

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

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

Dottorato di Ricerca in Neurofisiologia

XXII ciclo

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: BIO/09

Tesi di Dottorato

**Effetti termoregolatori ed ipnici indotti dalla
stimolazione farmacologica del bulbo
rostroventro mediale nel ratto**

Dott. Domenico Tupone

Coordinatore:
Prof. Claudio Galletti

Tutor:
Prof. Matteo Cerri

Dipartimento di Fisiologia Umana e Generale
Esame finale anno 2010

A mio Padre

INDICE

INDICE	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 5
TERMOREGOLAZIONE	pag. 7
Termoregolazione comportamentale	pag. 8
Termoregolazione non comportamentale	pag. 9
Risposte termoregolatorie evocate	
dall'esposizione ad ambienti freddi	pag. 10
Termogenesi da brivido (shivering)	pag. 10
Termogenesi non dipendente	
dal brivido (not-shivering)	pag. 10
• Termogenesi chimica	pag. 10
<u>Tessuto adiposo bruno (BAT)</u>	pag. 10
<u>Fegato</u>	pag. 11
<u>Muscolo</u>	pag. 11
<u>Cuore</u>	pag. 12
• Regolazione del flusso ematico cutaneo	pag. 12
• Piloerezione	pag. 13
Risposte termoregolatorie evocate	
dall'esposizione ad ambienti caldi	pag. 13
• Regolazione del flusso ematico cutaneo	pag. 13
• Sudorazione	pag. 14
• Polipnea	pag. 14
REGOLAZIONE DELLA VASOMOZIONE CUTANEA	pag. 15
• Sistema Nervoso Autonomo (SNA)	pag. 16
• Afferenze autonome simpatiche	
dirette ai vasi	pag. 17
• Premotoneuroni simpatici	pag. 18
• RVLM	pag. 19
• RVMM	pag. 20

Ruolo termoregolatorio e cardiocircolatorio dei neuroni RVMM e RVLN	pag. 21
Attuale modello di controllo della vasomozione cutanea termoregolatoria	pag. 22
• centri cerebrali responsabili del controllo della vasomozione cutanea	pag. 25
SONNO E TERMOREGOLAZIONE	pag. 26
TORPORE E TERMOREGOLAZIONE	pag. 30
SONNO, TORPORE, TERMOREGOLAZIONE E METABOLISMO	pag. 31
SCOPO	pag. 33
MATERIALI E METODI	pag. 35
INTERVENTO CHIRURGICO	pag. 36
Preparazione elettrodi	pag. 36
Termistori	pag. 37
CHIRURGIA	pag. 38
APPARATO DI REGISTRAZIONE	pag. 40
Box di registrazione	pag. 40
Postazioni di registrazione	pag. 41
Amplificazione e acquisizione del segnale	pag. 41
DISEGNO SPERIMENTALE	pag. 42
MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI	pag. 43
ISTOLOGIA	pag. 43
PIANO SPERIMENTALE	pag. 44
Esperimento A	pag. 44
• Esperimento A1	pag. 44
• Esperimento A2	pag. 44
Esperimento B	pag. 45
• Esperimento B1	pag. 45
• Esperimento B2	pag. 45
Esperimento C	pag. 45

Esperimento D	pag. 45
Analisi delle variabili ipniche	pag. 46
ANALISI STATISTICA	pag. 46
RISULTATI	pag. 47
EFFETTI TERMOREGOLATORI INDOTTI DALLA STIMOLAZIONE FARMACOLOGICA	pag. 48
Esperimento A	pag. 48
• Esperimento A1	pag. 48
• Esperimento A2	pag. 49
Esperimento B	pag. 50
• Esperimento B1	pag. 51
• Esperimento B2	pag. 51
Esperimento C	pag. 52
Esperimento D	pag. 53
ANALISI PARAMETRI IPNICI ED ELETTOENCEFALOGRAFICI	pag. 54
ANALISI VEGLIA	pag. 57
DISCUSSIONE	pag. 59
CONCLUSIONI	pag. 71
FIGURE.....	pag. 73
BIBLIOGRAFIA	pag. 135

INTRODUZIONE

Sia per le cellule (procariote o eucariote) che per gli organismi complessi appartenenti a tutte le classi animali come anche per le piante, sussiste uno stretto legame tra temperatura e attività metabolica. La legge termodinamica di Van't Hoff riassume questa relazione assumendo che al diminuire della temperatura diminuisce la cinetica di una reazione chimica. Quindi tutte le funzioni vitali sono influenzate dalle continue variazioni della temperatura ambientale, che contribuisce a modificare l'attività metabolica di questi organismi. Appare quindi evidente come una maggiore temperatura possa garantire, accelerando processi metabolici, l'aumento dell'efficienza di un organismo.

A tal proposito in tutti gli organismi si sono evoluti diversi sistemi di sopravvivenza a queste escursioni termiche ambientali che vanno dalle modificazioni strutturali delle proteine per i batteri termofili (es. TAQ polimerasi in *Thermus aquaticus*) ai più complessi sistemi di termoregolazione degli esseri superiori. La regolazione della temperatura diventa quindi di fondamentale importanza per poter garantire ed ottimizzare i processi metabolici, che da essa dipendono, e per poter permettere la vita dell'organismo.

Un altro aspetto importante che determina la sopravvivenza di un essere vivente è anche la sua capacità di reperire e saper gestire le risorse energetiche che gli vengono offerte dall'ambiente. A tal riguardo, la capacità di regolare l'attività metabolica in funzione della disponibilità delle risorse alimentari ambientali è stato un grosso vantaggio evolutivo per alcuni organismi. In alcune specie animali questo adattamento si è manifestato con la comparsa di un complesso sistema di controllo della temperatura corporea, che si è dovuto integrare con molti altri sistemi di regolazioni già esistenti, dai meccanismi di controllo dell'attività metabolica, a quelli di controllo del sistema cardiovascolare alla regolazione dell'attività ipnica. La classe di animali nella quale questa integrazione raggiunge la maggior complessità è rappresentata dalla classe dei mammiferi.

TERMOREGOLAZIONE

Si intende per termoregolazione la capacità di mantenere la temperatura nell'intorno di un valore predeterminato per mezzo di effettori che agiscono attuando delle correzioni in senso opposto a quello della deriva dal valore di temperatura di riferimento.

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

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

Tra gli animali si possono distinguere due sotto gruppi: animali poichilotermi e animali omeotermi. I primi adattano la loro temperatura alle condizioni ambientali e il loro corpo, che è generalmente più freddo (35°C), è maggiormente soggetto ad oscillazioni termiche dovute alle variazioni di temperatura ambientale. A questo gruppo appartengono pesci, anfibi e rettili.

Il secondo gruppo, a cui appartengono mammiferi e uccelli, è in grado di regolare in maniera attiva e mantenere la temperatura del proprio corpo costante indipendentemente dalle variazioni ambientali. La loro temperatura corporea oscilla intorno a 37°C.

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

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

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

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

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

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

Termoregolazione comportamentale (pesci, anfibi, rettili, mammiferi e uccelli)

La prima modalità di termoregolazione è detta comportamentale. Questa modalità termoregolaria, considerata anche la più ancestrale, è presente in tutte le classi animali. Si attua come già detto per mezzo di azioni volontarie dell'animale e prevedono diverse strategie in funzione della classe animale e del grado evolutivo degli stessi. Gli animali che sfruttano questo tipo di termoregolazione scelgono in funzione delle condizioni termiche ambientali il

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

Termoregolazione non comportamentale (mammiferi e uccelli)

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

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

Risposte termoregolatorie evocate dall'esposizione ad ambienti freddi

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

Termogenesi da brivido (shivering)

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

Termogenesi non dipendente dal brivido (not-shivering)

- **Termogenesi chimica**

Prevede la produzione di calore per mezzo di reazioni biochimiche esotermiche le quali avvengono in organi che, durante l'evoluzione, hanno acquisito capacità termoregolatorie. I principali organi coinvolti in questi processi termoregolatori sono il tessuto adiposo bruno, il fegato e il muscolo.

Tessuto adiposo bruno

Il tessuto adiposo bruno (BAT), chiamato in passato ghiandola ibernata poiché descritta per la prima volta in animali ibernanti, è un tessuto adiposo reticolare che si differenzia dal tessuto adiposo bianco per la sua caratteristica pigmentazione bruna (visibile ad occhio nudo) data dai carotenoidi presenti a livello mitocondriale. La sua principale funzione è di generare calore, per

questo motivo la sua localizzazione anatomica appare essere strategica nell'assolvere questo compito, poiché esso è sempre localizzato in prossimità di vasi sanguigni, a cui cede calore affinché venga trasportato con il flusso ematico alle zone periferiche del corpo. I maggiori depositi di BAT sono a livello interscapolare, periaortico e perirenale.

Questo tessuto è presente in quasi tutti i mammiferi (specialmente roditori) compreso l'uomo (figura 1) (Saito et al., 2009), anche se in quantità maggiore in età neonatale e in animali con un elevato rapporto superficie volume.

L'attività termogenetica (produzione di calore) che esso svolge è garantita dalla presenza di una particolare proteina mitocondriale: UCP1.

Questa proteina localizzata a livello della membrana mitocondriale ha la caratteristica di disaccoppiare la fosforilazione ossidativa favorendo quindi la produzione di calore a discapito della formazione di molecole di ATP (Cannon and Nedergaard, 2004). L'attivazione delle funzioni svolta da questo tessuto è garantita in primo luogo da una diretta connessione che ogni sua cellula riceve dal sistema nervoso centrale per mezzo di fibre provenienti dai gangli della colonna simpatica. Quindi il rilascio di noradrenalina ed il legame di questa a livello dei recettori β_3 determina un'attivazione di meccanismi a secondo messaggero che in ultima analisi innescano sia la produzione di calore che la sintesi di proteine UCP1 ed allo stesso tempo determinano il trofismo per questo tessuto. L'attivazione è altresì garantita da meccanismi endocrini come il rilascio di T3 e T4 dalla tiroide.

Fegato

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

Muscolo

Come già detto sopra, il muscolo è in grado di produrre calore attraverso il brivido ma recentemente sono state trovate isoforme della proteina UCP1

all'interno delle sue cellule che lasciano supporre un suo ruolo termogenetico di origine metabolica. Inoltre, nel muscolo degli uccelli l'espressione di una isoforma della proteina UCP1 la avUCP sembrerebbe essere direttamente correlata con l'abbassamento della temperatura (Collin et al., 2003). Resta comunque ancora da chiarire un possibile ruolo del muscolo nella termogenesi metabolica (Dulloo et al., 2001).

Cuore

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

• **Regolazione del flusso ematico cutaneo**

Il calore prodotto dagli organi termogenetici, ma anche quello derivante dai normali processi biochimici, richiede un sistema di trasporto efficiente che ne garantisca la diffusione in tutto il corpo ma che allo stesso tempo ne assicuri la conservazione o l'eventuale dispersione. Questo ruolo viene svolto dal sistema cardiovascolare.

A tal fine, la branca del sistema nervoso autonomo deputata alla termoregolazione si è dovuta integrare con la componente autonoma, più antica, deputata alla regolazione della funzione cardiovascolare. In quest'ottica e in circostanze adeguate, le esigenze termoregatorie possono prendere il sopravvento su quelle circolatorie, trasferendosi così il controllo di alcune componenti del sistema cardiovascolare ai centri deputati al controllo della temperatura corporea.

I centri termoregolatori possono agire a due livelli sul sistemacardio circolatorio: modificando la frequenza cardiaca e modificando il lume capillare. L'aumento della frequenza cardiaca a la duplice funzione di garantire la perfusione degli organi termogenetici (BAT) assicurandone un maggior apporto di ossigeno durante periodi di intensa attività ed inoltre di

aumentare il trasporto di calore, che questi organi producono, in tutti i distretti anatomici. Le variazioni del lume capillare invece garantiscono un aumento (vasodilatazione) o una diminuzione (vasocostrizione) del flusso ematico cutaneo periferico che rispettivamente permettono una maggiore dispersione o una maggiore conservazione del calore corporeo.

L'esposizione ad ambienti freddi causerà quindi vasocostrizione a livello cutaneo per conservare calore e contemporaneamente un aumento della frequenza cardiaca con conseguente aumento del trasporto di calore proveniente dagli organi termogenetici.

- **Piloerezione**

Negli animali coperti da pelliccia la piloerezione (sollevamento dei peli) ottenuta grazie alla contrazione dei muscoli erettori del pelo contribuisce alla conservazione del calore corporeo attraverso la formazione di un cuscino di aria, tra la cute calda e l'ambiente freddo, che funziona da isolante termico.

Risposte termoregolatorie evocate dall'esposizione ad ambienti caldi

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

- **Regolazione del flusso ematico cutaneo**

La regolazione del flusso ematico è di fondamentale importanza anche durante l'esposizione in ambienti caldi. In queste condizioni l'aumento del flusso capillare cutaneo ai distretti periferici del corpo e la sospensione dei processi metabolici termogenetici contribuiscono alla dispersione ed alla riduzione della produzione di calore. In queste circostanze anche la frequenza

cardiaca diminuisce in risposta ad una minore richiesta di ossigeno da parte degli organi termogenetici.

- **Sudorazione**

La sudorazione è un processo che permette la termodispersione sfruttando l'evaporazione dei liquidi. L'organo interessato in questa funzione termoregolatoria è la ghiandola sudoripara. Queste ghiandole sono localizzate su tutta la superficie corporea nell'uomo con una distribuzione maggiore a livello delle mani e dei piedi. La presenza di tale ghiandola è stata riscontrata solo in pochi altri mammiferi come il cammello o l'antilope (Bicego et al., 2007) ed in altri si riscontra la presenza di queste ghiandole solo in alcuni distretti anatomici come le zampe (cane).

- **Polipnea**

La polipnea è un aumento non patologico della frequenza degli atti respiratori che si verifica normalmente durante uno sforzo fisico quando in seguito all'aumento dei processi metabolici è richiesta una maggiore quantità di ossigeno. Tuttavia i sistemi termoregolatori hanno fatto anche dell'apparato respiratorio un suo organo termodispersivo permettendo un aumento del ritmo respiratorio anche in condizioni di riposo al solo scopo di favorire la dispersione di calore per evaporazione dei liquidi contenuti sulle mucose polmonari e buccali. Questo tipo di controllo termoregolatorio è presente solo in alcuni mammiferi ed è accentuato e intenso in quelli che per particolari caratteristiche anatomiche hanno particolare difficoltà a termoregolare in ambienti caldi (Es. cani con il muso corto).

Fra i meccanismi precedentemente elencati, appare di particolare interesse la regolazione della vasomozione cutanea, per la sua capacità di agire sia in funzione termoconservante che termodissipante e per la particolare integrazione che i sistemi di controllo termoregolatori devono raggiungere con i sistemi di controllo

cardiovascolari, nel garantire una funzionalità termoregolatoria che non comprometta la funzione cardiovascolare.

REGOLAZIONE DELLA VASOMOZIONE CUTANEA

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

Tutta la superficie cutanea del corpo è coinvolta nella regolazione termica data dalla vasomozione, tuttavia si possono delimitare alcuni distretti anatomici che possiedono spiccate caratteristiche termoregolarie. Questi distretti anatomici prendono il nome di scambiatori di calore. Ne sono un esempio, la coda e le zampe nel ratto e l'orecchio nel coniglio e nel gatto. La caratteristica di questi organi scambiatori è quella di possedere al tempo stesso un elevato rapporto superficie volume, un esteso letto vascolare capillare ed una superficie glabra. Il letto capillare presente in questi distretti è caratterizzato dall'aver numerose anastomosi artero/venose (AVA), (figura 2) cioè vasi che mettono in comunicazione, a livello precapillare, le arteriole con le venule. La parete delle AVA è costituita da tessuto muscolare liscio che come per gli sfinteri dei capillari è sotto il diretto controllo del sistema nervoso simpatico. Il loro lume varia tra i 10 e 50 μm ed hanno la capacità di obliterarsi, sotto il controllo simpatico, ostruendo quindi il passaggio del sangue.

Il ruolo che gli AVA hanno nella vasomozione cutanea non è ancora ben definito, tuttavia si ritiene che negli organi termoregolatori al fine di disperdere calore si abbia una riduzione del tono muscolare di questi vasi con un conseguente maggiore afflusso di sangue a questi a discapito del letto capillare, invece la riduzione della disperzione termica è il risultato di una chiusura del flusso ematico nelle AVA. (Gordon, 1990).

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

- **Sistema Nervoso Autonomo (SNA)**

Il SNA è suddiviso dal punto di vista anatomico e funzionale in sistema nervoso simpatico e parasimpatico.

Dal punto di vista funzionale, questi due sistemi prendono contatto con diversi organi nel corpo e contribuiscono bilanciandosi autonomamente al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo così come è stata in passato definito da Cannon. Le loro regolazioni sugli organi bersaglio avvengono grazie al rilascio di neurotrasmettitori che si legano a recettori specifici posti sugli stessi organi. I principali neurotrasmettitori rilasciati sono la noradrenalina per il SNA simpatico e l'acetilcolina per il SNA parasimpatico che si legano rispettivamente ai recettori adrenergici e colinergici.

Dal punto di vista anatomico il SNA si differenzia principalmente per la posizione dei suoi gangli nervosi. Gli assoni dei motoneuroni o neuroni pregangliari (colinergici) del sistema parasimpatico originano dal midollo spinale a livello cervicale e sacrale e prendono contatto all'interno dei gangli nervosi, che sono posti direttamente nell'organo bersaglio, con i neuroni post gangliari colinergici mentre gli assoni dei motoneuroni o neuroni pregangliari

simpatici (colinergici) emergono dal midollo spinale toracolombare a livello delle corna laterali e prendono contatto nei gangli, posti distanti dagli organi bersaglio, con i neuroni postgangliari adrenergici.

Tutti gli organi sono innervati sia dal sistema simpatico sia dal parasimpatico, i quali contribuiscono all'attivazione o all'inibizione delle attività che loro compiono, ad eccezione delle ghiandole sudoripare, della muscolatura liscia dei vasi ematici e del tessuto adiposo bruno che invece sono innervati soltanto dal SNA simpatico.

- **Afferenze autonome simpatiche dirette ai vasi**

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

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

- **Premotoneuroni simpatici.**

I neuroni che sinaptano direttamente con i neuroni motori simpatici localizzati nella IML, sono detti premotoneuroni. La principale caratteristica di questi neuroni è quella di essere il punto di convoglio di tutte le informazioni inibitorie ed eccitatorie che provengono da diversi nuclei cerebrali o da recettori periferici e che quindi si traducono in una attivazione od inibizione dei processi che questi neuroni controllano (es. vasomozione). Questi neuroni possono essere di tipo inibitorio o eccitatorio in funzione del neurotrasmettitore che viene prodotto e rilasciato dalle sue sinapsi.

Studi anatomici condotti mediante l'utilizzo di marcatori virali retrogradi (*pseudo-rabies virus*) hanno portato all'identificazione di nuclei ed aree nervose in cui sono accolti aggregati di premotoneuroni che assolvono alla medesima funzione. Questa tecnica consiste nell'iniettare in tessuto o in una area nervosa un virus retrogrado, cioè in grado di risalire gli assoni e trasferirsi transinapticamente da un neurone all'altro, e poi determinare il percorso che esso ha compiuto risalendo il SNC e permettendo infine la visualizzazione delle aree nervose coinvolte nel controllo delle aree poste sotto esame.

Questo approccio sperimentale ha permesso la localizzazione di diverse aree cerebrali contenenti premotoneuroni, coinvolti nella termoregolazione e nella vasomozione cutanea, le quali sono maggiormente localizzate a livello del tronco encefalico: nel bulbo nel ponte e nelle aree ipotalamiche.

Per quanto concerne il controllo del sistema cardiocircolatorio e quindi di conseguenza la vasomozione cutanea sono state localizzate nel ratto cinque specifiche aree contenenti premotoneuroni: il midollo rostro-ventro mediale (RVMM), il midollo rostro-ventro laterale (RVLM), i nuclei del raphe caudale, i neuroni A5 noradrenergici del ponte e nuclei paraventricolari ipotalamici (PVN).

La maggiorparte degli studi condotti sul sistema cardio circolatorio sono stati concentrati sulla comprensione funzionale del RVMM e RVLM.

- **RVLM**

Il loro principale ruolo è quello di regolare la pressione arteriosa ed assolvono a questa funzione sinaptando direttamente con i neuroni pregangliari a livello della IML, per mezzo dei quali esercita un controllo diretto su i letti vascolari di tutto il corpo. La dimostrazione del loro coinvolgimento nel controllo pressorio deriva da studi effettuati principalmente sul gatto, sul ratto e sul coniglio, dove la distruzione di queste aree o la inibizione delle stesse produce un repentino calo della pressione arteriosa (Dampney, 1994). Al contrario l'attivazione di questi neuroni ottenuta per mezzo di antagonisti GABAergici (bicucullina) produce un incremento della pressione arteriosa conseguenza di una massiccia vasocostrizione in tutti i letti vascolari. L'incremento di pressione ottenuto in seguito alla somministrazione di antagonisti gabaergici, nell'animale in anestesia (Dampney et al., 1988) suggerisce anche la presenza di un controllo di tipo tonico inibitorio, afferente a questi neuroni.

Oltre alle afferenze di tipo discendente, esistono proiezioni ascendenti che derivano da questi neuroni che nella maggior parte dei casi raggiungono aree troncoencefaliche e diencefaliche come la sostanza grigia periacqueduttale (PAG) l'ipotalamo laterale (LH) e nucleo parabrachiale (PBN). Le proiezioni ascendenti sembrano avere il ruolo di comunicare lo stato di attivazione del tono vascolare ai centri superiori. Il RVMM è inoltre considerato il centro integratore delle funzioni cardiovascolari in quanto esso riceve afferenze sia dalla periferia del corpo che dai centri nervosi superiori determinando quindi le regolazioni da effettuare a livello vascolare.

Le principali afferenze a quest'area provengono da: PAG, LH, PVN, nucleo del tratto solitario (NTS), caudal ventrolateral medulla (CVML), nuclei generatori del ritmo respiratorio e piccole proiezioni dai nuclei del raphe.

I principali recettori presenti su questi neuroni sono per: il glutammato, il GABA, l'acetilcolina, gli oppiacei, le catecolammine, la serotonina (5-HT) e l'angiotensina.

Considerando il particolare coinvolgimento di questi nuclei nel controllo della vasomozione ai fini della regolazione della pressione è facile immaginare un possibile loro coinvolgimento anche nel controllo della vasomozione finalizzato a scopi di tipo termoregolatorio. Tuttavia studi condotti da diversi autori mostrano come questi neuroni contribuiscano scarsamente al controllo di organi termoeffettori come il BAT o la vasomozione negli scambiatori di calore (coda ratto) (McAllen et al., 1982, McAllen, 1986, Morrison, 1999, Nakamura et al., 2005).

- **RVMM**

Diverse evidenze sperimentali hanno fatto del RVMM il nodo di afferenza di tutti i segnali termoregolatori. In particolare studi anatomici condotti mediante l'iniezione di pseudorabies virus in organi specificatamente termoregolatori come: BAT (Fig. 3) (Cano et al., 2003), vasi ematici degli scambiatori termici (coda ratto; Fig. 4) (Blessing and Nalivaiko, 2001, Toth et al., 2006), cuore (Standish et al., 1995, Ter Horst et al., 1996) e muscolo (Kerman et al., 2006) sono tutti risultati nella una marcatura a livello del RVMM.

Si intende per RVMM un area cerebrale sita sopra il tratto piramidale che comprende: il *raphe obscurus*, il *raphe magno*, il *raphe pallidus* ed il nucleo olivare inferiore

In questa area sono quindi contenuti i premotoneuroni autonomici simpatici diretti ai neuroni pregangliari che controllano diversi effettori termoregolatori.

Le principali funzioni svolte da questi neuroni sono nel controllo dell'attivazione del BAT, nella vasomozione cutanea, nella termogenesi da brivido attraverso l'attivazione delle fibre motorie alfa dirette ai muscoli e nel controllo della frequenza cardiaca. Questi neuroni sono ricchi di recettori per il glutammato, il GABA e la serotonina. Tuttavia sono presenti numerosi altri recettori tra i quali recettori per l'orexina, per l'istamina e per l' α MSH. Inoltre si è riscontrata la presenza di recettori EP3 localizzati sulle cellule serotoninergiche. Questi ultimi sono particolarmente abbondanti nella regione

preottica ipotalamica e legano in maniera specifica il mediatore infiammatorio prostaglandina E2 (PGE2). Il legame di questo mediatore a livello ipotalamico determina il rialzo termico nella risposta di tipo febbrile come evidenziato da incrementi di temperatura in seguito ad iniezioni di PGE2 nella regione preottica (Stitt, 1973, Williams et al., 1977). Ad oggi non si conosce il significato funzionale dei recettori EP3 a livello del RVMM. L'iniezione di PGE2 in questo sito non ha determinato nessuna variazione apprezzabile delle variabili fisiologiche misurate: pressione arteriosa, frequenza cardiaca, temperatura corporea e vasodilatazione cutanea (Tanaka and McAllen, 2005). Si ipotizza che questi recettori svolgano funzioni legate alla sensazione dolorifica durante gli stati febbrili ed infiammatori.

Svariati studi anatomici volti alla caratterizzazione dei neuroni del RVMM hanno riscontrato la presenza in essi del marcatore specifico dei neuroni glutamatergici: VGLUT3. La presenza di questo marcatore indica che questi neuroni sono di tipo glutamatergico ed inoltre lasciano supporre che le risposte termoregolatorie da essi mediate e dirette alla IML siano di tipo eccitatorio (McAllen et al., 1982, McAllen, 1986, Morrison, 1999, Nakamura et al., 2005). Tuttavia studi effettuati da Stornetta (Stornetta et al., 2005) hanno mostrato una maggiore complessità anatomica in quest'area. Infatti è stato dimostrato che i premotoneuroni del RVMM diretti alla IML coesprimono glutammato, GABA e serotonina. Questo studio inoltre, per la prima volta mostra un'afferenza dal RVMM alla IML di tipo inibitorio.

Ruolo termoregolatorio e cardiocircolatorio dei neuroni RVMM e RVLM

I neuroni della RVMM contribuiscono enormemente nella regolazione della temperatura corporea. Durante l'esposizione ad ambienti freddi la loro attività eccitatoria diretta alla IML determina l'attivazione dei processi termogenetici svolti principalmente dal BAT (Morrison, 2003) e probabilmente dal brivido muscolare (Tanaka et al., 2006, Brown et al., 2008). Inoltre, permettono nelle medesime condizioni ambientali la vasocostrizione dei letti vascolari cutanei (Smith et al., 1998, Blessing et al., 1999, Blessing and

Nalivaiko, 2001, Tanaka et al., 2002, Nakamura et al., 2004, Ootsuka and Blessing, 2005, Toth et al., 2006) al fine di ridurre la dispersione di calore ed un incremento della frequenza cardiaca al fine di garantire sia una maggiore richiesta di ossigeno a livello degli organi termogenetici che una maggiore trasporto di calore nei vari distretti anatomici. Al contrario l'esposizione ad ambienti caldi causa una riduzione dell'attività di questi neuroni che determina la sospensione delle attività termogenetiche, una riduzione della frequenza cardiaca (Nakamura and Morrison, 2007) e la vasodilatazione dei letti vascolari cutanei (Ootsuka et al., 2004, Morrison and Nakamura, 2010).

Il controllo a livello cardiocircolatorio a cui questi neuroni assolvono viene svolto indipendentemente dal controllo cardiocircolatorio svolto dai premotoneuroni localizzati nella RVLM. Questi ultimi contribuiscono fortemente al mantenimento della pressione arteriosa ed alla perfusione di tutto il corpo, agendo sia a livello cardiaco che a livello dei vasi senza contribuire in maniera significativa alle funzioni termoregolatorie (McAllen et al., 1982, McAllen, 1986, Morrison, 1999, Nakamura et al., 2005). Tuttavia in particolari condizioni, considerate estreme, è possibile immaginare un potenziale conflitto funzionale nel controllo cardiocircolatorio tra i neuroni del RVMM e quelli del RVLM. Questo si verifica quando è richiesta una maggiore perfusione agli organi (vasocostrizione) e la necessità nello stesso istante di ridurre la temperatura corporea (vasodilatazione).

Attuale modello di controllo della vasomozione cutanea termoregolatoria

La temperatura corporea negli animali omeotermi viene mantenuta ad un valore costante che oscilla tra i 37 e i 37,5°C. Al fine di mantenere questa temperatura costante in funzione delle modificazioni sia ambientali che fisiologiche (aumento della temperatura corporea causata per esempio da esercizio fisico), l'organismo deve essere in grado di misurare sia le modificazioni termiche ambientali che quelle interne all'organismo per poi attuare risposte termoregolatorie mirate, al fine di ristabilire la giusta temperatura corporea.

Il modello attuale di controllo della temperatura e quindi anche della vasomozione cutanea è riassunto nella figura 5. Si può dividere il circuito termoregulatorio in due componenti principali:

1. via termocettrice
 - somatosensoriale
 - termoregolatoria
2. via termoeffettrice

La via termocettrice ha il compito di raccogliere le informazioni inerenti la temperatura corporea e quindi inviare tali informazioni ai centri termoregolatori superiori somatosensoriali o termoregolatori autonomici (area preottica ipotalamica (POA)).

Tutte le informazioni termiche vengono raccolte dai recettori termici i quali sono in grado di percepire la temperatura per mezzo di proteine canale appartenenti alla famiglia delle transient receptor potential (TRP). In particolare due isoforme delle TRP sono coinvolte nella percezione di stimoli freddi e caldi, rispettivamente le TRPM8 e le TRPV1 2 3.

La localizzazione dei recettori termici è alquanto ubiquitaria, tuttavia si possono distinguere tre principali aree anatomiche maggiormente implicate nella raccolta delle informazioni termiche e sono: la cute, le viscere ed il cervello.

La termoccezione a livello cutaneo è molto importante in quanto è la prima superficie in grado di comunicare le informazioni termiche provenienti dall'ambiente circostante ed è quindi in grado di dare inizio ad una serie di compensazioni termiche anticipatorie sia per gli stimoli caldi che per quelli freddi. Questo comportamento è stato messo in evidenza da studi effettuati nel ratto (Lomax et al., 1964) nel gatto (Forster and Ferguson, 1952) e nel cane (Hellstrom and Hammel, 1967), nei quali una esposizione a basse temperature produceva una rapida diminuzione della temperatura della cute non seguita da una diminuzione della temperatura rettale, anzi si assisteva ad un leggero aumento di quest'ultima. Anche per quanto concerne l'esposizione al caldo si ha una risposta di tipo anticipatoria guidata dalle afferenze cutanee (Nakamura and Morrison, 2010). Le

informazioni termiche ricevute dai termocettori cutanei vengono convogliate attraverso fibre somatosensoriali nelle corna dorsali spinali ai neuroni della lamina I e da qui questi raggiungono, attraverso il tratto spino-talamo-corticale, la corteccia primaria somatosensoriale determinando quindi la sensazione termica (Craig, 2002).

Le stesse informazioni termiche percepite a livello cutaneo vengono, contemporaneamente trasmesse attraverso una via glutammatergica al nucleo laterale parabrachiale mesencefalico (LPBel) e da questi alla POA, considerato il più alto centro integratore termoregolatorio, attraverso una diretta proiezione glutammatergica diretta in particolare all'area mediana della preottica (MnPO). Questa rappresenta un centro di regolazione di svariate funzioni omeostatiche, che includono la spesa energetica, l'osmolarità e il tono cardiovascolare così come il controllo della temperatura corporea (Morrison et al., 2008).

Molti recettori termici per il caldo e per il freddo sono presenti anche nei visceri e le loro fibre afferenti corrono all'interno del nervo vago e splanchnico. Attualmente poco si conosce riguardo a come queste informazioni raggiungano la POA. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato che molti stimoli provenienti dai visceri come temperatura, sazietà, tensione gastrica, sete, gusto, e pressione arteriosa vengono trasferiti al LPB nella sua regione dorsale e caudale attraverso il NTS (Saper, 2002). È possibile quindi ipotizzare che il LPB sia il sito di integrazione degli stimoli termici somatici con le svariate informazioni viscerali che infine afferiscono nella POA (Morrison and Nakamura, 2010).

Per quanto concerne la sensibilità termica nell'encefalo, sono stati descritti molte popolazioni neuronali in grado di generare potenziali d'azione in risposta a stimoli termici. Tra queste popolazioni la più studiata, è localizzata nella POA a livello ipotalamico. Studi elettrofisiologici per primi condotti da Nakayama (Nakayama et al., 1963), hanno mostrato l'esistenza di neuroni in quest'area che risultavano essere attivi durante l'esposizione dell'animale in un ambiente termoneutrale e che aumentavano la loro scarica in risposta ad un riscaldamento locale. Questi neuroni vengono chiamati neuroni sensibili al caldo (WSN) e sono localizzati nell'area prottica mediale (MPO). Essi sono in grado di integrare tutte

le informazioni termiche provenienti dalla periferia con quelle raccolte in loco e quindi generare di conseguenza delle risposte termoregolarie. Da qui prende origine quella che può essere definita la via termoeffettrice.

I WSN ricevono per mezzo della MnPO due principali afferenze dalla cute un'eccitatoria che proviene dalle vie attivate da stimoli caldi che quindi contribuisce all'attivazione di questi neuroni e l'altra inibitoria che invece proviene dalle vie attivate da stimoli freddi (Nakamura and Morrison, 2010). A sua volta la funzione del MPO è quella di inibire le regioni caudali del cervello, come l'ipotalamo dorso mediale (DMH) e il RVMM incluso il nucleo del Raphe Pallidus, responsabili dell'attivazione delle risposte termogenetiche. Tutte le risposte termoregolarie dipenderanno quindi dall'attività svolte dai neuroni WSN o del DMH sui premotoneuroni a livello delle RVMM.

Questi infine hanno proiezioni eccitatorie sui neuroni pregangliari della IML i quali, attraverso l'attivazione dei neuroni postgangliari determinano in ultima analisi l'attivazione degli effettori termici, determinando l'attivazione o la sospensione delle attività termogenetiche o termodispersive (figura 5).

- **Centri cerebrali responsabili del controllo della vasomozione cutanea**

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

La stimolazione elettrica 10 μ A nel RVMM (in particolare entro 0,5 mm dalla superficie ventrale midollare) nel ratto in condizioni di anestesia generale ed con una temperatura corporea di 39-40°C produce una riduzione del flusso ematico alla coda da 28 ± 5 a 6 ± 1 cm/s ($P < 0,01$) per tutta la durata della stimolazione, senza effetti prominenti sulla pressione arteriosa (figura 6).

Inoltre, si ottiene una riduzione del flusso ematico alla coda in seguito all'iniezione dell'antagonista dei recettori GABA-A (bicucullina methiodide) nelle medesime condizioni di temperatura centrale (figura 7). Questi risultati dimostrano che l'esposizione al caldo produce un aumento del flusso ematico alla coda dato da un'inibizione diretta della POA alla RVMM, che viene rimossa in seguito a stimoli elettrici e iniezione di farmaci in grado di rimuovere l'inibizione. Inoltre questo studio suggerisce la presenza di una via eccitatoria diretta ai neuroni pregangliari che controllano la vasomozione cutanea (Blessing and Nalivaiko, 2001).

Un altro studio condotto dal gruppo di lavoro di DiMicco (Zaretsky et al., 2003) nel ratto libero di muoversi, ha misurato gli effetti sulla temperatura centrale dell'inibizione del RVMM, inseguito ad iniezioni crescenti di un inibitore dei recettori GABA-A (muscimolo). I risultati mostrano una riduzione della temperatura centrale che è dose dipendente. Questo studio non permette di comprendere quale sia la causa principale della diminuzione della temperatura, cioè se esse dipenda da una riduzione delle attività termogenetiche (disattivazione BAT) o da un'aumentata termodispersione (vasodilatazione), ma consente di affermare che il RVMM è un'area fondamentale nel controllo dei processi termoregolatori. Inoltre, essendo la riduzione della temperatura corporea la diretta conseguenza dell'inibizione del RVMM risultante in una sospensione delle attività termoregatorie a carico degli organi termoeffettori, si può affermare ancora una volta, per quanto concerne i processi termoregolatori, che quest'area invia proiezioni eccitatorie alla IML.

SONNO E TERMOREGOLAZIONE

Come precedentemente sottolineato, la comparsa nei mammiferi di una termoregolazione autonoma, guidata dal sistema nervoso vegetativo, ha condotto alla necessaria integrazione di tale sistema con i preesistenti sistemi regolatori. Fra

questi, una chiara e importante relazione è stata identificata fra le aree centrali sottese al controllo termoregolatorio e quelle coinvolte nella regolazione del ciclo veglia-sonno. Nei mammiferi, il ciclo veglia-sonno si compone normalmente di tre stati: la veglia, il sonno NREM e il sonno REM. Il sonno NREM è uno stato caratterizzato da una riduzione di tutte le funzioni autonome e da un tracciato EEG caratterizzato da onde ampie e lente. Il sonno REM, viceversa, è caratterizzato da una estrema instabilità autonoma e da un tracciato EEG in cui prevalgono onde veloci e di bassa ampiezza.

La relazione tra sonno e termoregolazione è stata evidenziata da numerosi studi condotti sia sull'uomo che su diversi animali.

La comparsa del sonno NREM è sempre accompagnata da una riduzione dei processi metabolici, che sono evidenziati da una riduzione dell'attività cardiaca concomitante ad una diminuzione della temperatura corporea centrale e ad un aumento della temperatura cutanea, segno quest'ultimo di una vasodilatazione periferica che favorirebbe la riduzione della temperatura corporea stessa. In particolare la riduzione dell'attività metabolica sembra essere mediata da un controllo di tipo termoregolatorio che anticipa la comparsa del sonno. La riduzione dei processi metabolici sembra quindi essere il requisito necessario alla creazione di un substrato fisiologico funzionale favorente l'ingresso in uno stato di sonno. Inoltre l'aumento della temperatura ambientale entro un rango di temperature che non differiscono molto dalla termoneutralità favoriscono l'ingresso in sonno NREM.

La relazione più forte tra termoregolazione e sonno è stata riscontrata durante la fase REM. Durante questa fase la termoregolazione assume un diverso aspetto funzionale e l'animale perde il controllo omeostatico della temperatura così come viene inteso durante la veglia e il sonno NREM. In particolare è stato messo in evidenza dal professor Parmeggiani (Parmeggiani, 2003) che, durante la fase di sonno REM, scomparivano nell'animale particolari comportamenti termoregolatori, come la piloerezione ed il brivido o la polipnea, comportamenti che invece risultavano essere attivi durante la veglia ed il sonno NREM. Inoltre, ulteriori analisi hanno messo in evidenza durante questa fase di sonno un

comportamento paradossale della vasomozione cutanea che produce vasocostrizione cutanea in animali esposti al caldo e una vasodilatazione cutanea in quelli esposti al freddo. Comportamenti vasomotori che sono contrari alla logica di termodispersione o termoconservazione dettate normalmente dal carico termico ambientale a cui gli animali vengono esposti. Responsabile dell'alterazione della funzionalità termoregolatoria sembra essere l'area preottica ipotalamica. Quest'area come descritto precedentemente accoglie una popolazione di neuroni sensibili alla temperatura, che risultano però perdere questa caratteristica durante la fase REM (Parmeggiani and Franzini, 1971, Glotzbach and Heller, 1976). Studi condotti sul gatto hanno dimostrato che il riscaldamento e il raffreddamento di quest'area nel gatto durante la fase REM non producono nessuna risposta termoregolatoria al contrario di quanto avviene durante la veglia e durante il sonno NREM.

Inoltre, l'esposizione di animali (ratto) a carichi termici ambientali freddi al di sotto del rango di termoneutralità risultano in una riduzione di circa 80% della quantità di sonno REM normalmente espressa in queste specie (Cerri et al., 2005).

La variabile più usata per discriminare gli stati del ciclo veglia-sonno è l'attività EEG, che registra l'attività elettrica della corteccia. L'animale addormentato presenta un quadro comportamentale caratterizzato da uno stato di quiescenza, una ridotta risposta agli stimoli esterni e l'assunzione di una postura che è specie specifica (Zeppelin et al., 2005).

Per quanto riguarda l'EEG, si possono riscontrare, almeno nei mammiferi, tre fasi che sono: la veglia caratterizzata da onde rapide di voltaggio ridotto, il sonno non-REM (NREM) con fusi (7-14 Hz) onde lente di tipo delta (1-4 Hz) e il sonno REM con desincronizzazione EEG e una potente attività nella banda theta (5-7 Hz) causata dall'attivazione della corteccia dell'ippocampo (Mancia, 1996).

Nei mammiferi, si può parlare di cicli veglia-sonno in quanto solo in questa classe, è possibile riconoscere in maniera distinta l'alternanza di fasi del sonno identificate in maniera abbastanza chiara sia dall'EEG che dal comportamento. Oltre la veglia attiva (AW) si possono riconoscere: veglia quieta

(QW) caratterizzata da desincronizzazione EEG, tono muscolare attivo e stabilità delle funzioni autonome; sonno NREM con sincronizzazione EEG, tono muscolare ridotto e stabilità delle funzioni autonome; sonno REM con desincronizzazione EEG, atonia muscolare, twitches mioclonici e instabilità delle funzioni autonome (Parmeggiani, 2003).

La quantità di sonno giornaliera, ma anche la durata e la frequenza delle fasi di sonno variano nei vari ordini di questa classe. Esiste una relazione di proporzionalità inversa tra peso corporeo e quantità media di sonno giornaliero infatti animali di piccola taglia come il pipistrello o l'opossum dormono in media 18-20 ore al giorno al contrario di giraffe ed elefanti che dormono in media 3-4 ore al giorno. Al peso corporeo è correlata anche la durata del ciclo di sonno che risulta essere, ad esempio, di circa 8 minuti nel toporagno e raggiunge 1,8 ore negli elefanti. (Siegel, 2005). La relazione di proporzionalità inversa che esiste tra la quantità di sonno e la massa dell'animale rafforza l'idea che in qualche modo il processo sonno sia correlato al controllo della spesa energetica (Amici et al., 2008).

Il sonno si correla positivamente con il risparmio energetico sia per via indiretta che diretta. Nel primo caso la sola riduzione dell'attività che si osserva nel corso di una fase di sonno produce una riduzione della spesa metabolica. Nel secondo caso invece il processo sonno sembra direttamente influenzare i centri di controllo termoregolatori determinando quindi una riduzione attiva della spesa metabolica, alla sua comparsa. Tuttavia in questo secondo caso non sappiamo se sia il processo sonno o quello termoregolatorio ad agire per primo nella riduzione della spesa energetica.

Tutti questi dati nell'insieme, rafforzano il legame che intercorre tra sonno e termoregolazione.

TORPORE E TERMOREGOLAZIONE

In particolari condizioni ambientali come freddo estremo e scarsità di cibo ci si trova nella condizione di non poter attuare la termoregolazione per mancanza di risorse energetiche essenziali per il funzionamento degli organi termogenetici. Esistono comunque in natura alcuni mammiferi che hanno evoluto sistemi per adattarsi a queste condizioni estreme. In particolare questi riescono per un certo periodo a ridurre drasticamente le loro funzioni metaboliche e quindi restano inattivi fin quando le condizioni ambientali non permettono loro un ritorno alle normali attività. Lo stato in cui questi animali entrano viene definito torpore.

Gli animali che esprimono il torpore possiedono generalmente una piccola massa (10g - 1Kg) ed hanno un alto rapporto superficie volume che risulta sfavorevole ai fini termoregolatori in quanto è causa di una aumentata termodispersione. Questi, durante tale periodo esprimono un comportamento simile a quello che si osserva durante uno stato di sonno ma con caratteristiche elettroencefalografiche e fisiologiche che appaiono diverse dal normale sonno. La loro temperatura corporea risulta essere ridotta a livelli molto al di sotto del valore eutermico, con alcune specie che raggiungono temperature appena al di sopra del punto di congelamento dell'acqua (*Hibernating Ground Squirrel* 2-3°C).

L'analisi elettroencefalografia mostra che l'ingresso in torpore è rappresentato principalmente da segnali ad onde lente caratteristiche del sonno NREM mentre al diminuire della temperatura si osserva prima una completa scomparsa del sonno REM e poi ad ulteriori riduzioni della temperatura corporea (<25°C) una riduzione progressiva delle attività cerebrali che diventano impossibili da registrare al di sotto di temperature di 10°C. Inoltre analisi spettrali condotti comparando l'EEG precedente e durante una fase di torpidità mostrano durante la fase di torpore uno spostamento delle bande di frequenza, caratteristiche del sonno, in posizioni differenti. In particolare, la banda di frequenza theta (5-7 Hz) caratteristica del sonno REM determinata dalla scarica dei neuroni ipocampali, si localizza progressivamente a frequenze più basse (3-4 Hz) al diminuire della temperatura corporea.

Il periodo di torpidezza è sospeso ad intervalli regolari da periodi di veglia della durata di circa 24h. Si ipotizza che queste fasi di risveglio siano fondamentali per permettere all'organismo lo smaltimento dei cataboliti che si accumulano durante il torpore e per il ripristino dei valori fisiologici ematici come pH e sali minerali.

Ad oggi poco si conosce riguardo al ruolo che i centri termoregolatori svolgono durante questo stato o nel garantire la sua comparsa. Sembrerebbe che i centri termoregolatori siano inattivi durante questo stato ma in alcune specie (Hibernating ground squirrels) sembra invece che essi funzionino attivamente al fine di mantenere la temperatura appena al di sopra del punto di congelamento dell'acqua.

Attualmente non si conosce molto riguardo alle regolazioni nervose che controllano questo meccanismo, ma di certo questo evento sembra coinvolgere sia i sistemi ipnici che quelli termoregolatori che sono ambedue in grado di interagire con i processi metabolici (Krauchi and Deboer, 2010).

SONNO, TORPORE, TERMOREGOLAZIONE E METABOLISMO

Sia il sonno che il torpore sembrano avere un legame stretto con la riduzione della temperatura e quindi con la riduzione del metabolismo. Inoltre, la diminuzione della temperatura corporea sembra un requisito importante per dare inizio ad una fase di sonno. Ancora, la termoregolazione sembra essere differentemente funzionante durante alcune fasi del Sonno (REM). Queste considerazioni lasciano supporre che esista una stretta relazione tra sonno, torpore e termoregolazione al fine di controllare la spesa energetica e quindi si può ipotizzare che i circuiti nervosi di controllo termoregolatorio siano coinvolti nel determinare o nel regolare questi stati comportamentali oppure che gli stati comportamentali influenzino il sistema termoregolatorio al fine di ridurre la spesa energetica.

SCOPO

Gli obiettivi principali di questo studio sono due:

- 1) esplorare estensivamente il RVMM, un'area che è ritenuta essere l'ultimo centro di controllo termoregolatorio che direttamente controlla gli organi termoeffettori e termodispersivi
- 2) analizzare gli effetti prodotti sul comportamento ipnico dalla stimolazione farmacologica di quest'area.
- 3) Analizzare gli effetti vasomotori inducibili dalla manipolazione farmacologica del RVMM su diversi letti vascolari

Il primo punto mira ad espander quanto rinvenuto da molti studi condotti da altri autori, che si sono concentrati su una ristretta area del RVMM sita nel bulbo tra i tratti piramidali al medesimo livello coronale del nucleo del settimo nervo cranico. Inoltre, la maggior parte di questi esperimenti è stata in passato condotta su animali mantenuti in anestesia generale. Quindi gli effetti indotti in questi preparati dalla stimolazione farmacologica di quest'area potrebbero essere falsati dal protocollo anestesiológico. A tal proposito abbiamo provveduto in questo studio ad un'estesa mappatura funzionale del RVMM che si estende dalla sua porzione più rostrale al livello del nucleo del settimo nervo cranico faciale (RVMM(fn)) alla sua porzione caudale sita a livello dei nuclei olivari inferiori (RVMM(io)). Tutti gli esperimenti sono stati condotti su animali liberi di muoversi al fine di escludere ogni eventuale alterazione funzionale data dal protocollo anestesiológico.

L'uso di un modello animale libero di muoversi ha permesso, per la prima volta, di esplorare gli effetti della stimolazione farmacologica di queste aree sul ciclo veglia sonno ed analizzare quindi le relazioni che intercorrono tra modificazione della temperatura corporea indotta centralmente e modificazione dei parametri elettroencefalografici.

La rilevazione della temperatura cutanea è stata registrata mediante una telecamera in grado di registrare la radiazione infrarossa. Questo ha permesso di avere una misura diretta della temperatura di tutta la superficie corporea dell'animale rispetto ai metodi convenzionali di misura della temperatura (termistori e termocoppie) che invece offrono solo una misura puntiforme della temperatura.

MATERIALI
E
METODI

Sono stati utilizzati complessivamente 33 ratti albi adulti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River) di peso compreso tra i 250g e i 300g al momento dell'acquisto.

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

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

INTRVENTO CHIRURGICO

Preparazione elettrodi

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

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

Gli elettrodi ECG sono stati costruiti con dei cavi di acciaio inox, (mod. AS 632, Cooner Wire Inc., Chatsworth (CA), USA) rivestiti da una guaina isolante di polietilene, uno della lunghezza di 4 cm ed uno della lunghezza di 14cm ai quali è stata rimossa la guaina isolante alle estremità. La porzione terminale del cavo più lungo è stata piegata per formare un'ansa che ne permettesse l'ancoraggio al processo xifoideo durante le operazioni chirurgiche.

I due cavi sono infine stati fissati ad un connettore femmina a due pin mediante una saldatura con stagno.

Termistori

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

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

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

CHIRURGIA

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

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

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

Nella zona addominale, lungo il seno che si forma tra la parete addominale e la zampa posteriore è stato praticato un taglio di circa 2 cm della cute e del sottocute per esporre l'arteria femorale la quale è stata scollata dal tessuto connettivo circostante alla vena femorale che corre adesa ad essa. Quindi attraverso delle forbici vascolari è stato praticato un foro nell'arteria nel quale è stato inserito il catetere della PA fino a risalire nell'aorta addominale. In fine il microtrasmettitore telemetrico collegato al catetere è stato alloggiato e fissato sottocute nella parete addominale (figura 8).

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

Per l'impianto degli elettrodi per la registrazione dell'elettrocardiogramma sono stati praticati due tagli uno a livello toracico appena sopra il processo xifoideo uno all'apice dello sterno (figura 8) ed uno a livello del cranio. A questo punto per mezzo di un passacavi i fili dell'elettrodo sono stati fatti passare sottocute a partire dal cranio fino alla zona toracica. L'estremità libera del filo più

corto è stata inserita nella cavità mediastinica ed è stato ancorato ai muscoli sternocleidomastoideo mentre l'ansa del filo più lungo è stata fissata sul processo xifoideo. A causa di problemi tecnici, la registrazione della pressione arteriosa non è stata effettuabile negli animali del gruppo A2. In questo gruppo la frequenza cardiaca è stata ricavata dall'attività elettrocardiografica, sulla base dell'intervallo intercorrente fra due onde R. Per tutti gli altri animali il calcolo della frequenza cardiaca è stato ottenuto dai dati di pressione arteriosa.

L'animale è stato quindi posto su un apparecchio stereotassico (barrette ferma muso 3,8mm) e dopo aver rimosso il periostio sono stati praticati nel seguente ordine: quattro fori (diametro 0.5mm) alla periferia del campo operatorio che sono serviti per l'alloggiamento delle viti di ancoraggio del castelletto, un foro (diametro 0.5) adiacente al bregma per l'inserimento del termistore ipotalamico, due fori (diametro 0.3mm) uno sull'osso frontale (-3mm Antero Posteriore (AP) 2mm Latero Laterale (LL) dal bregma) ed uno sull'osso parietale (4mm AP, 2mm LL dal bregma) per l'inserimento rispettivamente dell'elettrodo di riferimento ed esplorante dell'EEG e un foro sull'osso occipitale per l'impianto di una cannula guida per microiniezioni nel RVMM. La cannula è stata posta tra 2mm e 3.3 mm AP 0mm LL 9.5 DV (figura 9)

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

Tutti i connettori sono stati infine fissati sul cranio con una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal a freddo)

Al termine delle procedure chirurgiche si è proceduto alla disinfezione delle ferite addominali con betadine (Betadine 10% gel Meda Pharma Milano) per uso chirurgico, alla somministrazione intramuscolare di antibiotico ad ampio

spettro (37500 U.I. di Diaminocillina; 8750 U.I. di streptomicina solfato) per prevenire eventuali infezioni post operatorie e alla somministrazione sottocutanea di 5ml di soluzione fisiologica allo scopo di reidratare l'animale. Infine l'animale è stato tenuto sotto osservazione fino alla comparsa dei primi segni di ripresa dall'anestesia generale e quindi è stato posto nello stabulario per una settimana consentendogli di recuperare dall'intervento chirurgico. Due giorni prima della sessione sperimentale ogni animale è stato posto nel box di registrazione e connesso ai cavi per la registrazione delle variabili fisiologiche al fine di consentirne l'adattamento alle condizioni sperimentali.

APPARATO DI REGISTRAZIONE

Box di registrazione

La gabbia contenente l'animale è posta all'interno di un congelatore a pozzetto che è stato modificato in modo da poterne controllare in maniera fine la temperatura. Questo controllo avviene per mezzo di un termostato che è connesso al compressore del congelatore ed a una stufetta posta all'interno di quest'ultimo. Quando la temperatura devia da quella settata dall'operatore il termostato attiva il compressore o la stufetta (Vortice Microsol 600) per correggere la variazione di temperatura. Il box è inoltre dotato di un impianto: di aerazione, di illuminazione per mezzo di fibre ottiche (100 lux a livello della gabbia), telemetrico per la registrazione della pressione arteriosa dell'animale, video che permette lo studio comportamentale dell'animale, termografico per il monitoraggio della temperatura cutanea dell'animale e di cavi di connessione per la registrazione delle variabili fisiologiche. Le luci sono controllate da un timer regolato con accensione alle 9:00 del mattino con un ciclo 12h luce/12h buio

Postazioni di registrazione

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

La gabbia possiede inoltre un braccio oscillante dotato di contatto rotante al quale vengono collegati i cavi di registrazione delle variabili fisiologiche connessi all'animale.

Amplificazione e acquisizione del segnale

Tutti i segnali bioelettrici registrati dall'animale sono stati amplificati (Grass mod. 7P511L, Astro-Med, West Warwick (RI), USA) e filtrati, rispettivamente per il filtro passa alto e passa basso, con i seguenti valori per ciascuna variabile: EEG 0.3 Hz / 30 Hz, ECG 30 Hz / 2000 Hz, e Thy 0.5 Hz.

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

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

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

Le immagini della termocamera sono state acquisite mediante supporto digitale con una frequenza di 1frame/s. L'analisi della temperatura cutanea di coda e zampe è stata ottenuta mediante un software appositamente sviluppato in ambiente Labview (LabView, National Instruments, Austin (Tx), USA). L'analisi delle temperature si riferisce al valore più alto all'interno di una superficie presa in esame. Per l'analisi delle temperature della coda è stata scelta la zona mediale di quest'ultima in seguito a test eseguiti nell'animale in anestesia. La analisi della coda è stata effettuata dividendola in tre aree rispettivamente prossimale, mediale e distale (figura 10) per vedere se la variazione di temperatura in risposta ad una microiniezione nel RVMM avesse lo stesso effetto su tutto l'organo. In condizioni di controllo la zona prossimale risulta essere più calda che quella mediale e distale (+1.6°C) ma in seguito ad iniezione di muscimolo nel RVMM nell'animale in anestesia si ottiene negli stessi tempi una vasodilatazione della coda la quale si attesta per la sua interezza alla stessa temperatura massima. In seguito a questo test al fine di analizzare meglio gli effetti indotti dalla stimolazione farmacologica è stata scelta per l'analisi il tratto di coda mediale che è sottoposto meno a variazioni spontanee di temperatura.

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

DISEGNO SPERIMENTALE

Nella giornata sperimentale, dopo due giorni di adattamento nel box di registrazione, all'inizio del periodo di luce (9:00) gli animali sono stati registrati per due ore (periodo di controllo) al termine delle quali è stata inserita la microcannula interna per l'iniezione dei farmaci. La microiniezione è stata effettuata dopo 30 minuti dall'introduzione della cannula per consentire il ritorno delle variabili fisiologiche ai valori di controllo dopo la manipolazione dell'animale. In tutte le sessioni sperimentali è stato concesso all'animale un

giorno di recupero tra un'iniezione e l'altra. Le iniezioni dei diversi farmaci sono state opportunamente bilanciate.

MICROINIEZIONI IN RATTI LIBERI DI MUOVERSI

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

ISTOLOGIA

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

Successivamente gli animali sono stati sottoposti ad anestesia generale e quindi perfusi per via transcardiaca con 400 ml di PBS 4% a pH 7.4 e 400 ml di paraformaldeide 4%. I cervelli sono stati estratti dall'animale, postfissati in

paraformaldeide 4% per cinque giorni e crioprotetti in saccarosio (soluzione satura) per due giorni. Infine per mezzo di un criostato si è proceduto al taglio di sezioni coronali del bulbo per rintracciare il sito di iniezione del colorante. Le sezioni che sono risultate essere marcate, sono state poste su un vetrino e fotografate.

Nella figura 11 sono mostrati i siti di iniezioni per ogni esperimento del piano sperimentale.

PIANO SPERIMENTALE

Esperimento A

Questo esperimento è stato condotto allo scopo di determinare il contributo dei neuroni RVMM(io) RVMM(fn) sul controllo vasomotorio di coda e zampe, nel ratto libero di muoversi.

- **Esperimento A1**

4 ratti sono stati iniettati, nel RVMM(fn), con 100nl di:

- a) bicucullina methiodide (1mM) a Ta 32°C;
- b) muscimolo (1mM) a Ta 24°C;
- c) salina isotonica (0.9%) Ta 24°C.

- **Esperimento A2**

6 ratti sono stati iniettati, nel RVMM(io) ed alla Ta di 24°C, con 100nl di:

- a) bicucullina methiodide (1mM);
- b) muscimolo (1mM);
- c) salina isotonica (0.9%).

Gli esperimenti B,C e D sono stati messi a punto in seguito ai risultati ottenuti nell'esperimento A.

Esperimento B

L'esperimento B è stato eseguito per determinare l'influenza dei neuroni RVMM(io) nel controllo della vasodilatazione di coda e zampe indotta dall'esposizione dell'animale a alta Ta. L'esperimento è stato condotto su animali liberi di muoversi.

- **Esperimento B1**

4 ratti sono stati iniettati, nel RVMM(io), con 100nl di:

- a) GABA-zina (0,5mM) a Ta 24°C;
- b) GABA-zina (0,5mM) a Ta 32°C.

- **Esperimento B2**

4 ratti sono stati iniettati, nel RVMM(io), con 100nl di:

- a) Bicuculline methiodide (1mM) a Ta 24°C;
- b) Muscimolo (1mM) a Ta 32°C.

Esperimento C

L'esperimento C è stato necessario per determinare se l'attivazione dei neuroni RVMM(io) producesse vasodilatazione anche in animali esposti a basse Ta, condizione in cui la coda e le zampe sono massimamente vasocostrette. L'esperimento è stato condotto su animali liberi di muoversi.

4 ratti sono stati iniettati, nel RVMM(io) con 100nl di Bicuculline methiodide (1mM) a Ta 10°C

Esperimento D

L'esperimento D è stato effettuato per osservare gli effetti vasomotori prodotti dalla disinibizione dei neuroni RVMM(io) e RVMM(fn) nell'animale sottoposto ad anestesia generale.

4 ratti sono stati iniettati, in condizioni di anestesia generale e con il monitoraggio continuo della temperatura rettale (Tr), con 60nl di:

- a) Bicuculline methiodide (0,5 mM) in RVMM(io) con Tr sotto i 37.5 °C;
- b) Bicuculline methiodide (0,5 mM) in RVMM(fn) con Tr sopra ai 38.5°C.

Analisi delle variabili ipniche

Su 11 ratti iniettati nel RVMM(io) e RVMM(fn) con 100nl di muscimolo (1mM) alla Ta di 24°C sono state eseguite analisi sulle modificazioni del comportamento ipnico che si verifica durante lo stato ipotermico indotto dalla somministrazione di questo farmaco.

ANALISI STATISTICA

Al fine di determinare statisticamente gli effetti indotti dall'iniezione dei farmaci nei diversi esperimenti eseguiti, per ogni variabile fisiologica sono stati presi i valori medi nei dieci minuti precedenti il momento dell'iniezione e sono stati confrontati con i valori medi presi all'interno di una finestra di un minuto nell'intorno del punto di massima variazione post iniezione della variabile esaminata (Finestra di 1min = 30s pre 30s post massima variazione). Le variabili relative al comportamento ipnico dell'animale sono state analizzate confrontando la loro media nei 120 minuti precedenti l'iniezione con la media nei 60 minuti successivi ad essa.

Per analizzare statisticamente gli effetti indotti dall'iniezione di salina, sono stati confrontati i valori medi dei 10min precedenti l'iniezione di salina, con i periodi postiniezione di salina corrispondenti all'arco temporale dei picchi ottenuti con l'iniezione di muscimolo e bicucullina.

Tutte le comparazioni sono state fatte utilizzando il test non parametrico di Friedman (SPSS 9,0 SPSS inc. Chicago, IL, USA) e sono stati considerati significativi i valori con $P < 0,05$.

RISULTATI

EFFETTI TERMOREGOLATORI INDOTTI DALLA STIMOLAZIONE FARMACOLOGICA.

Esperimento A

Esperimento A1.

Ruolo dei neuroni del RVMM(fn) nel controllo della vasomozione cutanea nel ratto libero di muoversi.

La figura 12 mostra un esempio degli effetti registrati in un animale a seguito dell'iniezione nel RVMM(fn) di bicucullina, muscimolo e salina.

Come mostrato nella figura 12, l'iniezione di bicucullina nel RVMM(fn) a Ta di 32°C produce una diminuzione della temperatura di zampe e coda ed un aumento della temperatura ipotalamica e della pressione arteriosa mentre non si apprezza una variazione della frequenza cardiaca.

La somministrazione di muscimolo nel RVMM(fn) a Ta di 24°C causa un aumento della temperatura di zampe e coda accompagnate da profonda diminuzione della temperatura ipotalamica. Non si osservano variazioni della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa.

La somministrazione di salina non produce nessun effetto a carico di tutte e variabili esaminate.

La figura 13 mostra un esempio su un animale, degli effetti vasomotori di zampa e coda evocati dalla somministrazione rispettivamente di bicucullina muscimolo e salina nella RVMM(fn), registrati mediante termografia infrarossa.

La figura 14 mostra l'analisi statistica, sull'intero gruppo di animali trattati (N = 4), degli effetti indotti da ciascuna somministrazione farmacologica.

L'iniezione di bicucullina alla Ta di 32°C causa una diminuzione significativa della Tzampe (da $37.3 \pm 0.94^{\circ}\text{C}$ a $34.3 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$, $P < 0.05$) e della Tcoda (da $37.1 \pm 1.33^{\circ}\text{C}$ a $34.7 \pm 1.30^{\circ}\text{C}$, $P < 0.05$) e un aumento significativo della Thy (da $37.68 \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ a $38.30 \pm 0.40^{\circ}\text{C}$, $P < 0.05$) e della

PA (da 118 ± 4 mmHg a 136 ± 3 mmHg, $P < 0.05$) ma nessuna variazione significativa della FC (da 338 ± 34 bpm a 332 ± 28 bpm).

L'iniezione di muscimolo alla Ta di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ causa invece un aumento significativo della Tzampe (da $29.7 \pm 1.3^\circ\text{C}$ a $35.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$, $P < 0.05$) e della Tcoda (da $27.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ a $34.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$, $P < 0.05$) e una diminuzione significativa della Thy (da $37.2 \pm 0.46^\circ\text{C}$ a $35.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $P < 0.05$).

Non si osservano variazioni significative della FC (da 379 ± 32 bpm a 422 ± 43 bpm) e della PA (da 134 ± 11 mmHg a 143 ± 10 mmHg).

L'iniezione di salina alla Ta di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ non mostra alcuna variazione significativa delle variabili fisiologiche.

Esperimento A2

Ruolo dei neuroni del RVMM(io) nel controllo della vasomozione cutanea nel ratto libero di muoversi.

La figura 15 mostra un esempio degli effetti registrati in un animale a seguito dell'iniezione nel RVMM(io) di bicucullina, muscimolo e salina a Ta 24°C . A causa di problemi tecnici non è stato possibile ottenere misurazioni della pressione arteriosa.

L'iniezione di muscimolo produce, un incremento della temperatura di zampe e coda accompagnate da una profonda ipotermia come dimostrato dalla diminuzione della temperatura ipotalamica. Raggiunto in nadir della temperatura di code e zampe si osserva una diminuzione di queste che segue la dinamica di diminuzione della temperatura ipotalamica. Non si osserva un aumento della frequenza cardiaca a seguito della somministrazione del farmaco. Un incremento della frequenza si osserva al termine dell'effetto del muscimolo coincidente anche con la ripresa della temperatura ipotalamica.

L'iniezione di bicucullina nella medesima area, causa paradossalmente anch'essa un aumento della temperatura di zampe e coda che si accompagnano ad un concomitante aumento della temperatura ipotalamica e della frequenza cardiaca.

La somministrazione di salina non produce nessun effetto a carico di tutte e variabili esaminate.

La figura 16 mostra un esempio su un animale, degli effetti vasomotori di zampa e coda evocati dalla somministrazione rispettivamente di bicucullina muscimolo e salina nella RVMM(io), registrati mediante termografia infrarossa.

La figura 17 mostra l'analisi statistica, sull'intero gruppo di animali trattati (N = 6), degli effetti indotti da ciascuna somministrazione farmacologica.

L'iniezione di muscimolo a 24°C produce un aumento significativo della Tzampe (da 28.2±1.7 °C a 34.6±2.1 °C, $P<0.05$) e della Tcoda (da 26.9±1.53 °C a 34.0±0.71 °C, $P<0.05$) accompagnata da un diminuzione delle Thy (da 37.12±0.40 °C a 34.62±0.71 °C, $P<0.05$). Nessun effetto significativo è stato riscontrato a carico delle FC.

L'iniezione di bicucullina ha prodotto un incremento della Tzampe (da 30.7±2.74 °C a 35.2±0.9 °C, $P<0.05$) e Tcoda (da 27.5±1.5 °C a 34.0±0.5 °C, $P<0.05$) concomitante con un aumento della Thy (da 37.10±0.09 °C a 37.44±0.07 °C, $P<0.05$) e della FC (da 317±33 bpm a 403±36 bpm, $P<0.05$).

Non si sono osservate variazioni significative delle variabili esaminate in seguito alla somministrazione di salina.

Esperimento B

Ruolo dei neuroni RVMM(io) nel controllo della vasodilatazione di coda e zampe indotta dall'esposizione dell'animale a alta Ta.

L'esperimento A2 rivela la presenza di un potenziale nucleo di neuroni vasodilatatori che sono tonicamente inibiti da un'afferenza di tipo GABAergica. Se questa popolazione di neuroni è coinvolta nel controllo termoregulatorio che determina la vasodilatazione cutanea in seguito ad esposizione ad alte temperature ambientali (32°C), è logico aspettarsi che un'inibizione di questa popolazione di neuroni causi una riduzione della temperatura cutanea (vasocostrizione) durante l'esposizione ad alte Ta. Gli esperimenti B1 e B2 sono stati messi a punto per dimostrare se questa popolazione di neuroni avesse un ruolo di tipo termoregulatorio.

Esperimento B1

Disinibizione dei neuroni RVMM(io).

Come mostrato nella figura 18 esemplificativa, l'iniezione di GABAzina (antagonista GABA_A) nel RVMM(io) a 24°C produce, come già mostrato in seguito alla somministrazione di bicucullina, un aumento della temperatura di zampe e coda concomitanti con l'aumento delle temperatura ipotalamica della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa.

L'iniezione dello stesso farmaco a Ta di 32°C, condizione in cui l'animale è già massimamente vasodilatato, non produce nessun ulteriore aumento della temperatura delle zampe e della coda mentre si ottengono comunque aumenti della temperatura ipotalamica della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa.

La figura 19 mostra l'analisi statistica, sull'intero gruppo di animali trattati (N = 4), degli effetti indotti da ciascuna somministrazione farmacologica.

L'iniezione di Gabazina a Ta 24°C produce un aumento significativo della Tz (da 33.8±0.74 °C a 36.2±0.9 °C, $P<0.05$) e della Tc (da 29.3±0.9 °C a 35.1±1.1 °C, $P<0.05$) concomitante con un aumento significativo della Thy (da 36.34±0.14 °C a 36.97±0.17 °C, $P<0.05$), del FC (da 343±16 bpm a 383±16 bpm, $P<0.05$) e della PA (da 112±6 mm Hg a 154±7 mmHg, $P<0.05$). L'iniezione del farmaco alla Ta di 32°C non produce nessun variazione significativa a carico della Tz e della Tc, mentre un aumento significativo si osserva per la Thy (da 37.53±0.17 °C a 38.15±0.24 °C, $P<0.05$), per la FC (da 345±26 bpm a 361±23 bpm, $P<0.05$) e per la PA (da 118±14 mm Hg a 156±11 mm Hg, $P<0.05$).

Esperimento B2

Inibizione dei neuroni RVMM(io).

L'esperimento B2 è stato eseguito per testare se la vasodilatazione cutanea evocata dall'esposizione al caldo poteva essere mediata dall'attivazione dei neuroni del RVMM(io).

La figura 20 mostra un esempio degli effetti registrati in un animale a seguito dell'iniezione nel RVMM(io) di bicucullina a Ta 24°C e di muscimolo a Ta 32°C.

Come mostrato in figura 20 l'iniezione di bicucullina a Ta 24°C produce, come già mostrato negli esperimenti A2 e B1, un aumento della temperatura delle zampe e della coda accompagnate da un concomitante aumento della temperatura ipotalamica, della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa.

La somministrazione di muscimolo a Ta 32°C non produce nessuna modificazione della temperatura delle zampe e della coda. Si osservano in seguito all'iniezione di muscimolo una diminuzione della temperatura ipotalamica e nessuna variazione della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa.

La figura 21 mostra l'analisi statistica, sull'intero gruppo di animali trattati (N = 4), degli effetti indotti da ciascuna somministrazione farmacologica.

L'iniezione di bicucullina a Ta di 24°C produce un aumento significativo della Tz (da 31.2±1.6 °C a 35.5±0.6 °C, $P<0.05$) e della Tc (da 26.8±0.2 °C a 34.9±0.4 °C, $P<0.05$) ed un concomitante aumento significativo della Thy (da 36.50±0.26 °C a 36.93±0.21 °C, $P<0.05$), della FC (da 328±54 bpm a 386±55 bpm, $P<0.05$) e della PA (da 116±9 mm Hg a 132±10 mm Hg, $P<0.05$).

L'iniezione di muscimolo a Ta 32°C non ha prodotto variazioni significative della Tz, delle Ta, della FC e della PA, ma si è osservata un diminuzione significativa della Thy (da 38.21±0.25 °C a 37.41±0.35 °C, $P<0.05$).

Esperimento C

Effetti della disinibizione dei neuroni RVMM(io) a Ta 10°C

Questo esperimento è stato condotto per determinare gli effetti indotti dalla disinibizione dei neuroni RVMM(io) durante l'esposizione a basse temperature ambientali, una condizione in cui i neuroni vasocostrittori

RVMM(fn) sono massimamente attivati per garantire la massima vasocostrizione cutanea e la minima dispersione di calore.

La figura 22 mostra a sinistra un esempio degli effetti registrati in un animale a seguito dell'iniezione nel RVMM(io) di bicucullina a Ta 10°C e a destra l'analisi statistica ottenuta sull'intero gruppo di animali trattati (N = 4).

Come mostrato in figura 22 la somministrazione di bicucullina a Ta 10°C, condizione nel quale l'animale è massimamente vaso costretto a livello cutaneo, produce un aumento della Tz (da 18.7±3.0 °C a 30.7±3.2 °C, P<0.05) e della Tc (da 17.4±2.5 °C a 25.8±2.2 °C, P<0.05) accompagnata da un iniziale aumento della Thy che inverte immediatamente la sua direzione diminuendo in maniera significativa (da 36.51±0.32°C a 35.90±0.10 °C, P<0.05). La bicucullina produce anche una diminuzione significativa della FC (da 468±61 bpm a 384±42 bpm, P<0.05) ed un aumento significativo della PA (da 144±9 mm Hg a 169±6 mm Hg, P<0.05).

Esperimento D

Effetti della disinibizione del RVMM(io) e (fn) nell'animale sottoposto ad anestesia generale.

Molti esperimenti condotti da altri autori sono stati compiuti in preparati sperimentali mantenuti in una condizione di anestesia generale. Al fine di poter paragonare gli effetti ottenuti con il nostro preparato sperimentale libero di muoversi con i dati pubblicati da altri autori, si è resa necessaria la messa appunto di un esperimento che esplorasse gli effetti vasomotori della disinibizione del RVMM rostrale e caudale nell'animale sottoposto ad anestesia generale.

La figura 23 mostra, in alto a sinistra, un esempio degli effetti vasomotori cutanei della coda, nell'animale sottoposto ad anestesia generale, ottenuti in seguito alla somministrazione bicucullina nel RVMM(io) con temperatura rettale (Tret) sotto 37.5°C e nel RVMM(fn) con Tret sopra 38°C. In alto a destra è riportata l'analisi statistica ottenuta sull'intero gruppo di animali

trattati (N = 4). Come mostrato in figura 23 l'iniezione di bicucullina nel RVMM(io) in una condizione in cui la coda risulta essere vasocostretta produce un incremento significativo della Tc (da 29.1 ± 0.06 °C a 33.5 ± 0.23 °C, $P < 0.05$) riconducibile ad una vasodilatazione. Dopo il riscaldamento dell'animale (Tret sopra 38.5°C) condizione in cui la coda risulta essere vasodilatata, l'iniezione di bicucullina nel RVMM(fn) produce una diminuzione significativa della Tc (da 29.1 ± 0.06 °C a 33.5 ± 0.23 °C, $P < 0.05$) consistente con una vasocostrizione.

ANALISI PARAMETRI IPNICI ED ELETTROENCEFALOGRAFICI

Gli effetti prodotti dall'inibizione dei neuroni contenuti nel RVMM, sia RVMM(fn) che RVMM(io), sono stati analizzati anche dal punto di vista ipnico ed elettroencefalografico. Non emergendo differenze fra gli effetti inibitori prodotti dall'inibizione dei neuroni nel RVMM(fn) rispetto agli effetti prodotti dall'inibizione di RVMM(io), i due gruppi sono stati trattati come uno unico ai fini delle successive analisi. Le quantità di sonno sono espresse come percentuale di stato per epoche di 300 secondi.

La figura 24, in alto, mostra un esempio degli effetti causati dall'iniezione di muscimolo (figura a sinistra) e di salina (figura a destra) sull'attività spettrale dell'EEG, su Thy e sul ciclo veglia sonno. Nell'esempio si può osservare come la banda theta dello spettro EEG tenda a variare parallelamente all'andamento della temperatura. Durante il periodo di ipotermia e successivo riscaldamento inoltre la comparsa di episodi di sonno appare essere fortemente inibita, specialmente quella di episodi di sonno REM.

La figura 25 mostra l'andamento di Thy (in alto) e di AM (in basso) in seguito all'iniezione di muscimolo (cerchi bianchi) o salina (cerchi neri). La somministrazione di muscimolo nel RVMM causa una marcata riduzione di Thy, ed un breve aumento di AM, mentre nessun effetto di rilievo è riscontrabile dopo

somministrazione di salina. Sulla destra di ogni figura è mostrata l'analisi statistica nell'intero gruppo di trattati ($n = 10$).

La somministrazione di muscimolo causa una significativa riduzione di Thy (da $39,98 \pm 0,16$ °C a $35,01 \pm 0,39$ °C, $p < 0.05$) ed un aumento di AM (da 367 ± 138 pixel/s a 901 ± 106 pixel/s, $p < 0.05$). La somministrazione di salina non produce effetti significativi.

La figura 26 mostra gli effetti prodotti dalla somministrazione di muscimolo nel RVMM rispettivamente per la quantità di veglia, di sonno NREM e di sonno REM espresse dagli animali. L'inibizione dei neuroni del RVMM produce un importante aumento della quantità di veglia nelle due ore successive all'iniezione, concomitanti con una forte inibizione alla comparsa di sonno NREM ed alla totale inibizione della comparsa di sonno REM.

Sulla destra di ogni figura è mostrata l'analisi statistica relativa alle quantità di veglia, di sonno NREM e di sonno REM effettuate nelle due ore successive all'iniezione rispetto alle due ore precedenti. La quantità di veglia è significativamente incrementata dalla somministrazione di muscimolo (da $42,5 \pm 4,2$ % a $87 \pm 4,3$ %, $p < 0.05$), mentre la quantità di sonno NREM dormita è fortemente ridotta (da $52,7 \pm 3,8$ % a $12 \pm 4,3$ %, $p < 0.05$). La comparsa di sonno REM appare completamente inibita dalla somministrazione di muscimolo (da $4,7 \pm 1,1$ % a 0 %, $p < 0.05$). La somministrazione di salina non ha prodotto effetti significativi.

La figura 27 mostra l'andamento cumulativo della quantità di sonno REM (in alto) dormita dopo somministrazione di salina (linea tratteggiata) e di muscimolo (linea nera) nel RVMM. Si può osservare come la somministrazione di muscimolo provochi una totale inibizione della comparsa di sonno REM che viene rimossa appena l'effetto del farmaco si esaurisce. Una volta che il sonno REM ricompare, la dinamica della sua comparsa non sembra differire relativamente a quella osservata dopo la somministrazione di salina. La brevità della registrazione post-iniezione, così come quella della deprivazione di sonno REM, impedisce di concludere che il sonno REM perso durante l'ipotermia non venga recuperato.

E' interessante osservare (figura 27 in basso) che l'inibizione alla comparsa di sonno REM dura fintanto che permane l'azione del muscimolo, ossia fintanto che la Thy diminuisce. Poco dopo l'inizio della fase di riscaldamento, il sonno REM torna, infatti, a comparire.

Nella figura 28 sono mostrati gli andamenti della potenza spettrale delle bande delta (A) e sigma (B) misurate durante episodi di sonno NREM, in seguito all'iniezione di muscimolo (cerchi bianchi) o salina (cerchi neri). La somministrazione di muscimolo nell'RVMM produce una riduzione sia della potenza EEG nella banda delta, che in quella sigma. In seguito alla somministrazione di salina, non si osservano variazioni di rilievo nell'andamento della potenza della banda sigma, mentre si osserva nella banda delta una riduzione di potenza. Questa riduzione è fisiologica e segue il profilo del normale decadimento della potenza delta in funzione del tempo.

Sulla destra di ogni figura è mostrata l'analisi statistica dell'attività delta (A) e sigma (B). La somministrazione di muscimolo causa una significativa riduzione della potenza delta (da $100 \pm 3,4$ % a $53 \pm 6,8$ %, $p < 0.05$) e della potenza sigma (da $100 \pm 2,4$ % a $54 \pm 7,3$ %, $p < 0.05$), mentre non si osservano effetti significativi successivi alla somministrazione di salina.

Sempre nella figura 28 sono anche mostrati gli andamenti della potenza spettrale theta, in termini di potenza della banda stessa (C) e di frequenza del picco all'interno della banda (D) misurata durante episodi di veglia, in seguito all'iniezione di muscimolo (cerchi bianchi) o salina (cerchi neri). La somministrazione di muscimolo nell'RVMM causa uno spostamento del picco spettrale all'interno della banda theta e una riduzione della potenza spettrale durante la veglia. Non si osservano modificazioni di queste due variabili in seguito alla somministrazione di salina.

Sulla destra di ogni figura è mostrata l'analisi statistica relativa all'analisi dello spostamento del picco spettrale della banda theta e della potenza spettrale theta. In seguito alla somministrazione di muscimolo, il picco della banda si modifica significativamente, spostandosi verso sinistra (da $6,3 \pm 0,06$ Hz a $5,4 \pm$

0,12 Hz, $p < 0.05$). Parallelamente si osserva una riduzione significativa della potenza theta durante la veglia (da $100 \pm 3,2\%$ a $62 \pm 2,2\%$, $p < 0.05$).

Per valutare la relazione esistente fra il calo di Thy e il calo di potenza nella banda elettroencefalografica theta, si è proceduto ad effettuare una correlazione fra le due variabili (figura 29), in seguito all'iniezione di muscimolo (in alto) e di salina (in basso). La correlazione fra thy e potenza theta dopo la somministrazione di muscimolo mostra come la potenza theta vari in funzione della Thy, ma con un isteresi che divide la fase di calo di Thy rispetto alla fase di riscaldamento. Al termine della fase di raffreddamento si osserva infatti un rapido incremento di potenza theta, che poi ritorna verso i valori di controllo su una retta che ha una pendenza simile a quella espressa durante la fase di raffreddamento, ma spostata verso l'alto. Questi dati mostrano che, a parità di Thy, la potenza theta è mediamente più bassa quando il RVMM è inibito, suggerendo che, oltre all'effetto intrinseco della temperatura nel diminuire l'eccitabilità neuronale, anche il livello di attività del sistema nervoso simpatico influenzi l'attività ippocampale.

ANALISI VEGLIA

Lo stato comportamentale prodotto dalla somministrazione di muscimolo è stato catalogato come veglia ed è caratterizzato da una bassa potenza nella banda theta, rispetto al periodo precedente l'iniezione. Al fine di valutare se l'inibizione del RVMM e la conseguente ipotermia impedissero del tutto la comparsa di veglia con una potenza theta normale, si è provveduto ad analizzare la quantità di veglia a basso theta (potenza theta minore della potenza theta media espressa durante la veglia nelle due ore precedenti l'iniezione) e la quantità di veglia ad alto theta (potenza theta maggiore della potenza theta media espressa durante la veglia nelle due ore precedenti l'iniezione) (figura 30). Si può osservare che, benché siano prevalenti episodi veglia a basso theta durante il periodo di ipotermia, siano espressi anche episodi di veglia ad alto theta. Questi episodi presentano uno

spettro EEG confrontabile con le epoche simili precedenti l'iniezione e mostrano inoltre uno spostamento del picco della banda theta ridotto o assente (figura 30 in basso a destra). Le epoche di veglia caratterizzate da bassa attività theta invece mostrano un chiaro spostamento del picco della banda (figura 30 in basso a sinistra). La presenza di episodi di veglia elettroencefalograficamente indistinguibili dagli episodi antecedenti la somministrazione di muscimolo, suggerisce che la riduzione dell'eccitabilità ipotalamica causata dalla diminuzione di Thy non impedisce in linea di principio l'espressione di veglia dalle normali caratteristiche EEG.

DISCUSSIONE

La principale conclusione di questo studio è che la regolazione del flusso ematico cutaneo da parte dei neuroni del RVMM non è mediata solamente dalla popolazione di premotoneuroni simpatici per la vasocostrizione cutanea, ma include anche una popolazione di neuroni del RVMM la cui attivazione promuove una vasodilatazione cutanea. Questa popolazione neuronale, sita nella porzione caudale della RVMM corrispondente al Raphe Pallidus e al Raphe Obscurus, a livello dei nuclei dell'oliva inferiore rostrale risulta essere tonicamente inibita. Infatti, come mostrato nell'esperimento A2 figura 15, l'attivazione di questi neuroni vasodilatatori per mezzo di antagonisti gabaergici nel ratto libero di muoversi posto in un ambiente termoneutrale provoca una cospicua vasodilatazione a livello cutaneo (zampe e coda) in una condizione ambientale nella quale sia i nostri risultati (esperimento A1) che quelli di altri autori (Owens et al., 2002, Rathner et al., 2008) mostrano che in neuroni vasocostrittori risultano essere tonicamente attivi nel mantenere un tono vasocostrittore.

La risposta vasodilatatoria evocata dalla attivazione di questa popolazione neuronale è stata robusta e ripetibile sia in ratti mantenuti in condizioni di anestesia generale (esperimento D, figura 23) che in animali liberi di muoversi (A2, figura 15). Inoltre le medesime modificazioni sono state ottenute sia in seguito ad iniezione di GABAzine un antagonista gabaergico che risulta essere più selettivo della bicucullina a livello dei recettori per il GABA che durante l'esposizione dell'animale a temperature ambientali di 10°C condizione in cui il tono vasocostrittore risulta essere massimamente attivato.

La scoperta di una nuova popolazione di neuroni è stata fatta nel corso di esperimenti volti alla comprensione funzionale e alla localizzazione dei neuroni vasocostrittori presenti in quest'area. La mappatura di quest'area risultava interessante in quanto la maggior parte degli studi fatti in passato erano stati eseguiti principalmente nelle regioni rostrali della RVMM ma dalle evidenze anatomiche (marcatura con virus retrogradi) l'area della RVMM coinvolta nel controllo vasomotorio appariva essere più estesa.

I nostri risultati indicano che la popolazione di neuroni vasocostrittori possiede un'estensione che va dalla regione più rostrale a livello del nucleo del nervo faciale

(RVMM(fn)) fino alla regione più caudale della RVMM(io) dove risulta essere frammista con la popolazione di neuroni vasodilatatori. Questa evidenza scaturisce dai risultati ottenuti a seguito della inibizione della RVMM(io) che evoca la stessa massiva vasodilatazione delle zampe e della coda concomitanti con una profonda ipotermia che avviene quando l'inibizione viene eseguita a livello della RVMM(fn).

I nostri esperimenti condotti in animali liberi di muoversi non hanno permesso in questa fase sperimentale un'esplorazione più ampia della RVMM(io) in quanto la cannula in questo preparato sperimentale può essere inserita soltanto in uno specifico punto per ogni animale. Per questa ragione non siamo in grado di dire quale sia la reale distribuzione di questa popolazione neuronale vasodilatatoria a livello anatomico. Tuttavia, l'area interessata dalla diffusione del farmaco iniettato in un volume di 100 nl, appare idonea a garantire sufficiente specificità anatomica alle nostre conclusioni.

La vasodilatazione evocata in seguito alla disinibizione a livello della RVMM(io) attraverso antagonisti gabaergici sia in condizioni di termoneutralità che durante esposizione a 10°C (massimo tono vasocostrittore) indica che la popolazione di neuroni vasodilatatori invia una efferenza inibitoria che risulta essere in grado di sormontare l'attività tonica eccitatoria esercitata in queste condizioni termiche ambientali dai neuroni vasocostrittori. I nostri risultati però non permettono né di determinare la provenienza delle afferenze eccitatorie e toniche inibitorie che questi neuroni ricevono né quale sia il bersaglio della loro efferenza inibitoria.

Tuttavia è possibile speculare sul circuito neuronale attraverso cui i neuroni vasodilatatori del RVMM(io) agiscono per inibire l'attività simpatica diretta ai vasi ematici cutanei.

Studi anatomici condotti con l'uso di traccianti retrogradi iniettati a livello dei vasi ematici della coda nel ratto hanno evidenziato la presenza di numerosi neuroni non glutamatergici marcati nell'area della RVMM(io). Tuttavia è interessante notare che a questo livello non si osservi l'espressione del gene precoce c-fos dopo somministrazione centrale di PGE2 (Nakamura et al., 2004),

che evoca uno stimolo vasocostrittorio molto forte (Rathner et al., 2008) Queste ricerche indicano che la popolazione di neuroni non glutammatergica localizzata nella RVMM(io) che sinapticamente connessa con i vasi ematici della coda e che non assolve una funzione di tipo vasocostrittoria in seguito a stimolazioni con PGE2 potrebbe essere il substrato neuronale che se attivato determina la vasodilatazione cutanea. Quindi è possibile speculare che questi neuroni inviino un'efferenza inibitoria diretta alla colonna intermedio laterale (IML) del midollo spinale. Quest'ultima affermazione trova supporto anche dalla dimostrazione che due frammiste popolazioni di neuroni che proiettano sui neuroni pregangliari della IML siano state trovate a livello della RVMM(io). Una con fenotipo inibitorio contenente GABA o glicina e l'altra di tipo eccitatorio contenente vescicole per il trasporto del glutammato (Stornetta et al., 2004, Stornetta et al., 2005). Un'ipotesi alternativa prevede che i circuiti locali spinali simpatico-inibitori (Wang et al., 2008) siano attivati da neuroni eccitatori discendenti dalla regione del RVMM. Per attribuire un ruolo all'inibizione spinale nella vasodilatazione cutanea causata dalla regione RVMM, è necessario condurre studi farmacologici incentrati sul circuito spinale.

L'aumento della temperatura della coda e delle zampe in seguito alla somministrazione di muscimolo nella RVMM(fn) nel ratto libero di muoversi conferma i dati precedentemente ottenuti da altri autori sia in preparati sperimentali mantenuti sotto anestesia generale (Blessing and Nalivaiko, 2001, Ootsuka et al., 2004) che in animali liberi di muoversi (Zaretsky et al., 2003, Vianna et al., 2008) ed inoltre supporta l'attuale modello di controllo termoregolatorio della vasomozione cutanea, nel quale i premotoneuroni simpatici vasocostrittori contenuti nella RVMM(fn) aumentano la loro attività durante l'esposizione dell'animale al freddo riducendo quindi la dispersione di calore con l'ambiente (Morrison et al., 2008). Il fatto che la temperatura soglia per evocare l'inibizione della vasocostrizione negli animali mantenuti in anestesia generale è approssimativamente di 39°C (Owens et al., 2002, Rathner et al., 2008) suggerisce che in un ambiente termoneutrale ($T_a=24^{\circ}\text{C}$) e con una normale temperatura corporea, nell'animale libero di muoversi, questi neuroni dovrebbero essere attivi

nel mantenere un tono vasocostrittorio. La diminuzione della temperatura corporea che si verifica durante l'inibizione della RVMM(fn) è da imputare sicuramente alla aumentata dispersione di calore in seguito alla vasodilatazione cutanea degli scambiatori termici, tuttavia la profonda ipotermia potrebbe essere altresì determinata da una inibizione a carico di organi termogenetici come il tessuto adiposo bruno che risultano essere sotto il controllo eccitatorio di premotoneuroni localizzati nella RVMM(fn) (Morrison et al., 2008). I dati presentati in questo esperimento non sono sufficienti a dare risposta a questa affermazione in quanto non provvede ad una misura diretta delle variabili termogenetiche in esame.

Anche la riduzione della temperatura della coda e delle zampe evocata dalla somministrazione nella RVMM(fn) di antagonisti GABAergici (bicucullina, GABAzina) in condizioni che producono una massiva vasodilatazione come alta temperatura ambientale (32°C, exp A1) o alta temperatura centrale (38°C, exp D) sono in accordo con dati precedentemente descritti da altri autori (Blessing and Nalivaiko, 2001) che dimostrano come la disinibizione dei premotoneuroni simpatici vasocostrittori causa un incremento dell'input simpatico ai distretti vascolari cutanei producendo una riduzione del flusso ematico cutaneo.

L'aumento della temperatura centrale che si ottiene in seguito alla disinibizione dei premotoneuroni della RVMM(fn) potrebbe anche in questo caso non essere il solo risultato di una diminuita termodispersione a livello cutaneo ma bensì potrebbe essere determinata da una concomitante attivazione degli organi termogenetici (BAT). Ancora una volta la mancanza in questo lavoro di misure dirette di tale attività consente solo una speculazione basandosi sul fatto che altri autori hanno dimostrato che la disinibizione di queste aree produce una attivazione del tessuto adiposo bruno (Morrison, 1999).

La riduzione dell'attività del tono simpatico al letto vascolare cutaneo in seguito alla microiniezione di muscimolo sia nella RVMM(fn) che nella RVMM(io) in animali mantenuti a temperatura ambiente di 24°C, dimostra che la popolazione di premotoneuroni simpatici vasocostrittori è tonicamente attiva a Ta di 24°C e che questa popolazione neuronale si estende fino alla porzione più

caudale a livello delle olive inferiori. Quest'ultimo dato è altresì confermato da dati anatomici che dimostrano la presenza di una popolazione di neuroni eccitatori, positivi alla marcatura per V-GLUT3, con estensione nella RVMM che va dal nucleo del VII nervo cranico a livello dei nuclei olivari inferiori (Nakamura et al., 2004).

Il blocco dei recettori GABAA nella RVMM(fn) evoca contemporaneamente una vasocostrizione cutanea ed un aumento della temperatura centrale. Al contrario l'attivazione di questi recettori sia nella RVMM(fn) che nella RVMM(io) produce una vasodilatazione cutanea accompagnata da una riduzione della temperatura centrale.

Queste risposte sulla temperatura centrale supportano il modello precedentemente descritto nel quale un aumento dell'attività dei premotoneuroni vasocostrittori cutanei evoca una riduzione del flusso ematico cutaneo con conseguente riduzione della dispersione di calore causando quindi il rialzo termico mentre un'inibizione degli stessi produce un aumento del flusso ematico cutaneo seguito dall'aumento della dispersione di calore contribuendo quindi alla riduzione della temperatura centrale.

Al contrario il blocco dei recettori GABAA nel RVMM(io) produce una massiva vasodilatazione cutanea che quindi favorisce la dispersione termica concomitante con un incremento della temperatura centrale. Questo comportamento evidenzia che il blocco dei recettori GABAA a questo livello è contemporaneamente in grado di produrre la riduzione del tono simpatico vasocostrittore cutaneo e di incrementare l'attività termogenetica. Si può quindi concludere che l'antagonismo per il GABAA nella RVMM(io) agisca su due differenti e frammentate popolazioni di premotoneuroni: una simpatico-eccitatoria che conduce alla attivazione della termogenesi del BAT e quindi al rialzo termico ed un'altra simpatico-inibitoria che attivamente produce una riduzione del tono simpatico diretto al letto vascolare cutaneo, evocando l'aumento della temperatura della coda e delle zampe. L'interpretazione di questi dati è corroborata dalle osservazioni dei risultati ottenuti a Ta di 32°C (fig.) e a Ta di 10°C (fig.). La prima condizione termica ambientale determina una massiva vasodilatazione cutanea

che non viene assolutamente antagonizzata dall'iniezione nel RVMM(io) di GABAazine (antagonista gabaergico). Infatti in questa condizione ambientale la mancata risposta vasomotoria permette di considerare il rialzo termico centrale come un diretto effetto della attivazione termogenetica a carico probabilmente del tessuto adiposo bruno. La seconda condizione ambientale è caratterizzata da un'intensa attività termogenetica e vasocostrittoria atta a contrastare il forte carico termico ambientale. In questa condizione l'iniezione di bicucullina (antagonista GABAA) nella RVMM(io) causa un aumento della temperatura di zampe e coda concomitante con una riduzione della temperatura centrale. Questo indica che la vasodilatazione cutanea sia il risultato di un diretto effetto dell'antagonismo sui recettori GABAA e che la termogenesi non è in grado di compensare la dispersione termica.

Nel considerare un potenziale ruolo fisiologico della popolazione di premotoneuroni vasodilatatori nella RVMM(io), abbiamo testato anche la possibilità che la loro disinibizione potesse contribuire in qualche modo alla vasodilatazione cutanea indotta dall'esposizione al caldo. Per questa ragione abbiamo testato gli effetti risultanti da un'inibizione di questi neuroni durante l'esposizione ad alte temperature ambientali. Poichè l'inibizione della RVMM(io) in seguito alla somministrazione di muscimolo a 32°C non ha prodotto nessuna modificazione vasomotoria a carico della coda e delle zampe si può concludere dicendo che l'attività dei neuroni vasodilatatori nella RVMM(io) non contribuisce alla vasodilatazione cutanea indotta dalla esposizione ad alte temperature ambientali.

Sorprendentemente, l'inibizione della RVMM(io) a Ta di 32°C causa una significativa diminuzione della temperatura centrale in una condizione termica ambientale nella quali si presuppone che siano completamente inattivi tutti i sistemi termogenetici. Questa osservazione suggerisce che siano presenti neuroni nella RVMM(io) che supportano una attività di tipo non termogenetica diretta probabilmente ad organi non specificatamente termogenetici come fegato e cuore. Recentemente in un esperimento condotto da Stanley (Stanley et al., 2010), nel

quale sono stati inseriti traccianti retrogradi nel fegato, è risultata essere marcata una popolazione di neuroni a livello periolivare nella RVMM(io). L'inibizione di questa popolazione di neuroni, causando una diminuzione dell'attività metabolica epatica, potrebbe spiegare il calo di temperatura che abbiamo osservato a 32°C.

Per quanto concerne le variabili cardiovascolari, la disinibizione della RVMM(fn) alla Ta di 32°C ha prodotto un lieve aumento della pressione arteriosae nessun cambio della frequenza cardiaca che sono parzialmente in accordo con dati precedentemente mostrati in letteratura (Zaretsky et al., 2003). Questa discrepanza può essere spiegata ipotizzando che l'esposizione ad alte Ta inducano un'inibizione cardiovascolare, che quindi non permetto un aumento dell'attività cardiaca che normalmente si osserva quando la stessa disinibizione avviene in ambienti termoneutrali. Inoltre, poichè la maggiorparte degli effetti cardiovascolari è risultata dalla disinibizione della RVMM(io), si può speculare che la popolazione di premotoneuroni cardiovascolari sia estesa in questa porzione più caudale della RVMM.

Tuttavia a basse temperature (10°C) in seguito alla disinibizione della RVMM(io) si osserva una paradossa bradicardia che può essere spiegata in due modi: l'effetto bradicardico è il diretto risultato di riflesso barocettivo in risposta all'aumento di pressione che si verifica in seguito all'iniezione di bicucullina, oppure la temporanea riduzione dell'input eccitatorio ai premotoneuroni simpatici cardiaci provenienti dalle afferenze termocettive cutanee, causate dal riscaldamento della cute in concomitanza con la vasodilatazione cutanea che risulta dalla disinibizione della RVMM(io), causa una riduzione del tono simpatico diretto ai vasi di resistenza.

Il ruolo fisiologico e funzionale di questa nuova popolazione di neuroni resta da determinare come anche la loro esatta localizzazione. Questo studio ha comunque mostrato l'esistenza di una nuova popolazione neuronale che non assolve un compito di tipo termoregulatorio. Si può ipotizzare che questi neuroni siano necessari nel garantire dispersione di calore eccedente in condizioni in cui la produzione di calore non può essere inibita, per esempio durante la termogenesi indotta dalla dieta o durante l'attività muscolare.

Dal punto di vista degli effetti indotti dal muscimolo sull'attività ipnica, i dati presentati supportano il rapporto mutualmente esclusivo fra sonno e termoregolazione (Parmeggiani, 2003). In particolare la comparsa di sonno REM è totalmente inibita durante il periodo di ipotermia successivo alla somministrazione di muscimolo nel RVMM. Parallelamente a quanto avviene in seguito ad esposizione al freddo (Cerri et al., 2005), si può ipotizzare che l'ipotermia centrale prodotta dal muscimolo inibisca la comparsa di sonno REM in conseguenza di un'attivazione dei termocettori centrali presenti nell'area preottica, che, risulta in un aumentato drive termogenico diretto ai centri inferiori (Romanovsky, 2007). Nel caso specifico, l'aumentato drive termogenico non esiterebbe in un'aumentata attività degli organi termo-effettori periferici in quanto la stazione più caudale, il RVMM, è stato inibito farmacologicamente. Sussisterebbe comunque l'attività dei nuclei della via termoeffettrice centrale superiori al RVMM che, in un punto ancora non noto della rete, interferirebbe con la capacità dei circuiti troncoencefalici di generare sonno REM. Osservando il grafico relativo all'andamento cumulativo della quantità di sonno REM, si può inoltre osservare che, contrariamente a quanto avviene in seguito ad esposizione a bassa temperatura ambientale (Cerri et al., 2005), non sembra esserci nessun recupero di sonno REM una volta che l'effetto del farmaco sia scomparso. E' possibile ipotizzare che la quantità di sonno REM persa durante il periodo di ipotermia sia troppo modesta per dare luogo ad un periodo di recupero, in accordo con l'ipotesi dell'esistenza di una soglia critica di debito di sonno che inneschi il recupero (Amici et al., 2008). Una più ardita interpretazione del dato può però essere proposta. Si può supporre che il cervello dell'animale durante l'ipotermia, riducendo i propri processi metabolici in funzione di un fattore Q_{10} riduca proporzionalmente l'accumularsi di debito di sonno, che risulterebbe quindi vincolato all'attività metabolica neuronale. I dati presentati, a causa della brevità del periodo di deprivazione, non consentono di propendere decisamente per una delle due ipotesi. Deprivazioni prolungate ottenute per mezzo di ripetute iniezioni potrebbero aiutare a chiarire questi aspetti.

Anche la comparsa di sonno NREM appare fortemente, anche se non totalmente, compromessa dall'inibizione dei neuroni del RVMM. Inoltre il poco sonno NREM che compare durante il periodo di ipotermia presenta una potenza spettrale delta marcatamente ridotta. Anche per il sonno NREM non si assiste ad un periodo di recupero successivo al periodo di deprivazione, né nel dominio del tempo (aumento del tempo trascorso in sonno NREM), né nel dominio delle frequenze (aumento della potenza delta). Le stesse ipotesi formulate per giustificare l'assenza di recupero di sonno REM possono essere applicate anche al sonno NREM. Essendo nota, inoltre, la relazione che lega l'intensità della potenza delta durante il sonno NREM con la durata e qualità della veglia precedente (Borbely, 2001), l'ipotesi che il periodo di ipotermia non sia da classificare come una veglia a tutti gli effetti, e che quindi pesi meno nel determinare un debito di sonno, appare ancora più giustificata.

Indubbiamente lo stato comportamentale che è stato identificato genericamente come veglia in questo esperimento, presenta caratteristiche peculiari. È presente infatti una bassa potenza theta, in presenza sia di elevati livelli di attività motoria (prima periodo post-iniezione) che di bassi livelli (secondo periodo post-iniezione). Un'analisi più dettagliata della qualità della veglia durante il periodo di ipotermia rivela che la maggior parte della veglia presenta bassi livelli di theta, ma che comunque esistono episodi di veglia con potenza theta normale. L'analisi spettrale di questi due sottogruppi di veglia mostra che, mentre lo spettro della veglia a basso theta mostra una riduzione della potenza e uno spostamento del picco della banda verso il basso, la veglia ad alto theta appare simile a quella presente nel periodo precedente l'iniezione. Questo dato suggerirebbe che l'ipotermia non impedirebbe di per sé la comparsa di episodi di veglia ad alto theta, ma ridurrebbe drasticamente la frequenza di questi.

Durante il periodo di ipotermia si osserva uno spostamento generalizzato del picco della banda theta, attraverso tutti gli stati, che si sposta verso frequenze più lente parallelamente alla caduta di temperatura. Questo peculiare fenomeno elettroencefalografico è stato descritto in animali che presentano spontaneamente episodi di torpore (Deboer, 1998). In questi studi si è descritto un progressivo

rallentamento dell'attività theta, funzione della temperatura corporea. Correlando però Thy con la potenza theta, si osserva che la curva che descrive la relazione fra le due variabili durante la caduta di temperatura appare avere una pendenza diversa rispetto alla curva che descrive il recupero della temperatura corporea fisiologica. La correlazione fra le due mostra un'isteresi che si manifesta quando viene raggiunto il nadir di Thy, quando cioè l'effetto del muscimolo è ormai esaurito. In questo punto si osserva un rapido aumento della potenza theta, pur restando invariata la Thy. Questo porta alla conseguenza che, a parità di Thy, la potenza theta sarà più bassa se l'animale si sta raffreddando che se si sta riscaldando. Questo dato suggerisce che, unitamente ad un innegabile effetto della temperatura sull'eccitabilità ippocampale, anche il livello di attivazione del sistema nervoso simpatico ne influenzi il livello di attività. Come questo sia mediato non è evincibile dai dati presentati. Si deve però ricordare che il RVMM proietta anche alle cellule cromaffini surrenali. Una modificazione nella secrezione di catecolamine surrenali potrebbe essere alla base dell'isteresi osservata nella correlazione Thy-potenza theta. La somiglianza degli effetti EEG prodotti dall'inibizione del RVMM con quelli descritti in animali in torpore suggerisce inoltre che il RVMM possa essere una stazione critica nel regolare la comparsa attiva di stati ipometabolici come il torpore.

Dal punto di vista comportamentale si assiste ad un aumento dell'attività motoria nella prima parte del periodo ipotermico. Questo potrebbe essere considerato un tentativo da parte dell'animale di compensare per l'aumentata termo dispersione aumentando la quantità di calore prodotto dall'attività muscolare. Questa ipotesi non appare però sostenibile se si osserva che non appaio mutamenti nella dinamica di decremento della temperatura centrale, che quindi non sembra essere modificata dall'aumentata motilità dell'animale. Un'ipotesi alternativa può essere formulata considerando proprio la subitanea e massiva vasodilatazione cutanea che viene evocata dall'iniezione di muscimolo. Questa simulerebbe una qualche sorta di "vampata di calore" alla quale fastidio l'animale cercherebbe di compensare aumentando comportamenti volti a favorire ulteriormente la termodispersione, come il "saliva spreading". Analisi preliminari dei tracciati

video tendono a confermare questa ipotesi. L'animale verrebbe dunque "ingannato", nel primo periodo successivo all'iniezione, a pensare di essere di fronte ad un ambiente estremamente caldo. Il sangue caldo affluendo infatti alla cute, attiverrebbero i termocettori periferici, trasmettendo quindi una falsa sensazione ai centri termoregolatori. Soltanto con il successivo calo della temperatura centrale questo comportamento poi cesserebbe.

CONCLUSIONI

I dati presentati in questo esperimento hanno evidenziato la presenza di due popolazioni di neuroni all'interno del RVMM attive su organi termoeffetori periferici. Una popolazione appare svolgere un ruolo termoregolatorio, è tonicamente attiva e produce vasocostrizione; l'altra svolge un ruolo non termoregolatorio, è tonicamente inibita e produce vasodilatazione. Le due popolazioni appaiono sovrapporsi all'interno dell'area, con una predominanza di neuroni vasodilatatori nella porzione caudale del RVMM. Questa seconda popolazione di neuroni non è mai stata descritta precedentemente e rappresenta il principale contributo originale di questo lavoro. La somiglianza fra gli effetti comportamentali ed elettroencefalografici provocati dall'inibizione del RVMM con quelli descritti in animali in torpore suggerisce inoltre che il RVMM possa rappresentare una stazione chiave nel regolare la comparsa di stati ipometabolici come il torpore e l'ibernazione.

FIGURE

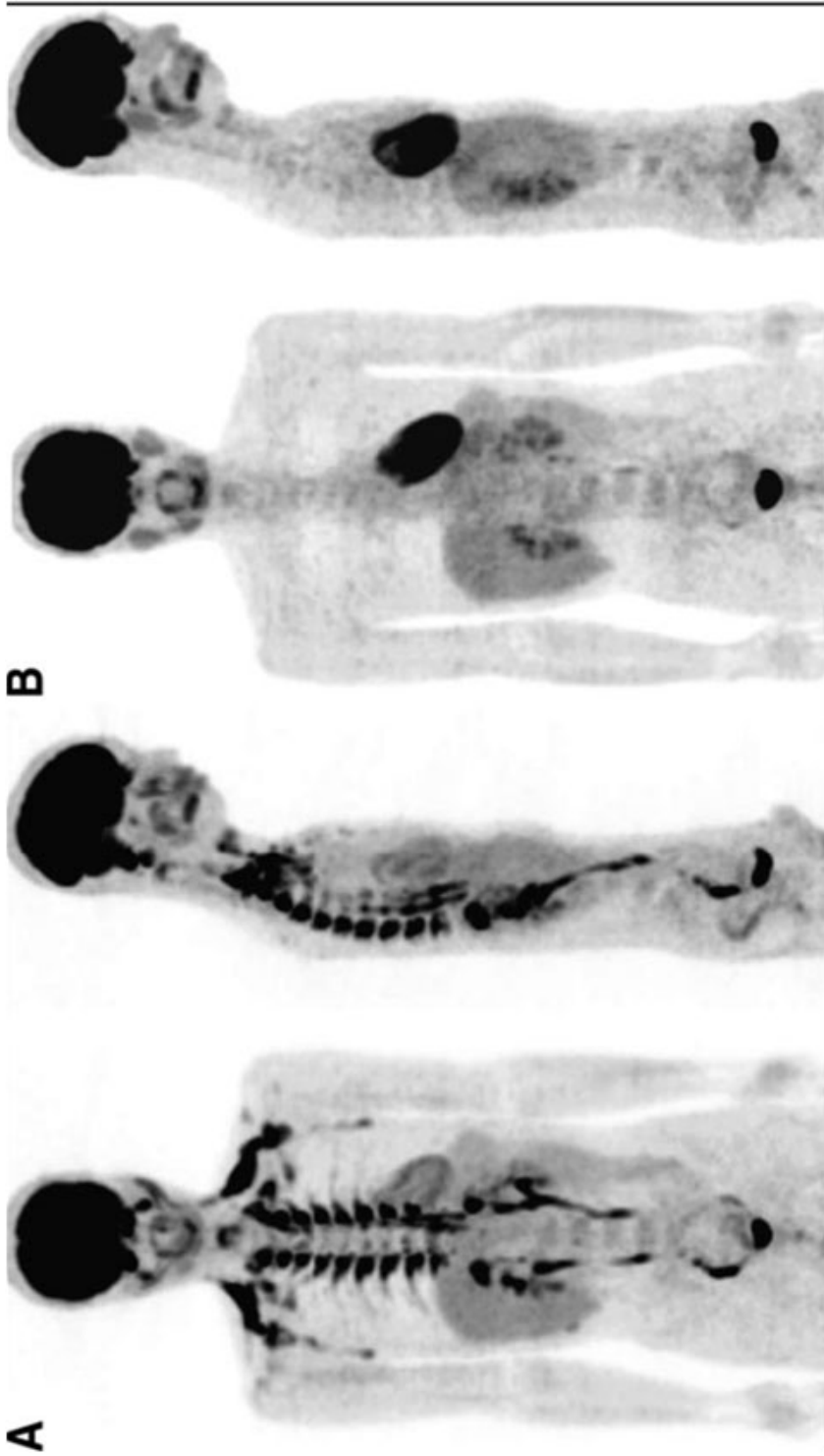


Figura 1

Immagine ottenuta mediante scansione con topografia ad emissione di positroni (PET) dopo esposizione del soggetto a due condizioni termiche ambientali: freddo e caldo e la somministrazione intravenosa di 2-[(18)F]fluoro-2-deoxyglucose (F-FDG). L'attivazione del tessuto adiposo bruno in seguito all'esposizione a basse temperature aumenta l'assorbimento del F-FDG da parte dell'organo che quindi diventa visibile alla scansione PET. I principali depositi di tessuto adiposo bruno in seguito ad esposizione al freddo sono visibili a livello sottoscapolare, paravertebrale perirenale e periaortico (in nero) durante l'esposizione al freddo. Non si riscontra nessuna marcatura durante l'esposizione al caldo.

(Saito et al., 2009)

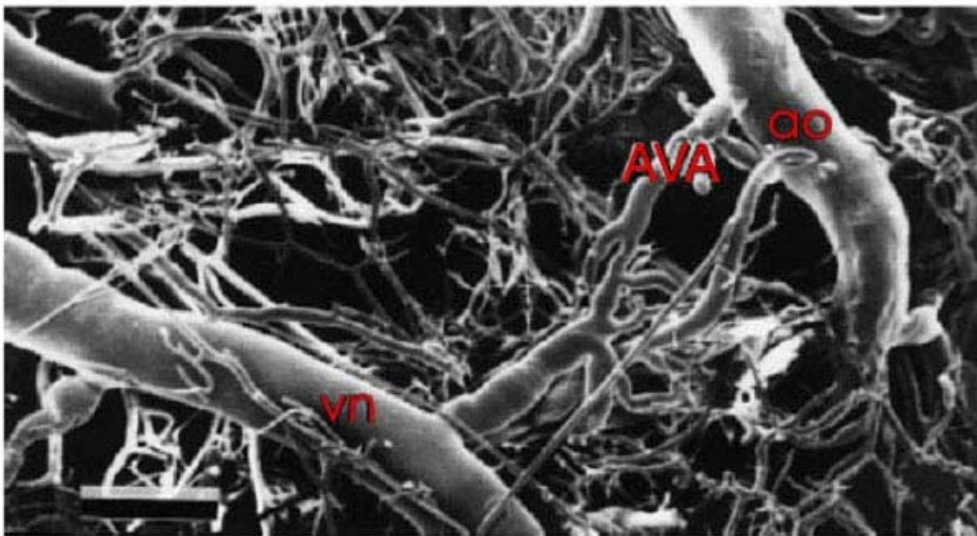
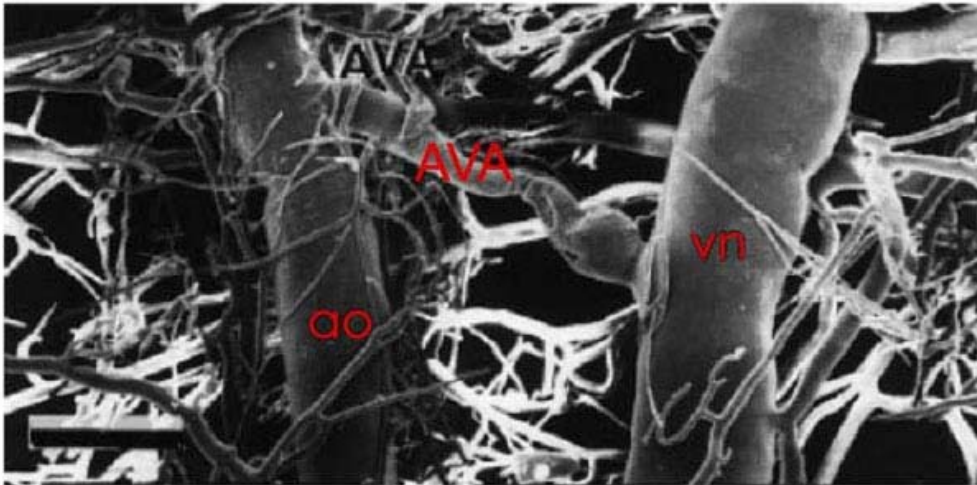


Figura 2

Microangiografia dell'orecchio del coniglio. Sono mostrate le anastomosi artero venose (AVA) che connettono le arteriole (ao) con le venule (vn). Attorno è visibile la fitta rete capillare. Barra = 1,5 μ m

(Ninomiya, 2000)

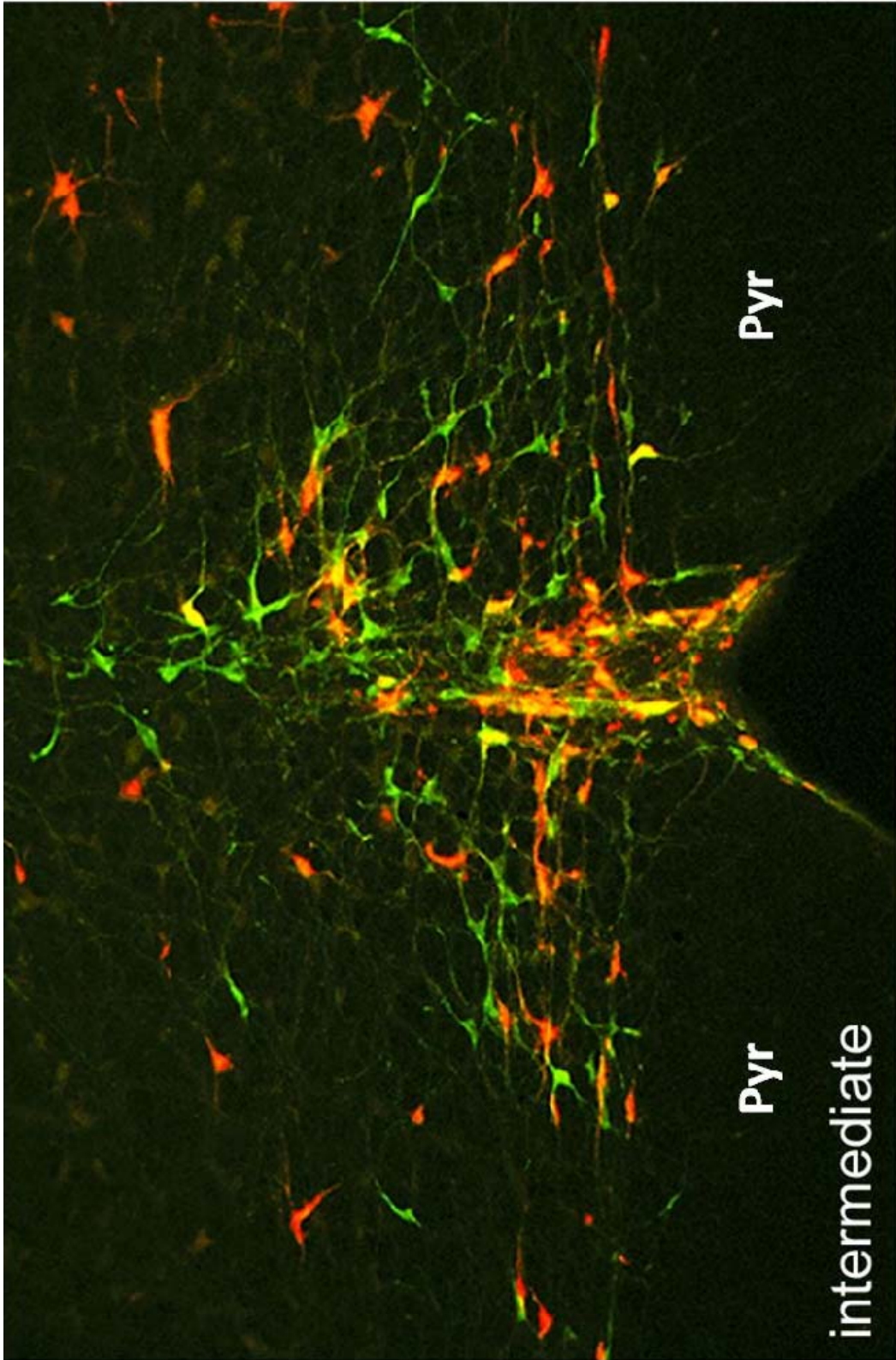


Figura 3 Neuroni infettati con pseudorabies virus (PRV) dopo iniezione del virus nel tessuto adiposo bruno.

La figura mostra in rosso i neuroni infettati con PRV. In verde sono mostrati i neuroni serotoninergici marcati con immunoreazione contro la tryptophan-hydroxylase. In giallo sono mostrati i neuroni che risultano positivi sia alla marcatura per la tryptophan-hydroxylase che a quella per PRV. La maggiorparte dei neuroni positivi alla doppia marcatura sono localizzati nella regione parpiramidale del RVMM.

(Cano et al., 2003)

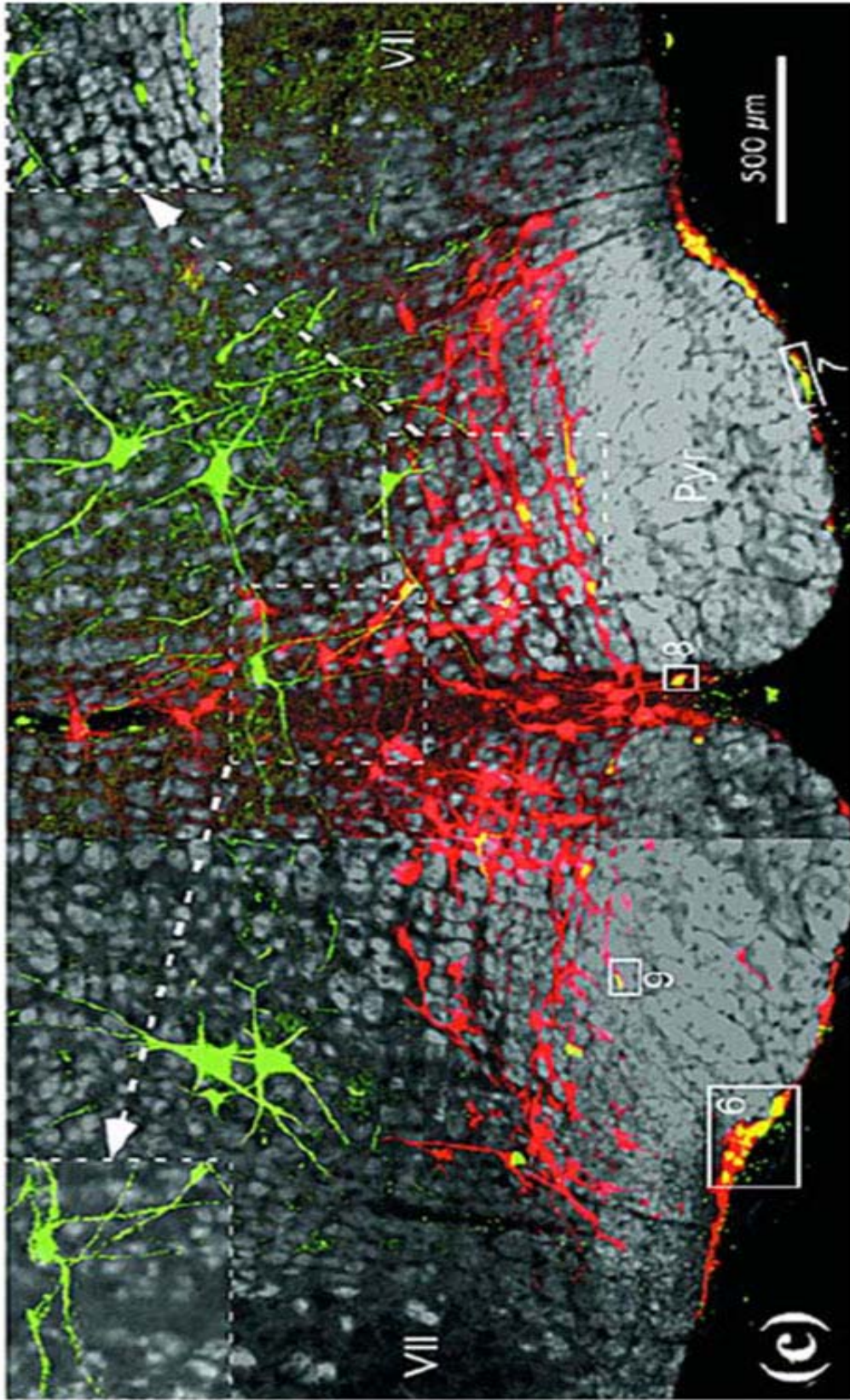


Figura 4 **Neuroni infettati con pseudorabies virus (PRV) dopo iniezione del virus nella coda del ratto.**

La figura mostra in verde i neuroni infettati con PRV. In rosso sono mostrati i neuroni serotoninergici marcati con immunoreazione contro phenylalanine hydroxylase 8 (PH8). In giallo sono mostrati i neuroni che risultano positivi sia alla marcatura per (PH8) che a quella per PRV. I neuroni positivi alla doppia marcatura sono localizzati nella regione parapiroamidale del RVMM.

(Toth et al., 2006)

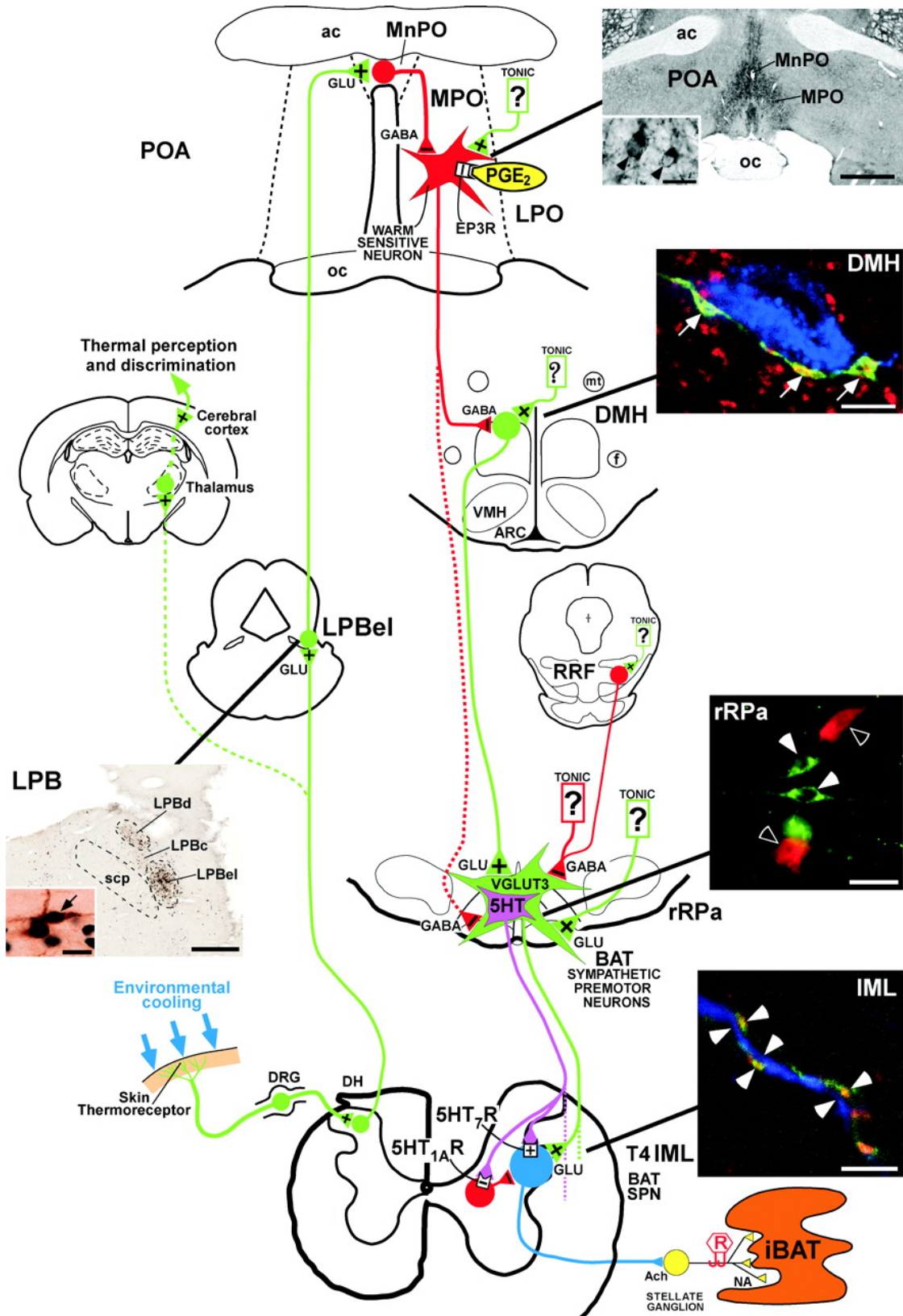


Figura 5 **Diagramma schematico dell' attuale modello di controllo della termogenesi**

Fotomicrografie del nucleo laterale parabrachiale (LPB), area preottica (POA), ipotalamo dorsomediale (DMH), Midollo rostro-VentroMediale (RVMM) e della colonna intermediolaterale (IML). Nel pannello LPB sono mostrati i nuclei esterno-laterale (LPBel), centrale (LPBc) e dorsale (LPBd) dell'LPB contenenti i neuroni marcati con un tracciante retrogrado (marrone) dalla regione preottica mediana (MnPO) della POA. I neuroni dell'LPBel e quelli dell'LPBc, ma non quelli dell'LPBd, esprimono inoltre Fos (nuclei neri) in seguito all'esposizione al freddo degli animali; scp, peduncolo cerebellare superiore; la barra nera corrisponde a 0.5 mm e 15 μ m (nel riquadro più piccolo). Nel pannello POA, l'immunoistochimica dei recettori EP3 (EP3R) mostra la localizzazione di questi recettori nei corpi cellulari (testa freccia) e le fibre dendritiche dei neuroni che sono distribuite nell'MnPO e nella regione preottica mediale (MPO) del POA; ac, commissura anteriore; oc, chiasma ottico; LPO, area preottica laterale; PGE2, prostaglandina E2; GLU, glutammato; la barra nera corrisponde a 1 mm e 20 μ m (nel riquadro piccolo). Nel pannello DMH, gli assoni provenienti dai neuroni del POA (verde) che risultano positivi al marker delle terminazioni GABAergiche (rosso) racchiudono i neuroni marcati con tracciante retrogrado (blu) dal RVMM; la barra nera corrisponde a 5 μ m. Il pannello RVMM mostra una duplice immunofluorescenza, marcando i neuroni positivi a VGLUT3 (verde, frecce bianche) e quelli positivi alla serotonina (5-HT) (rosso, frecce vuote); BAT, tessuto adiposo bruno; la barra nera corrisponde a 30 μ m. Il pannello IML mostra gli assoni provenienti dal RVMM (verde) che sono positivi a VGLUT3 (rosso) uniti (frecce bianche) alle fibre dendritiche positive (blu) per il marker dei neuroni pregangliari simpatici; la barra nera corrisponde a 5 μ m.

(Morrison et al., 2008)

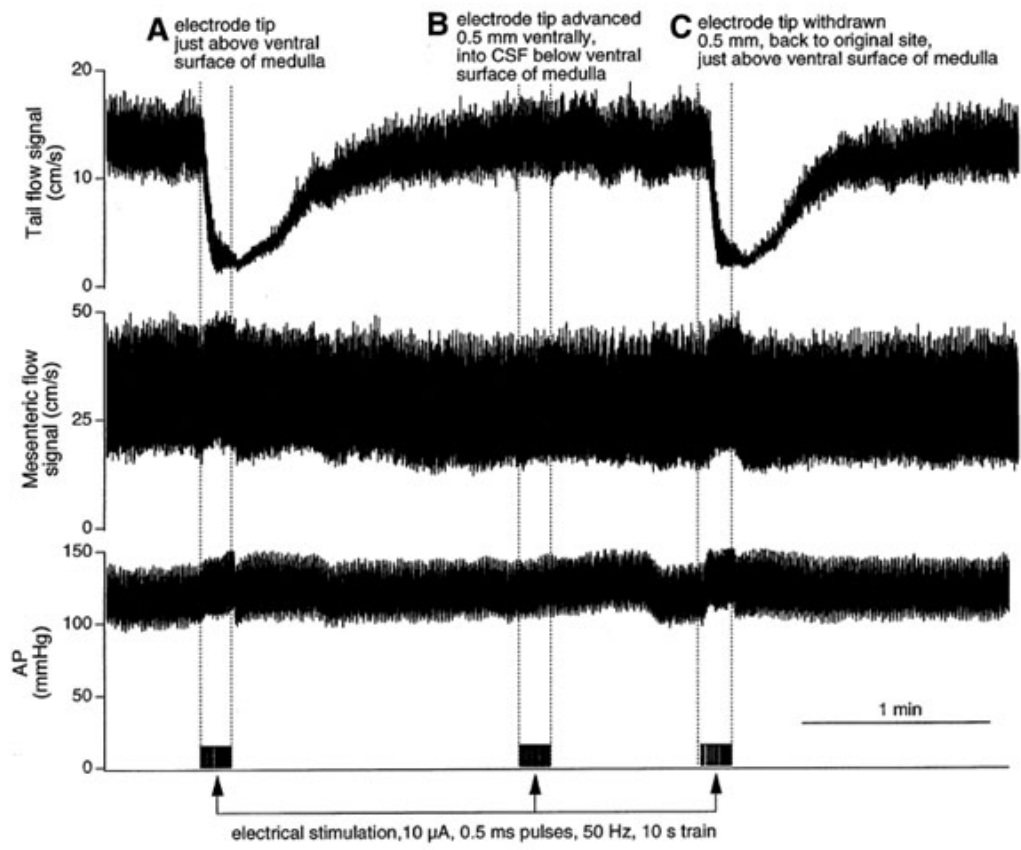


Figura 6 Stimolazione elettrica del RVMM.

La figura mostra cambiamenti nel flusso della coda, di quello mesenterico e della PA in risposta alla stimolazione elettrica del RVMM. La stimolazione elettrica produce una cospicua riduzione del flusso ematico alla coda senza apprezzabili variazioni del flusso ematico mesenterico (A, C). La stimolazione elettrica fuori dal RVMM non produce nessun effetto.

(Blessing and Nalivaiko, 2001)

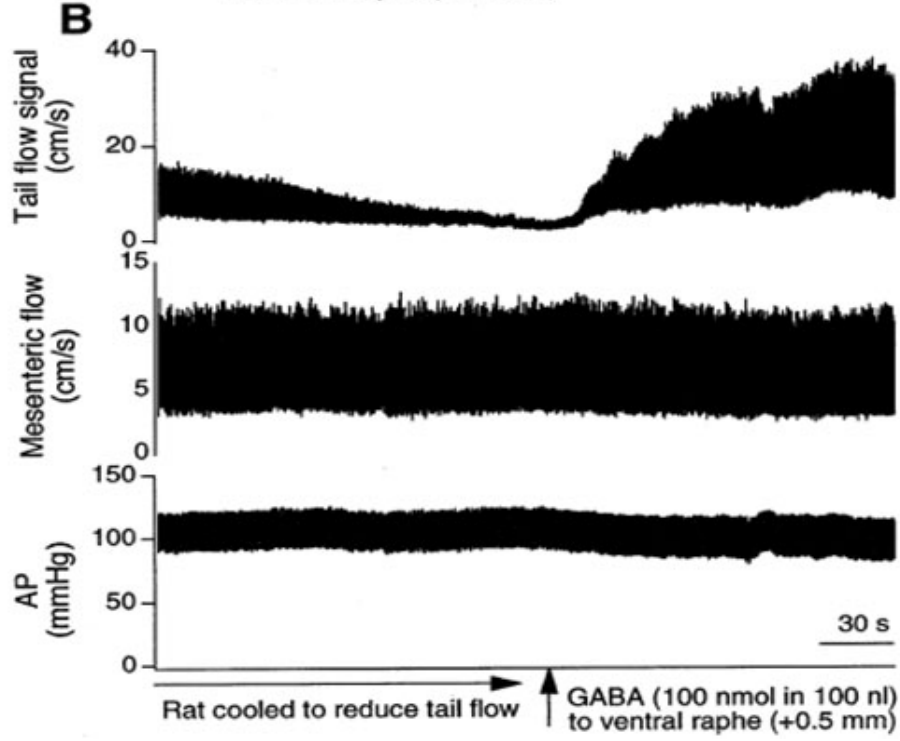
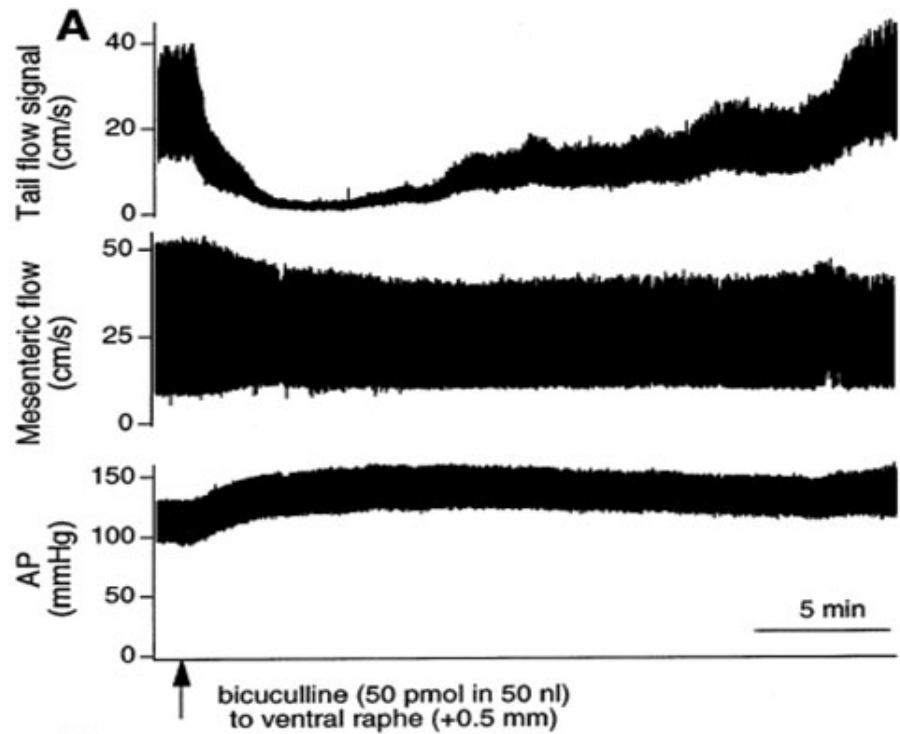


Figura 7 Stimolazione chimica o inibizione del RVMM.

La figura mostra cambiamenti nel flusso della coda, di quello mesenterico e della PA in risposta all'iniezione di bicucullina (freccia verticale) a +0.5 mm dal RVMM ventrale (A), e in risposta all'iniezione di GABA (freccia verticale) nello stesso sito (B). Prima della somministrazione di GABA l'animale ha subito un abbassamento della temperatura da 39-40°C a circa 37°C per ridurre il flusso sanguigno cutaneo.

(Blessing and Nalivaiko, 2001)

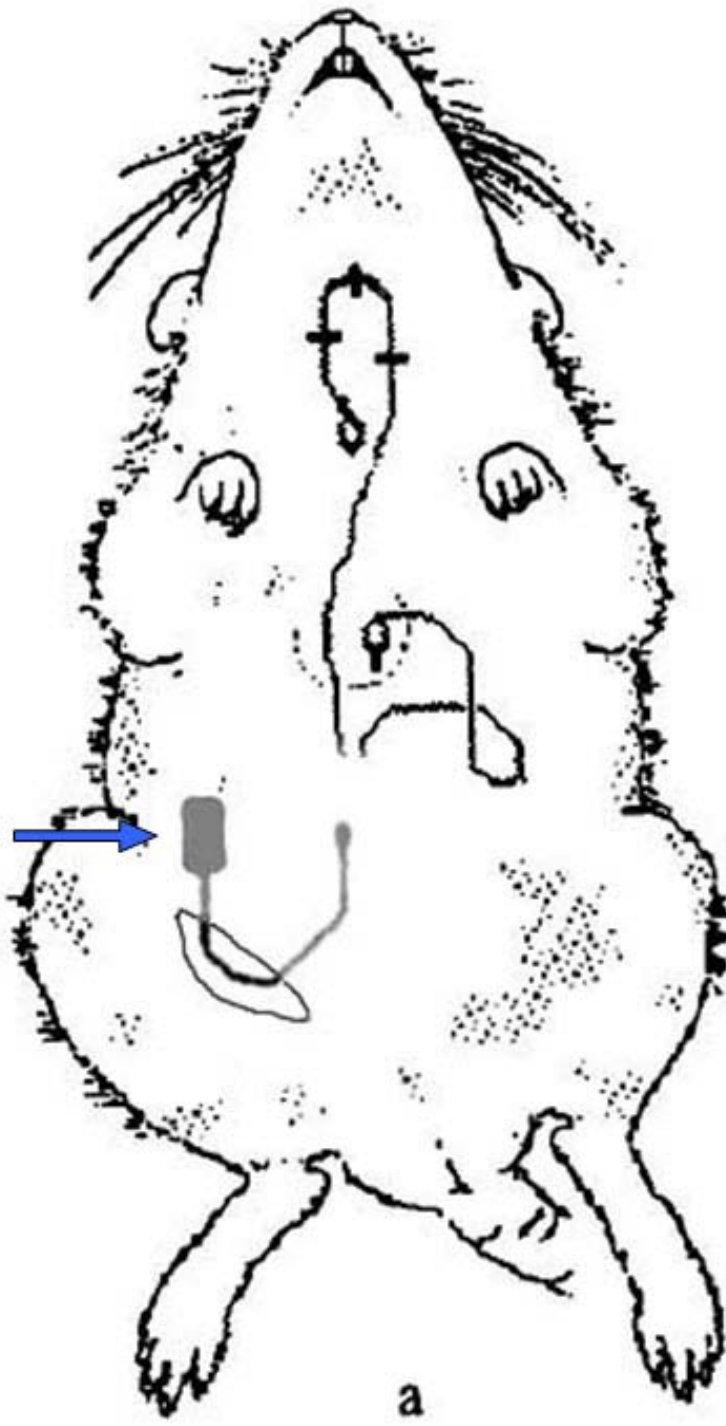
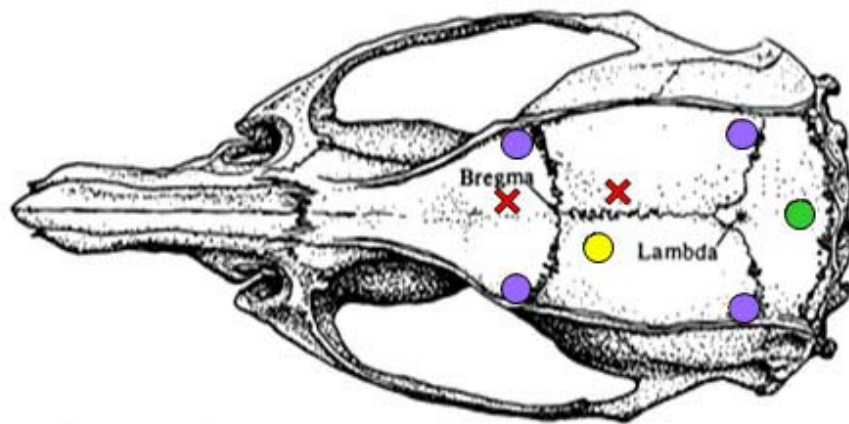


Figura 8 Impianto chirurgico per la registrazione dell PA e ECG

La figura mostra i punti di posizionamento degli elettrodi per la registrazione dell'ECG a livello del processo xifoideo e nella cavità mediastinica tra i muscoli sternocleidomastoideo. In corrispondenza della zampa dx viene mostrato in figura il punto di accesso chirurgico all'arteria femorale ed il catetere per la registrazione della pressione arteriosa in essa inserito. La freccia indica il trasmettitore telemetrico che viene alloggiato sotto cute.



- Viti di ancoraggio castelletto
- Termistore
- Cannula per microiniezioni
- ✕ Elettrodi EEG

Figura 9 Schema dell'impianto chirurgico cranico.

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

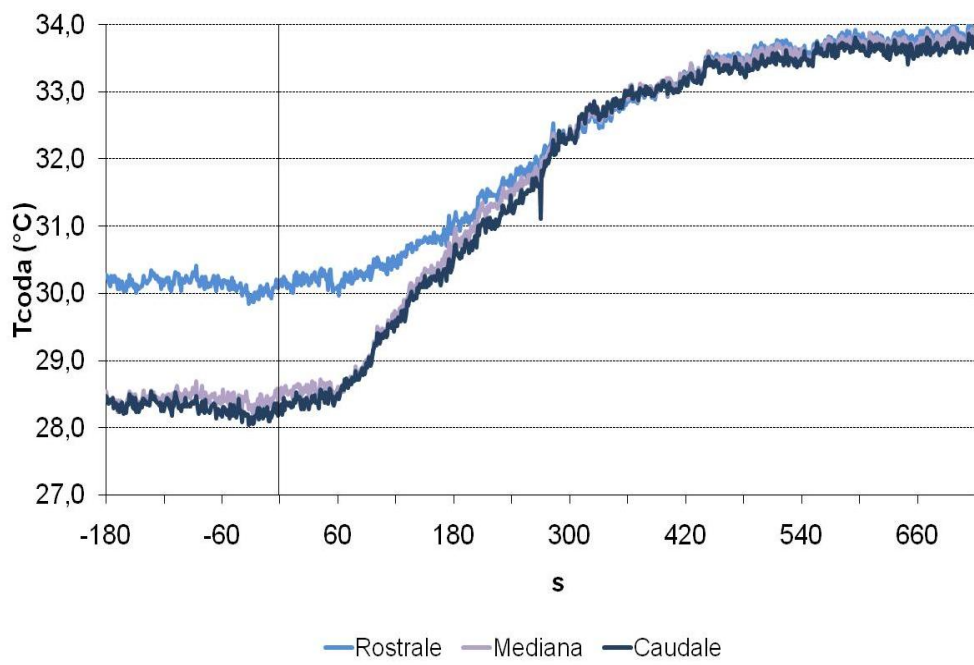
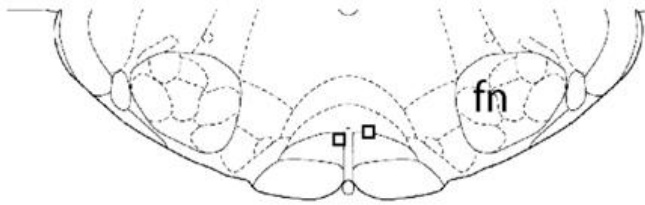
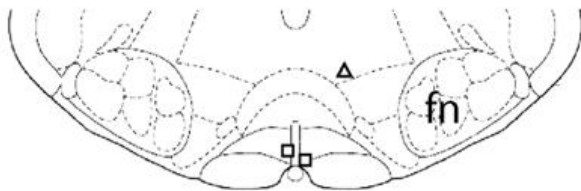


Figura 10 **Variazioni della temperatura in tre differenti regioni della coda.** La figura mostra la variazione di temperatura in tre diverse regioni della coda (rostrale, mediana e caudale) causate dall'iniezione di 100 nl di muscimolo nel RVMM in ratti sotto anestesia generale.

RVMM(fn)

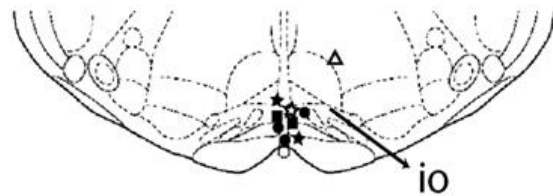


-11.04

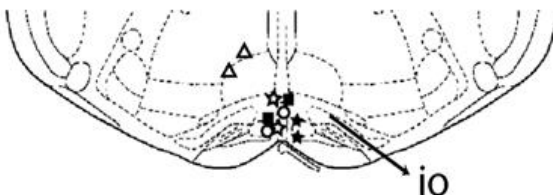


-11.16

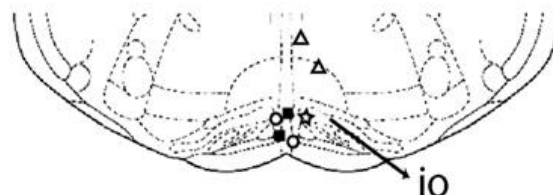
RVMM(io)



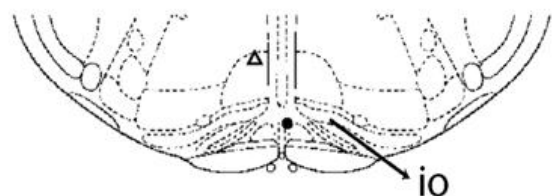
-12.12



-12.24



-12.36



-12.48

- Esperimento A1
- Esperimento A2
- Esperimento B1
- Esperimento B2
- ☆ Esperimento C
- ★ Esperimento D
- △ Nessun effetto

Figura 11 **Diagramma dei siti di iniezione**

Sulle sezioni coronali (atlas of Paxinos and Watson 2005) sono mostrati i siti di iniezione nel RVMM per i vari esperimenti condotti. (fn, nucleo del nervo facciale; io, oliva inferiore)

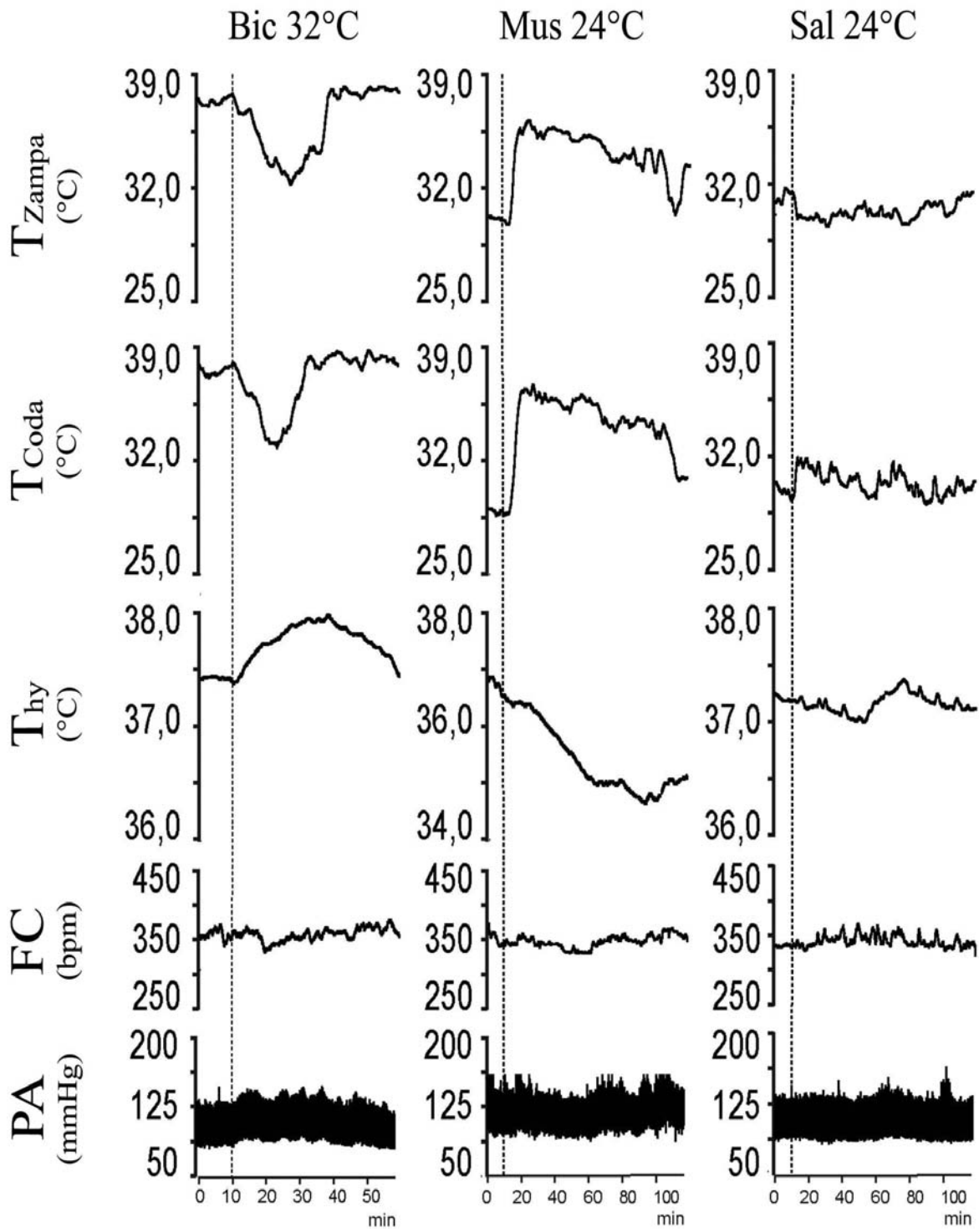


Figura 12 Ruolo dei neuroni del RVMM(fn) nel controllo della vasomozione cutanea.

La figura mostra un esempio dei cambiamenti di temperatura delle zampe (Tzampa), della coda (Tcoda), della temperatura ipotalamica (Thy), della frequenza cardiaca (FC) e della pressione arteriosa (PA), evocate dalla microiniezione nel RVMM(fn) di 100 nl di: bicucullina (1mM, Bic) a Ta di 32°C, muscimolo (1 mM, Mus) a Ta di 24°C e salina (0.9%, Sal) a Ta di 24°C.

In ogni colonna, la linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

RVMM(fn)

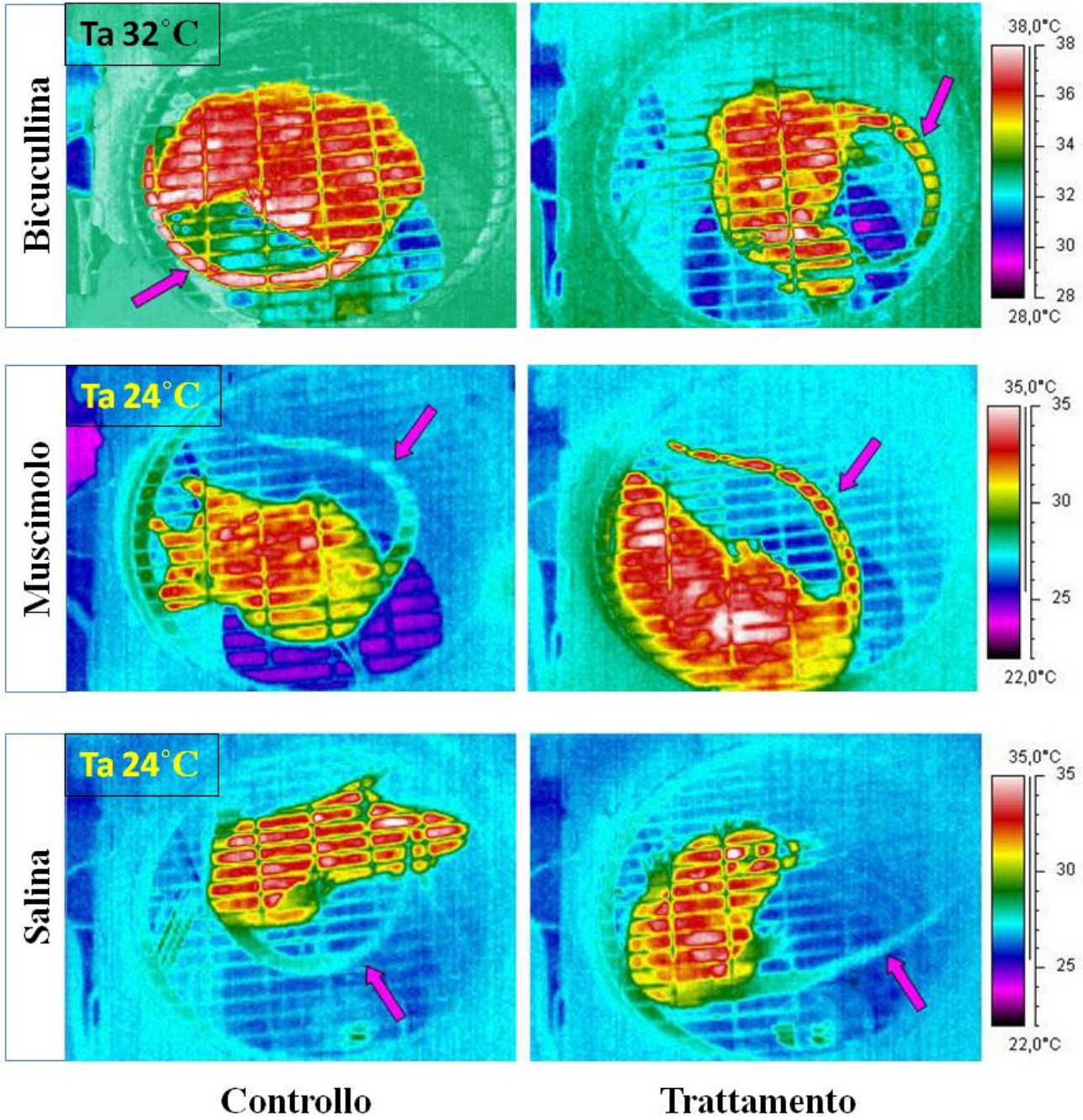


Figura 13 Immagine termografica degli effetti vasomotori cutanei indotti dalla stimolazione farmacologica della RVMM(fn).

La figura mostra le immagini ottenute mediante l'uso di una telecamera per il rilevamento della radiazione infrarossa che permette di visualizzare la temperatura cutanea (indice di flusso ematico agli scambiatori termici come coda e zampe).

Le immagini offrono un confronto del flusso ematico cutaneo tra le fasi precedenti (sinistra) e successive (destra) alla microiniezione nel RVMM(fn) di 100 nl di: bicucullina (1mM) a Ta di 32°C (in alto), muscimolo (1 mM, Mus) a Ta di 24°C (mediano) e salina (0.9%, Sal) a Ta di 24°C (in basso). Le frecce indicano la coda.

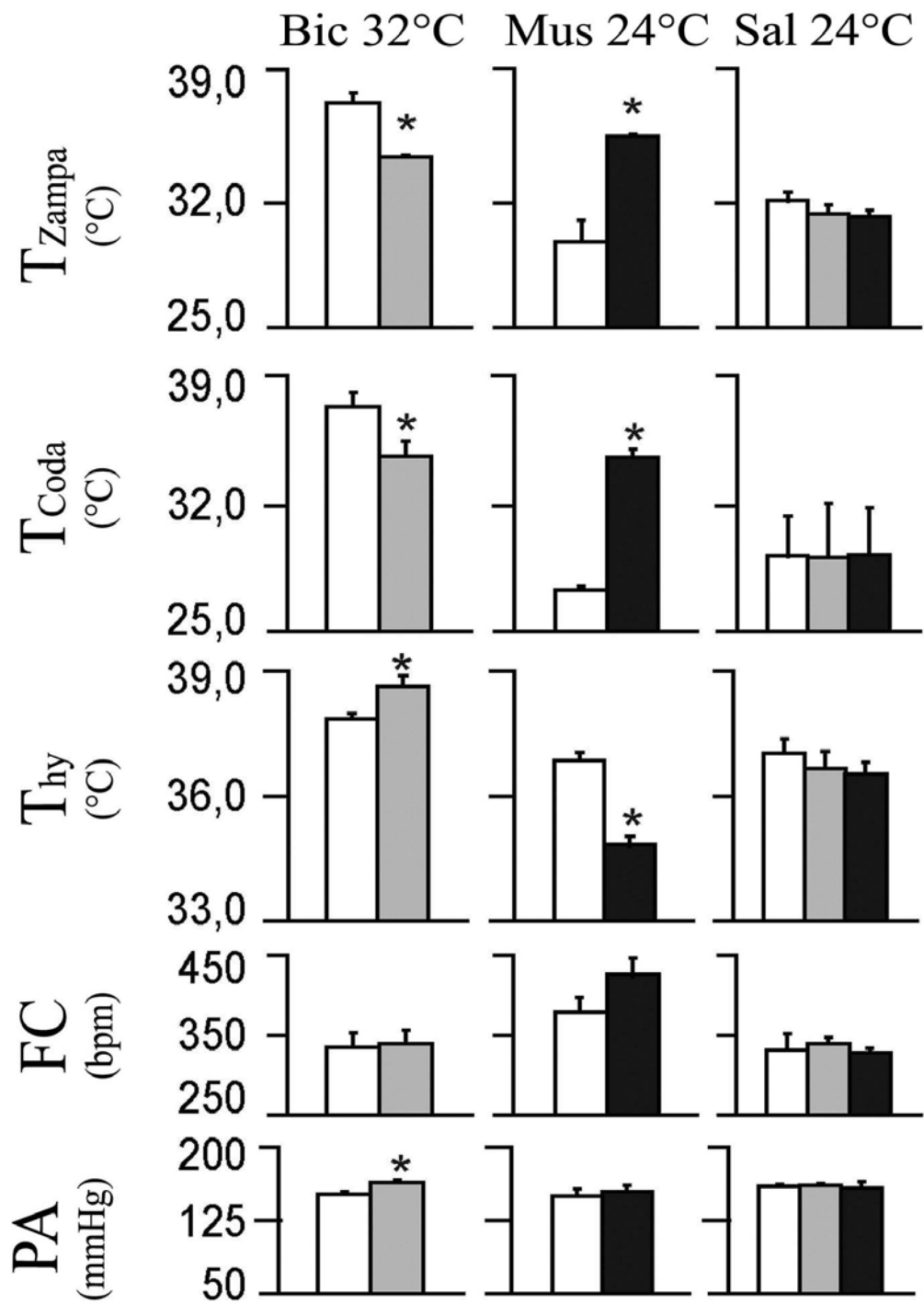


Figura 14 Analisi statistica

La figura mostra la comparazione statistica per Tzampe, Tcoda, Thy, HR e PA tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di bicucullina (colonna grigia) e muscimolo (colonna nera). Per ogni animale, l'effetto dell'iniezione di salina (sal) è stata analizzata comparando il valore medio di ogni variabile nei 10 min prima dell'iniezione di salina (colonna bianca) con il valore medio post iniezione osservato in una finestra di 30 s corrispondente a quella in cui era stata ottenuta la massima risposta (picco) in seguito all'iniezione di bicucullina (Sal, colonna grigia) e muscimolo (Sal, colonna nera). **P*0.05

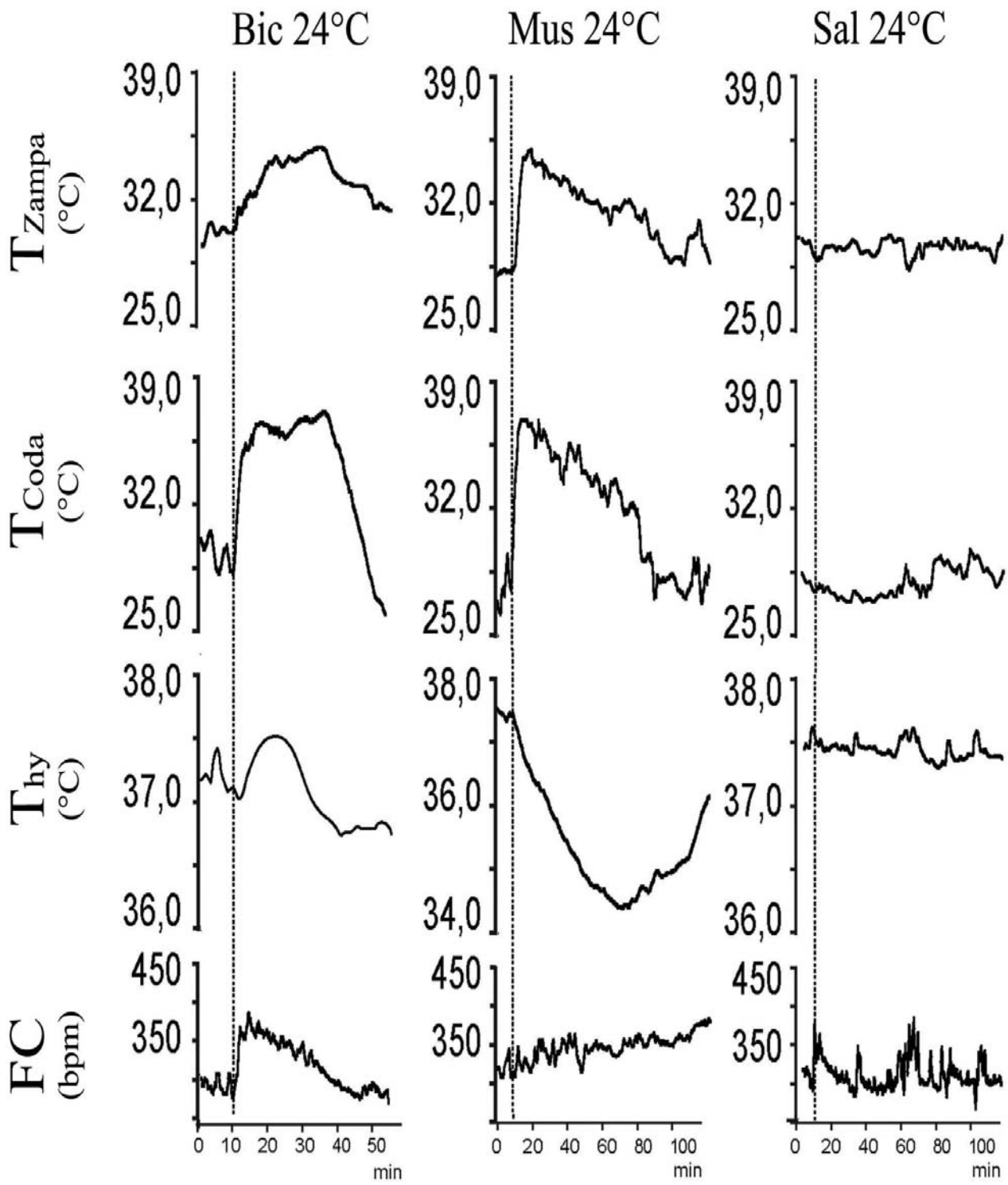


Figura 15 Ruolo dei neuroni del RVMM(io) nel controllo della vasomozione cutanea.

La figura mostra un esempio dei cambiamenti di temperatura delle zampe (Tzampa), della coda (Tcoda), della temperatura ipotalamica (Thy) e della frequenza cardiaca (FC) evocate dalla microiniezione nel RVMM(io) di 100 nl di: bicucullina (1mM, Bic) a Ta di 24°C, muscimolo (1 mM, Mus) a Ta di 24°C e salina (0.9%, Sal) a Ta di 24°C.

In ogni colonna, la linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

RVMM(io)

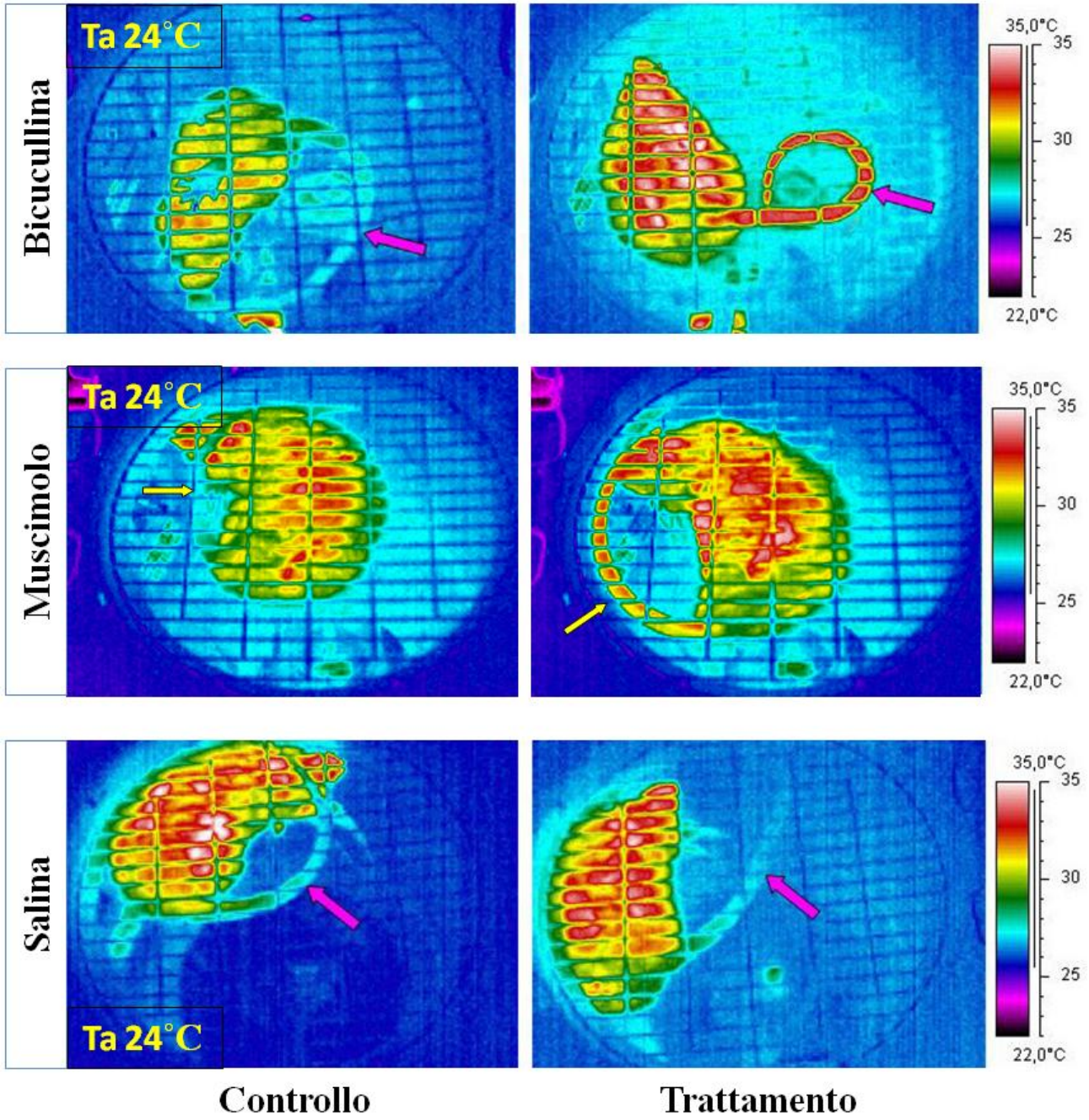


Figura 16 Immagine termografica degli effetti vasomotori cutanei indotti dalla stimolazione farmacologica della RVMM(io).

La figura mostra le immagini ottenute mediante l'uso di una telecamera per il rilevamento della radiazione infrarossa che permette di visualizzare la temperatura cutanea (indice di flusso ematico agli scambiatori termici come coda e zampe).

Le immagini offrono un confronto del flusso ematico cutaneo tra le fasi precedenti (sinistra) e successive (destra) alla microiniezione nel RVMM(io) di 100 nl di: bicucullina (1mM, Bic) a Ta di 24°C (in alto), muscimolo (1 mM, Mus) a Ta di 24°C (mediano) e salina (0.9%, Sal) a Ta di 24°C. (in basso). Le frecce indicano la coda.

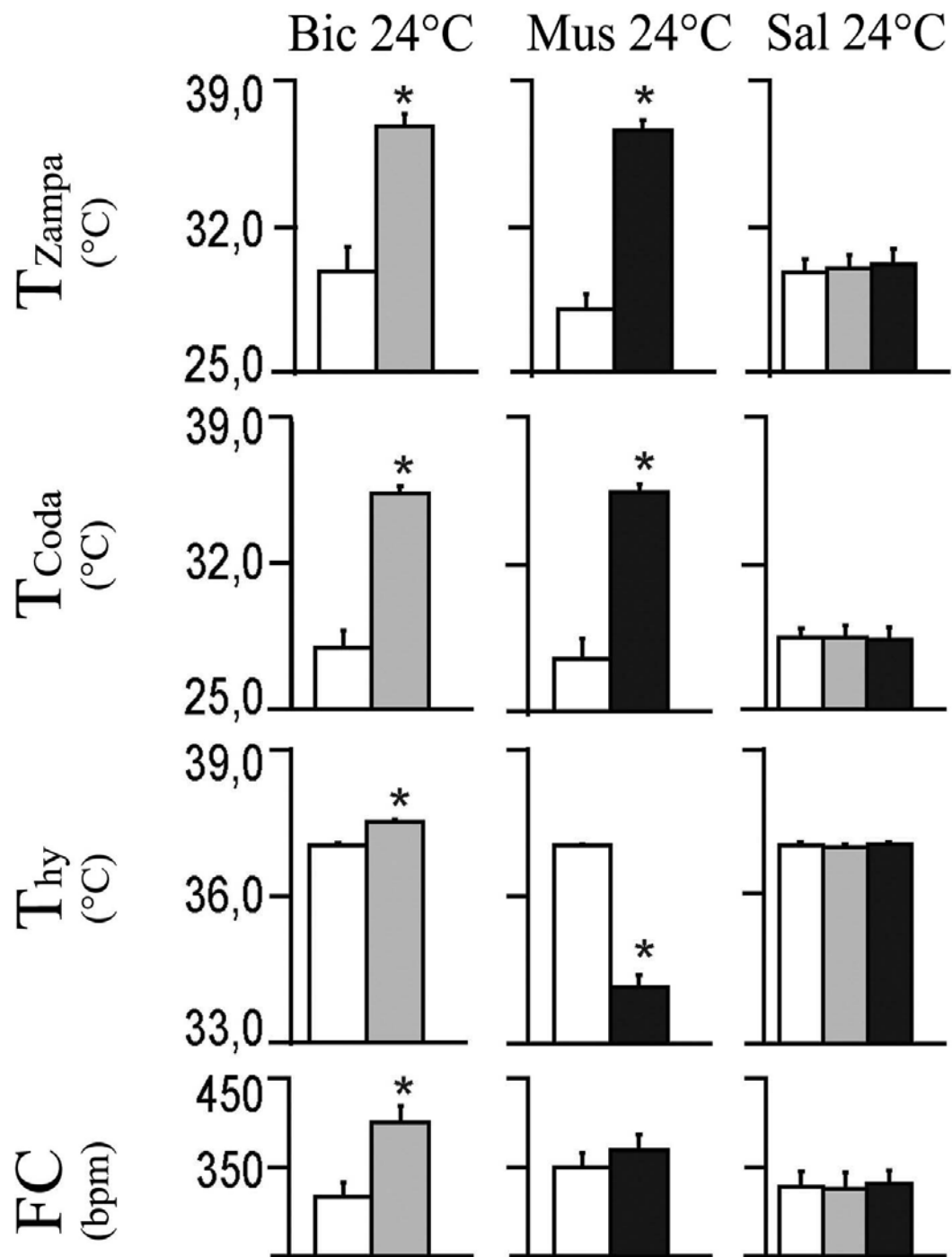


Figura 17 Analisi statistica

La figura mostra la comparazione statistica per Tzampe, Tcoda, Thy e HR tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di bicucullina (colonna grigia) e muscimolo (colonna nera). Per ogni animale, l'effetto dell'iniezione di salina (sal) è stata analizzata comparando il valore medio di ogni variabile nei 10 min prima dell'iniezione di salina (colonna bianca) con il valore medio post iniezione osservato in una finestra di 30 s corrispondente a quella in cui era stata ottenuta la massima risposta (picco) in seguito all'iniezione di bicucullina (Sal, colonna grigia) e muscimolo (Sal, colonna nera). **P*0.05

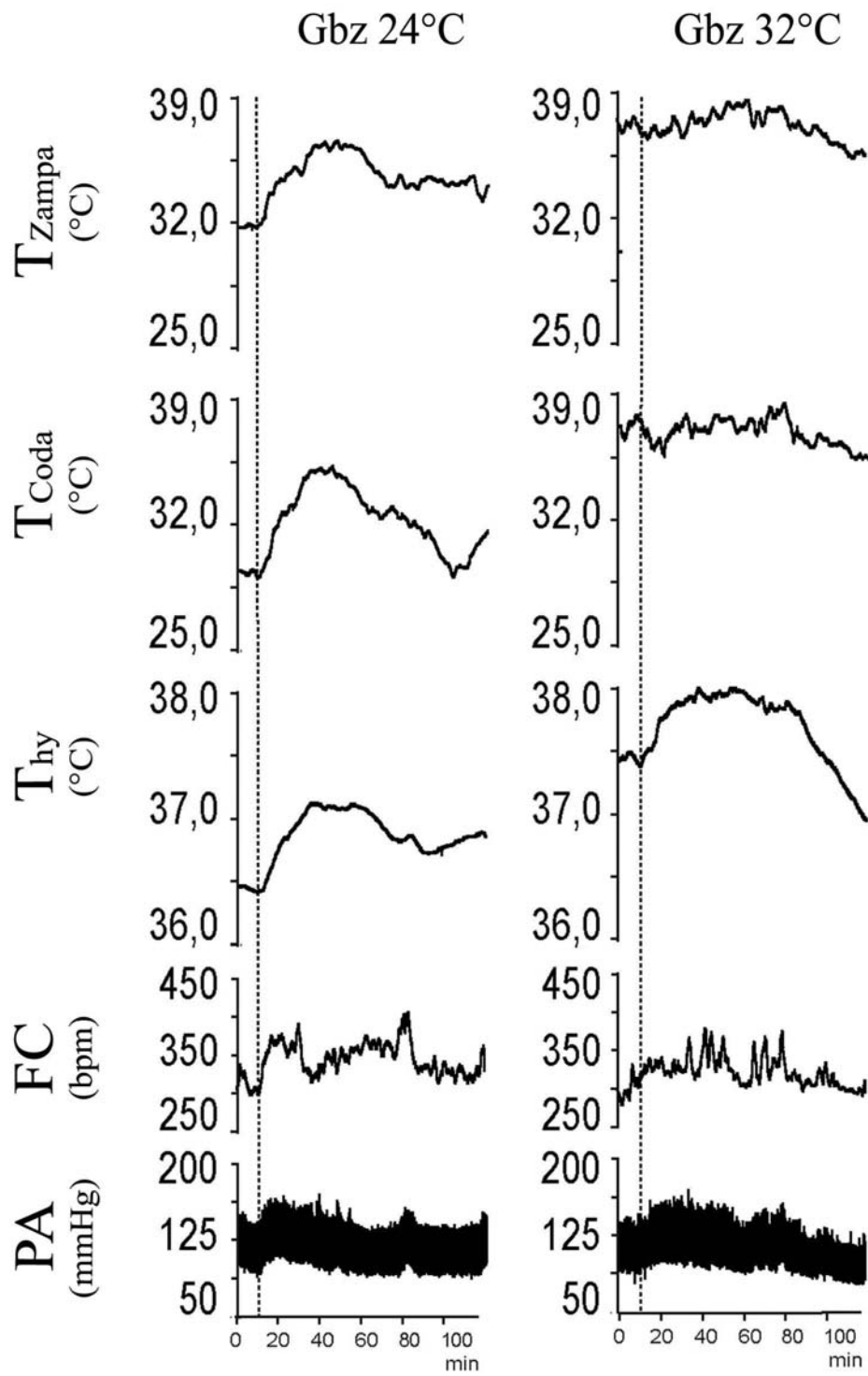


Figura 18 Ruolo dei neuroni del RVMM(io) nel controllo della vasodilatazione a livello cutaneo indotta dall'esposizione al caldo.

La figura mostra un esempio dei cambiamenti di temperatura delle zampe (Tzampa), della coda (Tcoda), della temperatura ipotalamica (Thy), della frequenza cardiaca (FC) e della pressione arteriosa (PA) evocate dalla microiniezione nel RVMM(io) di 100 nl di GABAzina (0.5 mM, Gbz) a Ta di 24 °C e GABAzina (0.5 mM, Gbz) at Ta 32 °C.

In ogni colonna, la linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

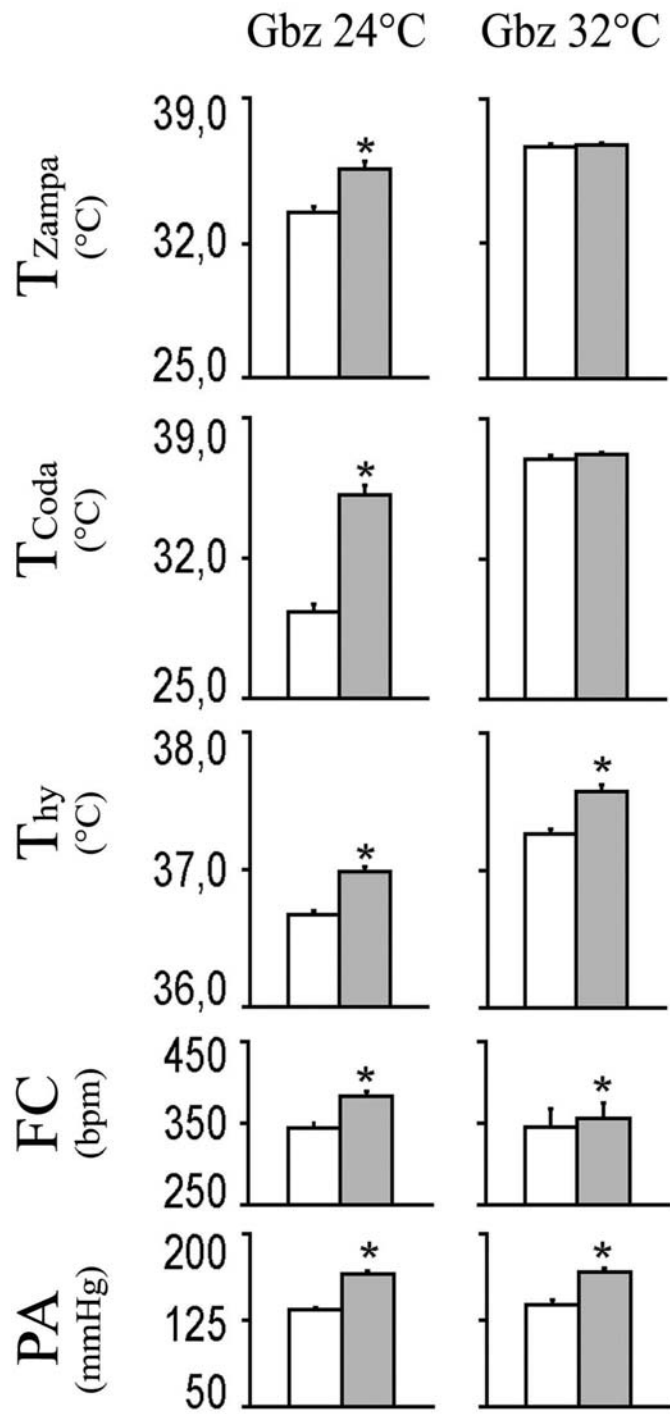


Figura 19 Analisi statistica

La figura mostra la comparazione statistica per Tzampe, Tcoda, Thy, HR e PA tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di GABAzina a 24 °C e GABAzina a 32 °C (colonna grigia).

**P0.05*

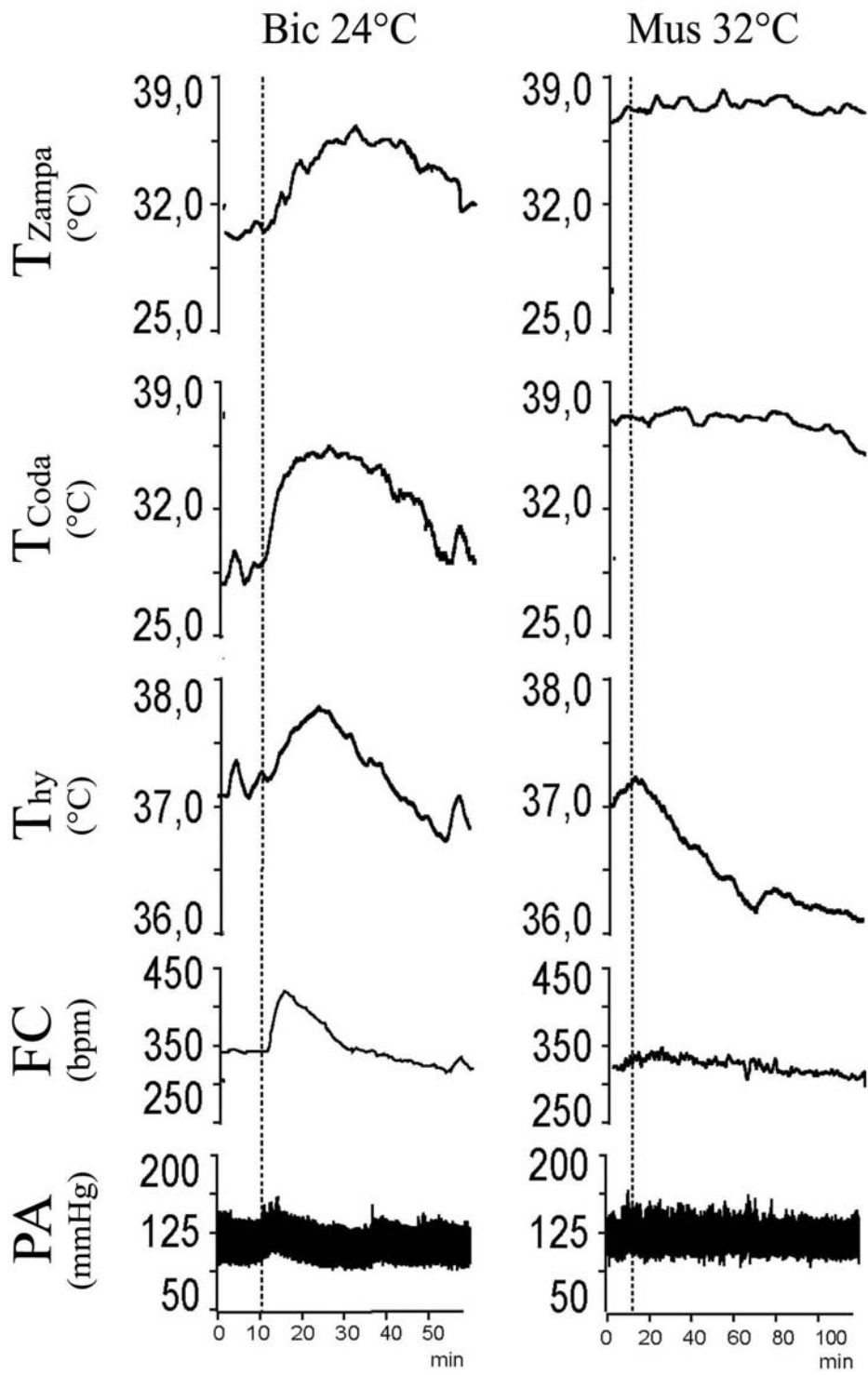


Figura 20 Ruolo dei neuroni del RVMM(io) nel controllo della vasodilatazione a livello cutaneo indotta dall'esposizione al caldo.

La figura mostra un esempio dei cambiamenti della temperatura delle zampe (Tzampa), della coda (Tcoda), della temperatura ipotalamica (Thy), della frequenza cardiaca (FC) e della pressione arteriosa (PA) evocate dalla microiniezione nel RVMM(io) di 100 nl di: bicucullina (1 mM, Bic) a Ta 24 °C e muscimolo (1 mM, Mus) a Ta 32 °C.

In ogni colonna, la linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

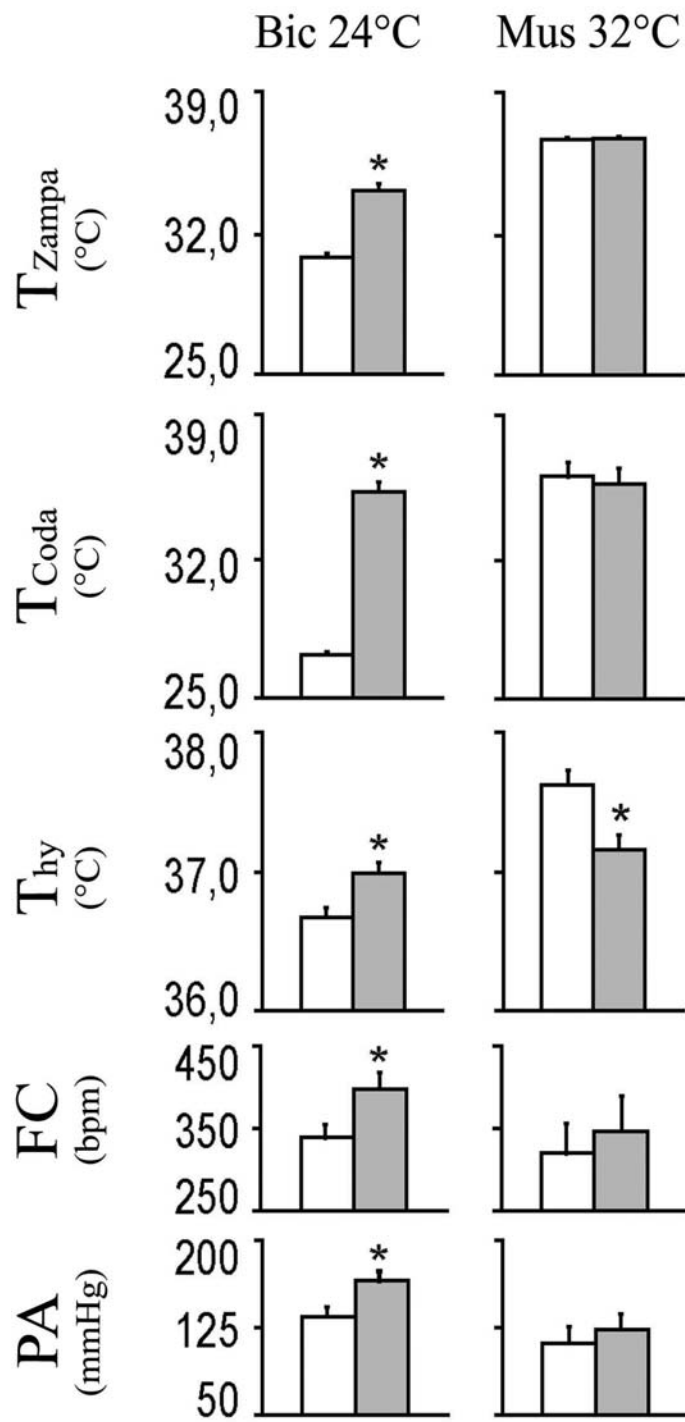


Figura 21 Analisi statistica

La figura mostra la comparazione statistica per Tzampe, Tcoda, Thy, HR e PA tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di: bicucullina (1 mM, Bic) a Ta 24 °C e muscimolo (1 mM, Mus) a Ta 32 °C (colonna grigia). **P*0.05

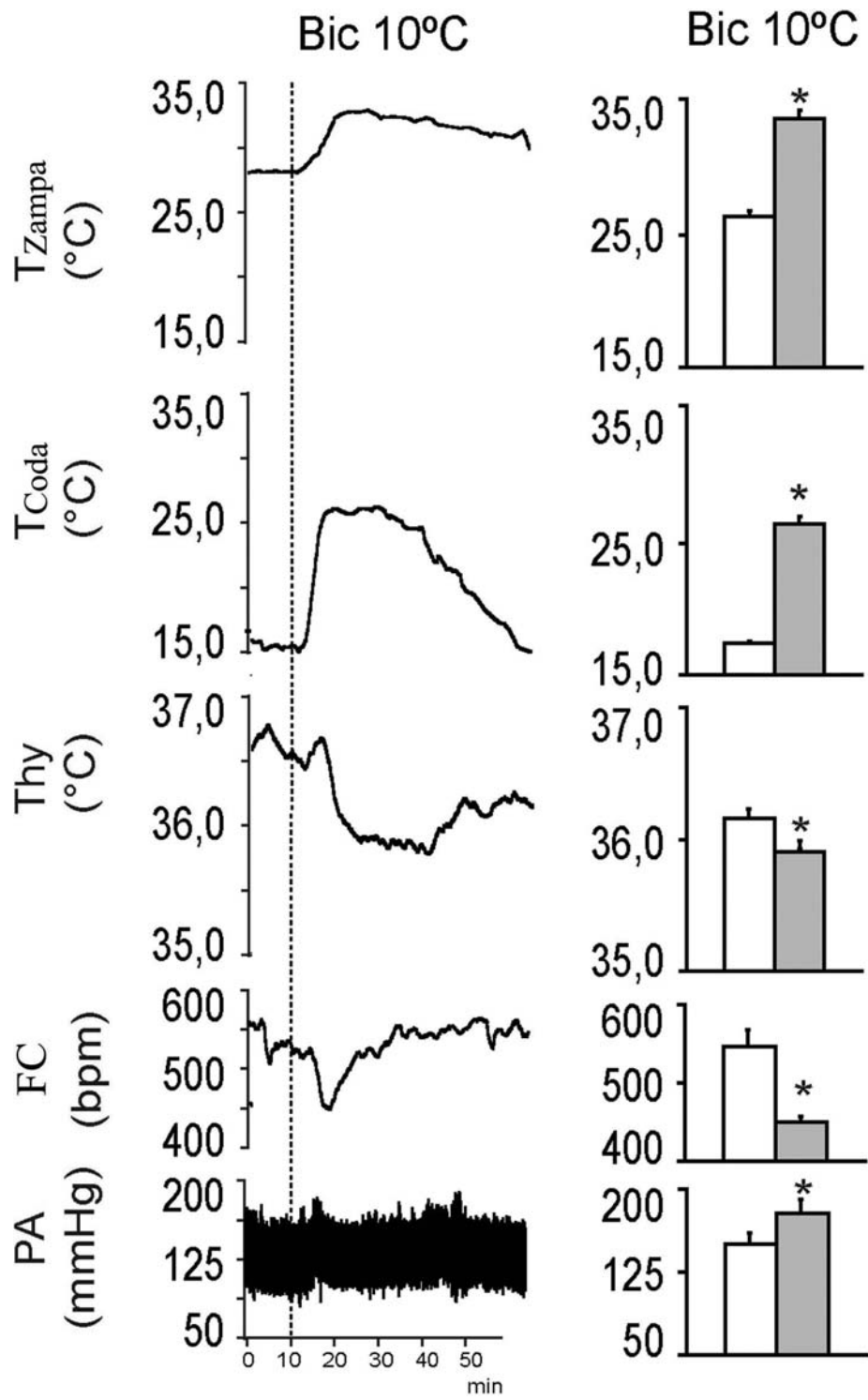


Figura 22 Effetti indotti dalla disinibizione dei neuroni del RVMM(io) durante l'esposizione a Ta 10°C.

La figura a sinistra mostra un esempio dei cambiamenti della temperatura delle zampe (Tzampa), della coda (Tcoda), della temperatura ipotalamica (Thy), della frequenza cardiaca (FC) e della pressione arteriosa (PA) evocate dalla microiniezione nel RVMM(io) di 100 nl di bicucullina (1 mM, Bic) a Ta 10°C. La linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

La figura a destra mostra la comparazione statistica per Tzampe, Tcoda, Thy, HR e PA tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di bicucullina (1 mM, Bic) a Ta 10 °C (colonna grigia). **P*0.05

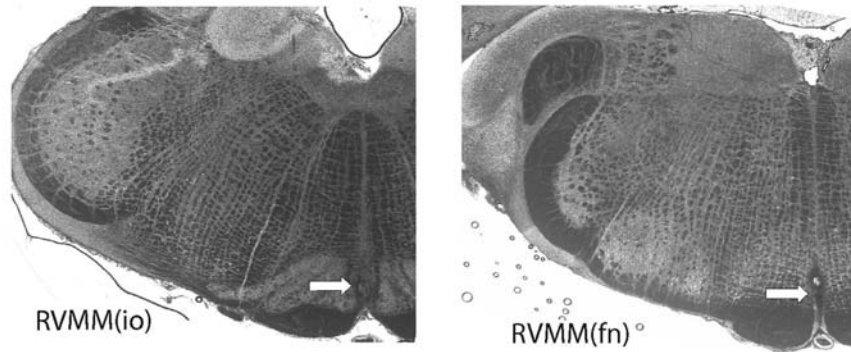
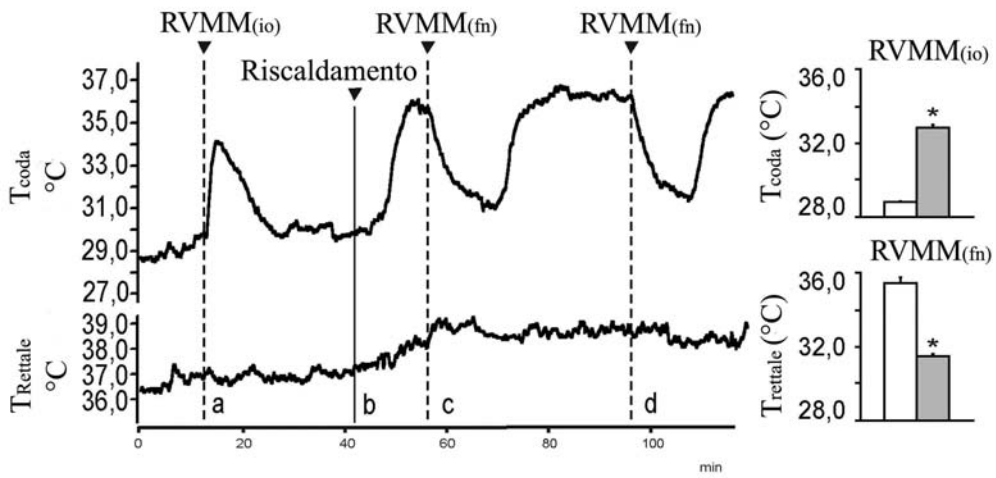


Figura 23 Effetti vasomotori sulla coda indotti dalla disinibizione dei neuroni del RVMM(fn) o del RVMM(io) nel ratto in anestesia generale.

La figura in alto a sinistra mostra un esempio dei cambiamenti della temperatura della coda (T_{coda}) evocati dalla microiniezione di 60 nl di bicucullina (0.25 mM, Bic) nella RVMM(fn) (linea tratteggiata a) o nella RVMM(io) (linea tratteggiata c and d) nel ratto sotto anestesia generale. In corrispondenza della nera (b), la temperatura centrale dell'animale (T_c) è stata aumentata a 38.5°C.

La figura in alto a destra mostra la comparazione statistica per T_{coda} tra i dieci minuti prima della microiniezione (colonna bianca) e il picco preso all'interno di una finestra di 30 secondi al nadir della risposta evocata dall'iniezione di bicucullina o nella RVMM(io) o nella RVMM(fn) (colonna grigia). **P*0.05.

La figura in basso mostra due sezioni istologiche coronali a livello della RVMM(io) (sinistra) e della RVMM(fn) (destra) in cui sono visibili i siti di iniezione (freccie bianche).

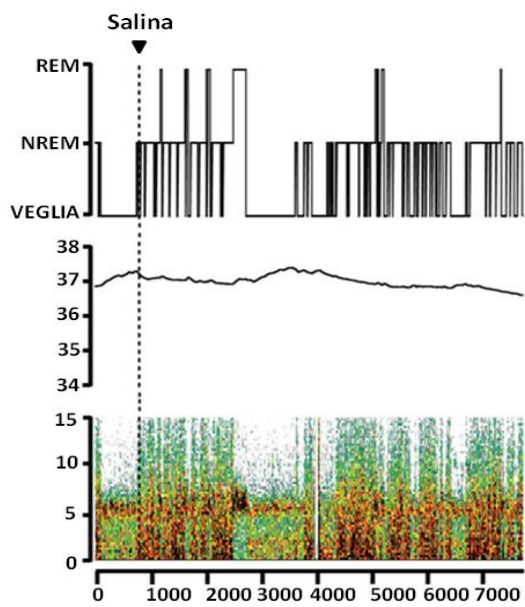
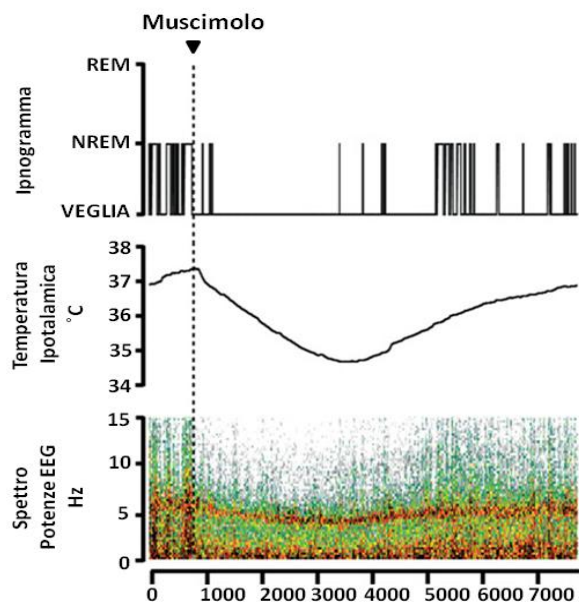
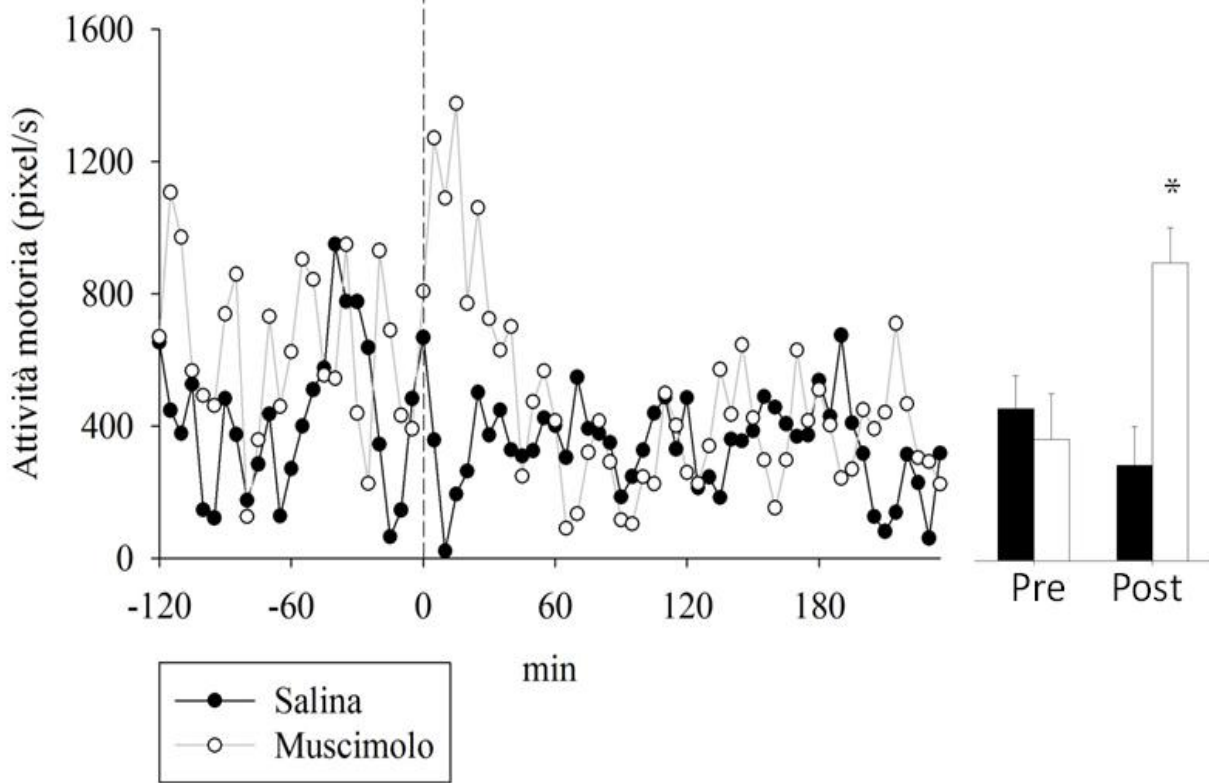
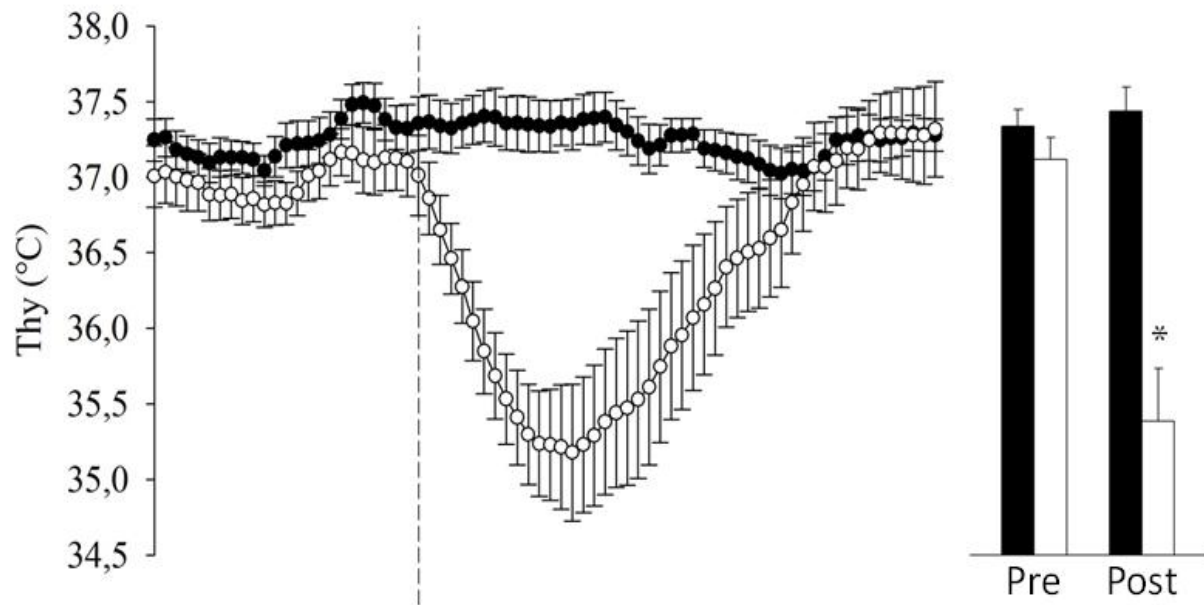


Figura 24 Effetti ipnici indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni della RVMM

La figura mostra un esempio dei cambiamenti sulla temperatura ipotalamica, sul ciclo veglia sonno e sull'attività spettrale elettroencefalografica evocate dalla microiniezione nella RVMM di 100 nl di: muscimolo (1 mM) e salina (0.9%) a Ta 24 °C. Sono riportati dall'alto verso il basso l'ipnogramma, la temperatura ipotalamica e lo spettro delle potenze EEG. La scala cromatica indica la potenza dello spettro (alta-nero, bassa-bianco). La linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione. Si nota uno spostamento del picco delle frequenze della banda theta durante lo stato ipotermico indotto dall'inibizione della RVMM.



● Salina
○ Muscimolo

Figura 25 Effetti sulla temperatura centrale e sull'attività motoria indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni della RVMM

La figura mostra i cambiamenti della temperatura ipotalamica e dell'attività motoria evocate dalla microiniezione nella RVMM di 100 nl di: muscimolo (1 mM) e salina (0.9%) a Ta 24 °C. La linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

A destra sono mostrate le comparazioni statistiche tra i 120 minuti precedenti la microiniezione (pre) di salina (colonna nera) e muscimolo (colonna bianca) e i 60 minuti seguenti l'iniezione (post). **P*0.05

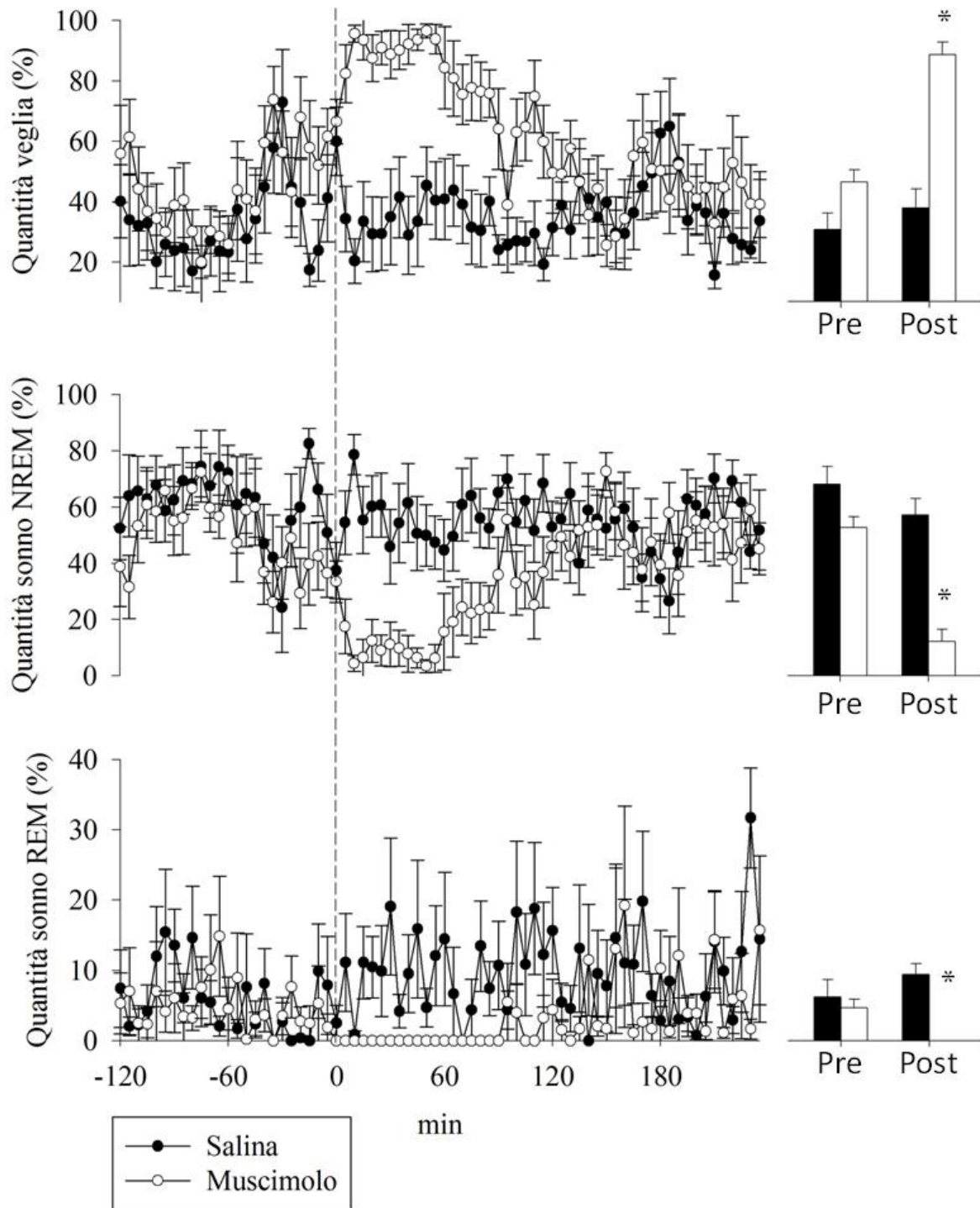


Figura 26 Effetti sulle variabili ipniche indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni della RVMM

La figura mostra i cambiamenti dell'ammontare della veglia, del sonno NREM e del sonno REM in seguito alla microiniezione nella RVMM di 100 nl di: muscimolo (1 mM) e salina (0.9%) a Ta 24 °C. La linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione.

A destra sono mostrate le comparazioni statistiche tra i 120 minuti precedenti la microiniezione (pre) di salina (colonna nera) e muscimolo (colonna bianca) e i 60 minuti seguenti l'iniezione (post). **P*0.05

REM cumulativo

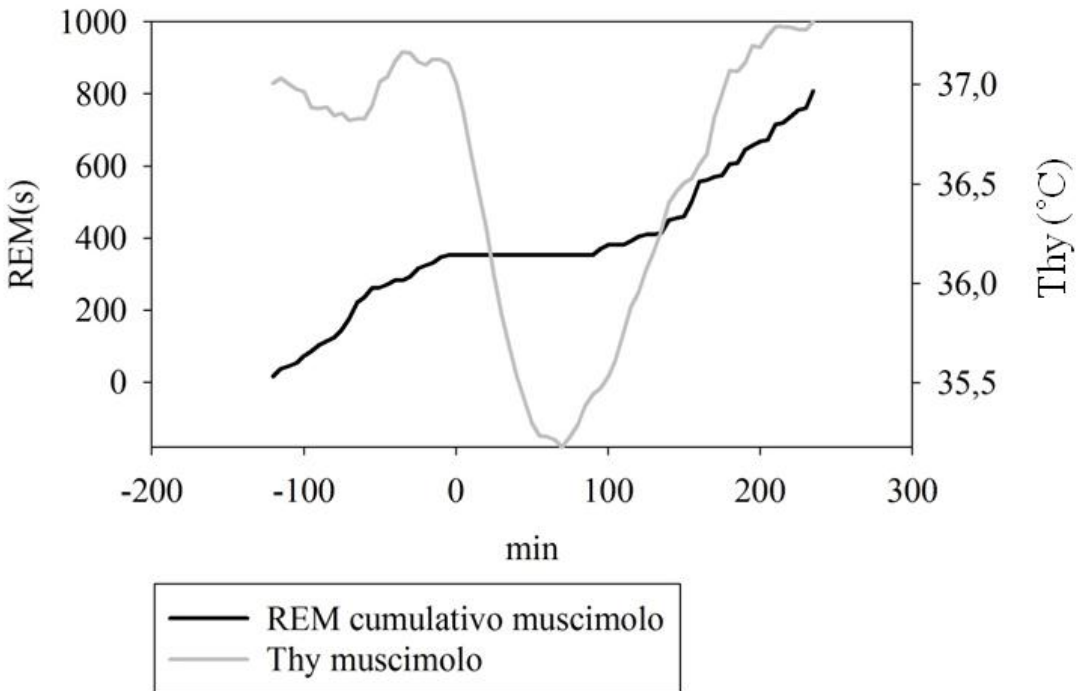
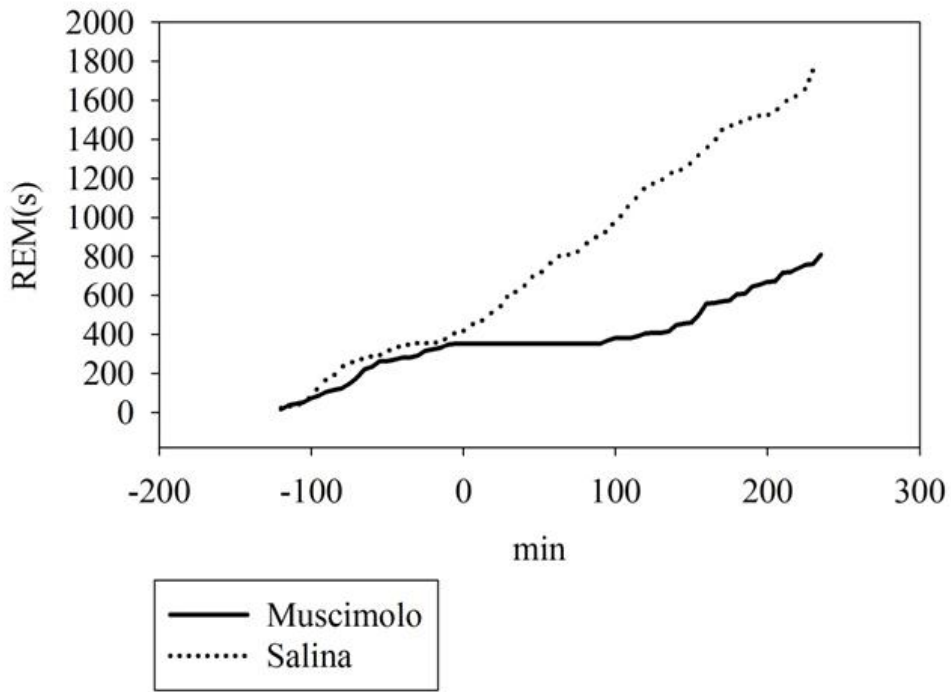


Figura 27 Dinamica della comparsa di sonno REM

La figura in alto mostra l'ammontare (secondi) di sonno REM cumulativo negli animali iniettati con muscimolo (linea nera) e salina (linea tratteggiata) nel RVMM a Ta 24 °C.

La figura in basso mostra la relazione temporale tra la quantità di sonno REM cumulativa (linea nera) e la variazione della temperatura ipotalamica (linea grigia) precedente e successiva alla microiniezione nella RVMM di 100 nl di muscimolo (1 mM) a Ta 24 °C.

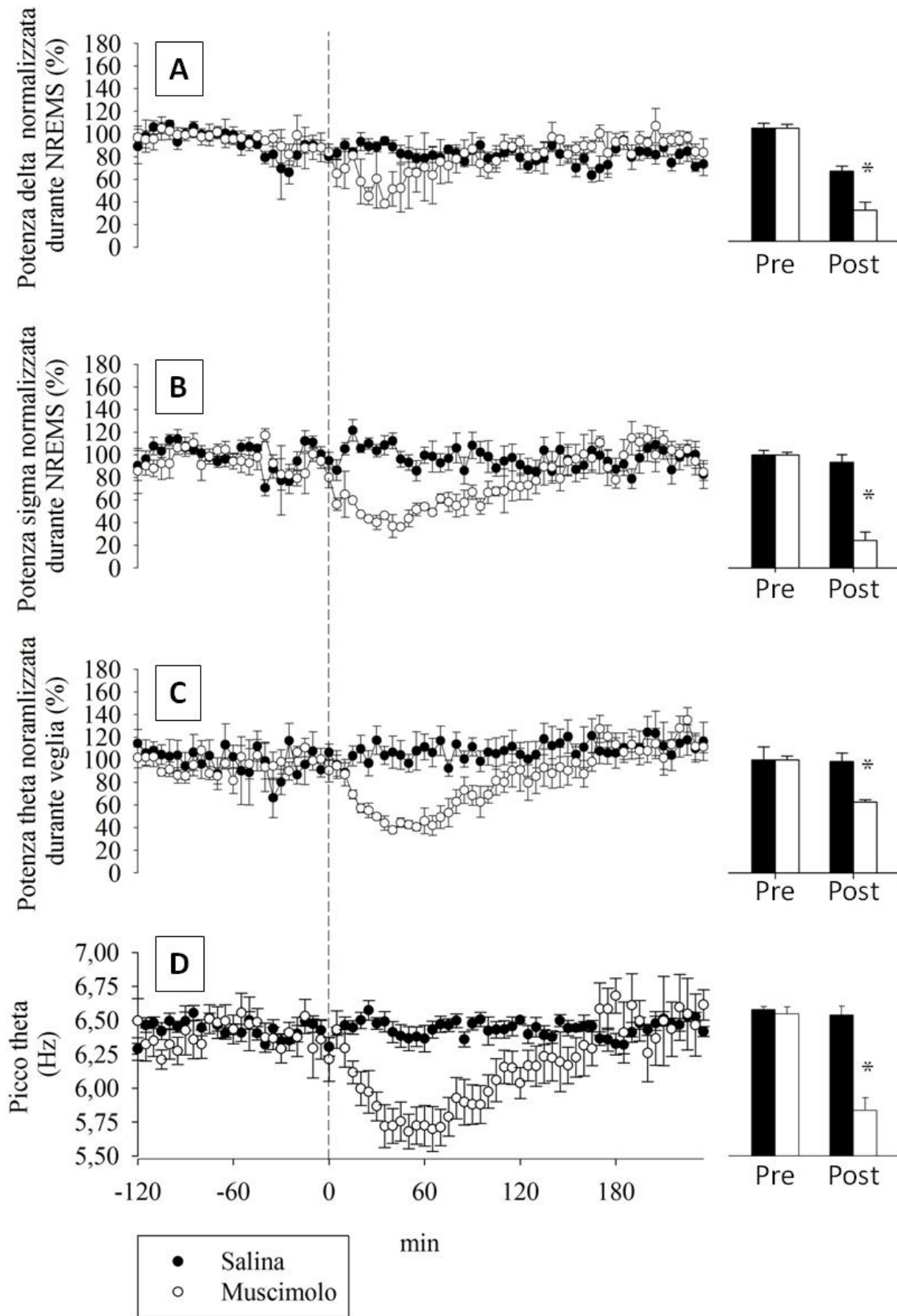


Figura 28 Effetti sull'attività EEG indotti dall'inibizione farmacologica dei neuroni della RVMM

La figura mostra un esempio dei cambiamenti delle bande di frequenza EEG (delta, sigma, theta) e del picco spettrale all'interno della banda theta, evocate dalla microiniezione nella RVMM di 100 nl di: muscimolo (1 mM) e salina (0.9%) a Ta 24 °C. La linea tratteggiata verticale indica il momento dell'iniezione. A destra sono mostrate le comparazioni statistiche tra i 120 minuti precedenti la microiniezione (pre) di salina (colonna nera) e muscimolo (colonna bianca) e i 60 minuti seguenti l'iniezione (post). **P*0.05

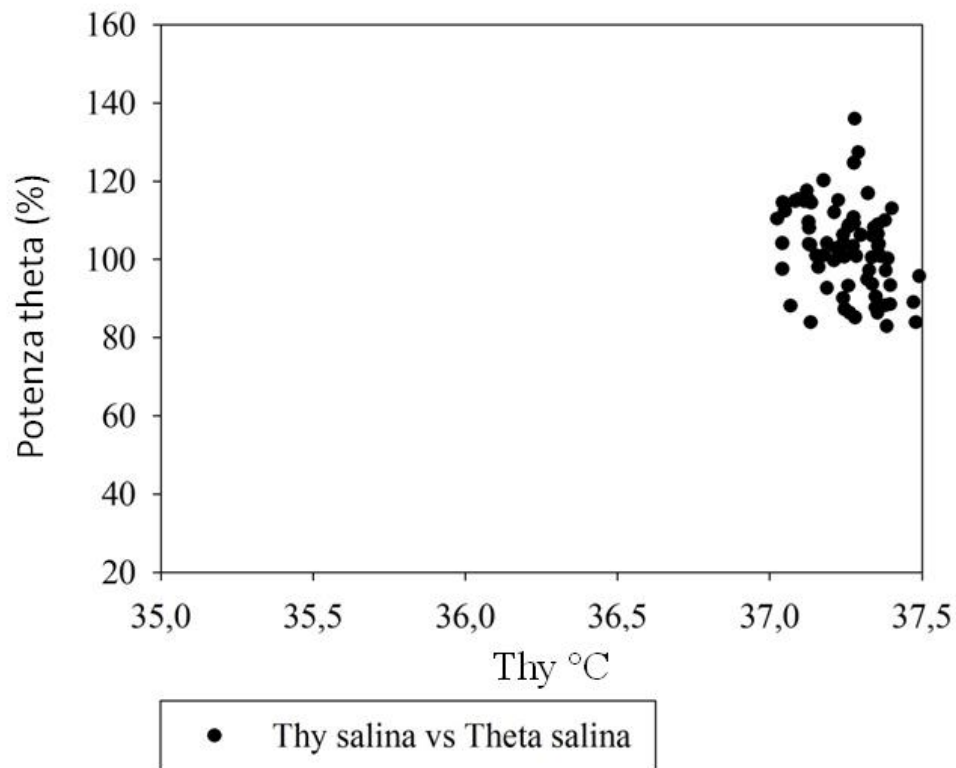
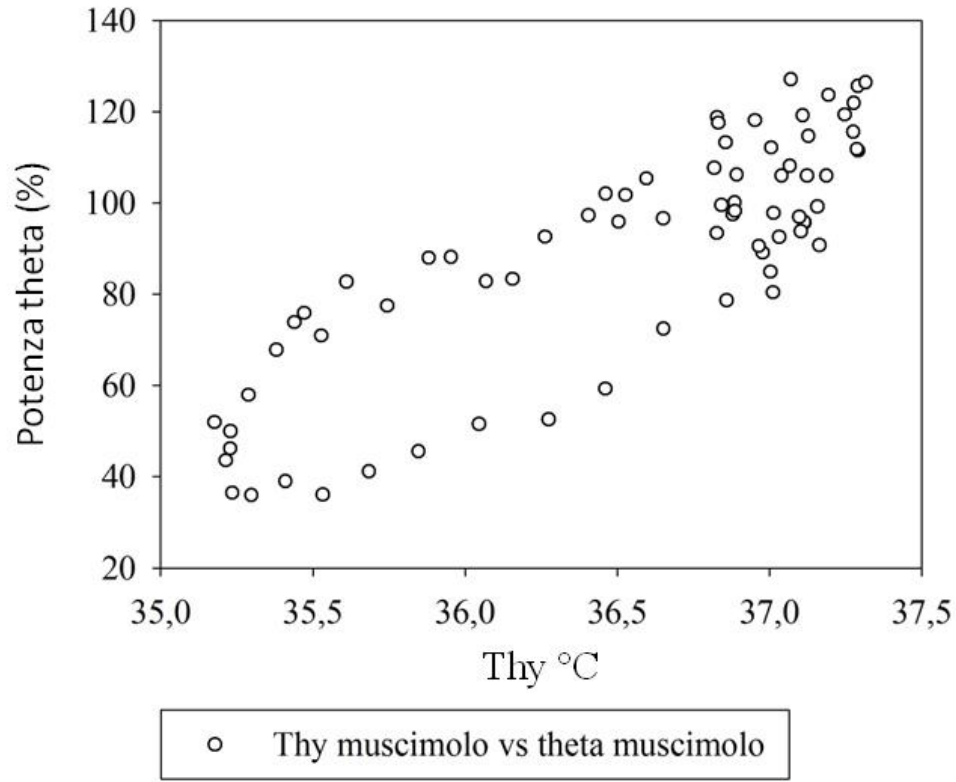
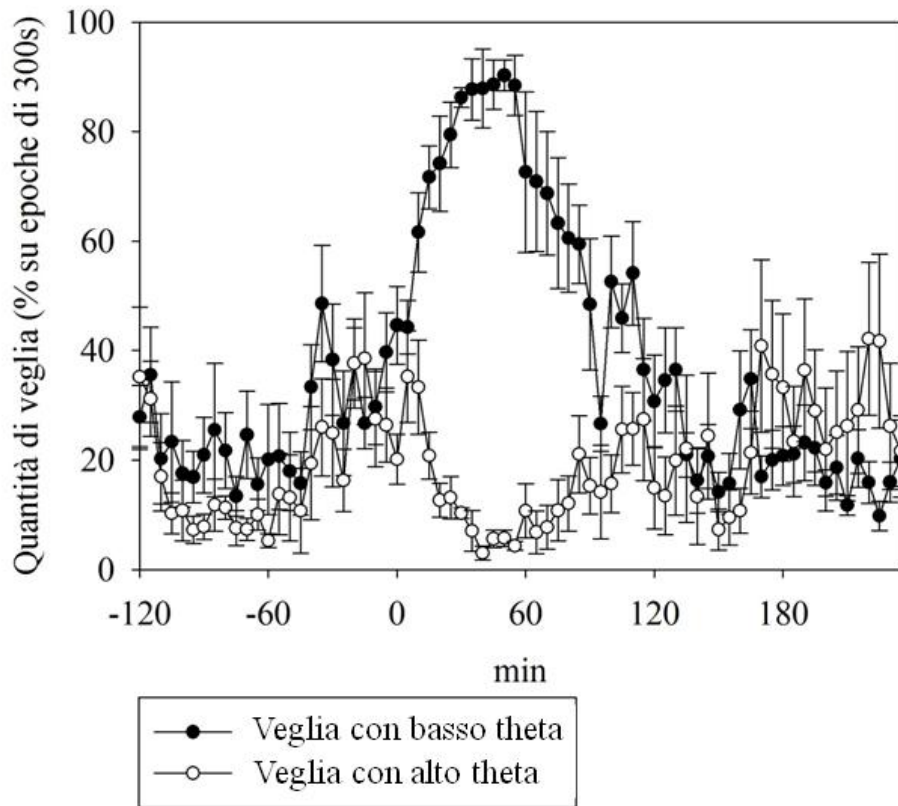


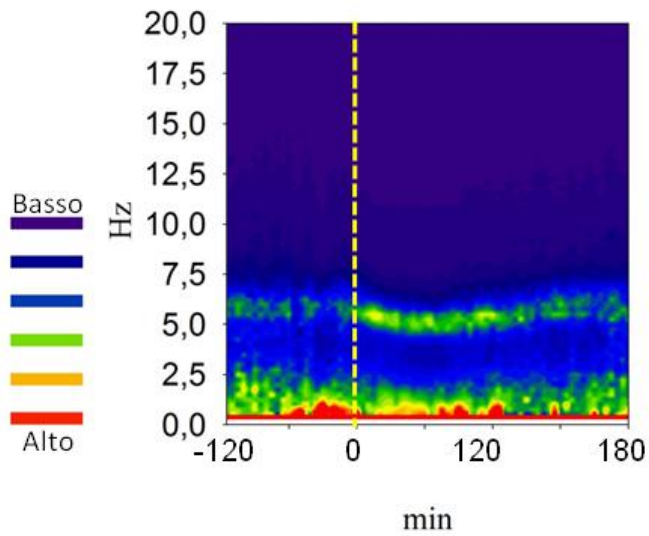
Figura 29 **Distribuzione XY potenza theta vs Thy**

La figura mostra la correlazione fra la temperatura ipotalamica e la potenza della banda di frequenza theta negli animali iniettati con muscimolo (alto) e salina (basso) nel RVMM.

Quantità di veglia ad alto e basso theta



Densità spettrale EEG media durante veglia basso theta



Densità spettrale EEG media durante veglia alto theta

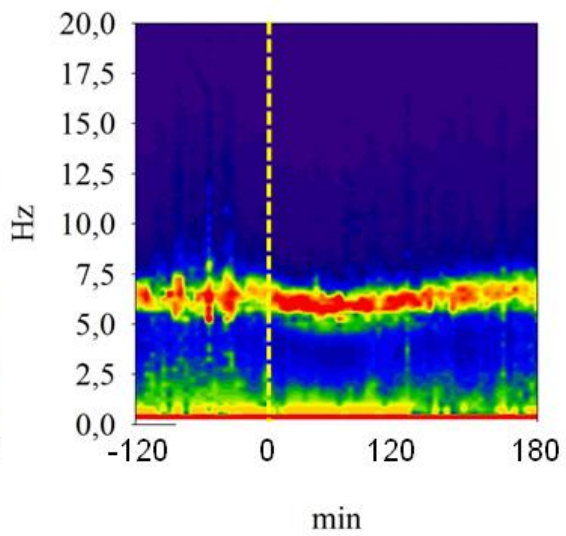


Figura 30

La figura in alto mostra la quantità di veglia, espressa in percentuale su epoche di 300 secondi, relativa agli episodi con alta e bassa potenza della banda di frequenza theta precedente e successiva alla microiniezione nella RVMM(fn) di 100 nl di muscimolo (1 mM) a Ta 24 °C.

In basso sono mostrati gli spettri di frequenza EEG, relativi agli episodi di veglia a basso (sinistra) ed alto (destra) theta. La linea tratteggiata gialla indica il momento dell'iniezione.

BIBLIOGRAFIA

- Amici R, Cerri M, Ocampo-Garces A, Baracchi F, Dentico D, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL, Zamboni G (Cold exposure and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size. *Sleep* 31:708-715.2008).
- Bicego KC, Barros RC, Branco LG (Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147:616-639.2007).
- Blessing WW, Nalivaiko E (Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. *Neuroscience* 105:923-929.2001).
- Blessing WW, Yu YH, Nalivaiko E (Raphe pallidus and parapyramidal neurons regulate ear pinna vascular conductance in the rabbit. *Neurosci Lett* 270:33-36.1999).
- Borbely AA (From slow waves to sleep homeostasis: new perspectives. *Arch Ital Biol* 139:53-61.2001).
- Boulant JA (Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* 100:1347-1354.2006).
- Brown JW, Sirlin EA, Benoit AM, Hoffman JM, Darnall RA (Activation of 5-HT1A receptors in medullary raphe disrupts sleep and decreases shivering during cooling in the conscious piglet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R884-894.2008).
- Cannon B, Nedergaard J (Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359.2004).
- Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF (Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* 460:303-326.2003).
- Cerri M, Ocampo-Garces A, Amici R, Baracchi F, Capitani P, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL, Zamboni G (Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep* 28:694-705.2005).
- Collin A, Buyse J, van As P, Darras VM, Malheiros RD, Moraes VM, Reyns GE, Taouis M, Decuypere E (Cold-induced enhancement of avian uncoupling

- protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *General and comparative endocrinology* 130:70-77.2003).
- Craig AD (How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* 3:655-666.2002).
- Dampney RA (Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74:323-364.1994).
- Dampney RA, Blessing WW, Tan E (Origin of tonic GABAergic inputs to vasopressor neurons in the subretrofacial nucleus of the rabbit. *J Auton Nerv Syst* 24:227-239.1988).
- Deboer T (Brain temperature dependent changes in the electroencephalogram power spectrum of humans and animals. *J Sleep Res* 7:254-262.1998).
- Dulloo AG, Samec S, Seydoux J (Uncoupling protein 3 and fatty acid metabolism. *Biochemical Society transactions* 29:785-791.2001).
- Forster RE, Ferguson TB (Relationship between hypothalamic temperature and thermo-regulatory effectors in unanesthetized cat. *Am J Physiol* 169:255-269.1952).
- Glotzbach SF, Heller HC (Central nervous regulation of body temperature during sleep. *Science* 194:537-539.1976).
- Gordon CJ (Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* 47:963-991.1990).
- Hellstrom B, Hammel HT (Some characteristics of temperature regulation in the unanesthetized dog. *Am J Physiol* 213:547-556.1967).
- Kerman IA, Akil H, Watson SJ (Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study. *J Neurosci* 26:3423-3433.2006).
- Krauchi K, Deboer T (The interrelationship between sleep regulation and thermoregulation. *Front Biosci* 15:604-625.2010).
- Lomax P, Malveaux E, Smith RE (Brain Temperatures in the Rat during Exposure to Low Environmental Temperatures. *Am J Physiol* 207:736-739.1964).
- Mancia M (1996) *Sonno & sogno*. Bari: Gius. Laterza & Figli.

- McAllen RM (Action and specificity of ventral medullary vasopressor neurones in the cat. *Neuroscience* 18:51-59.1986).
- McAllen RM, Neil JJ, Loewy AD (Effects of kainic acid applied to the ventral surface of the medulla oblongata on vasomotor tone, the baroreceptor reflex and hypothalamic autonomic responses. *Brain Res* 238:65-76.1982).
- Morrison SF (RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276:R962-973.1999).
- Morrison SF (Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience* 121:17-24.2003).
- Morrison SF, Nakamura K (Central neural pathways for thermoregulation. in press.2010).
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ (Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93:773-797.2008).
- Nakamura K, Matsumura K, Hubschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, Boldogkoi Z, Konig M, Thiel HJ, Gerstberger R, Kobayashi S, Kaneko T (Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci* 24:5370-5380.2004).
- Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S, Kaneko T (Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neurosci Res* 51:1-8.2005).
- Nakamura K, Morrison SF (Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R127-136.2007).
- Nakamura K, Morrison SF (A thermosensory pathway mediating heat defense response. *PNAS* in press.2010).
- Nakayama T, Hammel HT, Hardy JD, Eisenman JS (Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. *Am J Physiol* 204:1122-1126.1963).

- Ninomiya H (The vascular bed in the rabbit ear: microangiography and scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Anat Histol Embryol* 29:301-305.2000).
- Ootsuka Y, Blessing WW (Inhibition of medullary raphe/parapyramidal neurons prevents cutaneous vasoconstriction elicited by alerting stimuli and by cold exposure in conscious rabbits. *Brain Res* 1051:189-193.2005).
- Ootsuka Y, Blessing WW, McAllen RM (Inhibition of rostral medullary raphe neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries. *Neurosci Lett* 357:58-62.2004).
- Owens NC, Ootsuka Y, Kanosue K, McAllen RM (Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail. *J Physiol* 543:849-858.2002).
- Parmeggiani PL (Thermoregulation and sleep. *Front Biosci* 8:s557-567.2003).
- Parmeggiani PL, Franzini C (Changes in the activity of hypothalamic units during sleep at different environmental temperatures. *Brain Res* 29:347-350.1971).
- Rathner JA, Madden CJ, Morrison SF (Central pathway for spontaneous and prostaglandin E2-evoked cutaneous vasoconstriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R343-354.2008).
- Romanovsky AA (Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R37-46.2007).
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M (High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531.2009).
- Saper CB (The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu Rev Neurosci* 25:433-469.2002).
- Siegel JM (Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437:1264-1271.2005).

- Smith JE, Jansen AS, Gilbey MP, Loewy AD (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).
- Standish A, Enquist LW, Escardo JA, Schwaber JS (Central neuronal circuit innervating the rat heart defined by transneuronal transport of pseudorabies virus. *J Neurosci* 15:1998-2012.1995).
- Stanley S, Pinto S, Segal J, Perez CA, Viale A, DeFalco J, Cai X, Heisler LK, Friedman JM (Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7024-7029.2010).
- Stitt JT (Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. *J Physiol* 232:163-179.1973).
- Stornetta RL, McQuiston TJ, Guyenet PG (GABAergic and glycinergic presympathetic neurons of rat medulla oblongata identified by retrograde transport of pseudorabies virus and in situ hybridization. *J Comp Neurol* 479:257-270.2004).
- Stornetta RL, Rosin DL, Simmons JR, McQuiston TJ, Vujovic N, Weston MC, Guyenet PG (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).
- Tanaka M, McAllen RM (A subsidiary fever center in the medullary raphe? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1592-1598.2005).
- Tanaka M, Nagashima K, McAllen RM, Kanosue K (Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats. *J Physiol* 540:657-664.2002).
- Tanaka M, Owens NC, Nagashima K, Kanosue K, McAllen RM (Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *J Physiol* 572:569-583.2006).
- Ter Horst GJ, Hautvast RW, De Jongste MJ, Korf J (Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat. *The European journal of neuroscience* 8:2029-2041.1996).

- Toth IE, Toth DE, Boldogkoi Z, Hornyak A, Palkovits M, Blessing WW (Serotonin-synthesizing neurons in the rostral medullary raphe/parapyramidal region transneuronally labelled after injection of pseudorabies virus into the rat tail. *Neurochem Res* 31:277-286.2006).
- Vianna DM, Allen C, Carrive P (Cardiovascular and behavioral responses to conditioned fear after medullary raphe neuronal blockade. *Neuroscience* 153:1344-1353.2008).
- Wang L, Spary E, Deuchars J, Deuchars SA (Tonic GABAergic inhibition of sympathetic preganglionic neurons: a novel substrate for sympathetic control. *J Neurosci* 28:12445-12452.2008).
- Williams JW, Rudy TA, Yaksh TL, Viswanathan CT (An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. *Brain Res* 120:251-262.1977).
- Zaretsky DV, Zaretskaia MV, DiMicco JA (Stimulation and blockade of GABA(A) 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:R110-116.2003).
- Zeppelin H, Siegel JM, Tobler I (2005) Mammalian sleep. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*, pp 91-100: Kiger MH, Roth T, Dement WC (eds.).