

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 05/D1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/09

TITOLO TESI

ASPETTI CELLULARI E SISTEMICI  
DELL'ATTIVAZIONE E DELL'INIBIZIONE  
DEI NEURONI DEL RAPHE PALLIDUS

Presentata da: **Dott.ssa Alessia Di Cristoforo**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. Lucio Cocco**

**Prof. Roberto Amici**

**Esame finale anno 2017**

*A Marco Francesco*

# INDICE

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>9</b>
<b>1 RAPHE PALLIDUS .....</b>	<b>11</b>
1.1 <i>Anatomia del Raphe Pallidus.....</i>	<i>11</i>
1.2 <i>Regolazioni fisiologiche a livello del Raphe Pallidus.....</i>	<i>13</i>
1.2.1 Cenni sulla Termoregolazione.....	13
1.2.2 Il Raphe Pallidus e la termogenesi senza brivido .....	17
1.2.3 Il Raphe Pallidus e la termogenesi con brivido .....	20
1.2.4 Il Raphe Pallidus e la termogenesi nella comparsa dello stato febbrile .....	22
1.2.5 Il Raphe Pallidus e la vasomozione cutanea.....	24
1.2.6 Il Raphe Pallidus e il comportamento alimentare.....	26
<b>2 ATTIVAZIONE FARMACOLOGICA DEI NEURONI DEL RAPHE PALLIDUS .....</b>	<b>27</b>
2.1 <i>Effetti indotti dall'attivazione e/o disinibizione farmacologica dei neuroni del Raphe Pallidus .....</i>	<i>27</i>
2.2 <i>Neurochimica dell'Oressina .....</i>	<i>35</i>
2.2.1 Ruolo dei neuroni oressinergici nella regolazione degli stati di veglia e di sonno e nel comportamento alimentare .....	38
<b>3 INIBIZIONE FARMACOLOGICA DEI NEURONI DEL RAPHE PALLIDUS .....</b>	<b>42</b>
3.1 <i>Effetti indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni del Raphe Pallidus .....</i>	<i>42</i>
3.2 <i>La proteina Tau.....</i>	<i>48</i>
3.2.1 Iperfosforilazione della proteina Tau .....	51
<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>63</b>
<b>1 INTERVENTO CHRURGICO.....</b>	<b>65</b>
1.1 <i>Elettrodi.....</i>	<i>65</i>

1.2	<i>Termistori</i> .....	66
1.3	<i>Rilevazione della pressione arteriosa</i> .....	67
1.4	<i>Chirurgia</i> .....	67
<b>2</b>	<b>APPARATO DI REGISTRAZIONE</b> .....	<b>70</b>
2.1	<i>Box di registrazione</i> .....	70
<b>3</b>	<b>AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEI SEGNALI BIOELETTRICI</b> .....	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI</b> .....	<b>71</b>
4.1	<i>Modalità microiniezioni</i> .....	71
4.2	<i>Analisi istologica del sito di iniezione</i> .....	72
<b>5</b>	<b>PROCEDURA PER L'ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA</b> .....	<b>73</b>
5.1	<i>Perfusione intra-cardiaca</i> .....	73
5.2	<i>Analisi immunohistochemica</i> .....	74
5.3	<i>Analisi delle immagini</i> .....	76
<b>6</b>	<b>PIANO SPERIMENTALE</b> .....	<b>78</b>
6.1	<i>Esperimento A</i> .....	78
6.2	<i>Esperimento B</i> .....	80
<b>7</b>	<b>ANALISI STATISTICA</b> .....	<b>81</b>
7.1	<i>Esperimento A</i> .....	81
7.2	<i>Esperimento B</i> .....	82
	<b>RISULTATI</b> .....	<b>83</b>
<b>1</b>	<b>ESPERIMENTO A</b> .....	<b>85</b>
1.1	<i>EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL CICLO VEGLIA-SONNO</i> .....	85
1.2	<i>EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL COMPORTAMENTO ALIMENTARE</i> .....	87
1.3	<i>EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL GRADO DI ATTIVAZIONE DEI NEURONI SEROTONINERGICI DEL RPa</i> .....	88

<b>2</b>	<b>ESPERIMENTO B</b> .....	<b>90</b>
2.1	<i>EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL GRADO DI FOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA TAU</i> .....	90
	<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>93</b>
	<b>FIGURE</b> .....	<b>105</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>149</b>



# **RIASSUNTO**



Scopo della tesi è stato studiare nel ratto libero di muoversi i correlati comportamentali (modificazione degli stati veglia/sonno, assunzione di cibo) e della funzionalità cellulare nervosa centrale della manipolazione farmacologica locale del Raphe Pallidus (RPa), area sede di premotoneuroni simpatici che regolano processi inerenti la termogenesi.

Studi precedenti hanno mostrato, da un lato, che l'iniezione di Oressina A (ORXA) nel ratto a livello del RPa induce un aumento della temperatura cerebrale e della pressione arteriosa, ma solo in presenza di un drive termogenico in atto, indotto dall'esposizione a una temperatura ambientale ( $T_a$ ) sub-termoneutrale. Dall'altro lato, è stato invece osservato che l'inibizione del RPa, mediante iniezione di un agonista GABA-ergico (muscimolo, MUS), determina nel ratto, specie non-ibernante, un blocco della termogenesi inducendo uno stato ipotermico di pseudo torpore e un'ampia riduzione dell'attività elettrica corticale.

I risultati della tesi mostrano che l'iniezione di ORXA nel RPa a una  $T_a$  di  $24^{\circ}\text{C}$ , di poco inferiore al valore termoneutrale, induce un ampio e protratto aumento della veglia e un significativo aumento dell'assunzione di cibo. Gli effetti risveglianti sono meno intensi e l'assunzione di cibo non diversa da quella dei controlli dopo iniezione dell'antagonista GABA-ergico GABA-zina o di ORXA a  $T_a$   $32^{\circ}\text{C}$ . Un'indagine immunoistochimica condotta per verificare se tali effetti comportamentali fossero legati a un'attivazione dei neuroni serotoninergici del RPa ha dato risultati negativi.

Nel secondo esperimento, gli effetti indotti dall'ipotermia che segue un'inibizione del RPa con MUS sull'attività cellulare di aree cerebrali che regolano processi di vigilanza e funzione autonoma sono stati valutati attraverso lo studio immunoistochimico della proteina Tau, della quale è stata osservata un'iperfosforilazione reversibile indotta dal torpore in specie ibernanti.

I risultati ottenuti hanno mostrato nel ratto un andamento analogo a quello dell'ibernante

naturale, suggerendo che l'iperfosforilazione Tau sia un meccanismo generalizzato di difesa dall'ipotermia della funzione cellulare nervosa

# **INTRODUZIONE**



# 1 RAPHE PALLIDUS

## 1.1 Anatomia del Raphe Pallidus

Il Raphe Pallidus (RPa), è un nucleo situato nella porzione caudale del tronco encefalico, a livello del bulbo rostrale ventromediale (RVMM, *Rostral Ventral Medial Medulla*).

Questo nucleo, è considerato un punto di snodo centrale nella termoregolazione, in quanto sede dei premotoneuroni simpatici, che regolano la termogenesi a livello del tessuto adiposo bruno (BAT, *Brown Adipose Tissue*)<sup>1</sup>, la vasocostrizione cutanea nel ratto<sup>2</sup>, la comparsa del brivido<sup>3</sup> e la termogenesi durante il processo febbrile<sup>4</sup> (Fig. 1).

È stato inoltre coinvolto nella risposta cardiovascolare in seguito a stress psicologico<sup>5</sup> e in quella alimentare come la motilità gastrica<sup>6</sup> e la masticazione<sup>7</sup>.

La sua posizione è stata per molti anni erroneamente confusa con quella del Raphe Magno (RMg), ma nel 1970 Braak ne individuò la corretta posizione indicando il RPa come una lunga struttura che si estende per una porzione di midollo allungato<sup>8</sup>.

Nell'uomo questa struttura, la più piccola annoverata tra i nuclei del Raphe<sup>9</sup>, è localizzata in prossimità della linea mediana compresa tra l'estremità del tratto piramidale e la parte superiore del lemnisco mediale e si estende in senso rostro-caudale dall'estremità posteriore del RMg fino all'obex<sup>10</sup>.

Nello specifico il RPa è compreso nel “*gruppo caudale*” dei *nuclei del Raphe* (RMg e del Raphe Obscurus), che rappresentano la maggiore risorsa serotoninergica del sistema nervoso centrale<sup>11</sup>; questo invia la maggior parte delle sue proiezioni alla parte caudale del tronco encefalico e del midollo spinale<sup>12,13</sup>.

Il Raphe è anatomicamente suddiviso in RPa rostrale (rRPa) e Raphe caudale (cRPa), che nel topo risultano localizzati rispettivamente tra i due lemnischi mediali (rRpa) e tra i nuclei mediali delle olive inferiori (cRPa) <sup>14</sup>.

Nel 2000 uno studio pubblicato da Nogueira e colleghi, condotto attraverso l'utilizzo di un tracciante retrogrado fluorescente, al fine di chiarire le incertezze di studi precedentemente svolti con delle tecniche poco sensibili, ha mostrato le connessioni afferenti che proiettano al cRPa <sup>15</sup>. Queste provengono dall'area preottica, dall'ipotalamo laterale, dal grigio centrale, dalla formazione reticolare, dai nuclei parabrachiale, tegmentale, del RMg e del raphe mediano ed infine dal midollo spinale <sup>15</sup>.

Un primo studio completo sulle afferenze al rRPa è stato pubblicato precedentemente, nel 1997, da Hermann <sup>16</sup> che ha riassunto e ampliato gli studi precedenti.

Le afferenze individuate in questo studio, attraverso l'utilizzo della subunità b della tossina colerica, sembrerebbero provenire da: i) centri implicati nella termoregolazione come l'area preottica e l'ipotalamo laterale e l'ipotalamo dorsomediale; ii) centri coinvolti nel controllo autonomico e/o della respirazione come l'area preottica mediale, il nucleo preottico mediano, la parte ventromediale del grigio periacqueduttale, il nucleo paragigantocellulare laterale e il locus coeruleus.

Studi recenti hanno dimostrato inoltre come in particolare dall'area perifornicale un fascio di fibre oressinergiche proietta a livello del rRPa e sono coinvolte nei processi di termogenesi a livello del BAT <sup>17</sup>

Per quanto riguarda le vie efferenti del RPa, proiezioni serotoninergiche sono state riscontrate a livello della colonna intermediolaterale (IML, *Intermediolateral Column*)<sup>18</sup> e del corno dorsale e ventrale del midollo spinale <sup>19</sup>, nei nuclei motori del trigemino, nel nucleo ambiguo, facciale e ipoglosso <sup>20</sup>. Inoltre neuroni contenenti l'ormone rilasciante la tireotropina (TRH,

*Thyrotropin Releasing Hormone*) a livello del RPa proiettano al complesso vagale dorsale responsabile dell'aumento dell'attività gastrica <sup>6</sup>.

La maggior parte di questi neuroni termina direttamente a livello dei motoneuroni o dei neuroni pregangliari autonomici.

Studi recenti effettuati attraverso tecniche immunocistochemiche hanno mostrato come la citoarchitettura del RPa sia caratterizzata dalla presenza di neuroni positivi per diversi marcatori come VGLUT3 (marker per la presenza dei neuroni glutamatergici) <sup>21</sup>, serotonina o triptofano idrossilasi (TPH, *Tryptophan Hydroxylase*) indice della presenza di neuroni serotoninergici <sup>22</sup> e la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD-67, *Glutamic Acid Decarboxylase-67*), marcatore per i neuroni GABA-ergici <sup>21</sup>.

Sono state inoltre trovate cellule con la co-localizzazione per la serotonina, la sostanza P, il TRH e l'encefalina <sup>11</sup>.

Ulteriori approfondimenti attraverso l'utilizzo di virus retrogrado hanno mostrato che una significativa frazione dei premotoneuroni del rRPa che proiettano alla IML sono di natura glutamatergica e serotoninergica <sup>23</sup>.

## **1.2 Regolazioni fisiologiche a livello del Raphe Pallidus**

### **1.2.1 Cenni sulla Termoregolazione**

Al fine di meglio comprendere parte delle funzioni fisiologiche regolate a livello del RPa, si devono introdurre alcuni concetti base sulla termoregolazione.

La termoregolazione è un processo fisiologico necessario per il mantenimento dell'omeostasi corporea nei mammiferi. Questo meccanismo permette di mantenere valori di temperatura corporea (TC) entro un range prestabilito (33,2-38,2°C) in maniera tale da preservare le principali funzioni dell'organismo <sup>24</sup>.

Nell'uomo la TC subisce delle fluttuazioni fisiologiche influenzate dal ritmo circadiano, dall'ovulazione nella donna, e dall'età; quando queste fluttuazioni si discostano dai valori fisiologici, le conseguenze possono essere fatali per l'organismo <sup>24</sup>.

Un aumento anomalo della temperatura (*ipertermia*), provoca la denaturazione delle proteine e il blocco della sintesi del DNA causando danni irreversibili a livello degli organi e malfunzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) <sup>25</sup>. Al contrario, una drastica diminuzione della temperatura al di sotto dei valori fisiologici (temperatura interna inferiore a 27°C; *ipotermia*) è associata alla comparsa di modificazioni patologiche, in alcuni casi fatali, a livello del sistema neuromuscolare, cardiovascolare, ematologico e respiratorio <sup>26</sup>.

Il mantenimento della normotermia, definita come la variazione di temperatura interna dell'organismo (T<sub>core</sub>) compresa all'interno del range fisiologico di temperatura, implica l'instaurarsi di un equilibrio tra i meccanismi di termogenesi e termolisi che sono attivati rispettivamente durante le risposte dell'organismo ad una bassa o alta temperatura ambientale (T<sub>a</sub>).

La termogenesi è il meccanismo responsabile della produzione di calore, mentre la termolisi comprende tutte quelle strategie messe in atto dall'organismo per la dissipazione del calore corporeo (sudorazione) <sup>27</sup>.

Durante l'esposizione ad una bassa o alta T<sub>a</sub>, i mammiferi, per regolare la loro TC utilizzano diverse strategie termoregolatrici che possono essere di tipo autonomico (*termoregolazione autonoma*) e/o comportamentale (*termoregolazione comportamentale*).

La termoregolazione autonoma si compone di tutti quei processi vegetativi, non volontari che permettono di mantenere costante la TC; ad esempio durante l'esposizione a basse Ta i mammiferi producono calore attraverso l'aumento del tono muscolare (*termogenesi da brivido*) o l'attivazione del metabolismo a livello del tessuto adiposo bruno (BAT; *termogenesi adattativa o senza brivido*); nell'uomo, la termogenesi senza brivido, è presente solo nei neonati e viene persa nell'adulto <sup>28</sup>, mentre viene conservata per tutta la vita nei roditori e piccoli mammiferi <sup>1</sup>.

Al contrario la termoregolazione comportamentale, filogeneticamente più antica, è caratterizzata dall'insieme di azioni volontarie messe in atto per mantenere costante la TC come il cambiamento posturale o la ricerca di un ambiente con una temperatura favorevole <sup>28</sup>.

I principali meccanismi effettori coinvolti nella risposta termoregolatrice durante l'esposizione a basse Ta comprendono: i) la termoregolazione comportamentale che permette la riduzione della perdita di calore, ii) la piloerezione e la vasocostrizione a livello cutaneo che permettono la conservazione del calore, iii) la termogenesi senza brivido o adattativa (*non-shivering thermogenesis*) a livello del tessuto adiposo bruno (BAT) e la termogenesi con brivido (*shivering thermogenesis*) nel muscolo scheletrico responsabili della produzione di calore.

La perdita di calore attraverso la termoregolazione comportamentale, la vasodilatazione cutanea che convoglia il calore dal core alla cute e il raffreddamento per evaporazione ottenuto, a seconda delle specie animali, attraverso la sudorazione o la dispersione di saliva, invece fanno parte di quei meccanismi termoregolatori volti a contrastare l'aumento della TC oltre i valori normali <sup>29</sup>.

Tutti i meccanismi responsabili del controllo degli organi termo-effettori, sono regolati da una via nervosa centrale termoregolatoria, che integra le informazioni sensitive di freddo o caldo

percepite a livello cutaneo e/o viscerale a quelle inerenti alla temperatura cerebrale (Tc) al fine di prevenire o contrastare cambiamenti termici negli organi termosensibili <sup>1</sup>.

Un esaustivo modello neuroanatomico, che illustra le vie neuronali responsabili del controllo termoregolatorio degli organi effettori, è stato proposto per la prima volta da Morrison nel 2004<sup>1,23</sup> (Fig. 2).

Secondo questo schema, in base ai cambiamenti della temperatura esterna, i termocettori cutanei sensibili al caldo e al freddo trasmettono i segnali ai rispettivi neuroni sensitivi primari dei gangli della radice dorsale (DRG, *Dorsal Root Ganglia*). Queste informazioni vengono in seguito convogliate ad un secondo ordine di neuroni sensitivi nel corno dorsale del midollo spinale (DH, *Dorsal Horn*).

Durante l'esposizione a basse Ta, i neuroni sensibili al freddo del DH attivano una terza rete di neuroni nel subnucleo esterno laterale del nucleo parabrachiale laterale (LPBel), mentre i neuroni sensibili al caldo proiettano ai neuroni sensitivi del subnucleo dorsale del nucleo parabrachiale laterale (LPBd).

I segnali dal DH sono anche inviati al talamo e quindi alla corteccia per la percezione e la localizzazione degli stimoli termici a livello conscio.

Dal LPB i segnali sono trasmessi all'area preottica (POA, *Preoptic Area*) dove gli interneuroni GABA-ergici del subnucleo preottico mediano (MnPO, *Median Preoptic Subnucleus*) sono attivati da input glutammatergici provenienti dai neuroni sensibili al freddo del LPBel e inibiscono, a livello dell'area preottica mediale (MPA, *Medial Preoptic Area*), tutte le popolazioni neuronali sensibili al caldo di natura GABA-ergica che controllano: i) la vasocostrizione cutanea (CVC, *Cutaneous Vasoconstriction*) , attraverso la tonica inibizione dei premotoneuroni a livello del RPa che a loro volta proiettano ai neuroni pregangliari simpatici (SPNs, *Sympathetic Premotor Neurons*) della colonna intermediolaterale (IML); ii)

la termogenesi senza brivido e con brivido, inibendo a livello dell'ipotalamo dorsomediale (DMH, *Dorsomedial Hypothalamus*) i neuroni simpatici eccitatori del BAT e i neuroni promuoventi il brivido.

Quando il DMH viene disinibito, in seguito alla diminuzione della TC, invia input eccitatori al livello del RPa ai premotoneuroni simpatici del BAT e ai premotoneuroni del muscolo scheletrico. I premotoneuroni a loro volta proiettano rispettivamente ai neuroni simpatici pregangliari (SPNs, *Sympathetic Preganglionic Neurons*) nella IML del midollo spinale e ai motoneuroni  $\alpha$  e  $\gamma$  del corno ventrale (VH, *Ventral Horn*) del midollo spinale.

Gli SPNs a loro volta inviano proiezioni eccitatorie ai neuroni gangliari che attivano la termogenesi nel BAT mentre i motoneuroni  $\alpha$  e  $\gamma$  attivano a livello muscolare il meccanismo per la comparsa del brivido<sup>30</sup>.

Al contrario, durante l'esposizione ad alte Ta, gli interneuroni glutammatergici del MnPO, che sembrerebbero essere attivati da input glutammatergici provenienti dai neuroni sensibili a stimoli caldi del LPBd, attivano i neuroni sensibili a stimoli caldi della MPA, inibendo la termogenesi senza brivido, con brivido e la CVC.

### **1.2.2 Il Raphe Pallidus e la termogenesi senza brivido**

Nei roditori, la prima fonte di produzione di calore, regolata a livello nervoso centrale, è rappresentata dall'ossidazione mitocondriale a livello del BAT, dall'incremento della frequenza cardiaca e dalla comparsa del brivido nei muscoli scheletrici (*termogenesi con brivido*)<sup>1</sup>.

Il BAT si è evoluto nel tempo come un organo effectore essenziale per la termogenesi nei piccoli mammiferi e nei roditori. In questi ultimi, quando sono esposti a basse Ta ( $T_a=5^\circ\text{C}$ ), il BAT diventa ipertrofico (attraverso la differenziazione e proliferazione cellulare) per poi

ritornare ai livelli fisiologici dopo l'esposizione dell'animale ad una Ta termoneutrale (Ta=28°C). Questi cambiamenti morfologici sono attivati in parte dalla noradrenalina che aumenta l'espressione della proteina disaccoppiante 1 o termogenina (UCP1, *Uncoupling Protein 1*) nelle cellule differenziate<sup>31</sup>.

La UCP 1 è localizzata sulla membrana interna mitocondriale ed è responsabile della produzione di calore a livello del BAT attraverso la dissipazione del gradiente protonico generato dalla catena di trasporto di elettroni durante la fosforilazione ossidativa<sup>32</sup>.

Nella complessa organizzazione gerarchica della via centrale termoregolatoria, che governa la termogenesi a livello del BAT, i neuroni del RPa assumono un ruolo chiave come premotoneuroni simpatici che inviano input eccitatori agli SPNs dell'IML responsabili dell'attivazione della termogenesi.

I premotoneuroni simpatici hanno un ruolo essenziale all'interno del sistema autonomico soprasspinale centrale, in quanto convogliano i segnali direttamente ai SPNs della IML, che a loro volta attivano diversi centri effettori; questa via bulbo-spinale è molto importante per il controllo di diverse funzioni che regolano l'omeostasi dell'organismo come il flusso sanguigno, il metabolismo e la termoregolazione<sup>33</sup>.

I primi studi anatomici, che hanno portato ad ipotizzare la possibile presenza di una popolazione di premotoneuroni simpatici coinvolti nel processo di termoregolazione a livello del RPa, sono stati focalizzati sulla localizzazione dei neuroni premotori simpatici della via termogenetica, attraverso lo studio del trasporto transinaptico di un virus retrogrado inoculato a livello del BAT interscapolare. I risultati di questi lavori hanno mostrato la presenza di una consistente marcatura a livello della regione del RVMM centrata nella zona del RPa e del RMg ventrale ed estesa fino alle piramidi nell'area piramidale<sup>34,22,35</sup>.

Questi risultati sono coerenti con studi precedenti che hanno rilevato la presenza di connessioni neuronali tra l'area del RPa e l'IML<sup>18</sup>, che vengono in parte attivate in seguito ad esposizione ad una bassa Ta.

La grande varietà di tipi cellulari innervati a livello del BAT giustifica solo in parte la grande dispersione anatomica dei potenziali premotoneuroni rilevati da questi studi.

Un chiarimento è stato dato nel 2003, quando la comparazione tra la presenza della proteina cFos<sup>36</sup> (indice di attivazione neuronale) e la mappatura delle vie neuronali con un virus retrogrado in animali con un processo termogenetico attivo, ha evidenziato un elevato numero di neuroni del RPa contemporaneamente marcati dal virus e attivati dall'esposizione a bassa Ta. Questo studio ha fornito una prima chiara evidenza sulla possibile presenza di una popolazione di neuroni premotori a livello del RPa, coinvolti nella regolazione del circuito simpatico spinale che controlla la termogenesi a livello del BAT<sup>22</sup>.

Parallelamente la caratterizzazione dei neurotrasmettitori dei premotoneuroni della via termogenetica, ha permesso di evidenziare la presenza di diversi tipi di marcatori all'interno dei neuroni del RVMM e in particolare della zona del RPa che proiettano all'IML come: i) il trasportatore vescicolare del glutammato (VGLUT-3, *Vesicular Glutamate Transporter 3*), indice della presenza di neuroni glutamatergici<sup>37,21</sup> ii) serotonina (5-HT), marker dei neuroni serotoninergici<sup>22</sup>, iii) decarbossilasi-67 dell'acido glutammico (GAD-67, *Glutamic Acid Decarboxylase-67*)<sup>21</sup>.

In base ad esperimenti che hanno dimostrato l'attivazione di queste popolazioni neuronali a livello del rRPa come risposta ad uno stimolo freddo<sup>37 38</sup>, è stato ipotizzato che sia i neuroni VGLUT-3 sia i neuroni serotoninergici del RPa che proiettano all'IML siano plausibilmente correlati al controllo degli organi effettori (BAT) che mediano la risposta durante l'esposizione a basse Ta.

È stato inoltre dimostrato che il rRPa riceve sia forti input glutammatergici eccitatori sia input inibitori GABA-ergici, questi ultimi sono presenti soprattutto in presenza di un'elevata TC; nel ratto, infatti, la microiniezione di un agonista glutammatergico o il blocco dei recettori GABA-ergici a livello del RPa induce un'elevata attivazione dell'attività simpatica del BAT<sup>39</sup>.

La conferma definitiva che l'attività dei premotoneuroni del RPa che proiettano al BAT attraverso l'IML forniscono un input eccitatorio necessario e sufficiente per la risposta termogenetica all'interno del circuito soprasspinale è stata fornita da esperimenti che hanno previsto l'inibizione farmacologica del RPa<sup>40</sup>.

Questi studi hanno mostrato che l'inibizione dei neuroni del RPa, attraverso l'iniezione di un agonista GABA-ergico, causa un'inversione nell'aumento dell'attività simpatica e della produzione di calore nel BAT indotte da qualsiasi stimolo termogenetico testato.

Ad esempio, l'iniezione di glicina a livello del RPa, induce una completa reversione di tutte le risposte termogenetiche evocate dalla diminuzione della TC, nonostante questo stimolo termogenetico continui a persistere<sup>41</sup>.

Tutte queste evidenze raccolte nei vari studi indicano che il RPa contiene la principale popolazione di premotoneuroni simpatici che attivano la via spinale che controlla l'attività simpatica del BAT e la termogenesi nella via bulbo-spinale<sup>30</sup>.

### **1.2.3 Il Raphe Pallidus e la termogenesi con brivido**

Il brivido è una risposta motoria somatica involontaria, prodotta dai muscoli scheletrici per la produzione di calore durante l'esposizione ad una bassa Ta o la comparsa della febbre.

La termogenesi da brivido (*shivering thermogenesis*) è l'ultimo meccanismo effettore di difesa dell'organismo che viene attivato in risposta ad una bassa Ta, infatti la sua soglia termica di attivazione è più bassa rispetto a quella della *non-shivering thermogenesis* e della

vasocostrizione cutanea <sup>42</sup>.

Il motivo potrebbe risiedere nel fatto che questo processo potrebbe essere governato da una distinta popolazione di neuroni sensibili al caldo della POA, ma è anche spiegato dal fatto che è un processo energeticamente molto dispendioso durante il quale l'animale è molto vulnerabile all'ambiente esterno <sup>29</sup>.

Tuttavia, la produzione di calore proveniente da questo processo, è essenziale sia negli animali da esperimento che nell'uomo per l'aumento della TC, durante l'esposizione ad una bassa temperatura o durante il processo febbrile <sup>43</sup>.

La contrazione muscolare responsabile della produzione del brivido sembrerebbe essere generata da scariche ritmiche a livello degli  $\alpha$ -motoneuroni che innervano il muscolo scheletrico <sup>29</sup>.

La via centrale che regola l'attivazione degli  $\alpha$ -motoneuroni non è ancora ben definita: studi preliminari hanno mostrato che questa si compone di una trasmissione dei segnali cutanei attraverso il LPB, della loro integrazione a livello della POA ed infine dell'attivazione, ad opera dei neuroni del RPa, dell'output somatomotore a livello del corno ventrale <sup>42</sup>.

Il coinvolgimento del RVMM e particolare del RPa nella *shivering thermogenesis* è stato suggerito sia dai risultati ottenuti attraverso studi anatomici che di elettrofisiologia *in vivo*.

Diversi studi, volti alla caratterizzazione dei substrati anatomici implicati nella comparsa del brivido, hanno tutti confermato che i neuroni responsabili dell'attivazione della *shivering thermogenesis* sono localizzati a livello della zona del RVMM e in particolare concentrati nella zona del RPa <sup>44</sup>.

Nello specifico è stato riscontrato che: i) a livello dei neuroni somatomotori spinali è presente una innervazione di tipo monosinaptico proveniente dalla zona del RPa e del RVMM <sup>45</sup>; ii) le

connessioni sia serotoninergiche che non serotoninergiche di queste zone proiettano al corno ventrale del midollo spinale <sup>46</sup>; iii) i neuroni coinvolti nella comparsa del brivido sono localizzati in diverse zone del tronco che comprendono anche il RPa ; iv) l'iniezione di NMDA a livello del RPa causa comparsa di brivido a livello nucale che non è assolutamente distinguibile da quello indotto attraverso il raffreddamento cutaneo dell'animale e la diminuzione della Tcore; v) l'inibizione dell'area del RPa attenua la risposta termogenetica da brivido attivata tramite raffreddamento cutaneo o dall' iniezione di PGE<sub>2</sub> a livello della MPO<sup>47</sup>; vi) l'inibizione del RPa attraverso microiniezioni di glicina riduce la risposta dei neuroni fusimotori del muscolo scheletrico indotta dal raffreddamento cutaneo <sup>3</sup>.

I risultati sopra elencati portano alla conclusione che i premotoneuroni del RPa, che proiettano al corno ventrale del midollo spinale, potrebbero essere implicati nella via efferente che regola la comparsa del brivido indotto da un decremento della TC o dalla comparsa dello stato febbrile <sup>47</sup>.

#### **1.2.4 Il Raphe Pallidus e la termogenesi nella comparsa dello stato febbrile**

La febbre è una risposta termoregolatoria coordinata a livello del CNS e ha un ruolo chiave nella fase acuta di risposta ad un'infezione o un'inflammazione.

Questo meccanismo è caratterizzato da un aumento della TC concomitante ad una riduzione della perdita di calore corporeo ad opera della termogenesi del BAT, la produzione del brivido e la vasocostrizione cutanea <sup>48</sup>.

L'attivazione del processo febbrile è stimolata dalla prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) che è sintetizzata, a livello vascolare nel cervello e nei tessuti periferici, come risposta ai segnali immunitari causati dall'infezione <sup>4</sup>. Questa esplica il suo ruolo legandosi ai recettori della prostaglandina E (EP3r) presenti sui neuroni della POA<sup>49</sup>, attenuando l'attività GABA-ergica

delle proiezioni discendenti<sup>42</sup>.

La maggior parte dei EP3r è localizzato nei neuroni di specifiche aree della POA: il MnPO e il MPO<sup>49</sup>. Questa via controlla gli organi effettori periferici, incluso il BAT, che è considerato il maggiore organo per la produzione di calore durante la febbre nei roditori<sup>50</sup>.

I neuroni contenenti i recettori EP3r sono di natura GABA-ergica e questo è dimostrato dal fatto che l'iniezione di un'antagonista GABA-ergico nel DMH o nel rRPa evoca le medesime risposte indotte dalla somministrazione della PGE<sub>2</sub> nella POA come la termogenesi a livello del BAT e la tachicardia<sup>39,51-53</sup>.

È stato dimostrato inoltre che due differenti popolazioni neuronali contenenti EP3r della POA, proiettano separatamente a due strutture essenziali per l'attivazione della termogenesi a livello del BAT e la vasocostrizione cutanea: il DMH e il RPa<sup>54</sup>.

Questo è testimoniato dal fatto che microiniezioni nel rRPa di un agonista GABA-ergico, sopprimono completamente il processo termogenetico a livello del BAT<sup>4</sup> e riducono la vasocostrizione nella coda del ratto precedentemente indotti dalla somministrazione di PGE<sub>2</sub> sia nel ventricolo centrale che all'intero della POA<sup>55</sup>; l'inibizione dei neuroni del DMH, al contrario, blocca la termogenesi a livello del BAT ma non ha effetto sulla vasocostrizione cutanea indotta in seguito ad iniezione di PGE<sub>2</sub> a livello della POA<sup>55</sup>.

Inoltre la somministrazione di PGE<sub>2</sub> a livello del ventricolo laterale o della POA causa un forte attivazione dei neuroni del rRPa<sup>4</sup>.

Tutte queste evidenze non solo hanno dimostrato chiaramente l'importanza del rRPa nella comparsa dello stato febbrile mediato dalla PGE<sub>2</sub> ma hanno permesso anche di ipotizzare un possibile modello dello stato febbrile in cui, la tonica inibizione GABA-ergica mantenuta normalmente dai neuroni della POA sui neuroni responsabili della termogenesi nel DMH e nel rRPa, viene ridotta in seguito ad un'infezione dal legame della PGE<sub>2</sub> ai recettori EP3r

inducendo una riduzione di cAMP a livello intracellulare<sup>37,56</sup>. Questo permette a sua volta la disinibizione dei neuroni termogenetici del tronco e l'attivazione degli organi effettori della termoregolazione<sup>37</sup>.

Inoltre l'osservazione che esistono due diverse popolazioni neuronali della POA contenenti i recettori EP3r che proiettano al DMH e al rRPa<sup>54</sup>, fanno ipotizzare che i segnali dalla POA sono trasmessi al RPa attraverso due vie differenti: i) una indiretta che dal DMH proietta a sua volta al RPa attivando la produzione di calore a livello del BAT e una diretta che induce l'aumento della vasocostrizione cutanea<sup>54</sup>.

### **1.2.5 Il Raphe Pallidus e la vasomozione cutanea**

La cute ha un ruolo essenziale nel processo di termoregolazione. Il flusso sanguigno cutaneo infatti risulta modificato in base alla variazione della T<sub>core</sub> e della T<sub>a</sub> ed è regolato principalmente a livello del sistema nervoso autonomo<sup>24</sup>. Durante l'esposizione ad una bassa T<sub>a</sub> l'aumento dell'attività nervosa simpatica a livello dei vasi sanguigni, riduce il flusso del sangue nel distretto cutaneo (vasocostrizione,) permettendo di limitare la dispersione di calore metabolico nell'ambiente, mentre durante l'esposizione ad alte T<sub>a</sub> l'inibizione dell'attività simpatica nervosa diretta ai vasi sanguigni cutanei produce un aumento del flusso (vasodilatazione) favorendo la dispersione del calore nell'ambiente<sup>57</sup>. In condizioni normotermiche in diverse specie, compreso l'uomo, è presente un moderato livello basale dell'attività simpatica responsabile della vasocostrizione che sembrerebbe essere modulata, anche se in maniera modesta, dal riflesso barocettorio<sup>29</sup>.

La vasocostrizione cutanea è considerata anche un importante meccanismo di difesa durante l'instaurarsi del processo febbrile<sup>55</sup>.

Gli SPNs responsabili del controllo della vasocostrizione cutanea (CVC, *Cutaneous Vasoconstriction*) sono localizzati nella IML del midollo spinale a livello toraco-lombare (T11-L2)<sup>37</sup>; questi proiettano principalmente ai gangli simpatici cutanei vasocostrittori che innervano i vasi sanguigni cutanei e le anastomosi<sup>58</sup>.

Studi effettuati attraverso l'utilizzo di un tracciante retrogrado indicano che i neuroni premotori che proiettano principalmente agli SPNs responsabili della comparsa della CVC sono localizzati all'interno del RVMM principalmente nella zona del rRPa e nella regione parapiramidale<sup>37,59</sup>, alcuni dei quali sono di natura serotoninergica o glutammatergica e nel bulbo rostrale ventrolaterale (RVLM, *Rostral Ventrolateral Medulla*)<sup>60</sup>.

A livello funzionale, l'elettrostimolazione del rRPa o la somministrazione di un antagonista GABA-ergico (bicucullina) in animali anestetizzati mantenuti ad una TC di 39-40°C riduce il flusso sanguigno arterioso nel distretto cutaneo della coda; al contrario la somministrazione di muscimolo nello stesso sito in ratti tenuti ad una bassa TC ristabilisce un flusso sanguigno nel letto cutaneo della coda con una percentuale pari al  $93 \pm 4\%$  del flusso presente prima del raffreddamento dell'animale<sup>61</sup>.

In ratti e conigli anestetizzati mantenuti ad una bassa TC, l'inibizione GABA-ergica del RPa, sopprime l'attività dei neuroni simpatici a livello cutaneo nella coda del ratto e nell'orecchio del coniglio<sup>62</sup>.

Ulteriori studi hanno mostrato come l'inattivazione chimica attraverso la somministrazione di glicina a livello del rRPa o del RVLM è in grado di prevenire un aumento della CVC a livello della coda del ratto indotta dall'abbassamento della TC attraverso il raffreddamento cutaneo<sup>2</sup>.

Questi risultati presenti in letteratura indicano che le alterazioni termoregatorie a livello del flusso sanguigno cutaneo sono plausibilmente determinate da una popolazione di neuroni

premotori simpatici localizzati principalmente a livello del rRPa, della zona parapiramidale e del RVLM<sup>58</sup>.

Diverse aree cerebrali influenzano la perdita di calore cutanea controllando l'attività dei premotoneuroni simpatici responsabili della CVC. La conferma che il controllo termoregolatorio della CVC è mediato dai neuroni sensibili al caldo della POA e che l'inibizione mediata dalla PGE2 dei neuroni sensibili al caldo contribuisce all'attivazione dei premotoneuroni simpatici responsabili della CVC durante il processo febbrile<sup>63,64,65</sup>, insieme alla dimostrazione che la POA contiene una popolazione neuronale GABA-ergica contenente gli EP3r che proietta direttamente al rRPa<sup>4</sup> che è distinta da quella che proietta al DMH<sup>54</sup>, supportano un modello in cui i neuroni sensibili al caldo della POA inviano proiezioni di natura GABA-ergica dirette al rRPa che regolano l'attivazione dei premotoneuroni simpatici responsabili della CVC<sup>29</sup>.

### **1.2.6 Il Raphe Pallidus e il comportamento alimentare**

Il comportamento alimentare è un complesso gruppo di funzioni che comprende la ricerca, la cattura e l'ingestione di sostanze organiche e inorganiche necessarie per il sostegno del costo energetico dell'organismo<sup>66</sup>.

Come il ritmo biologico, questo comportamento è organizzato per la maggior parte a livello del diencefalo ad opera del LH, dell'ipotalamo mediale e del nucleo paraventricolare<sup>67,68</sup>.

Oltre a queste strutture nella regolazione del comportamento alimentare sono coinvolte anche regioni del tronco encefalico come il RMg, il RPa e il Raphe Obscurus<sup>66</sup>.

Ci sono diverse evidenze che testimoniano il coinvolgimento del nucleo del RPa nel comportamento alimentare: i) i neuroni del RPa infatti proiettano ai diversi nuclei motori coinvolti nella masticazione e nella deglutizione<sup>20</sup>; ii) costituiscono la maggiore risorsa

afferente serotonergica al nucleo motore trigemino<sup>69</sup>; iii) l'iniezione di TRH nel RPa promuove l'attività gastrica in animali deprivati di cibo attraverso il complesso vagale dorsale<sup>6</sup>.

A dimostrazione di questo, è stato dimostrato che un gruppo di neuroni, contenente il TRH provenienti dal RPa che proiettano al complesso vagale, giocano un ruolo chiave nelle funzioni gastrointestinali, pancreatiche ed epatiche mediate dal complesso<sup>6</sup>.

Un'ulteriore conferma del coinvolgimento di questo nucleo nel comportamento alimentare è stato dato da uno studio effettuato sul ratto in cui è stato limitato il consumo di cibo ad un preciso momento della giornata; tra i diversi gruppi sperimentali utilizzati, nel nucleo del RPa si è evidenziata un'espressione di cFos maggiore del 50% rispetto a quella del RMg e del Raphe Obscurus (ROb) in due gruppi di animali molto attivi nella ricerca e/o ingestione di cibo: il primo in cui era permesso osservare il cibo ma non ingerirlo e il secondo in cui era permesso mangiare per soli 30 minuti durante l'arco della giornata. Questi risultati sembrerebbero enfatizzare il ruolo del RPa come nucleo premotore nei processi somatici e vegetativi come la masticazione, la contrazione gastrointestinale e la secrezione gastrica attraverso il complesso vagale<sup>66</sup>.

## **2 ATTIVAZIONE FARMACOLOGICA DEI NEURONI DEL RAPHE PALLIDUS**

### **2.1 Effetti indotti dall'attivazione e/o disinibizione farmacologica dei neuroni del Raphe Pallidus**

La microiniezione di sostanze eccitatorie (o inibitorie), in aree cerebrali specifiche, è un metodo comunemente utilizzato, per indagare il ruolo delle popolazioni neuronali a livello del complesso CNS nei mammiferi<sup>70</sup>.

Non ci sono dirette evidenze, tuttavia, che gli effetti indotti da microiniezioni possano mimare degli eventi fisiologici, infatti non tutto l'eterogeneo gruppo cellulare attivato da una microiniezione potrebbe essere coinvolto nella risposta fisiologica. Inoltre questo metodo non permette di comprendere se la popolazione neuronale manipolata, sia coinvolta in uno o in tutti gli effetti osservati in seguito all'iniezione. Ciò nonostante, la stimolazione farmacologica, rappresenta un valido metodo per l'interpretazione delle diverse risposte indotte dall'attivazione o disinibizione completa di una determinata popolazione neuronale<sup>70</sup>.

Gli esperimenti di attivazione farmacologica dei neuroni del RPa sono stati condotti sia in animali anestetizzati che liberi di muoversi; è infatti noto come l'anestesia può alterare profondamente diversi parametri fisiologici come la termoregolazione e l'omeostasi cardiovascolare<sup>71</sup>. Gli esperimenti che hanno previsto la stimolazione chimica dei neuroni di RPa sono stati condotti mediante l'utilizzo di sostanze con un profilo farmacologico eccitatorio o disinibitorio.

Gli studi di disinibizione dei neuroni GABA-ergici del RPa sono stati svolti mediante l'utilizzo di bicucullina (Bic), un antagonista del recettore GABA<sub>A</sub>-ergico, che blocca la trasmissione recettoriale con la conseguente disinibizione neuronale. L'iniezione di Bic a livello del RPa, in animali anestetizzati, ha mostrato la contemporanea comparsa di effetti modulatori di natura termoregolatoria, cardiorespiratoria e somatomotoria.

Dal punto di vista termoregolatorio la disinibizione dei neuroni GABA<sub>A</sub>-ergici, in animali anestetizzati con una T<sub>core</sub> controllata attraverso fonti di calore esterne, ha prodotto un aumento dell'attività simpatica nervosa (SNA, *Sympathetic Nerve Activity*)<sup>52</sup> e della temperatura a livello del BAT (TBAT)<sup>70</sup>. Parallelamente è stata osservata la comparsa di vasocostrizione della coda di ratti anestetizzati mantenuti ad una TC di 39-40°C che presentavano un processo di vasodilatazione attivo<sup>72</sup>; questo dato è stato confermato dal fatto

che l'iniezione di Bic nel RPa provoca un blocco della vasodilatazione cutanea precedentemente provocato dal riscaldamento della POA<sup>73</sup>. Sul piano cardiorespiratorio si è osservato un marcato aumento della frequenza respiratoria, della frequenza cardiaca (FC), della pressione arteriosa media (MAP) e della SNA cardiaca (CSNA)<sup>74</sup>. L'attivazione cardiaca simpatica e la tachicardia indotta dalla disinibizione dei neuroni del RPa è stata conservata anche in seguito alla parallela inibizione GABA<sub>A</sub>-ergica dei neuroni del RVLM, che normalmente supportano l'attività basale del CSNA e della FC, inviando proiezioni di natura eccitatoria ai SPNs. Una simile tachicardia evocata dalla disinibizione dei neuroni del RPa è stata osservata anche in animali in cui erano state precedentemente rimosse entrambe le ghiandole surrenali, facendo ipotizzare che l'aumento della FC sia dovuto solo alla proiezione simpatica al cuore<sup>74</sup>.

L'incremento nelle variabili autonomiche è stato accompagnato anche da modificazioni di tipo somatomotorio, come la comparsa del brivido e l'incremento dell'attività elettromiografica della zampa e del muscolo paraspinale.

La disinibizione dei neuroni del RPa in definitiva ha indotto cambiamenti autonomici e somatomotori che sono consistenti con lo stato di un animale "eccitato", tuttavia queste modificazioni non sono state accompagnate in nessun caso da modificazioni dell'attività corticale a riposo. Plausibilmente le iniezioni di Bic porterebbero ad aumento delle variabili vegetative e somatomotorie attraverso proiezioni discendenti che originano nel RPa e proiettano al midollo spinale<sup>70</sup>.

Gli studi condotti in animali liberi di muoversi, mantenuti ad una Ta termoneutrale, hanno in parte confermato i dati raccolti in animali anestetizzati e in parte ampliato le conoscenze sulle funzioni fisiologiche del RPa. L'iniezione di Bic, in ratti non anestetizzati, ha indotto un forte aumento della FC come era stato precedentemente riportato nel ratto anestetizzato.

L'incremento di FC si è verificato dopo un minuto dall'iniezione ed è stato seguito, nei 10 minuti successivi, da una risposta pressoria che però non è stata significativamente differente da quella osservata in seguito ad iniezioni effettuate al di fuori dell'area del RPa. In contrasto con il marcato aumento della FC i cambiamenti nella TC sono stati minimi o assenti; 20 minuti dopo l'iniezione i valori della TC non sono risultati differenti rispetto a quelli registrati durante il baseline<sup>71</sup>.

I risultati della disinibizione dei neuroni del RPa fanno ipotizzare che in condizioni di valori fisiologici di TC, i neuroni del RPa che controllano la SNA del BAT, il flusso simpatico al nodo seno-atriale cardiaco e l'attivazione dei motoneuroni del muscolo scheletrico, sono controllati da una forte tono inibitorio di natura GABA<sub>A</sub>-ergica. Quando quest'ultimo viene meno permette l'aumento della attività neuronale. È stato postulato che l'interruzione della tonica inibizione dei neuroni del RPa sia necessaria per l'attivazione della termogenesi nel BAT durante l'esposizione ad una bassa Ta o durante lo stato febbrile. L'assenza di un aumento della TC nell'animale non anestetizzato, in seguito ad iniezione di Bic, è consistente con l'esistenza di un livello di attività basale dei neuroni del RPa che controlla la termogenesi a livello del BAT necessaria per il mantenimento della TC<sup>40</sup>:

Il ruolo della neurotrasmissione da parte degli aminoacidi eccitatori nella comparsa delle risposte termogenetiche e cardiovascolari mediate dal RPa, è stato valutato attraverso microiniezione di agonisti selettivi per i recettori ionotropici del glutammato<sup>75</sup>.

Il glutammato (GLUT) un aminoacido non essenziale è il maggiore substrato energetico per le cellule proliferanti e neoplastiche e il principale neurotrasmettitore eccitatorio a livello del CNS. I recettori per questo neurotrasmettitore sono di natura ionotropa e metabotropa. I recettori ionotropici sono dei canali ionici ligando dipendenti che permettono il passaggio di cationi in seguito al legame del GLUT; questi sono classificati, in base all'agonista selettivo e

alla conduttanza ionica, in recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) e i recettori non-NMDA (recettori dell'acido Kainico, recettori  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA))<sup>76,77</sup>.

Il D,L-acido omocisteico, agonista selettivo del recettore NMDA, è stato utilizzato per la caratterizzazione del ruolo dei neuroni del RPa negli effetti simpatici sulla FC, la contrattilità cardiaca e la conduzione atrio-ventricolare in ratti anestetizzati. I risultati di questo studio hanno mostrato per la prima volta che oltre all'aumento della FC, l'attivazione dei neuroni del RPa è coinvolta nell'aumento della contrattilità ventricolare e nella diminuzione del ritardo nella conduzione atrio-ventricolare<sup>78</sup>.

L'attivazione di entrambi i recettori NMDA e non-NMDA a livello del RPa induce un immediato aumento della SNA del BAT che raggiunge il picco massimo dopo due minuti dall'iniezione, seguita da un aumento della TBAT, della CO<sub>2</sub> espirata e dalla comparsa di una marcata tachicardia. Non sono stati osservati effetti significativi sulla pressione arteriosa. Questo studio è stato il primo a dimostrare che l'attivazione di entrambi i recettori ionotropici NMDA e non-NMDA presenti al livello del RPa sono necessari per la comparsa della risposta termogenetica e cardiovascolare evocata in seguito alla disinibizione del tono GABA-ergico, supportando un modello in cui i premotoneuroni del RPa ricevono sia una tonica inibizione GABA-ergica che un input eccitatorio mediato dagli aminoacidi eccitatori; quest'ultimo sembrerebbe essere responsabile principalmente della guida eccitatoria dei premotoneuroni del RPa quando l'inibizione GABA-ergica viene meno<sup>75</sup>.

Questi risultati preliminari sono stati in seguito approfonditi in uno studio pubblicato nel 2006 in cui è stato indagato il ruolo dell'attivazione dei recettori glutammatergici del RPa nella modulazione delle risposte sulla FC, sulla SNA del BAT e sulla SNA renale indotte in seguito a disinibizione dei neuroni GABA-ergici del DMH<sup>79</sup>.

È stato dimostrato che la disinibizione dei neuroni della DMH nel ratto causa un aumento nella SNA del BAT e renale (RSNA), evocando un incremento nella termogenesi del BAT, nella pressione arteriosa e nella FC<sup>80</sup>.

La microiniezione a livello del RPa di agonisti per i recettori NMDA e non-NMDA (Acido Kainico, KA), in animali anestetizzati, ha indotto una marcata ma breve stimolazione della SNA del BAT, accompagnata da un aumento della TBAT, della CO<sub>2</sub> espirata e della FC. Sono stati osservati solo cambiamenti modesti a carico della pressione arteriosa media (PAM) e della RSNA. Il confronto tra gli effetti ottenuti in seguito ad iniezione dell'agonista per i recettori NMDA con quelli indotti dall'AK non ha mostrato alcuna differenza, facendo ipotizzare che entrambi i recettori siano ugualmente coinvolti nella comparsa di queste risposte<sup>79</sup>.

Questi risultati insieme all'evidenza scientifica che la somministrazione di antagonisti dei recettori NMDA e non-NMDA a livello del RPa bloccano gli effetti inerenti all'attività del BAT, ma non quelli sulla FC, MAP o RSNA indotti dalla disinibizione del DMH, indicano che l'attivazione glutammatergica dei neuroni del RPa (plausibilmente dei motoneuroni simpatici che controllano la termogenesi a livello del BAT) è coinvolta nella rete nervosa del DMH che controlla la SNA del BAT ma non nell'attivazione dei premotoneuroni cardiaci del RPa indotta in seguito alla disinibizione del DMH. L'incapacità degli antagonisti dei recettori glutammatergici di revocare l'aumento della MAP e della RSNA in seguito a disinibizione del DMH è consistente con i risultati di precedenti studi che hanno indicato il RVLM come sito dei premotoneuroni simpatici renali attivati dai neuroni del DMH<sup>81,51</sup>.

La presenza di fibre oressinergiche che proiettano al rRPa è stata ampiamente dimostrata da molti studi presenti in letteratura, tuttavia si conosce ben poco sui meccanismi e sui siti d'azione dell'oressina in questa regione<sup>82,83</sup>.

Le prime evidenze di una connessione tra i neuroni oressinergici e la zona del RPa sono stati forniti da uno studio in cui è stato dimostrato che l'iniezione intracerebroventricolare (icv) di oressina (ORX, *Orexin*), causa un aumento dell'espressione di cFos nella regione del rRPa<sup>82</sup>.

Il deficit di ORX causa la comparsa di narcolessia che è caratterizzata da disordini del ciclo veglia-sonno, della regolazione della TC e da una forte predisposizione all'obesità<sup>17</sup>

La produzione di calore a livello del BAT contribuisce alla regolazione della TC e attraverso il consumo energetico alla regolazione del peso corporeo. Recenti studi nel topo, hanno mostrato che durante lo stadio pre-natale, la presenza di ORX a livello sistemico, è fondamentale per la differenziazione del BAT e che la sua totale assenza causa la comparsa di obesità post-natale, molto probabilmente dovuta ad un'inefficace termogenesi del BAT per l'incapacità dei preadipociti bruni di accumulare trigliceridi<sup>84</sup>.

Nel 2011, Tupone e colleghi, hanno mostrato per la prima volta che il rRPa è il substrato neuronale coinvolto nell'influenza dei neuroni oressinergici sulla termogenesi del BAT. La prima parte di questo studio, condotto mediante l'utilizzo di un tracciante virale retrogrado iniettato a livello del BAT, della tossina colerica b iniettata a livello del RPa e combinato con l'analisi immunostochimica, ha mostrato la presenza di proiezioni oressinergiche, provenienti dall'area ipotalamica laterale e l'area perifornicale, dirette ai premotoneuroni a livello del rRPa<sup>17</sup>.

Per meglio comprendere il ruolo dei neuroni del RPa nelle risposte fisiologiche controllate dai neuroni oressinergici e il ruolo dell'oressina nella regolazione della termogenesi sono stati effettuati diversi studi di attivazione neuronale del RPa in seguito ad iniezione di oressina-A (ORXA).

Gli effetti dell'ORXA sui premotoneuroni del rRPa in ratti anestetizzati mantenuti a due diverse Tcore ha mostrato come in animali mantenuti ad una Tcore leggermente inferiore ai

37°C, quindi in presenza di un livello basale della SNA del BAT, l'iniezione di ORXA ha indotto un rapido, massiccio e prolungato aumento della SNA e della termogenesi a livello del BAT; anche la FC ha subito un incremento, al contrario la PAM non ha subito modificazioni rilevanti. Non sono state osservate modificazioni in nessuna delle variabili analizzate dopo l'iniezione di ORXA in animali con un processo termogenico non attivo ( $T_{core} > 37^{\circ}\text{C}$ ). I risultati ottenuti indicano che l'ORX è responsabile dell'amplificazione del processo termogenico del BAT solo in presenza di un tono eccitatorio termogenico già presente<sup>17</sup>.

Questo risultato è stato in parte confermato anche su animali liberi di muoversi mantenuti in condizioni di normotermia, quindi con una termogenesi non attiva; sono stati tuttavia osservati sia effetti cardiovascolari come l'aumento della PAM e della FC che effetti comportamentali come l'aumento della pulizia dell'animale e la comparsa di piccoli movimenti corporei<sup>85</sup>

La mancata comparsa degli effetti termoregolatori osservati in seguito ad iniezione di Bic o dall'attivazione glutammatergica nel RPa, fa ipotizzare che in condizioni di normotermia le proiezioni oressinergiche non hanno nessun ruolo sulla termogenesi a livello del BAT e la vasocostrizione. Tuttavia i neuroni oressinergici potrebbero controllare parte dei loro effetti pressori e tachicardici inviando proiezioni dirette al RPa

Un recente studio condotto nel nostro laboratorio (Fig. 3) su ratti liberi di muoversi esposti a tre diverse  $T_a$  ha confermato ancora una volta tutti i precedenti risultati sia dal punto di vista termoregolatorio che cardiovascolare<sup>86</sup>.

Infatti l'iniezione di ORXA a livello del RPa ha causato un aumento della  $T_c$  che è stato netto negli animali esposti ad una bassa temperatura (quindi con una forte termogenesi attiva), modesto alla  $T_a$  di 24°C, dove il tono termogenico era molto ridotto e praticamente nulla alla  $T_a$  di 32°C, durante la totale assenza di termogenesi (Fig. 3a). Questi dati confermano ancora una volta come l'ORX di per sé non è in grado di innescare una risposta termoregolatoria se

non coadiuvata da altri neurotrasmettitori o plausibilmente dalla concomitante presenza di un robusto tono eccitatorio a livello del BAT<sup>17</sup>.

Dal punto di vista cardiovascolare questo lavoro ha in parte confermato come questo aspetto sia influenzato dalla presenza di ORX nel RPa. Infatti la PAM ha subito un forte incremento negli animali esposti alla Ta di 24°C che non è stato replicato negli animali esposti a 10°C e a 32°C (Fig. 3c). Al contrario gli effetti a carico della FC (Fig. 3b), che risulta modificata in seguito ad altre manipolazioni farmacologiche come l'iniezione di Bic o NMDA, sono stati minori. Questo potrebbe indicare il coinvolgimento di un'altra popolazione neuronale nella mediazione degli effetti oressinergici sulla FC<sup>86</sup>.

## **2.2 Neurochimica dell'Oressina**

L'oressina anche conosciuta come Ipocretina, è un neuropeptide espresso da una specifica popolazione neuronale a livello dell'ipotalamo laterale, una regione implicata nell'assunzione di cibo, nella veglia e nei comportamenti motivati.

È stata identificata per la prima volta indipendentemente da due gruppi di ricerca come un ligando endogeno per due proteine G orfane accoppiate ai recettori nell'ipotalamo laterale<sup>87</sup><sup>88</sup>. Dato che l'iniezione di questo ligando induceva il consumo di cibo da parte dell'animale, questo fu chiamato da uno dei gruppi di ricerca, oressina, la cui radice deriva dalla parola greca *orexis* che vuol dire appetito.

Le oressine costituiscono una nuova famiglia di peptidi, che non presenta nessuna omologia strutturale con le altre famiglie di peptidi regolatori, formata da due diversi sottotipi: Oressina-A (ORX A) e Oressina-B (ORX B)<sup>89</sup>.

L'ORX A è un peptide formato da 33 aminoacidi caratterizzato dalla presenza di due ponti disolfuro intracatena, un residuo N-terminale piroglutamico e un'amidazione presente all'estremità C-terminale. La struttura primaria della ORX A predetta attraverso l'utilizzo del cDNA è completamente conservata in diverse specie di mammiferi (uomo, ratto, topo, pecora, cane e maiale) <sup>87</sup>.

L'ORX B è un peptide composto da 28 aminoacidi, amidato nell'estremità C-terminale con il 46% delle sequenze amminoacidiche (13 su 28) identiche a quelle dell'ORX A. la porzione C-terminale è molto simile a quella dell'ORX A con il 73% di omologia nelle sequenze (11 su 15) mentre la parte N-terminale della molecola è molto variabile. Anche l'ORX B è conservata nelle diverse specie di mammiferi.

L'ORX A e l'ORX B, sintetizzate a partire da un taglio proteolitico a livello di un polipeptide comune: la prepro-oressina, si legano a due sottotipi di recettori: recettore 1 oressinergico (OX1R, *Orexin receptor-1*) e il recettore 2 (OX2R, *Orexin receptor-2*).

Questi due recettori hanno il 64 % delle sequenze identiche tra loro e i loro geni sono altamente conservati nelle diverse specie, infatti è stato stimato che circa il 94 % degli aminoacidi dell'OX1R e il 95% di OX2R del topo e dell'uomo sono identici <sup>87</sup>.

L'OX1R ha una maggiore affinità per l'ORX A mentre l'OX2R mostra una simile affinità per entrambi i sottotipi di ORX. Studi di ibridazione in situ hanno mostrato come i due recettori siano caratterizzati da una distribuzione differente e complementare a livello cerebrale, facendo ipotizzare un loro differente ruolo fisiologico <sup>90</sup>: Elevati livelli di espressione del RNA messaggero (mRNA) per l'OX1R sono stati riscontrati nell'area ipotalamica anteriore, nella formazione ippocampale, nel raphe dorsale e nel locus coeruleus, tutte regioni in cui sono stati riscontrati bassi livelli o assenza di mRNA per la codifica di OX2R; al contrario elevate quantità di mRNA per l'OX2R sono state rilevate in aree che con bassi livelli di mRNA OR1X

come l'ipotalamo dorsomediale, il nucleo arcuato, il nucleo paraventricolare, l'ipotalamo laterale, il nucleo tuberomammillare, la corteccia celebrale, il nucleo accumbens e i nuclei del raphe<sup>90,91</sup>.

Queste evidenze istologiche suggeriscono che plausibilmente le oressine e i loro recettori abbiano un vasto ruolo nella regolazione fisiologica a livello del sistema nervoso centrale<sup>92</sup>.

I neuroni responsabili della produzione dell'oressina (neuroni oressinergici) sono localizzati esclusivamente a livello dell'ipotalamo laterale e dell'area perifornicale, tuttavia recenti studi hanno indicato la presenza di oressina e dei suoi recettori anche a livello del sistema nervoso enterico e dei neuroni sensitivi primari<sup>93</sup>.

I neuroni oressinergici proiettano lungo l'intero nevrasse, esclusa la zona del cervelletto. Una colorazione immunoistochimica più intensa della parte terminale dei neuroni oressinergici è stata riscontrata a livello del nucleo arcuato, dell'ipotalamo laterale, dei nuclei del raphe e del nucleo tuberomammillare, questo in accordo con la localizzazione dei recettori oressinergici suggerisce che queste regioni rappresentano i maggiori siti effettori dell'oressina.

Le vie afferenti che proiettano ai neuroni oressinergici sono state rilevate attraverso studi nel topo e nel ratto che hanno previsto l'uso di traccianti retrogradi e anterogradi<sup>94,95</sup>. Questi studi hanno mostrato che i neuroni oressinergici sono innervati dal nucleo parabrachiale laterale, dal nucleo preottico ventrolaterale, dall'area preottica mediale e laterale, dal tronco encefalico, dall'ipotalamo posteriore e dorsomediale e dai nuclei mediani del raphe.

È stato dimostrato che i neuroni oressinergici ricevono proiezioni anche da aree associate al controllo dell'omeostasi energetica, che plausibilmente provengono dal nucleo arcuato.

Le proiezioni afferenti inviano segnali ai neuroni oressinergici e modulano l'attività neuronale oressinergica attraverso la secrezione di specifici neuromodulatori., che sono stati in parte scoperti in seguito a studi di elettrofisiologia su topi transgenici.

La noradrenalina e la serotonina iperpolarizzano e inibiscono l'attività dei neuroni oressinergici<sup>96,97</sup>, mentre il carbacolo, agonista colinergico, attiva il 27% dei neuroni e ne inibisce il 6%<sup>94</sup>. L'istamina al contrario sembrerebbe non avere alcun effetto sui neuroni oressinergici<sup>89</sup>. Diversi studi rivelano inoltre che i neuroni oressinergici sono tonicamente attivati dai neuroni di natura glutammatergica<sup>96</sup> e fortemente inibiti da input GABA-ergici<sup>98,99</sup>.

Recentemente Yamanaka e colleghi hanno inoltre mostrato che la stessa oressina induce l'attivazione dei neuroni oressinergici mediante il legame con OR2X; questo potrebbe suggerire che i neuroni formano un circuito di feedback positivo attraverso vie dirette e indirette, al fine di sostenere la stessa via oressinergica durante uno stato di attivazione massiccia e/o prolungata nel tempo<sup>100</sup>.

L'attività oressinergica risulta modulata anche da fattori umorali. Studi di elettrofisiologia hanno mostrato come un'elevata concentrazione extracellulare di glucosio e leptina inducono una marcata iperpolarizzazione dei neuroni oressinergici. Al contrario la diminuzione della concentrazione di glucosio, grelina e un insieme di diversi aminoacidi inducono una depolarizzazione di questi neuroni<sup>101</sup>.

### **2.2.1 Ruolo dei neuroni oressinergici nella regolazione degli stati di veglia e di sonno e nel comportamento alimentare**

I neuroni oressinergici sono neuroni “*multi-tasking*” coinvolti nella regolazione degli stati di veglia-sonno e nei comportamenti attivi motivati, come quello alimentare, emotivo e quello legato alla ricerca di una ricompensa<sup>92</sup>.

Nel ratto e in altre specie, la somministrazione centrale di ORXA durante il periodo di luce, induce nelle prime due ore che seguono l'iniezione, un aumento del consumo di cibo pari a 2-

3g<sup>87,102</sup>; questa situazione è comparabile con il risultato ottenuto nel ratto, in seguito all'iniezione icv di un peptide fortemente oressigenico come la grelina<sup>103</sup>.

Inoltre, il digiuno aumenta il numero dei neuroni oressinergici positivi per la presenza della proteina cFos nei primati<sup>104</sup> e nei topi<sup>105</sup>; in particolare nel topo in cui è stata indotta una condizione ipoglicemica, dopo 48 ore di digiuno, si riscontra un aumento della quantità di mRNA per la sintesi della prepro-oressina, suggerendo che l'espressione del gene è regolata anche dal livello di glucosio nel sangue<sup>87,106,92</sup>.

Concomitantemente è stato mostrato che i neuroni oressinergici non solo ricevono proiezioni dai neuroni del nucleo arcuato<sup>107</sup>, ma influenzano direttamente il circuito neuronale ipotalamico implicato nel comportamento alimentare. La somministrazione locale di ORXA nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo nel ratto, nel DMH o nel LH<sup>108</sup> induce l'aumento dell'assunzione di cibo, suggerendo che questo neuropeptide influenza il comportamento alimentare interagendo con vari aspetti del circuito dell'alimentazione<sup>108-110</sup>.

L'ORX sembrerebbe essere inoltre coinvolta nella regolazione del peso corporeo, infatti l'incidenza dell'obesità in individui narcolettici, che presentano un ridotto numero di neuroni oressinergici, è due volte più alta rispetto alla popolazione generale<sup>111</sup>. Questo è confermato da studi effettuati su topi in cui l'ablazione dei neuroni oressinergici causa ipofagia e paradossalmente induce la comparsa tardiva dell'obesità e del diabete di tipo 2<sup>112</sup>. Inoltre topi transgenici con una elevata espressione del neuropeptide sono resistenti all'obesità indotta da una dieta ad alto contenuto di grassi<sup>113</sup>.

L'ipotesi che l'ORX possa indurre resistenza all'obesità è ulteriormente supportata da studi su ratti in cui è stata modificata l'attività spontanea. Questi animali, caratterizzati da uno stato di iper-attività, presentano un'elevata espressione di mRNA codificante per la prepro-oressina, un elevato dispendio dell'energia metabolica e resistenza all'obesità<sup>114</sup>.

L'ORX quindi sembrerebbe indurre simultaneamente l'aumento del consumo di cibo e della spesa energetica.

È stato inoltre ampiamente dimostrato il coinvolgimento dell'ORX nel consolidamento dello stato di veglia; i neuroni oressinergici, infatti, risultano attivi durante il periodo di veglia e inviano segnali eccitatori a diverse popolazioni neuronali monoaminergiche e colinergiche promuoventi lo stato di veglia, plausibilmente sostenendo la loro attività. Questo è stato dimostrato dall'insieme studi condotti *in vivo* e *in vitro* che hanno mostrato come i neuroni oressinergici: i) scaricano attivamente durante lo stato di veglia attiva, quando l'animale esplora l'ambiente circostante, mentre risultano silenti durante la fase di sonno NREM e sonno REM<sup>115-117</sup>; ii) sono responsabili della stimolazione di diverse popolazioni neuronali promuoventi la veglia come: i neuroni noradrenergici del locus coeruleus (LC)<sup>118</sup>, dopaminergici dell'area tegmentale ventrale (VTA)<sup>119</sup>, serotoninergici del raphe dorsale<sup>120</sup>, istaminergici del nucleo tuberomammillare<sup>100</sup> e colinergici del prosencefalo basale (BF)<sup>121</sup>. I neuroni oressinergici, a loro volta, sono regolati dall'acetilcolina e dalle monoamine e sono costantemente innervati dai neuroni colinergici provenienti dal BF<sup>94</sup>. L'iniezione di un agonista colinergico come il carbacolo attiva parte della popolazione dei neuroni oressinergici. I neuroni serotoninergici e noradrenergici, al contrario, inviano proiezioni inibitorie ai neuroni oressinergici<sup>94,97</sup>.

D'altra parte è stato dimostrato che i neuroni della VLPO, un'area chiave per la comparsa del sonno, pur non presentando recettori per il neuropeptide, inviano numerose proiezioni inibitorie ai neuroni oressinergici<sup>95</sup>. Questo è stato confermato dal fatto che questi ultimi risultano fortemente inibiti da agonisti GABA-ergici<sup>98</sup> e la selettiva deplezione nel topo di geni per i recettori GABA<sub>B</sub> in questi neuroni si traduce in una instabilità dell'architettura degli stati veglia-sonno<sup>99</sup>.

Inoltre la modulazione farmacogenetica dei neuroni oressinergici ha rivelato che la loro stimolazione aumenta il periodo passato in veglia dell'animale mentre la loro inibizione diminuisce il periodo di veglia e aumenta quello di sonno NREM<sup>122</sup>. Questa modulazione selettiva dei neuroni oressinergici *in vivo* suggerisce che la loro attività è implicata nella regolazione dello stato di vigilanza dell'animale<sup>92</sup>.

Saper e colleghi hanno proposto il coinvolgimento dell'ORX in un circuito, chiamato *flip-flop switch*, che controlla la transizione tra lo stato di veglia e quello di sonno. Questo modello si esplica attraverso un'inibizione mutualistica tra il VLPO e i neuroni monoaminergici promuoventi la veglia. In questo circuito l'ORX avrebbe il ruolo di stabilizzare la transizione tra la veglia e il sonno, rinforzando il sistema promuovente la veglia, senza però inibire direttamente la VLPO<sup>123</sup>.

È stato ipotizzato che il mantenimento di uno stato di veglia consolidato da parte dell'ORX potrebbe essere importante per il supporto del comportamento alimentare, come ad esempio la ricerca del cibo, che è essenziale per la sopravvivenza dell'animale. In condizioni di scarsa disponibilità di cibo, infatti, gli animali mettono in atto diverse strategie tra cui il prolungamento del periodo di veglia, che interrompe il normale pattern circadiano.

Durante una deprivazione di cibo prolungata, topi con l'ablazione dei neuroni oressinergici, non presentano un massiccio aumento della quantità di veglia e dell'attività locomotoria, che si riscontra invece in topi wild type esposti alle stesse condizioni sperimentali<sup>124</sup>.

Studi precedenti condotti sul ratto hanno mostrato come le modificazioni del pattern di veglia-sonno indotte in seguito ad un periodo prolungato di deprivazione di cibo, sono in parte ridotte in seguito ad infusione di glucosio<sup>125</sup>. Inoltre la somministrazione periferica di leptina in ratti deprivati di cibo aumenta la quantità di sonno NREM, che ritorna ai livelli fisiologici in seguito all'assunzione di cibo<sup>126</sup>.

Questi studi sono coerenti con un modello in cui una drastica diminuzione dei livelli di glucosio e leptina circolante nel sangue e un aumento dei segnali grelina indotti dalla deprivazione di cibo producono un aumento dell'attività dei neuroni oressinergici <sup>124</sup>.

Tutte queste evidenze suggeriscono che i neuroni oressinergici percepiscono lo stato metabolico e nutrizionale dell'animale e integrano queste informazioni per indurre un livello di veglia tale da permettere la ricerca di cibo durante un bilancio energetico negativo.

Il sistema oressinergico potrebbe quindi contribuire alla regolazione dell'omeostasi energetica attraverso l'integrazione delle informazioni riguardanti lo stato metabolico e la regolazione degli stati veglia-sonno.

### **3 INIBIZIONE FARMACOLOGICA DEI NEURONI DEL RAPHE PALLIDUS**

#### **3.1 Effetti indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni del Raphe Pallidus**

L'inibizione farmacologica neuronale è una tecnica di inattivazione reversibile, che permette di bloccare le funzioni neuronali interferendo con queste a diversi livelli.

L'inattivazione a livello cerebrale può essere indotta attraverso l'utilizzo di due principali tipi di sostanze: i) farmaci bloccanti i canali ionici, come la tetrodossina e diversi anestetici locali, che prevengono l'inizio e la trasmissione dei potenziali d'azione nei corpi cellulari e nelle fibre degli assoni; ii) agonisti e antagonisti dei neurotrasmettitori che interferiscono con l'attività neuronale a solo a livello sinaptico<sup>127</sup>.

L'inibizione farmacologica ha due importanti vantaggi: può essere ripetuta più volte nello stesso animale durante la stessa sessione sperimentale e la stessa area cerebrale può essere manipolata più volte in sessioni sperimentali diverse, permettendo di aumentare la confidenza del risultato ottenuto. Analogamente diversi siti possono essere inattivati nello stesso animale permettendo di constatare la selettività spaziale dell'effetto. Questi aspetti permettono di arrivare a solide ipotesi riguardo la localizzazione della popolazione neuronale coinvolta<sup>128</sup>. L'utilizzo di agonisti e antagonisti dei neurotrasmettitori è considerato un metodo valido per l'inattivazione di specifiche aree cerebrali, in quanto ha il vantaggio di inattivare temporaneamente i neuroni a livello locale permettendo di evitare le fibre di passaggio. Tuttavia questo non preclude l'induzione di effetti distali sulle aree cerebrali connesse con la regione inattivata<sup>127</sup>

L'inibizione farmacologica dei neuroni del RPa blocca la produzione di calore, l'aumento della SNA a livello del BAT e l'aumento della FC indotte in seguito a qualsiasi stimolo termogenetico testato.

La somministrazione di muscimolo, antagonista del recettore GABA<sub>A</sub>-ergico, utilizzata per indagare il ruolo dei neuroni del RPa nella trasmissione dei segnali pirogeni (mediati dalla PGE<sub>2</sub>) agli effettori simpatici che contribuiscono alla comparsa della febbre, ha mostrato come la continua inibizione dei neuroni del RPa causa il blocco dell'aumento della TBAT e della T<sub>core</sub>, precedentemente indotti dalla somministrazione di PGE<sub>2</sub> a livello centrale o nella MPO<sup>4</sup>.

Inoltre un ulteriore studio delle vie efferenti che regolano le risposte simpatiche durante l'esposizione ad una bassa T<sub>a</sub> e nella comparsa del processo febbrile ha mostrato ancora una volta come l'inibizione GABA-ergica o l'attivazione dei recettori 5-HT<sub>1A</sub> dei neuroni del RPa elimina il brivido e tutte le risposte autonome indotte dal raffreddamento cutaneo o dalla

somministrazione centrale di PGE<sub>2</sub><sup>47</sup>. Contemporaneamente l'inibizione dei neuroni del RVMM attenua la comparsa del brivido e l'attivazione dei neuroni fusimotori del muscolo scheletrico osservate in seguito a raffreddamento il cutaneo<sup>3</sup>.

In ratti anestetizzati, mantenuti ad una T<sub>core</sub> inferiore ai 37°C attraverso il raffreddamento cutaneo, l'inibizione dei neuroni del RPa, indotta indipendentemente dall'iniezione di muscimolo, glicina (agonisti dei recettori inibitori), acido chinurenico, ( KiA; antagonista non selettivo dei recettori ionotropici degli aminoacidi eccitatori) e l'8-idrossi-2-(Di-*n*-propilamino) tetralin idrobromide (8-OH-DAT; agonista del recettore serotoninergico 1A) ha causato una completa reversione degli effetti indotti dal raffreddamento cutaneo dell'animale sulla SNA del BAT, sulla TBAT, sulla CO<sub>2</sub> espirata e sulla FC; cambiamenti nella MAP sono stati osservati solo dopo l'iniezione con glicina e KiA.

Questi risultati confermano le evidenze raccolte in esperimenti di attivazione neuronale del RPa, in animali con una T<sub>core</sub> normotermica, in cui l'attivazione dei recettori glutammatergici amplifica l'attività termogenetica a livello del BAT, la TBAT, la CO<sub>2</sub> espirata e la FC<sup>75</sup>. Il ruolo della trasmissione amminoacidica eccitatoria nelle riposte evocate dall'attivazione glutammatergica del rRPa è stato ulteriormente consolidato in seguito a somministrazione di antagonisti dei recettori per il GLUT. Tutti gli effetti termoregolatori e cardiaci indotti dall'attivazione neuronale del RPa sono stati bloccati in seguito a somministrazione di antagonisti per i recettori NMDA e non-NMDA.

L'aumento della FC, fortemente arrestato dall'inibizione dei neuroni del RPa, potrebbe indicare l'esistenza di vie efferenti simili nella risposta cardiaca e termogenetica durante l'esposizione a basse Ta. Questa ipotesi è consistente con lavori precedenti in cui l'inibizione della POA o l'attivazione dei neuroni del DMH o del RPa causano un aumento della FC.

La completa soppressione dell'aumento dell'attività termogenetica del BAT e del tasso metabolico, osservata in seguito all'iniezione di 8-OH-DPAT, è stata osservata anche in un precedente lavoro in cui l'attivazione dei recettori 5-HT<sub>1A</sub> ha eliminato le risposte termogenetiche e cardiovascolari indotte dall'infusione endovenosa di leptina. Questi risultati fanno ipotizzare il coinvolgimento di input serotoninergici diretti al RPa. nel controllo della via termogenetica efferente.

Inoltre una somministrazione sistemica dell'agonista dei recettori 5-HT<sub>1A</sub> induce la comparsa di uno stato ipotermico in diverse specie animali come il ratto e l'uomo ed è in grado di diminuire la termogenesi del BAT in ratti non anestetizzati esposti ad una bassa Ta. I recettori 5-HT<sub>1A</sub> sono accoppiati negativamente all'adenilato ciclasi dalla proteina Gi; questo probabilmente provoca un'inibizione delle funzioni neuronali. Dati ottenuti in diversi studi di immunoistochimica supportano una potenziale localizzazione di questi recettori sui corpi cellulari dei premotoneuroni del RPa che controllano il BAT; la loro attivazione in seguito ad input serotoninergici potrebbe attenuare l'attività dei premotoneuroni causando l'inibizione del processo termogenetico nel BAT<sup>41</sup>.

Uno studio di inattivazione neuronale in ratti liberi di muoversi ha mostrato per la prima volta il coinvolgimento dei neuroni del rRPa nel mantenimento della Tcore. Infatti, contrariamente a quanto osservato in seguito a disinibizione dei neuroni del RPa in ratti anestetizzati, l'iniezione di muscimolo nel RPa ha indotto un veloce decremento della Tcore senza influenzare i valori della FC e della MAP<sup>71</sup>. In due degli esperimenti condotti in questo studio le iniezioni di muscimolo sono state effettuate in due differenti aree del RPa: una più anteriore e una più laterale rispetto al sito d'iniezione; in entrambi i casi non si è osservata alcuna riduzione significativa della TC. Questi dati suggeriscono che l'attività dei neuroni nella regione del RPa giocano un ruolo importante nel mantenimento della TC ma non della FC in condizioni fisiologiche in animali liberi di muoversi<sup>71</sup>.

Una diminuzione della TC è stata osservata anche durante la perfusione dell'area de RPa con la tetrodossina in animali liberi di muoversi mantenuti ad una Ta normale. La tetrodossina inibisce l'attività neuronale bloccando i canali del Na<sup>+</sup>, quindi l'effetto osservato in questo studio potrebbe essere dovuto ad un blocco della propagazione del potenziale degli assoni che passano attraverso il RPa piuttosto che ad un'inibizione del soma cellulare dei neuroni residenti in questa regione<sup>129</sup>.

Lo studio degli effetti di inibizione farmacologica dei neuroni del RPa è stata di fondamentale importanza in quanto ha permesso di concludere che l'attività dei suoi premotoneuroni simpatici coinvolti nel controllo del BAT e del cuore forniscono una guida sopraspinale eccitatoria al circuito simpatico spinale necessaria e sufficiente per le risposte termogenetiche e cardiache coinvolte nei processi di termoregolazione, di comparsa della febbre e ad una varietà di stimoli che influenzano la TC<sup>40</sup>.

Basandosi sull'osservazione dello studio condotto da Zaretsky e colleghi<sup>71</sup>, dove l'inibizione GABA-ergica dei neuroni del RPa induce una riduzione della TC, nel 2013 un ulteriore studio condotto nel nostro laboratorio ha mostrato come l'inibizione dei del RPa per un lungo intervallo di tempo (6 ore) attraverso iniezioni reiterate di muscimolo (1 all'ora) causa un drastico cambiamento in diversi parametri autonomici e nella potenza delle onde elettroencefalografiche (Fig. 4)<sup>130</sup>. A partire dalla prima somministrazione di muscimolo si osserva una progressiva diminuzione della Tc, della FC e della potenza delle onde cerebrali. Contemporaneamente compare una massiccia vasodilatazione cutanea negli organi scambiatori di calore come la coda che regredisce progressivamente in parallelo con la diminuzione della Tc (Fig. 4b). Come riscontrato nel precedente studio la MAP non ha subito grandi cambiamenti, facendo ipotizzare un modesto coinvolgimento del RPa nella regolazione di questo parametro<sup>39</sup> (Fig. 4a). Dal punto di vista comportamentale l'animale dopo la prima iniezione di muscimolo assume una postura volta alla dissipazione del calore corporeo. Questo comportamento

potrebbe essere dovuto alla grande affluenza del sangue a livello cutaneo che potrebbe aver attivato i termocettori sensibili al caldo. Al raggiungimento del Nadir della Tc l'animale appare letargico e non presenta alcun tipo di movimento corporeo. I cambiamenti nello spettro delle onde elettroencefalografiche potrebbero essere una conseguenza della diminuzione della Tc, tuttavia potrebbe essere anche mediato dai neuroni bulbari con proiezioni ascendenti o dai cambiamenti indotti dal RVMM nel flusso sanguigno cerebrale.

La profonda ipotermia osservata in questo studio è il risultato dell'aumento della dissipazione termica e molto probabilmente di una diminuzione della produzione di calore dovuta plausibilmente all'inibizione dei neuroni serotoninergici e glutammatergici localizzati nel RVMM, in particolare nella zona del RPa. La forte diminuzione della FC potrebbe essere spiegata dalla mancanza del tono eccitatorio dei neuroni del RPa che non può essere compensato dall'intervento dei centri ipotalamici superiori o dal RVLM.

Il prolungato blocco della via centrale della termoregolazione, coinvolta nelle risposte all'esposizione a basse Ta, attraverso l'inibizione farmacologica del RPa ha indotto nel ratto aspetti fenomenologici come il progressivo calo della Tc seguito dalla concomitante riduzione della FC, l'assenza di modificazioni a carico della PA e la diminuzione dell'attività corticale che ricalcano quelli osservati durante l'ibernazione naturale. L'ibernazione è una risposta fisiologica e comportamentale finemente regolata che permette di coordinare i processi endogeni con le condizioni ambientali<sup>131</sup>. Durante l'ibernazione tutti gli aspetti metabolici come la FC e la frequenza respiratoria sono fortemente ridotti, permettendo, attraverso uno stato ipotermico regolamentato, di tollerare valori di TC vicini a quelli della Ta<sup>132</sup>.

Un meccanismo cellulare che può contribuire alla riduzione del tasso metabolismo e della termogenesi durante il periodo di ibernazione, è la fosforilazione reversibile di enzimi e proteine che interessa anche le proteine sinaptiche di membrana, un sistema quest'ultimo

implicato anche nei processi di plasticità sinaptica. È stato dimostrato che nei processi di fosforilazione, che insorgono durante l'ibernazione, è coinvolta anche una proteina associata ai microtubuli: la proteina Tau. È stato ipotizzato che l'iperfosforilazione della proteina Tau è collegato ai processi di riduzione delle connessioni sinaptiche che si manifesta durante il periodo di torpore, quando l'attività elettroencefalografica risulta fortemente ridotta. È stato ben documentato che la fosforilazione reversibile della proteina Tau, nell'animale ibernante, è concomitante alla graduale regressione e la successiva ricomparsa dei contatti sinaptici tra le fibre *mossy* e i neuroni piramidali dell'ippocampo. Questo risultato, insieme all'evidenza della esistente correlazione tra un modesto aumento della fosforilazione della Tau e l'aumento della protezione neuronale rispetto all'apoptosi cellulare, potrebbero far pensare a questo processo come ad una strategia protettiva in un ambiente sfavorevole<sup>132</sup>.

### **3.2 La proteina Tau**

La Tau è una proteina altamente solubile ed è localizzata maggiormente a livello degli assoni dei neuroni maturi<sup>133</sup>. La presenza di questa proteina è stata osservata anche a livello del compartimento somatodendritico neuronale<sup>134</sup>, nel nucleo<sup>135</sup> e in misura minore anche negli astrociti e negli oligodendrociti<sup>136</sup>.

La Tau appartiene alla famiglia delle proteine associate a microtubuli (MAP) e sono state identificate, nel cervello umano, 6 isoforme generate in seguito a splicing alternativo del gene MAPT<sup>137</sup>.

Le isoforme differiscono tra loro per due principali caratteristiche: i) la presenza di 3 (3R) o 4 (4R) sequenze ripetute in tandem carbossi-terminali della lunghezza di 31 aminoacidi, che corrispondono ai domini di legame per i microtubuli; ii) l'assenza (0N) o la presenza di una (1N) o due sequenze (2N) ripetute N-terminali.

Le isoforme 3R e 4R sono presenti in eguale proporzione nel cervello umano rispetto alle isoforme N0, N1 e N2<sup>138,139</sup>.

La Tau è una proteina di natura basica, tuttavia presenta dei residui nella parte N-terminale di natura acida e altri di natura neutra nella parte C-terminale. L'asimmetria delle cariche è fondamentale da un lato nell'interazione con i microtubuli ed altre proteine e dall'altro per il ripiegamento interno e l'aggregazione della proteina stessa. La sua struttura è divisa, sulla base dell'interazione con i microtubuli e della natura degli aminoacidi che la compongono, in due domini principali: il dominio di assemblaggio C-terminale che lega i microtubuli e ne promuove l'assemblaggio<sup>140</sup> e il dominio di proiezione N-terminale che proietta fuori dai microtubuli<sup>141</sup>. Questi due domini sono tenuti insieme tra loro da una regione ricca di prolina che funziona come dominio di legame per proteine segnale contenenti il dominio Src di omologia 3 (SH3), come la tirosina-chinasi FYN. Un'altra regione contenente un elevato numero di prolina si trova a valle del dominio ripetuto e contiene gli epitopi degli anticorpi che vanno incontro ad iperfosforilazione durante la patologia del morbo di Alzheimer sia nell'uomo che nei modelli animali<sup>142</sup>.

La proteina trovata anche a livello del sistema nervoso periferico è chiamata "grande Tau" in riferimento al maggiore peso molecolare rispetto alle isoforme presenti a livello del CNS<sup>143</sup>.

Lo stato di fosforilazione e l'espressione delle isoforme vengono regolati durante lo sviluppo, molto probabilmente perché coinvolti nell'aumento della plasticità del citoscheletro necessaria durante lo sviluppo embrionale e precoce<sup>144</sup>. Infatti durante l'embriogenesi nell'uomo è presente una sola di isoforma della proteina Tau (N0R3) con un elevato grado di fosforilazione<sup>145</sup>. Al contrario nell'età adulta sono presenti tutte le 6 isoforme della proteina e il grado di fosforilazione riscontrato è minore<sup>145,146</sup>. Anche la distribuzione della Tau è regolata dallo sviluppo: nel neurone giovane la Tau è distribuita solo nel corpo cellulare e nel neurite,

quando l'assone emerge e il neurone si polarizza la Tau inizia ad essere presente in maniera massiccia all'interno dell'assone e in minor percentuale nei dendriti e nel nucleo<sup>133</sup>.

La Tau è stata inizialmente identificata come una proteina associata ai microtubuli, ma più recentemente è stato dimostrato il ruolo di questa proteina in molteplici funzioni a livello di diversi compartimenti cellulari<sup>147</sup>.

A livello assonale la proteina Tau stabilizza i microtubuli e ne promuove l'assemblaggio, in particolare ne regola l'instabilità dinamica responsabile della riorganizzazione del citoscheletro<sup>142,148</sup>. Inoltre è coinvolta anche nella regolazione del trasporto assonale attraverso l'interazione con le proteine motore, in particolare sembrerebbe essere coinvolta nel distacco della chinesina dal microtubulo e nell'inversione della direzione della dineina, riducendo il trasporto assonale retrogrado e anterogrado<sup>149</sup>. Il coinvolgimento della proteina Tau nel trasporto assonale è stato dimostrato da studi *in vitro* o su culture cellulari<sup>150,151,152</sup>, tuttavia l'aumento o la diminuzione dell'espressione della proteina nel topo non ha avuto alcuna influenza sul trasporto assonale<sup>153</sup>, facendo ipotizzare l'esistenza di un ulteriore meccanismo *in vivo* che controbilancia l'azione della Tau<sup>147</sup>.

Il dominio C-terminale che lega i microtubuli, oltre a coadiuvare la stabilizzazione del citoscheletro e il trasporto assonale, interagisce anche con diverse proteine come le fosfatasi<sup>154</sup>, DNA<sup>155</sup> e RNA<sup>156</sup>. Il dominio N-terminale, al contrario, è stato dimostrato interagire con le membrane neuronali e con il dominio Src di omologia 3 delle proteine segnale associate alla membrana plasmatica<sup>157</sup>, facendo ipotizzare un coinvolgimento nella regolazione della rete di segnali cellulari.

Inoltre la Tau sembrerebbe essere essenziale nella maturazione e nell'allungamento dell'assone, infatti l'ablazione di questa proteina nelle culture cellulari di neuroni di ratto inibisce la formazione del neurite<sup>158</sup>, mentre al contrario l'aumento della sua espressione

promuove la formazione del neurite anche in cellule di altra natura<sup>159</sup>, tuttavia questo ruolo necessita di ulteriori approfondimenti in quanto studi *in vivo* effettuati sul topo hanno mostrato risultati discordanti<sup>160,161</sup>.

Recentemente è stata ipotizzata un'ulteriore funzione a livello dendritico per questa proteina nel meccanismo di plasticità neuronale, infatti l'attivazione farmacologica a livello sinaptico dei neuroni *in vitro* induce la traslocazione della proteina dall'albero dendritico al compartimento post-sinaptico eccitatorio<sup>162</sup>. È stato inoltre mostrato sia in colture cellulari che con esperimenti *in vivo* che in condizioni fisiologiche e di stress ipertermico, la Tau presente a livello nucleare sembrerebbe avere un ruolo nel mantenimento dell'integrità del DNA e del RNA sia citoplasmatico che nucleare.

Tutte queste evidenze suggeriscono che la Tau sia una proteina multifunzione coinvolta nell'assemblaggio e stabilizzazione a livello microtubulare, nella trasduzione del segnale cellulare e nella differenziazione neuronale<sup>163,164</sup>.

### **3.2.1 Iperfosforilazione della proteina Tau**

Le funzioni della proteina Tau, nel cervello dell'uomo adulto, sono finemente regolate da meccanismi post-traduzionali. Tra questi, il processo di fosforilazione di un limitato numero di residui di Serina e Treonina rappresenta un rapido meccanismo per la regolazione della capacità di legame della Tau ai microtubuli. In generale la fosforilazione induce una diminuzione dell'affinità di legame per i microtubuli regolando la normale funzione fisiologica di questa proteina nell'assemblaggio e nella stabilità dei microtubuli<sup>165</sup>.

Tuttavia in diverse patologie neurodegenerative il grado di fosforilazione della proteina Tau diventa sempre più elevato con la progressione della malattia per arrivare fino ad uno stato definito di "iperfosforilazione"<sup>165</sup>. La forma iperfosforilata della proteina si aggrega in

filamenti a doppia elica (PHF, PHFs, *Paired Helical Filaments*), che rappresentano la subunità strutturale dei grovigli neurofibrillari e di altri aggregati intracellulari presenti nelle cosiddette “Taupatie”<sup>166,167</sup>.

Ad esempio, grovigli neurofibrillari (NTF) formati dai PHFs rappresentano uno dei maggiori marcatori per la diagnosi nel morbo di Alzheimer (AD, *Alzheimer Disease*), una delle Taupatie maggiormente studiate<sup>168</sup>. La Tau presente negli aggregati differisce da quella normale per l'elevato grado di fosforilazione presente, per la sua conformazione che diventa più compatta e per una diminuita solubilità<sup>169,170</sup>. Attualmente il legame tra l'elevata fosforilazione della proteina Tau e la formazione degli aggregati non è ancora ben definito. Si è ipotizzato che il processo di fosforilazione possa indurre dei cambiamenti conformazionali che favoriscono la sua aggregazione<sup>171,172</sup>. Nell'uomo sono stati individuati circa 30 siti di fosforilazione della proteina Tau che sono coinvolti sia nei processi fisiologici che patologici. In base a questo risultato è stato ipotizzato che la fosforilazione della proteina Tau nel AD intervenga inizialmente come parte di un processo fisiologico volto alla protezione e che in seguito si trasformi in un meccanismo patologico con il progredire della malattia<sup>168</sup>.

La fosforilazione dei residui di Treonina e Serina è associata ad una ridotta affinità per i microtubuli e alla traslocazione dal compartimento assonale a quello somatodendritico con la conseguente disregolazione della funzione della proteina<sup>173</sup>. Sulla base di queste evidenze si è ipotizzato che il declino cognitivo tipico delle Taupatie potrebbe essere dovuto in primis ad una dislocazione della Tau iperfosforilata nei siti subsinaptici piuttosto che alla formazione dei PHF<sup>174,173</sup>.

La fosforilazione, in un grado inferiore a quello presente nell'AD, sembrerebbe essere promossa a livello neuronale per regolare l'attività della proteina Tau in maniera transiente e reversibile in base alla necessità. Una dimostrazione di questa ipotesi è data dal fenomeno di

ibernazione dove la selettiva espressione e il controllo delle chinasi e delle fosfatasi rappresenta una risposta adattativa per la sopravvivenza in ambienti ostili<sup>165</sup>. Durante lo stato di torpore dell'ibernazione la Tau risulta altamente iperfosforilata, tuttavia la presenza di PHFs è ben tollerata dall'organismo non essendo associata con la formazione fibrillare ed essendo completamente reversibile con il ritorno dell'animale all'eutermia. La fosforilazione/defosforilazione della proteina Tau durante il torpore e il successivo ritorno all'eutermia è concomitante alla regressione e alla seguente ricomparsa sinaptica dei contatti delle fibre *mossy* terminali ippocampali<sup>132</sup>. Una spiegazione potrebbe essere data dal fatto che la fosforilazione della proteina Tau aumenta l'instabilità dei microtubuli favorendone lo stato dinamico, questo faciliterebbe i cambiamenti strutturali delle fibre *mossy* durante l'ibernazione. Questo suggerisce un collegamento tra la fosforilazione della proteina e la plasticità sinaptica che compare durante l'ibernazione<sup>175</sup>.

Diversi studi hanno confermato il ruolo dell'iperfosforilazione tra i meccanismi di neuroprotezione messi in atto in condizioni ambientali sfavorevoli. A dimostrazione di questo è stato osservato anche una correlazione tra il modesto incremento della proteina Tau fosforilata e l'aumento della protezione dei neuroni rispetto al processo apoptotico<sup>176</sup>. Un ulteriore meccanismo di protezione che permette agli animali ibernanti di tollerare la severa riduzione del flusso sanguigno e della disponibilità di ossigeno a livello cerebrale sembrerebbe coinvolgere l'aumento della fosforilazione del fattore di allungamento eucariotico 2 (eEF2)<sup>177</sup>. La sua fosforilazione rappresenterebbe uno specifico processo che inibisce la fase di allungamento durante la sintesi proteica ed è correlata alla fosfatasi P2 (PP2) che risulta quasi del tutto inibita durante il periodo di torpore. La completa inibizione della PP2, considerata la principale fosfatasi delle serine e treonine a livello cerebrale, che regola anche la fosforilazione della Tau potrebbe anche essa essere coinvolta nel meccanismo di neuroprotezione. L'inibizione cronica di questa fosfatasi, infatti, induce la fosforilazione della Tau nella regione

ippocampale con uno schema di distribuzione che ricalca quello osservato durante il periodo di torpore nell'animale ibernante.

L'iperfosforilazione della Tau potrebbe essere un meccanismo finalizzato alla stabilizzazione della sua struttura, attraverso il conferimento di una resistenza all'azione delle proteasi. La stabilizzazione del citoscheletro di questa proteina potrebbe essere un meccanismo finalizzato a congelare la struttura dinamica durante il periodo di ibernazione in maniera tale da prevenirne la sua degradazione conservandola per una rapida attivazione durante il ritorno dell'animale alle condizioni normotermiche<sup>132</sup>.

È stato dimostrato che l'ingresso e l'uscita da uno stato ipotermico di animali ibernanti e non ibernanti è accompagnato da una fase di ipereccitabilità a livello neuronale<sup>178</sup>. La sensibilità dell'attività neuronale alla variazione della temperatura sembrerebbe essere mediata da processi dipendenti dal recettore NMDA<sup>179</sup>. L'espressione della delezione mutante della Tau che non permette il legame con i microtubuli induce un disaccoppiamento tra i recettori NMDA e la proteina di densità post-sinaptica 95 (PSD-95). Questo fa ipotizzare che la Tau in uno stato iperfosforilato, quindi con una ridotta affinità per i microtubuli, potrebbe essere dislocata nelle spine dendritiche dove riduce la funzione sinaptica, plausibilmente riducendo o dislocando i recettori NMDA a livello postsinaptico. Questo meccanismo potrebbe essere utilizzato anche durante l'ibernazione come un meccanismo neuroprotettivo che previene l'ipereccitabilità neuronale mediata dai recettori NMDA che altrimenti si manifesterebbe durante il graduale raffreddamento del cervello. In questa ottica l'inattivazione funzionale dei segnali mediati dai recettori NMDA indotta dalla proteina Tau nel suo stato iperfosforilato potrebbe essere non solo un grande vantaggio durante l'entrata in torpore dell'animale ma potrebbe essere un pre-requisito, necessario per una controllata inattivazione dell'attività neuronale durante l'ibernazione. Questa ipotesi è in accordo con l'osservazione di un efficiente processo di iperfosforilazione nell'ibernante presente nel range tra i 37 e i 30°C<sup>180</sup>.

L'iperfosforilazione della proteina Tau sotto condizioni controllate di ipometabolismo e ipotermia rappresenta una reazione fisiologica generalizzata con funzione di protezione. Allo stesso modo è stato ipotizzato che l'iperfosforilazione della proteina Tau nell'AD rappresenti una strategia compensatoria che compare durante la comparsa della malattia per sopprimere lo sbilanciamento eccitatorio e inibitorio e l'alterazione delle reti neuronali.



# **SCOPO DELLA TESI**



Scopo di questa tesi è stato quello di studiare nel ratto libero di muoversi i correlati comportamentali (modificazione degli stati veglia/sonno, assunzione di cibo) e della funzionalità cellulare nervosa centrale della manipolazione farmacologica locale del Raphe Pallidus, area sede di pre-motoneuroni simpatici coinvolti nella regolazione di processi inerenti la termogenesi.

Nella prima parte dello studio si è proceduto a studiare gli effetti della somministrazione locale nel RPa del neuropeptide Oressina A. Studi precedenti hanno infatti mostrato come la somministrazione di Oressina A nel RPa sia in grado di attivare la termogenesi e le variabili autonome cardiovascolari sia nell'animale anestetizzato, sia in quello libero di muoversi, ma solo in presenza di un tono termogenetico di base. Tali effetti tendono a scomparire quando la termogenesi sia inibita dall'esposizione a un'elevata temperatura ambientale.

Per questo motivo nella tesi si è condotta un'analisi degli effetti a breve termine dell'iniezione di Oressina A sui diversi stati del ciclo veglia-sonno e, più in particolare, sul comportamento alimentare in animali esposti a una temperatura ambientale alla normale temperatura di laboratorio (24°C, prossima ai limiti inferiori del rango termoneutrale del ratto) e a una temperatura ambientale elevata (32°C). Le risposte comportamentali osservate alle normali condizioni di laboratorio hanno indotto a un'ulteriore indagine volta alla caratterizzazione della popolazione neuronale del RPa responsabile degli effetti osservati. In particolare si è ipotizzato che tale popolazione fosse rappresentata da neuroni serotoninergici, sia perché questa è una popolazione neuronale a mediatore noto tra le più numerose in quest'area, sia perché è noto che l'iniezione di un agonista serotoninergico a livello della colonna intermedio laterale del midollo spinale che riceve le efferenze dei pre-motoneuroni simpatici del RPa, induce un'amplificazione dell'attivazione della termogenesi.

Per meglio discriminare la specificità comportamentale e cellulare degli effetti indotti dall'attivazione selettiva oressinergica dei neuroni del RPa, i risultati sono stati confrontati con quelli indotti alla normale temperatura di laboratorio dalla disinibizione non selettiva dei neuroni del RPa ottenuta attraverso la microiniezione di GABA-zina, un antagonista dei recettori GABA<sub>A</sub>.

Nella seconda parte dello studio si è proceduto invece in senso inverso, agendo localmente sul RPa mediante la somministrazione di muscimolo, un agonista GABA<sub>A</sub>, la cui somministrazione reiterata nel ratto si è mostrata in grado di indurre un blocco reversibile della termogenesi in grado di determinare una progressiva riduzione della temperatura corporea fino a livelli di poco superiori ai 20°C e una concomitante inibizione di ogni attività comportamentale accompagnata da un'ampia riduzione dell'ampiezza del tracciato elettroencefalografico.

Gli effetti comportamentali e autonomici di tale manipolazione centrale dell'attività del RPa sono stati precedentemente descritti in uno studio condotto nel nostro laboratorio da Cerri e collaboratori<sup>130</sup>. In questa tesi si è proceduto ad indagare la correlazione tra i suddetti effetti e la funzionalità cellulare nel RPa e in altre strutture nervose centrali, valutata attraverso lo studio del grado di fosforilazione della proteina Tau, durante lo sviluppo della condizione di ipotermia e il successivo ripristino della condizione eutermica.

Questa scelta è stata determinata dal fatto che nell'animale ibernante è stata osservata una iperfosforilazione della proteina Tau in concomitanza della comparsa dei periodi di torpore che risulta completamente reversibile durante il progressivo ripristino delle condizioni di eutermia<sup>132</sup>. Tale processo si ritiene costituisca la base di un meccanismo di neuroprotezione, possibilmente associato a fenomeni di plasticità neuronale già descritti nell'ibernante, in grado di scongiurare la comparsa di eventuali danni cellulari indotti dall'ipotermia profonda.

L'analisi è stata prioritariamente condotta in alcune strutture nervose centrali coinvolte nella regolazione degli stati veglia/sonno e nel controllo della funzione autonoma e metabolica e rappresenta il primo tentativo di indagare tali processi in condizioni di ipotermia profonda in una specie non-ibernante come il ratto, anche al fine di porre le basi per un possibile futuro trasferimento in piena sicurezza alla specie umana di tecniche atte ad indurre un'ipotermia di grado comparabile a quella che si osserva negli ibernanti naturali.



# **MATERIALI E METODI**



Per la realizzazione di questo studio sono stati utilizzati complessivamente 75 ratti albini maschi ceppo Sprague-Dawley (Charles River) aventi un peso compreso tra 275 e 300g al momento dell'acquisto.

Dopo l'arrivo gli animali sono stati stabulati, in coppie di individui dello stesso peso, in apposite gabbie di plexiglass (Techniplast), dotate di una lettiera depolverata, in accordo con le indicazioni della Direttiva 2010/63/UE.

Prima di ogni sessione sperimentale, gli animali sono stati fatti adattare a condizioni ambientali finemente controllate (Temperatura ambiente  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; ciclo luce-buio 12h:12h, accensione della luce alle 9:00 del mattino, 100 lux di intensità a livello della gabbia) con cibo e acqua *ad libitum*, per un periodo minimo di sette giorni.

Ogni giorno, dopo l'accensione della luce, un operatore specializzato ha provveduto alla valutazione del benessere degli animali, al cambio delle lettiere e al rifornimento di cibo e acqua.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con la Direttiva dell'Unione Europea 2010/63/EU, su autorizzazione del Ministero della Salute secondo i DL 116/92 e 26/2014 e sotto la supervisione del Servizio Veterinario Centrale dell'Università di Bologna.

## **1 INTERVENTO CHRURGICO**

### **1.1 Elettrodi**

Gli elettrodi impiantati per la registrazione dell'elettroencefalogramma (EEG) e della temperatura cerebrale (Tc) sono stati realizzati prima di ogni intervento chirurgico.

A tale scopo, per gli elettrodi necessari per l'EEG, sono stati utilizzati due fili di rame (lunghezza 2 mm, diametro 0,3) rivestiti da uno strato isolante e opportunamente sverniciati per 1 mm alle estremità. I fili sono stati in seguito saldati alle estremità di due pin collegati ad

un connettore con una saldatrice a stagno. Durante l'intervento sono stati fatti due nodi alle estremità libere dei fili, con funzione di fermo, al fine di evitare eventuali lesioni della dura madre durante il loro inserimento attraverso la teca cranica.

## **1.2 Termistori**

Per la misura della  $T_c$  è stato utilizzato un termistore in goccia di vetro (B10KA303N; NTC Thermometrix) del diametro di 0,3 mm.

Il termistore è stato prima inserito in un ago 21 G precedentemente tagliato per una lunghezza di 6 cm e poi connesso con una spinetta a due pin situata nel collo di connessione dell'ago; in seguito si è proceduto all'isolamento di tutte le componenti con diversi strati di vernice per elettrodi.

La settimana precedente l'intervento il termistore è stato tarato per la valutazione della costanza dei parametri fisici del trasduttore e in seguito si è proceduto alla calibrazione lineare dello stesso.

Per la taratura il termistore è stato previamente immerso in un bagno termostato, fissato alla temperatura di 35°C, misurata con un termometro a mercurio (scala 34°C-42°C) ed è stato connesso a un amplificatore in corrente continua, successivamente utilizzato durante la sessione sperimentale per l'acquisizione del segnale.

Al fine di verificare la costanza nel tempo delle caratteristiche fisiche del termistore e di compararne il funzionamento a tempi diversi di utilizzazione, si è proceduto al rilievo della sua impedenza a tre diverse temperature: 35°C, 35,5°C e 36°C.

### **1.3 Rilevazione della pressione arteriosa**

Per l'acquisizione della pressione arteriosa (PA) è stato utilizzato un catetere (AS 632 DataSciences) inserito nell'arteria femorale, il cui trasmettitore è stato invece alloggiato a livello della cavità addominale dell'animale.

Nel corso dell'intervento chirurgico, prima del suo inserimento in arteria il catetere è stato opportunamente sterilizzato per 8 minuti in una apposita soluzione (CIDEX-OPA, Jhonson & Jhonson)

### **1.4 Chirurgia**

Prima dell'inizio di ogni sessione chirurgica, gli animali, dopo essere stati sottoposti a una preanestesia (Diazepam, Valium Roche, 5 mg/Kg intramuscolo) a scopo sedativo e dopo pochi minuti sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di Ketavet (Ketamina-Hcl, Parke-Davis, 100 mg/Kg).

Dopo l'addormentamento dell'animale, verificato mediante piccoli stimoli pressori, esercitati a livello degli arti inferiori e delle vibrisse, si è proceduto alla tricotomia del cranio (Esperimento A e Esperimento B) e della superficie dell'addome lungo la linea compresa tra i muscoli addominali e l'arto posteriore (Esperimento A, gruppo A3). Tutte le aree sono state di seguito disinfettate con una crema antisettica (Betadine 10% gel Meda Pharma Milano) per uso chirurgico al fine di evitare contaminazioni batteriche durante le operazioni a cute incisa.

Dopo che l'arteria femorale è stata esposta, attraverso un taglio effettuato a livello dell'insenatura compresa tra la parete addominale e la zampa posteriore destra, è stata scollata dal tessuto connettivo circostante e dalla vena femorale adesa ad essa. In seguito, attraverso l'uso di forbici vascolari, è stato praticato un foro nell'arteria dove è stato inserito il catetere per la rilevazione della pressione arteriosa. Infine il trasmettitore collegato al catetere è stato

alloggiato e fissato nel piano sottocutaneo, a livello addominale, con dei punti di sutura (Esperimento A, gruppo A3).

L'animale è stato quindi posizionato su un apparecchio stereotassico (Esperimento A e B), con l'ausilio di una barra trasversale di appoggio per la mascella (barretta blocca muso, 4 mm) e di due barrette auricolari a punta smussa inserite delicatamente ed in modo incruento nei meati uditivi esterni.

In seguito alla rimozione del periostio tramite una leggera cauterizzazione, sono stati praticati in sequenza: i) 2 fori (diametro 0,5 mm) nella porzione antero-laterale delle ossa frontali e 2 fori (diametro 0,5 mm) nella porzione postero-laterale delle due ossa parietali, in cui sono state inserite quattro viti per l'ancoraggio di un castelletto di resina acrilica; ii) un foro (diametro 0,5 mm), a livello dell'ipotalamo laterale, per l'impianto di un termistore per la rilevazione della Tc, iii) 1 foro sull'osso parietale (4mm Antero Posteriore (AP), 2 mm Latero Laterale (LL) dal bregma) e 1 foro sull'osso frontale (-3 mm AP, 2 mm LL dal bregma) per l'impianto dell'elettrodo registrante e di riferimento per il rilievo dell'EEG, iv) 1 foro a livello dell'osso occipitale per l'inserimento di una microcannula guida ( C315G-SPC, Plastics One; calibro esterno cannula guida: 0,46 mm; estensione della cannula interna dal piedistallo: +3,5 mm; calibro esterno cannula interna: 0,20 mm) atta alla somministrazione di soluzioni a livello del RPa (da -9,7 mm a -14 mm AP; 0 mm LL; -9.5 DV dal bregma).

Il corretto posizionamento della microcannula guida è stato valutato attraverso l'utilizzo di un test funzionale intraoperatorio che ha previsto, mediante l'utilizzo di una termocamera ad infrarosso (ThermaCAM Researcher Pro; FLIR Systems), l'osservazione delle variazioni di temperatura della coda dell'animale, in seguito all'iniezione di 100 nl di muscimolo 1mM nel RVMM. Lavori effettuati in precedenza, infatti, hanno mostrato come l'inibizione del RVMM causi una intensa vasodilatazione.

Se entro 5 minuti dall'iniezione si osservava un aumento della temperatura della coda (indice di intensa vasodilatazione) il posizionamento della microcannula veniva considerato corretto e si procedeva con la fissazione di tutti gli impianti con una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal a freddo). In caso di esito negativo le coordinate DV e LL venivano modificate e il test è ripetuto. Nel caso di reiterato risultato negativo l'animale veniva escluso dal piano sperimentale.

Al termine della procedura chirurgica è stata attuata una profilassi antibiotica ad ampio spettro (penicillina G, 37500 IU/kg; streptomina-solfato, 8750 IU/kg, per via intramuscolare) per prevenire eventuali infezioni postoperatorie e sono stati somministrati per via sottocutanea 5 ml di soluzione fisiologica per la reidratazione dell'animale.

Le zone cutanee lesionate sono state nuovamente trattate con Betadine per la loro disinfezione e il dolore post-operatorio è stato prevenuto grazie alla somministrazione intraoperatoria (anche post-operatoria all'occorrenza) di un analgesico (Carprofene 4 mg/kg per via subcutanea).

Dopo l'intervento chirurgico ogni animale è stato stabulato individualmente per tutta la durata dell'esperimento per prevenire lesioni causate da altri animali in presenza degli impianti chirurgici. Durante questo periodo gli animali operati hanno mantenuto il contatto visivo ed olfattivo con gli altri ratti per attenuare gli effetti dell'isolamento. Il recupero post-intervento ha avuto la durata di 1 settimana, durante la quale, gli animali sono stati tenuti sotto stretta osservazione da un operatore e dai medici veterinari del Servizio Veterinario Centralizzato. Il livello di sofferenza nell'animale durante tutto il corso della procedura sperimentale è stato valutato attraverso l'ausilio della tabella Human End Point (HEP).

Due giorni prima della sessione sperimentale gli animali sono stati fatti adattare alla Ta di  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  nel box di registrazione dove sono stati connessi alla strumentazione utilizzata per la registrazione dei parametri fisiologici.

## **2 APPARATO DI REGISTRAZIONE**

### **2.1 Box di registrazione**

Il box di registrazione è costituito da un congelatore a pozzetto, modificato per effettuare una fine regolazione della temperatura ambientale. Tale regolazione è data da un termostato connesso al compressore del congelatore e a una stufa elettrica (1500 W) alloggiata all'interno dello stesso.

Tale termostato ha la funzione di attivare rispettivamente il compressore o la stufa ogni volta che la temperatura si discosta da quella fissata dall'operatore.

La parte superiore del box di registrazione è stata inoltre opportunamente modificata per permettere l'alloggiamento di: i) cavi per la registrazione delle variabili fisiologiche, ii) una ventola per permettere un'aerazione interna continua, iii) un impianto video in bianco e nero (Philips) per il monitoraggio del comportamento dell'animale, iv) un sistema telemetrico per la rilevazione della PA, v) un sistema di illuminazione con fibre ottiche (100 lux a livello della gabbia) collegato ad un timer esterno al box per l'accensione e lo spegnimento della luce (accensione ore 9:00; spegnimento ore 21:00).

Ogni box è stato modificato in maniera tale da poter contenere al suo interno al massimo due postazioni di registrazione.

### **2.2 Postazione di registrazione**

La postazione di registrazione è formata da una gabbia in plexiglass dotata di un fondo mobile, alla quale è applicato tramite un supporto, un braccio basculante con contatto rotante al quale vengono collegati i cavi per l'acquisizione delle variabili fisiologiche dell'animale.

### **3 AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEI SEGNALI BIOELETTRICI**

I parametri fisiologici registrati (EEG e Tc) sono stati amplificati (mod. Grass 7P511L, Astro-Med Inc, West Warwick (RI), USA) e filtrati con filtro passa alto e passa basso con i seguenti valori per ciascun segnale bioelettrico: EEG 0,3 Hz /30 Hz e Tc 0,5 Hz (per il passa-alto).

Tutti i segnali sono stati convertiti dalla modalità analogica a quella digitale (analogico-digitale a 12 bit, CED Micro MK 1401 II) e sono stati salvati su un hard drive digitale con frequenza di campionamento di 500 Hz per l'EEG, e di 50 Hz per Tc. Il segnale EEG è stato sottoposto ogni secondo ad un'analisi spettrale mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier (FFT).

In questo modo sono stati ottenuti 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 physiotel PA-C40, DataSciences) e incorporato digitalmente su un computer con una frequenza di acquisizione di 500 Hz.

### **4 MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI**

#### **4.1 Modalità microiniezioni**

L'apparato per le microiniezioni è stato messo a punto nel nostro laboratorio ed è costituito da:  
i) un tubo di teflon, lungo 1 metro e con un diametro costante per tutta la sua lunghezza (D.I.0.2mm, FEP-Tubing 4001005 10X1m Microbiotech/se AB, Stockholm, Sweden), ii) due connettori a tenuta stagna che collegano un'estremità del tubo con la microcannula per le microiniezioni e l'altra con una siringa Hamilton (5 µl, Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland).

Prima di ogni sessione sperimentale il tubo e la cannula sono riempiti con la sostanza da iniettare, mentre la siringa è riempita con un olio minerale e un colorante idrofobico. L'interfaccia che si viene a creare tra il colorante e l'olio permettono all'operatore di verificare, mediante l'utilizzo di un microscopio stereoscopico e un centimetro opportunamente posizionato sotto il tubo, sia l'avvenuta iniezione che il volume di liquido iniettato.

La siringa, dopo essere stata preparata, è collocata su una pompa per infusione (Harvard Apparatus) posizionata all'esterno del box di registrazione per evitare che l'animale non venga disturbato dalla procedura d'iniezione.

Dopo aver verificato che l'iniezione è stata correttamente eseguita, la cannula viene rimossa alla fine di ogni sessione sperimentale.

## **4.2 Analisi istologica del sito di iniezione**

Come riportato in dettaglio nella sezione 1.4, il corretto posizionamento della cannula guida è stato verificato funzionalmente durante l'intervento chirurgico. Per ulteriore conferma, al fine di non disturbare ed eventualmente alterare il Raphe Pallidus, che in tutti gli esperimenti è stato oggetto di analisi immunohistochimica, non si è proceduto ad iniettare coloranti in grado di marcare l'area di iniezione prima del sacrificio dell'animale, ma dopo aver sezionato il cervello al criostato diverse fettine contenenti l'area del RPa sono state analizzate al microscopio a luce bianca per verificare che la traccia lasciata dalla cannula interna terminasse in corrispondenza del RPa. Tali sezioni sono state fotografate digitalmente (vedi esempio nella Figura 5). In tutti gli animali sperimentali i cui dati sono stati riportati in questa tesi è stato confermato che, come indicato dalla precedente procedura funzionale, il posizionamento della cannula fosse in corrispondenza del RPa.

## **5 PROCEDURA PER L'ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA**

### **5.1 Perfusionione intra-cardiaca**

Dopo ogni sessione, secondo quanto stabilito dal protocollo sperimentale utilizzato, gli animali sono stati anestetizzati con etere dietilico per la conseguente perfusione intra-cardiaca con 250 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%, peso/volume) seguiti da 250 ml di paraformaldeide al 4% (peso/volume) in tampone fosfato.

In tale procedura è stata utilizzata una pompa peristaltica, collegata ad un ago da perfusione (16G), caricata un'ora e mezza prima della perfusione con soluzione fisiologica in seguito sostituita dalla paraformaldeide al 4%. L'utilizzo della pompa ha permesso l'erogazione di un flusso e di un volume del liquido costanti, scongiurando l'eventuale formazione di bolle.

Dopo aver verificato l'effettiva efficacia dell'anestesia, attraverso la valutazione della risposta dell'animale a modica stimolazione dolorifica e l'andamento della frequenza cardiaca, si è proceduto con una toracotomia per l'esposizione del cuore e il conseguente inserimento dell'ago da perfusione nell'aorta.

Verificato il giusto posizionamento alla base dell'aorta, l'ago è stato fissato attraverso una pinza emostatica e si è proceduto con l'accensione della pompa peristaltica.

Pochi secondi dopo l'attivazione della pompa si è effettuato un taglio a livello dell'auricola destra del cuore per permettere al sangue e ai liquidi immessi di defluire all'esterno, evitando carichi pressori.

Constatata la buona riuscita del lavaggio degli organi con la soluzione fisiologica attraverso l'avvenuto sbiancamento del fegato e degli arti, la soluzione salina è stata sostituita con la paraformaldeide per la fissazione degli organi.

Alla fine della procedura il cervello (Esperimento A, B), il midollo spinale (Esperimento B), l'intestino (Esperimento B), e lo stomaco (Esperimento B) sono stati estratti, post-fissati per un'ora e mezza in paraformaldeide e in seguito immersi in una soluzione di saccarosio al 30% con NaN<sub>3</sub> per la conservazione alla temperatura di 4°C fino al giorno del taglio.

## 5.2 Analisi immunoistochimica

I cervelli (esperimento A, B) e il midollo spinale (esperimento B) sono stati preparati per la successiva analisi immunoistochimica attraverso il taglio in sezioni coronali da 35 µm con un criostato (Reichert-Jung, 2800 Frogocut-N) fissato alla temperatura di -21°C.

Prima del taglio si è provveduto ad eliminare dai campioni eventuali residui di meningi, nervi periferici e aree non utili per l'analisi immunoistochimica e a effettuare un primo taglio grossolano del cervello a livello dell'eminenza mediana e del midollo spinale a livello delle vertebre cervicali, toraciche e lombari con l'ausilio di un brain blocker (PA 001 Rat Brain Blocker, David Kopf Instruments).

I campioni così preparati sono stati sistemati sulla base di taglio del criostato con l'utilizzo di un apposito mezzo di inclusione (Killik, Bio Optica Milano s.p.a) per il susseguente taglio.

Durante l'operazione di taglio le fettine sono state raccolte a rotazione in differenti pozzetti (n=6 per il cervello; n=3 per il midollo spinale) in maniera tale da poter ottenere differenti campionamenti tutti uguali tra loro.

Al termine della procedura le fettine ottenute sono state lavate in un tampone fosfato salino 10 mM (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) e conservate in una soluzione crioprotettrice alla temperatura di -70°C fino al momento del trattamento immunoistochimico.

Il protocollo immunoistochimico, dopo un primo lavaggio in PBS, ha previsto una pre-incubazione delle fettine in siero normale di asino per due ore (*Normal-Donkey serum*, Sigma-Aldrich, ADS) e una seguente incubazione di 12 ore con differenti gruppi di anticorpi (Ac)

primari, precedentemente diluiti in ADS, per la rilevazione di differenti antigeni scelti in base alla necessità del protocollo sperimentale

Gli antigeni analizzati e i relativi Ac utilizzati con le opportune diluizioni per i due esperimenti sono elencati di seguito:

i) esperimento A:

- ***anti-cfos*** (1:1000, policlonale di coniglio, Calbiochem), per la rilevazione di cfos marker di attivazione neuronale
- ***anti-Tryptophane-Hydroxylase*** (1:500, monoclonale di topo, Sigma-Aldrich), per la rilevazione dell'enzima triptofano idrossilasi (TPH) indice della presenza di neuroni serotoninergici

ii) esperimento B:

- ***MabN140-anti-NeuN*** (1:400, monoclonale di coniglio, clone 27-4, Millipore), per la rilevazione della proteina NeuN marker delle cellule neuronali
- ***AT8 - anti-Phospho-PHF-tau pSer202+Thr205*** (1:400, monoclonale di topo, clone AT-8, Pierce Laboratories), per la rilevazione della proteina Tau associata ai PHFs nell'uomo e in altre specie come il ratto.

Dopo 12 ore le sezioni sono state lavate con una soluzione di PBS contenente Triton X-100 0,3% (v/v) per eliminare l'eccesso di Ac non legato. In seguito le fettine sono state incubate per ulteriori due ore con gli Ac secondari legati a differenti fluorocromi precedentemente diluiti in ADS secondo quanto segue:

- anti-IgG di coniglio ***Alexa Fluor 488*** coniugato con fluorocromo verde (1:500), diretto contro gli Ac ***anti-c-Fos*** (esperimento A) e ***MabN140-anti-NeuN*** (esperimento B)

- anti-IgG di topo *Alexa Fluor 594*, coniugato con fluorocromo rosso (1:500), diretto contro gli Ac *anti-Tryptophane-Hydroxylase* (esperimento A) e *AT8 - anti-Phospho-PHF-tau pSer202+Thr205* (esperimento B)

Al termine della seconda incubazione le fettine sono state nuovamente lavate in PBS e in seguito montate tramite tecnica di *free floating* su speciali vetrini portaoggetto trattati per permettere una migliore adesione delle fettine (Superfrost Plus, Thermo Scientific Menzel). Dopo 24 ore si è proceduto a montare il coprioggetto su ogni vetrino con un liquido montante protettivo per la fluorescenza (Prolong-Diamond Antifade, Invitrogen). I vetrini sono stati quindi riposti in un'apposita scatola porta vetrini mantenuta ad una temperatura di 4°C.

### 5.3 Analisi delle immagini

Le immagini relative all'esperimento A sono state ottenute mediante l'utilizzo un microscopio (Zeiss Jenaval) comprensivo di un apparato di filtri per epifluorescenza montati in cubetto Nikon (Alexa 594 Top Pride). Il microscopio è stato collegato a una macchina fotografica (Nikon) e a un computer per la conseguente acquisizione e salvataggio delle immagini.

Sono state analizzate un totale di 4 sezioni tutte adiacenti al sito d'iniezione con le seguenti coordinate: -11,28 AP, -12 AP, -12,48 AP e -13,44 AP dal bregma.

Dopo aver scelto la fettina contenente l'area di interesse, questa è stata fotografata utilizzando in sequenza i due filtri atti alla rilevazione della fluorescenza (verde per la positività a cfos; rosso per la positività a TPH).

In seguito le immagini della stessa area ottenute con l'utilizzo del filtro rosso e del filtro verde sono state sovrapposte mediante l'utilizzo del programma Image Pro-Analyzer 7.0 per la

valutazione di un'eventuale co-localizzazione dei due marcatori rilevati, indice di presenza di un neurone serotoninergico attivato.

Dopo aver verificato la perfetta sovrapposizione delle due immagini, attraverso l'utilizzo dello stesso programma adoperato per sovrapporre e montare le immagini fotografiche, un operatore ha eseguito il conteggio delle cellule positive per i diversi tipi di fluorescenza.

Al termine dell'analisi tutte le cellule contate per ogni sezione sono state registrate dal programma che ha restituito il numero totale di cellule positive per ogni marcatore analizzato.

Le immagini analizzate per l'esperimento B sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza (Nikon) per gentile concessione dell'unità operativa di Anatomia, Istologia Patologica e Citodiagnostica dell'Ospedale Maggiore di Bologna.

L'analisi dell'immagine è stata effettuata utilizzando il medesimo programma dell'esperimento A e le strutture analizzate sono state selezionate da un operatore attraverso l'ausilio del marker MabN140-anti-NeuN (Anti-NeuN) marcato con fluorocromo verde e dell'atlante neuroanatomico<sup>182</sup>.

L'analisi svolta ha previsto un approccio qualitativo, diversi operatori hanno effettuato in cieco una valutazione dell'intensità di fluorescenza del fluorocromo corrispondente all'antigene AT8 - anti-Phospho-PHF-tau pSer202+Thr205 (AT-8; fluorocromo rosso) presente nelle strutture di interesse.

I risultati sono stati catalogati utilizzando una scala definita in base alle diverse intensità riscontrate nel segnale, con i seguenti criteri:

- i) “-” completa assenza del segnale
- ii) “+” intensità debole del segnale
- iii) “++” intensità intermedia del segnale
- iv) “+++” intensità alta del segnale
- v) “++++” intensità massima del segnale

## 6 PIANO SPERIMENTALE

### 6.1 Esperimento A

L'esperimento A è stato volto allo studio degli effetti sistemici e cellulari in seguito all'iniezione di ORXA, GABA-zina e soluzione fisiologica a livello del RPa in ratti liberi di muoversi, esposti a diverse Ta.

Il protocollo sperimentale ha previsto l'utilizzo di 5 gruppi di animali per un totale di 59 ratti. Dopo una settimana di recupero dall'intervento, gli animali sono stati alloggiati nel box di registrazione per due giorni di adattamento alle normali condizioni di laboratorio (Ta  $24\pm 1^\circ\text{C}$ ). Dopo questo periodo, durante le due giornate sperimentali, la Ta è stata mantenuta a  $24\pm 1^\circ\text{C}$  in 3 gruppi di animali (gruppo A1, A3, A4), mentre è stata fissata a  $32\pm 1^\circ\text{C}$  per i restanti 2 gruppi sperimentali (gruppo A2, A5).

Durante la seconda giornata sperimentale si è proceduto alla somministrazione di una singola microiniezione a livello del RPa delle seguenti sostanze (Fig. 6):

- i) gruppo A1 (ORX  $24^\circ\text{C}$ ; n=16), iniezione del neuropeptide ORXA (30 pM, 150 nl) alla Ta di  $24\pm 1^\circ\text{C}$
- ii) gruppo A2 (ORX  $32^\circ\text{C}$ ; n=15), iniezione del neuropeptide ORXA (30 pM, 150 nl) alla Ta di  $32\pm 1^\circ\text{C}$
- iii) gruppo A3 (GBZ  $24^\circ\text{C}$ ; n=5), iniezione dell'antagonista GABA<sub>A</sub>, GABA-zina (0,5 mM, 120 nl) alla Ta di  $24\pm 1^\circ\text{C}$
- iv) gruppo A4 (Sal  $24^\circ\text{C}$ ; n=11), iniezione di soluzione fisiologica (0,9 %, 150 nl) alla Ta di  $24\pm 1^\circ\text{C}$
- v) gruppo A5 (Sal  $32^\circ\text{C}$ ; n=9), iniezione di soluzione fisiologica (0,9%, 150 nl) alla Ta di  $32\pm 1^\circ\text{C}$

Le microiniezioni sono state effettuate nella mattinata del secondo giorno sperimentale tra le ore 11:00 e le ore 14:00, in un momento di particolare tranquillità della giornata dell'animale. Questo periodo è coinciso con l'inizio della fase di riposo, quando le variabili autonome tornano a livelli fisiologici e compare un episodio di sonno prolungato e con la fine della fase di attivazione comportamentale del ciclo ultradiano di attività-riposo (BRAC, Basic Rest Activity Cycle), caratterizzata nel ratto da laboratorio da un aumento delle variabili vegetative come la Tc, la FC e la PA e la concomitante assunzione di cibo<sup>183</sup>.

Tutti gli animali sono stati monitorati per 1 ora e 30 minuti successivi al trattamento, attraverso un apparato di registrazione video installato sulla gabbia dell'animale (Philips), di cui un operatore poteva osservare gli aspetti del comportamento alimentare.

Un animale del gruppo A4 non è stato iniettato a causa della presenza di un tappo fibroso nella guida della cannula interna, precedentemente impiantata durante l'intervento, che ha impedito l'inserimento dell'ago per la microiniezione in sede. Si è deciso di utilizzare comunque questo animale considerandolo un caso *Sham Operated*, ovvero un animale sottoposto alle stesse condizioni sperimentali del gruppo A4 ma non iniettato.

Nella seconda giornata sperimentale si è proceduto alla registrazione del tracciato EEG di un campione rappresentativo per ognuno dei 5 gruppi sperimentali (ORX 24°C=7; GBZ 24°C=5; Sal 24°C=4; ORX 32°C=5; Sal 32°C=5); l'acquisizione del tracciato EEG è stata finalizzata all'analisi quantitativa degli stati di veglia e di sonno.

Si è inoltre effettuata un'analisi immunoistochimica, di un campione di animali per tutte le condizioni sperimentali che hanno previsto un'esposizione alla Ta di 24°C: ORX 24°C=7; GBZ 24°C=5; Sal 24°C=4. Gli animali sono stati perfusi 1 ora e 30 minuti dopo il trattamento ricevuto per una valutazione ottimale dell'espressione dell'antigene cfos, indice di attivazione neuronale.

È stata fatta anche una valutazione immunohistochimica dell'animale *Sham operated*, utilizzato come controllo interno per discriminare eventuali falsi positivi dovuti a una reazione aspecifica in seguito all'alloggiamento della cannula interna a livello del RPa o alla manipolazione dell'animale.

Per meglio comprendere se i risultati sull'attivazione neuronale del gruppo A4 fossero dovuti alla sostanza utilizzata o a un fattore meccanico, causato a esempio dall'inserimento dell'ago in sede o dal volume delle soluzioni iniettate, si è proceduto a un ulteriore controllo somministrando il liquido cerebrospinale artificiale (a-CSF, *Artificial Cerebrospinal Fluid*) in un gruppo di animali (n=2) esposto alle stesse condizioni dei gruppi A1, A3, A4.

## 6.2 Esperimento B

L'esperimento B è stato finalizzato allo studio degli effetti cellulari riguardanti il grado di fosforilazione della proteina Tau, in seguito ad induzione di uno stato di pseudo-torpare attraverso l'iniezione di un antagonista GABA<sub>A</sub>-ergico a livello del RPa, in animali liberi di muoversi. Per la realizzazione di questo esperimento gli animali (n=16), dopo una settimana di recupero dall'intervento, sono stati fatti adattare alle condizioni sperimentali (Ta di 15°C, dieta Mucedola D12492: 35% lipidi, ciclo luce buio 12h:12h) per tre giorni consecutivi e sono stati registrati durante la sola giornata sperimentale.

Sono stati seguiti 6 differenti protocolli sperimentali (B0, B1, B2, B3, B4, B5, Fig. 7) in cui l'induzione dello stato ipotermico è avvenuto attraverso la somministrazione di ripetute iniezioni dell'agonista GABA<sub>A</sub>-ergico, muscimolo (1mM, 100 nl), a livello del RPa con la cadenza di una all'ora, e in cui gli animali sono stati perfusi:

- i) gruppo B1 (n=4); al raggiungimento di una Tc di 30°C durante lo stato ipotermico;
- ii) gruppo B2 (n=4) dopo 6 ore dall'inizio della sessione sperimentale, in presenza di una condizione di ipotermia profonda

- iii) gruppo B3 (n=3) in prossimità del ripristino delle condizioni normotermiche ( $T_c=35,5^{\circ}\text{C}$ );
- iv) gruppo B4 (n=2) dopo 6 ore dal ritorno alle condizioni normotermiche ( $T_c = 37^{\circ}\text{C}$ );
- v) gruppo B5 (n=1) dopo 36 ore dal ritorno alle condizioni normotermiche ( $T_c=37^{\circ}\text{C}$ );

Gli effetti dei 5 differenti protocolli sul grado di fosforilazione della proteina Tau sono stati inoltre confrontati con un gruppo di animali normotermici (gruppo B0; n=2) esposti alle stesse condizioni di adattamento degli altri gruppi ( $T_a$  di  $15^{\circ}\text{C}$ , dieta Mucedola D12492: 35% lipidi, ciclo luce buio 12h:12h) e non operati.

Tutti gli animali in cui è stato indotto uno stato ipotermico sono stati iniettati a partire dalle 9:30 del mattino, dopo 30 minuti dall'introduzione della microcannula nel sito di iniezione.

Per i gruppi B3, B4 e B5 a partire da un'ora dopo l'ultima iniezione la  $T_a$  è stata fissata a  $28^{\circ}\text{C}$ . la  $T_a$  è stata mantenuta tale fino alla fine della sessione sperimentale per i gruppi B3 e B4, mentre nel gruppo B5 è stata posizionata a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante la seconda giornata sperimentale.

## 7 ANALISI STATISTICA

### 7.1 Esperimento A

Per l'analisi statistica sono state utilizzati diversi test in base alla natura dei risultati analizzati:

- i) l'analisi quantitativa degli stati di veglia e di sonno della giornata sperimentale ha previsto l'utilizzo del test di ANOVA a due vie (SPSS 21.0), con misure ripetute per un fattore. I contrasti ortogonali pre-pianificati sono stati effettuati mediante l'utilizzo del t-test modificato ( $t^*$ )<sup>184</sup>. I fattori sono stati definiti in: i) fattore "condizione sperimentale" composto da due livelli (Oressina e salina o GABA-zina e salina), ii) fattore "tempo" (considerato per le misure ripetute), composto da 7

livelli, corrispondenti a ciascuno degli intervalli di 10 minuti analizzati. Le medie dei risultati sono state confrontate per mezzo dei seguenti contrasti ortogonali: i) Salina vs Oressina ii) Salina vs GABA-zina.

- ii) I risultati dell'analisi immunostochimica sono stati analizzati separatamente per ciascuna marcatura utilizzata (cfos, TPH) e la co-localizzazione (cfos/TPH) mediante l'utilizzo di un test ANOVA ad una via considerando le medie per ognuno dei 4 livelli anatomici all'interno di ogni condizione sperimentale. Le medie sono state comparate attraverso confronti ortogonali pre-pianificati mediante l'utilizzo del t-test modificato ( $t^*$ ). Il fattore considerato è definito dalla "condizione sperimentale", quindi dal tipo di sostanza somministrata.
- iii) l'analisi del comportamento alimentare è stata effettuata mediante l'utilizzo del test esatto di Fisher che valuta la varianza tra 2 popolazioni. Le popolazioni messe a confronto sono state: i) ORX 24°C vs Sal 24°C, ii) GBZ 24°C vs Sal 24°C, iii) ORX 32°C vs Sal 32°C.

In tutti i confronti effettuati nelle varie analisi, il grado di significatività è stato definito per  $p < 0,05$ .

## 7.2 Esperimento B

Per l'analisi dei dati dell'esperimento B è stato utilizzato il test non-parametrico "U" di Mann-Whitney, per ranghi. Tutti i confronti sono stati considerati significativi per valori di  $p < 0,05$ . Il carattere qualitativo del dato non ha permesso un confronto diretto, all'interno della stessa condizione sperimentale, dei singoli risultati osservati per ogni struttura cerebrale, ma ha consentito di stabilire come la condizione sperimentale in generale influisce sul grado di immunoreattività.

# **RISULTATI**



# 1 ESPERIMENTO A

## 1.1 EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL CICLO VEGLIA-SONNO

La quantità degli stati di veglia e di sonno è rappresentata come percentuale  $\pm$  errore standard dell'intervallo di tempo totale analizzato suddiviso in intervalli di 10 minuti (Fig. 8, 9, 10).

L'analisi statistica è stata effettuata nell'arco temporale di 70 minuti, che ha compreso i 10 minuti precedenti e i 60 minuti successivi l'iniezione.

Sia l'iniezione di oressina alle due diverse temperature ambientali ( $T_a = 24^\circ\text{C}$ ,  $T_a = 32^\circ\text{C}$ ) che l'iniezione di GABA-zina nel RPa hanno indotto un significativo aumento della quantità di veglia.

Durante l'esposizione dell'animale alla  $T_a$  di  $24^\circ\text{C}$ , dopo 10 minuti dalla somministrazione di oressina si è assistito a un significativo aumento della quantità di veglia, rispetto a quanto osservato dopo l'iniezione di salina, mantenuto per i successivi 40 minuti (Fig. 8a).

L'incremento ha raggiunto un picco dopo 30 minuti dal trattamento (ORX  $24^\circ\text{C} = 78,1 \pm 11,7\%$ ,  $p < 0,05$ , rispetto alla salina) ed è stato associato alla comparsa di un picco negativo della quantità di sonno NREM ( $21,9 \pm 11,7\%$ ,  $p < 0,05$  rispetto alla salina) (Fig. 8a, 8b).

Lo stesso andamento osservato per la veglia (Fig. 8a), si è riscontrato anche per la quantità di sonno NREM che è rimasta significativamente minore rispetto agli animali iniettati con salina per 40 minuti successivi all'iniezione con il neuropeptide oressina (Fig. 8b).

Dopo 20 minuti dall'iniezione si è verificata una drastica riduzione della quantità di sonno REM ( $0 \pm 0\%$ ,  $p < 0,05$ ) rispetto alla salina che è stata mantenuta per 10 minuti (Fig. 8c)

L'iniezione di GABA-zina alla Ta di 24°C e di oressina alla Ta di 32°C hanno indotto significativo aumento della quantità di veglia per un periodo di tempo minore rispetto a quanto osservato in seguito all'iniezione di oressina alla Ta di 24°C (Fig. 9a, 10a).

L'aumento della quantità di veglia, generato in seguito a somministrazione di GABA-zina, è risultato significativamente maggiore rispetto a quello della salina nei 20 minuti successivi all'iniezione raggiungendo un picco dopo 10 minuti dall'iniezione ( $78 \pm 9,4\%$ ) (Fig. 9a). Lo stesso andamento, ma con verso opposto, è stato riscontrato anche per le quantità di sonno NREM e il sonno REM che sono risultate statisticamente minori, rispetto alla salina, nei 20 minuti dopo l'iniezione (Fig. 9b, 9c). In particolare la quantità di sonno NREM ha raggiunto un picco negativo dopo 10 minuti dall'iniezione ( $16,2 \pm 4,8 \%$ ) (Fig. 9b), mentre la quantità di sonno REM osservata è risultata totalmente soppressa dopo i 20 minuti ( $0 \pm 0\%$  rispetto alla salina,  $p < 0,05$ ) e molto ridotta dopo i 50 minuti ( $2,3 \pm 1,7\%$  rispetto alla salina;  $p < 0,05$ ) successivi all'iniezione (Fig.9c).

Alla Ta di 32°C l'iniezione di oressina ha prodotto un incremento della quantità di veglia che è risultato statisticamente rilevante per 30 minuti, con un picco raggiunto dopo 30 minuti successivi al trattamento ( $66,3 \pm 13,5\%$ ,  $p < 0,05$ , rispetto alla salina;  $p < 0,005$ ) (Fig. 10a). Questo aumento è stato accompagnato da una concomitante riduzione della quantità di sonno NREM nei successivi 20 minuti, con un picco negativo raggiunto dopo 20 minuti l'iniezione ( $18,2 \pm 8,2\%$ ,  $p < 0,05$ , rispetto alla salina) (Fig. 10b).

L'andamento del sonno REM negli animali iniettati con oressina alla Ta di 32°C, non ha mostrato differenze rispetto a quello osservato in salina (Fig. 10c).

## **1.2 EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL COMPORTAMENTO ALIMENTARE**

Gli effetti sull'assunzione di cibo indotti dai diversi trattamenti sono stati valutati, mediante la registrazione video da un operatore, nell'intervallo temporale di 20 minuti a partire dal momento dell'iniezione. Tutte le risposte non comprese in questo lasso di tempo non sono state prese in considerazione. La durata dell'intervallo è stata decisa in maniera tale da poter ascrivere con ragionevole certezza l'effetto dell'assunzione di cibo al trattamento effettuato e per mantenere l'analisi in un ambito di durata in cui l'animale si mantiene sveglio nelle diverse condizioni sperimentali.

I risultati sono stati rappresentati come percentuale  $\pm$  errore standard del numero di animali che ha assunto cibo nei 20 minuti successivi l'iniezione.

Alla Ta di 24°C la somministrazione di oressina nel RPa ha indotto un'attiva risposta nel comportamento alimentare che è risultata significativamente maggiore rispetto alla salina ( $p < 0,05$ ) (Fig. 11a).

In particolare nei primi 20 minuti dopo l'iniezione il 56,3% degli animali ha assunto cibo (9 su 16 totali;  $p < 0,05$ ) a fronte del 9,1% (1 animale su un totale di 11) di quelli iniettati con salina (Fig. 11a).

Al contrario l'iniezione di oressina alla Ta di 32°C e di GABA-zina (Ta = 24°C) ha generato una modesta assunzione di cibo che non è risultata diversa rispetto a quanto osservato nei gruppi di controllo (rispettivamente, Sal 24°C e Sal 32°C) (Fig. 11b, 11c).

In particolare dopo l'iniezione con GABA-zina solo 1 animale su 5 ha assunto cibo (20%) (Fig. 11b), mentre alla Ta di 32°C solo 4 animali su 15 totali hanno mostrato un comportamento alimentare attivo in seguito ad iniezione di oressina (26,7%), mentre nessuno degli animali iniettati con salina ha assunto cibo (0%) (Fig. 11c).

### **1.3 EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL GRADO DI ATTIVAZIONE DEI NEURONI SEROTONINERGICI DEL RPa**

I risultati sono rappresentati come media  $\pm$  l'errore standard (Fig. 12a, 12b, 12c) e come media percentuale  $\pm$  l'errore standard (Fig. 12d) del numero di neuroni positivi per il rispettivo marcatore analizzato.

L'analisi immunohistochimica è stata condotta per tutte le condizioni sperimentali in cui è stata prevista un'esposizione alla Ta di 24°C.

I risultati per ogni animale sono stati calcolati per quanto riguarda i valori mostrati nella Figura 12 come numero medio/vetrino di tutta la struttura e per la Figura 13 come numero medio/vetrino per ognuno dei quattro livelli esaminati. Per ogni livello si è proceduto all'analisi di 2-5 vetrini.

Come atteso, il numero di neuroni serotoninergici (TPH+) è risultato simile per tutte le 3 condizioni sperimentali ( $24 \pm 1,6$  neuroni per ORX 24°C,  $25 \pm 2,4$  per GBZ 24°C,  $21,3 \pm 4$  per Sal 24°C) (Fig. 12b).

Non si è riscontrata alcuna differenza rilevante a livello statistico nell'attivazione neuronale (cFos+) generata in seguito ad iniezione di oressina, GABA-zina e salina nel RPa (Fig. 12a).

In particolare il numero medio dei neuroni attivati (cFos+) osservato è stato di  $43,8 \pm 5$  in seguito ad iniezione di oressina, di  $55,8 \pm 10,8$  in seguito ad iniezione di GABA-zina e di  $47,3 \pm 8,5$  in seguito ad iniezione con salina (Fig. 12a).

La media del numero dei neuroni serotoninergici attivati (cFos/TPH+; Fig. 12c,12d) nei diversi protocolli sperimentali utilizzati è risultata particolarmente bassa, infatti il numero medio complessivo dei neuroni doppiamente marcati è stato di  $4,2 \pm 0,5$  (17,2 %) dopo iniezione di

oressina, 24°C,  $4,8 \pm 0,9$  (17,1 %) dopo iniezione di GABA-zina e di  $3,6 \pm 1,2$  (14,3 %) dopo iniezione di salina.

L'analisi statistica effettuata sulla presenza dei vari marcatori per ogni singola sezione istologica utilizzata (n =4) (Fig. 13) non ha mostrato alcuna differenza significativa nella distribuzione rostro-caudale dei marcatori tra le tre diverse condizioni sperimentali (Fig. 13a, 13b, 13c, 13d).

I risultati di questo esperimento ed in particolare quelli ottenuti sull'attivazione neuronale in seguito ad iniezione con salina ( $47,3 \pm 8,5$  neuroni) ci hanno portato ad ipotizzare che la positività dei neuroni per il marcatore cFos potesse essere stata la conseguenza di una reazione aspecifica dovuta alla presenza di un trauma meccanico o alla concentrazione ionica della soluzione fisiologica stessa. Per cercare di valutare la natura di questa reazione abbiamo deciso di utilizzare un gruppo di animali iniettato con a-CSF, una soluzione sterile contenente la stessa concentrazione elettrolitica del liquor cerebrospinale. Anche in seguito ad iniezione di a-CSF si è osservata la presenza di attivazione neuronale ( $27,1 \pm 7,8$  neuroni; Fig. 12a, 13a).

Nell'animale *Sham Operated*, in cui l'iniezione non è avvenuta per un'ostruzione della cannula si è osservata la quasi totale assenza di attivazione neuronale ( $0,5 \pm 0,5$  neuroni, Fig. 12a)

## **2 ESPERIMENTO B**

### **2.1 EFFETTI INDOTTI DALLA MICROINIEZIONE DELLE DIVERSE SOSTANZE NEL RPa SUL GRADO DI FOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA TAU**

I risultati ottenuti, classificati secondo la scala utilizzata per le diverse intensità del segnale, corrispondenti al grado di fosforilazione della proteina Tau e la tabella che indica le significatività statistiche, sono mostrati nella Figura 15.

L'analisi è stata prioritariamente condotta in alcune strutture nervose centrali coinvolte nella regolazione degli stati veglia/sonno e nel controllo della funzione autonoma e metabolica (Fig. 14), comparando la media totale delle valutazioni qualitative ottenuta per l'insieme delle aree analizzate in ogni condizione sperimentale; il tipo di metodo analitico e il numero di animali utilizzato in questa prima fase del protocollo sperimentale non hanno consentito di effettuare confronti quantitativi e qualitativi interni ad ogni singola area o tra le diverse regioni analizzate. L'analisi qualitativa dei dati nelle diverse aree non sembra mettere in luce differenze sostanziali nella dinamica del processo di fosforilazione e defosforilazione nelle aree implicate nel controllo del ciclo veglia-sonno rispetto a quelle coinvolte nel controllo centrale della funzione autonoma. Per quanto riguarda nello specifico il RPa, è interessante notare come questa sia l'unica struttura nella quale una debole marcatura positiva compaia sia in condizioni di controllo (B0), sia in condizioni di pieno recupero (B5).

Nel complesso, il grado di fosforilazione della proteina Tau ha mostrato differenze significative tra le differenti condizioni analizzate (Fig. 15b). Come mostrato nelle figure 16, 17, 18, 19, 20 e 21, dove vengono mostrati, a titolo di esempio, i risultati relativi a sei delle strutture analizzate, durante lo stato di ipotermia profonda (B2) lo stato di fosforilazione della proteina

Tau appare molto marcato e significativamente più intenso rispetto alla condizione di controllo (B0), alla condizione di riscaldamento precoce (B3) e a entrambe le condizioni di riscaldamento completo (B4, B5).

Il raggiungimento della Tc di 30°C durante l'induzione dello stato ipotermico ha determinato un grado di fosforilazione della proteina più intenso rispetto alle condizioni di controllo (B0), di riscaldamento precoce (B3) e di completo ritorno dell'animale all'eutermia della durata di 36 ore (B5). Non sono state osservate differenze nel grado di fosforilazione della Tau tra la condizione di ipotermia precoce (B1) e ipotermia profonda (B2).

La condizione di riscaldamento precoce (B3) ha mostrato differenze significative rispetto alle altre due condizioni che hanno previsto il completo ritorno dell'animale all'eutermia dopo l'induzione dello stato ipotermico (B4, B5), risultando l'intensità dei segnali analizzati maggiore rispetto a queste due ultime condizioni

Dopo il ritorno dell'animale all'eutermia il grado di fosforilazione della proteina Tau è risultato statisticamente maggiore nella condizione di normotermia mantenuta per 6 ore (B4) rispetto a quella di 36 ore (B5).



# **DISCUSSIONE**



Nel ratto anestetizzato, l'attivazione oressinergica dei neuroni del RPa è in grado di attivare la termogenesi solo in presenza di un concomitante tono termogenetico già presente<sup>17</sup>. Questi risultati sono stati confermati nell'animale libero di muoversi<sup>86</sup> dove, a seguito della somministrazione di ORXA si è osservato un aumento della temperatura cerebrale solo se gli animali erano mantenuti in condizioni di lieve sub-termoneutralità (24°C) o a bassa temperatura ambientale (10°C). Dal punto di vista cardiovascolare in questi animali si è evidenziato anche un marcato aumento della pressione arteriosa media (PAM) quando mantenuti ad una Ta di 24°C, che è non si è osservato invece negli animali adattati ad una Ta di 32°C e in quelli esposti ad una Ta di 10°C. Nel secondo caso, però, in quanto l'adattamento alla bassa Ta aveva già imposto un livello basale della PAM molto elevato.

Questo effetto sulla termogenesi della somministrazione di ORXA induce a ipotizzare che l'attivazione dei neuroni oressinergici, che compare fisiologicamente quando l'animale è vigile e attivo, sia implicata nell'amplificazione di un processo termogenetico già esistente al fine di aumentare la temperatura cerebrale e quella corporea per ottimizzare le attività svolte durante il periodo di veglia<sup>17</sup>.

I risultati dell'esperimento A mostrano come l'attivazione oressinergica dei neuroni del RPa sia in grado di indurre dal punto di vista comportamentale un aumento della quantità della veglia a scapito di quella del sonno NREM e del sonno REM nell'animale esposto alla Ta di 24°C. Queste modificazioni sono state più ampie e più prolungate rispetto a quelle indotte dall'ORXA negli animali esposti alla Ta di 32°C e rispetto a quelle che successive alla disinibizione non selettiva dei neuroni del RPa ottenuta attraverso l'iniezione di GABA-zina, un antagonista GABA<sub>A</sub>-ergico. Nel primo caso, la differenza può essere spiegata con il minor impatto dell'ORXA sulla funzionalità del RPa a temperature ambientali elevate, mentre nel secondo starebbe a indicare che la massiccia disinibizione di ogni componente neuronale del

RPa potrebbe attenuare gli aspetti attivanti a causa di una contemporanea disattivazione di circuiti inibitori locali.

L'induzione della veglia in seguito alla somministrazione di ORXA in un centro bulbare prevalentemente coinvolto nel controllo della termogenesi<sup>58</sup> è in parte inaspettata, in quanto le proiezioni efferenti dei neuroni del RPa sono prevalentemente di natura discendente e quindi plausibilmente non in grado di influenzare direttamente le strutture tronco-diencefaliche attivanti o direttamente la corteccia cerebrale. Un'eccezione a questa regola è rappresentata dai neuroni ON-OFF del RPa<sup>185</sup>, che sembrerebbero implicati nella percezione del dolore e quindi in grado di indurre un'attivazione corticale. L'ipotesi che l'attivazione comportamentale osservata in questa tesi possa essere ascritta all'attivazione di questi neuroni appare però assai indebolita in considerazione del ruolo fisiologico che l'ORX svolge nei comportamenti motivati. Infatti se questa ipotesi fosse vera qualsiasi episodio di attivazione comportamentale, come l'assunzione di cibo o acqua, sarebbe ragionevolmente accompagnata dalla percezione di dolore. Questa ipotesi risulta ulteriormente indebolita dai dati raccolti in questa tesi inerenti gli effetti dell'iniezione di ORXA sul comportamento alimentare. A livello comportamentale infatti l'iniezione di ORXA non ha prodotto solo un aumento della quantità della veglia, ma, più specificamente, ha attivato un comportamento alimentare che sembra aumentare proporzionalmente ai livelli dell'attivazione corticale. Infatti il 60% degli animali mantenuti ad una Ta di 24°C non solo si svegliano dopo l'iniezione di ORXA, ma assumono cibo in maniera maggiore rispetto a quelli trattati con salina (ciò non è accaduto dopo somministrazione di GBZ o di ORXA durante l'esposizione alla Ta di 32°C). Tale comportamento non sembra conciliabile con la contemporanea intensificazione di una possibile percezione di dolore.

Alla luce di questi risultati un'altra e più ragionevole ipotesi che potrebbe spiegare gli effetti comportamentali osservati è che il risveglio dell'animale sia la conseguenza di un riflesso

vegetativo in cui i segnali periferici indotti dall'attivazione autonoma e termoregolatoria verrebbero ritrasmessi ai centri ipotalamici implicati nel controllo dello stato di vigilanza, causando l'attivazione comportamentale. Questo riflesso sembrerebbe però essere in grado non solo di indurre la veglia nell'animale, ma anche di promuovere l'assunzione di cibo, andando quindi ad attivare, oltre alla corteccia cerebrale anche altri centri nervosi più specifici. Anche se è già stato proposto un ruolo del RPa come nucleo premotore nei processi somatici e vegetativi come la masticazione, la contrazione gastrointestinale e la secrezione gastrica attraverso il complesso vagale<sup>66</sup>, allo stato attuale non ci sono dati che ne attestino un ruolo quale centro di regolazione dei comportamenti ingestivi. Per meglio caratterizzare l'interazione tra la regolazione comportamentale e autonoma responsabile della comparsa di un comportamento così complesso sono sicuramente necessari altri esperimenti che consentano di quantificare con più precisione la relazione tra il grado di attivazione autonoma e termogenetica e le modificazioni del comportamento.

Da un punto di vista cardiovascolare è noto che i neuroni del RPa sono in grado di indurre un importante effetto sulla FC<sup>186</sup>. Questo risultato però non è stato confermato da quanto osservato precedentemente in seguito all'iniezione di ORXA nel RPa, che ha prodotto solo un effetto minimo sulla FC<sup>86</sup>. Una spiegazione potrebbe essere che l'ORX agisca su una popolazione neuronale diversa da quella attivata in seguito all'iniezione di bicucullina o dall'agonista glutammatergico NMDA, che producono tachicardia attraverso la rispettiva interazione con una popolazione neuronale contenente recettori di natura GABA-ergica o glutammatergica<sup>17,74</sup>.

Si è ipotizzato quindi che l'ORXA potesse agire su una sottopopolazione di neuroni che non siano coinvolti nella regolazione della FC. Il fatto che la popolazione neuronale serotoninergica sia di fatto la più numerosa presente nella zona del RPa e che l'iniezione di un agonista serotoninergico a livello della IML, che riceve afferenze dai premotoneuroni simpatici del RPa, induca un'amplificazione dell'attivazione della termogenesi<sup>187</sup>, ha portato ad ipotizzare che

questa popolazione neuronale potesse essere coinvolta negli effetti precedentemente osservati. Sulla base di questi presupposti, si è deciso quindi di studiare attraverso un'indagine immunohistochimica se fossero proprio i neuroni serotoninergici ad essere attivati dall'iniezione di ORXA.

I risultati osservati nell'esperimento A, pur non essendo di facile interpretazione, in quanto anche la semplice iniezione di veicolo (soluzione salina) ha indotto un'attivazione neuronale plausibilmente di natura aspecifica, sembrano smentire questa ipotesi. La risposta di attivazione cellulare osservata dopo iniezione di salina potrebbe dipendere da un danno meccanico di natura volumetrica o pressoria indotto dall'iniezione o dalle variazioni dei livelli di pH (la soluzione salina è debolmente acida) o dell'aumentata concentrazione degli ioni  $Cl^-$ , che potrebbero avere influenzato il potenziale di membrana a riposo. La presenza di una marcata attivazione dei neuroni del RPa anche negli animali iniettati al termine dell'esperimento con liquido cerebrospinale artificiale (pH neutro e bassi livelli di  $Cl^-$ ) allo scopo di chiarire le possibili cause dell'attivazione aspecifica indotta dalla salina induce a pensare che tale attivazione sia secondaria a un danno meccanico. Infine, i risultati ottenuti in un animale esposto alle stesse condizioni sperimentali degli animali mantenuti alla Ta di 24°C, ma in cui l'iniezione non ha avuto successo per un'ostruzione della cannula ci ha permesso di eliminare anche la manipolazione dell'animale dalle potenziali cause dell'attivazione aspecifica dei neuroni del RPa.

I risultati ottenuti inducono quindi a molta cautela in esperimenti futuri volti a determinare il grado di attivazione di strutture nervose in cui si micro-inietti direttamente una soluzione, pur se i volumi utilizzati, come in questo esperimento, risultino molto piccoli.

Pur in presenza di un'attivazione neuronale aspecifica, però, il complesso effetto comportamentale osservato negli animali è differente nelle tre condizioni sperimentali: mentre

infatti l'iniezione di ORXA causa la comparsa di un prolungato periodo di veglia, quella di GBZ induce un breve periodo di veglia e quella di Salina non è in grado di svegliare l'animale. Inoltre l'attivazione oressinergica dei neuroni del RPa induce l'assunzione di cibo nei 20 minuti successivi l'iniezione negli animali iniettati con ORXA alla Ta di 24°C, che si osserva in modo apparentemente meno marcato in seguito all'iniezione di GBZ ed è praticamente assente dopo salina.

Sulla base di questi risultati è ragionevole sostenere che la popolazione di neuroni serotoninergici che risultano attivati (cFos positivi) dalle iniezioni, che è della medesima entità nelle tre condizioni ed è soprattutto in termine assoluti numericamente molto scarsa, non sia da ritenere responsabile degli effetti comportamentali osservati a seguito della somministrazione di ORXA. In particolare, infatti, nessuno degli effetti indotti da ORXA è stato riscontrato in seguito alla somministrazione di salina.

La popolazione neuronale responsabile degli effetti osservati in seguito ad iniezione di ORXA quindi potrebbe essere di natura diversa. Oltre alla popolazione serotoninergica infatti le popolazioni maggiormente rappresentate nel RPa sono quella glutammatergica positiva per il marcatore VGLUT3 e quella GABA-ergica<sup>21</sup>. La mancanza della risposta termogenetica in seguito alla stimolazione oressinergica dei neuroni del RPa quando non è presente un tono termogenetico centrale<sup>17</sup>, come ad esempio durante l'esposizione ad alte temperature, ci permette di ipotizzare che i neuroni glutammatergici VGLUT3, che sono di fatto dei premotoneuroni simpatici in grado di attivare il sistema simpatico a livello spinale in maniera diretta<sup>79</sup>, non siano coinvolti nella regolazione dell'attività dei neuroni del RPa attivati dal neuropeptide oressina.

Il ruolo dei neuroni GABA-ergici del RPa viceversa non è stato ancora ben caratterizzato. Questi, agendo da interneuroni inibitori, potrebbero essere i responsabili del blocco della

termogenesi in condizioni peculiari come in condizioni di ipossia<sup>40</sup>. È possibile però che questa popolazione neuronale abbia delle funzioni più complesse, che potrebbero accordarsi con i risultati dell'esperimento A, facendo ipotizzare che l'azione di modulazione dell'ORX si potrebbe probabilmente spiegare attraverso i neuroni GABA-ergici con meccanismi e dinamiche che richiedono però di essere verificate attraverso future analisi immunostochimiche con marcatori per i neuroni GABA-ergici.

Per quanto riguarda l'Esperimento B, i risultati hanno in primo luogo confermato la riproducibilità dei risultati di esperimenti condotti precedentemente nel nostro laboratorio<sup>130</sup>, che hanno mostrato come il blocco GABA-ergico dell'attività del RPa, una via di snodo centrale nel processo di termoregolazione, induca nel ratto la comparsa di uno stato di pseudo torpore con modificazioni autonome e comportamentali che mimano quelle riscontrate negli animali ibernanti<sup>188</sup>.

Lo studio approfondito delle modificazioni comportamentali e cellulari indotte da questa procedura è soprattutto motivato dal fatto che la medesima ha le potenzialità di essere tralata, in un futuro prossimo, all'Uomo, che come il ratto non è un ibernante naturale. È quindi interessante e notevole sottolineare come questa procedura sperimentale non induca alcun tipo di danno funzionale nell'animale. Infatti, alla fine della medesima esso è in grado di tornare spontaneamente alle condizioni di eutermia senza che si osservino alterazioni a livello comportamentale macroscopico e, in base ai risultati ottenuti in questo esperimento, senza modificazioni permanenti della funzionalità cellulare, almeno per quanto attiene i livelli di fosforilazione della proteina Tau.

I risultati di questa tesi permettono di estendere ad una specie che non va in torpore spontaneamente, quale il ratto, l'osservazione condotta nell'ibernante naturale della comparsa di un processo di iperfosforilazione della proteina Tau durante l'induzione e il mantenimento

di una condizione di torpore<sup>132</sup>. Nel ratto, questo processo, si è manifestato sia in aree nervose centrali coinvolte nella regolazione delle funzioni autonome, sia in aree coinvolte nei processi di regolazione del ciclo veglia-sonno, ed è risultato completamente reversibile, così come nell'ibernante naturale, dopo il ritorno dell'animale alle normali condizioni eutermiche. Questi risultati potrebbero far pensare all'iperfosforilazione della proteina Tau come ad un meccanismo di regolazione dell'omeostasi cellulare, attivato al fine di scongiurare eventuali danni dovuti a condizioni di stress come quelle che accompagnano il drastico calo della temperatura interna. Vale la pena sottolineare come l'unica area nella quale una debole marcatura positiva (+) in condizioni di controllo e al termine del periodo di recupero sia il RPa. Questo potrebbe indicare la presenza di una risposta di fosforilazione Tau che potrebbe essersi sviluppata in seguito al "trauma" volumetrico indotto dalla microiniezione, che appare essere responsabile dell'attivazione aspecifica dell'area osservata nell'Esperimento A dopo somministrazione di salina.

Esperimenti condotti *in vivo* e *in vitro* hanno mostrato come la risposta alla riduzione della temperatura a livello cellulare o tissutale sia modulata da diversi meccanismi che agiscono a livello del sistema microtubulare e dell'RNA messaggero attraverso l'intervento di proteine specifiche chiamate *cold-shock proteins* (CSP)<sup>189</sup>, in modo analogo a quanto riscontrato nell'ambito delle risposte cellulari attuate durante la comparsa di uno stato ipertermico che promuove l'espressione di proteine chiamate per questo *heat-shock proteins* (HSP)<sup>190</sup>. L'aumentata espressione di alcune di queste proteine sembrerebbe avere una funzione di citoprotezione verso lo stress causato dalla condizione di ipometabolismo che compare durante l'ipotermia che caratterizza l'ibernazione<sup>191</sup>.

Attualmente l'iperfosforilazione della proteina Tau è ritenuta responsabile dell'instabilità del sistema dei microtubuli ed è compresa nell'insieme delle risposte cellulari attuate dal sistema nervoso centrale in condizioni di stress indotto dalla condizione ipotermica<sup>192</sup>.

L'iperfosforilazione della proteina Tau è attualmente attribuita ad una perturbazione della modulazione dell'attività delle chinasi e delle fosfatasi che agiscono sulle proteine associate ai microtubuli<sup>173</sup>. Rimane tuttavia ancora da chiarire se l'iperfosforilazione della proteina Tau sia la causa o sia la conseguenza della separazione della proteina dai microtubuli<sup>193</sup>.

Nell'animale ibernante il ruolo della iperfosforilazione durante il periodo di torpore è stato suggerito sia parte di un meccanismo necessario per l'ingresso e la sopravvivenza dell'animale in queste condizioni<sup>180</sup>. Infatti è stato dimostrato come l'iperfosforilazione della proteina Tau vada di pari passo con la regressione delle spine dendritiche che si osserva durante uno stato di ipotermia profonda<sup>132</sup>. In base ai risultati osservati nell'esperimento B è ragionevole pensare che anche nell'animale non ibernante l'iperfosforilazione della proteina Tau rappresenti un meccanismo di protezione del sistema dei microtubuli durante lo stato di ipotermia profonda. Ciò è testimoniato soprattutto dalla rapidità e dalla estensione riscontrata nel processo medesimo.

Questo meccanismo sembrerebbe avere il fine ultimo di mantenere i microtubuli in una condizione di depolimerizzazione che favorisce la riduzione dei normali aggiustamenti e spostamenti osservati durante la condizione normotermica. La riduzione degli spostamenti microtubulari, imputabile a motivi termodinamici legati al calo della temperatura, favorirebbe l'assunzione di configurazioni con uno stato di entropia negativa che non avrebbero bisogno di essere regolate da alcun processo biologico.

L'iperfosforilazione della proteina Tau potrebbe inoltre in parte spiegare la riduzione dell'ampiezza delle onde elettroencefalografiche osservato durante l'induzione dello stato ipotermico. Recentemente è stato ipotizzato che l'iperfosforilazione della Tau potrebbe essere responsabile dell'inattivazione della trasmissione dei segnali provenienti dai recettori NMDA, plausibilmente responsabili dell'ipereccitabilità neuronale<sup>179</sup> osservata durante l'entrata e

l'uscita dal torpore<sup>178</sup>. L'iperfosforilazione infatti causerebbe la dislocazione della proteina Tau a livello delle spine dendritiche dove, attraverso il legame con la PSD-95, proteina di ancoraggio dei recettori NMDA alla membrana postsinaptica, comprometterebbe la funzione sinaptica. Questo meccanismo causerebbe una diminuzione della densità dei recettori NMDA a livello postsinaptico che si potrebbe tradurre in una inattivazione funzionale dei segnali dei recettori NMDA e faciliterebbe il graduale spegnimento dell'attività cerebrale osservato durante l'ingresso in uno stato di torpore nell'animale ibernante<sup>180</sup>. Inoltre il processo di iperfosforilazione e defosforilazione osservato nel nostro esperimento sembra seguire una scala temporale che ricalca quella osservata nell'animale ibernante da von der Ohe<sup>194</sup>, che ha osservato che l'iperfosforilazione concomitante al processo di regressione dei contatti sinaptici a livello encefalico si sviluppa in modo rapido e appare tornare a livelli normali di defosforilazione dopo solo due ore dal ritorno dell'animale ai valori fisiologici di temperatura.

In base ai risultati ottenuti nell'esperimento B, il modello di induzione di ipotermia profonda potrebbe anche essere di aiuto per una migliore interpretazione del significato dell'iperfosforilazione della proteina Tau, caratteristica delle Taupatie come il morbo di Alzheimer. Infatti, è stato recentemente suggerito, che tale processo intervenga inizialmente nel morbo di Alzheimer come un meccanismo compensatorio<sup>173</sup> volto alla soppressione dello scompenso eccitatorio e inibitorio della rete neuronale<sup>195-197</sup> e che solo in seguito si trasformerebbe in un processo patologico responsabile dell'attivazione di una cascata di eventi promuoventi la neurodegenerazione che accompagna il morbo di Alzheimer<sup>180</sup>. Altrettanto interessante, a scopi traslazionali, sarà l'utilizzo futuro di questo modello sperimentale per meglio comprendere quali siano i meccanismi alla base della rapida defosforilazione della proteina Tau.

In conclusione, i risultati di questa tesi confermano la rilevanza fisiologica del Raphe Pallidus quale centro nervoso in grado di regolare la termogenesi e le funzioni autonome associate

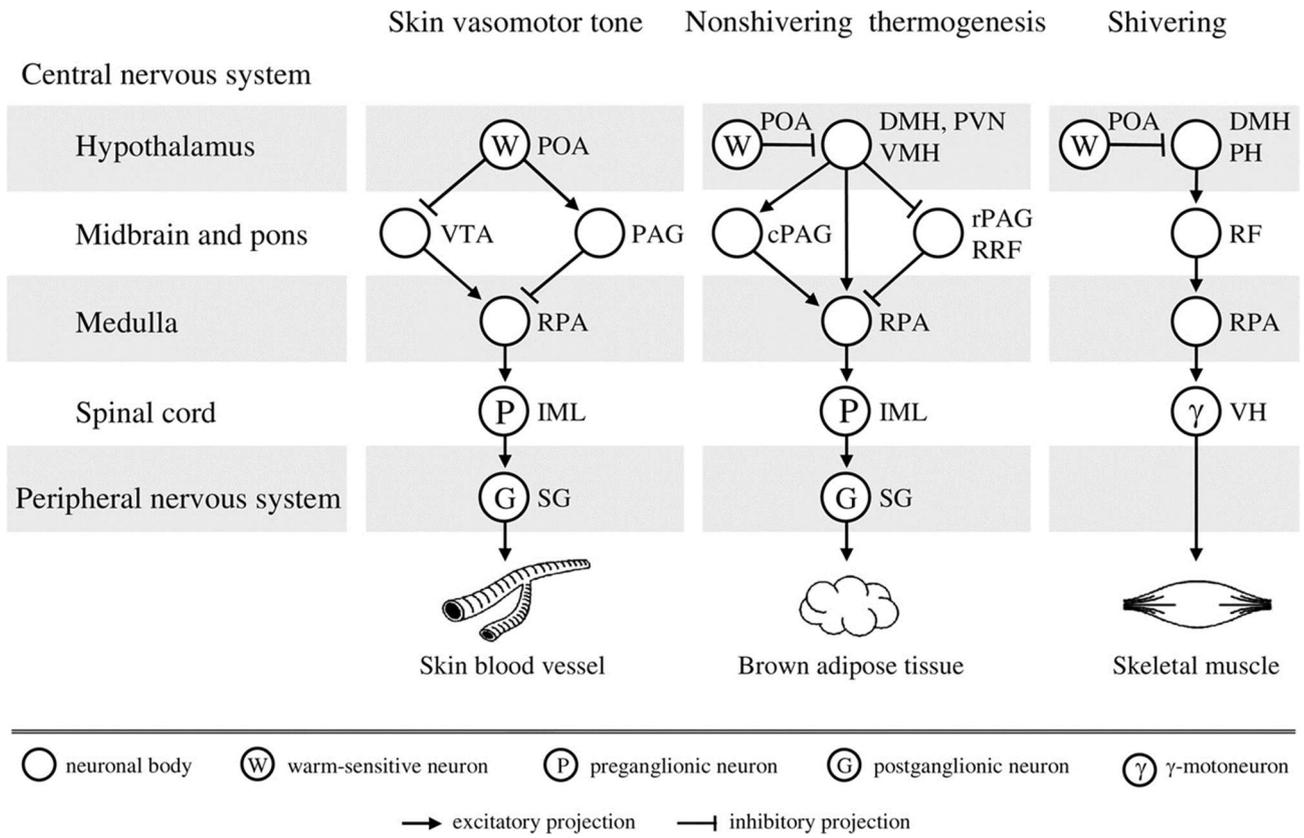
e, conseguentemente, i complessi comportamenti che seguono l'attivazione o l'inibizione della medesima ed evidenziano l'importanza del RPa quale possibile struttura bersaglio di manipolazioni farmacologiche selettive in grado di indurre effetti comportamentali e cellulari con importanti ricadute traslazionali.

# FIGURE

**Figura 1**\_Nella figura sono mostrate le vie efferenti responsabili della regolazione della vasomozione cutanea, della termogenesi non da brivido a livello del tessuto adiposo bruno (BAT) e della comparsa del brivido nel ratto.

Il Raphe Pallidus sembra essere uno dei comuni denominatori di questi 3 meccanismi fisiologici che fanno parte del processo fisiologico della termoregolazione.

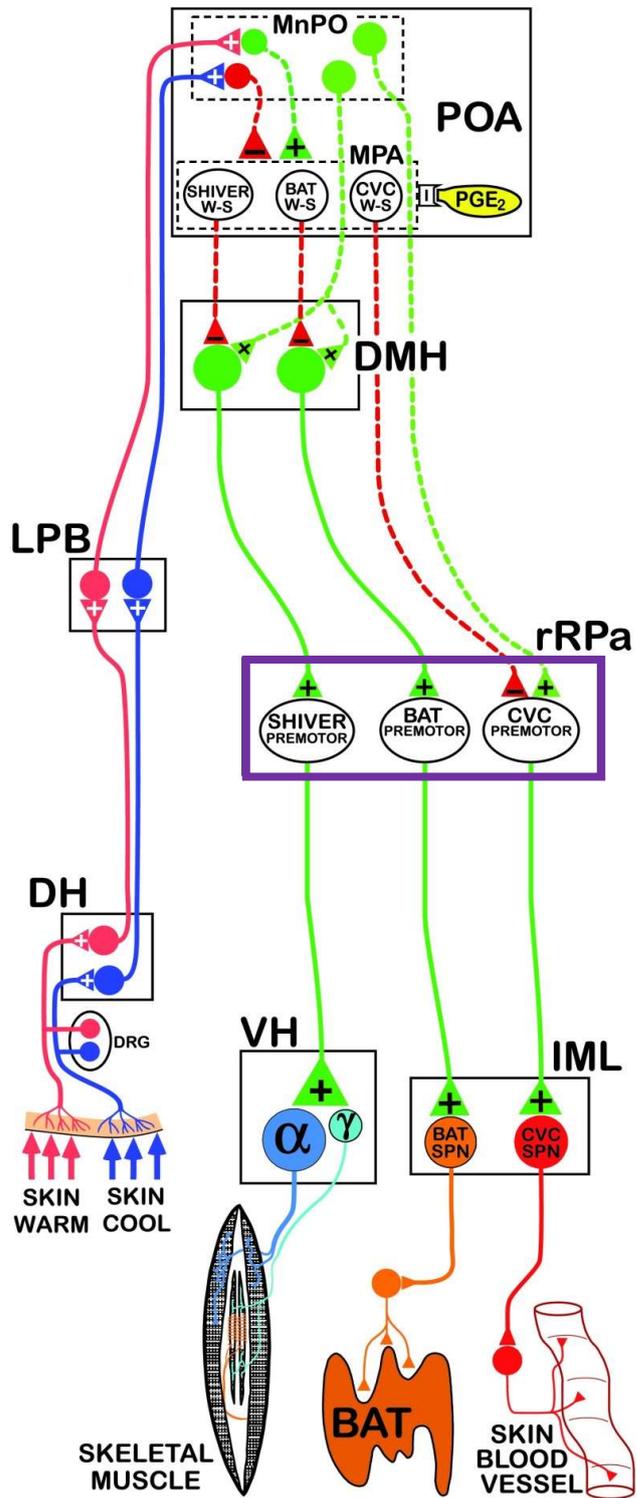
Abbreviazioni: DMH ipotalamo dorsomediale; IML colonna intermediolaterale; PAG materia del grigio periacqueduttale; cPAG PAG caudale; rPAG PAG rostrale; PH ipotalamo posteriore; PVN nucleo paraventricolare; RF formazione reticolare; RPA raphe pallidus; RRF campo retrorubrale; VH corna ventrale; VMH ipotalamo ventromediale; VTA area tegmentale ventrale.



Romanovsky A. A. *et al.*, *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R37–R46 (2006)<sup>33</sup>

**Figura 2\_** La figura mostra il modello neuroanatomico della via nervosa centrale termoregolatoria e pirogena che controlla la termogenesi a livello del tessuto adiposo bruno (BAT), la vasocostrizione cutanea (CVC) e la termogenesi da brivido. Nel rettangolo viola è evidenziata l'area del RPa, un punto di snodo chiave per la termogenesi nei mammiferi in quanto sede dei diversi pre-motoneuroni simpatici che governano i 3 meccanismi.

Abbreviazioni: DRG, Ganglio della Radice Dorsale; DH, Corno Dorsale; LPBel, Nucleo Parabrachiale Laterale; LPBd Nucleo Parabrachiale Dorsale; MPO, Nucleo Preottico Mediale; MnPO, Nucleo Preottico Mediano; DMH, Ipotalamo Dorsomediale; rRPa, Raphe Pallidus rostrale; IML, Nucleo Spinale Intermediolaterale; PVH, Nucleo Paraventricolare Ipotalamico; VLM Midollo Ventrolaterale; VH, Corno ventrale del midollo spinale; PGE<sub>2</sub>, Prostaglandina E<sub>2</sub>



Morrison SF, Auton. Neurosci. **196**, 14–24 (2016)<sup>58</sup>

**Figura 3\_** Nella figura sono mostrate le modificazioni indotte dall'iniezione di ORXA a livello del RVMM sulle variabili termoregolarie e cardiovascolari.

Dal punto di vista termoregolario (a) si è osservato un aumento della temperatura centrale netto a 10°C, modesto a 24°C e praticamente assente a 32°C confermando l'ipotesi che l'oressina ha un ruolo di amplificazione dell'attività termogenetica guidata dal RPa.

Anche le variabili cardiovascolari (b, c) subiscono delle modificazioni in seguito ad iniezione del neuropeptide che sono però più modeste rispetto a quelle osservate per la temperatura cerebrale (a).

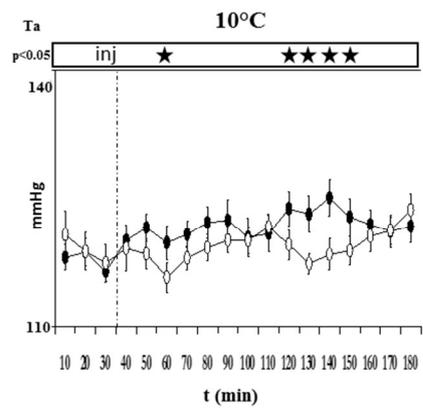
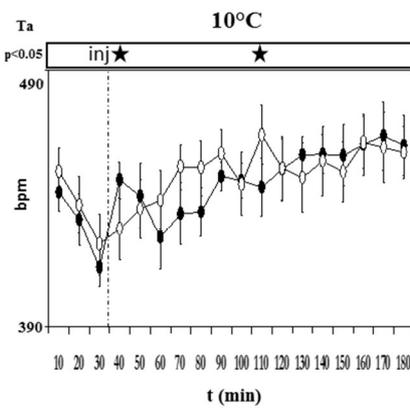
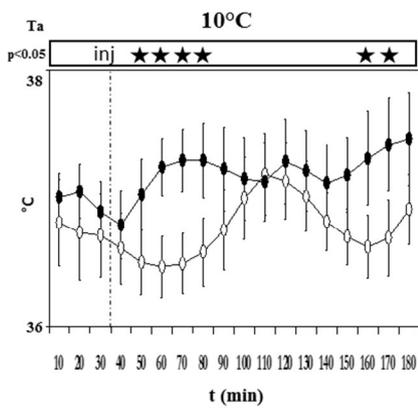
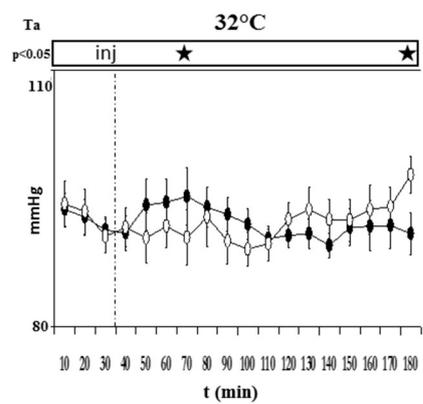
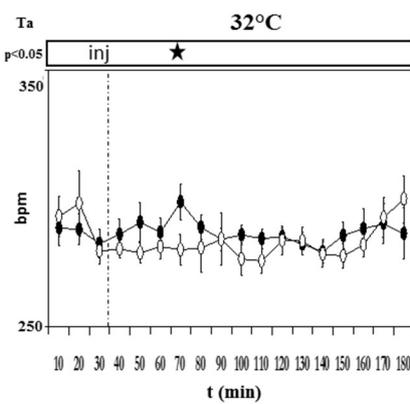
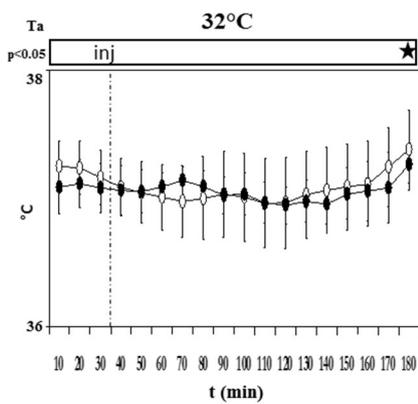
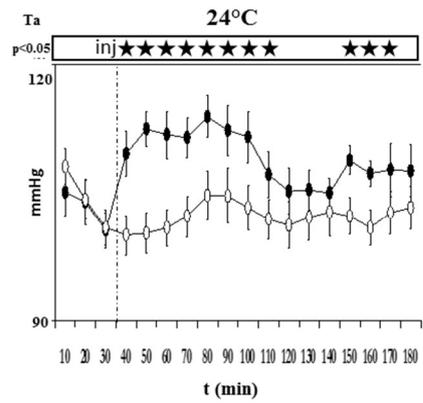
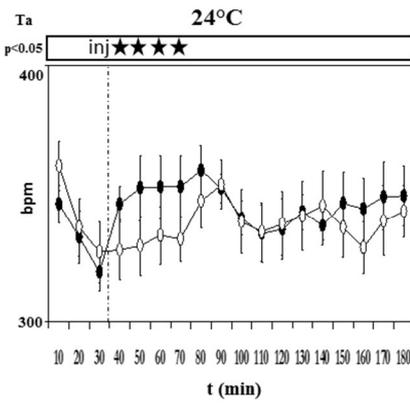
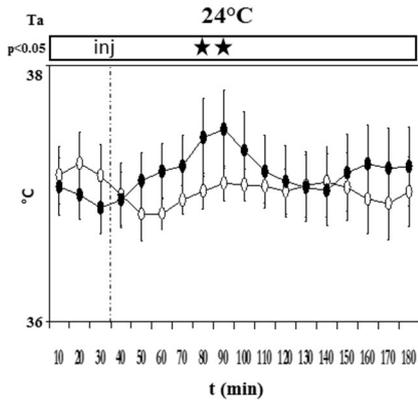
I grafici (a, b, c) mostrano l'andamento delle variabili autonome durante l'esposizione dell'animale a tre differenti temperature ambientali con una risoluzione temporale di 10 minuti durante i 180 minuti di registrazione.

Ogni animale è stato iniettato durante i due giorni consecutivi di registrazione con ORXA (pallini neri) e con salina (pallini bianchi). La linea verticale tratteggiata rappresenta il momento dell'iniezione. Le stelle in alto indicano una significatività di  $p < 0,05$  rispetto alla salina.

a) Temperatura cerebrale

b) Frequenza cardiaca

c) Pressione arteriosa media



● Orx  
○ Sal

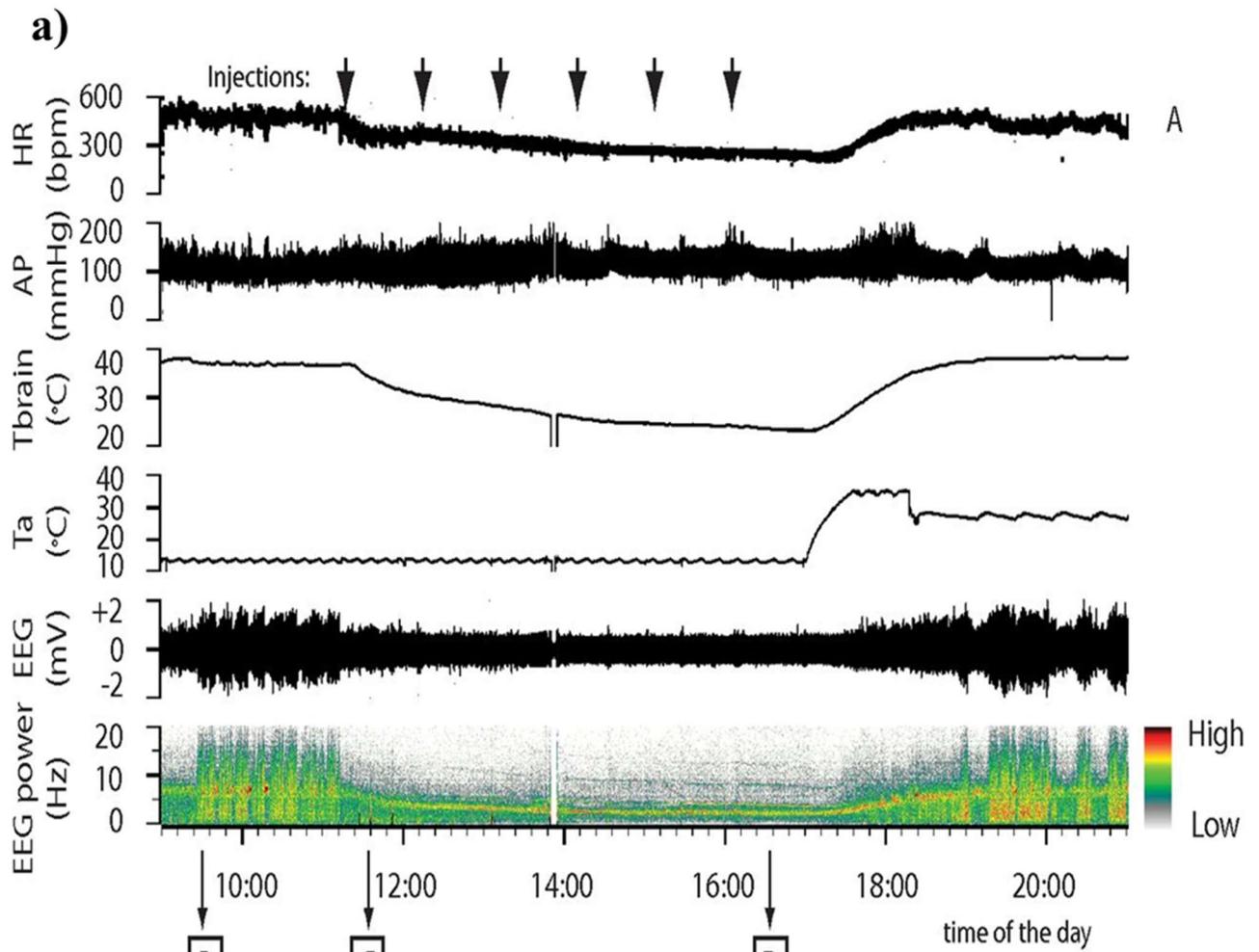
Del Vecchio F., *Effetti sulle funzioni autonome e sugli stati di veglia e di sonno della manipolazione centrale farmacologica del sistema ipocretinergico nel ratto*. Anno 2013; 169

-174<sup>86</sup>

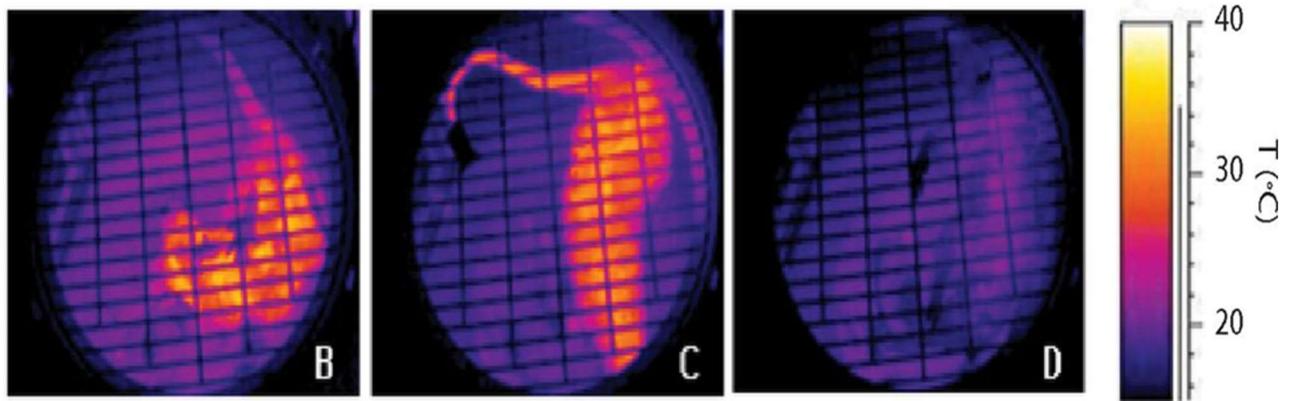
**Figura 4** Nella figura sono mostrati gli effetti indotti dall'inibizione del RVMM attraverso ripetute iniezioni di muscimolo (agonista GABA<sub>A</sub>). Nella parte superiore della figura (a) sono mostrati gli effetti indotti su alcune variabili fisiologiche da ripetute iniezioni dell'agonista GABA<sub>A</sub>-ergico (muscimolo; frecce nere in alto) a livello del RVMM in un animale precedentemente esposto ad un Ta di 15°C.

I grafici mostrano come l'inibizione del RVMM induca uno stato di pseudo torpore caratterizzato da una riduzione della temperatura cerebrale ( $T_{\text{brain}}$ ), frequenza cardiaca (HR) e dell'attività elettroencefalografica (a) accompagnati da una importante vasodilatazione a livello cutaneo (b). Non si verificano cambiamenti significativi a livello della pressione arteriosa (AP).

Le immagini in basso (b), acquisite attraverso una termocamera ad infrarossi, mostrano l'andamento della vasomozione cutanea dell'animale: prima dell'iniezione (B), dopo la prima iniezione (C), alla fine della sessione sperimentale (D).

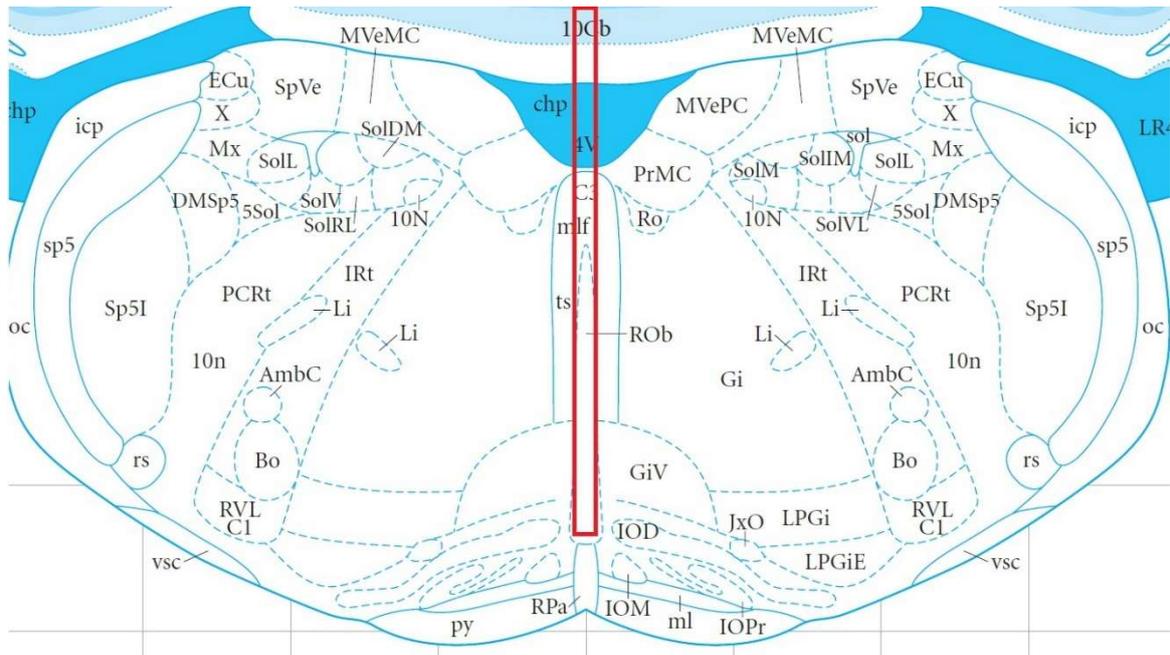


**b)**



Cerri M. *et al.*, J. Neurosci. **33**, 2984–2993 (2013) <sup>130</sup>

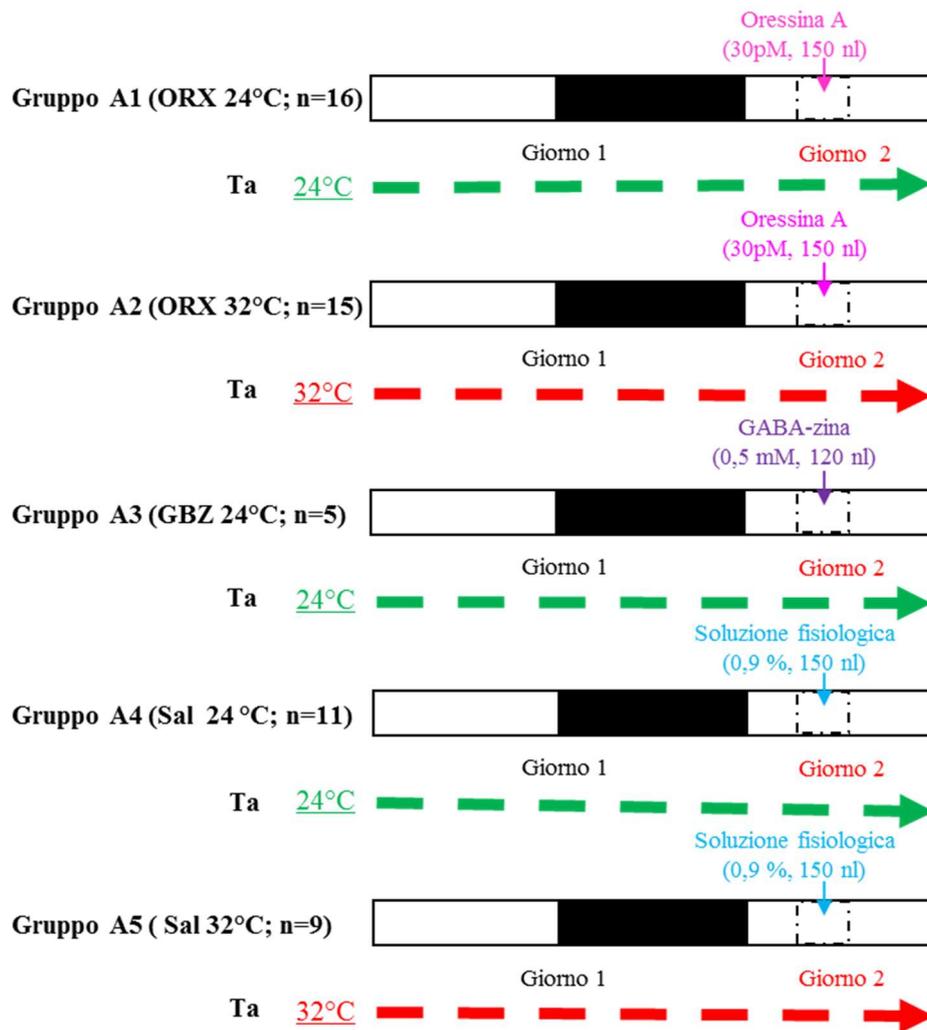
**Figura 5** Nel riquadro inferiore della figura è rappresentata la sezione istologica coronale del RPa contenente il sito di iniezione. Nella riquadro superiore il sito di iniezione è indicato da un rettangolo rosso sulla corrispondente area della tavola anatomica dell'atlante neuroanatomico del ratto<sup>182</sup>.



**Figura 6\_** La figura rappresenta in maniera schematica i 5 gruppi di animali utilizzati nell'esperimento A (ORX 24°C, ORX 32°C, GBZ 24°C, Sal 24°C, Sal 32°C).

Per ogni gruppo sono indicate: i) la linea temporale (quadrato bianco =luce 12h; quadrato nero=buio 12h) con in basso indicate le due differenti giornate sperimentali (giorno 1; giorno 2); ii) l'intervallo temporale in cui è stata effettuata l'iniezione (11:00-14:00) rappresentato dal quadrato con linea tratteggiata inserito all'interno del quadrato del giorno 2; iii) la temperatura ambientale (Ta) alla quale sono stati esposti gli animali (freccia tratteggiata; Ta 24°C, linea verde; Ta 32°C, linea rossa); iv) la sostanza iniettata durante la giornata sperimentale a livello del RPa (Fucsia, Oressina-A; viola, GABA-zina; celeste, Salina;), situata in alto su ogni linea temporale; v) il gruppo sperimentale e il numero di animali utilizzato (posizionato a sinistra della linea temporale).

# ESPERIMENTO A



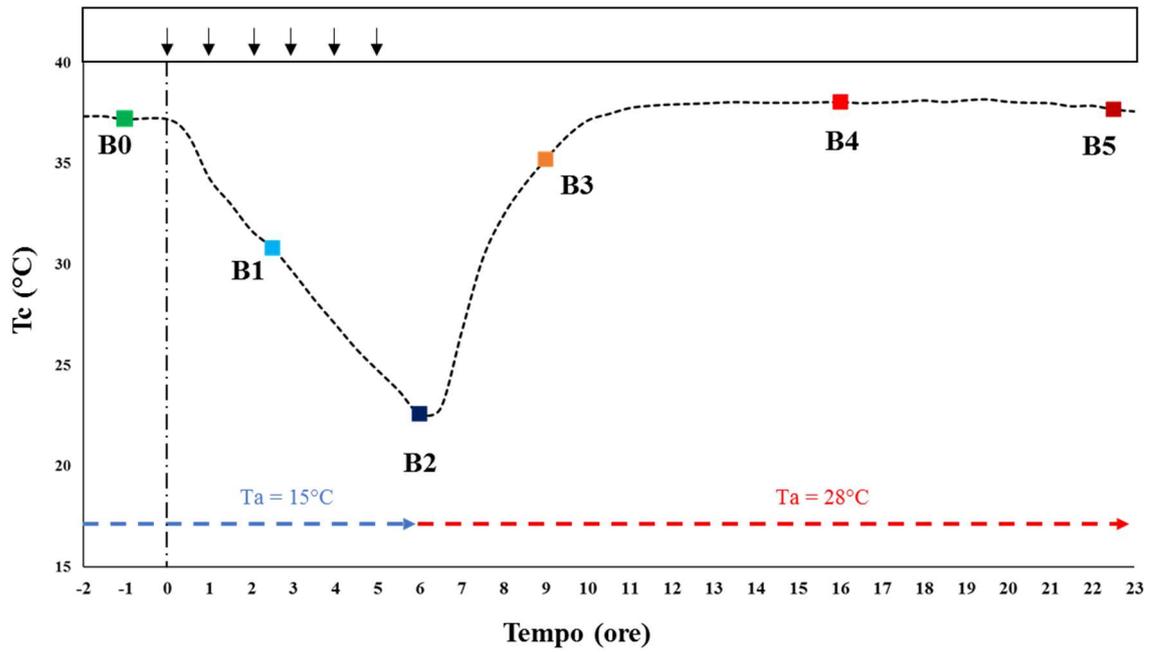
**Figura 7** \_ La figura è una rappresentazione schematica dei piani sperimentali utilizzati per la realizzazione dell'esperimento B.

Il grafico è un esempio rappresentativo dell'andamento della Tc dell'animale prima, durante e dopo l'induzione di uno stato di pseudo torpore attraverso iniezioni ripetute di muscimolo (agonista GABA<sub>A</sub>) a livello del RPa.

Ogni punto della Tc evidenziato da un quadrato indica la diversa temperatura cerebrale (Tc) alla quale sono stati perfusi gli animali nel protocollo sperimentale utilizzato: quadrato verde (B0) Tc 37°C, quadrato celeste (B1) Tc 30°C, quadrato blu (B2) Tc 22,5°C, quadrato arancione (B3) Tc 35,5°C, quadrato rosso (B4) Tc di 37°C (dopo 6 ore dal raggiungimento della normotermia), quadrato bordeaux (B5) dopo 36 ore dal raggiungimento della Tc di 37°C.

Nel gruppo B5 dopo 12 ore dal ritorno alla normotermia la Ta è stata modificata da 28 a 24 ±1°C. Il gruppo di controllo B0 non ha ricevuto nessuna iniezione di farmaco. Le frecce all'interno del quadrato nella parte alta del grafico indicano i diversi momenti in cui è stato iniettato l'animale con il muscimolo. La linea tratteggiata posta a livello dell'ora 0 indica il momento in cui è stata effettuata la prima iniezione. Le frecce in basso rappresentano la Ta alla quale sono stati esposti gli animali durante il protocollo sperimentale, rispettivamente la freccia blu indica una Ta di 15°C e la freccia rossa una Ta di 28°C.

# ESPERIMENTO B



**Figura 8\_** Nella figura sono mostrate le modificazioni indotte dall'iniezione di oressina e di soluzione fisiologica a livello del RPa sulla quantità di veglia (a), sonno NREM (b) e sonno REM (c) durante l'esposizione dell'animale alla Ta di 24°C.

Questi risultati mostrano che l'iniezione del neuropeptide a livello del RPa produce un importante e sostenuto aumento della quantità di veglia (a) durante l'esposizione dell'animale a 24°C associato ad una riduzione della quantità di sonno (b, c).

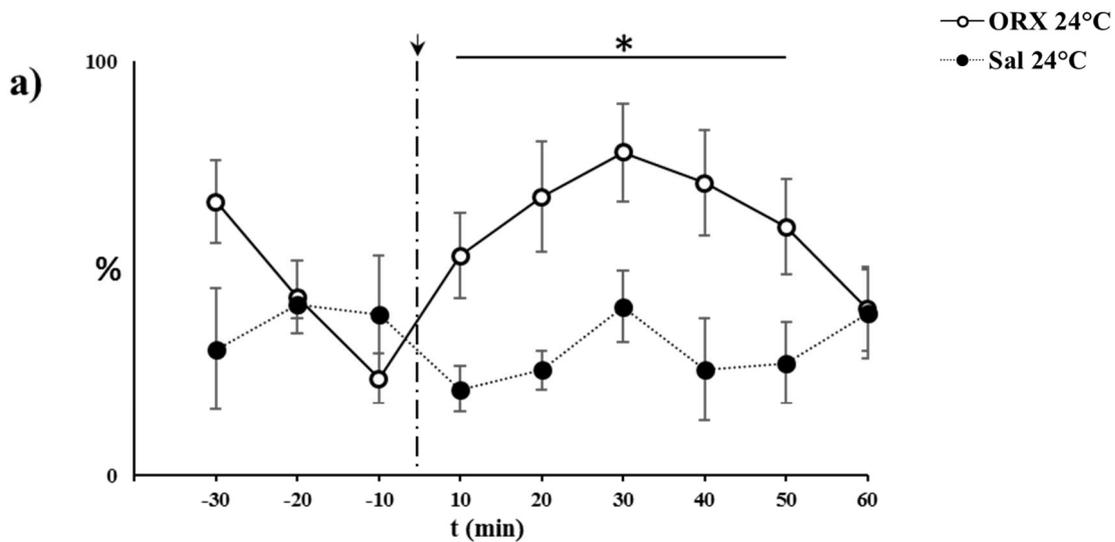
I risultati rappresentano la quantità del tempo trascorso dall'animale in ogni stato (veglia, sonno NREM, sonno REM) espressa come percentuale di ogni intervallo con una risoluzione temporale di 10 minuti durante i 90 minuti di registrazione. Ogni animale è stato iniettato durante il secondo giorno consecutivo di esposizione alla Ta di 24°C con oressina (pallini bianchi) e con salina (pallini neri). La linea verticale tratteggiata indicata dalla freccia in alto rappresenta il momento dell'iniezione.

L'asterisco indica una significatività statistica di  $p < 0,05$  nei confronti indicati dalla barra in alto.

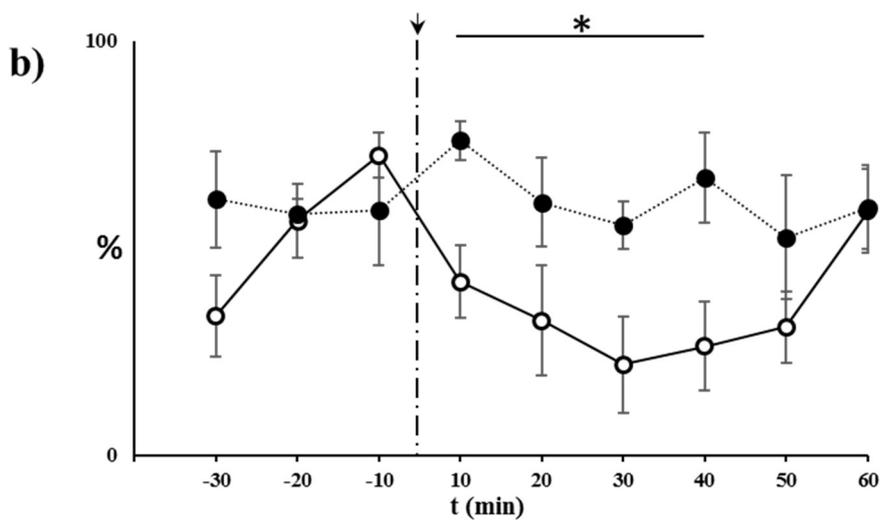
# ESPERIMENTO A

ORX 24°C vs Sal 24°C

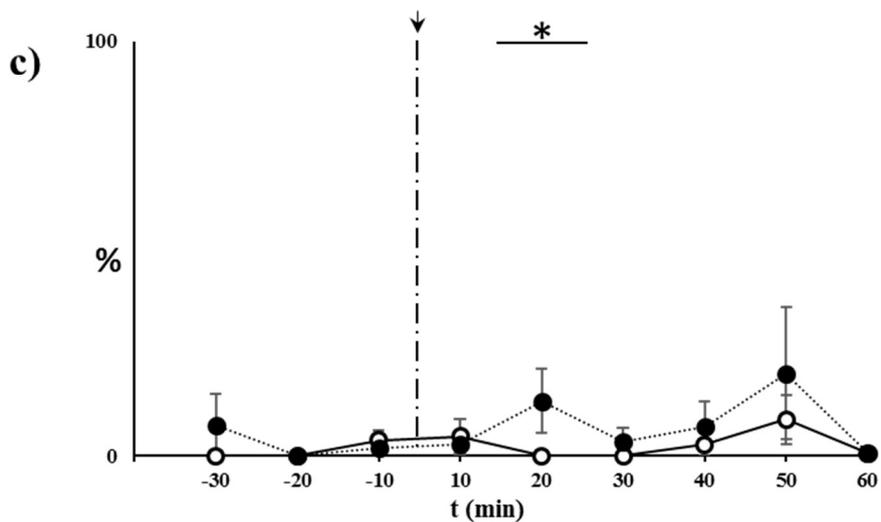
a) VEGLIA - Quantità



b) SONNO NREM - Quantità



c) SONNO REM - Quantità



**Figura 9** \_Nella figura sono mostrate le modificazioni indotte dall'iniezione di GABA-zina e soluzione fisiologica (Sal), a livello del RPa, sulla quantità di veglia (a), sonno NREM (b) e sonno REM (c) durante l'esposizione dell'animale alla Ta di 24°C.

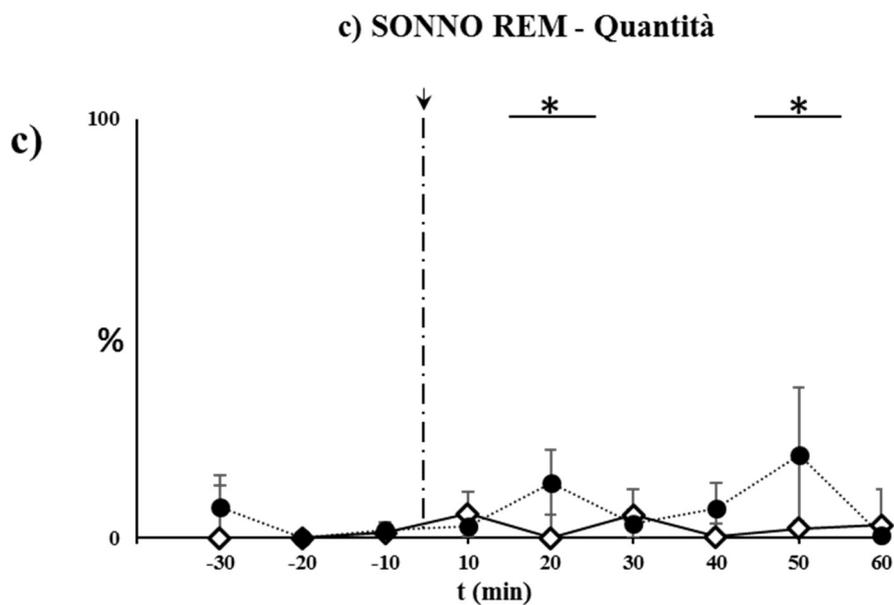
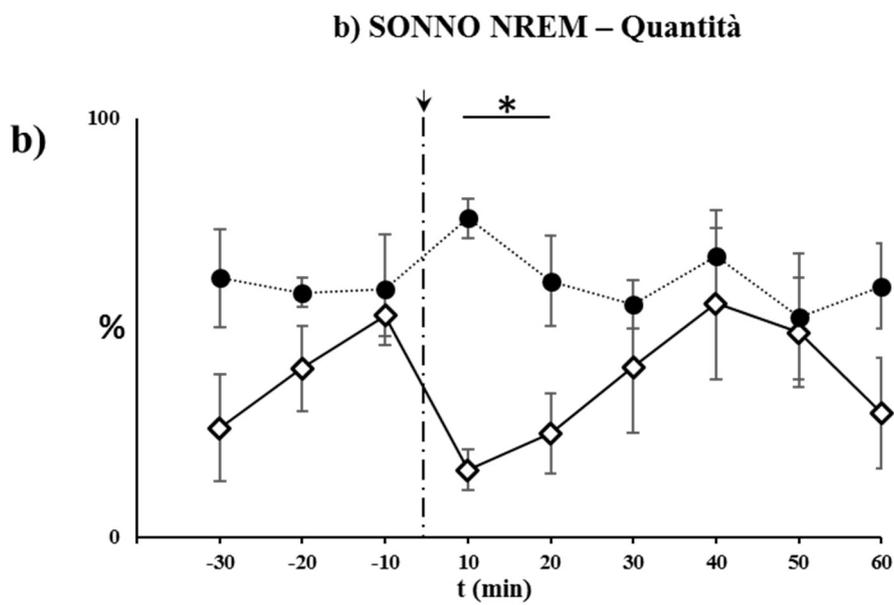
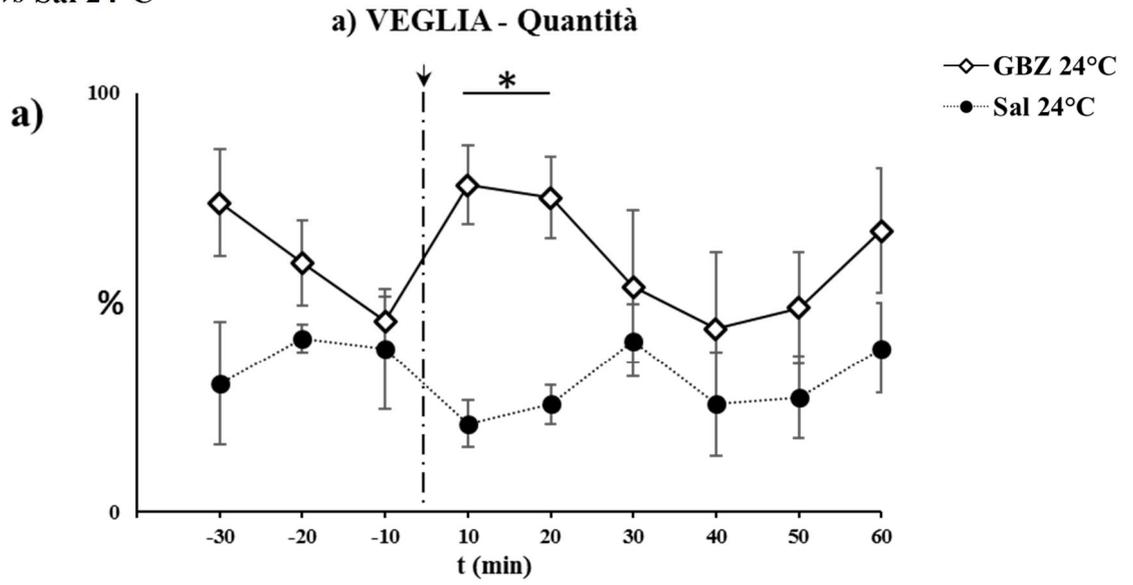
Questi risultati mostrano come l'iniezione dell'antagonista GABA-ergico a livello del RPa produce un modesto aumento della quantità di veglia che si verifica nei primi 20 minuti successivi l'iniezione, associato ad una riduzione della quantità di sonno (b, c).

I risultati rappresentano la quantità del tempo trascorso dall'animale in ogni stato (veglia, sonno NREM, sonno REM) espressa come percentuale di ogni intervallo con una risoluzione temporale di 10 minuti durante i 90 minuti di registrazione. Ogni animale è stato iniettato durante il secondo giorno consecutivo esposizione alla Ta di 24°C con GABA-zina (rombi bianchi) e con salina (pallini neri). La linea verticale tratteggiata indicata dalla freccia posta in alto rappresenta il momento dell'iniezione.

L'asterisco indica una significatività statistica di  $p < 0,05$  nei confronti indicati dalla barra in alto.

# ESPERIMENTO A

GBZ 24°C vs Sal 24°C



**Figura 10\_** Nella figura sono mostrate le modificazioni indotte dall'iniezione di oressina e di salina a livello del RPa sulla quantità di veglia (a), sonno NREM (b) e sonno REM (c) durante l'esposizione dell'animale alla Ta di 32°C.

Questi risultati mostrano che l'iniezione del neuropeptide a livello del RPa produce un discreto aumento della quantità di veglia, associato ad una riduzione della quantità di sonno NREM rispetto al trattamento con soluzione fisiologica (Sal 32°C) (b).

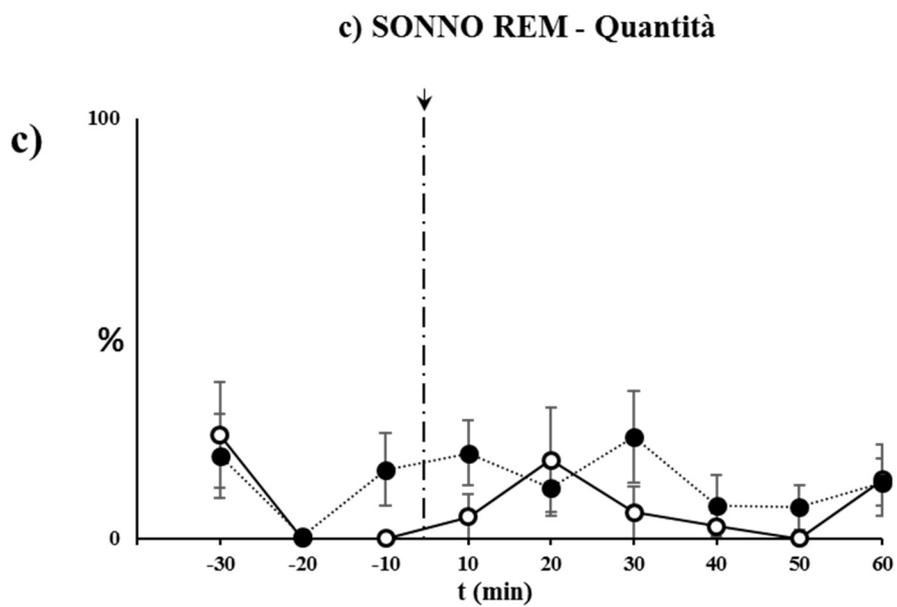
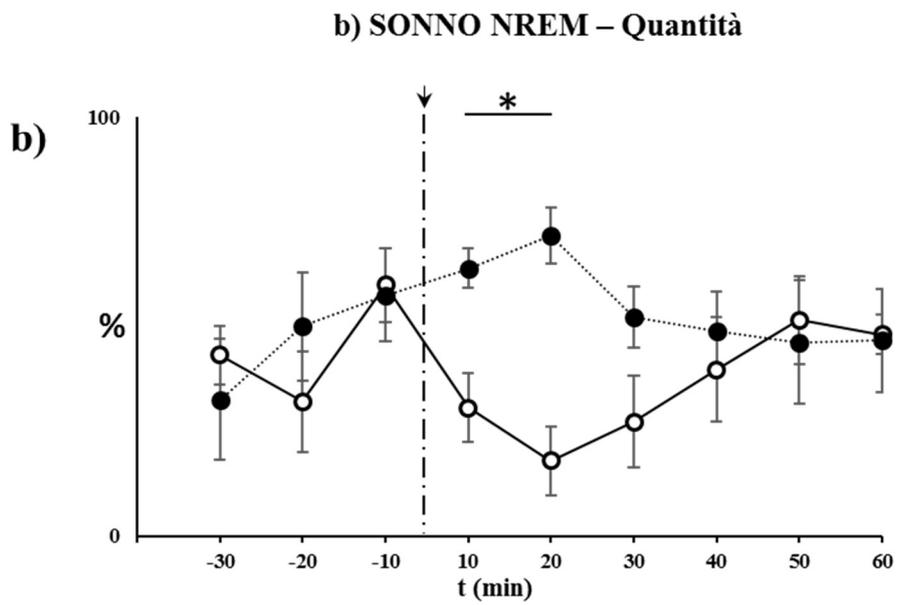
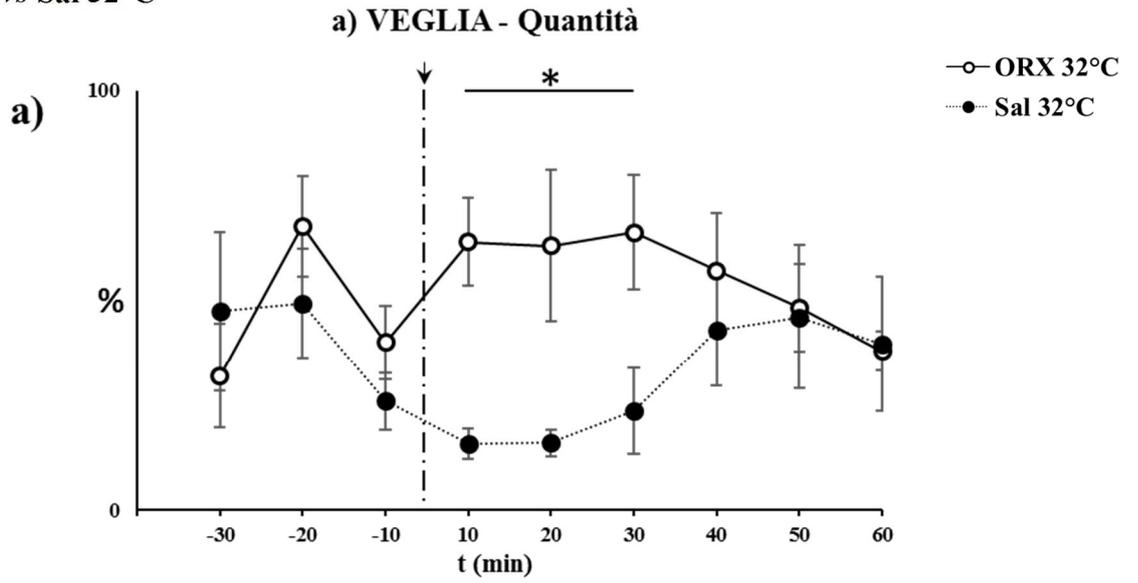
Non sono state rilevate modificazioni nella quantità di sonno REM in seguito all'iniezione del neuropeptide.

I risultati rappresentano la quantità del tempo trascorso dall'animale in ogni stato (veglia, sonno NREM, sonno REM) espressa come percentuale di ogni intervallo con una risoluzione temporale di 10 minuti durante i 90 minuti di registrazione. Ogni animale è stato iniettato durante il secondo giorno consecutivo esposizione alla Ta di 32°C con oressina (pallini bianchi) e con salina (pallini neri). La linea verticale tratteggiata indicata dalla freccia posta in alto rappresenta il momento dell'iniezione

L'asterisco indica una significatività statistica di  $p < 0,05$  nei confronti indicati dalla barra in alto.

# ESPERIMENTO A

ORX 32°C vs Sal 32°C



**Figura 11\_** Nei grafici sono rappresentati i risultati del comportamento alimentare per le diverse condizioni sperimentali analizzate con il rispettivo gruppo di controllo: grafico a) ORX 24°C vs Sal 24°C, grafico b) GBZ 24°C vs Sal 24°C, grafico c) ORX 32°C vs Sal 32°C.

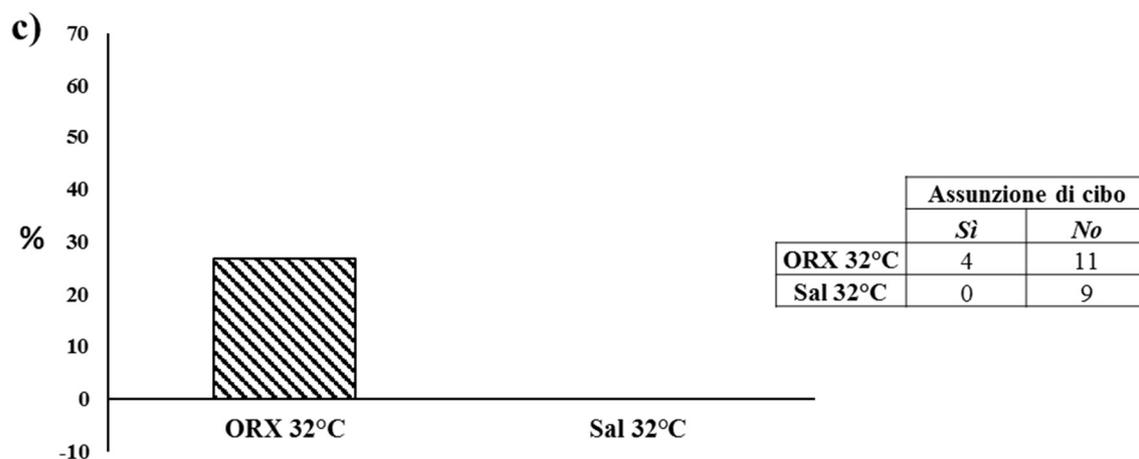
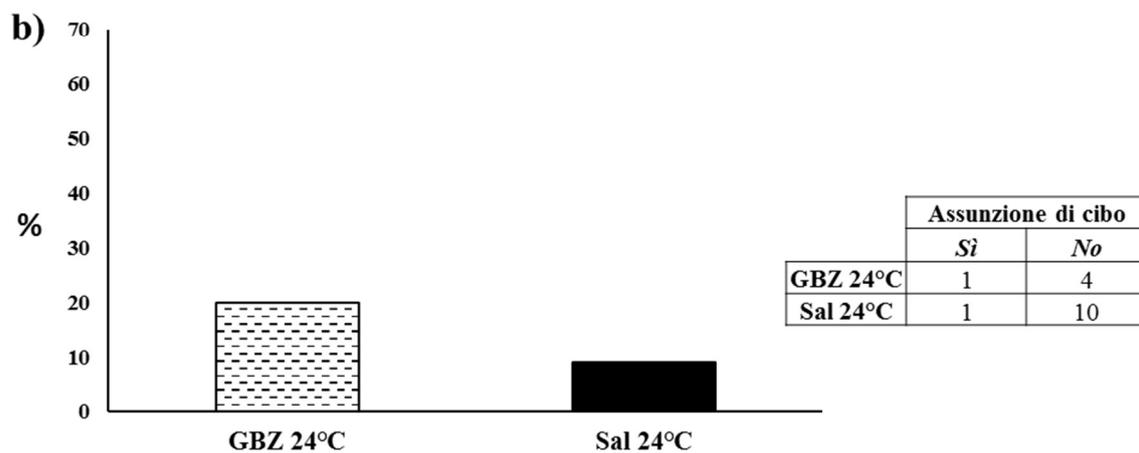
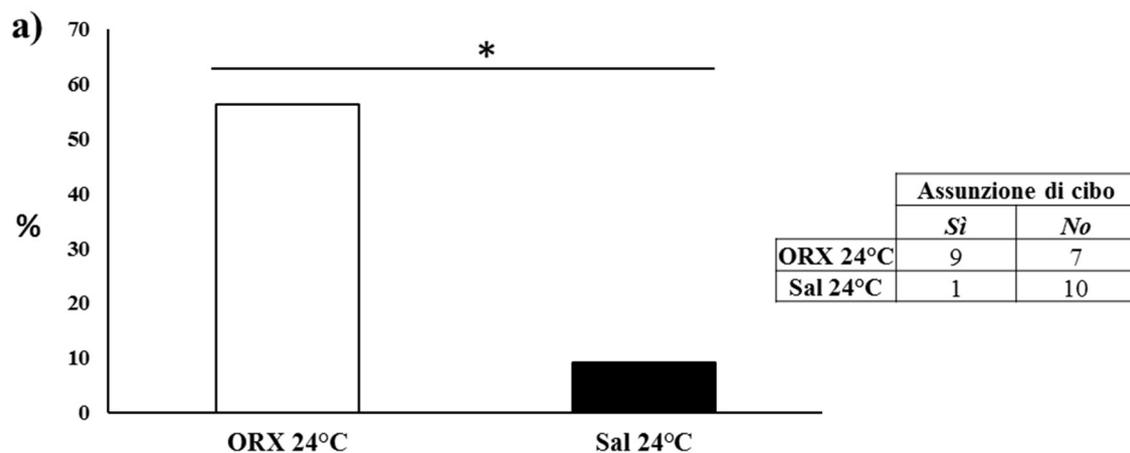
Alla destra di ogni grafico è rappresentata una tabella dove è indicato il numero di animali che ha assunto cibo (casella Si) e non ha assunto cibo (casella No) per ogni condizione sperimentale.

I risultati sono rappresentati come percentuale del numero degli animali che nei 20 minuti successivi all'iniezione della sostanza a livello del RPa ha mostrato una risposta comportamentale di assunzione di cibo.

L'asterisco indica una significatività statistica di  $p < 0,05$  nei confronti indicati dalla barra in alto.

# ESPERIMENTO A

## COMPORTAMENTO ALIMENTARE



**Figura 12\_** I quattro grafici, mostrati in figura, rappresentano la media/veicolo del numero di neuroni del RPa positivi per la presenza dei diversi marcatori analizzati per ogni condizione sperimentale: neuroni positivi per cFos (cFos+), indice di attivazione neuronale (grafico a); neuroni positivi per la TPH (TPH+), indice della presenza di neuroni serotoninergici (grafico b); neuroni positivi sia per il marker cFos che per TPH (cFos/TPH+), indice della presenza di neuroni serotoninergici attivati (grafico c, d).

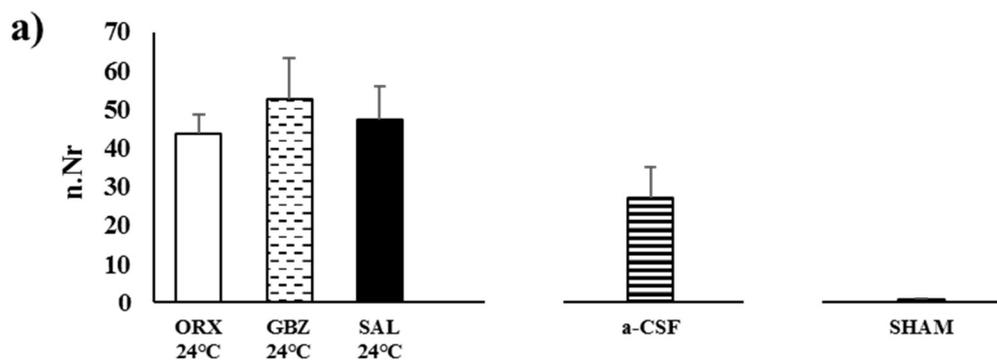
Il grafico sulla sinistra mostra il conteggio delle cellule per le condizioni sperimentali: ORX 24°C (istogramma bianco), GBZ 24°C (istogramma trattini orizzontali), Sal 24°C (istogramma nero), il grafico al centro quello degli animali iniettati con a-CSF (istogramma con righe orizzontali) e il grafico sulla destra quello per l'animale *Sham* (istogramma con puntini neri).

I dati sono rappresentati come media del numero di neuroni (n.NR)  $\pm$  SEM (a, b, c) e come media percentuale dei neuroni (n.Nr (%))  $\pm$  SEM (d).

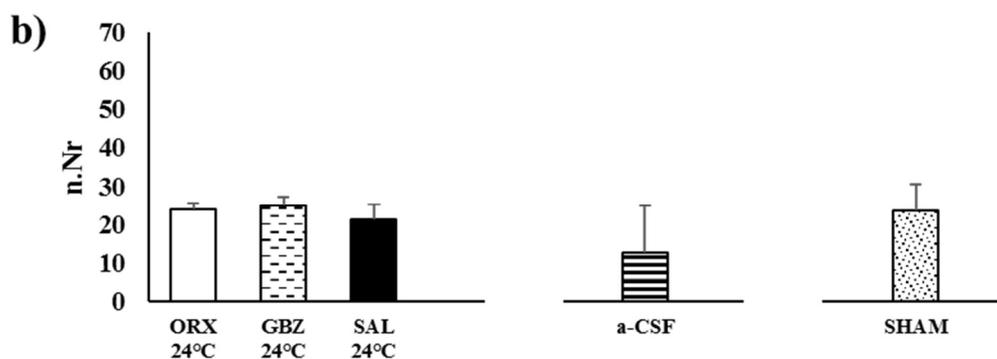
Per il conteggio sono state prese in considerazione quattro sezioni adiacenti al sito d'iniezione a livello del RPa.

# ESPERIMENTO A

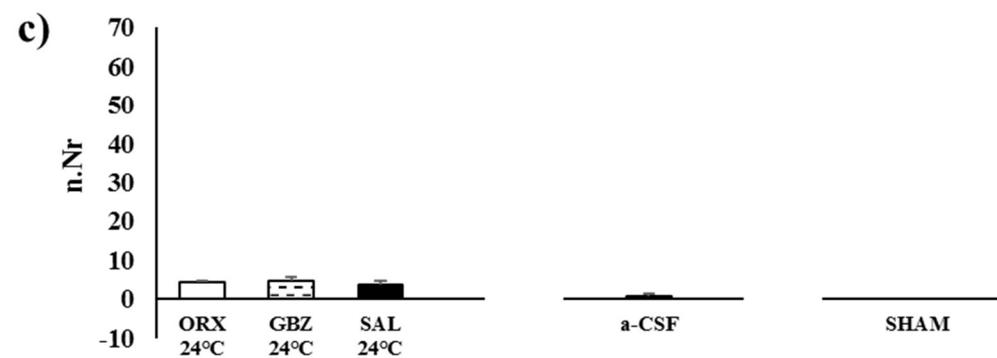
## a) NEURONI cFos +



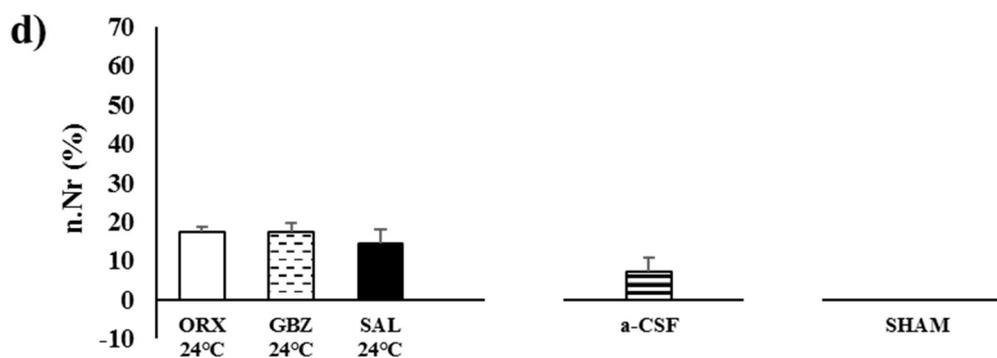
## b) NEURONI TPH +



## c) NEURONI cFos/TPH +



## d) NEURONI cFos/TPH +



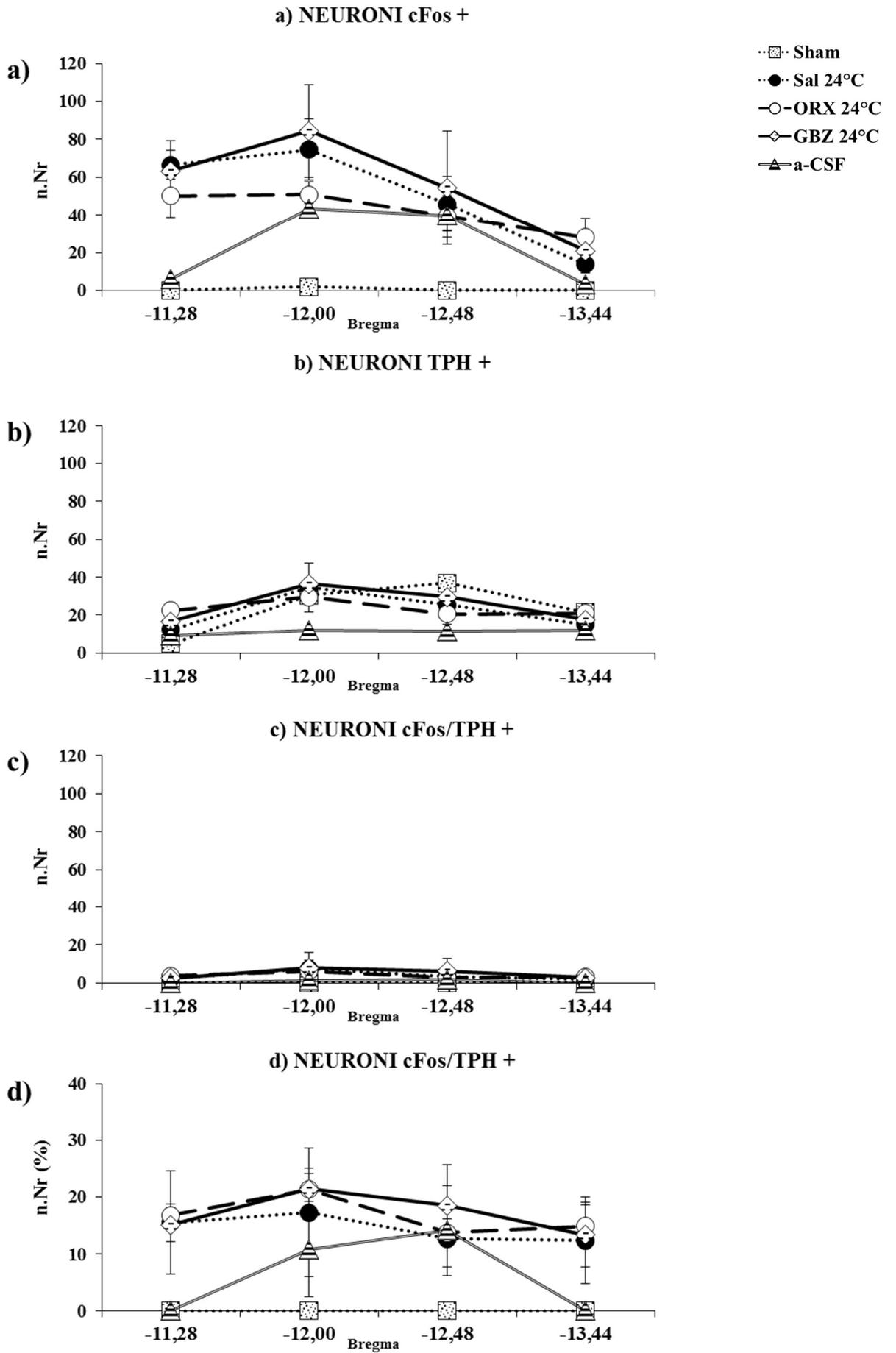
**Figura 13**\_ I quattro grafici nella figura, rappresentano per ogni sezione istologica analizzata, la media/vetrino del numero di neuroni del RPa positivi per la presenza dei diversi marcatori analizzati nelle condizioni sperimentali utilizzate: neuroni positivi per cFos (cFos+), indice di attivazione neuronale (grafico a); neuroni positivi per la TPH (TPH+), indice della presenza di neuroni serotoninergici (grafico b); neuroni positivi sia per il marker cFos che per TPH (cFos/TPH+), indice della presenza di neuroni serotoninergici attivati (grafico c, d).

Il grafico sulla sinistra mostra il conteggio delle cellule per le condizioni sperimentali: ORX 24°C (pallino bianco), GBZ 24°C (rombo trattini orizzontali), Sal 24°C (pallino nero), il grafico al centro quello degli animali iniettati con a-CSF (triangolo con righe orizzontali) e il grafico sulla destra quello per l'animale *Sham* (quadrato con puntini neri).

Le quattro sezioni analizzate sono adiacenti al sito d'iniezione e per ognuna le coordinate prese rispetto al bregma dell'animale sono indicate nell'asse delle ascisse ( -11,28 AP, -12,00 AP, -12,48 AP e -13,44 AP rispetto al bregma).

I dati sono rappresentati per ogni sezione come la media del numero di neuroni in valore assoluto (n.Nr)  $\pm$  SEM (grafico a, b, c) e come media percentuale dei neuroni (n.Nr (%))  $\pm$  SEM (grafico d).

# ESPERIMENTO A



**Figura 14\_** Nella tabella sono rappresentate tutte le strutture analizzate nell'esperimento B con le relative funzioni fisiologiche.

## ESPERIMENTO B

<b>Struttura Anatomica</b>	<b>Funzione</b>
<b>Corteccia frontale</b>	Area coinvolta nella genesi delle onde lente elettroencefalografiche di maggiore ampiezza durante il sonno NREM
<b>Regione CA3 dell'Ippocampo</b>	Area coinvolta nella genesi delle onde theta durante la veglia e il sonno REM
<b>Nucleo preottico ventrolaterale</b>	Sede dei neuroni responsabili dell'inibizione dei sistemi attivanti ascendenti
<b>Nucleo paraventricolare ipotalamico</b>	Sede dei premotoneuroni coinvolti nella integrazione di tipo neuro-endocrino e autonomico della regolazione cardiovascolare
<b>Ipotalamo laterale</b>	Sede dei neuroni oressinergici del sistema ascendente attivante
<b>Nuclei Tuberosomammillari</b>	Sede dei neuroni istaminergici del sistema ascendente attivante
<b>Nuclei del Tegmento pontino</b>	Sede dei neuroni colinergici del sistema ascendente attivante
<b>Nucleo Parabrachiale</b>	Area coinvolta nel controllo della termoregolazione e dell'attività cardio-respiratoria
<b>Locus coeruleus</b>	Sede dei neuroni noradrenergici del sistema ascendente attivante
<b>Nucleo del Tratto Solitario</b>	Area coinvolta nel controllo dell'attività cardio-respiratoria
<b>Bulbo ventrolaterale rostrale</b>	Area coinvolta nella regolazione cardio-respiratoria
<b>Raphe pallidus</b>	Sede dei premotoneuroni simpatici coinvolti nella regolazione della termogenesi

**Fig. 15\_** Nella tabella (a) sono indicate le diverse intensità del marcatore per la proteina Tau fosforilata (AT-8) per le varie aree cerebrali analizzate. Il grado di intensità è la risultante della valutazione in cieco di due diversi operatori. I risultati sono stati catalogati utilizzando una scala definita in base alle diverse intensità riscontrate del segnale, con i seguenti criteri:

i) “-” completa assenza del segnale, ii) “+” intensità debole del segnale, iii) “++” intensità intermedia del segnale, iv) “+++” intensità alta del segnale, v) “++++” intensità massima del segnale.

Nella tabella (b) in basso nella figura sono indicati i risultati del test non-parametrico “U” di Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )

## ESPERIMENTO B

a)

Struttura Anatomiche	B0	B1	B2	B3	B4	B5
Corteccia frontale	+	++++	++	++	-	-
Regione CA3 dell'Ippocampo	-	+++	++++	++	-	-
Nucleo preottico ventro-laterale	+	+++	++++	++++	+	-
Nucleo paraventricolare ipotalamico	-	++++	+++	+++	-	+
Ipotalamo laterale	-	+++	++++	++	-	-
Nuclei Tuberomammillari	-	+++	++++	+++	+	-
Nuclei del Tegmento pontino	-	+	++++	++	+	-
Nucleo Parabrachiale	-	++	++++	++	-	-
Locus coeruleus	+++	-	++	++	+	-
Nucleo del Tratto Solitario	-	++++	++++	++	-	-
Bulbo ventrolaterale rostrale	-	++	++++	+++	-	-
Raphe pallidus	+	+++	++++	+++	++	+

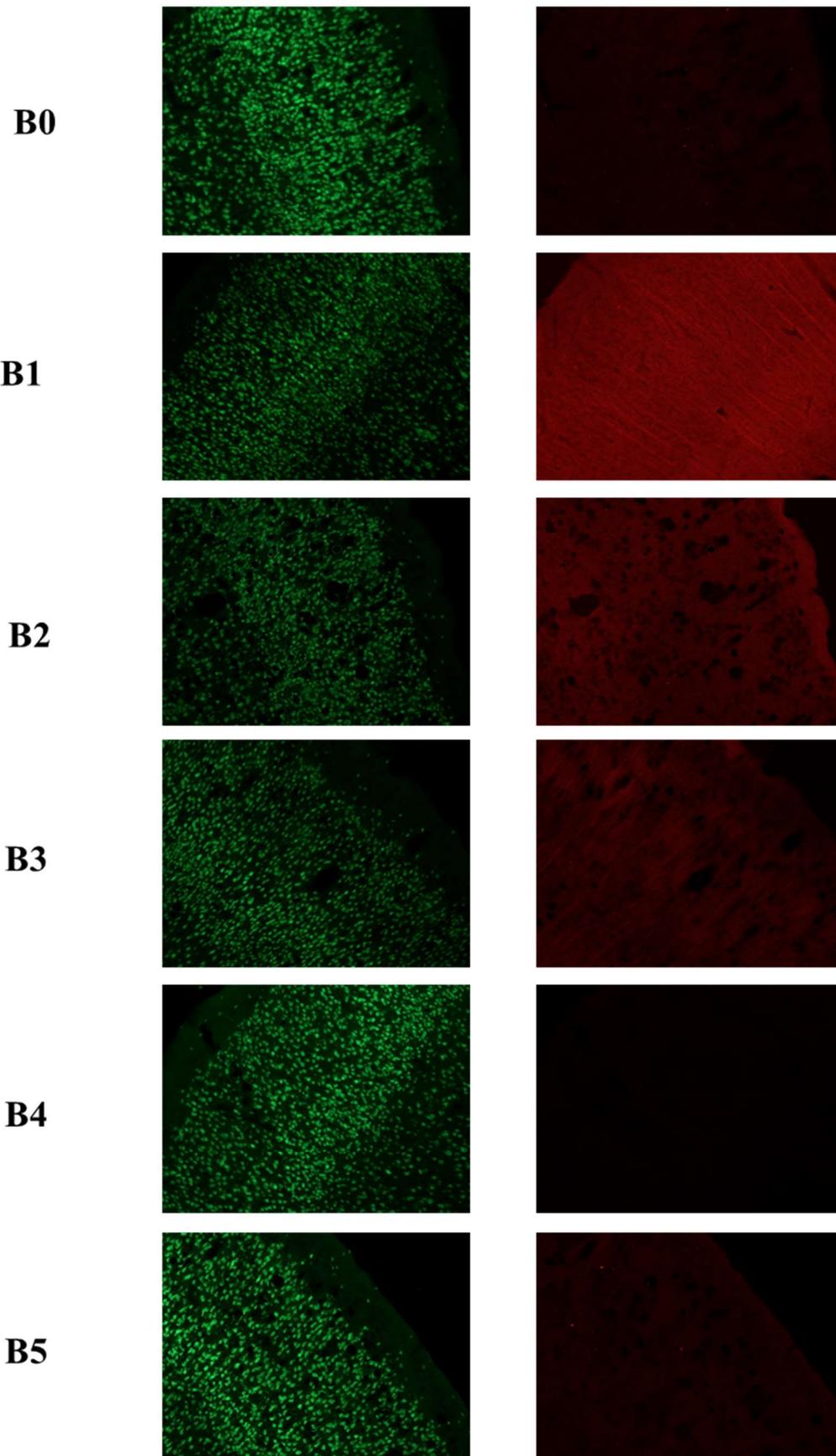
b)

Analisi Statistica
<i>p</i> <0,05
B0 vs B1
B0 vs B2
B0 vs B3
B1 vs B3
B1 vs B5
B2 vs B3
B2 vs B4
B2 vs B5
B3 vs B4
B3 vs B5
B4 vs B5

**Fig.16\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio della corteccia frontale per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore. La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

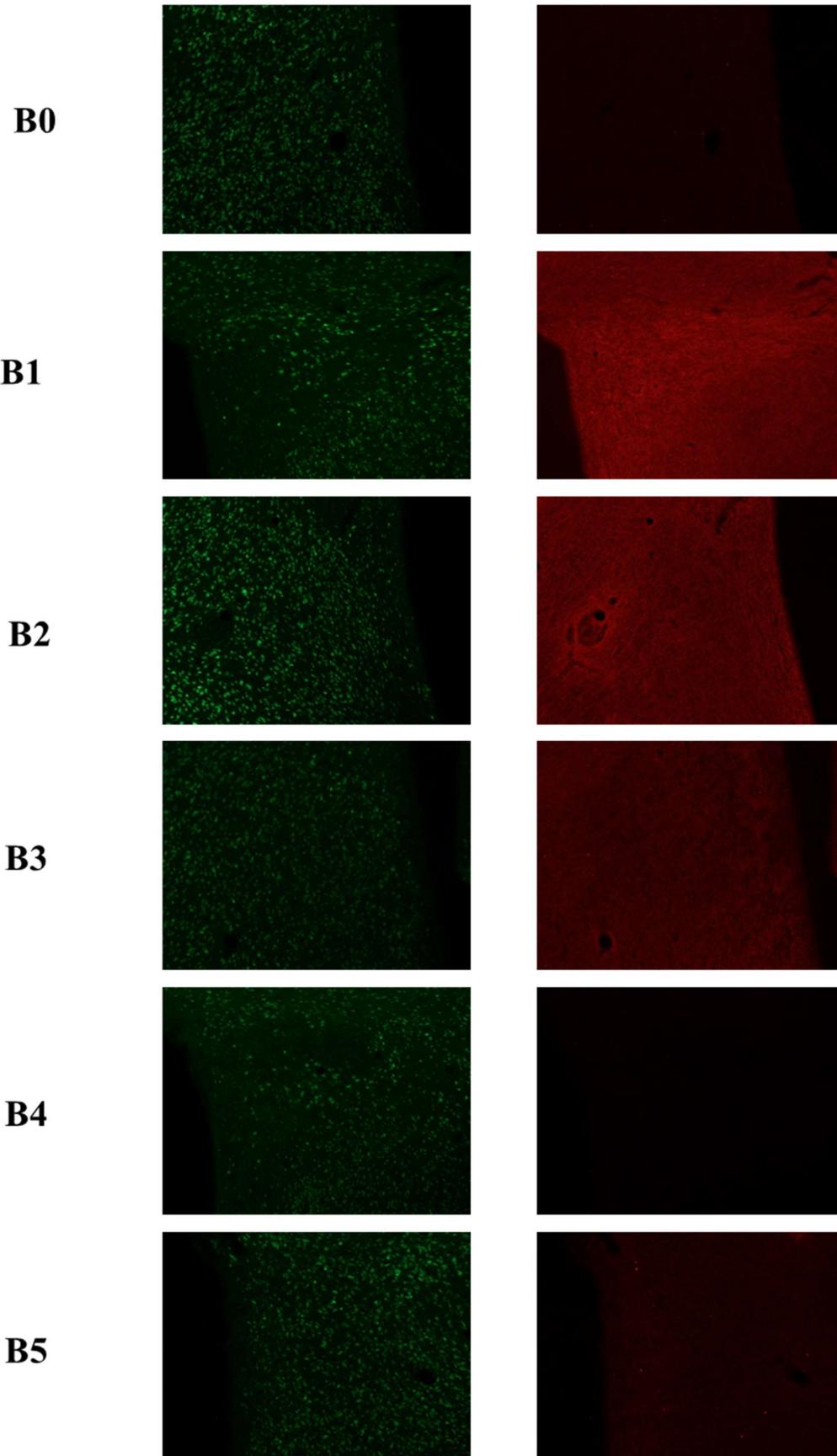
*Corteccia frontale*



**Fig. 17\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio del nucleo paraventricolare ipotalamico per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore. La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

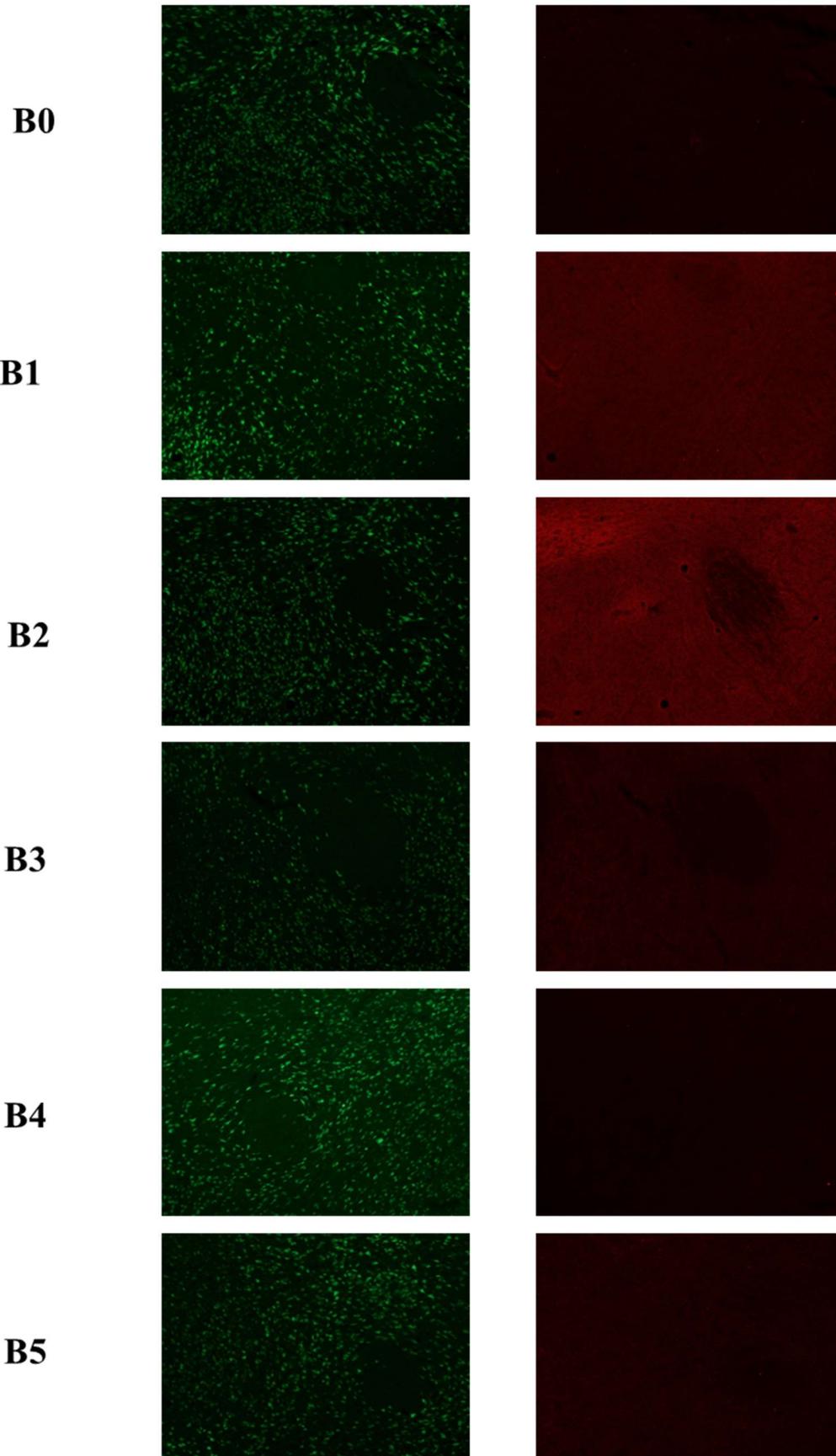
*Nucleo paraventricolare ipotalamico*



**Fig. 18\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio dell'ipotalamo laterale per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore. La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

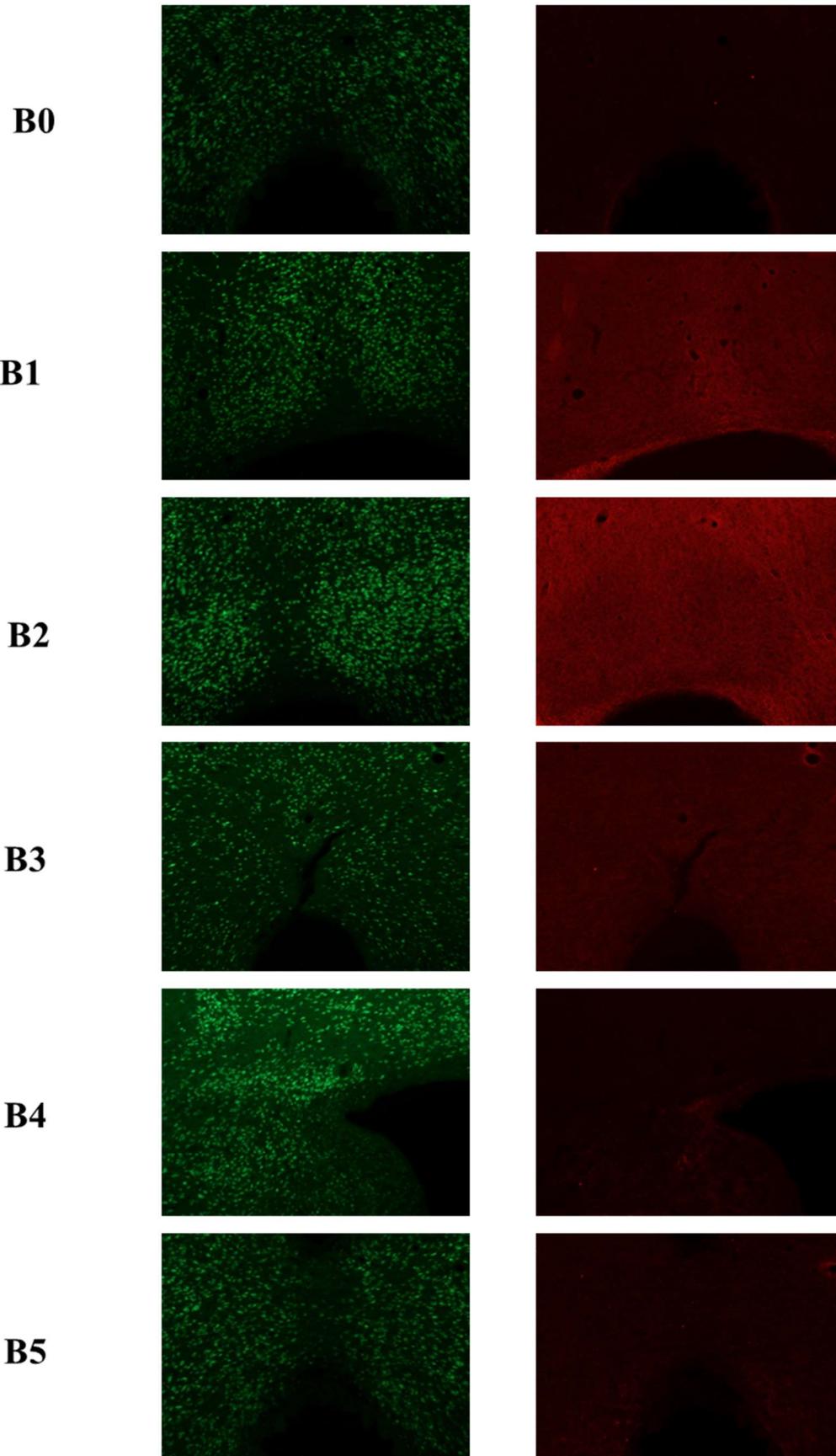
*Ipotalamo laterale*



**Figura 19\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio del nucleo tuberomammillare per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore. La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

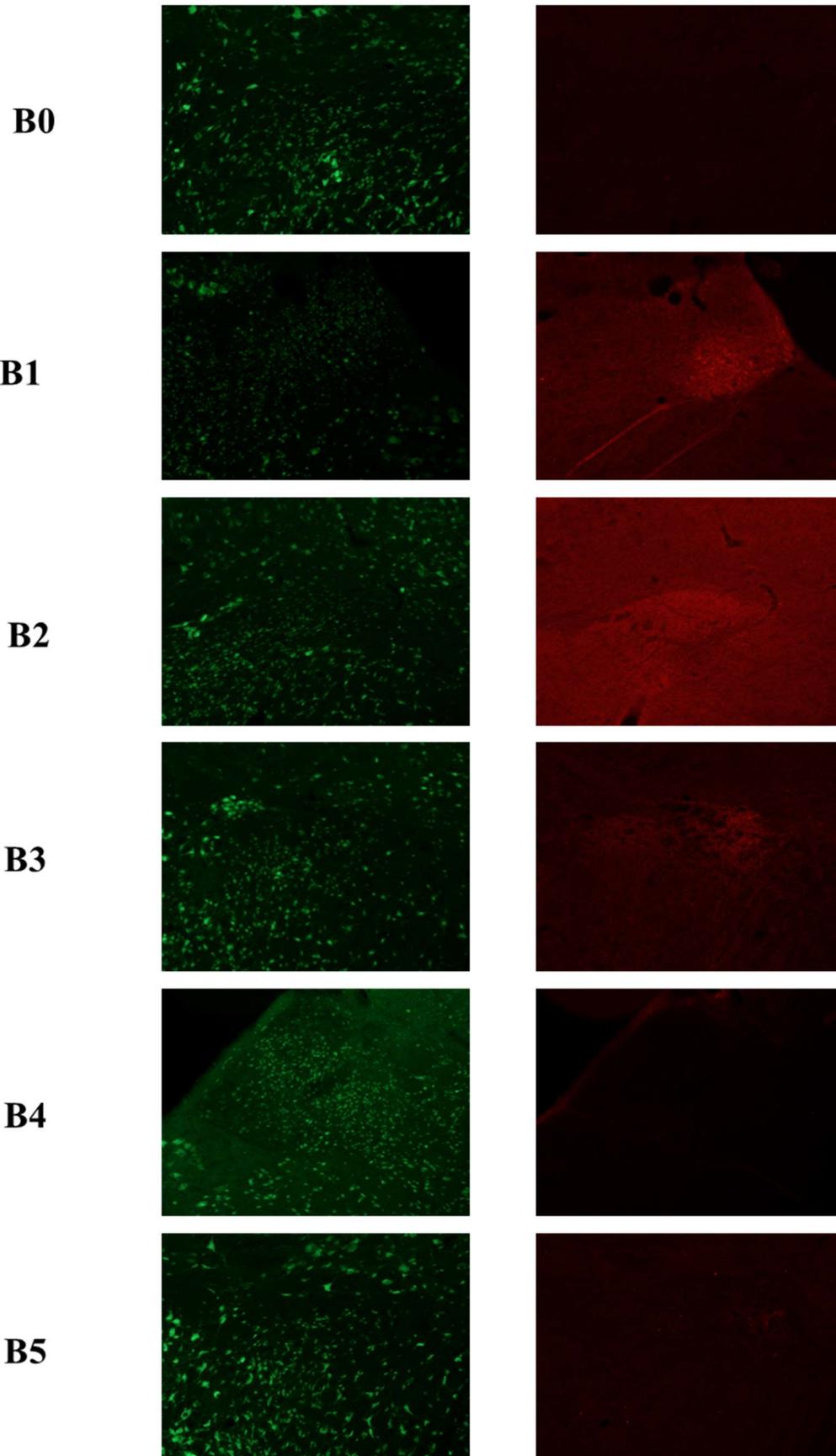
*Nucleo tuberomammilare*



**Figura 20\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio del nucleo del tratto solitario per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore. La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

*Nucleo del tratto solitario*

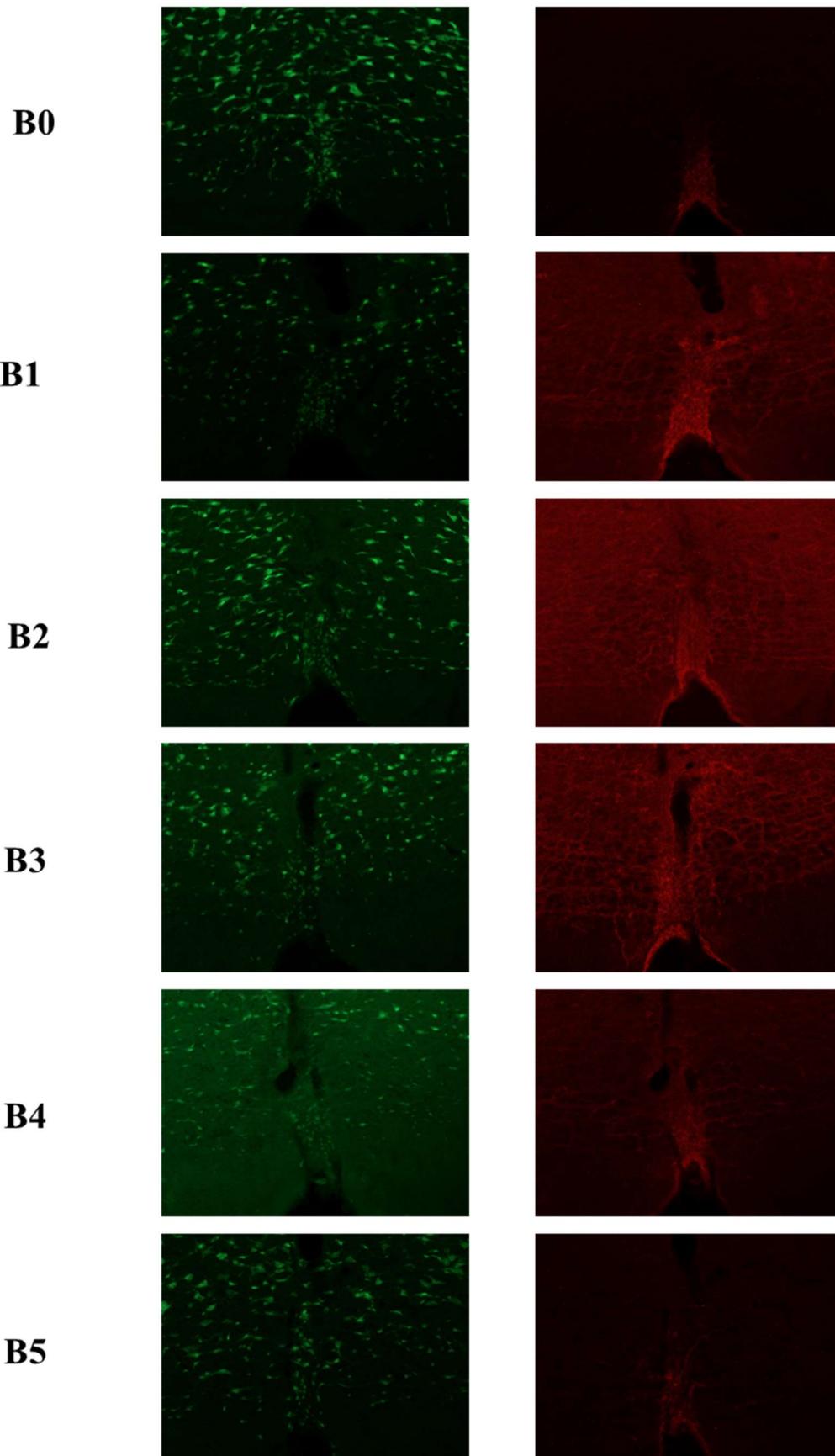


**Figura 21\_** La figura rappresenta le immagini in fluorescenza acquisite attraverso il microscopio del nucleo del raphe pallidus (RPa) per ogni condizione sperimentale. La prima riga si riferisce al gruppo di controllo B0, la seconda al gruppo B1 in cui è stata indotta un'ipotermia precoce ( $T_c = 30^\circ\text{C}$ ); la terza al gruppo B2 in cui è stata indotta un'ipotermia profonda; la quarta riga rappresenta il gruppo B3 in cui è stato permesso un riscaldamento precoce; la quinta e la sesta riga rappresentano il gruppo B4 e B5 ovvero gli animali in cui la condizione eutermica è stata mantenuta rispettivamente per 6 e 36 ore dopo l'induzione dello stato di pseudo torpore.

La marcatura in rosso rappresenta la presenza della proteina Tau iperfosforilata (AT-8) mentre quella in verde indica i nuclei delle cellule nervose (anti- Neun).

**ESPERIMENTO B**

*Raphe Pallidus*





# **BIBLIOGRAFIA**



1. Morrison, S. F. '*Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis.*' News Physiol. Sci. **19**, 67–74 (2004).
2. Ootsuka, Y. & McAllen, R. M. '*Interactive drives from two brain stem premotor nuclei are essential to support rat tail sympathetic activity.*' Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. **289**, (2005).
3. Tanaka, M., Owens, N. C., Nagashima, K., Kanosue, K. & McAllen, R. M. '*Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe.*' J. Physiol. **572**, 569–83 (2006).
4. Nakamura, K., Matsumura, K., Kaneko, T., Kobayashi, S., Katoh, H. & Negishi, M. '*The Rostral Raphe Pallidus Nucleus Mediates Pyrogenic Transmission from the Preoptic Area.*' J. Neurosci. **22**, (2002).
5. Zaretsky, D. V, Zaretskaia, M. V, Samuels, B. C., Cluxton, L. K. & DiMicco, J. A. '*Microinjection of muscimol into raphe pallidus suppresses tachycardia associated with air stress in conscious rats.*' J. Physiol. **546**, 243–50 (2003).
6. Garrick, T., Prince, M., Yang, H., Ohning, G. & Taché, Y. '*Raphe pallidus stimulation increases gastric contractility via TRH projections to the dorsal vagal complex in rats.*' Brain Res. **636**, 343–7 (1994).
7. Ribeiro-do-Valle, L. E. '*Serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei discharge in association with activity of masticatory muscles.*' Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol. **30**, 79–83 (1997).
8. Braak, H. '*[On the nuclei of the human brain stem. II. The raphe nuclei].*' Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **107**, 123–41 (1970).
9. Hornung, J.-P. '*The human raphe nuclei and the serotonergic system.*' J. Chem. Neuroanat. **26**, 331–43 (2003).
10. Hornung, J.-P. in The Human Nervous System 401–424 (2012).

11. Nogueira, M. I., Perpétuo Pfeiffer, C., Cioni Bittencourt, J. & Ribeiro do Vale, L. E. '*Caudal Brainstem Raphe Nuclei: Neural Substrate for their Involvement in the Expression of Some Biological Rhythms*'. Biol. Rhythm Res. **27**, 245–260 (1996).
12. Carlsson, A., Falck, B., Fuxe, K. & Hillarp, N.-Å. '*Cellular Localization of Monoamines in the Spinal Cord*'. Acta Physiol. Scand. **60**, 112–119 (1964).
13. Skagerberg, G. & Björklund, A. '*Topographic principles in the spinal projections of serotonergic and non-serotonergic brainstem neurons in the rat.*' Neuroscience **15**, 445–80 (1985).
14. Watson, C. in The Mouse Nervous System 398–423 (Elsevier, 2012).
15. Nogueira, M. I., de Rezende, B. D., do Vale, L. E. & Bittencourt, J. C. '*Afferent connections of the caudal raphe pallidus nucleus in rats: a study using the fluorescent retrograde tracers fluorogold and true-blue.*' Ann. Anat. **182**, 35–45 (2000).
16. Hermann, D. M., Luppi, P.-H., Peyron, C., Hinckel, P. & Jouvét, M. '*Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars  $\alpha$  demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b)*'. J. Chem. Neuroanat. **13**, 1–21 (1997).
17. Tupone, D., Madden, C. J., Cano, G. & Morrison, S. F. '*An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis.*' J. Neurosci. **31**, 15944–55 (2011).
18. Loewy, A. D. '*Raphe pallidus and raphe obscurus projections to the intermediolateral cell column in the rat.*' Brain Res. **222**, 129–33 (1981).
19. Johansson, O., Hökfelt, T., Pernow, B., Jeffcoate, S. L., White, N., Steinbusch, H. W., Verhofstad, A. A., Emson, P. C. & Spindel, E. '*Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary*

- neurons projecting to the spinal cord.* Neuroscience **6**, 1857–81 (1981).
20. Holstege, G. ‘*Some anatomical observations on the projections from the hypothalamus to brainstem and spinal cord: An HRP and autoradiographic tracing study in the cat*’. J. Comp. Neurol. **260**, 98–126 (1987).
  21. Stornetta, R. L., Rosin, D. L., Simmons, J. R., McQuiston, T. J., Vujovic, N., Weston, M. C. & Guyenet, P. G. ‘*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 (2005).
  22. Cano, G., Passerin, A. M., Schiltz, J. C., Card, J. P., Morrison, S. F. & Sved, A. F. ‘*Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure*’. J. Comp. Neurol. **460**, 303–326 (2003).
  23. Morrison, S. F., Madden, C. J. & Tupone, D. ‘*Central control of brown adipose tissue thermogenesis.*’ Front. Endocrinol. (Lausanne). **3**, (2012).
  24. Tansey, E. A. & Johnson, C. D. ‘*Recent advances in thermoregulation*’. Adv. Physiol. Educ. **39**, (2015).
  25. Lepock, J. R. ‘*Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage*’. Int. J. Hyperth. **19**, 252–266 (2003).
  26. Mallet, M. L. ‘*Pathophysiology of accidental hypothermia*’. QJM **95**, 775–785 (2002).
  27. Terrien, J., Perret, M. & Aujard, F. ‘*Behavioral thermoregulation in mammals: a review.*’ Front. Biosci. (Landmark Ed. **16**, 1428–44 (2011).
  28. Nagashima, K. ‘*Central Mechanisms for Thermoregulation in a Hot Environment*’. Ind. Health **44**, 359–367 (2006).
  29. Morrison, S. F. & Nakamura, K. ‘*Central neural pathways for thermoregulation.*’ Front. Biosci. (Landmark Ed. **16**, 74–104 (2011).
  30. Morrison, S. F. ‘*Central control of body temperature.*’ F1000Research **5**, (2016).

31. Jakus, P. B., Sandor, A., Janaky, T. & Farkas, V. '*Cooperation between BAT and WAT of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in BAT during reacclimation.*' J. Lipid Res. **49**, 332–9 (2008).
32. CANNON, B. & Nedergaard, J. '*Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance*'. Physiol. Rev. **84**, 277–359 (2004).
33. Romanovsky, A. A. '*Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system*'. AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. **292**, R37–R46 (2006).
34. Bamshad, M., Song, C. K. & Bartness, T. J. '*CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue*'. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. **276**, (1999).
35. Yoshida, K., Nakamura, K., Matsumura, K., Kanosue, K., König, M., Thiel, H.-J., Boldogkői, Z., Toth, I., Roth, J., Gerstberger, R. & Hübschle, T. '*Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3.*' Eur. J. Neurosci. **18**, 1848–60 (2003).
36. Sagar, S. M., Sharp, F. R. & Curran, T. '*Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level.*' Science **240**, 1328–31 (1988).
37. Nakamura, K., Matsumura, K., Hübschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkői, Z., König, M., Thiel, H.-J., Gerstberger, R., Kobayashi, S. & Kaneko, T. '*Identification of Sympathetic Premotor Neurons in Medullary Raphe Regions Mediating Fever and Other Thermoregulatory Functions*'. J. Neurosci. **24**, (2004).
38. Martín-Cora, F. , Fornal, C. , Metzler, C. & Jacobs, B. . '*Single-unit responses of serotonergic medullary and pontine raphe neurons to environmental cooling in freely moving cats*'. Neuroscience **98**, 301–309 (2000).

39. Morrison, S. F. '*RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue.*' *Am. J. Physiol.* **276**, R962-73 (1999).
40. Morrison, S. F., Nakamura, K. & Madden, C. J. '*Central control of thermogenesis in mammals.*' *Exp. Physiol.* **93**, 773–97 (2008).
41. Nakamura, K. & Morrison, S. F. '*Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue.*' *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R127–R136 (2006).
42. Nakamura, K., Morrison, S. F., Nakamura, K. & Morrison, S. F. '*Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering.*' *J Physiol* **58914**, 3641–365814 (2011).
43. Palmes, E. D. & Park, C. R. '*The regulation of body temperature during fever.*' *Arch. Environ. Health* **11**, 749–59 (1965).
44. Kerman, I. A., Enquist, L. W., Watson, S. J. & Yates, B. J. '*Brainstem Substrates of Sympatho-Motor Circuitry Identified Using Trans-Synaptic Tracing with Pseudorabies Virus Recombinants.*' *J. Neurosci.* **23**, (2003).
45. Zagon, A. & Bacon, S. J. '*Evidence of a Monosynaptic Pathway Between Cells of the Ventromedial Medulla and the Motoneuron Pool of the Thoracic Spinal Cord in Rat: Electron Microscopic Analysis of Synaptic Contacts.*' *Eur. J. Neurosci.* **3**, 55–65 (1991).
46. Allen, G. V. & Cechetto, D. F. '*Serotonergic and nonserotonergic neurons in the medullary raphe system have axon collateral projections to autonomic and somatic cell groups in the medulla and spinal cord.*' *J. Comp. Neurol.* **350**, 357–366 (1994).
47. Nakamura, K. & Morrison, S. F. '*Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering.*' *J. Physiol.* **589**, 3641–58 (2011).
48. Tanaka, M., McKinley, M. J. & McAllen, R. M. '*Role of an excitatory preoptic-raphé*

- pathway in febrile vasoconstriction of the rat's tail*. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. **305**, (2013).
49. Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H. & Negishi, M. '*Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system.*' J. Comp. Neurol. **421**, 543–69 (2000).
  50. Rothwell, N. J. '*Eicosanoids, thermogenesis and thermoregulation.*' Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids **46**, 1–7 (1992).
  51. Cao, W.-H., Fan, W. & Morrison, S. F. '*Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus*'. Neuroscience **126**, 229–240 (2004).
  52. Morrison, S. F., Sved, A. F. & Passerin, A. M. '*GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue.*' Am. J. Physiol. **276**, R290-7 (1999).
  53. Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V., Shekhar, A. & DiMicco, J. A. '*Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats*'. Brain Res. **928**, 113–125 (2002).
  54. Nakamura, Y., Nakamura, K. & Morrison, S. F. '*Different populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions*'. Neuroscience **161**, 614–620 (2009).
  55. Rathner, J. A., Madden, C. J. & Morrison, S. F. '*Central pathway for spontaneous and prostaglandin E2-evoked cutaneous vasoconstriction.*' Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **295**, R343-54 (2008).
  56. Nakamura, Y., Nakamura, K., Matsumura, K., Kobayashi, S., Kaneko, T. & Morrison, S. F. '*Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus*'. Eur. J. Neurosci. **22**, 3137–3146 (2005).

57. Morrison, S. F. '*Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue*'. *Auton. Neurosci.* **196**, 14–24 (2016).
58. Morrison, S. F. '*Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue*'. *Auton. Neurosci.* **196**, 14–24 (2016).
59. Tóth, I. E., Tóth, D. E., Boldogkoi, Z., Hornyák, Á., Palkovits, M. & Blessing, W. W. '*Serotonin-Synthesizing Neurons in the Rostral Medullary Raphé/Parapyramidal Region Transneuronally Labelled After Injection of Pseudorabies Virus into the Rat Tail*'. *Neurochem. Res.* **31**, 277–286 (2006).
60. Smith, J. E., Jansen, A. S. ., Gilbey, M. P. & Loewy, A. D. '*CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat*'. *Brain Res.* **786**, 153–164 (1998).
61. Blessing, W. W. & Nalivaiko, E. '*Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats.*' *Neuroscience* **105**, 923–9 (2001).
62. Ootsuka, Y., Blessing, W. W. & McAllen, R. M. '*Inhibition of rostral medullary raphé neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries*'. *Neuroscience Letters* **357**, (2004).
63. Zhang, Y. H., Yanase-Fujiwara, M., Hosono, T. & Kanosue, K. '*Warm and cold signals from the preoptic area: which contribute more to the control of shivering in rats?*' *J. Physiol.* 195–202 (1995).
64. Tanaka, M. & McAllen, R. M. '*A subsidiary fever center in the medullary raphe?*' *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1592–R1598 (2005).
65. Tanaka, M., McKinley, M. J. & McAllen, R. M. '*Roles of two preoptic cell groups in tonic and febrile control of rat tail sympathetic fibers*'. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R1248–R1257 (2009).
66. Takase, L. F., Barone, J. R. & Nogueira, M. I. '*Involvement of the caudal raphe nuclei*

- in the feeding behavior of rats*'. Braz J Med Biol Res **33**, (2000).
67. Zaia, C. T. B. ., Gaziri, L. C. ., Zaia, D. A. ., Delattre, E., Dolnikoff, M. S. & Timonaria, C. 'Effect of Chemical Stimulation of the Dorsomedial Hypothalamic Nucleus on Blood Plasma Glucose, Triglycerides and Free Fatty Acids in Rats'. Brain Res. Bull. **42**, 195–198 (1997).
  68. Leal, A. M. O. & Moreira, A. C. 'Food and the circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis'. Brazilian J. Med. Biol. Res. **30**, 1391–1405 (1997).
  69. Fort, P., Luppi, P.-H., Sakai, K., Salvert, D. & Jouvet, M. 'Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: A double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer'. J. Comp. Neurol. **301**, 262–275 (1990).
  70. Nason, M. W. & Mason, P. 'Modulation of Sympathetic and Somatomotor Function by the Ventromedial Medulla'. J. Neurophysiol. **92**, 510–522 (2004).
  71. Zaretsky, D. V., Zaretskaia, M. V. & DiMicco, J. A. 'Stimulation and blockade of GABA<sub>A</sub> receptors in the raphe pallidus: effects on body temperature, heart rate, and blood pressure in conscious rats'. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. **285**, R110–R116 (2003).
  72. Blessing, W. W. & Nalivaiko, E. 'Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats.' Neuroscience **105**, 923–9 (2001).
  73. Tanaka, M., Nagashima, K., McAllen, R. M. & Kanosue, K. 'Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats.' J. Physiol. **540**, 657–64 (2002).
  74. Cao, W. H. & Morrison, S. F. 'Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate.' Brain Res. **980**, 1–10 (2003).
  75. Madden, C. J. & Morrison, S. F. 'Excitatory amino acid receptor activation in the

- raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis.* Neuroscience **122**, 5–15 (2003).
76. Willard, S. S. & Koochekpour, S. '*Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways.*' Int. J. Biol. Sci. **9**, 948–59 (2013).
77. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. & Dingledine, R. '*Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function*'. Pharmacol. Rev. **62**, 405–496 (2010).
78. Salo, L. M., Nalivaiko, E., Anderson, C. R. & McAllen, R. M. '*Control of cardiac rate, contractility, and atrioventricular conduction by medullary raphe neurons in anesthetized rats.*' Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **296**, H318-24 (2009).
79. Cao, W.-H. & Morrison, S. F. '*Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons*'. Neuropharmacology **51**, 426–437 (2006).
80. DiMicco, J. A., Stotz-Potter, E. H., Monroe, A. J. & Morin, S. M. '*Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress.*' Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **23**, 171–6 (1996).
81. Horiuchi, J. '*Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM*'. AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. **287**, R824–R832 (2004).
82. Berthoud, H.-R., Patterson, L. M., Sutton, G. M., Morrison, C. & Zheng, H. '*Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation*'. Histochem. Cell Biol. **123**, 147–156 (2005).
83. Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G. & Kilduff, T. S. '*Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple*

- neuronal systems.*' J. Neurosci. **18**, 9996–10015 (1998).
84. Sellayah, D., Bharaj, P., Sikder, D., Mori, T., Sakurai, T., Kanmura, Y., Kuwaki, T., Bloch, K. D., Peterson, R. T., Sasaoka, T. & al., et. '*Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function.*' Cell Metab. **14**, 478–90 (2011).
85. Luong, L. N. L. & Carrive, P. '*Orexin microinjection in the medullary raphe increases heart rate and arterial pressure but does not reduce tail skin blood flow in the awake rat*'. Neuroscience **202**, 209–217 (2012).
86. Del Vecchio, F. '*Effetti sulle funzioni autonome e sugli stati di veglia e di sonno della manipolazione centrale farmacologica del sistema ipocretinergico nel ratto*'. (2012).
87. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J. & Yanagisawa, M. '*Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.*' Cell **92**, 573–85 (1998).
88. de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M. & Sutcliffe, J. G. '*The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.*' Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**, 322–7 (1998).
89. Tsujino, N. & Sakurai, T. '*Orexin/Hypocretin: A Neuropeptide at the Interface of Sleep, Energy Homeostasis, and Reward System*'. Pharmacol. Rev. **61**, 162–176 (2009).

90. Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M. & Elmquist, J. K. '*Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain.*' J. Comp. Neurol. **435**, 6–25 (2001).
91. Sakurai, T. '*Reverse pharmacology of orexin: from an orphan GPCR to integrative physiology.*' Regul. Pept. **126**, 3–10 (2005).
92. Tsujino, N. & Sakurai, T. '*Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation.*' Front. Behav. Neurosci. **7**, 28 (2013).
93. Kirchgessner, A. L. '*Orexins in the Brain-Gut Axis.*' Endocr. Rev. **23**, 1–15 (2002).
94. Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S. & Yanagisawa, M. '*Input of Orexin/Hypocretin Neurons Revealed by a Genetically Encoded Tracer in Mice.*' Neuron **46**, 297–308 (2005).
95. Yoshida, K., McCormack, S., España, R. A., Crocker, A. & Scammell, T. E. '*Afferents to the orexin neurons of the rat brain.*' J. Comp. Neurol. **494**, 845–61 (2006).
96. Yamanaka, A., Muraki, Y., Tsujino, N., Goto, K. & Sakurai, T. '*Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems.*' Biochem. Biophys. Res. Commun. **303**, 120–9 (2003).
97. Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T. S., Goto, K. & Sakurai, T. '*Serotonergic Regulation of the Orexin/Hypocretin Neurons through the 5-HT1A Receptor.*' J. Neurosci. **24**, 7159–7166 (2004).
98. Xie, X., Crowder, T. L., Yamanaka, A., Morairty, S. R., LeWinter, R. D., Sakurai, T. & Kilduff, T. S. '*GABA<sub>B</sub> receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus.*' J. Physiol. **574**, 399–414 (2006).
99. Matsuki, T., Nomiya, M., Takahira, H., Hirashima, N., Kunita, S., Takahashi, S., Yagami, K. -i., Kilduff, T. S., Bettler, B., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. '*Selective loss*

- of GABAB receptors in orexin-producing neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture*. Proc. Natl. Acad. Sci. **106**, 4459–4464 (2009).
100. Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y. & Tominaga, M. ‘*Orexin Directly Excites Orexin Neurons through Orexin 2 Receptor*’. J. Neurosci. **30**, 12642–12652 (2010).
  101. Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. ‘*Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice*’. Neuron **38**, 701–713 (2003).
  102. Clegg, D. J., Air, E. L., Woods, S. C. & Seeley, R. J. ‘*Eating Elicited by Orexin-A, But Not Melanin-Concentrating Hormone, Is Opioid Mediated*’. Endocrinology **143**, 2995–3000 (2002).
  103. Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K. & Matsukura, S. ‘*A role for ghrelin in the central regulation of feeding.*’ Nature **409**, 194–198 (2001).
  104. Diano, S., Horvath, B., Urbanski, H. F., Sotonyi, P. & Horvath, T. L. ‘*Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets.*’ Endocrinology **144**, 3774–8 (2003).
  105. Leininger, G. M., Opland, D. M., Jo, Y.-H., Faouzi, M., Christensen, L., Cappellucci, L. A., Rhodes, C. J., Gnegy, M. E., Becker, J. B., Pothos, E. N., Seasholtz, A. F., Thompson, R. C. & Myers, M. G. ‘*Leptin Action via Neurotensin Neurons Controls Orexin, the Mesolimbic Dopamine System and Energy Balance*’. Cell Metab. **14**, 313–323 (2011).
  106. Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K. ichi, Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai,

- T. 'Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice.' *Neuron* **38**, 701–13 (2003).
107. Elias, C. F., Saper, C. B., Maratos-Flier, E., Tritos, N. A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J. B., Hoffman, G. E., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Sakurai, T., Yanagisawa, M. & Elmquist, J. K. 'Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area.' *J. Comp. Neurol.* **402**, 442–59 (1998).
108. Dube, M. G., Kalra, S. P. & Kalra, P. S. 'Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action.' *Brain Res.* **842**, 473–7 (1999).
109. Thorpe, A. J., Mullett, M. A., Wang, C. & Kotz, C. M. 'Regional, metabolic, and circadian specificity of lateral hypothalamic orexin A feeding stimulation'. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**, R1409–R1417 (2003).
110. Sweet, D. C., Levine, A. S., Billington, C. J. & Kotz, C. M. 'Feeding response to central orexins.' *Brain Res.* **821**, 535–8 (1999).
111. Schuld, A., Hebebrand, J., Geller, F. & Pollmächer, T. 'Increased body-mass index in patients with narcolepsy'. *Lancet* **355**, 1274–1275 (2000).
112. Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. 'Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity.' *Neuron* **30**, 345–54 (2001).
113. Hara, J., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. 'Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions'. *Neurosci. Lett.* **380**, 239–242 (2005).
114. Perez-Leighton, C. E., Boland, K., Billington, C. J. & Kotz, C. M. 'High and low activity rats: Elevated intrinsic physical activity drives resistance to diet-induced

- obesity in non-bred rats*'. *Obesity* **21**, 353–360 (2013).
115. Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I. & Siegel, J. M. '*Behavioral Correlates of Activity in Identified Hypocretin/Orexin Neurons*'. *Neuron* **46**, 787–798 (2005).
  116. Lee, M. G., Hassani, O. K. & Jones, B. E. '*Discharge of Identified Orexin/Hypocretin Neurons across the Sleep-Waking Cycle*'. *J. Neurosci.* **25**, 6716–6720 (2005).
  117. Takahashi, K., Lin, J.-S. & Sakai, K. '*Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake–sleep states in the mouse*'. *Neuroscience* **153**, 860–870 (2008).
  118. Bourgin, P., Huitrón-Résendiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., Sutcliffe, J. G., Henriksen, S. J. & de Lecea, L. '*Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons.*' *J. Neurosci.* **20**, 7760–5 (2000).
  119. Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. '*Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system.*' *Brain Res.* **873**, 181–7 (2000).
  120. Liu, R.-J., van den Pol, A. N. & Aghajanian, G. K. '*Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions.*' *J. Neurosci.* **22**, 9453–64 (2002).
  121. Eggermann, E., Serafin, M., Bayer, L., Machard, D., Saint-Mleux, B., Jones, B. E. & Mühlethaler, M. '*Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones.*' *Neuroscience* **108**, 177–81 (2001).
  122. Tsunematsu, T., Kilduff, T. S., Boyden, E. S., Takahashi, S., Tominaga, M. & Yamanaka, A. '*Acute Optogenetic Silencing of Orexin/Hypocretin Neurons Induces Slow-Wave Sleep in Mice*'. *J. Neurosci.* **31**, 10529–10539 (2011).
  123. Saper, C. B., Scammell, T. E. & Lu, J. '*Hypothalamic regulation of sleep and*

- circadian rhythms*'. Nature **437**, 1257–1263 (2005).
124. Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. '*Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice*'. Neuron **38**, 701–713 (2003).
  125. Danguir, J. & Nicolaidis, S. '*Dependence of sleep on nutrients' availability*'. Physiol. Behav. **22**, 735–740 (1979).
  126. Sinton, C. M., Fitch, T. E. & Gershenfeld, H. K. '*The effects of leptin on REM sleep and slow wave delta in rats are reversed by food deprivation.*' J. Sleep Res. **8**, 197–203 (1999).
  127. Gallo, M. '*Reversible Inactivation of Brain Circuits in Learning and Memory Research*'. Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging (CRC Press/Taylor & Francis, 2007).
  128. Martin, J. H. & Ghez, C. '*Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement*'. J. Neurosci. Methods **86**, 145–159 (1999).
  129. Ishiwata, T., Hasegawa, H., Yasumatsu, M., Akano, F., Yazawa, T., Otokawa, M. & Aihara, Y. '*The role of preoptic area and anterior hypothalamus and median raphe nucleus on thermoregulatory system in freely moving rats.*' Neurosci. Lett. **306**, 126–8 (2001).
  130. Cerri, M., Mastrotto, M., Tupone, D., Martelli, D., Luppi, M., Perez, E., Zamboni, G. & Amici, R. '*The Inhibition of Neurons in the Central Nervous Pathways for Thermoregulatory Cold Defense Induces a Suspended Animation State in the Rat*'. J. Neurosci. **33**, 2984–2993 (2013).
  131. Magariños, A. M., McEwen, B. S., Saboureau, M. & Pevet, P. '*Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in*

- European hamsters.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**, 18775–80 (2006).
132. Arendt, T., Stielor, J., Strijkstra, A. M., Hut, R. A., Rüdiger, J., Van der Zee, E. A., Harkany, T., Holzer, M. & Härtig, W. ‘*Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals.*’ J. Neurosci. **23**, 6972–81 (2003).
133. Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. ‘*The distribution of tau in the mammalian central nervous system.*’ J. Cell Biol. **101**, 1371–8 (1985).
134. Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y. & Iwatsubo, T. ‘*Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex.*’ Neuroreport **8**, 2797–801 (1997).
135. Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P. & Binder, L. I. ‘*Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells.*’ Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**, 8422–6 (1990).
136. Klein, C., Kramer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R. & Trotter, J. ‘*Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau.*’ J. Neurosci. **22**, 698–707 (2002).
137. Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. & Donlon, T. A. ‘*Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2.*’ Mol. Brain Res. **1**, 271–280 (1986).
138. Goedert, M. & Jakes, R. ‘*Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization.*’ EMBO J. **9**, 4225–30 (1990).
139. Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen,

- K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. ‘*Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17.*’ *Science* **282**, 1914–7 (1998).
140. Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H. E., Schmidt, B., Mieskes, G., Söling, H. D., Drechsel, D. & Kirschner, M. W. ‘*Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup>(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles.*’ *EMBO J.* **9**, 3539–44 (1990).
141. Hirokawa, N., Shiomura, Y. & Okabe, S. ‘*Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules.*’ *J. Cell Biol.* **107**, 1449–59 (1988).
142. Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. ‘*Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration.*’ *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006247 (2012).
143. Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L. & Nunez, J. ‘*Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system.*’ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4378–81 (1992).
144. Noble, W., Pooler, A. M. & Hanger, D. P. ‘*Advances in tau-based drug discovery.*’ *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 797–810 (2011).
145. Hanger, D. P., Seereeram, A. & Noble, W. ‘*Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer’s disease.*’ *Expert Rev. Neurother.* **9**, 1647–1666 (2009).
146. Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A. & Anderton, B. H. ‘*Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis.*’ *J. Biol. Chem.* **282**, 23645–23654 (2007).
147. Wang, Y. & Mandelkow, E. ‘*Tau in physiology and pathology.*’ *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 22–35 (2015).

148. Feinstein, S. C. & Wilson, L. '*Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death*'. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1739**, 268–279 (2005).
149. Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E. & Holzbaur, E. L. F. '*Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau*'. *Science (80-. )*. **319**, 1086–1089 (2008).
150. Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J. & Gross, S. P. '*Multiple-motor based transport and its regulation by Tau*'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 87–92 (2007).
151. Konzack, S., Thies, E., Marx, A., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. '*Swimming against the Tide: Mobility of the Microtubule-Associated Protein Tau in Neurons*'. *J. Neurosci.* **27**, 9916–9927 (2007).
152. Kanaan, N. M., Morfini, G. A., LaPointe, N. E., Pigino, G. F., Patterson, K. R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S. T. & Binder, L. I. '*Pathogenic Forms of Tau Inhibit Kinesin-Dependent Axonal Transport through a Mechanism Involving Activation of Axonal Phosphotransferases*'. *J. Neurosci.* **31**, 9858–9868 (2011).
153. Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K. & Nixon, R. A. '*Axonal Transport Rates In Vivo Are Unaffected by Tau Deletion or Overexpression in Mice*'. *J. Neurosci.* **28**, 1682–1687 (2008).
154. Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White, C. L., Mumby, M. C. & Bloom, G. S. '*Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies.*' *J. Biol. Chem.* **274**, 25490–8 (1999).
155. Li, W., Wang, X. S., Hua Qu, M., Liu, Y. & He, R. Q. '*Human protein tau represses DNA replication in vitro*'. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1726**, 280–286 (2005).

156. Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. '*RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments*'. FEBS Lett. **399**, 344–349 (1996).
157. Lee, G. '*Tau and src family tyrosine kinases*'. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. **1739**, 323–330 (2005).
158. Caceres, A. & Kosik, K. S. '*Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons*'. Nature **343**, 461–463 (1990).
159. Knops, J., Kosik, K. S., Lee, G., Pardee, J. D., Cohen-Gould, L. & McConlogue, L. '*Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes*'. J. Cell Biol. **114**, 725–33 (1991).
160. Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V, Ghoshal, N., Binder, L. I. & Vitek, M. P. '*Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice*'. J. Cell Sci. **114**, 1179–87 (2001).
161. Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. & Hirokawa, N. '*Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein*'. Nature **369**, 488–491 (1994).
162. Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lante, F. & Buisson, A. '*Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers*'. J. Neurosci. **34**, 6084–6097 (2014).
163. Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buee, L. & Galas, M.-C. '*Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection*'. J. Biol. Chem. **286**, 4566–4575 (2011).
164. Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R.,

- Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buee, L. & Galas, M.-C. 'A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions'. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 84 (2014).
165. Crespo-Biel, N., Theunis, C. & Van Leuven, F. 'Protein Tau: Prime Cause of Synaptic and Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease'. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 1–13 (2012).
166. Goedert, M. & Spillantini, M. G. 'Pathogenesis of the Tauopathies'. *J. Mol. Neurosci.* **45**, 425–431 (2011).
167. Shahani, N. & Brandt, R. 'Functions and malfunctions of the tau proteins.' *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1668–80 (2002).
168. Stieler, J. T., Bullmann, T., Kohl, F., Tøien, Ø., Brückner, M. K., Härtig, W., Barnes, B. M. & Arendt, T. 'The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation.' *PLoS One* **6**, e14530 (2011).
169. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. & Binder, L. I. 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4913–7 (1986).
170. Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J. & Crowther, R. A. 'Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms.' *Neuron* **8**, 159–68 (1992).
171. Bielska, A. A. & Zondlo, N. J. 'Hyperphosphorylation of Tau Induces Local Polyproline II Helix<sup>†</sup>'. *Biochemistry* **45**, 5527–5537 (2006).
172. Du, J.-T., Yu, C.-H., Zhou, L.-X., Wu, W.-H., Lei, P., Li, Y., Zhao, Y.-F., Nakanishi, H. & Li, Y.-M. 'Phosphorylation modulates the local conformation and self-aggregation ability of a peptide from the fourth tau microtubule-binding repeat'. *FEBS J.* **274**, 5012–5020 (2007).

173. Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. '*The many faces of tau.*' *Neuron* **70**, 410–26 (2011).
174. Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L.-L., Ashe, K. H. & Liao, D. '*Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration.*' *Neuron* **68**, 1067–1081 (2010).
175. Su, B., Wang, X., Drew, K. L., Perry, G., Smith, M. A. & Zhu, X. '*Physiological regulation of tau phosphorylation during hibernation.*' *J. Neurochem.* **105**, 2098–108 (2008).
176. Lesort, M., Blanchard, C., Yardin, C., Esclaire, F. & Hugon, J. '*Cultured neurons expressing phosphorylated tau are more resistant to apoptosis induced by NMDA or serum deprivation.*' *Brain Res. Mol. Brain Res.* **45**, 127–32 (1997).
177. Chen, Y., Matsushita, M., Nairn, A. C., Damuni, Z., Cai, D., Frerichs, K. U. & Hallenbeck, J. M. '*Mechanisms for increased levels of phosphorylation of elongation factor-2 during hibernation in ground squirrels.*' *Biochemistry* **40**, 11565–70 (2001).
178. Hooper, D. C., Martin, S. M. & Horowitz, J. M. '*Temperature effects on evoked potentials of hippocampal slices from euthermic chipmunks, hamsters and rats.*' *J. Therm. Biol.* **10**, 35–40 (1985).
179. McNaughton, B. L., Shen, J., Rao, G., Foster, T. C. & Barnes, C. A. '*Persistent increase of hippocampal presynaptic axon excitability after repetitive electrical stimulation: dependence on N-methyl-D-aspartate receptor activity, nitric-oxide synthase, and temperature.*' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4830–4 (1994).
180. Arendt, T. & Bullmann, T. '*Neuronal plasticity in hibernation and the proposed role of the microtubule-associated protein tau as a “master switch” regulating synaptic gain in neuronal networks.*' *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R478-

- 89 (2013).
181. 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 (2010).
  182. Paxinos, G. & Watson, C. '*The rat brain in stereotaxic coordinates*'. (Elsevier, 2007).
  183. Blessing, W., Mohammed, M. & Ootsuka, Y. '*Heating and eating: Brown adipose tissue thermogenesis precedes food ingestion as part of the ultradian basic rest–activity cycle in rats*'. *Physiol. Behav.* **105**, 966–974 (2012).
  184. Holm, S. '*Board of the Foundation of the Scandinavian Journal of Statistics A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure*'. *Source Scand. J. Stat. Scand J Stat.* **6**, 65–70 (1979).
  185. Fay, R. M., Johannessen, J. N., Zhang, D. X. & Mayer, D. J. '*Differential uptake of HRP by intact axon terminals versus transected axons: A study on bulbospinal fibers in the dorsolateral funiculus*'. *Neurosci. Lett.* **114**, 141–146 (1990).
  186. Cerri, M. & Morrison, S. F. '*Activation of lateral hypothalamic neurons stimulates brown adipose tissue thermogenesis*'. *Neuroscience* **135**, 627–638 (2005).
  187. Madden, C. J. & Morrison, S. F. '*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 (2008).
  188. Ruf, T. & Geiser, F. '*Daily torpor and hibernation in birds and mammals*'. *Biol. Rev.* **90**, 891–926 (2015).
  189. Al-Fageeh, M. B. & Smales, C. M. '*Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems.*' *Biochem. J.* **397**, 247–259 (2006).

190. Bashir, S., Bashir, H., Shuja Qadri, S. & to, C. '*Heat Shock and the Heat Shock Proteins HEAT SHOCK AND THE HEAT SHOCK PROTEINS: AN OVERVIEW*'. Int. J. Med. Sci. Public Heal. **2**, (2013).
191. Storey, K. B. & Storey, J. M. '*Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation*'. Res. Rep. Biol. **2**, 57–68 (2011).
192. Hernández, F., García-García, E. & Avila, J. '*Microtubule depolymerization and tau phosphorylation*'. J. Alzheimer's Dis. **37**, 507–513 (2013).
193. Alonso, A., Gong, C., Hernandez, F., Garcia-Garcia, E. & Avila, J. '*Microtubule Depolymerization and Tau Phosphorylation Dedicated to Inge Grundke-Iqbal*'. J. Alzheimer's Dis. **37**, 507–513 (2013).
194. von der Ohe, C. G., Darian-Smith, C., Garner, C. C. & Heller, H. C. '*Ubiquitous and Temperature-Dependent Neural Plasticity in Hibernators*'. J. Neurosci. **26**, 10590–10598 (2006).
195. Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N. & Boehm, J. '*Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation*'. J. Biol. Chem. **287**, 32040–53 (2012).
196. Palop, J. J. & Mucke, L. '*Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks*'. Nat. Neurosci. **13**, 812–818 (2010).
197. Palop, J. J. & Mucke, L. '*Epilepsy and Cognitive Impairments in Alzheimer Disease*'. Arch. neurol **66**, 435–440 (2009).