'ammina-associata al recettore TAAR1. Il suo ruolo fisiologico non è ancora ben chiaro, ma la sua iniezione nel topo ha portato ad una riduzione dose-dipendente della temperatura corporea e della frequenza cardiaca, inoltre la sua iniezione nel topo e nei criceti russi (*Phodopus sungorus*) ha ridotto il tasso metabolico. Tuttavia esistono alcune importanti differenze tra gli effetti metabolici e termici indotti da T1AM e il torpore naturale, che sollevano questioni importanti sul ruolo potenziale di questo composto nell'indurre pseudo-torpore. Rispetto al torpore naturale, in questo trattamento farmacologico la riduzione del

metabolismo avviene più velocemente e il riscaldamento richiede più tempo dopo il trattamento con T1AM. Inoltre la somministrazione di T1AM induce una depressione metabolica che è accompagnata da una rapida inibizione della glicolisi che nel torpore spontaneo è meno ritardata e pronunciata; inoltre il grado di ipotemia è meno pronunciato in seguito al trattamento con T1AM rispetto al naturale torpore, con la temperatura corporea che si attesta a 33°C e 30°C nei criceti e topi rispettivamente. La maggior parte degli effetti di T1AM sono opposti agli effetti di altri ormoni tiroidei come T4 e T3; questo suggerisce che gli ormoni tiroidei e i loro amminici derivati possono giocare un ruolo importante nell'impedire l'ingresso in torpore. Recentemente, Ju et al. hanno mostrato che la somministrazione di T1AM può indurre più giorni di torpore nel topo, seguendo un protocollo sperimentale che prevede la somministrazione di dieta grassa per quattro settimane prima dell'esperimento, e ripetute iniezioni intraperitoneali di T1AM; i pochi animali usati e le particolarità del protocollo sperimentale sollevano dubbi sull'usabilità della procedura. Per questo ulteriori dati sono necessari per valutare il potenziale ruolo di T1AM come induttore terapeutico di pseudo-torpore nei non ibernanti (Bouma et al., 2011).

1.5.5 ALTRI COMPOSTI DI POTENZIALE INTERESSE NELL'INDURRE IL TORPORE

Diversi composti che influenzano la disponibilità, il rilevamento, la produzione o l'uso di energia sono stati segnalati per ridurre la temperatura corporea e indurre uno stato simile al torpore. Includono: i) 2-deossi-D-glucosio (2DG) che agisce bloccando la glicolisi; ii) metilpalmoxirate (MP); iii) mercaptoacetato (MA), che limitano l'utilizzazione degli acidi grassi. Iniezioni intracerebroventricolari del neuropeptide Y (NPY) inducono una risposta ipotermica che è simile alla risposta che si ha iniettando 2-DG e che conduce ad una lieve diminuzione della temperatura corporea di circa 1-2 °C. Iniezioni intracerebroventricolari di NPY nonché uno specifico agonista del recettore

dell'NPY Y1 nei criceti russi porta una pronunciata ipotermia che dura diverse ore e che potrebbe essere prevenuta con uno specifico antagonista del recettore NPY Y1. Tuttavia, non è ancora chiaro se effettivamente questa molecola possa indurre il torpore anche in specie non ibernanti (Bouma et al., 2011).

1.5.6 INTERPRETAZIONE E IPOTESI ALTERNATIVE

Tutti gli studi presentati sopra seguono un approccio comune: tentano cioè di indurre uno stato di pseudo-torpore mediante un'inibizione sistemica del metabolismo cellulare. Il principale problema che emerge dagli studi sopra descritti è che sono stati effettuati con successo solo nel topo, che è un endotermo facoltativo e che quindi è in grado, nelle giuste condizioni, di entrare spontaneamente in uno stato di torpore; è quindi lecito supporre che i vari trattamenti usati in questi studi possano aver semplicemente provocato, in maniera più o meno diretta, l'attivazione di una via già naturalmente esistente nell'animale. In alternativa lo stato di torpore osservato può essere una forma di difesa dallo stato di ipossia cellulare sistemica indotto dai composti utilizzati.

L'approccio che noi proponiamo in questo studio è diverso: anziché agire inibendo il metabolismo, esploreremo la possibilità che l'inibizione selettiva di uno dei punti chiave della via centrale deputata al controllo della termoregolazione possa essere sufficiente ad indurre uno stato di profonda ipotermia, attraverso un blocco della termogenesi e il contemporaneo aumento della dispersione termica. L'utilizzo di questo approccio ci permetterebbe inoltre di evitare gli effetti dannosi di una risposta compensatoria al freddo.

Per concludere, al fine di evitare le possibili complicazioni sperimentali legate all'endotermia facoltativa del topo, condurremo lo studio nel ratto, una specie che non è in grado, in nessuna circostanza, di entrare in torpore spontaneamente.

1.6 TERMOREGOLAZIONE

Si intende per termoregolazione la capacità di mantenere la temperatura nell'intorno di un valore predeterminato per mezzo di effettori che agiscono attuando delle correzioni in senso opposto a quello della deriva dal valore di temperatura di riferimento. Questo tipo di regolazione può essere attuato per mezzo di un classico sistema di controllo a feedback negativo, nel quale un integratore controlla il valore di temperatura in ingresso, lo confronta con un valore di riferimento e lo corregge per mezzo di effettori termici per mantenerlo il più vicino al valore di riferimento. Fino ad oggi questo classico sistema di controllo è stato adottato anche per spiegare la regolazione della temperatura in fisiologia (Boulant, 2006) ma la complessità di un meccanismo fisiologico come la regolazione della temperatura che dipende da svariati fattori fisiologici (risorse energetiche disponibili, risorse idriche ecc.) non può essere spiegata da un modello così semplificato (Romanovsky, 2007).

Per comprendere quali siano i fattori che entrano in gioco in un organismo complesso per regolare la temperatura, bisogna analizzare i diversi tipi di termoregolazione che si sono evoluti nel corso del tempo.

Tra gli animali si possono distinguere due sotto gruppi: animali poichilotermi e animali omeotermi. I primi adattano la loro temperatura alle condizioni ambientali e il loro corpo, che è generalmente più freddo (35°C), è maggiormente soggetto ad oscillazioni termiche dovute alle variazioni di temperatura ambientale. A questo gruppo appartengono pesci, anfibi e rettili. Il secondo gruppo, a cui appartengono mammiferi e uccelli, è in grado di regolare in maniera attiva e mantenere la temperatura del proprio corpo costante indipendentemente dalle variazioni ambientali. La loro temperatura corporea oscilla intorno a 37°C .

Per consentire il mantenimento di una temperatura costante è necessario essere in grado sia di produrre e/o conservare calore che disperderlo. Per poter attuare questi processi di generazione, mantenimento e dispersione del calore

bisogna disporre di particolari organi effettori che siano in grado di attuare queste risposte.

I processi fisici che descrivono il flusso di calore fra un corpo e l'ambiente sono:

- **l'irraggiamento:** trasmissione di calore a mezzo di radiazioni elettromagnetiche;
- **la conduzione:** il calore dato dall'energia cinetica delle particelle di un materiale si trasferisce per contatto con un materiale più freddo con un'energia cinetica delle particelle minore;
- **la convezione termica:** il calore di un corpo si trasferisce ad un liquido od ad un gas i quali scaldandosi diminuiscono la loro densità e tendono a creare moti convettivi. Questo genere di moto crea una corrente di aria o liquido caldo ascendente ed una corrente di aria o liquido freddo discendente che determina il raffreddamento del corpo.
- **l'evaporazione:** il cambiamento di stato da liquido a gas che avviene quando un liquido entra in contatto con un corpo caldo.

Sulla base di questi processi di scambio termico si sono evolute diverse modalità termoregolatorie che nei mammiferi hanno contribuito alla formazione di organi e strategie specializzate a questo scopo. In quest'ottica, si possono distinguere due principali forme di termoregolazione:

- termoregolazione comportamentale: quando è coinvolta l'attività volontaria dell'animale
- non comportamentale quando non dipende da un'azione volontaria ma bensì viene gestita dal sistema nervoso autonomo.

1.6.1 TEROREGOLAZIONE COMPORTAMENTALE

La prima modalità di termoregolazione è detta comportamentale (pesci, anfibi, rettili, mammiferi e uccelli). Questa modalità termoregolatoria, considerata anche la più ancestrale, è presente in tutte le classi animali. Si attua come già detto

per mezzo di azioni volontarie dell'animale e prevedono diverse strategie in funzione della classe animale e del grado evolutivo degli stessi. Gli animali che sfruttano questo tipo di termoregolazione scelgono in funzione delle condizioni termiche ambientali il posto migliore dove poter mantenere la propria temperatura corporea il più possibile vicino al valore ottimale per la conduzione della loro attività fisiologica.

Questi spostamenti possono essere fatti all'interno di una ristretta area come per esempio i rettili che cambiano continuamente la loro posizione durante l'arco della giornata passando da zone soleggiate a zone d'ombra oppure possono richiedere spostamenti molto più ampi di migliaia di chilometri come nel caso degli uccelli migratori che nei periodi invernali si muovono verso zone temperate. Un'altra strategia di termoregolazione comportamentale è data dagli aggiustamenti posturali che contribuiscono rispettivamente, aumentando o diminuendo la superficie corporea esposta all'aria, nel disperdere o conservare la temperatura corporea. Inoltre alcuni mammiferi, quando esposti ad alte temperature, cospargono il loro corpo di saliva, consentendo quindi la dispersione di calore per evaporazione. Questo comportamento viene definito, nell'ambito scientifico, con il nome di salivaspreading.

1.6.2 TERMOREGOLAZIONE NON COMPORTAMENTALE

La termoregolazione comportamentale (mammiferi e uccelli) si basa sulla regolazione della temperatura corporea per mezzo di sistemi autonomici che non prevedono un'azione di tipo volontario. Anche se recenti studi hanno mostrato in alcuni rettili e pesci la possibilità di una termoregolazione autonoma, questi restano tuttavia principalmente dipendenti da una termoregolazione di tipo comportamentale (Bicego et al., 2007). Si può quindi affermare che le uniche classi animali che posseggono una termoregolazione autonoma sono i mammiferi e gli uccelli. Questi animali omeotermi, oltre a possedere la capacità di controllare e regolare la propria temperatura corporea in maniera autonoma, hanno anche, rispetto alle altre classi animali, una temperatura corporea più elevata. Le

risposte termoregolatorie autonome messe in atto da questi animali possono essere divise in due categorie: risposte termoregolatorie evocate da esposizione ad ambienti freddi e risposte termoregolatorie evocate da esposizione ad ambienti caldi.

1.7 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI FREDDI

Coinvolgono quegli effettori termoregolatori che possiedono la caratteristica di conservare e/o produrre calore. In queste condizioni, la temperatura corporea viene quindi conservata per mezzo di un aumento della produzione di calore (termogenesi), che può vedere la presenza di brivido (termogenesi da brivido) o no (termogenesi senza brivido), e per mezzo di una riduzione della dispersione termica nell'ambiente (regolazione del flusso ematico cutaneo, piloerezione).

1.7.1 TERMOGENESI DA BRIVIDO (SHIVERING)

Questa risposta termoregolatoria è garantita dalla produzione di calore ottenuta per mezzo della contrazione isometrica del tessuto muscolare garantita dalla trasmissione nervosa diretta al muscolo. Questo tipo di contrazione della muscolatura scheletrica non finalizzata al movimento produce un tremore definito brivido, che compare quando la temperatura corporea tende alla diminuzione. Questo processo è importante anche nella fase di rialzo termico che si verifica durante gli stati febbrili.

1.7.2 TERMOGENESI NON DIPENDENTE DA BRIVIDO (NOT-SHIVERING)

La termogenesi chimica è compresa tra le termogenesi non dipendente da brivido, prevede la produzione di calore per mezzo di reazioni biochimiche esotermiche le quali avvengono in organi che, durante l'evoluzione, hanno acquisito capacità termoregolarie. I principali organi coinvolti in questi processi termoregolarie sono il tessuto adiposo bruno, il fegato e il muscolo.

i) Il tessuto adiposo bruno (BAT) è un organo adibito alla produzione di calore mediante una peculiare reazione chimica che promossa da una proteina presente nei suoi mitocondri. Questo tessuto svolge un ruolo molto importante nella produzione di calore negli animali ibernanti ed in altri mammiferi adattati a vivere in climi freddi (Cannon 2004), mentre nell'uomo è presente in quantità molto ridotte.

ii) Il fegato viene attualmente considerato un altro organo termoregolarie in grado di aumentare la sua attività metabolica con conseguente produzione di calore in seguito a basse temperature ambientali.

iii) Il muscolo come già detto sopra, è in grado di produrre calore attraverso il brivido ma recentemente sono state trovate isoforme della proteina UCP1 all'interno delle sue cellule che lasciano supporre un suo ruolo termogenetico di origine metabolica. Inoltre, nel muscolo degli uccelli l'espressione di un'isoforma della proteina UCP1 la avUCP sembrerebbe essere direttamente correlata con l'abbassamento della temperatura (Collin et al., 2003).

iv) Il cuore, l'attività cardiaca è soggetta ad un forte cronotropismo positivo durante l'esposizione a basse temperature ambientali. Questo da un lato sostiene le richieste metaboliche dei tessuti attivi in queste circostanze, ma è di per sé in grado di produrre una quantità non trascurabile di calore.

La regolazione del flusso ematico cutaneo è un tipo di controllo dell'equilibrio termico non dipendente da brivido. Il calore prodotto dagli organi termogenetici, ma anche quello derivante dai normali processi biochimici, richiede un sistema di trasporto efficiente che ne garantisca la diffusione in tutto il corpo ma che allo stesso tempo ne assicuri la conservazione o l'eventuale dispersione. Questo ruolo viene svolto dal sistema cardiovascolare. A tal fine, la branca del sistema nervoso autonomo deputata alla termoregolazione si è dovuta integrare con la componente autonoma, più antica, deputata alla regolazione della funzione cardiovascolare. In quest'ottica e in circostanze adeguate, le esigenze termoregolatorie possono prendere il sopravvento su quelle circolatorie, trasferendosi così il controllo di alcune componenti del sistema cardiovascolare ai centri deputati al controllo della temperatura corporea.

I centri termoregolatori possono agire a due livelli sul sistema cardio circolatorio: modificando la frequenza cardiaca e modificando il lume capillare. L'aumento della frequenza cardiaca a la duplice funzione di garantire la perfusione degli organi termogenetici (BAT) assicurandone un maggior apporto di ossigeno durante periodi di intensa attività ed inoltre di aumentare il trasporto di calore, che questi organi producono, in tutti i distretti anatomici. Le variazioni del lume capillare invece garantiscono un aumento (vasodilatazione) o una diminuzione (vasocostrizione) del flusso ematico cutaneo periferico che rispettivamente permettono una maggiore dispersione o una maggiore conservazione del calore corporeo. L'esposizione ad ambienti freddi causerà quindi vasocostrizione a livello cutaneo per conservare calore e contemporaneamente un aumento della frequenza cardiaca con conseguente aumento del trasporto di calore proveniente dagli organi termogenetici.

La piloerezione, (sollevamento dei peli) negli animali coperti da pelliccia, è un altro tipo di termogenesi non dipendente da brivido, ed è ottenuta grazie alla contrazione dei muscoli erettori del pelo contribuisce alla conservazione del calore corporeo attraverso la formazione di un cuscino di aria, tra la cute calda e l'ambiente freddo, che funziona da isolante termico.

1.8 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI CALDI

Le risposte termoregolatorie evocate dall'esposizione ad ambienti caldi si attuano per mezzo di effettori che facilitano la dispersione di calore, la cui attivazione si associa ad un'inibizione dell'attività degli organi termogenici. Fra questi il più importante è rappresentato dalla regolazione del flusso ematico cutaneo, ma questo può essere supportato da sistemi accessori, quali la polipnea e la sudorazione.

1.8.1 REGOLAZIONE DEL FLUSSO EMATICO CUTANEO

L'aumento del flusso capillare cutaneo ai distretti periferici del corpo e la sospensione dei processi metabolici termogenetici contribuiscono alla dispersione ed alla riduzione della produzione di calore. In queste circostanze anche la frequenza cardiaca diminuisce in risposta ad una minore richiesta di ossigeno da parte degli organi termogenetici.

1.8.2 SUDORAZIONE

La sudorazione è un processo che permette la termodispersione sfruttando l'evaporazione dei liquidi. L'organo interessato in questa funzione termoregolatoria è la ghiandola sudoripara. Queste ghiandole sono localizzate su tutta la superficie corporea nell'uomo con una distribuzione maggiore a livello delle mani e dei piedi.

1.8.3 POLIPNEA

La polipnea è un aumento non patologico della frequenza degli atti respiratori che si verifica normalmente durante uno sforzo fisico quando in

seguito all'aumento dei processi metabolici è richiesta una maggiore quantità di ossigeno. Questo tipo di controllo termoregolatorio è presente solo in alcuni mammiferi ed è accentuato e intenso in quelli che per particolari caratteristiche anatomiche hanno particolare difficoltà a termoregolare in ambienti caldi (Es. cani con il muso corto).

1.9 CONTROLLO DELLA TERMOREGOLAZIONE

1.9.1 TERMOGENESI

Il tessuto adiposo bruno (BAT) chiamato in passato ghiandola ibernata poiché descritta per la prima volta in animali ibernanti, è un tessuto adiposo reticolare che si differenzia dal tessuto adiposo bianco per la sua caratteristica pigmentazione bruna (visibile ad occhio nudo) data dai carotenoidi presenti a livello mitocondriale. La sua principale funzione è di generare calore, per questo motivo la sua localizzazione anatomica appare essere strategica nell'assolvere questo compito, poiché esso è sempre localizzato in prossimità di vasi sanguigni, a cui cede calore affinché venga trasportato con il flusso ematico alle zone periferiche del corpo.

I maggiori depositi di BAT sono a livello interscapolare, periaortico e perirenale. Questo tessuto è presente in quasi tutti i mammiferi (specialmente roditori) compreso l'uomo (Saito et al., 2009), anche se in quantità maggiore in età neonatale e in animali con un elevato rapporto superficie volume. L'attività termogenetica (produzione di calore) che esso svolge è garantita dalla presenza di una particolare proteina mitocondriale: UCP1.

Questa proteina localizzata a livello della membrana mitocondriale ha la caratteristica di disaccoppiare la fosforilazione ossidativa favorendo quindi la produzione di calore a discapito della formazione di molecole di ATP (Cannon and Nedergaard, 2004).

1.9.2 VASODILATAZIONE

Come mostrato sopra gli animali omeotermi hanno sviluppato diverse strategie termoregolarie, che includono la specializzazione funzionale di alcuni organi ma anche il controllo di sistemi ed apparati che normalmente assolvono ad altre funzioni. Tra gli apparati coinvolti nella termoregolazione quello cardiocircolatorio è molto interessante dal punto di vista funzionale e sperimentale in quanto è l'unico che può assolvere sia le funzioni termo dispersive che termo conservative. La principale caratteristica termoregolaria di questo apparato è quella di poter ridurre (vasocostrizione) o aumentare (vasodilatazione) il flusso ematico cutaneo, conducendo rispettivamente alla conservazione o alla dispersione del calore da esso trasportato.

Tutta la superficie cutanea del corpo è coinvolta nella regolazione termica data dalla vasomozione, tuttavia si possono delimitare alcuni distretti anatomici che possiedono spiccate caratteristiche termoregolarie. Questi distretti anatomici prendono il nome di scambiatori di calore. Ne sono un esempio, la coda e le zampe nel ratto e l'orecchio nel coniglio e nel gatto. La caratteristica di questi organi scambiatori è quella di possedere al tempo stesso un elevato rapporto superficie volume, un esteso letto vascolare capillare ed una superficie glabra. Il letto capillare presente in questi distretti è caratterizzato dall'aver numerose anastomosi artero/venose (AVA), cioè vasi che mettono in comunicazione, a livello precapillare, le arteriole con le venule. La parete delle AVA è costituita da tessuto muscolare liscio che come per gli sfinteri dei capillari è sotto il diretto controllo del sistema nervoso simpatico. Il loro lume varia tra i 10 e 50 μm ed hanno la capacità di obliterarsi, sotto il controllo simpatico, ostruendo quindi il passaggio del sangue. Il ruolo che gli AVA hanno nella vasomozione cutanea non è ancora ben definito, tuttavia si ritiene che negli organi termoregolarie al fine di disperdere calore si abbia una riduzione del tono muscolare di questi vasi con un conseguente maggiore afflusso di sangue a questi a discapito del letto capillare, invece la riduzione della dispersione termica è il risultato di una chiusura del flusso ematico nelle AVA. (Gordon, 1990). La vasomozione cutanea, che come

abbiamo detto rappresenta un potentissimo mezzo termoregolatorio in quanto assolve la duplice funzione termodispersiva e termo conservativa, inoltre essendo sotto il diretto controllo del sistema nervoso centrale (SNC) assolve il compito termoregolatorio in maniera fine e soprattutto rapida. La principale afferenza nervosa proveniente dal SNC che prende contatto con il sistema vasomotorio è il sistema nervoso autonomo simpatico.

1.10 SISTEMA NERVOSO AUTONOMO (SNA)

Il SNA è suddiviso dal punto di vista anatomico e funzionale in sistema nervoso simpatico e parasimpatico. Dal punto di vista funzionale, questi due sistemi prendono contatto con diversi organi nel corpo e contribuiscono bilanciandosi autonomamente al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo così come è stata in passato definita da Cannon. Le loro regolazioni sugli organi bersaglio avvengono grazie al rilascio di neurotrasmettitori che si legano a recettori specifici posti sugli stessi organi. I principali neurotrasmettitori rilasciati sono la noradrenalina per il SNA simpatico e l'acetilcolina per il SNA parasimpatico che si legano rispettivamente ai recettori adrenergici e colinergici. Dal punto di vista anatomico il SNA si differenzia principalmente per la posizione dei suoi gangli nervosi. Gli assoni dei motoneuroni o neuroni pregangliari (colinergici) del sistema parasimpatico originano dal midollo spinale a livello cervicale e sacrale e prendono contatto all'interno dei gangli nervosi, che sono posti direttamente nell'organo bersaglio, con i neuroni post gangliari colinergici mentre gli assoni dei motoneuroni o neuroni pregangliari simpatici (colinergici) emergono dal midollo spinale toracolombare a livello delle corna laterali e prendono contatto nei gangli, posti distanti dagli organi bersaglio, con i neuroni postgangliari adrenergici. Tutti gli organi sono innervati sia dal sistema simpatico sia dal parasimpatico, i quali contribuiscono all'attivazione o all'inibizione delle attività che loro compiono, ad eccezione delle ghiandole sudoripare, della

muscolatura liscia dei vasi ematici e del tessuto adiposo bruno che invece sono innervati soltanto dal SNA simpatico.

1.10.1 AFFERENZE AUTONOMICHE SIMPATICHE DIRETTE AL BAT

L'attivazione di tutti i depositi di tessuto adiposo bruno posizionati nell'organismo è garantita da una diretta connessione tra le sue cellule e una serie di neuroni pregangliari simpatici posizionati a vari livelli del midollo spinale: da lì il rilascio di noradrenalina ed il legame di questa a livello dei recettori β_3 determina un'attivazione di meccanismi a secondo messaggero che in ultima analisi innescano sia la produzione di calore che la sintesi di proteine UCP1 ed allo stesso tempo determinano il trofismo per questo tessuto. L'attivazione è altresì garantita da meccanismi endocrini come il rilascio di T3 e T4 dalla tiroide.

1.10.2 AFFERENZE AUTONOMICHE SIMPATICHE DIRETTE AI VASI

La muscolatura liscia a livello degli sfinteri precapillari e delle arteriole riceve afferenze dai neuroni adrenergici postgangliari. Questi attraverso il rilascio di noradrenalina, la quale si lega ai recettori adrenergici presenti sulle cellule muscolari dei vasi, determinano la contrazione muscolare e quindi la riduzione del flusso ematico, al contrario la riduzione del rilascio di noradrenalina determina invece l'apertura dei vasi e quindi l'aumento del flusso ematico. Quindi si evince che la vasocostrizione è un processo attivo mentre la vasodilatazione è sempre un processo passivo che dipende solo dalla sospensione dell'attività vasocostrittoria e non da un'attività nervosa inibitoria sulla muscolatura del vaso. Casi particolari sono rappresentati dalla dilatazione locale di alcuni distretti vascolari in seguito alla liberazione di monossido d'azoto (NO), o da specifiche fibre vasodilatatorie, identificate per alcuni particolari distretti, come la cute del palmo della mano

nell'uomo. Il soma dei neuroni postgangliari è accolto all'interno dei gangli della catena simpatica paravertebrale e riceve afferenze dai neuroni pregangliari colinergici. Il neurosoma di questi ultimi, detti secondo la nomenclatura attuale motoneuroni autonomici simpatici, è invece posizionato a livello della colonna intermedio laterale (IML) della sostanza grigia del midollo spinale.

1.10.3 *PREMOTONEURONI SIMPATICI*

I neuroni che sinaptano direttamente con i neuroni motori simpatici localizzati nell'IML, sono detti premotoneuroni. La principale caratteristica di questi neuroni è quella di essere il punto di convoglio di tutte le informazioni inibitorie ed eccitatorie che provengono da diversi nuclei cerebrali o da recettori periferici e che quindi si traducono in un'attivazione od inibizione dei processi che questi neuroni controllano (es. termogenesi e vasomozione). Questi neuroni possono essere di tipo inibitorio o eccitatorio in funzione del neurotrasmettitore che viene prodotto e rilasciato dalle sue sinapsi. Studi anatomici condotti mediante l'utilizzo di marcatori virali retrogradi (*pseudo-rabies virus*) hanno portato all'identificazione di nuclei ed aree nervose in cui sono accolti aggregati di premotoneuroni che assolvono la medesima funzione. Questa tecnica consiste nell'iniettare in tessuto o in un'area nervosa un virus retrogrado, cioè in grado di risalire gli assoni e trasferirsi transinapticamente da un neurone all'altro, e poi determinare il percorso che esso ha compiuto risalendo l'SNC e permettendo infine la visualizzazione delle aree nervose coinvolte nel controllo delle aree poste sotto esame. Questo approccio sperimentale ha permesso la localizzazione di diverse aree cerebrali contenenti premotoneuroni coinvolti nella termoregolazione e nella vasomozione cutanea, principalmente localizzate a livello del tronco encefalico: nel bulbo nel ponte e nelle aree ipotalamiche.

Per quanto concerne il controllo del sistema cardiocircolatorio e di conseguenza della vasomozione cutanea sono state localizzate nel ratto cinque specifiche aree contenenti premotoneuroni: il bulbo rostro-ventro mediale (RVMM), il bulbo rostro-ventro laterale (RVLM, figura 6), i neuroni A5

noradrenergici del ponte, il nuclei paraventricolare ipotalamico (PVN) e i neuroni orexigenici dell'ipotalamo laterale (LH). La maggior parte degli studi condotti sul sistema termogenetico si sono focalizzati sul ruolo regolatorio svolto dall'RVMM e dall'RVLM (Bamshad 1999, Cano 2003).

1.10.4 RVMM

Diverse evidenze sperimentali hanno fatto dell'RVMM il nodo di afferenza di tutti i segnali termoregolatori centrali. In particolare, studi anatomici condotti mediante l'iniezione di pseudorabies virus in organi specificatamente termoregolatori come: BAT (Cano et al., 2003), vasi ematici degli scambiatori termici (Blessing and Nalivaiko, 2001, Toth et al., 2006), cuore (Standish et al., 1995, Ter Horst et al., 1996) e muscolo (Kerman et al., 2006) sono tutti risultati in una marcatura a livello dell'RVMM. Si intende per RVMM un'area cerebrale sita sopra il tratto piramidale che comprende: il *raphe obscurus*, il *raphe magno*, il *raphe pallidus* ed il nucleo olivare inferiore. In questa area sono quindi contenuti i premotoneuroni autonomici simpatici diretti ai neuroni pregangliari, che controllano diversi effettori termoregolatori. Le principali funzioni svolte da questi neuroni sono: il controllo dell'attivazione del BAT, della vasomozione cutanea, della termogenesi da brivido attraverso l'attivazione delle fibre motorie alfa dirette ai muscoli e nel controllo della frequenza cardiaca. Questi neuroni sono ricchi di recettori per il glutammato, il GABA e la serotonina. Tuttavia sono presenti numerosi altri recettori tra i quali recettori per l'orexina, per l'istamina e per l' α MSH. Inoltre si è riscontrata la presenza di recettori EP3 localizzati sulle cellule serotoninergiche. Questi ultimi sono particolarmente abbondanti nella regione preottica ipotalamica e legano in maniera specifica il mediatore infiammatorio prostaglandina E2 (PGE2). Il legame di questo mediatore a livello ipotalamico determina il rialzo termico nella risposta di tipo febbrile come evidenziato da incrementi di temperatura in seguito ad iniezioni di PGE2 nella regione preottica (Stitt, 1973, Williams et al., 1977). Ad oggi non si conosce il significato funzionale dei recettori EP3 a livello del RVMM. L'iniezione di PGE2

in questo sito non ha determinato nessuna variazione apprezzabile delle variabili fisiologiche misurate: pressione arteriosa, frequenza cardiaca, temperatura corporea e vasomotone cutanea (Tanaka and McAllen, 2005). Si ipotizza che questi recettori svolgano funzioni legate alla sensazione dolorifica durante gli stati febbrili ed infiammatori. Svariati studi anatomici volti alla caratterizzazione dei neuroni del RVMM hanno riscontrato la presenza in essi del marcatore specifico dei neuroni glutamatergici: VGLUT3. La presenza di questo marcatore indica che questi neuroni sono di tipo glutamatergico ed inoltre lasciano supporre che le risposte termoregolatorie da essi mediate e dirette all'IML siano di tipo eccitatorio (McAllen et al., 1982, McAllen, 1986, Morrison, 1999, Nakamura et al., 2005). Tuttavia studi effettuati da Stornetta (Stornetta et al., 2005) hanno mostrato una maggiore complessità anatomica in quest'area. Infatti, è stato dimostrato che i premotoneuroni del RVMM diretti all'IML co-esprimono glutammato, GABA e serotonina. Questo studio inoltre, per la prima volta mostra un'afferenza dal RVMM all'IML di tipo inibitorio.

1.11 ATTUALE MODELLO DI CONTROLLO DELLA TERMOREGOLAZIONE

Al fine di mantenere la temperatura costante che oscilla tra valori di 37 e 37,5°C, in seguito a modificazioni sia ambientali che fisiologiche (aumento della temperatura corporea causata per esempio da esercizio fisico), l'organismo deve essere in grado di misurare sia le modificazioni termiche ambientali che quelle interne all'organismo per poi attuare risposte termoregolatorie mirate, al fine di ristabilire la giusta temperatura corporea. Il modello attuale di controllo della temperatura è riassunto nella figura 6. Si può dividere il circuito termoregolatorio in due componenti principali:

1. via termocettrice:
 - somatosensoriale
 - termoregolatoria

2. via termoeffettrice

La via termocettrice ha il compito di raccogliere le informazioni inerenti la temperatura corporea e quindi inviare tali informazioni ai centri termoregolatori superiori somatosensoriali o termoregolatori autonomici (area preottica ipotalamica (POA)). Tutte le informazioni termiche vengono raccolte dai recettori termici i quali sono in grado di percepire la temperatura per mezzo di proteine canale appartenenti alla famiglia delle transient receptor potential (TRP).

La localizzazione dei recettori termici è ubiquitaria, tuttavia si possono distinguere tre principali aree anatomiche maggiormente implicate nella raccolta delle informazioni termiche e sono: la cute, le viscere ed il cervello. La termoccezione a livello cutaneo è molto importante in quanto è la prima superficie in grado di comunicare le informazioni termiche provenienti dall'ambiente circostante ed è quindi in grado di dare inizio ad una serie di compensazioni termiche anticipatorie sia per gli stimoli caldi che per quelli freddi. Questo comportamento è stato messo in evidenza da studi effettuati nel ratto (Lomax et al., 1964) nel quale un'esposizione a basse temperature produceva una rapida diminuzione della temperatura della cute non seguita da una diminuzione della temperatura rettale, anzi si assisteva ad un leggero aumento di quest'ultima.

Anche per quanto concerne l'esposizione al caldo si ha una risposta di tipo anticipatoria guidata dalle afferenze cutanee (Nakamura and Morrison, 2010). Le informazioni termiche ricevute dai termocettori cutanei vengono convogliate attraverso fibre somatosensoriali nelle corna dorsali spinali ai neuroni della lamina I e da qui questi raggiungono, attraverso il tratto spino-talamo-corticale, la corteccia primaria somatosensoriale determinando quindi la sensazione termica (Craig, 2002).

Le stesse informazioni termiche percepite a livello cutaneo vengono, contemporaneamente trasmesse attraverso una via glutammatergica al nucleo laterale parabrachiale mesencefalico (LPBel) e da questi alla POA, considerato il più alto centro integratore termoregolatorio, attraverso una proiezione glutammatergica diretta in particolare all'area mediana della preottica (MnPO).

Questa rappresenta un centro di regolazione di svariate funzioni omeostatiche, che includono la spesa energetica, l'osmolarità e il tono cardiovascolare così come il controllo della temperatura corporea (Morrison et al., 2008). Molti recettori termici per il caldo e per il freddo sono presenti anche nei visceri e le loro fibre afferenti corrono all'interno del nervo vago e splancnico. Attualmente poco si conosce riguardo a come queste informazioni raggiungano la POA. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato che molti stimoli provenienti dai visceri come temperatura, sazietà, tensione gastrica, sete, gusto, e pressione arteriosa vengono trasferiti al LPB nella sua regione dorsale e caudale attraverso il NTS (Saper, 2002). E possibile quindi ipotizzare che il LPB sia il sito di integrazione degli stimoli termici somatici con le svariate informazioni viscerali che infine afferiscono nella POA (Morrison and Nakamura, 2010). Per quanto concerne la sensibilità termica nell'encefalo, sono stati descritti molte popolazioni neuronali in grado di generare potenziali d'azione in risposta a stimoli termici. Tra queste popolazioni, la più studiata è localizzata nella POA a livello ipotalamico.

Studi elettrofisiologici per primi condotti da Nakayama (Nakayama et al., 1963), hanno mostrato l'esistenza di neuroni in quest'area che risultavano essere attivi durante l'esposizione dell'animale in un ambiente termoneutrale e che aumentavano la loro scarica in risposta ad un riscaldamento locale. Questi neuroni vengono chiamati neuroni sensibili al caldo (WSN) e sono localizzati nell'area prottica mediale (MPO). Essi sono in grado di integrare tutte le informazioni termiche provenienti dalla periferia con quelle raccolte in loco e quindi generare di conseguenza delle risposte termoregatorie. Da qui prende origine quella che può essere definita la via termoeffettrice. I WSN ricevono per mezzo della MnPO due principali afferenze dalla cute un'eccitatoria che proviene dalle vie attivate da stimoli caldi che quindi contribuisce all'attivazione di questi neuroni e l'altra inibitoria che invece proviene dalle vie attivate da stimoli freddi (Nakamura and Morrison, 2010). A sua volta la funzione del MPO è quella di inibire le regioni caudali del cervello, come l'ipotalamo dorso mediale (DMH) e il RVMM incluso il nucleo del Raphe Pallidus, responsabili dell'attivazione delle risposte termogenetiche. Tutte le risposte termoregatorie dipenderanno quindi

dall'attività svolte dai neuroni WSN o del DMH sui premotoneuroni a livello delle RVMM. Questi infine hanno proiezioni eccitatorie sui neuroni pregangliari della IML i quali, attraverso l'attivazione dei neuroni postgangliari determinano in ultima analisi l'attivazione degli effettori termici, determinando l'attivazione o la sospensione delle attività termogenetiche o termodispersive (figura 6).

Numerosi studi suggeriscono con che i neuroni simpatici pregangliari localizzati nell'IML, che sono deputati all'attivazione delle fibre autonome dirette alla muscolatura liscia dei vasi cutanei, siano sotto l'influenza eccitatoria glutammatergica di premotoneuroni simpatici localizzati nel RVMM. Lo dimostra, come precedentemente descritto, la presenza di marcatori per il glutammato VGLU3 espresso nei premotoneuroni del RVMM come anche molti dati sperimentali condotti per mezzo di stimolazioni elettriche o chimiche dei premotoneuroni stessi.

Il RVMM è un'area fondamentale nel controllo dei processi termoregolatori. L'inibizione del RVMM nel ratto libero di muoversi e mantenuto a temperatura ambiente, ha provocato una lieve ipotermia dovuta all'incremento della dissipazione del calore cutaneo e da una riduzione del calore prodotto dal BAT (Cerri et al., 2010). Inoltre, essendo la riduzione della temperatura corporea la diretta conseguenza dell'inibizione del RVMM risultante in una sospensione delle attività termoregolarie a carico degli organi termoeffettori, si può affermare ancora una volta, per quanto concerne i processi termoregolatori, che quest'area invii proiezioni eccitatorie all'IML.

2. SCOPO

Gli scopi di questa tesi sono:

1. Verificare la possibilità di indurre uno stato reversibile di pseudo-torpore in un animale che non entra spontaneamente in stati ipotermico-ipometabolici, mediante una manipolazione del circuito responsabile del controllo della termoregolazione.
2. Analizzare la dinamica di recupero dallo pseudo-torpore, sia riguardo agli effetti vegetativi che si osservano durante il ritorno alla normotermia, sia riguardo gli effetti sull'omeostasi ipnica.

In particolare il punto 1 è di particolare importanza nell'ottica di possibili sviluppi medico-terapeutici di un metodo di induzione di uno stato ipotermico-ipometabolico. Tutti gli studi effettuati finora si concentrano su animali in grado di entrare spontaneamente in uno stato di torpore; inoltre suddetti studi utilizzano farmaci che vanno ad interferire con il metabolismo cellulare per indurre modificazioni a livello sistemico. In questa tesi l'approccio è l'opposto: si tenta di interferire a livello sistemico sulla temperatura corporea per indurre una riduzione del metabolismo.

L'interesse sul punto due è invece più mirato a questioni di tipo ipnico: la validazione di un modello di pseudo-torpore nel ratto consentirebbe di disporre di uno strumento del tutto nuovo per lo studio delle dinamiche legate all'omeostasi del sonno, ed in particolare del significato biologico del fenomeno del recupero del Delta; l'attuale modello dell'omeostasi sinaptica utilizzato per spiegarle è ancora lacunoso per quanto riguarda taluni aspetti e non spiega il comportamento ipnico degli animali emersi da stadi ipometabolici.

3. MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati complessivamente 21 ratti albini adulti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River) di peso compreso tra i 250g e i 300g al momento dell'acquisto.

Al loro arrivo gli animali sono stati stabulati in coppia in apposite gabbie in plexiglas (Techniplast) contenenti lettieri depolverate ed hanno trascorso una settimana di adattamento alle normali condizioni di laboratorio: libero accesso a cibo e acqua, temperatura ambiente termoneutrale di $24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con un ciclo luce-buio di 12 h:12 h (accensione luce 9:00 di mattina, 100 lux di intensità luminosa a livello della gabbia). Tutte le mattine all'accensione della luce un operatore ha provveduto al cambio delle lettieri ed al rifornimento di acqua e cibo.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con la Direttiva dell'Unione Europea (86/609/EEC) e sotto la supervisione del Servizio Veterinario Centrale dell'Università di Bologna e del National Health Authority.

3.1 INTERVENTO CHIRURGICO

3.1.1 PREPARAZIONE ELETTRODI

Prima di ogni sessione chirurgica sono stati costruiti gli elettrodi e i trasduttori che venivano impiantati per la registrazione dell'elettroencefalogramma (EEG), dell'elettromiogramma nucale (nuECG) e della temperatura ipotalamica (Thy).

Per la registrazione dell'EEG sono stati usati dei connettori con quattro pin. Su due pin del connettore sono stati fissati attraverso una saldatrice a stagno due cavi in rame della lunghezza di 2 cm e del diametro di 0.3 mm rivestiti da una pellicola isolante. L'estremità libera di questi cavi è stata opportunamente sverniciata per 1 mm ed inserita all'interno della teca cranica per la registrazione dell'EEG. Al fine di evitare penetrazioni troppo profonde che potessero

danneggiare la dura madre durante la sessione chirurgica, sono stati fatti due nodi all'estremità dei cavi con funzione di fermo.

Gli elettrodi EMG sono stati costruiti da coppie di cavi di acciaio inox, (mod. AS 632, Cooner Wire Inc., Chatsworth (CA), USA) rivestiti da una guaina isolante di polietilene, della lunghezza di 15cm (diEMG) o 8cm (nuEMG), ai quali sono stati rimossi 3mm di guaina isolante alle estremità, e 2mm di guaina a metà lunghezza del cavo.

3.1.2 TERMISTORI

Per la misura della temperatura ipotalamica (Thy) sono stati usati dei termistori inglobati in goccia di vetro (NTC Thermometrix) del diametro di 0.3mm. I termistori sono stati inseriti nella punta di un ago 21 G e connesso ad una spinetta a due pin posta nel collo di connessione dell'ago; il tutto è stato isolato con diversi strati di vernice per elettrodi.

Nella giornata precedente l'impianto i termistori erano sottoposti ad un procedimento di taratura durante il quale veniva valutata la costanza delle caratteristiche fisiche del trasduttore e si procedeva alla calibrazione lineare dello stesso. Per fare questo, il termistore è stato immerso in un ampio recipiente d'acqua (bagnetto termico) portata alla temperatura di 39° C, misurata grazie ad un termometro a mercurio (scala 34° C-42°C), e connesso all'amplificatore in corrente continua che sarebbe stato usato nelle giornate successive per acquisire l'animale.

Per valutare la costanza nel tempo delle caratteristiche fisiche del termistore, si è lasciata raffreddare spontaneamente la massa d'acqua che, essendo di elevato volume, ha permesso un calo lento e regolare della temperatura e, quindi, l'effettuazione di misure regolari delle variazioni di impedenza che il termistore subiva alle diverse temperature raggiunte. Per confrontare il funzionamento del termistore a tempi diversi di utilizzazione, l'impedenza è stata misurata a tre temperature: 38.5 °C, a 37.5°C e a 36.5°C.

3.1.3 CHIRURGIA

Dopo una settimana di adattamento alle condizioni di laboratorio gli animali sono stati sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale (preanestetizzati: Diazepam, Valium Roche, 5 mg/Kg intramuscolo anestetizzati Ketamina-HCl, Parke-Davis, 100 mg/Kg intraperitoneale.) per l'impianto degli apparati di registrazione delle variabili fisiologiche.

Dopo aver constatato attraverso piccoli stimoli dolorifici a livello degli arti e delle vibrisse l'avvenuto addormentamento dell'animale si è proceduto alla tricotomia del cranio, della zona toracica corrispondente al processo xifoideo e della zona addominale lungo la linea che si forma tra i muscoli addominali e la zampa posteriore.

Tutte le aree tricotomizzate sono state disinfettare con Betadine per uso chirurgico al fine di evitare contaminazioni batteriche durante le operazioni a cute aperta.

Nella zona addominale, lungo il seno che si forma tra la parete addominale e la zampa posteriore è stato praticato un taglio di circa 2 cm (figura 7) della cute e del sottocute per esporre l'arteria femorale la quale è stata scollata dal tessuto connettivo circostante alla vena femorale che corre adesa ad essa. Quindi attraverso delle forbici vascolari è stato praticato un foro nell'arteria nel quale è stato inserito il catetere della pressione arteriosa (PA) fino a risalire nell'aorta addominale. In fine il microtrasmettitore telemetrico collegato al catetere è stato alloggiato e fissato sottocute nella parete addominale.

Prima dell'operazione di cateterizzazione il catetere è stato opportunamente sterilizzato ponendolo per circa dieci minuti in una soluzione sterilizzante (NU-CIDEX NCX010, Johnson & Johnson).

Per l'impianto degli elettrodi per la registrazione del diEMG sono stati praticati due tagli, uno toracico a livello del processo xifoideo (figura 7), l'altro a livello del cranio; il processo xifoideo è stato poi afferrato con una pinza e ripiegato all'insù in modo da esporre il sottostante diaframma: lì mediante un ago da sutura i fili degli elettrodi sono stati inseriti nel muscolo e fatti scorrere fino a

portare la parte centrale, priva di guaina, a contatto diretto col diaframma. A questo punto per mezzo di un passacavi i fili degli elettrodi sono stati fatti passare sottocute a dalla zona toracica fino al cranio, dove le due estremità di ciascuno dei due fili sono state riunite e collegate ad un connettore femmina a due pin mediante saldatura a stagno.

Il taglio effettuato a livello del cranio (figura 8) è stato utilizzato anche per accedere ai muscoli nucali, attraverso i quali, mediante un ago da sutura, sono stati inseriti nel muscolo e fatti scorrere fino a portare la parte centrale, priva di guaina, a contatto diretto col tessuto muscolare.

L'animale è stato quindi posto su un apparecchio stereotassico (barrette ferma muso 3,8mm) e dopo aver rimosso il periostio sono stati praticati nel seguente ordine: quattro fori (diametro 0.5mm) alla periferia del campo operatorio che sono serviti per l'alloggiamento delle viti di ancoraggio del castelletto, un foro (diametro 0.5) adiacente al bregma per l'inserimento del termistore ipotalamico, due fori (diametro 0.3mm) uno sull'osso frontale (-3mm Antero Posteriore (AP) 2mm Latero Laterale (LL) dal bregma) ed uno sull'osso parietale (4mm AP, 2mm LL dal bregma) per l'inserimento di due elettrodi volti alla determinazione dell'EEG e un foro sull'osso occipitale per l'impianto di una cannula guida per microiniezioni nel RVMM. La cannula è stata posta tra 3.3 mm AP 0mm LL 9.5 DV (fig.8).

Per verificare il corretto posizionamento della cannula nel RVMM è stato effettuato un test intraoperatorio che è consistito nell'osservare le variazioni di temperatura della coda, mediante termocamera ad infrarosso, in seguito all'iniezione di 100 nl di muscimolo 1mM nel RVMM. La prova veniva considerata positiva quando entro 5 minuti dall'iniezione si osservava un aumento della temperatura della coda. In caso di esito negativo si ripeteva il test a coordinate DV LL differenti. Invece l'animale veniva escluso dal piano sperimentale nel caso di duplice negatività del test a coordinate DV LL differenti. Tutti i connettori sono stati infine fissati sul cranio con una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal a freddo).

Al termine delle procedure chirurgiche si è proceduto alla disinfezione delle ferite addominali con betadine (Betadine 10% gel Meda Pharma Milano) per uso chirurgico, alla somministrazione intramuscolare di antibiotico ad ampio spettro (108000 U.I. di Benzilpennicillina; 2.4 mg di Neobicina) per prevenire eventuali infezioni post operatorie e alla somministrazione sottocutanea di 5ml di soluzione fisiologica allo scopo di reidratare l'animale. Infine l'animale è stato tenuto sotto osservazione fino alla comparsa dei primi segni di ripresa dall'anestesia generale e quindi è stato posto nello stabulario per una settimana consentendogli di recuperare dall'intervento chirurgico. Un giorno prima della sessione sperimentale ogni animale è stato posto nel box di registrazione e connesso ai cavi per la registrazione delle variabili fisiologiche al fine di consentirne l'adattamento alle condizioni sperimentali.

3.2 APPARATO DI REGISTRAZIONE

3.2.1 BOX DI REGISTRAZIONE

La gabbia contenente l'animale è posta all'interno di un congelatore a pozzetto che è stato modificato in modo da poterne controllare in maniera fine la temperatura. Questo controllo avviene per mezzo di un termostato che è connesso al compressore del congelatore ed a una stufetta posta all'interno di quest'ultimo.

Quando la temperatura devia da quella settata dall'operatore il termostato attiva il compressore o la stufetta (Vortice Microsol 600) per correggere la variazione di temperatura. Il box è inoltre dotato di un impianto: di aerazione, di illuminazione per mezzo di fibre ottiche (100 lux a livello della gabbia), telemetrico per la registrazione della pressione arteriosa dell'animale, video che permette lo studio comportamentale dell'animale, termografico per il monitoraggio della temperatura cutanea dell'animale e di cavi di connessione per la registrazione delle variabili fisiologiche. Le luci presenti all'interno del box di registrazione sono state tenute spente per tutta la durata dell'esperimento.

3.2.2 POSTAZIONI DI REGISTRAZIONE

La postazione di registrazione consiste in una gabbia metabolica in plexiglass che possiede come fondo una rete metallica a maglia larga la quale consente la registrazione delle immagini all'infrarosso. Tali immagini sono state registrate per mezzo di una termocamera (FLIR A20) che è stata posta sotto la gabbia (figura 9) in modo da poter registrare agevolmente la temperatura cutanea dell'animale ed in particolar modo la temperature di coda e zampe che sono considerati organi scambiatori termici. L'uso di questa tecnologia ha permesso uno studio non invasivo della vasomozione cutanea. La gabbia possiede inoltre un braccio oscillante dotato di contatto rotante al quale vengono collegati i cavi di registrazione delle variabili fisiologiche connessi all'animale.

3.2.3 AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEL SEGNALE

Tutti i segnali bioelettrici registrati dall'animale sono stati amplificati (Grass mod. 7P511L, Astro-Med, West Warwick (RI), USA) e filtrati, rispettivamente per il filtro passa alto e passa basso, con i seguenti valori per ciascuna variabile: EEG 0.3 Hz / 30 Hz, nuEMG 10 Hz / 3000 Hz, diEMG 100 Hz / 1000 Hz e Thy 0.5 Hz.

In seguito tutti i segnali hanno subito una conversione analogico-digitale a 12 bit (CED Micro MK 1401 II) per essere immagazzinati su un supporto informatico (PC ASUS) con frequenza di campionamento di 500Hz per l'EEG, di 1KHz per il nuEMG e di 50 Hz per Thy.

Il segnale elettroencefalografico è stato sottoposto ad un'analisi spettrale mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier (FFT) su finestre mobili (1 secondo) di 4 secondi al fine di ottenere i valori di densità di potenza per le bande Delta (0.75-4 Hz) Theta (5.5-9 Hz) e Sigma (11-16 Hz).

Il segnale della PA è stato registrato telemetricamente, amplificato (DSI Phytotel PA-C40, DataSciences) ed incorporato digitalmente su un PC con una frequenza di acquisizione di 500 Hz.

Le immagini della termocamera sono state acquisite mediante supporto digitale con una frequenza di 1frame/2s. L'analisi della temperatura cutanea di coda e zampe è stata ottenuta mediante il software ThermaCAM Researcher Pro (FLIR Systems AB, SE). L'analisi delle temperature si riferisce al valore più alto all'interno di una superficie presa in esame. Per l'analisi delle temperature della coda è stata scelta la zona mediale di quest'ultima in seguito a test eseguiti nell'animale in anestesia.

Lo stato ipnico degli animali è stato valutato visivamente da un operatore, con una risoluzione di 4 secondi, basandosi sulle registrazioni di EEG, nuEMG e Thy.

3.3 DISEGNO SPERIMENTALE

Gli animali sono stati fatti adattare nel box di registrazione alle condizioni sperimentali (T_a $15^{\circ}\pm 1C$, dieta Mucedola D12492: 35% lipidi, ciclo luce buio 0h:24h) per tre giorni.

Gli animali sono stati registrati per 3 giorni, a partire dalle ore 9:00 del terzo giorno di adattamento (giorno di controllo, B); il giorno successivo (giorno di iniezione, I) alle ore 10:30 è stata inserita la micro cannula per l'iniezione del farmaco. Dopo 30' dall'inserimento della micro cannula, necessari per far ritornare l'animale alle condizioni fisiologiche normali, è stata eseguita la prima iniezione. In totale sono state eseguite 6 iniezioni, al ritmo di un'iniezione l'ora per 6 ore consecutive.

Alle ore 17:00, quindi un'ora dopo l'ultima iniezione, la temperatura del box di registrazione è stata alzata a $28^{\circ}C$, e lasciata così per il resto dell'esperimento.

Nell'esperimento B questo protocollo è stato leggermente modificato: alle ore 17:00 del giorni I la Ta è stata impostata a 37°C per 60' (dalle 17:00 alle 18:00) e successivamente abbassata a 28°C, temperatura che è stata poi mantenuta per il resto dell'esperimento.

Il giorno successivo l'animale è stato registrato per il terzo ed ultimo giorno (giorno di recupero, R), a partire dalle ore 9:00 fino alle ore 9:00 del giorno successivo.

3.4 MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI

Le microiniezioni nei ratti liberi di muoversi sono state eseguite mediante un apparato di iniezione messo a punto nel nostro laboratorio (figura 9). Un tubo di teflon della lunghezza di un metro e con un diametro costante per tutta la lunghezza (D.I. 0.2mm, FEP-Tubing 4001005 10X1m Microbiotech/se AB) veniva riempito, mediante una siringa Hamilton, con la sostanza da iniettare e con un colorante idrofobico, in modo che si formasse un'interfaccia colore-sostanza che permettesse la visualizzazione del movimento del liquido nel tubo durante le procedure di iniezione. Per mezzo di connettori a tenuta stagna si è connesso il tubo ad un'estremità con una siringa Hamilton da 5µL e dall'altra con la cannula per microiniezioni. La siringa veniva posta su una pompa per microiniezioni (Harvard Apparatus) ed il tubo ad essa collegata veniva posizionato su un centimetro posto sotto un microscopio stereoscopico. Durante la procedura di iniezione, un operatore visualizzando, mediante il microscopio, il movimento dell'interfaccia colore-sostanza sul centimetro, poteva calcolare, conoscendo il diametro del tubo, la quantità di sostanza iniettata.

3.5 ISTOLOGIA

Alla fine di ogni sessione sperimentale ogni animale è stato marcato, mediante l'iniezione intracerebrale di 50nl di colorante (Fast Green, 2%), per poter determinare istologicamente il sito delle iniezioni.

Successivamente gli animali sono stati sottoposti ad anestesia generale e quindi perfusi per via transcardiaca con 400 ml di PBS 4% a pH 7.4 e 400 ml di paraformaldeide 4%. I cervelli sono stati estratti dall'animale, postfissati in paraformaldeide 4% per cinque giorni e crioprotetti in saccarosio (soluzione satura) per due giorni. Infine per mezzo di un criostato si è proceduto al taglio di sezioni coronali del bulbo per rintracciare il sito di iniezione del colorante. Le sezioni che sono risultate essere marcate, sono state poste su un vetrino e fotografate (figura 25).

3.6 PIANO SPERIMENTALE

Il piano sperimentale prevede due protocolli sperimentali (A e B) volti a testare: A) se l'inibizione prolungata del RVMM può causare uno stato assimilabile al torpore; B) se l'attivazione del simpatico necessaria all'animale per tornare ad uno stato di normotermia può influenzare le dinamiche del recupero dall'ipotermia.

3.6.1 ESPERIMENTO A

Due diversi gruppi di animali (gruppo A e gruppo C, n=7 per ciascun gruppo) sono stati ripetutamente sottoposti a ripetute iniezioni (100nl ciascuna) di: agonista GABA_A muscimolo (gruppo A), soluzione salina isotonica (gruppo C, di controllo).

3.6.2 ESPERIMENTO B

Un secondo gruppo di animali (gruppo B, n=7) è stato sottoposto allo stesso protocollo sperimentale previsto dall'esperimento A, ma alle ore 17:00 del giorno di iniezione la temperatura del box è stata alzata a 37°C anziché a 28°C come precedentemente descritto (vedi cap. Disegno sperimentale). Dopo 60 minuti in seguito al ritorno della Thy a livelli fisiologici, la Ta è stata riportata a 28°C.

3.7 ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sono rappresentati come valore medio, calcolato su una finestra di tempo di 30', dei valori di tutti gli animali di ciascun gruppo; fanno eccezione i dati riguardanti il Theta durante il sonno REM, il cui valore medio è calcolato su una finestra di 60'.

Tutte i valori sono riportati come media \pm errore standard.

L'analisi statistica è stata elaborata usando SPSS 9.0. E' stata usato un test ANOVA a due vie per misure ripetute.

I confronti post-hoc sono stati fatti per mezzo di un t-test modificato secondo il metodo "Bonferroni Sequenziale" (Holm, 1979). I confronti sono stati ritenuti positivi per valori di $p < 0.05$.

4. RISULTATI

Un esempio degli effetti di ripetute iniezioni di muscimolo nel RVMM di un singolo animale è riportato in figura 7, che mostra l'andamento di Thy, PAM, FC, EEG e spettrogramma dell'EEG, durante le prime 13 ore del giorno di iniezione di muscimolo.

Si può osservare come a seguito dell'iniezione di muscimolo si verifici una vasodilatazione di zampe e coda, una riduzione di FC e di Thy che portano l'animale, alla fine delle 6 ore di iniezione, ad una temperatura superficiale prossima a quella ambientale.

4.1 ASPETTI TERMICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM

4.1.1 TEMPERATURA IPOTALAMICA

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipoteremia

A partire dall'inizio del trattamento si osserva un calo costante della temperatura ipotalamica (significativo rispetto il gruppo di controllo, $P < 0,05$ 11:00-11:30; $P < 0,01$ dalle 11:30 alle 17:00; figura 12). La Thy da un valore medio di $36,87 \pm 0,19$ °C calcolato un'ora prima dell'inizio delle iniezioni, arriva ad un minimo di $22,44 \pm 0,44$ °C. In totale, in 6h di trattamento, si verifica un calo nella temperatura corporea media di $14,43$ °C.

Il gruppo di controllo, in seguito alle iniezioni di soluzione salina nel RVMM, non presenta ipoteremia: la Thy infatti non scende mai al di sotto dei 36 °C.

Fase di riscaldamento

Alle 17:00 del giorno di iniezione (I) gli effetti delle iniezioni di muscimolo stanno terminando e la Thy è al Nadir ($22,44 \pm 0,44$ °C). In quel momento il termostato del box di registrazione viene impostato sulla temperatura di 28°C. La Ta quindi aumenta passando da 15 ± 1 °C a 28 ± 1 °C nel giro di 45'.

In seguito all'incremento della Ta e alla fine del trattamento con muscimolo, si verifica un'inversione nell'andamento della Thy negli animali del gruppo A, che aumenta rapidamente ($+4,03$ °C/h $\pm 0,33$ °C) fino a raggiungere una temperatura prossima ai 36°C in 3h.

Durante le prime fasi del periodo di riscaldamento, la Thy degli animali del gruppo A differisce significativamente ($P < 0,01$ dalle 17:00 alle 19:30; figura 12) da quella degli animali del gruppo di controllo.

In seguito la Thy rimane entro valori fisiologici per il restante periodo sperimentale.

Giorno di recupero

Nel giorno di recupero (R), gli animali di entrambi i gruppi, gruppo A e gruppo di controllo, sono esposti ad una Ta di 28°C e la Thy media di entrambi i gruppi si è attestata su livelli fisiologici.

Non si rilevano differenze significative tra le Thy medie (calcolate sulle 12h della fase di riposo e sulle 12h della fase attiva) dei due gruppi. Per contro animali del gruppo A presentano una Thy media giornaliera leggermente ($P < 0,05$) più bassa rispetto a quella registrata il giorno B.

In definitiva al termine del trattamento con muscimolo gli animali del gruppo A vedono la loro Thy media abbassarsi un poco rispetto al primo giorno di registrazione.

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Ad eccezione di 60 minuti tra le 17:00 e le 18:00 del giorno I, in cui la T_a del box di registrazione viene portata a 37°C anziché a 28°, il protocollo sperimentale utilizzato nell'esperimento B non si discosta da quello dell'esperimento A (figura 12).

Come visto nell'esperimento A, a partire dalla prima iniezione si verifica un calo significativo ($P < 0,05$, 11:00-17:00) nella Thy che alla fine del trattamento raggiunge il Nadir ($22,8 \pm 0,8^\circ\text{C}$). La Thy degli animali del gruppo B nelle prime fasi del trattamento (dalle 11:30 alle 14:00) scende in maniera significativamente ($P < 0,01$) più veloce rispetto quella del gruppo A.

Fase di riscaldamento

In seguito all'esposizione alla T_a di 37°C, la Thy aumenta in modo tale che già dopo 30' non è più significativamente ($P < 0,01$) diversa da quella del gruppo di controllo e in 60' per ritorna a livelli fisiologici ($36,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$). Gli animali del gruppo B raggiungono la normotermia significativamente prima rispetto a quelli del gruppo A ($P < 0,01$ dalle 17:00 alle 20:30 e $P < 0,05$ nei successivi 30').

Giorno di recupero

Nel giorno di recupero (R), anche gli animali del gruppo B sono esposti ad una T_a di 28°C e la loro Thy media si è oramai attestata su livelli fisiologici.

Nel giorno R l'andamento circadiano della Thy negli animali del gruppo B sembra essersi attenuato in quanto non si nota più una differenza significativa tra la Thy registrata nella fase di riposo e in quella attiva; questo probabilmente è dovuto ad una Thy media durante la fase di riposo un poco più alta (significativa

per $P < 0,01$ rispetto il gruppo di controllo). Nel complesso però la Thy degli animali di questo gruppo non mostra differenze significative se confrontata con il rispettivo giorno B o con quella degli animali del gruppo A.

4.1.2 TEMPERATURA DELLA CODA

Fase di induzione dell'ipotermia

A causa delle temperature relativamente basse (15°C) in cui sono registrati gli animali, le code risultano vaso costrette per tutto il tempo (figura 10).

Nei minuti immediatamente successivi all'inibizione del RVMM si verifica una marcata vasodilatazione della coda (figure 10 e 11); questo fenomeno avviene senza sostanziali differenze sia negli animali del gruppo A che in quelli del gruppo B, mentre non si verifica negli animali del gruppo di controllo. A causa della vasodilatazione, la temperatura media della coda aumenta da $22,8 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ a $29,2 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ nel giro di 30', per poi diminuire progressivamente fino a $18,7 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ alla fine del trattamento.

Fase di riscaldamento

Il flusso d'aria calda necessario per riscaldare il box di registrazione a 28°C (o a 37°C per gli animali del gruppo B), ha portato ad un effetto di saturazione nelle registrazioni effettuate con la termocamera ad infrarossi, impedendo di fatto una efficace analisi della temperatura cutanea degli animali.

4.1.3 INDICE DI PERDITA DI CALORE

L'indice di perdita di calore (IPC) (figura 11), calcolato secondo questa formula: $(T_{\text{coda}} - T_a) / (T_{\text{thy}} - T_a)$ (Romanovsky and Blatteis, 1996), mostra forte incremento (da $0,38 \pm 0,07$ a $0,73 \pm 0,09$) in concomitanza con la prima iniezione (e

quindi l'inizio della vasodilatazione); in seguito, nonostante il generale raffreddamento dell'animale, l'IPC rimarrà comunque per tutta la durata del trattamento con muscimolo a livelli superiori a quelli precedenti le iniezioni, evidenziando il ruolo della coda nell'abbassamento della temperatura corporea.

4.2 ASPETTI CARDIOVASCOLARI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM

4.2.1 *PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA*

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il primo giorno di registrazione (B) la pressione arteriosa media (MAP) degli animali di entrambi i gruppi, di controllo e trattato, si attesta sui seguenti valori: $107,8 \pm 2,7$ mmHg e $106,0 \pm 2,3$ mmHg durante la fase di riposo e $108,8 \pm 2,3$ mmHg e $106,3 \pm 2,3$ mmHg durante la fase attiva, rispettivamente per i gruppi controllo e trattato (figura 14).

Nel giorno di iniezione (I) la PAM di entrambi i gruppi si mantiene su quei livelli fino all'inizio del trattamento (salina o muscimolo a seconda dei gruppi). A partire dalle ore 11:00 e per tutte le sei ore di iniezione con salina, la MAP negli animali del gruppo di controllo non si discosta da quella registrata nelle stesse ore del giorno precedente.

Gli animali del gruppo A nelle ultime ore di trattamento mostrano una tendenza al calo della PAM (Figura 14), che comunque non mostra variazioni significative rispetto a quanto registrato negli animali del gruppo di controllo.

Fase di riscaldamento

A seguito dell'innalzamento da $15 \pm 1^\circ\text{C}$ a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ della T_a del box di registrazione si verifica una diminuzione della PAM dei ratti del gruppo di controllo, che da un valore medio, registrato a partire dalle 9:00, di 104.6 ± 0.8 mmHg, diminuisce fino a stabilizzarsi attorno al valore di 92.6 ± 0.9 mmHg.

Gli animali del gruppo A al termine del trattamento hanno una PAM di 93.3 ± 5.2 mmHG, ma a seguito del riscaldamento questa mostra un incremento significativo ($P < 0,01$ dalle 17:30 alle 20:00, rispetto al gruppo di controllo) che la porta ad un picco di 116.1 ± 2.4 mmHg alle ore 19:30; in seguito la PAM diminuisce fino a stabilizzarsi durante il resto della notte su un valore medio di $95,7 \pm 0.6$ mmHg.

Giorno di recupero

La variazione di T_a da 15°C a 28°C comporta per gli animali di entrambi i gruppi una significativa modificazione della PAM nel giorno R rispetto al giorno B ($P < 0,01$), a causa del progressivo adattamento alle nuove condizioni ambientali.

I valori della PAM degli animali del gruppo A registrati durante le fasi di riposo ed attiva dei giorni B (rispettivamente $106 \pm 2,3$ mmHg e $106,3 \pm 2,3$ mmHg) ed R (rispettivamente 92.1 ± 2.6 mmHg e 92.8 ± 1.9 mmHg), non si discostano mai significativamente da quelli degli animali del gruppo di controllo; gli effetti del trattamento con muscimolo non hanno comportato variazioni della PAM durante il giorno I né tantomeno ne hanno influenzato i valori nel giorno seguente.

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Per tutto il periodo che va dalle ore 9:00 alle 17:00 del giorno I, i valori di PAM registrati negli animali del gruppo B non si discostano significativamente da quelli registrati nel gruppo A o nel gruppo di controllo. Nonostante questo, si può notare una lieve tendenza alla diminuzione della PAM, che alle 17:00 raggiunge un Nadir di $102,8 \pm 5,3$ mmHg (Figura 14).

Fase di riscaldamento

Rispetto a quanto visto nel gruppo A, si può osservare come la PAM aumenti più velocemente, differenziandosi fin da subito in maniera significativa dai valori registrati negli animali del gruppo A ($P < 0,01$ tra le 17:00 e le 18:00 e tra le 19:30 e le 20:00, $P < 0,05$ tra le 18:00 e le 18:30 e tra le 19:00 e le 19:30 per la PAM) fino a raggiungere un picco $128,8 \pm 4,2$ mmHg 60' dopo l'inizio della fase di riscaldamento.

Nel periodo immediatamente successivo all'inizio del riscaldamento i valori della PAM registrati negli animali del gruppo B si discostano significativamente ($P < 0,01$ dalle 17:00 alle 19:30 e per $P < 0,05$ dalle 19:30 alle 20:30) da quelli registrati negli animali del gruppo di controllo; ma una leggera tendenza all'ipertensione si registra per tutto il resto della notte e in taluni momenti questo divario diviene significativo sia nei confronti degli animali del gruppo A ($P < 0,05$ dalle 00:00 alle 04:30 e dalle 07:00 alle 08:30) che degli animali del gruppo di controllo ($P < 0,01$ negli intervalli tra: 01:30-02:00, 03:00-03:30, 05:00-05:30 e 07:30-08:30; Figura 14).

Giorno di recupero

A causa dell'adattamento della PAM alla nuova T_a non è corretto confrontare i valori di questo parametro nel giorno R con quelli registrati nel giorno B; comunque nel giorno R i valori della PAM si attestano sui $100,6 \pm 2$ mmHg durante la fase di riposo e $101,7 \pm 2$ mmHg durante la fase attiva; questi valori sono significativamente più alti ($P < 0,01$) sia da quelli del gruppo A che da

quelli del gruppo di controllo; è da notare come la PAM fosse comunque significativamente ($P<0,01$) più alta, anche se in misura minore, in questo gruppo rispetto agli altri anche durante il giorno B.

4.2.2 FREQUENZA CARDIACA

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il primo giorno di registrazione (B) la frequenza cardiaca media (FC) degli animali di entrambi i gruppi, di controllo e trattato, oscillano seguendo un normale andamento circadiano (457 ± 11 bpm e 469 ± 10 bpm durante la fase di riposo e 480 ± 5 bpm e 482 ± 8 bpm durante la fase attiva, rispettivamente per i gruppi controllo e A, figura 13).

Nel giorno di iniezione (I) la FC media di entrambi i gruppi si è mantenuta su quei livelli fino all'inizio delle 6 iniezioni (salina o muscimolo a seconda dei gruppi). A partire dalle ore 11:00 e per tutte le sei ore di iniezione con salina, la frequenza cardiaca media negli animali del gruppo di controllo non si discosta da quella registrata nelle stesse ore del giorno precedente.

Negli animali del gruppo A, a seguito delle iniezioni, si è registrata invece una costante diminuzione ($P<0,05$ dalle 12:00 alle 12:30, $P<0,01$ dalle 12:30 alle 17:00) della frequenza cardiaca media durante il periodo di iniezione con muscimolo che dopo 6 ore raggiunge il Nadir con una FC media di 194 ± 12 bpm; nello stesso periodo la FC media degli animali trattati con salina era 443 ± 12 bpm (figura.13).

Fase di riscaldamento

A seguito dell'innalzamento da $15 \pm 1^\circ\text{C}$ a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ della Ta del box di registrazione si verifica una contemporanea diminuzione della FC dei ratti del gruppo di controllo, che passa da un valore medio registrato a partire dalle 9:00 di 449 ± 1 bpm a 367 ± 7 bpm alle 19:30; in seguito al progressivo adattamento degli animali alla nuova Ta la FC media si stabilizzerà poi a 394 ± 3 bpm per il resto della notte. Nel giorno seguente l'adattamento alla nuova Ta continuerà e la FC media calerà a 334 ± 7 bpm durante la fase di riposo e 372 ± 8 bpm durante la successiva fase attiva.

Alla fine del trattamento con muscimolo, la FC degli animali del gruppo A è al Nadir (194 ± 12 bpm); durante la fase di riscaldamento la FC mostra un rapido incremento ($P < 0,05$ dalle 17:00 alle 18:00, rispetto al gruppo di controllo) fino a un picco di 431 ± 8 bpm per poi stabilizzarsi durante il resto della notte su un valore medio di 403 ± 2 bpm.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'adattamento alla nuova Ta continua e la FC media cala a 362 ± 12 bpm durante la fase di riposo e 383 ± 8 bpm durante la successiva fase attiva. A causa di questo adattamento della FC alla Ta non ha senso confrontare la FC dei giorni B e R.

Il confronto della FC nelle 12h della fase di riposo e nelle 12h della fase attiva degli animali del gruppo A con la FC dei corrispondenti periodi degli animali del gruppo di controllo non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi (figura.13).

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Anche negli animali del gruppo B si verifica una diminuzione significativa ($P < 0,05$ dalle 11:30 alle 12:30 e per $P < 0,01$ dalle 12:30 alle 17:00) della FC durante le ore di trattamento con muscimolo; per contro non si osservano differenze tra l'andamento della FC negli animali del gruppo A e quelli del gruppo B.

Fase di riscaldamento

Alla fine del periodo di ipotermia, la FC degli animali del gruppo B raggiunge un valor medio al nadir di 207 ± 12 bpm (figura 13).

In seguito all'esposizione alla T_a di 37°C la FC aumenta in modo significativamente più veloce rispetto a quanto visto negli animali del gruppo A ($P < 0,01$ tra le 17:00 e le 19:30) fino a raggiungere un picco di 468 ± 16 bpm 90' dopo l'inizio della fase di riscaldamento. L'incremento della FC è così rapido che già nei primi 30' a 37°C il suo valore medio non si discosta da quello del gruppo di controllo e solo successivamente lo supera in maniera significativa ($P < 0,05$ dalle 18:00 alle 20:00 e per $P < 0,01$ dalle 18:30 alle 19:00); dalle 20:00 in poi i valori medi della FC si abbassano fino ad allinearsi a livelli comparabili con quelli del gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Durante il giorno R, FC si attesta intorno ad un valore medio di 362 ± 12 bpm nella fase di riposo e 389 ± 8 bpm nella fase attiva. Anche questi valori non sono comparabili con quelli registrati nel giorno B a causa dell'adattamento alla nuova T_a ; per contro non risultano significativamente diversi da quelli osservati nel gruppo A e nel gruppo di controllo.

4.2.3 RAPPORTO TRA FUNZIONE CARDIOVASCOLARE E THY

Le due strategie di riscaldamento, quello intenso dell'esperimento B e quello più moderato dell'esperimento A si differenziano non solo per l'effetto diretto sulla Thy e quindi sulle diverse dinamiche di ritorno alla normotermia ma anche per gli effetti sul comparto cardiovascolare.

La figura 16 mostra la correlazione tra Thy e FC, effettuata durante l'intervallo di tempo che va dall'inizio del riscaldamento fino al raggiungimento della normotermia. Nonostante nell'esperimento B il riscaldamento intenso porti ad un raggiungimento della normotermia più rapido rispetto a quanto avviene nell'esperimento A, il rapporto tra Thy e FC nei due gruppi si mantiene inalterato.

La figura 16 mostra la correlazione tra Thy e PAM, effettuata durante l'intervallo di tempo che va dall'inizio del riscaldamento fino al raggiungimento della normotermia; si nota come non ci sia una correlazione diretta tra i due parametri: la PAM descrive un picco prima del raggiungimento della normotermia e solo successivamente si stabilizza.

Inoltre risulta evidente come la PAM sia fortemente influenzata dalla Ta: a parità di temperatura corporea, gli animali sottoposti ad un riscaldamento a 37° mostrano un incremento nella PAM superiore a quello degli animali riscaldati a 28°C.

4.3 ASPETTI ELETTROENCEFALOGRAFICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM

4.3.1 POTENZA TOTALE DELL'EEG

ESPERIMENTO A

La potenza totale dell'EEG (PTE) è data dalla somma delle potenze totale

dello spettro EEG compreso fra tra 0.3 e 20Hz ed è stata rappresentata come percentuale calcolata sulla media della potenza totale registrata nelle 24h del giorno di controllo (figura 15).

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il primo giorno di registrazione (B) la PTE media del gruppo di controllo e del gruppo A mostrano un andamento circadiano, oscillando rispettivamente attorno ai valori di $100.6 \pm 6.3\%$ e di $109.4 \pm 9.8\%$ nella fase di riposo e di 97.8 ± 6.5 e di 89.9 ± 2.5 nella fase attiva (figura 15).

Nel giorno I la PTE media del gruppo di controllo si mantiene su livelli comparabili a quelli registrati in B ($104,7 \pm 5,4\%$ nella fase di riposo, $93.9 \pm 5.4\%$ nella fase attiva).

Negli animali del gruppo A, a partire dalla prima iniezione si osserva un calo (significativo per $P < 0,01$ dalle 15:00 alle 16:30 e per $P < 0,05$ dalle 16:30 alle 17:00 rispetto al gruppo di controllo) costante della PTE che al arriva Nadir ($30,1 \pm 8,6\%$) alle ore 16:30.

Fase di riscaldamento

Gli animali del gruppo A alla fine delle sei iniezioni presentano una PTE estremamente ridotta ($30,1 \pm 8,6\%$), ma a seguito del riscaldamento questa aumenta in maniera significativa ($P < 0,01$ 17:00-17:30 e $P < 0,05$ 17:30-18:00, rispetto il gruppo di controllo) e, dopo aver raggiunto un'intensità paragonabile a quella del controllo, continua a salire fino a descrivere un picco del $159,0 \pm 27,9\%$ alle ore 20:00 e si mantiene elevata fino alle 4:00, quando la ritorna a livelli comparabili con quelli degli animali del gruppo di controllo (figura 15). Nonostante i livelli della PTE si mantengano elevati per tutta la prima parte della notte, solo per 30' tra le 22:00 e le 22:30 la PTE risulta essere significativamente ($P < 0,05$) maggiore negli animali del gruppo A rispetto a quelli del gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Nella giornata di recupero la PTE di entrambi i gruppi presenta delle variazioni compatibili con l'andamento circadiano, oscillando attorno ai valori di 94.8 ± 10.9 e 102.1 ± 12.9 nella fase di riposo, mentre nella fase attiva oscillano intorno a valori di 79.8 ± 9.3 e 86.2 ± 8.0 rispettivamente per i gruppi di controllo e trattato (figura 15)

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Negli animali del gruppo B la PTE mostra calo costante e significativo ($P < 0,05$ dalle 12:00 alle 13:00, $P < 0,01$ dalle 14:30 alle 17:30) se paragonata a quanto accade negli animali del gruppo di controllo; in questa fase non si riscontrano invece differenze nell'andamento della PTE tra i due gruppi di animali trattati con muscimolo.

Fase di riscaldamento

Dal Valore di Nadir ($23,73 \pm 4,06\%$) raggiunto al termine della fase di induzione dell'ipotermia, la PTE degli animali del gruppo B, in seguito all'incremento della T_a , aumenta fino a raggiungere un picco del $148,08 \pm 14,16\%$ tra le 19:30 e le 20:00.

Per la maggior parte del tempo non si riscontrano differenze significative nell'andamento della PTE tra i gruppi A e B (figura 15): gli animali del gruppo B vedono la loro PTE aumentare più velocemente e di conseguenza raggiungere il picco in anticipo rispetto quelli del gruppo A ($P < 0,05$ al raggiungimento del picco, tra le 19:30 e le 20:00); la PTE dei due gruppi si differenzia in modo significativo in altre due occasioni durante la notte ($P < 0,05$ 20:00-02:30 e 04:30-05:00).

Confrontando la PTE del gruppo B con quella dei controlli si nota come col riscaldamento più intenso i valori tornino quasi immediatamente a livelli normali (durante la fase di incremento tra gruppo B e gruppo di controllo si notano differenze significative, $P < 0,01$ solo nella prima mezzora di riscaldamento, tra le 17:00 e le 17:30). In seguito i valori di PTE si discosteranno significativamente ($P < 0,05$ 22:00-22:30) solo in un'occasione.

Giorno di recupero

Nella giornata di recupero la PTE degli animali del gruppo B presenta delle variazioni compatibili con il normale andamento circadiano (figura 15), oscillando attorno ai valori di $94,0 \pm 6,0$ e nella fase di riposo e di $80,9 \pm 6,8$ nella fase attiva. Non si riscontrano differenze significative Tra i valori di PTE nel giorno R e nel giorno B; in ugual modo i valori di PTE nel giorno R degli animali del gruppo B non si discostano da quelli osservati negli altri gruppi (A e controllo).

4.3.2 MODIFICAZIONI DELLO SPETTRO

Un'analisi più approfondita della dinamica di modificazione della potenza spettrale EEG è rappresentata nella figura 17, dove viene rappresentato l'andamento medio normalizzato nel tempo dello spettro EEG compreso fra 0.25 Hz e 20 Hz. Si può osservare il progressivo rallentamento della banda di potenza contenuta fra 5 Hz e 7Hz (banda Theta), che tende a spostarsi progressivamente verso regioni più lente dello spettro, fino a virtualmente scomparire in corrispondenza del nadir della Thy (fig 17 A e B). Durante la fase di riscaldamento si osserva una progressiva accelerazione della potenza spettrale EEG ed un potente incremento della banda Theta nel gruppo A ma non nel gruppo B, che ritorna alla normalità in corrispondenza del ritorno alla normotermia. Una volta raggiunta la normotermia si osserva un importante potenziamento spere nella porzione più lenta dello spettro EEG (0.5 – 4.5 Hz). Nessuna variazione

spettrale di rilievo viene osservata nel gruppo iniettato con salina (fig 17C).

4.3.3 ANALISI SPETTRALE EEG

ESPERIMENTO A

Gli spostamenti dello spettro EEG verso regioni più lente dello spettro stesso in conseguenza dell'indotta ipotermia sono descritti nella figura 18. Qui sono rappresentati gli spettri EEG medi calcolati nel momento indicato dalla linea continua nera all'interno del grafico incorporato in alto a destra di ogni spettro. Si può osservare come il picco spettrale che si posiziona intorno ai 6.5 Hz in condizioni di baseline, si sposti e si indebolisca progressivamente col progredire dell'ipotermia, per poi spostarsi potenziato verso regioni dello spettro più veloci col ripristinarsi della normotermia, quando si può osservare anche la comparsa di un secondo picco posizionato nella regione più lenta dello spettro.

ESPERIMENTO B

Gli spostamenti dello spettro EEG verso regioni più lente dello spettro stesso in conseguenza dell'indotta ipotermia sono descritti anche in questo caso dalla figura 18. In particolare la colonna di destra descrive le modificazioni dello spettro EEG relative agli animali dell'esperimento B: il picco spettrale qui appare molto meno intenso rispetto a quanto osservato nell'esperimento A; inoltre può osservare come a parità di tempistiche, il repentino riscaldamento porti ad un picco meno definito. La comparsa del secondo picco localizzato nella regione lenta dello spettro qui è notevolmente anticipata rispetto a quanto osservato negli animali del gruppo A.

4.4 ASPETTI IPNICI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM

4.4.1 SONNO NREM

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B le quantità medie di sonno NREM prodotte dagli animali del gruppo A e dal gruppo di controllo sono rispettivamente $19066 \pm 1029s$ e $19353 \pm 1416s$ nella fase di riposo contro $11554 \pm 999s$ e $10950 \pm 1656s$ nella fase attiva.

Durante il giorno B gli animali del gruppo A e del gruppo di controllo esprimono rispettivamente una media (calcolata su una finestra di mezzora) di $794 \pm 43s$ e $856 \pm 59s$ nella fase attiva contro $519 \pm 67s$ e $536 \pm 75s$ nella fase di riposo.

Come si nota dalla figura 23, in seguito al trattamento con muscimolo la quantità oraria media di tempo passato in stato di sonno NREM dagli animali del gruppo A decresce rapidamente arrivando a zero nel giro di due ore. Da quel momento in poi gli animali permangono in uno stato di simil-veglia, durante il quale non producono sonno NREM. Questo stato persiste fino all'inizio della fase di riscaldamento.

Gli animali del gruppo di controllo non mostrano questo comportamento, continuando ad alternare momenti di sonno e di veglia durante tutto il periodo di trattamento.

Fase di riscaldamento

Contestualmente al ritorno alla normotermia, si verifica un rapido incremento della quantità oraria media di NREM prodotta dagli animali del

gruppo A, che già dalle ore 20:00 è comparabile con la quantità oraria media di sonno NREM prodotta dagli animali del gruppo di controllo. Nelle ore seguenti per gli animali di controllo comincia la fase attiva in cui si assiste comunque ad un aumento del tempo passato in sonno NREM a causa dell'aumento della T_a . Anche gli animali del gruppo A, in seguito al ritorno alla normotermia, riprendono a dormire e presentano un incremento del tempo passato in sonno NREM (figura 23).

Giorno di recupero

Nel giorno di recupero, anche a causa della T_a più elevata rispetto ai giorni precedenti, si assiste ad un aumento del tempo passato in sonno NREM sia dagli animali del gruppo A che da quelli del gruppo di controllo, che si attestano rispettivamente sui valori medi orari di $828 \pm 31s$ e $853 \pm 40s$ per la fase di riposo contro $644 \pm 54s$ e $583 \pm 70s$ nella fase attiva.

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Negli animali del gruppo B, durante la giornata di controllo (B), la media di tempo passato in sonno NREM è di $888,0 \pm 39.1s$ durante la fase di riposo e di $55.88 \pm 20,0s$ durante la fase attiva. Nel giorno I il trattamento porta ad una rapida diminuzione del tempo passato in sonno NREM, fino alla sua totale scomparsa un'ora dopo l'inizio delle iniezioni di muscimolo (figura 23).

Fase di riscaldamento

Due ore dopo l'aumento della T_a , in concomitanza con raggiungimento della normotermia, gli animali riprendono ad esprimere una quantità di sonno NREM paragonabile a quella osservata nel gruppo di controllo. Durante il resto

della giornata la media del tempo passato in sonno REM dagli animali del gruppo B è di $940,3 \pm 64.2s$.

Giorno di recupero

Nel giorno di recupero, anche a causa della T_a più elevata rispetto ai giorni precedenti, si assiste ad un aumento del tempo passato in sonno NREM dagli animali del gruppo B che mostrano una media di $959,0 \pm 17.8s$ nella fase di riposo e di $731,9 \pm 24.4s$ nella fase attiva.

4.4.2 SONNO REM

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante la giornata di controllo (B) la quantità di tempo passata in sonno REM (espressa come media calcolata su una finestra di 60 minuti \pm errore standard) dagli animali del gruppo A e del gruppo di controllo in sonno REM è rispettivamente di $200,8 \pm 28.8s$ e $154.9 \pm 28.7s$ nella fase di riposo e di $84,8 \pm 25,9s$ e 62.6 ± 38.5 durante la fase attiva.

Nel giorno I, in seguito al trattamento, gli animali del gruppo di controllo passano $158.2 \pm 37.7s$ in sonno REM durante la fase di riposo. Negli animali del gruppo A invece, in seguito al trattamento si assiste ad un rapido calo della quantità di sonno REM espressa, che nel giro di 30' raggiunge si azzera.

Fase di riscaldamento

In seguito al ritorno alla normotermia ed alla ricomparsa di sonno NREM gli animali del gruppo A riprendono a esprimere sonno REM; la sua comparsa è facilitata anche dalla T_a più elevata rispetto al giorno B (figura 23).

Durante la fase attiva del giorno I gli animali del gruppo A e del gruppo di controllo esprimono rispettivamente $180,6 \pm 37.4s$ e $140.2 \pm 30.4s$ di sonno REM.

Giorno di recupero

Durante il giorno R la T_a di $28^\circ C$ facilita la comparsa di sonno REM in entrambi i gruppi di animali. Il gruppo A esprime $263.4 \pm 27.0s$ di sonno REM nella fase di riposo e $115.8 \pm 48.9s$ nella fase attiva contro i $238.9 \pm 25.4s$ e $100.9 \pm 31.6s$ del gruppo di controllo.

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante la giornata di controllo gli animali del gruppo B esprimono $206.4 \pm 13.5s$ e 68.3 ± 10.3 rispettivamente nella fase di riposo e nella fase attiva.

Nel giorno I in seguito al trattamento con muscimolo si assiste ad una rapida e pressoché immediata scomparsa del sonno REM.

Fase di riscaldamento

In seguito all'innalzamento della T_a , al raggiungimento della normotermia ed alla ricomparsa del sonno NREM, anche gli animali del gruppo B tornano ad esprimere sonno REM (figura 23).

Al pari degli animali del gruppo A anche negli animali del gruppo B si assiste ad un parziale recupero del sonno REM perduto durante la giornata. Durante quella che dovrebbe essere la fase attiva del giorno I gli animali di questo gruppo esprimono una media di $204.6 \pm 24.5s$ di sonno REM.

Giorno di recupero

Durante il giorno R la T_a di 28°C facilita la comparsa di sonno REM anche negli animali del gruppo B.

Il tempo passato in sonno REM durante questa giornata è di 232.2 ± 11.5 durante la fase attiva e $75.8 \pm 9.2s$ durante la fase di riposo.

4.4.3 ANDAMENTO CUMULATIVO di SONNO NREM E REM

L'analisi dell'andamento cumulativo della quantità di sonno NREM (figura 24) evidenzia durante tutta la fase dell'ipotermia sia gli animali del gruppo A che quelli del gruppo B non esprimano sonno NREM, a differenza di quelli del gruppo di controllo che continuano a dormire secondo il normale andamento circadiano nonostante il trattamento con soluzione salina. In particolare il sonno NREM perduto dagli animali dei gruppi A e B durante la fase di ipotermia sembra essere quasi del tutto recuperato nel corso della seconda parte del giorno I. Il tracciato del sonno NREM cumulativo di questi due gruppi nel giorno R si torna ad allinearsi perfettamente a quello degli animali del gruppo di controllo.

L'andamento cumulativo del sonno REM (figura 24) mostra come invece il sonno REM perduto dai due gruppi di animali trattati con muscimolo vada incontro ad un recupero molto limitato nel resto del periodo di registrazione.

4.5 ASPETTI SPETTRALI DELLA PROLUNGATA INIBIZIONE DEL RVMM

4.5.1 BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B non si riscontrano significative differenze tra l'intensità del Delta in sonno NREM tra gli animali del gruppo di controllo e quelli del gruppo A. I valori medi sono di $96.9 \pm 1.5\%$ e $91.8 \pm 2.7\%$ rispettivamente per il gruppo A e il gruppo di controllo durante la fase di riposo: durante la fase attiva i valori sono rispettivamente di 96.4 ± 3.9 e di 105.6 ± 6.8 .

Nel giorno di iniezione si assiste ad un decremento dell'intensità del Delta in sonno NREM negli animali del gruppo A, che precede e precede la scomparsa.

Fase di riscaldamento

Negli animali del gruppo A le prime fasi di sonno NREM (figura 19) non si registrano prima del raggiungimento della normotermia (ore 19:30, Thy media $34,6 \pm 0,7^\circ\text{C}$) e sono caratterizzate da un incremento significativo ($P < 0,05$ dalle 19:30 alle 20:00) della potenza della banda Delta ($169,5 \pm 16,3\%$), rispetto al gruppo di controllo.

In seguito con lo stabilizzarsi della Thy su livelli fisiologici e la comparsa di periodi di sonno NREM più lunghi l'intensità della banda Delta incrementa ulteriormente (picco a $237,7 \pm 19,9\%$, $P < 0,01$ dalle 20:00 fino alle 23:00), prima di ritornare a livelli comparabili a quelli del gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Nel giorno R (figura 19) l'intensità della banda Delta in sonno NREM degli animali del gruppo A si assesta su valori di $93,12 \pm 12,4\%$ nella fase di riposo e $84,2 \pm 7,5\%$ nella fase attiva, valori non dissimili da quelli registrati per gli animali del gruppo di controllo ($87,2 \pm 8,9\%$ e $89,9 \pm 9,5$ rispettivamente nella fase di riposo e attiva).

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B l'intensità della banda Delta in sonno NREM degli animali del gruppo B non si discosta da quanto osservato nel gruppo di controllo o nel gruppo A.

Nel giorno I l'intensità del Delta in sonno NREM cala come visto negli animali del gruppo A, prima della scomparsa del sonno NREM in seguito all'ipotermia (figura 19).

Fase di riscaldamento

La ricomparsa del sonno NREM si verifica solo col ritorno alla normotermia; durante questi episodi la banda Delta dello spettro EEG mostra un'intensità molto elevata rispetto al gruppo di controllo ($P < 0,01$ dalle 18:30 alle 22:30). L'intensità del Delta, nel giro di 60' dalla ricomparsa del sonno NREM, aumenta fino ad un picco del $196,4 \pm 17,0\%$, prima di tornare a livelli normali.

Gli animali del gruppo B si differenziano da quelli del gruppo A fin da subito: il sonno NREM appare prima, ma durante queste fasi l'intensità della banda Delta rimane significativamente inferiore ($P < 0,01$ 20:00-20:30, 21:00-21:30 e 22:30-23; $P < 0,05$ 20:30-21:00, 21:30-22:00 e 00:00-00:30) rispetto a quanto visto negli animali del gruppo A.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Delta durante in sonno NREM degli animali del gruppo B si assesta su livelli ($85,4 \pm 2,5\%$ durante la fase di riposo e $83,1 \pm 5,9\%$ durante la successiva fase attiva) comparabili con quelli osservati nel giorno R nel gruppo a ed in quello di controllo. E' da notare come questi livelli

siano significativamente ($P<0.05$) inferiori a quelli registrati negli stessi animali nel giorno B.

4.5.2 BANDA SIGMA DURANTE IL SONNO NREM

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B non si riscontrano significative differenze tra l'intensità della banda Sigma (figura 20) in sonno NREM tra gli animali del gruppo di controllo e quelli del gruppo A. I valori medi sono di $98.1 \pm 1.3\%$ e $96.0 \pm 0.9\%$ rispettivamente per il gruppo A e il gruppo di controllo durante la fase di riposo; durante la successiva fase attiva i valori sono rispettivamente di 96.5 ± 3.9 e di 100.5 ± 3.4 .

Parimenti a quanto visto per la banda Delta, nel giorno di iniezione si assiste ad un rapido decremento (significativo per $P<0.01$ dalle 11:00 alle 11:30) dell'intensità del Sigma in sonno NREM negli animali del gruppo A, che precede la scomparsa.

Fase di riscaldamento

Quando negli animali del gruppo A ricompaiono le prime fasi di sonno NREM, inizialmente la banda Sigma è significativamente meno intensa ($P<0.01$ dalle 18:00 alle 19:00) rispetto quella degli animali del gruppo di controllo; in seguito si osserva come questa si riallinei ai valori osservati nel gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Sigma in sonno NREM degli animali del gruppo A si assesta su valori di $88,9 \pm 9.5\%$ nella fase di riposo e $88.5 \pm 7.0\%$ nella fase attiva, valori non dissimili da quelli registrati per gli animali del gruppo di controllo ($77.0 \pm 3.4\%$ e $86.6 \pm 4.4\%$ rispettivamente nella fase di riposo e attiva).

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B l'intensità della banda Sigma (figura 20) in sonno NREM degli animali del gruppo B non si discosta da quanto osservato nel gruppo di controllo o nel gruppo A.

Nel giorno I l'intensità del Sigma in sonno NREM cala significativamente ($P < 0.01$ dalle 11:30 alle 12:00) similmente a quanto visto negli animali del gruppo A, prima della scomparsa del sonno NREM in seguito all'ipotermia.

Rispetto agli animali del gruppo A, la diminuzione del Sigma negli animali del gruppo B è significativamente più veloce ($P < 0,01$ dalle 11:00 alle 12:00).

Fase di riscaldamento

La banda Sigma in sonno NREM quando riappare negli animali del gruppo B è significativamente ($P < 0,05$ dalle 18:30 alle 19:00) meno intensa rispetto a quella osservata nello stesso periodo negli animali del gruppo di controllo.

Rispetto agli animali del gruppo A si osserva come durante la notte l'intensità della banda sigma abbia un andamento leggermente diverso nei due gruppi di animali al punto da differire in maniera significativa in alcuni momenti ($P < 0,05$: 20:30-21:00, 21:30-22:00, 22:30-23:00, 08:00-08:30; $P < 0,01$ 04:00-04:30 e 05:30-06:00).

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Sigma in NREM degli animali del gruppo B si assesta su valori di $85,5 \pm 5.1\%$ nella fase di riposo e $82.7 \pm 4.4\%$ nella fase attiva, valori non diversi da quelli registrati negli altri due gruppi.

Confrontando però l'intensità del Sigma nel giorno R con quella nel giorno B si osserva come vi sia stata una significativa ($P < 0,01$) diminuzione dell'intensità tra le due giornate.

4.5.3 BANDA THETA IN VEGLIA

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B non si riscontrano significative differenze tra l'intensità della banda Theta in veglia (figura 21) tra gli animali del gruppo di controllo e quelli del gruppo A. I valori medi sono di $101.8 \pm 5.3\%$ e $94.0 \pm 2.2\%$ rispettivamente per il gruppo A e il gruppo di controllo durante la fase di riposo; durante la successiva fase attiva i valori sono rispettivamente di 100.6 ± 0.6 e di 100.0 ± 0.9 .

In seguito al trattamento con muscimolo negli animali del gruppo A si osserva una significativa ($P < 0,05$ dalle 11:30 alle 12:00) diminuzione dell'intensità della banda Theta in veglia; in seguito all'aggravarsi dello stato di ipotermia questa scende al di sotto della soglia del 50% e lo stato dell'animale non viene più considerato veglia ma pseudo-torpore.

Fase di riscaldamento

Con l'incremento della Thy si assiste ad una progressiva intensificazione della banda Theta che alle 18:30 supera la soglia del 50%, pur rimanendo

significativamente ($P < 0,01$ dalle 18:30 alle 19:00) inferiore a quella del gruppo di controllo. In seguito col progressivo ritorno alla normotermia la banda Theta in veglia degli animali del gruppo A torna a livelli comparabili con quelli del gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Theta in veglia degli animali del gruppo A si assesta su valori di $92.0 \pm 10.1\%$ nella fase di riposo e $86.3 \pm 8.6\%$ nella fase attiva, valori non discordi da quelli registrati per gli animali del gruppo di controllo (84.4 ± 5.1 e $83.8 \pm 3.3\%$ rispettivamente nella fase di riposo e attiva).

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B l'intensità della banda Theta (figura 21) in veglia degli animali del gruppo B non si discosta da quanto osservato nel gruppo di controllo o nel gruppo A ($98.4 \pm 3.6\%$ nella fase di riposo e $100.3 \pm 2.3\%$ in quella attiva).

Nel giorno I in seguito al trattamento si verifica un significativo ($P < 0.05$ dalle 11:00 alle 11:30 e $P < 0,01$ dalle 11:30 alle 12:00) decremento dell'intensità della banda Theta in veglia rispetto ai controlli. Questo decremento non differisce in maniera significativa da quello osservato durante le stesse ore del giorno I negli animali del gruppo A.

In seguito alla diminuzione del Theta in veglia al di sotto della soglia del 50% si considerano anche gli animali di questo gruppo in uno stato di pseudo-torpore.

Fase di riscaldamento

In seguito al riscaldamento degli animali del gruppo B con una Ta di 37°C, si osserva un rapido incremento dell'intensità del Theta in veglia, che supera la soglia del 50% di intensità contemporaneamente 30' minuti prima (alle 18:00) di quanto accade negli animali del gruppo A. Quando il Theta di entrambi i gruppi è al disopra del 50% (e quindi diventa possibile compararli) si osserva come l'intensità della banda Theta nel gruppo B risulti più elevata ($P < 0.01$ dalle 18:30 alle 19:30).

Rispetto ai controllo l'intensità del Theta risulta essere significativamente inferiore ($P < 0,05$) alle 18:00 ovvero quando torna a superare la soglia del 50% dell'intensità; successivamente torna velocemente a livelli non dissimili da quelli degli animali del gruppo di controllo.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Theta in veglia degli animali del gruppo B si assesta su valori di $91.0 \pm 6.4\%$ nella fase di riposo e $92.9 \pm 4.6\%$. Questi valori non differiscono significativamente da quelli riscontrati negli altri due gruppi.

4.5.4 BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM

ESPERIMENTO A

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B non si riscontrano significative differenze tra l'intensità della banda Theta in sonno REM (figura 22) tra gli animali del gruppo di controllo e quelli del gruppo A. I valori medi sono di $100.9 \pm 0.7\%$ e 101.0

$\pm 0.8\%$ rispettivamente per il gruppo A e il gruppo di controllo durante la fase di riposo; durante la successiva fase attiva i valori sono rispettivamente di $91.6 \pm 1.46\%$ e di $93.9 \pm 2.1\%$.

Durante il giorno I all'inizio del trattamento con muscimolo segue la scomparsa del sonno REM negli animali del gruppo A.

Fase di riscaldamento

Quando il sonno REM torna a comparire (ore 20:00) negli animali del gruppo A la banda Theta in questa fase del sonno è significativamente ($P < 0,01$ dalle 20:00 alle 20:30 e $P < 0,05$ dalle 20:30 alle 21:00) più intensa di quella riscontrata negli animali del gruppo di controllo. In particolare a differenza di altre bande si può notare come la banda Theta in sonno REM non parta da una intensità più bassa per poi riallinearsi ai controlli (magari passando per un picco), ma al contrario parte da un picco ($135.6 \pm 5.3\%$) per poi tornare ad un livello più basso.

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Theta in sonno REM degli animali del gruppo A si assesta su valori di $91.4 \pm 10.5\%$ nella fase di riposo e $88.7 \pm 7.0\%$ nella fase attiva, valori non discordi da quelli registrati per gli animali del gruppo di controllo (91.4 ± 10.5 e $88.7 \pm 7.0\%$ rispettivamente nella fase di riposo e attiva).

Si osserva una significativa diminuzione dell'intensità del Theta in sonno REM ($P < 0,01$) nel gruppo di controllo nel giorno R rispetto al giorno B. Questa variazione si riflette anche nel confronto tra il Theta in sonno REM nella fase attiva del giorno R di animali del gruppo A e controlli: questi ultimi mostrano un'intensità del theta minore ($P < 0,05$).

ESPERIMENTO B

Fase di induzione dell'ipotermia

Durante il giorno B l'intensità della banda Theta (figura 22) in sonno REM degli animali del gruppo B non si discosta da quanto osservato nel gruppo di controllo o nel gruppo A ($101.3 \pm 0.7\%$ nella fase di riposo e $92.9 \pm 1.2\%$ in quella attiva).

Nel giorno I, negli animali del gruppo B, si verifica la scomparsa del sonno REM e della relativa banda Theta in seguito all'inizio del trattamento.

Fase di riscaldamento

Quando (alle 19:00) ricompaiono le prime fasi sonno REM negli animali del gruppo B, l'intensità della banda Theta non si discosta mai per intensità da quanto osservato nel gruppo di controllo. In questo differisce da quanto osservato nel gruppo A dove l'intensità della banda Theta era maggiore ($P < 0,01$ tra le 20:00 e le 21:00 e $P < 0,05$ tra le 21:00 e le 22:00).

Giorno di recupero

Nel giorno R l'intensità della banda Theta in sonno REM degli animali del gruppo B si assesta su valori di $93.7 \pm 2.9\%$ nella fase di riposo e $86.17 \pm 3.4\%$. Questi valori non differiscono significativamente da quelli riscontrati negli altri due gruppi.

5. DISCUSSIONE

I dati presentati mostrano come sia possibile indurre uno stato di pseudo-torpore reversibile in un animale non ibernante come il ratto, tramite l'inibizione di una stazione chiave nella rete centrale di controllo della termogenesi. Questo risultato appare supportare l'assunzione iniziale che suggeriva che l'insieme di geni responsabile della sopravvivenza degli animali ibernanti a tale condizione potesse essere comune a tutti i mammiferi. In particolare appare opportuno sottolineare che la dinamica di induzione dello pseudo-torpore nel ratto mostra tratti fenomenologici molto simili a quelli osservati nel torpore naturale: il calo lineare e progressivo della FC che segue il calo della Thy, l'assenza di un calo della PA e lo spostamento dell'attività EEG verso le regioni più lente dello spettro. L'incapacità del ratto di entrare in torpore spontaneamente, inoltre, rafforza il ruolo di questo animale come modello per lo studio di procedure di induzione di stati ipometabolici.

Dal punto di vista teorico, i dati presentati supportano l'uso di un approccio alternativo a quello dell'inibizione del metabolismo cellulare nel cercare di simulare il torpore. Infatti, tutti i tentativi precedentemente effettuati per innescare uno stato ipometabolico sono andati incontro a numerosi problemi quando si è tentata la loro applicazione a specie non ibernanti. La possibilità di indurre lo pseudo-torpore tramite una manipolazione estremamente selettiva di una ristretta regione del sistema nervoso centrale appare estremamente valevole su diversi piani. Da un lato, amplifica il già importante ruolo che l'RVMM aveva nella regolazione della temperatura corporea. Tramite i neuroni dell'RVMM sono infatti controllate funzioni chiave per la termoregolazione, quali l'attività del grasso bruno, la vasomozione cutanea, la frequenza cardiaca e il brivido. Ma è possibile suggerire che l'RVMM agisca anche su altri organi con funzione metabolica, quali la tiroide, il pancreas, il fegato, la ghiandola surrenale ed il tessuto adiposo bianco. Sulla base dei dati presentati qui, non si possono esplicitare conclusioni riguardo quest'ultima affermazione, ma appare oltremodo importante notare che non si è osservata nessuna reazione compensatoria all'induzione dell'ipotermia, suggerendo che, anche organi che sarebbero stati in grado di svolgere un'azione di compenso alla subentrante ipotermia, non sono

stati attivati. L'RVMM appare quindi essere la stazione comune di uscita delle fibre nervose deputate all'innervazione degli organi termogenici, rappresentando uno snodo critico nella determinazione dell'attività simpatica. Ancor più significativa appare l'assenza di effetti sulla PA. Il mantenimento di una pressione di perfusione ottimale è infatti critico in condizioni di ipometabolismo per mantenere la perfusione tissutale ed evitare danni ischemici. La conservazione della funzione vascolare appare il risultato della selettività anatomica che il SNS assume a livello del bulbo, dove le afferenze centrali termogeniche terminano alla RVMM, mentre quelle vascolari a livello della RVLM (Morrison, 2001). Dal punto di vista funzionale quindi, la prolungata inibizione dell'RVMM differisce chiaramente da altre modalità di inibizione simpatica, quali la somministrazione di β -bloccanti. Questi ultimi infatti agiscono anche sulla porzione del simpatico destinata al mantenimento della funzione vascolare e che non viene modificata dall'inibizione dell'RVMM. Inoltre, l'inibizione dell'RVMM non si limita a ridurre il rilascio di nor-adrenalina dai neuroni post-gangliari per disfacilitazione dei neuroni pre-gangliari, ma, agendo anche sulle cellule serotoninergiche del RVMM, riduce anche il rilascio di serotonina all'interno della colonna intermedio-laterale del midollo spinale. La serotonina in questo distretto ha mostrato avere azioni di potenziamento sull'attività simpatica (Medden and Morrison, 2008). La sua riduzione potrebbe avere un ruolo importante nella simpato-inibizione osservata dopo inibizione del RVMM.

Una fase critica dell'esperimento descritto qui è rappresentata dalla fase di riscaldamento. Abbiamo osservato un'importante attivazione simpatica quando si è cessata la somministrazione farmacologica e si è permesso all'animale di riguadagnare la normotermia. L'aumento dell'attività simpatica ha riguardato anche il distretto vascolare, che non era stato coinvolto nell'effetto simpato-inibitore innescato dall'inibizione dell'RVMM, e potrebbe per questo costituire un fattore di rischio nell'applicazione di una procedura simile di induzione di ipotermia. Tale attivazione è probabilmente dovuta alla risposta termogenica che l'animale deve metter in atto per ritornare alla normotermia e che è probabilmente innescata dai neuroni della regione preottica. La condizione di riscaldamento è

sicuramente innaturale, nel senso che l'animale si trova in una condizione in cui la sua temperatura centrale è bassa mentre quella ambientale è alta (a causa del riscaldamento attivo a cui lo sottoponiamo). E' possibile che questa dissociazione di stimolazioni termiche conduca ad un'attivazione simpatica paradossa, specialmente nel distretto vascolare. Un'eventuale strategia mirata alla riduzione di questa attivazione potrebbe essere la riduzione del riscaldamento attivo, in quanto si è visto come un riscaldamento attivo estremo, ottenuto portando la temperatura ambientale a 37°C per il tempo sufficiente a far riguadagnare all'animale la normotermia passivamente, comporti uno stress cardiovascolare e induca una persistente ipertensione.

Dal punto di vista degli effetti sull'attività cerebrale il nostro modello simula con efficacia quanto avviene in natura: abbiamo osservato una diminuzione dell'intensità dell'elettroencefalogramma con uno spostamento di tutte le sue frequenze verso la parte lenta dello spettro; le similitudini però non si limitano solamente alla fase di ipotermia, ma a ciò che accade in seguito al ritorno alla normotermia: l'animale infatti spende molto tempo in un sonno NREM caratterizzato da una intensa attività Delta.

L'intensificazione del Delta in seguito al ritorno alla normotermia riflette quanto visto in animali in grado di andare in contro naturalmente a stati ipometabolici e ipotermici, convalidando ulteriormente il nostro modello dal punto di vista della riproduzione dei fenomeni di torpore naturali.

Dal punto di vista dell'omeostasi del sonno questa intensificazione del Delta rimane difficile da spiegare; se da un lato possiamo affermare che durante il periodo di ipotermia non c'è comportamento ipnico e che quindi è sensato prevedere una pressione omeostatica che spinga alla produzione di sonno NREM con intensa attività SWA, dall'altro tutto questo è difficilmente spiegabile alla luce dell'attuale teoria dell'omeostasi sinaptica.

Questa teoria si focalizza principalmente sull'intensa attività corticale in veglia per spiegare la necessità di una rimodulazione della forza dei contatti sinaptici che si traduce in un incremento del processo S e quindi in un'intensificazione della SWA durante il sonno NREM successivo. Noi però

osserviamo una diminuzione della potenza totale dell'EEG che si spinge fino al 23% di quanto registrato nel giorno di controllo, che è esattamente il contrario di un'intensa attività cerebrale.

Una possibile spiegazione per un tale incremento dell'attività Delta (237% negli animali del gruppo A) durante il sonno NREM successivo alla fase di ipotermia, può essere legato alla fase del riscaldamento più che a quella di ipotermia vera e propria. In questa fase c'è un'intensa attività ma è a carico del SNS piuttosto che della corteccia: gli animali si trovano nella condizione di dover riscaldare il corpo da una temperatura di 22°C fino a livelli fisiologici (37,5°C con un Δ di almeno 15°C). L'ipotesi del forte coinvolgimento del SNS nelle dinamiche di recupero del Delta successive all'ipotermia è supportata anche dal calo significativo dell'intensità del sonno NREM in animali sottoposti ad una intensa fase di riscaldamento attivo, in cui il tempo necessario per il ritorno alla normotermia viene ridotto di 2/3 e in cui di conseguenza risulta ridotto anche lo sforzo a carico del SNS necessario per il *rewarming*. In questi animali si assiste comunque ad un vistoso incremento nell'intensità del Delta (un incremento del sonno 196%, rispetto al 237% osservato negli animali riscaldati a 28°C) nelle fasi di sonno NREM immediatamente successive al ritorno alla normotermia; ne consegue che non è possibile quindi attribuire l'incremento osservato nella SWA esclusivamente all'attività simpatica sviluppata durante il riscaldamento corporeo.

E' sensato ipotizzare che il fenomeno di intensificazione della SWA in seguito a periodi di ipotermia sia dovuto a più fattori, tra i quali l'attività simpatica ha certamente un ruolo di rilievo, sebbene sia difficile quantificarlo con precisione. In quest'ottica l'analisi del recupero di Delta e di sonno NREM in animali lasciati tornare alla normotermia in maniera autonoma e quindi senza il supporto di una T_a elevata, o viceversa riscaldati attivamente mentre persiste un'inibizione del RVMM potrebbe fornire dati interessanti.

Al contrario del sonno NREM che dopo l'ipotermia va incontro immediatamente ad un fenomeno di recupero, il sonno REM perso viene recuperato solo in minima parte (figura 25). Di norma in seguito ad una deprivazione totale di REM, si attiva un meccanismo di compensazione per cui un

aumento della frequenza nella comparsa delle fasi di sonno REM ne permette un rapido recupero (un'eccezione in questo senso è rappresentata da esperimenti di deprivazione di sonno REM prolungata nel tempo). Nel nostro caso l'incapacità dell'animale di recuperare il sonno REM perduto può essere legata al fatto che il circuito neurale responsabile del controllo omeostatico del sonno REM finisca per essere del tutto inibito durante il periodo di ipotermia; in questo senso sarebbe interessante valutare se la stessa cosa avviene in altre specie in seguito a periodi di torpore o ibernazione naturali.

In alternativa si può considerare il fatto che di norma i modelli di deprivazione di sonno non implicano la riduzione del metabolismo o della temperatura corporea dei soggetti; alla luce dell'impellenza osservata nel recupero del sonno REM negli animali di taglia piccola (e quindi dotati di un metabolismo più veloce), si può supporre che la mancanza del recupero di sonno REM da noi osservata negli animali cui è stata indotta l'ipotermia, sia da ricondursi ad una "non necessità" di compensare la perdita di sonno REM, in quanto alla diminuzione del metabolismo potrebbe corrispondere una pari riduzione della necessità di sonno REM. Di nuovo, sarebbe interessante osservare come avviene in recupero di sonno REM in animali in grado di entrare spontaneamente in stati ipotermici ed ipometabolici.

A questo punto viene naturale un'ultima considerazione su come l'omeostasi del sonno agisca in maniera differente sul sonno NREM e sul sonno REM: quali che siano i meccanismi coinvolti nell'attribuzione di un ipotetico "fabbisogno giornaliero di sonno" e nelle dinamiche di recupero dello stesso, è evidente che una funzione anche in condizioni di ipotermia/ibernazione, mentre l'altro (quello responsabile per il sonno REM), almeno nel caso dell'ipotermia sia in qualche modo inattivo.

Dal punto di vista biologico-evoluzionistico, la somiglianza fra la fenomenologia dello pseudo-torpore indotto da inibizione dell'RVMM e il torpore descritto in natura è interessante. Considerando l'ampia diffusione trans-famiglia che il tratto torpore/ibernazione possiede, è logico supporre che il substrato

genetico che permetta la sopravvivenza durante il torpore stesso sia comune a tutti i mammiferi, ma che soltanto alcuni abbiano sviluppato la possibilità di innescare e regolare il meccanismo. In considerazione dei nostri dati, è lecito suggerire che il torpore naturale possa essere innescato da una via inibitoria diretta al RVMM, attivata da stimoli ambientali quali il freddo, la diminuzione della luminosità e la scarsità di cibo. Considerando la multi stazionarietà della rete centrale di controllo della termogenesi, è possibile che una mutazione che consenta di acquisire il controllo di tale rete possa avvenire in diversi punti della rete stessa, aumentando così la sua stessa probabilità di apparire in diverse specie animali e rappresentando un esempio di evoluzione funzionale convergente.

Di estremo interesse appare a questo proposito il ruolo che l'RVMM ha nel controllo del tono vasomotorio cutaneo. Poco si conosce sulla regolazione vascolare cutanea nell'ibernante, ma è possibile che questa svolga un ruolo più importante di quello pensato prima. Un altro organo critico è rappresentato dal tessuto adiposo bruno. Non ci sono dubbi sul controllo pressoché assoluto che l'RVMM esercita sull'attività simpatica diretta al tessuto adiposo bruno. Questo spiegherebbe quello che viene considerato il tratto caratteristico del torpore naturale, il suo esordio tramite una riduzione del metabolismo (misurata mediante quoziente respiratorio). L'inibizione dell'RVMM, producendo una inibizione dell'attività del tessuto adiposo bruno, produce infatti una riduzione della CO₂ espirata (Morrison, 2003) che precede la riduzione della temperatura corporea e che giustificherebbe la riduzione della attività metabolica osservata all'inizio del torpore naturale.

Dal punto di vista applicativo, i nostri dati rappresentano una dimostrazione di principio che sia possibile indurre uno stato di pseudo-torpore senza inibire sistemicamente il metabolismo cellulare. Se oggi l'iniezione di farmaci direttamente nel parenchima bulbare appare non facilmente praticabile, è possibile che una tecnologia adatta si sviluppi nei prossimi tempi. Considerando per esempio i progressi che la stimolazione cerebrale profonda ha compiuto negli ultimi anni, è possibile che modalità più attive di modificazione della funzione cerebrale possano comparire nei prossimi anni. Inoltre, l'identificazione

dell'RVMM come snodo critico nel controllo metabolico/termoregolatorio può aprire la strada all'identificazione di bersagli selettivi per una più tradizionale farmaco-terapia. Un'altra soluzione plausibile è l'intervento farmacologico diretto sui termocettori, volto a bloccare le afferenze sensoriali responsabili per la risposta al freddo (Almeida et al., 2012).

E' anche importante sottolineare che l'ipotermia indotta in questo modo è scevra da risposte compensatorie da parte del sistema nervoso simpatico, rappresentando quindi un deciso passo avanti rispetto alle procedure correnti di induzione dell'ipotermia tramite raffreddamento attivo.

5.1 CONCLUSIONI

I dati presentati mostrano come la manipolazione farmacologica del RVMM consenta di indurre nel ratto, un animale non ibernante, uno stato di profonda ipotermia le cui caratteristiche sono la totale reversibilità, le dinamiche elettroencefalografiche e vegetative fortemente simili a quelle presentate negli ibernanti naturali e l'assenza di evidenti effetti collaterali.

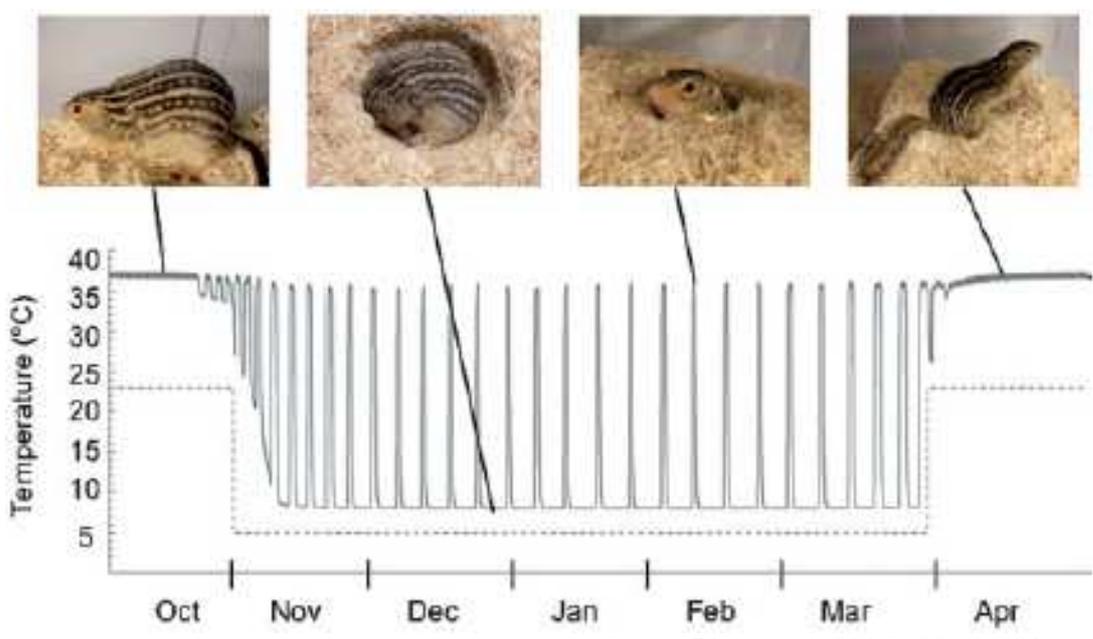
Con questo lavoro non solamente convalidiamo la validità del nostro modello di ipotermia, ma soprattutto stabiliamo l'efficacia della manipolazione dei meccanismi di controllo della termoregolazione, anziché del metabolismo cellulare, nell'induzione di uno stato di profonda ipotermia in un non ibernante, aprendo interessanti prospettive in un campo di ricerca attuale quale l'utilizzo dell'ipotermia terapeutica nell'uomo.

La manipolazione delle condizioni del ritorno alla normotermia ha inoltre evidenziato come l'incremento nella SWA durante le fasi di sonno successive presenti una componente significativa addebitabile all'intensa attivazione del SNS necessaria per ripristino della normale temperatura corporea.

Inoltre l'analisi delle dinamiche del ritorno ad uno stato termico fisiologicamente normale e delle condizioni in cui questo può avvenire, ha evidenziato i possibili rischi collegati ad intensa una stimolazione termica quando il corpo si trova nella situazione paradossale di essere innaturalmente freddo pur

percepando un forte calore dalle afferenze cutanee. Ad ora la fase del riscaldamento rimane il punto più critico di tutto il processo e merita ulteriori studi.

6. FIGURE



Andrews, *Bioessays*. 2007; 29(5):431-40

Figura 1. La figura mostra un esempio dei cambiamenti della temperatura corporea (linea continua) nel citello dalle tredici linee (*Spermophilus Tridecemlineatus*) durante il corso dell'anno. Si può osservare che all'abbassarsi della temperatura ambientale (linea tratteggiata), si innesca il processo di ibernazione, caratterizzato da una profonda ipotermia interrotta da periodici brevi periodi di eutermia.

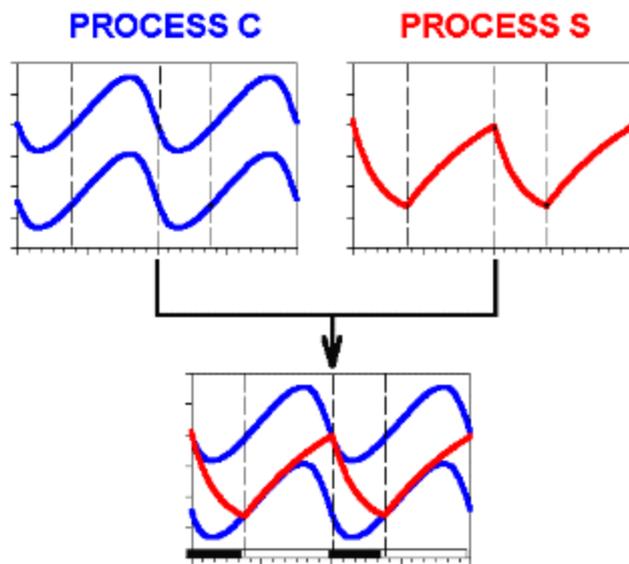
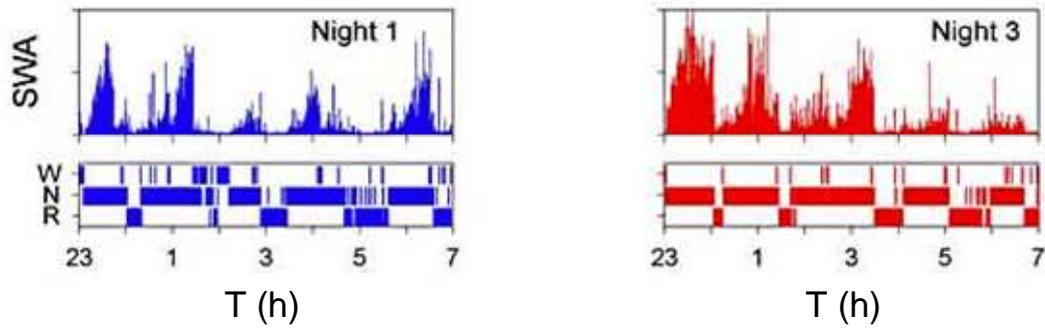
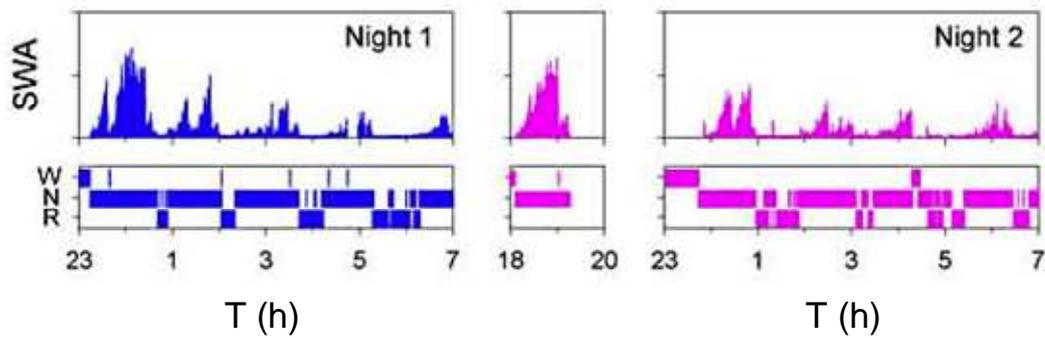


Figura 2. Nel riquadro in alto è rappresentato il tempo passato in veglia (barre orizzontali bianche) e in sonno (barre orizzontali nere) come risultato dell'interazione tra il processo circadiano (C, in blu) ed il processo omeostatico (S, in rosso). La propensione al sonno è rappresentata dalla distanza tra i due processi.

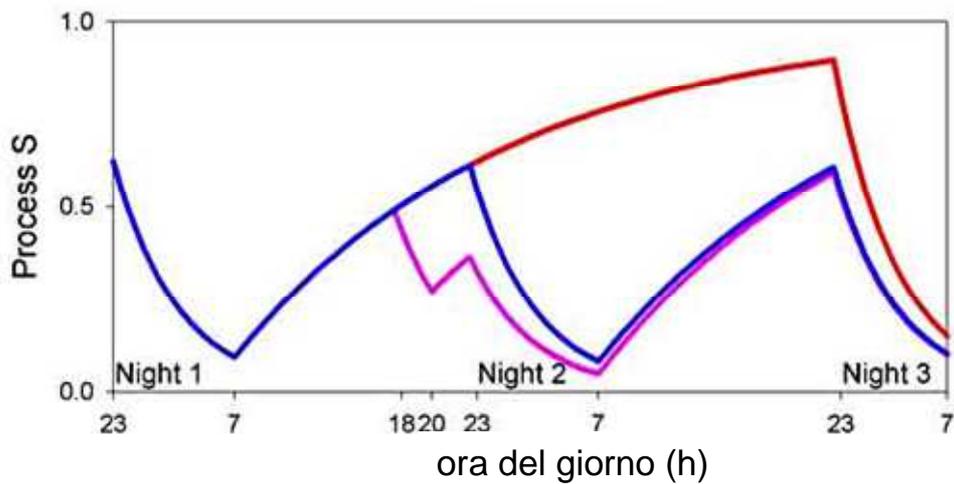
Deprivazione di sonno



Sonno pomeridiano

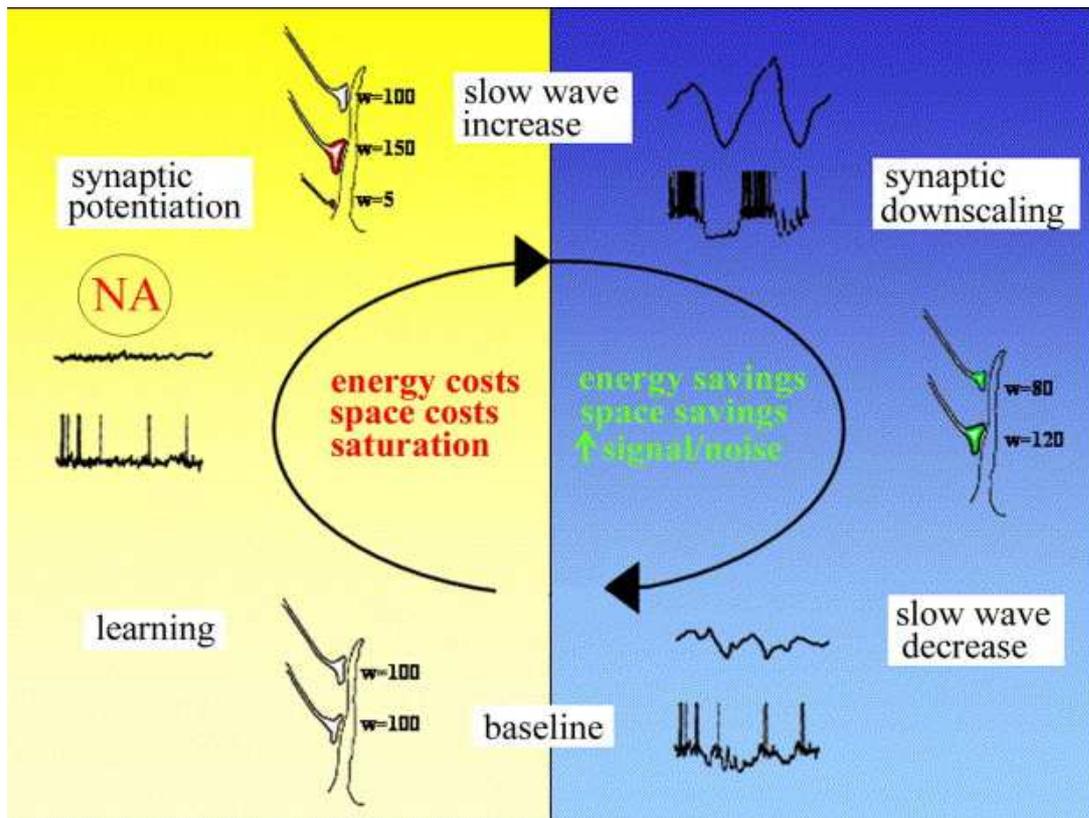


Modello



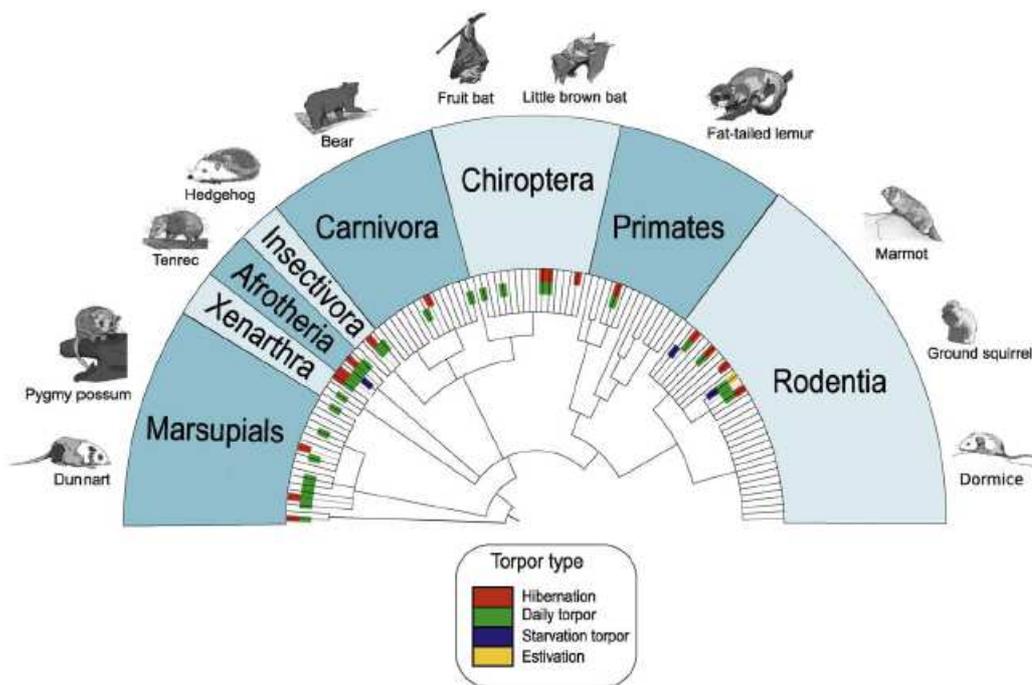
From Achermann and Borbély, Front. in Biosc. 2003; 8, 683-693

Figura 3. Il riquadro in alto mostra l'andamento nel tempo della SWA e delle fasi di veglia (W) sonno NREM (N) e REM (R) durante un giorno di controllo (in blu), durante un intervallo di 2h di sonno pomeridiano e nella rispettiva notte (in rosa), nella notte successiva ad una deprivazione di sonno di 40h (in rosso). Il riquadro inferiore presenta una simulazione dell'andamento del processo S in una serie di tre notti con 8h di sonno ciascuna (in blu), durante una deprivazione di sonno di 40h (in rosso) e in seguito ad una fase di sonno pomeridiana di 2h (in rosa).



From: Tononi and Cirelli; *sleep med. rev.* 2006; 10 (1); 49-62

Figura 4. Rappresentazione grafica della teoria dell'omeostasi sinaptica; nel riquadro a sinistra sono rappresentati gli eventi della fase di veglia, con il potenziamento delle connessioni sinaptiche, mentre nel riquadro di destra è rappresentata la rimodulazione della forza sinaptica che avviene nella fase SWA del sonno.



Melvin and Andrews, *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(10):490-8

Figura 5. La figura mostra un dendrogramma evolutivo di 8 famiglie di mammiferi alcuni componenti delle quali mostrano stati di ipometabolismo. In rosso gli animali che mostrano ibernazione, in verde quelli che mostrano torpore, in blu quelli che entrano in torpore in seguito a digiuno prolungato, in giallo quelli che entrano in estivazione.

Figura 6. La figura mostra l'attuale circuito di controllo dell'attività simpatica termoregolatoria. Nel rettangolo viola è evidenziata la regione del bulbo rostro ventromediale (fra cui il nucleo del Raphe Pallidus (RPa)), area chiave nel mediare le efferenze simpatiche ai vari organi effettori, fra cui I vasi cutanei, il tessuto adiposo bruno (BAT) e il muscolo scheletrico.

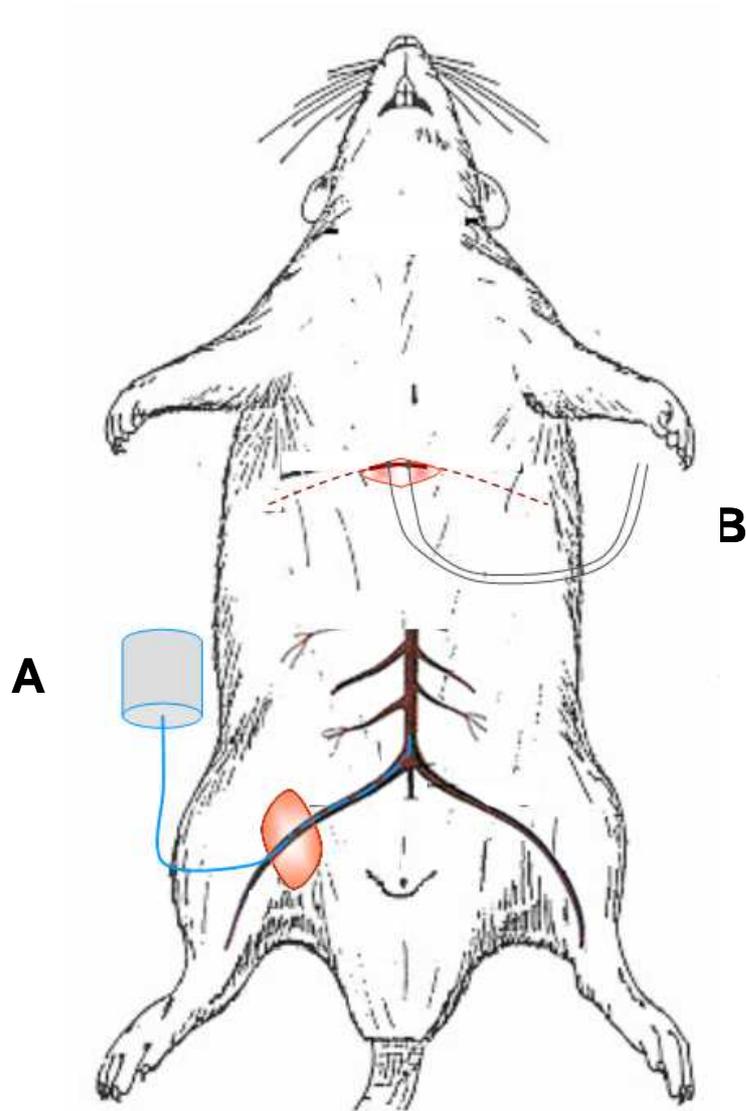


Figura 7: La figura mostra uno schema esemplificativo dell'impianto chirurgico del catetere per la rilevazione telemetrica della pressione arteriosa nell'arteria femorale (A) e degli elettrodi per la registrazione dell'elettromiogramma diaframmatico (B).

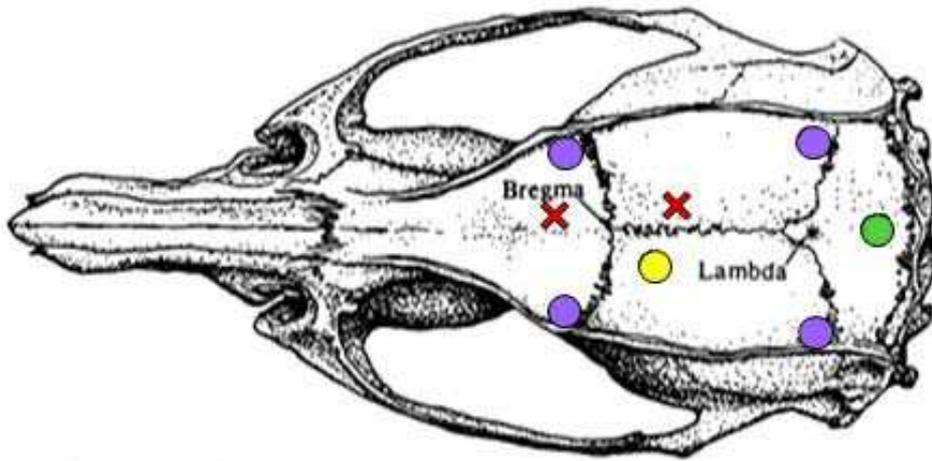


Figura 8. Schema dell'impianto chirurgico cranico. Visione dorsale del cranio del ratto che mostra i punti in cui sono state effettuate le craniotomie durante l'intervento chirurgico sull'animale in anestesia generale. Sono state posizionate 4 viti (viola) per l'ancoraggio dell'impianto, due nella porzione antero-laterale delle ossa frontali, due nella porzione postero-laterale delle ossa parietali; 2 elettrodi per la rilevazione del segnale elettroencefalografico (EEG; croce), una a +3.00 mm antero-posteriore dal bregma e +3.00 mm laterale, una nell'osso parietale a -4.00 mm dal bregma e 1.00 mm laterale; 1 termistore (giallo) per la rilevazione della temperatura ipotalamica a -1.00 mm dal bregma e 1.00 mm laterale; 1 cannula (verde) in corrispondenza della regione RVMM a -2,5/-3.00 mm da lambda, 0 mm laterale e -9.00/-9.5 mm in senso dorso-ventrale dalla superficie del cervelletto.

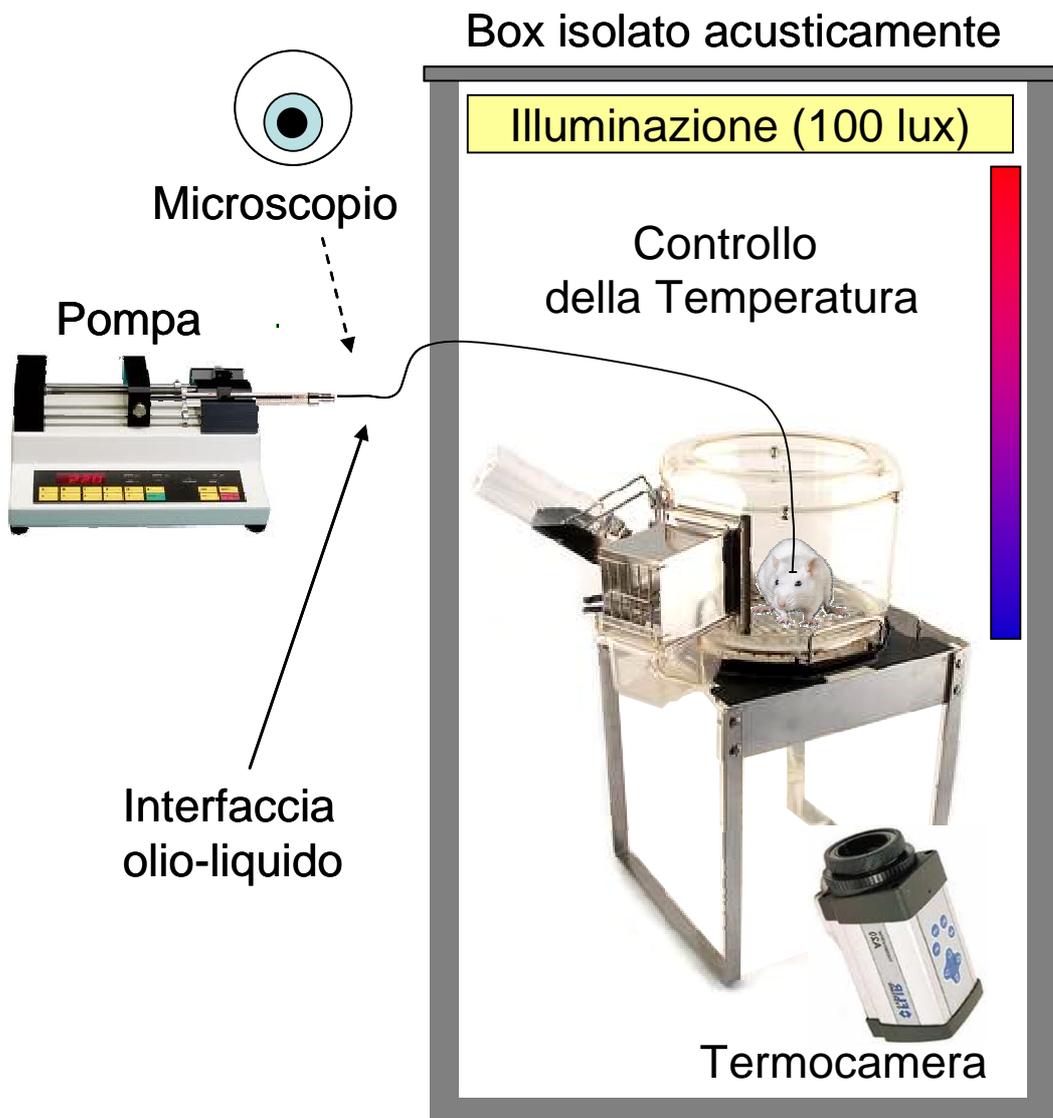


Figura 9. Rappresentazione schematica dell'apparato di microiniezione nel ratto libero di muoversi. L'isolamento del box e il posizionamento dell'apparato di iniezione al di fuori del box stesso consentono di effettuare iniezioni senza disturbare direttamente l'animale. I dettagli della procedura sono descritti nella sezione Materiali e Metodi.

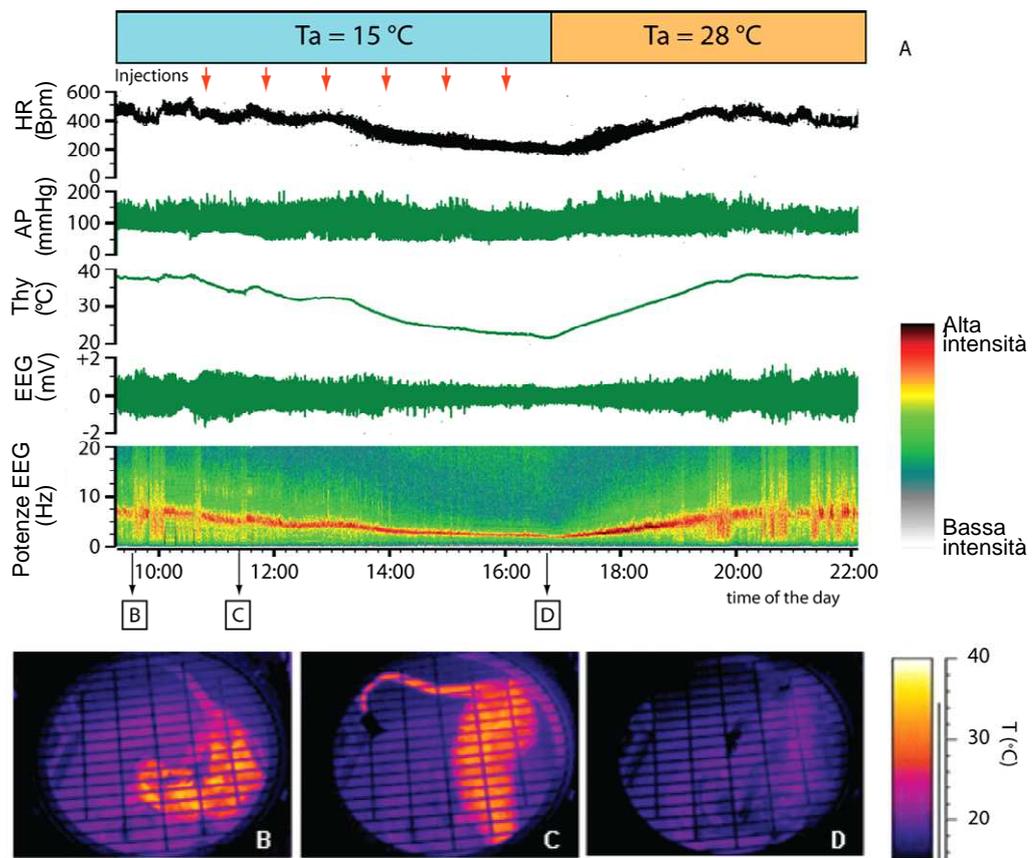


Figura 10. Esempio di tracciato durante le prime 13 h della giornata di induzione dell'ipotermia: nella prima finestra (A) sono riportate la temperatura ambientale (Ta) cui il ratto è esposto, la frequenza cardiaca (FC), la pressione arteriosa (PA), la temperatura ipotalamica (THY), l'elettroencefalogramma (EEG) e lo spettro delle potenze dell'elettroencefalogramma., la cui intensità è indicata da una scala cromatica che va dal grigio (bassa intensità) al nero (alta intensità). Il momento in cui avviene ciascuna iniezione di muscimolo è indicato da una freccia rossa. Le finestre B, C e D sono foto all'infrarosso scattate rispettivamente nelle fasi contrassegnate con le lettere B, C e D dell'esperimento.

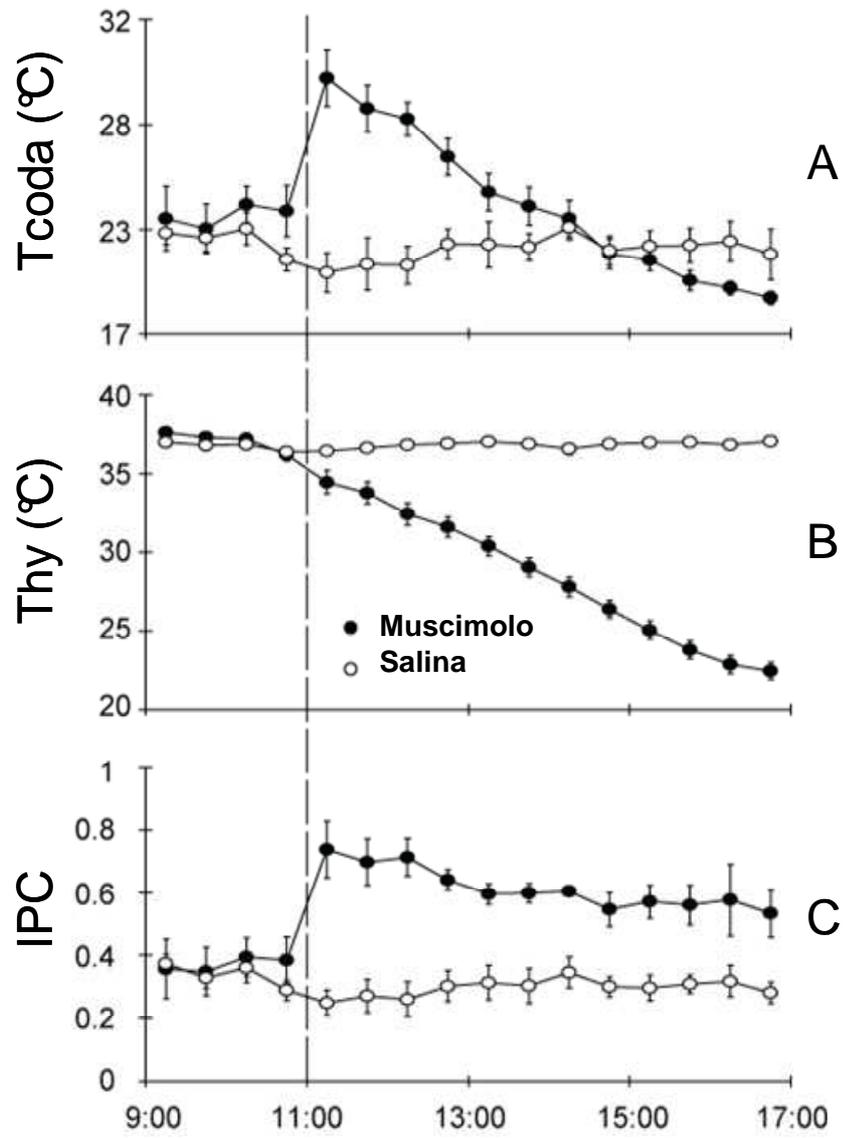
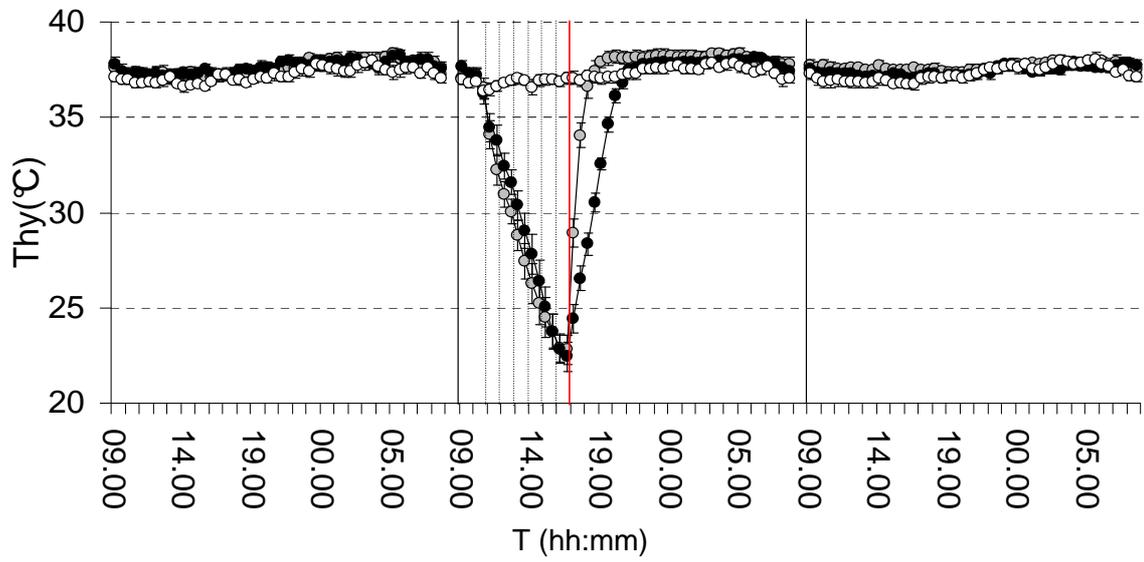


Figura 11. La figura mostra una serie di grafici raffiguranti l'andamento medio della temperatura della coda (Tcoda, A), l'andamento medio della temperatura ipotalamica (Thy, B) e l'andamento medio della l'indice di perdita di calore (IPC,C). I punti bianchi rappresentano gli animali trattati con la salina a 28 °C, mentre i punti neri gli animali trattati con il muscimolo a 28 °C, la linea tratteggiata mostra il momento dell'iniezione.

Temperatura ipotalamica



Temperatura ipotalamica (dettaglio del giorno di iniezione)

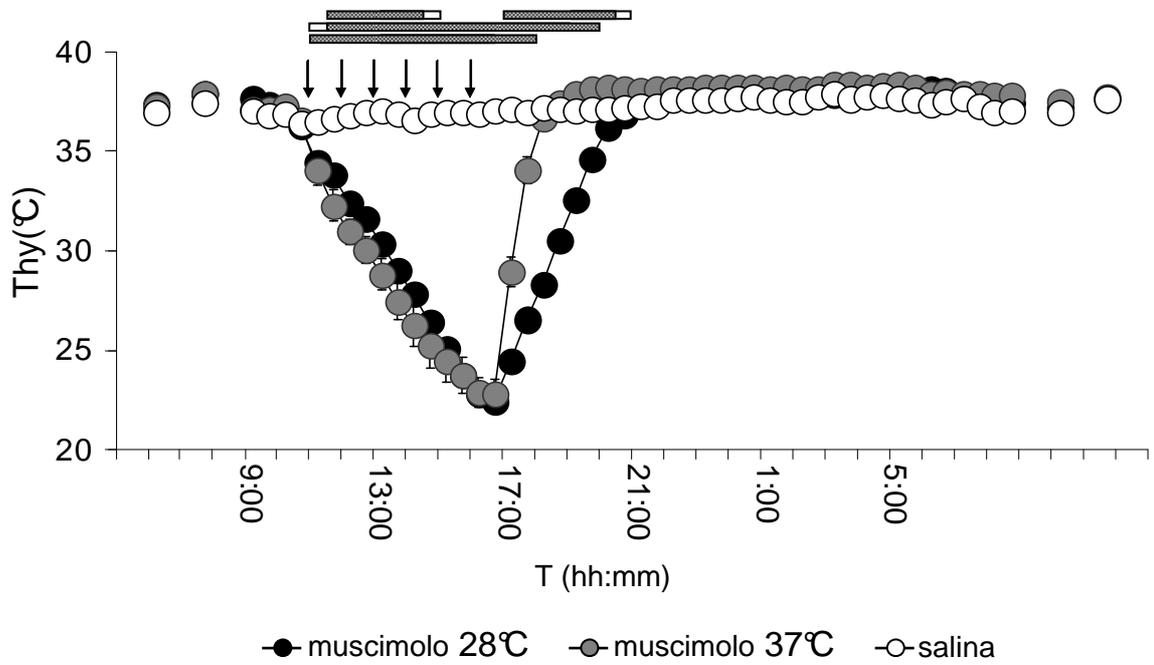
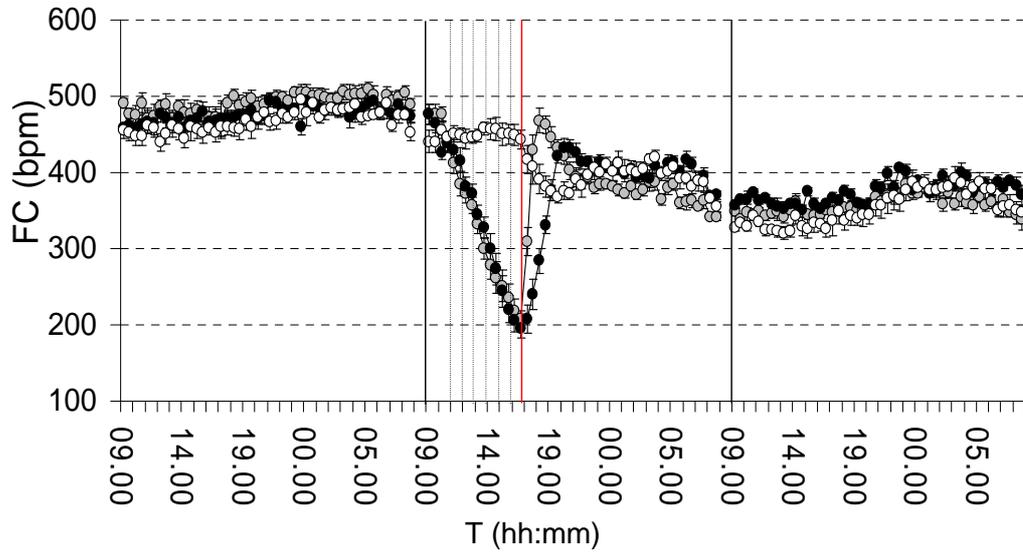


Figura 12. Il riquadro in alto mostra l'andamento della temperatura ipotalamica (Thy) durante i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio della temperatura ipotalamica (Thy) durante le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Frequenza cardiaca



Frequenza cardiaca (dettaglio del giorno di iniezione)

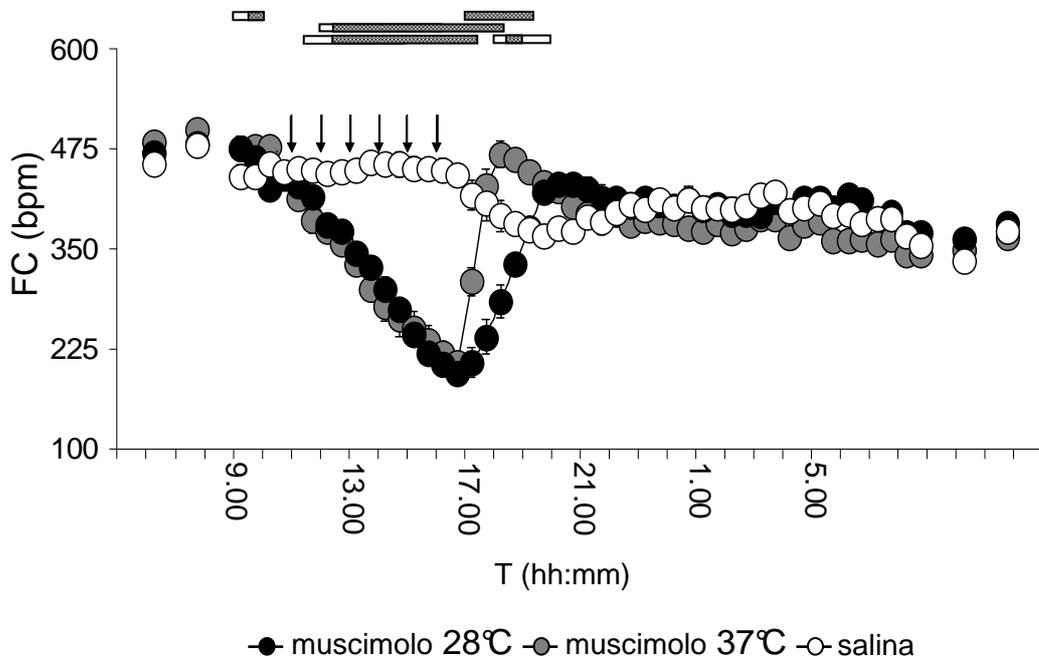
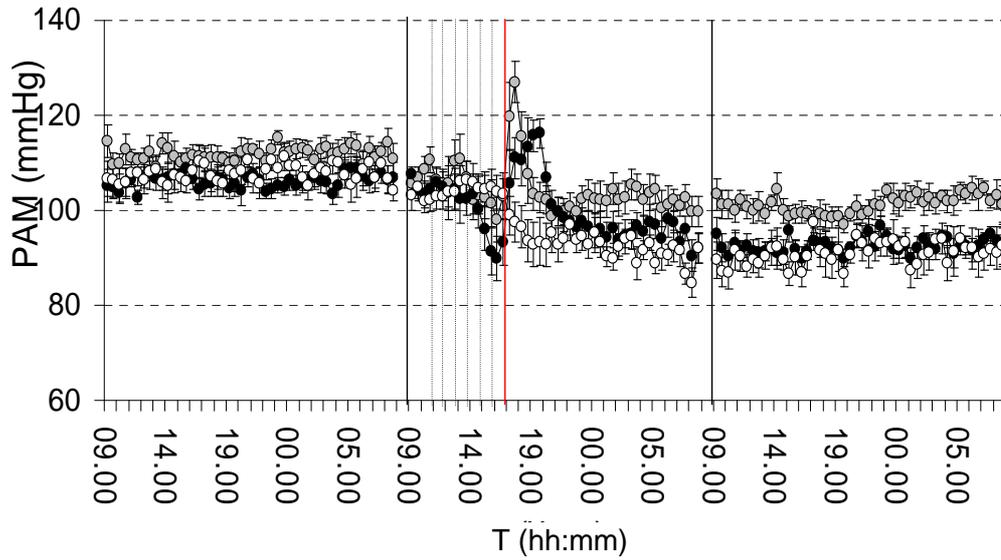


Figura 13. Il riquadro in alto mostra l'andamento della temperatura frequenza cardiaca (FC) durante i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio della frequenza cardiaca (FC) durante le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$

Pressione Arteriosa Media



Pressione Arteriosa Media (dettaglio del giorno di iniezione)

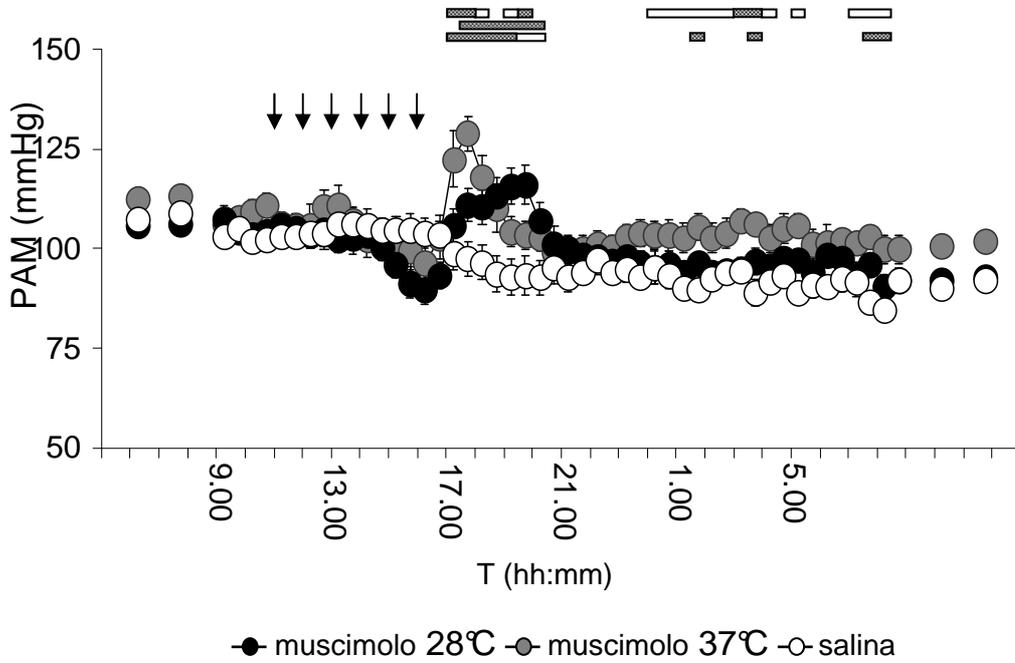
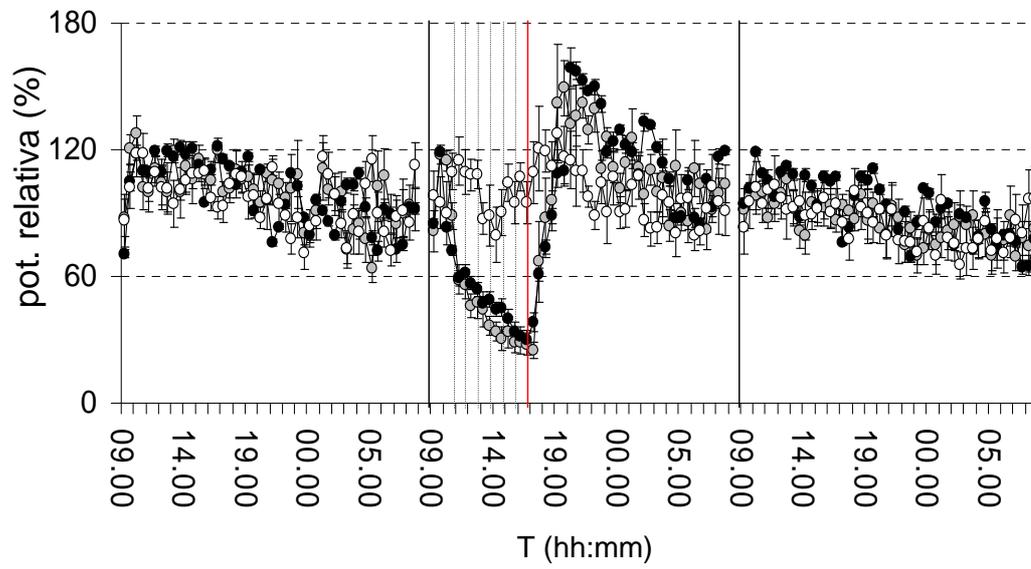


Figura 14. Il riquadro in alto mostra l'andamento della pressione arteriosa media (PAM) durante i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio della pressione arteriosa media (PAM) durante le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Potenza totale dell'EEG



Potenza totale dell'EEG (dettaglio del giorno di iniezione)

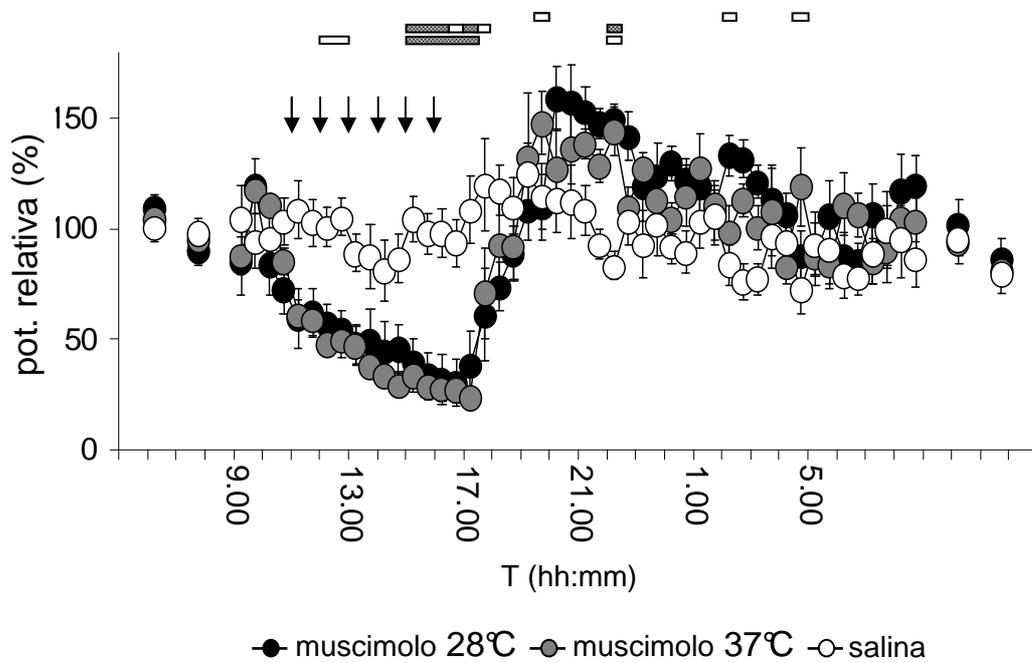
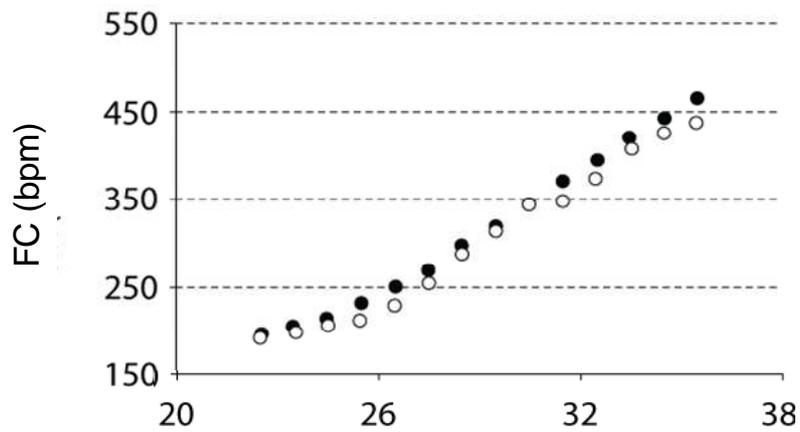


Figura 15. Il riquadro in alto mostra l'andamento medio della potenza totale dell'EEG (PTE) durante i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio potenza totale dell'EEG (PTE) durante le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Rapporto tra frequenza cardiaca e temperatura ipotalamica



Rapporto tra pressione arteriosa media e temperatura ipotalamica

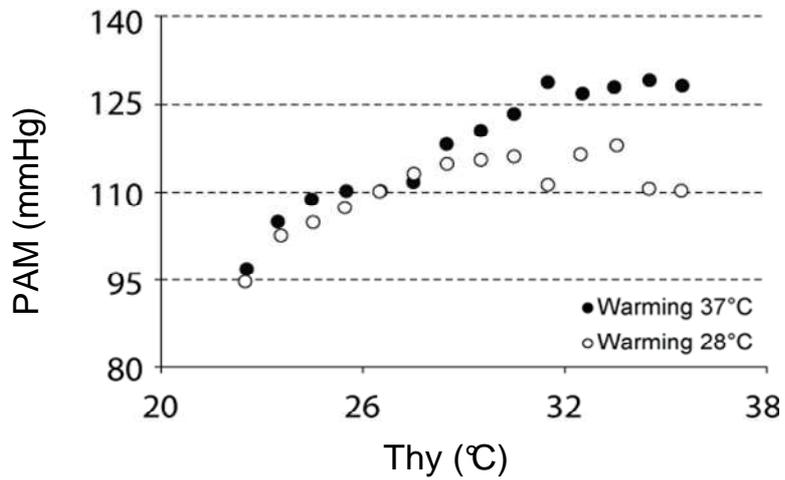


Figura 16. La figura nel pannello superiore mostra il rapporto tra l'andamento della FC e della Thy (pannello superiore) e il rapporto tra l'andamento della PAM e della Thy (pannello inferiore) nelle fasi immediatamente successive la fine dell'ipotermia, nei due gruppi di animali: trattati con muscimolo e riscaldati a 28°C (gruppo A, punti bianchi) e trattati con muscimolo e riscaldati a 37°C per un'ora (gruppo B, punti neri).

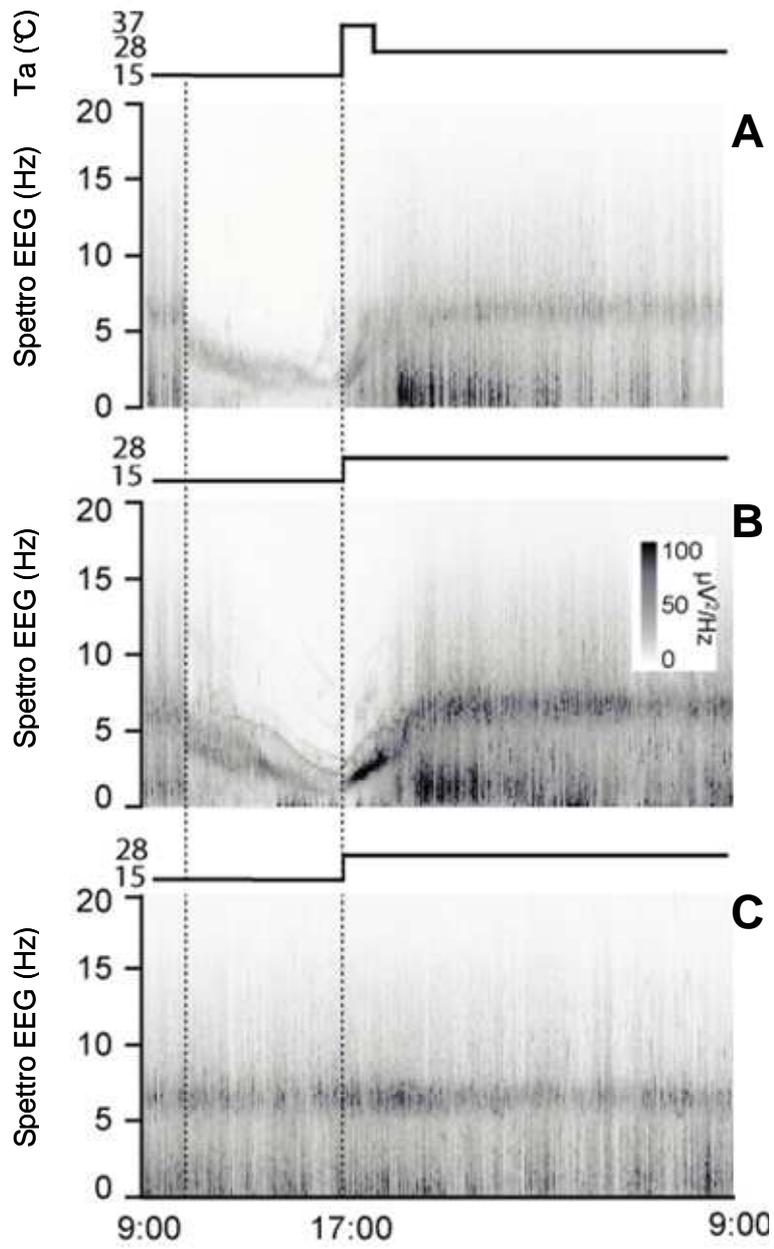


Figura 17. La figura mostra l'andamento medio normalizzato dello spettrogramma dell'EEG durante la giornata di iniezione degli animali trattati con muscimolo e riscaldati ad una Ta di 37°C per 90' (A), degli animali trattati con muscimolo e riscaldati ad una Ta di 28°C (B) e di quelli del gruppo di controllo (C). L'inizio e la fine del trattamento sono indicati dalle linee tratteggiate. Sopra ad ogni spettrogramma viene riportato l'andamento della temperatura (Ta) durante le 24h prese in esame.

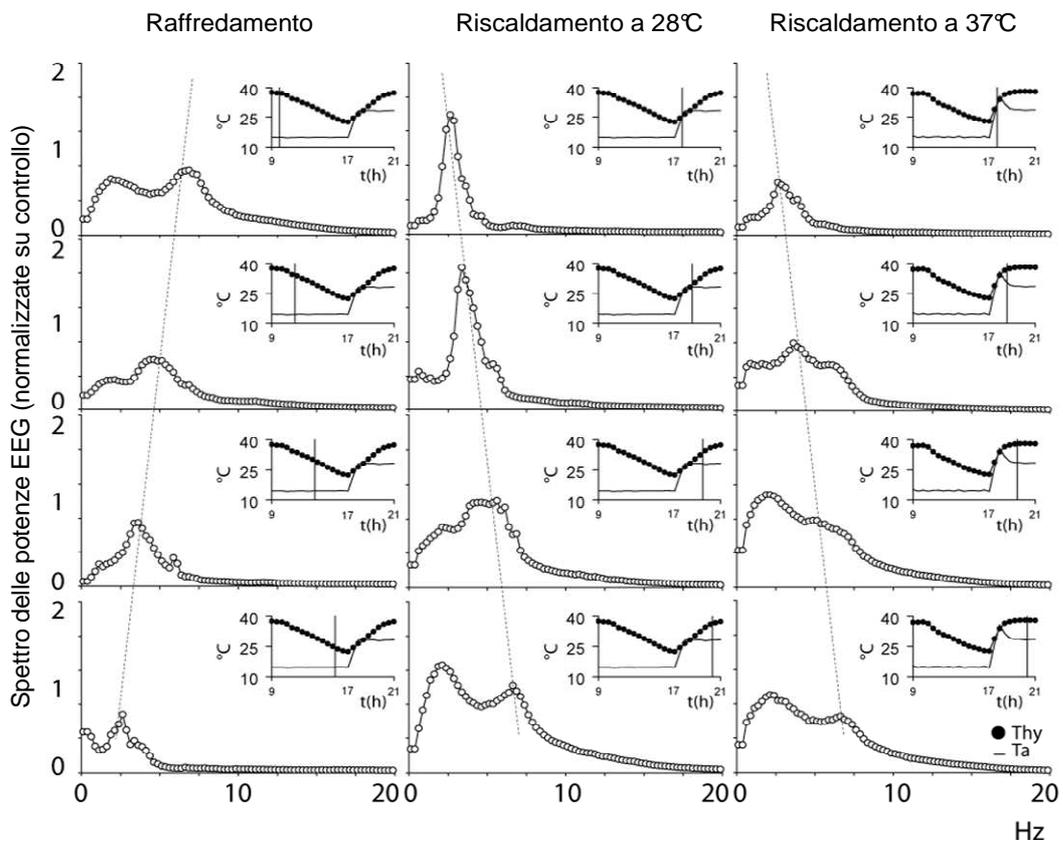
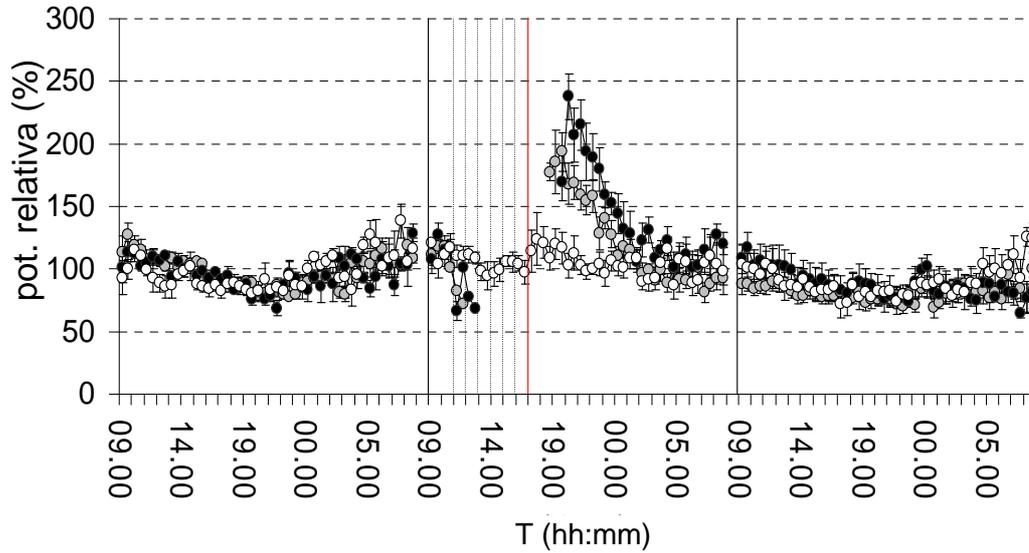


Figura 18. La figura mostra una serie di grafici raffiguranti la distribuzione delle frequenze dello spettro EEG in vari momenti (indicati nei riquadri piccoli presenti in alto a destra; in particolare la linea verticale indica il momento della giornata cui fa riferimento ciascun grafico; per completezza vengono riportati anche l'andamento della potenza totale dell'EEG e la T_a). I grafici nella colonna di sinistra sono relativi alla fase di raffreddamento, quelli della colonna centrale sono relativi alla fase di riscaldamento degli animali dell'esperimento A e quelli nella colonna di destra sono relativi la fase di riscaldamento dell'esperimento B.

Potenza della banda Delta nel sonno NREM



**Potenza della banda Delta nel sonno NREM
(dettaglio del giorno di iniezione)**

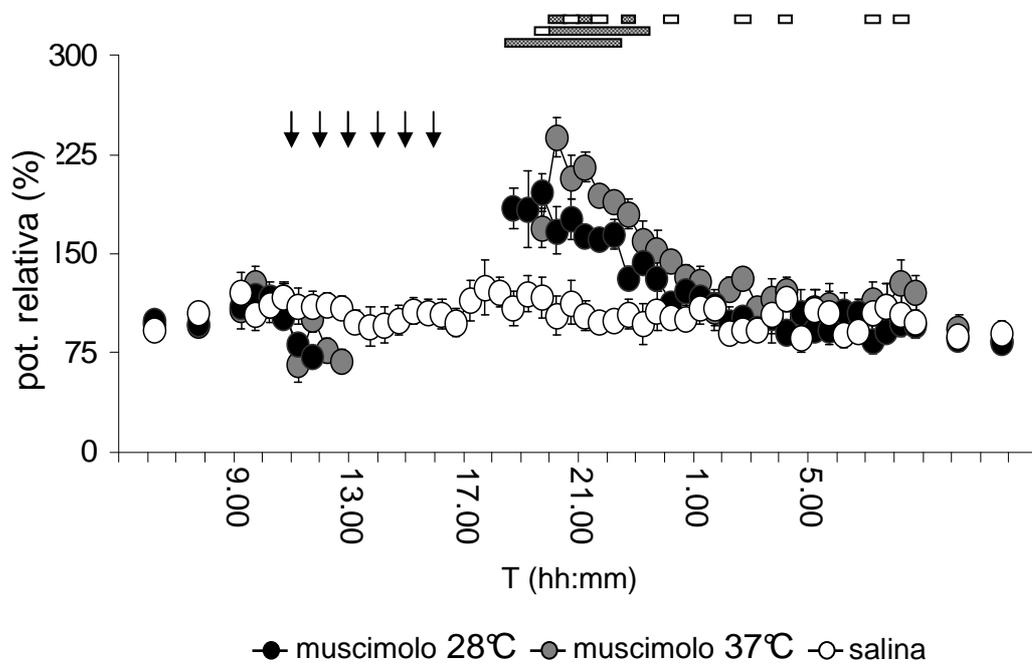
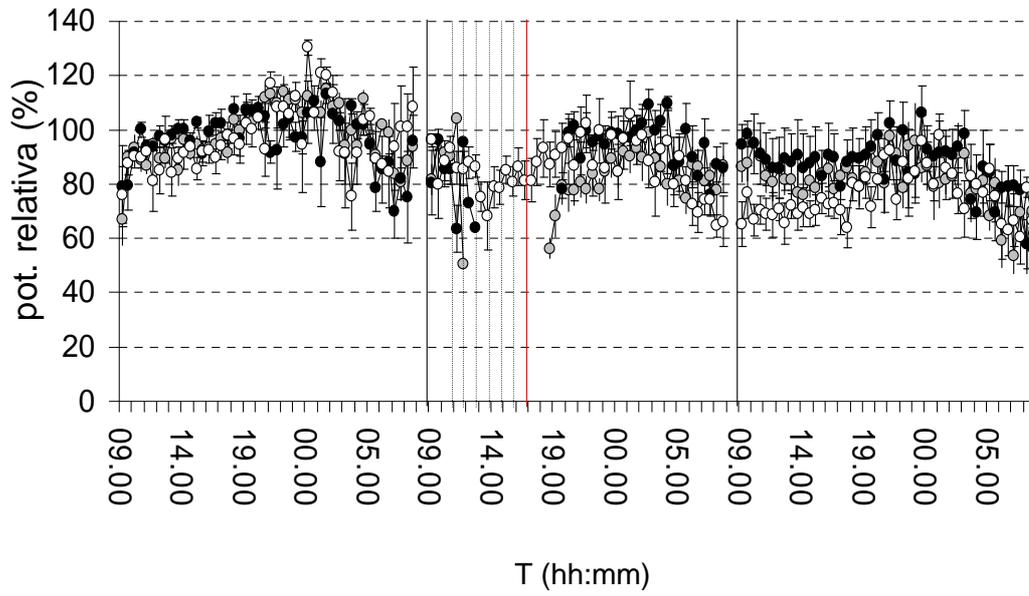


Figura 19. Il riquadro in alto mostra l'andamento medio della potenza della banda Delta dell'EEG durante il sonno NREM nei i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio potenza della banda Delta dell'EEG durante il sonno NREM nelle le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$

Potenza della banda Sigma nel sonno NREM



Potenza della banda Sigma nel sonno NREM (dettaglio del giorno di iniezione)

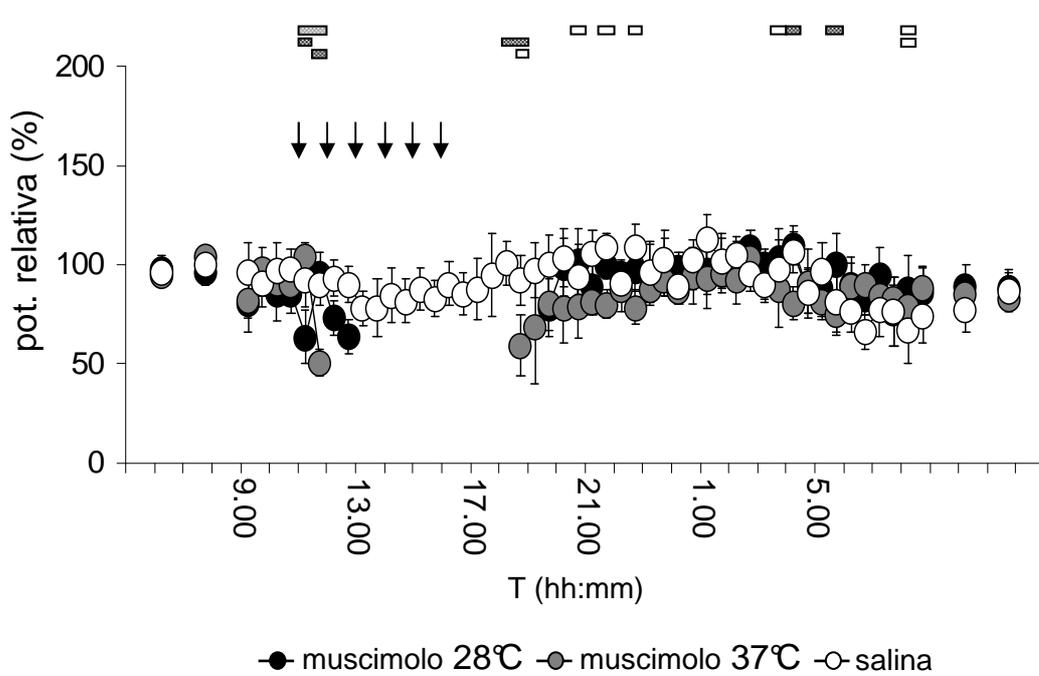
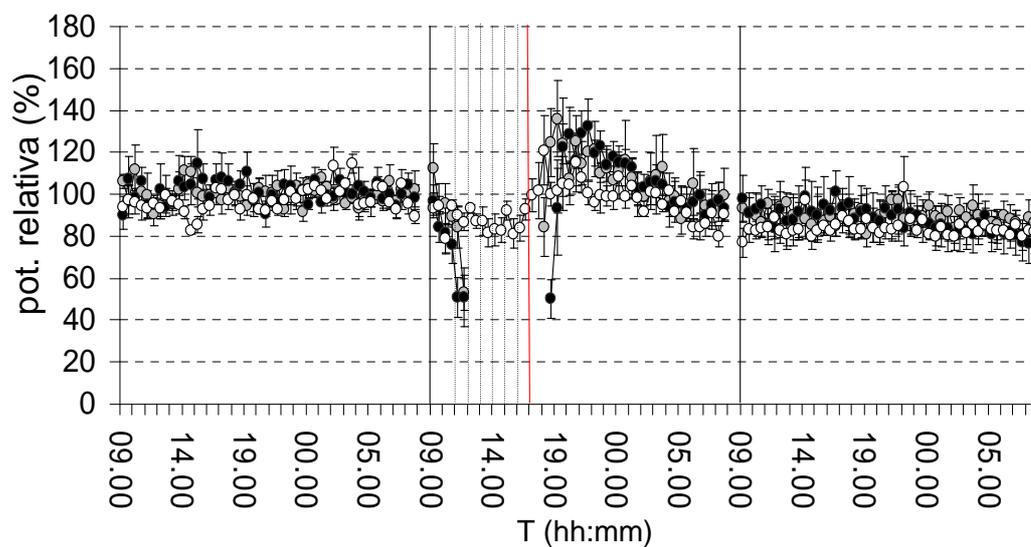


Figura 20. Il riquadro in alto mostra l'andamento medio della potenza della banda Sigma dell'EEG durante il sonno NREM nei tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio potenza della banda Sigma dell'EEG durante il sonno NREM nelle 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Potenza della banda Theta in veglia



Potenza della banda Theta in veglia (dettaglio del giorno di iniezione)

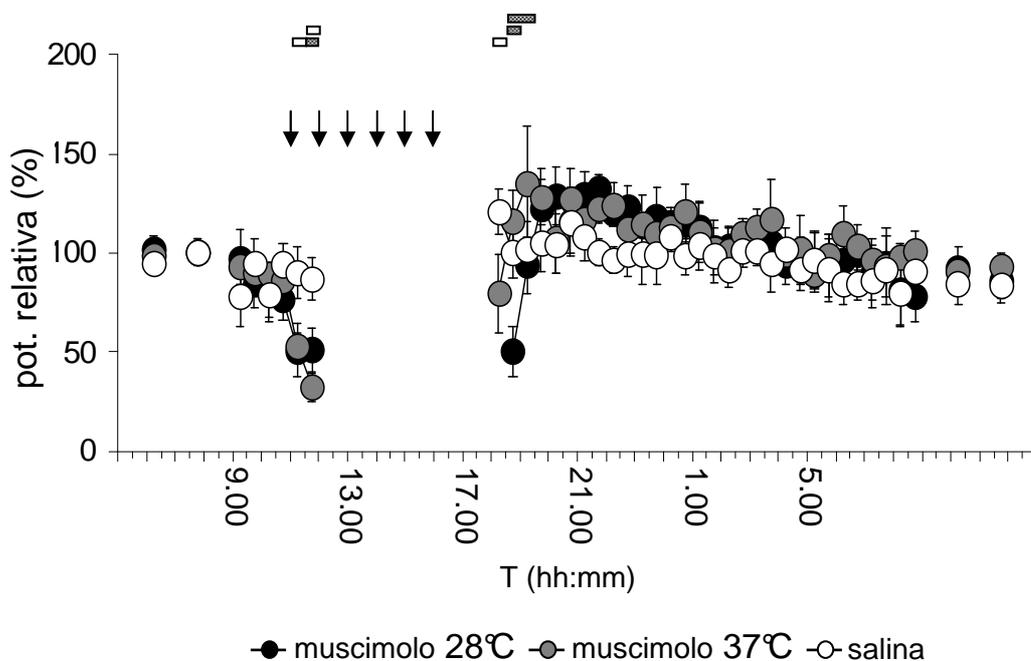
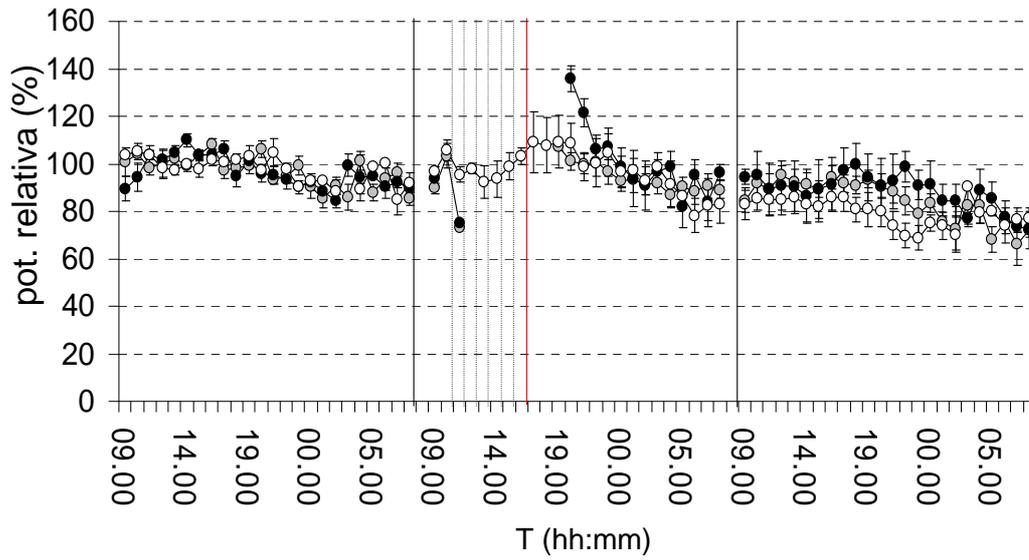


Figura 21. Il riquadro in alto mostra l'andamento medio della potenza della banda Theta dell'EEG durante la veglia nei i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio potenza della banda Theta dell'EEG durante la veglia nelle le 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Potenza della banda Theta nel sonno REM



Potenza della banda Theta nel sonno REM (dettaglio del giorno di iniezione)

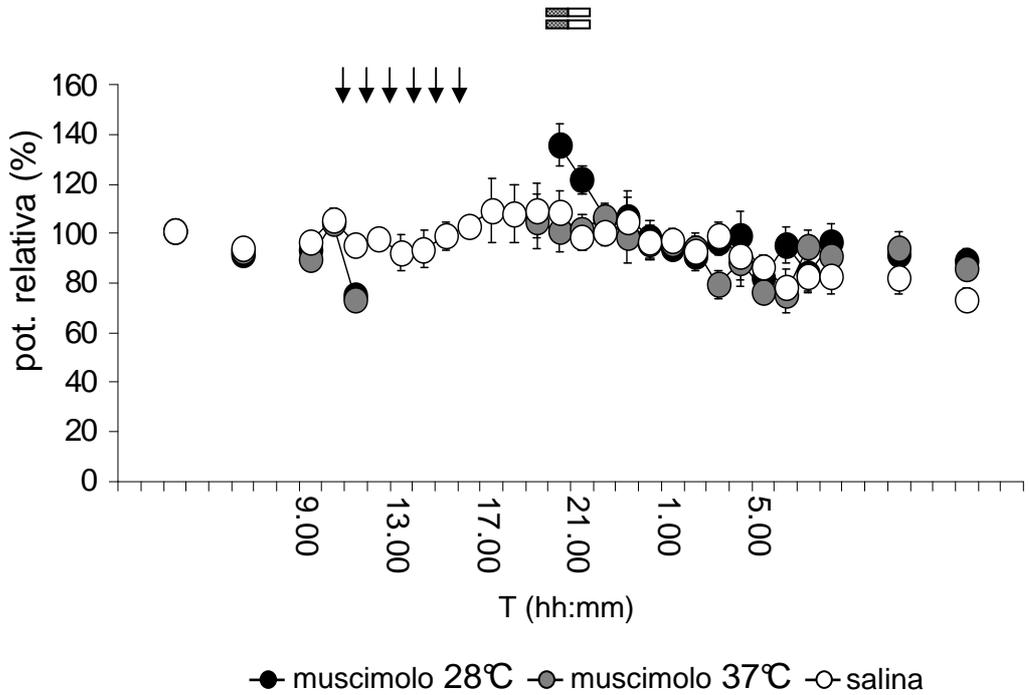
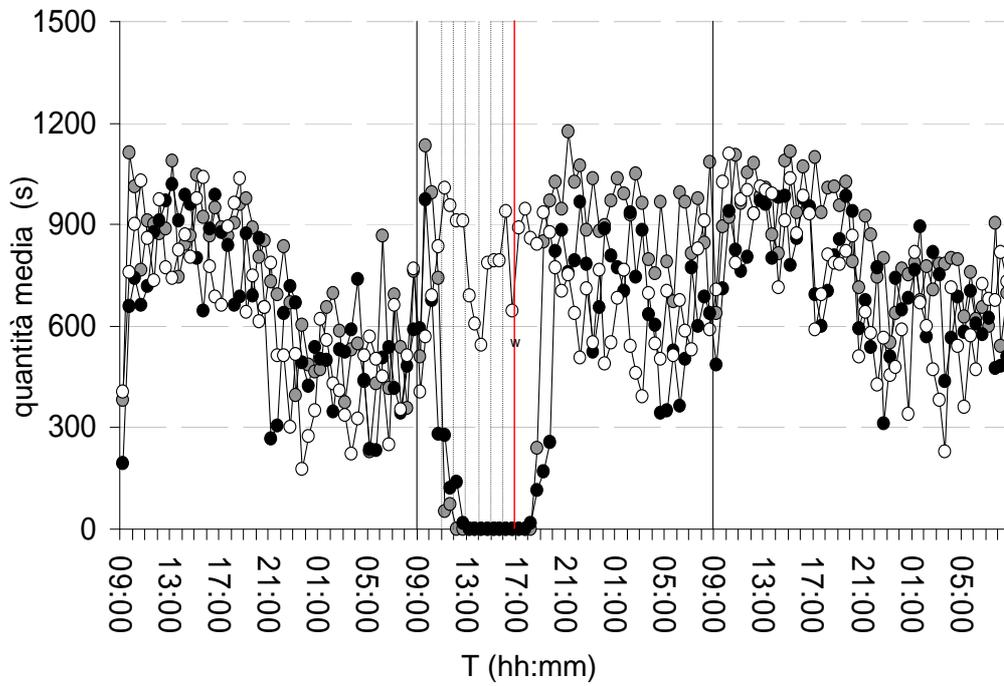


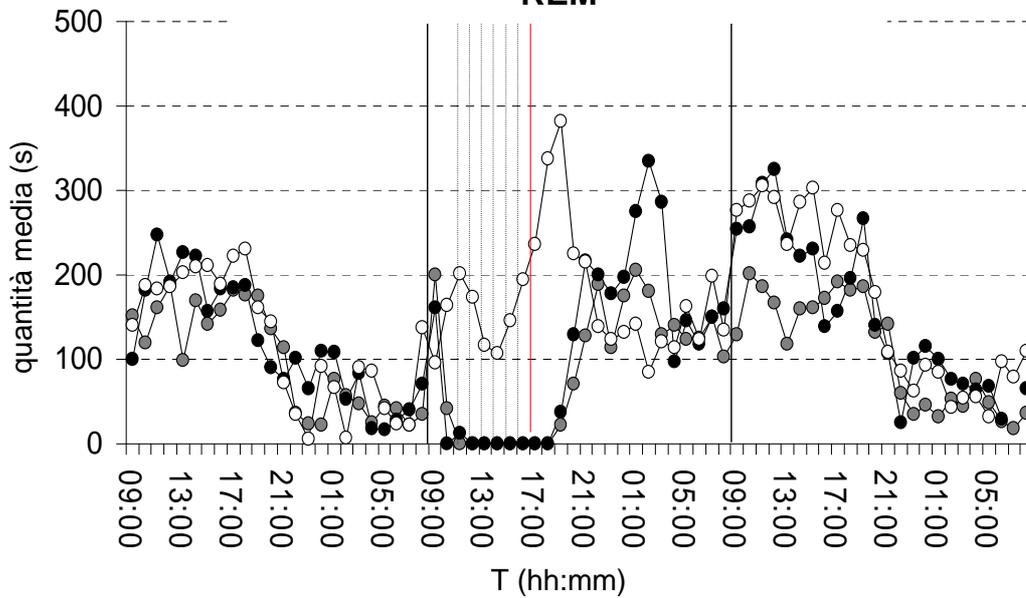
Figura 22. Il riquadro in alto mostra l'andamento medio della potenza della banda Theta dell'EEG durante il sonno REM nei tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue) del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e del gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata.

Il secondo riquadro mostra l'andamento medio potenza della banda Theta dell'EEG durante il sonno REM nelle 24 ore del giorno di iniezione; lateralmente sono riportate le medie, calcolate su una finestra di 12h, registrate nel giorno di controllo (a sinistra) e in quello di recupero (a destra), nei tre gruppi sperimentali. Le frecce indicano i momenti delle iniezioni, mentre le barre indicano dove i confronti tra i diversi gruppi sperimentali risultano significativi: dall'alto verso il basso sono stati confrontati muscimolo 28°C vs muscimolo 37°C, muscimolo 28°C vs salina e muscimolo 37°C vs salina. Le barre grigie indicano una significatività per $P < 0,01$ e bianche $P < 0,05$.

Andamento della quantità di sonno NREM



Andamento della quantità di sonno REM

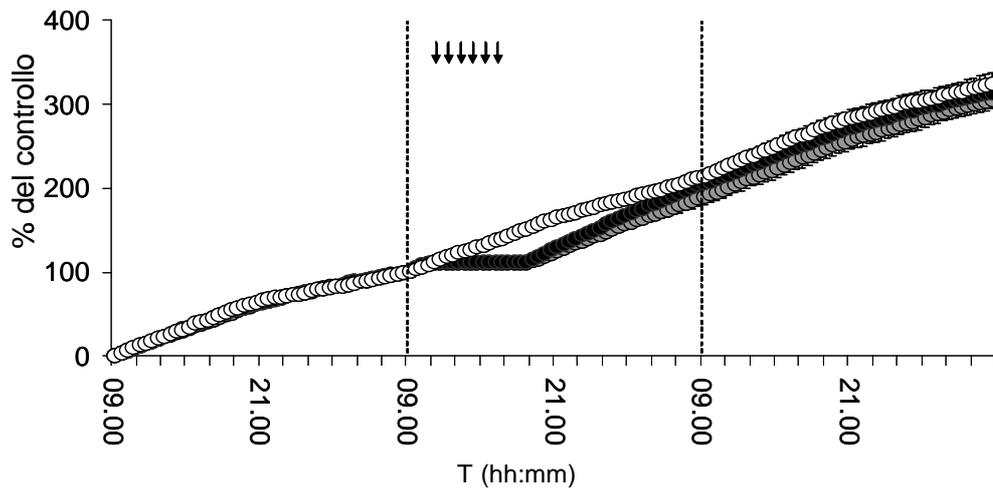


● muscimolo 28°C ● muscimolo 37°C ○ salina

Figura 23. Nel pannello superiore è esposto l'andamento del sonno NREM durante i tre giorni di registrazione (separati dalle linee nere continue); i valori sono espressi come media (calcolata su una finestra di 30') del sonno NREM del gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), dal gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e dal gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 37°C per un'ora (punti grigi). Le linee tratteggiate indicano i momenti delle iniezioni, la linea rossa continua il momento in cui la temperatura nel box viene cambiata da 15°C a 28°C.

Nel pannello inferiore gli stessi dati sono stati riportati per il sonno REM; i valori sono espressi come media oraria del sonno REM degli animali di ciascun gruppo durante il giorno di controllo.

Andamento cumulativo del sonno NREM



Andamento cumulativo del sonno REM

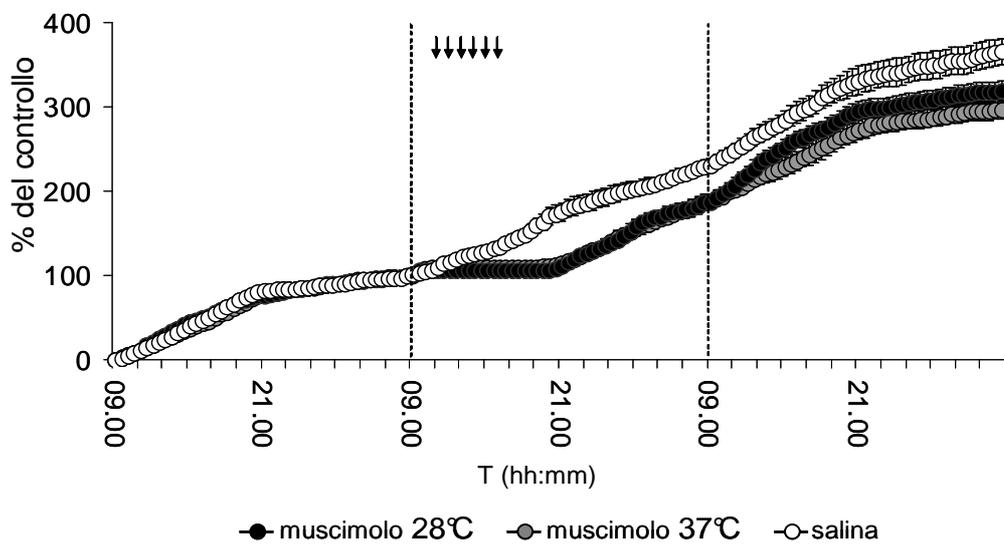


Figura 24. La figura mostra, nel pannello in alto l'incremento nella quantità di sonno NREM prodotto nei tre giorni (B, I e R) dell'esperimento dal gruppo di animali iniettati con salina (punti bianchi), dal gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 28°C (punti neri) e dal gruppo di animali iniettati con muscimolo e riscaldati a 35°C per un'ora (punti grigi). Le frecce indicano i momenti delle iniezioni.

Nel pannello inferiore è riportato invece l'incremento prodotto nella quantità di sonno REM. I dati sono calcolati come percentuale della quantità totale di ciascuno stato prodotto dal gruppo di controllo per ogni giornata.

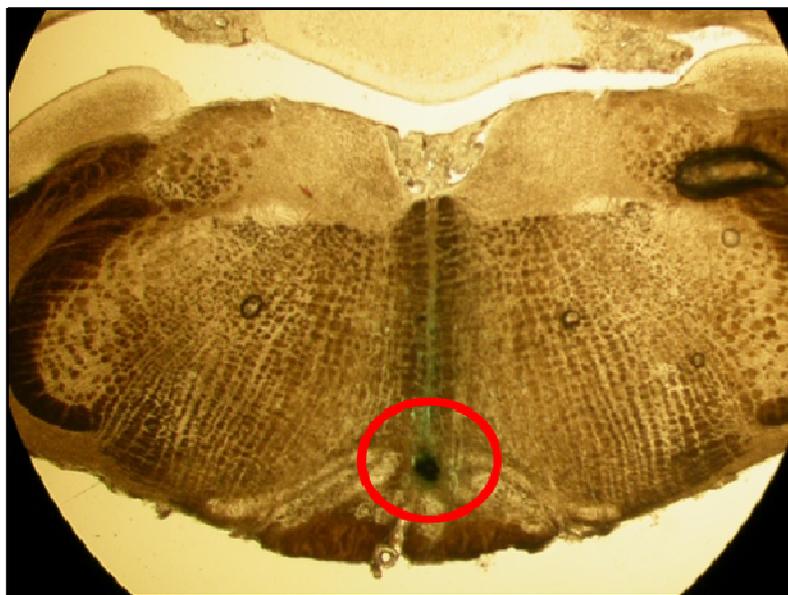
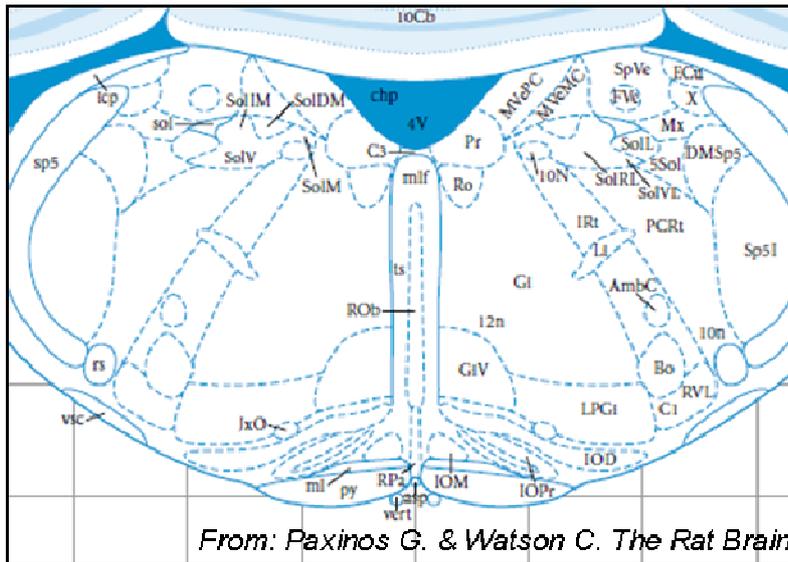


Figura 25. Nel riquadro in alto è riportato un diagramma raffigurante una sezione coronale del tronco dell'encefalo (Bregma - 12,48), e la corrispondente sezione istologica, in cui è evidenziato (in rosso) il sito di iniezione, identificato dalla macchia scura prodotta dal colorante Fastgreen.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alhola P & Polo-Kantola P. (2007). Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatr Dis Treat* **3**, 553-567.
- Almeida MC, Hew-Butler T, Soriano RN, Rao S, Wang W, Wang J, Tamayo N, Oliveira DL, Nucci TB, Aryal P, Garami A, Bautista D, Gavva NR & Romanovsky AA. Pharmacological Blockade of the Cold Receptor TRPM8 Attenuates Autonomic and Behavioral Cold Defenses and Decreases Deep Body Temperature. *J Neurosci* **32**, 2086-2099.
- Almeida MC, Hew-Butler T, Soriano RN, Rao S, Wang W, Wang J, Tamayo N, Oliveira DL, Nucci TB, Aryal P, Garami A, Bautista D, Gavva NR & Romanovsky AA. Pharmacological Blockade of the Cold Receptor TRPM8 Attenuates Autonomic and Behavioral Cold Defenses and Decreases Deep Body Temperature. *J Neurosci* **32**, 2086-2099.
- Amici R, Cerri M, Ocampo-Garces A, Baracchi F, Dentico D, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL & Zamboni G. (2008). Cold exposure and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size. *Sleep* **31**, 708-715.
- Bicego KC, Barros RC & Branco LG. (2007). Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **147**, 616-639.
- Blackstone E, Morrison M & Roth MB. (2005). H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* **308**, 518.
- Blessing WW & Nalivaiko E. (2001). Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. *Neuroscience* **105**, 923-929.

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
Boulant JA. (2006). Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* **100**, 1347-1354.

Bouma HR, Verhaag EM, Otis JP, Heldmaier G, Swoap SJ, Strijkstra AM, Henning RH & Carey HV. Induction of torpor: mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications. *J Cell Physiol* **227**, 1285-1290.

Calvert JW, Coetzee WA & Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection. *Antioxid Redox Signal* **12**, 1203-1217.

Cannon B & Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359.

Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF & Sved AF. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* **460**, 303-326.

Carey HV, Andrews MT & Martin SL. (2003). Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* **83**, 1153-1181.

Cerri M, Ocampo-Garcés A, Amici R, Baracchi F, Capitani P, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL & Zamboni G. (2005). Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep* **28**, 694-705.

- Cerri M, Zamboni G, Tupone D, Dentico D, Luppi M, Martelli D, Perez E & Amici R. Cutaneous vasodilation elicited by disinhibition of the caudal portion of the rostral ventromedial medulla of the free-behaving rat. *Neuroscience* **165**, 984-995.
- Collin A, Buyse J, van As P, Darras VM, Malheiros RD, Moraes VM, Reyns GE, Taouis M & Decuypere E. (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen Comp Endocrinol* **130**, 70-77.
- Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU & Heldmaier G. (2004). Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature* **429**, 825-826.
- Deboer T & Tobler I. (1994). Sleep EEG after daily torpor in the Djungarian hamster: similarity to the effect of sleep deprivation. *Neurosci Lett* **166**, 35-38.
- Endo T, Roth C, Landolt HP, Werth E, Aeschbach D, Achermann P & Borbely AA. (1998). Selective REM sleep deprivation in humans: effects on sleep and sleep EEG. *Am J Physiol* **274**, R1186-1194.
- Glotzbach SF & Heller HC. (1976). Central nervous regulation of body temperature during sleep. *Science* **194**, 537-539.
- Gordon CJ. (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**, 963-991.
- Heldmaier G, Ortman S & Elvert R. (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol* **141**, 317-329.

- Kerman IA, Akil H & Watson SJ. (2006). Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study. *J Neurosci* **26**, 3423-3433.
- Lee CC. (2008). Is human hibernation possible? *Annu Rev Med* **59**, 177-186.
- Luppi M, Martelli D, Amici R, Baracchi F, Cerri M, Dentico D, Perez E & Zamboni G. Hypothalamic osmoregulation is maintained across the wake-sleep cycle in the rat. *J Sleep Res* **19**, 394-399.
- Madden CJ & Morrison SF. (2008). Brown adipose tissue sympathetic nerve activity is potentiated by activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A/5-HT7} receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology* **54**, 487-496.
- Massimini M, Rosanova M & Mariotti M. (2003). EEG slow (approximately 1 Hz) waves are associated with nonstationarity of thalamo-cortical sensory processing in the sleeping human. *J Neurophysiol* **89**, 1205-1213.
- Massimini M, Rosanova M & Mariotti M. (2003). EEG slow (approximately 1 Hz) waves are associated with nonstationarity of thalamo-cortical sensory processing in the sleeping human. *J Neurophysiol* **89**, 1205-1213.
- Meerlo P, de Bruin EA, Strijkstra AM & Daan S. (2001). A social conflict increases EEG slow-wave activity during subsequent sleep. *Physiol Behav* **73**, 331-335.
- Melvin RG & Andrews MT. (2009). Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 490-498.
- Milde LN. (1992). Clinical use of mild hypothermia for brain protection: a dream revisited. *J Neurosurg Anesthesiol* **4**, 211-215.

- Morrison SF. (2001). Differential control of sympathetic outflow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R683-698.
- Morrison SF. (2003). Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience* **121**, 17-24.
- Morrison SF, Nakamura K & Madden CJ. (2008). Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93**, 773-797.
- Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S & Kaneko T. (2005). Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neurosci Res* **51**, 1-8.
- Nakamura K & Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8848-8853.
- Parmeggiani PL, Cianci T, Calasso M, Zamboni G & Perez E. (1980). Quantitative analysis of short term deprivation and recovery of desynchronized sleep in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **50**, 293-302.
- Parmeggiani PL & Franzini C. (1971). Changes in the activity of hypothalamic units during sleep at different environmental temperatures. *Brain Res* **29**, 347-350.
- Parmeggiani P. L. 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.

- Rechtschaffen A & Bergmann BM. (1995). Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav Brain Res* **69**, 55-63.
- Romanovsky AA. (2007). Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R37-46.
- Romanovsky AA & Blatteis CM. (1996). Heat stroke: opioid-mediated mechanisms. *J Appl Physiol* **81**, 2565-2570.
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y & Tsujisaki M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531.
- Sgoifo A, Koolhaas J, De Boer S, Musso E, Stilli D, Buwalda B & Meerlo P. (1999). Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neurosci Biobehav Rev* **23**, 915-923.
- Siegel JM. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* **437**, 1264-1271.
- Standish A, Enquist LW, Escardo JA & Schwaber JS. (1995). Central neuronal circuit innervating the rat heart defined by transneuronal transport of pseudorabies virus. *J Neurosci* **15**, 1998-2012.
- Stitt JT. (1973). Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. *J Physiol* **232**, 163-179.

- Stornetta RL, Rosin DL, Simmons JR, McQuiston TJ, Vujovic N, Weston MC & Guyenet PG. (2005). Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and gamma-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. *J Comp Neurol* **492**, 477-494.
- Taheri S. (2007). Sleep and metabolism: bringing pieces of the jigsaw together. *Sleep Med Rev* **11**, 159-162.
- Tanaka M & McAllen RM. (2005). A subsidiary fever center in the medullary raphe? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1592-1598.
- Ter Horst GJ, Hautvast RW, De Jongste MJ & Korf J. (1996). Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat. *Eur J Neurosci* **8**, 2029-2041.
- Tononi G & Cirelli C. (2003). Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* **62**, 143-150.
- Toth IE, Toth DE, Boldogkoi Z, Hornyak A, Palkovits M & Blessing WW. (2006). Serotonin-synthesizing neurons in the rostral medullary raphe/parapyramidal region transneuronally labelled after injection of pseudorabies virus into the rat tail. *Neurochem Res* **31**, 277-286.
- Williams JW, Rudy TA, Yaksh TL & Viswanathan CT. (1977). An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. *Brain Res* **120**, 251-262.
- Wilz M & Heldmaier G. (2000). Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*. *J Comp Physiol B* **170**, 511-521.