

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**



Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche, Fisiologiche e dello Sport

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

Ciclo XXVI

Tesi di Dottorato di Ricerca

**SONNO E MALATTIE NEURODEGENERATIVE  
IN MODELLI ANIMALI**

Dottorando:

Dott. Federico DEL GALLO

Matricola: R09097

Tutor:

Prof. Luca IMERI

Dipartimento di Scienze della Salute

Coordinatore:

Prof. Michele MAZZANTI

ANNO ACCADEMICO  
2012 - 2013



# SOMMARIO

<b>1 - RIASSUNTO</b> .....	<i>pag.</i>	1
ABSTRACT .....	<i>pag.</i>	5
<b>2 - INTRODUZIONE</b> .....	<i>pag.</i>	7
<u>2.1 - IL SONNO</u> .....	<i>pag.</i>	9
2.1.1 - VERSO UNA DEFINIZIONE .....	<i>pag.</i>	10
2.1.2 - APPUNTI DI STORIA DEL SONNO .....	<i>pag.</i>	11
2.1.3 - PILLOLE DI ELETTROENCEFALOGRAFIA (EEG) .....	<i>pag.</i>	17
2.1.4 – COS'È IL CICLO VEGLIA SONNO? .....	<i>pag.</i>	23
2.1.4.1 – L'ARCHITETTURA DEL CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i>	23
2.1.4.2 – LA REGOLAZIONE DEL CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i>	25
2.1.4.2.1 – IL SONNO COME CICLO CIRCADIANO .....	<i>pag.</i>	25
2.1.4.2.2 – IL SONNO COME PROCESSO OMEOSTATICO .....	<i>pag.</i>	27
2.1.4.2.3 – IL CICLO CIRCADIANO E IL PROCESSO OMEOSTATICO: UN'INTEGRAZIONE .....	<i>pag.</i>	29
2.1.4.3 – LE FASI DEL CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i>	31
2.1.4.3.1 – LA VEGLIA .....	<i>pag.</i>	31
Caratteristiche .....	<i>pag.</i>	31
Regolazione neurale .....	<i>pag.</i>	31
<i>Glutammato (Glu)</i> .....	<i>pag.</i>	32
<i>Noradrenalina (NA)</i> .....	<i>pag.</i>	32
<i>Dopamina (DA)</i> .....	<i>pag.</i>	32
<i>Serotonina (5-HT)</i> .....	<i>pag.</i>	33
<i>Acetilcolina (Ach)</i> .....	<i>pag.</i>	33
<i>Istamina (His)</i> .....	<i>pag.</i>	34
<i>Oressina/Ipocretina (Orx/Hcrt)</i> .....	<i>pag.</i>	35
2.1.4.3.2 – IL SONNO NREM .....	<i>pag.</i>	37
Caratteristiche .....	<i>pag.</i>	37

Regolazione neurale .....	pag.	38
2.1.4.3.3 – IL CIRCUITO “FLIP-FLOP”:		
DALLA VEGLIA AL SONNO NREM .....	pag.	39
Adenosina .....	pag.	41
2.1.4.3.4 – IL SONNO REM .....	pag.	42
Caratteristiche .....	pag.	42
Regolazione neurale .....	pag.	44
2.1.4.3.5 – IL MODELLO AD INTERAZIONE RECIPROCA:		
DAL SONNO NREM AL SONNO REM.....	pag.	48
<b><u>2.2 – SONNO E MALATTIE NEURODEGENERATIVE</u></b> .....	pag.	51
2.2.1 – LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	pag.	52
2.2.1.1 – LE PRIONOPATIE .....	pag.	52
2.2.1.1.1 – L’INSONNIA FATALE FAMILIARE (FFI) .....	pag.	59
2.2.1.1.2 – LA MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB (CJD).....	pag.	62
2.2.1.2 – LA MALATTIA DI ALZHEIMER (AD) .....	pag.	65
2.2.1.3 – LA MALATTIA DI HUNTINGTON (HD).....	pag.	68
2.2.1.4 – LE SINUCLEINOPATIE .....	pag.	71
2.2.1.4.1 – LA MALATTIA DI PARKINSON (PD).....	pag.	72
<b><u>2.3 – UN PUNTO DI CONTATTO: IL DISTURBO COMPORTAMENTALE</u></b>		
<u>DURANTE IL SONNO REM (RBD)</u> .....	pag.	75
2.3.1 – COS’È IL DISTURBO COMPORTAMENTALE		
DURANTE IL SONNO REM? .....	pag.	75
2.3.2 – RBD E MALATTIE NEURODEGENERATIVE .....	pag.	79
<b><u>2.4 – PREMESSA ALLA FASE SPERIMENTALE</u></b> .....	pag.	83
2.4.1 – L’UTILIZZO DI MODELLI ANIMALI NELLA RICERCA.....	pag.	83
2.4.2 – IL SONNO NEI RODITORI .....	pag.	84
2.4.3 – I MODELLI MURINI .....	pag.	86
2.4.3.1 – IL MODELLO MURINO DI MALATTIA		
DI CREUTZFELDT-JAKOB FAMILIARE .....	pag.	86
2.4.3.2 – IL MODELLO MURINO DI INSONNIA FATALE FAMILIARE .....	pag.	89

2.4.3.3 – IL MODELLO MURINO DI MALATTIA DI ALZHEIMER.....	pag. 91
<u>2.5 – TIRANDO LE SOMME.....</u>	pag. 93
<b>3 - SCOPO.....</b>	pag. 97
<b>4 - MATERIALI E METODI.....</b>	pag. 101
<u>4.1 – ESPERIMENTO N.1 – IL CICLO VEGLIA-SONNO</u>	
<u>NEL MODELLO MURINO DI FFI.....</u>	pag. 103
4.1.1 – ANIMALI E STABULAZIONE - I.....	pag. 103
4.1.2 – LE PROCEDURE CHIRURGICHE - I.....	pag. 104
4.1.3 – IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - I.....	pag. 106
4.1.4 – IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - I.....	pag. 106
4.1.5 – LA REGISTRAZIONE DEI SEGNALI - I.....	pag. 107
<u>4.2 – ESPERIMENTO N.2 – IL CICLO VEGLIA-SONNO</u>	
<u>NEL MODELLO MURINO DI CJD.....</u>	pag. 108
4.2.1 – ANIMALI E STABULAZIONE - II.....	pag. 108
4.2.2 – LE PROCEDURE CHIRURGICHE - II.....	pag. 109
4.2.3 – IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - II.....	pag. 109
4.2.4 – IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - II.....	pag. 109
4.2.5 – LA REGISTRAZIONE DEI SEGNALI - II.....	pag. 109
<u>4.3 – ESPERIMENTO N.3 – IL CICLO VEGLIA-SONNO</u>	
<u>NEL MODELLO MURINO DI AD.....</u>	pag. 110
4.3.1 – ANIMALI E STABULAZIONE - III.....	pag. 110
4.3.2 – LE PROCEDURE CHIRURGICHE - III.....	pag. 110
4.3.3 – IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - III.....	pag. 111
4.3.4 – IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - III.....	pag. 111
4.3.4.1 – VERIFICA POSIZIONAMENTO CANNULA GUIDA.....	pag. 112
Prova funzionale.....	pag. 113

Prova anatomica .....	<i>pag.</i> 114
4.3.4.2 – PREPARAZIONE SOLUZIONI .....	<i>pag.</i> 114
PBS .....	<i>pag.</i> 114
Monomeri e oligomeri di A- $\beta_{1-42}$ .....	<i>pag.</i> 114
4.2.3.5 – LA REGISTRAZIONE DEI SEGNALI - III .....	<i>pag.</i> 114
<u>4.4 – ANALISI DEI DATI</u> .....	<i>pag.</i> 117
4.4.1 – ANALISI DEL CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i> 117
4.4.1.1 – ANALISI QUANTITATIVA DEL SONNO.....	<i>pag.</i> 117
4.4.1.2 – ANALISI DELL'ARCHITETTURA DEL SONNO .....	<i>pag.</i> 118
4.4.1.3 – ANALISI SPETTRALE DEL SONNO .....	<i>pag.</i> 118
4.4.1.4 – ANALISI DELLA POTENZA SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM.....	<i>pag.</i> 119
4.4.2 – ANALISI DELL'ATTIVITÀ MOTORIA .....	<i>pag.</i> 119
<u>4.5 – ANALISI STATISTICHE</u> .....	<i>pag.</i> 121
4.5.1 – ESPERIMENTO N.1 .....	<i>pag.</i> 121
4.5.1.1 – CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i> 121
Analisi quantitativa .....	<i>pag.</i> 121
Analisi dell'architettura del sonno .....	<i>pag.</i> 121
Analisi spettrale.....	<i>pag.</i> 121
Potenza spettrale banda delta durante il sonno NREM .....	<i>pag.</i> 122
4.5.1.2 – ATTIVITÀ MOTORIA .....	<i>pag.</i> 122
4.5.2 – ESPERIMENTO N.2 .....	<i>pag.</i> 123
4.5.2.1 – CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i> 123
Analisi quantitativa .....	<i>pag.</i> 123
Analisi dell'architettura del sonno .....	<i>pag.</i> 123
Analisi spettrale.....	<i>pag.</i> 123
Potenza spettrale banda delta durante il sonno NREM .....	<i>pag.</i> 123
4.5.2.2 – ATTIVITÀ MOTORIA .....	<i>pag.</i> 123

4.5.3 – ESPERIMENTO N.3 .....	<i>pag.</i> 124
4.5.3.1 – CICLO VEGLIA-SONNO .....	<i>pag.</i> 124
Analisi quantitativa .....	<i>pag.</i> 124
Analisi dell'architettura del sonno .....	<i>pag.</i> 124
Analisi spettrale .....	<i>pag.</i> 124
Potenza spettrale banda delta durante il sonno NREM .....	<i>pag.</i> 124
4.5.3.2 – ATTIVITÀ MOTORIA.....	<i>pag.</i> 124
<b>5 - RISULTATI</b> .....	<i>pag.</i> 125
<u>5.1 – ESPERIMENTO N.1 – MODELLO MURINO DI FFI</u> .....	<i>pag.</i> 127
5.1.1 – RISULTATI.....	<i>pag.</i> 127
5.1.1.1 –RIDUZIONE DI SONNO REM IN TOPI FFI .....	<i>pag.</i> 127
5.1.1.2 – LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONE DELLA SUA ARCHITETTURA.....	<i>pag.</i> 128
5.1.1.3 – LA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO È AUMENTATA IN TOPI FFI .....	<i>pag.</i> 128
5.1.1.4 – IL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM È RIDOTTO IN TOPI FFI .....	<i>pag.</i> 128
5.1.1.5 – LA VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM È ALTERATA IN TOPI FFI.....	<i>pag.</i> 129
5.1.1.6 – PRESENZA DI ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI FFI.....	<i>pag.</i> 129
5.1.1.7 – RIDUZIONE DELL'ATTIVITÀ MOTORIA E APPIATTIMENTO RITMI CIRCADIANI IN TOPI FFI .....	<i>pag.</i> 129
5.1.2 – GRAFICI E TABELLE .....	<i>pag.</i> 131
<u>5.2 – ESPERIMENTO N.2 – MODELLO MURINO DI CJD</u> .....	<i>pag.</i> 139
5.2.1 – RISULTATI.....	<i>pag.</i> 139
5.2.1.1 – PRECOCE RIDUZIONE DI SONNO REM IN TOPI CJD.....	<i>pag.</i> 139

5.2.1.2 – LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONE DELLA SUA ARCHITETTURA .....	<i>pag.</i> 140
5.2.1.3 – LA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO È ALTERATA IN TOPI CJD .....	<i>pag.</i> 140
5.2.1.4 – IL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM È RIDOTTO IN TOPI CJD ANZIANI .....	<i>pag.</i> 141
5.2.1.5 – LA VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM È ALTERATA IN TOPI CJD .....	<i>pag.</i> 142
5.2.1.6 – PRESENZA DI ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI CJD .....	<i>pag.</i> 142
5.2.2 – GRAFICI E TABELLE .....	<i>pag.</i> 145
<b>5.3 – ESPERIMENTO N.3 – MODELLO MURINO DI AD</b> .....	<i>pag.</i> 153
5.3.1 – RISULTATI .....	<i>pag.</i> 153
5.3.1.1 – GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ RIDUCONO IL SONNO REM DURANTE IL PERIODO DI BUIO .....	<i>pag.</i> 153
5.3.1.2 – LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONE DELLA SUA ARCHITETTURA .....	<i>pag.</i> 153
5.3.1.3 – GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ NON CAUSANO ALTERAZIONI NELLA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO .....	<i>pag.</i> 153
5.3.1.4 – GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ RIDUCONO IL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM .....	<i>pag.</i> 154
5.3.1.5 – GLI OLIGOMERI DI A $\beta_{1-42}$ INDUCONO ATTIVITÀ EEG ANOMALA... <i>pag.</i> 155	
5.3.1.6 – GLI OLIGOMERI DI A $\beta_{1-42}$ NON INDUCONO ALTERAZIONI DELL'ATTIVITÀ MOTORIA .....	<i>pag.</i> 155
5.3.2 – GRAFICI E TABELLE .....	<i>pag.</i> 157
<b>6 - DISCUSSIONE</b> .....	<i>pag.</i> 165
<b>6.1 – LE ALTERAZIONI DEL SONNO NEL MODELLO MURINO DI FFI</b> .....	<i>pag.</i> 169



<u>6.2 – LA PRECOCE ALTERAZIONE DEL CICLO VEGLIA-SONNO NEL</u> <u>MODELLO MURINO DI CJD</u> .....	<i>pag.</i> 173
<u>6.3 – LE MODIFICAZIONI DEL SONNO NEL MODELLO MURINO DI AD</u> .....	<i>pag.</i> 177
<u>6.4 – CONCLUSIONE</u> .....	<i>pag.</i> 181
<b>7 - RINGRAZIAMENTI</b> .....	<i>pag.</i> 187
<b>8 - BIBLIOGRAFIA</b> .....	<i>pag.</i> 191



# 1. - RIASSUNTO



I disturbi del sonno rappresentano una manifestazione clinica tipica di gran parte delle malattie neurodegenerative. Insonnia, ipersonnia, parasonnie, perdita di specifiche fasi del sonno e disorganizzazione del ciclo veglia-sonno sono alcune delle manifestazioni che caratterizzano le sinucleinopatie, le prionopatie e le taupatie. Recenti evidenze hanno rilevato che in molti casi i disturbi del sonno possono precedere l'insorgenza del quadro sintomatico tipico di queste patologie. In particolare, è stato osservato che la presenza di RBD (disturbo del comportamento durante il sonno REM) nella sua forma idiopatica (iRBD) sembra costituire un fattore predittivo per l'insorgenza di una futura sinucleinopatia. L'utilizzo di modelli animali è uno degli strumenti più utilizzati in campo biomedico per lo studio della patologia umana e lo sviluppo di nuovi metodi più efficaci per la diagnosi e il trattamento di malattie sia umane che animali.

Scopo di questa tesi è stato quello di verificare se le alterazioni del sonno fossero presenti anche in modelli murini di alcune malattie neurodegenerative con diversa eziologia. Tra queste abbiamo preso in considerazione l'Insonnia Fatale Familiare (FFI), la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) e la malattia di Alzheimer (AD). In seconda istanza, la disponibilità di un modello murino a diversi stadi evolutivi, ha permesso di indagare l'ipotesi di una precoce insorgenza dei disturbi del sonno nella malattia di Creutzfeldt-Jakob. A questo scopo è stato registrato poligraficamente e analizzato il ciclo veglia-sonno in modelli murini delle tre patologie sopra citate.

Nel primo esperimento è stato analizzato il ciclo veglia-sonno di topi transgenici che esprimevano l'omologo murino della mutazione (D178N/M129) al gene *Prnp* che codifica per la proteina prionica (PrP). Questa mutazione nell'uomo è associata a insonnia fatale familiare. Il ciclo veglia-sonno di questi animali è stato confrontato con due ceppi di topi di controllo: i) topi *wild type* (C57BL/6J) e ii) topi *knock-out* per la PrP.

Nel secondo esperimento sono state analizzate le caratteristiche del sonno in topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione (D178N/V129) al gene *Prnp*, che nell'uomo porta a una forma familiare di Creutzfeldt-Jakob (CJD<sup>178</sup>). Il ciclo veglia-sonno di questi topi è stato confrontato con i ceppi di controllo già descritti per il primo esperimento. Ciascun ceppo di topi, inoltre, è stato analizzato a tre diverse età: 6, 12 e 18 mesi che rappresentano stadi evolutivi diversi (rispettivamente: giovani, adulti e anziani); questo al fine di valutare l'evoluzione delle alterazioni del sonno e la loro effettiva insorgenza.

Nel terzo esperimento è stato preso in considerazione un modello, in acuto, di malattia di Alzheimer (AD). Il ciclo veglia-sonno di topi C57BL/6J è stato analizzato in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (ICV), in acuto, di oligomeri sintetici di  $\beta$ -amiloide (A- $\beta_{1-42}$ ). Questi sono i costituenti delle placche amiloidi riscontrate in pazienti affetti da AD. La somministrazione veniva eseguita all'inizio della fase di luce del ciclo luce-buio. In seguito, il

ciclo veglia-sonno era registrato poligraficamente per le successive 24 ore in condizioni normali di laboratorio. Questa condizione è stata confrontata con il ciclo veglia-sonno degli stessi topi (disegno *within*) in seguito a somministrazione di due trattamenti di controllo: i) un veicolo (tampone fosfato salino, PBS) e ii) i monomeri sintetici di  $\beta$ -amiloide.

In tutti e tre i modelli murini considerati si sono osservate marcate alterazioni del ciclo veglia-sonno, nei termini di una riduzione del sonno REM. La perdita di questa fase era essenzialmente dovuta a una diminuzione del numero dei suoi episodi. I modelli murini delle tre malattie neurodegenerative mostravano, infatti, una certa difficoltà nell'iniziare un episodio di sonno REM. La decurtazione di sonno REM era accompagnata, anche, da una riduzione del potere spettrale della banda theta durante gli episodi di sonno REM. L'analisi dei tracciati elettroencefalografici (EEG) ha, inoltre, messo in evidenza la presenza di attività EEG anomala, consistente in complessi polifasici di ampio voltaggio e con un picco di frequenza attorno ai 7 Hz. Le registrazioni del modello murino di CJD a diversi stadi evolutivi hanno evidenziato che le alterazioni del sonno in questo modello si presentano già a 12 mesi di età, ancora prima dell'insorgenza dei sintomi tipici della patologia.

Le alterazioni del sonno sono, quindi, presenti anche in modelli murini di alcune malattie neurodegenerative, incluse quelle in cui il disturbo del sonno non rappresenta il sintomo principale. Nel modello murino di CJD, inoltre, l'alterazione del normale ciclo veglia-sonno sembra precedere la manifestazione del quadro sintomatico tipico della patologia.

Questi dati suggeriscono una stretta relazione tra alterazioni del ciclo veglia-sonno e malattie neurodegenerative. Per questo motivo, in campo clinico e diagnostico, sarebbe opportuno porre una maggiore attenzione ai disturbi del sonno. Questi sembrano essere, infatti, parte integrante di molte malattie contraddistinte da degenerazione neuronale. L'alterazione del normale ciclo veglia-sonno potrebbe avere, inoltre, un valore predittivo per alcune delle patologie neurodegenerative o comunque essere un valido aiuto nel processo diagnostico.

In futuro, il miglioramento della qualità del sonno e/o la normalizzazione del ciclo veglia-sonno potrebbero essere validi strumenti al fine di prevenire la neurodegenerazione e l'insorgenza di alcune malattie neurodegenerative, o almeno rappresentare un approccio palliativo in corso di malattia.

# ABSTRACT

Sleep disturbances represent an important clinical feature in different neurodegenerative disorders. Insomnia, hypersomnia, parasomnia, loss of specific sleep stages and alterations in circadian rhythms characterize synucleinopathies, prionopathies and tauopathies. Recent evidences highlight that, in many instances, sleep alterations could disclose the onset of a neurodegenerative disorder. In particular, it has been shown that the idiopathic form of the REM sleep Behavior Disorder (iRBD) could be a prognostic factor for the development of a future synucleinopathy. The use of animal models is very common in biomedical research and is essential to develop new and more effective methods for diagnosis and treating disease that affecting both humans and animals.

The first aim of this thesis is to verify if murine models of neurodegenerative disorders with different aetiology show sleep alterations similar to those observed in humans. Secondly, the availability of a murine model at different stages of the disease's course allowed us to investigate whether the sleep alterations precede (or not) the development of other features of the disease. To this purpose, the sleep-wake cycle was poligraphically recorded and analyzed in the murine models of three neurodegenerative disorders: i) Fatal Familial Insomnia (FFI), ii) Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and iii) Alzheimer's disease (AD).

In the first experiment we analyzed the sleep-wake cycle of transgenic mice expressing the murine homolog of the D178N/M129 human mutation at the Prnp gene, encoding for prion protein (PrP). This kind of mutation is associated in human with FFI. We compared the sleep-wake cycle of these animals with two control mice strains: i) wild-type mice (C57BL/6J, WT mice) and ii) PrP knock-out mice (KO mice).

In the second experiment we analyzed the sleep-wake cycle in mice expressing the murine homolog of the D178N/V129 human mutation, associated with a familial form of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD178). We compared the sleep of these mice with WT and KO mice. In order to evaluate the course of sleep alterations and their onset, each mice strain was recorded at three different ages: 6, 12 and 18 months of age. At these ages animals can be considered as young, adult and old, respectively.

In the third experiment, we considered an acute mice model of Alzheimer's disease (AD). C57BL/6J mice were intracerebroventricularly injected with three different solutions: i) synthetic oligomers of amyloid- $\beta$  (A- $\beta$ 1-42); ii) phosphate buffer saline, PBS (vehicle); iii) synthetic monomers of amyloid- $\beta$  (A- $\beta$ 1-42). A- $\beta$ 1-42 oligomers are the main elements of A- $\beta$  plaques, observed in AD patients. The other two solutions were administered as control condition. All mice received all the three injections (within design) at the light onset. Hereafter, the sleep-wake

cycle was polygraphically recorded during the next 24 hours in baseline conditions. We compared the sleep-wake cycle of mice following the injection of A- $\beta$ 1-42 oligomers with that followed the administration of the control conditions.

In all three experiments the murine models showed marked sleep-wake alterations, in particular a reduction of the amount of REM sleep. The loss of REM sleep was due to a reduction of the number of REM sleep bouts. In other words, the murine models showed a difficulty in entering REM sleep. The reduction of the time spent in REM sleep was combined with a decrease of EEG theta power during REM sleep bouts. Moreover, the EEG activity of murine models was characterized by bursts of polyphasic complexes, peaking at around 7 Hz. At last, analyses of the murine model of CJD at different ages revealed that sleep alterations were already present at 12 months of age, before any other evidence of clinical signs.

As well as in humans, sleep alterations are have been described in animal models of neurodegenerative disorders, including those in which sleep disturbance is not considered a main feature. Moreover, in the murine model of CJD, the alteration of the normal sleep-wake cycle seems to precede the onset of other clinical signs of the disease.

These data suggest the existence of a relationship between sleep-wake cycle alterations and some neurodegenerative disorders and suggest to pay more attention to sleep disturbances, in clinic and diagnostic field. Sleep alterations seem to represent an important feature of numerous neurodegenerative disorders and could be considered a prognostic factor for the evolution of these disorders and something to be taken into account in the evaluation of the clinical picture.

In the future, it would be useful considering the enhancement of sleep quality and/or the normalization of sleep-wake cycle as a new tool to prevent the evolution of neurodegeneration and the onset of several neurodegenerative disorder, or at least represent a palliative care in course of the disorders.



## **2. - INTRODUZIONE**



# 2.1 - IL SONNO

## 2.1.1 - VERSO UNA DEFINIZIONE

Uno degli argomenti più affascinanti in campo scientifico riguarda quell'evento che interrompe le quotidiane operazioni e al quale difficilmente l'uomo può sottrarsi: il sonno. Parlare del sonno e darne una definizione risulta essere problematico. Per rendersene conto basti pensare al semplice quesito: a cosa serve il sonno? Se questa domanda fosse posta ai più grandi studiosi in materia, le risposte sarebbero quanto più disparate (Siegel, 2005): dal ruolo del sonno nel consolidamento della memoria alla sua azione ricostituente per l'organismo. Nessuna delle ipotesi formulate sarebbe più giusta delle altre, tutto dipenderebbe dal livello di analisi considerato e dall'inquadramento teorico cui si fa riferimento (Vassalli and Dijk, 2009). Lasciando da parte i dibattiti, non ancora del tutto risolti, è dato consolidato che il sonno è uno stato essenziale che si è conservato nel corso della filogenesi fino all'essere umano (Cirelli and Tononi, 2008). L'idea del sonno come comportamento comune a molte delle specie animali risale già a Piéron che, in una pubblicazione del 1913, definì il sonno come uno stato fisiologico periodicamente necessario, caratterizzato da un'interruzione dei complessi rapporti sensoriali e motori che tengono unito il soggetto al suo ambiente (Piéron, 1913). Come ogni comportamento, anche il sonno ha subito modificazioni concordi ai vincoli biologici di ciascuna specie, ad esempio l'ambiente, le caratteristiche predatorie, il metabolismo ecc. In alcuni animali si fa riferimento a uno stato di quiescenza (*rest*), come nel caso della *drosophila melanogaster* (Hendricks et al., 2000); in altri, come nei mammiferi marini e negli uccelli, si parla, invece, di sonno uni-emisferico, cioè uno stato elettrofisiologico durante il quale un emisfero presenta le caratteristiche tipiche del sonno mentre l'altro emisfero quelle tipiche della veglia (Rattenborg et al., 2000).

L'importanza del sonno è paradossalmente evidenziata dalla sua assenza, in altre parole: cosa accade quando non è possibile dormire? È esperienza comune che il giorno seguente a una sola notte passata "in bianco" sia contraddistinto da stanchezza generale, umore alterato, difficoltà di concentrazione ecc. (Brown, 2012). In campo sperimentale, molti studi hanno dimostrato che ratti privati totalmente di sonno sviluppano una serie di cambiamenti fisiologici, come un aumento dell'assunzione di cibo, una diminuzione del peso e della temperatura corporei, che culminano con il decesso dopo poche settimane (circa 2 - 4 settimane) dall'inizio

della deprivazione (Rechtschaffen et al., 2002; Rechtschaffen and Bergmann, 1995). Allo stesso modo, una prolungata deprivazione di sonno risulta essere fatale anche nella *drosophila melanogaster* (Shaw et al., 2002) e nei blattoidei (Stephenson et al., 2007). L'assenza di sonno non è deleteria nei soli animali, ma anche negli uomini: dopo novanta ore di veglia ininterrotta, i soggetti mostrano una riduzione della temperatura corporea, simile a quella osservata nei ratti deprivati, accompagnata da allucinazioni visive e comportamento simil-psicotico (Dement, 1976). Deprivazioni di sonno più lunghe (264 ore), nell'uomo, si associano a irritabilità, incoordinazione motoria, vista offuscata, eloquio confuso, allucinazioni ipnagogiche, difficoltà attentive e disturbi della memoria a breve termine (Ross, 1965).

Queste evidenze portano a concludere che il sonno non è una semplice riduzione della veglia ma un comportamento universale e strettamente regolato, che non può essere eliminato senza conseguenze dannose per l'organismo stesso (Cirelli and Tononi, 2008).

Cercare una definizione del sonno onnicomprensiva è impresa ardua, tuttavia, volendo tirare le somme, si può parafrasare la definizione di Carskadon e Dement e pensare al sonno come un fenomeno neurobiologico e comportamentale molto complesso e periodicamente necessario. Questo si contraddistingue da altri stati come il coma, l'anestesia o l'ibernazione, per la sua reversibilità alla veglia, per la sua durata e per la presenza di uno specifico pattern elettrofisiologico (Carskadon and Dement, 2011).

## 2.1.2 - APPUNTI DI STORIA DEL SONNO

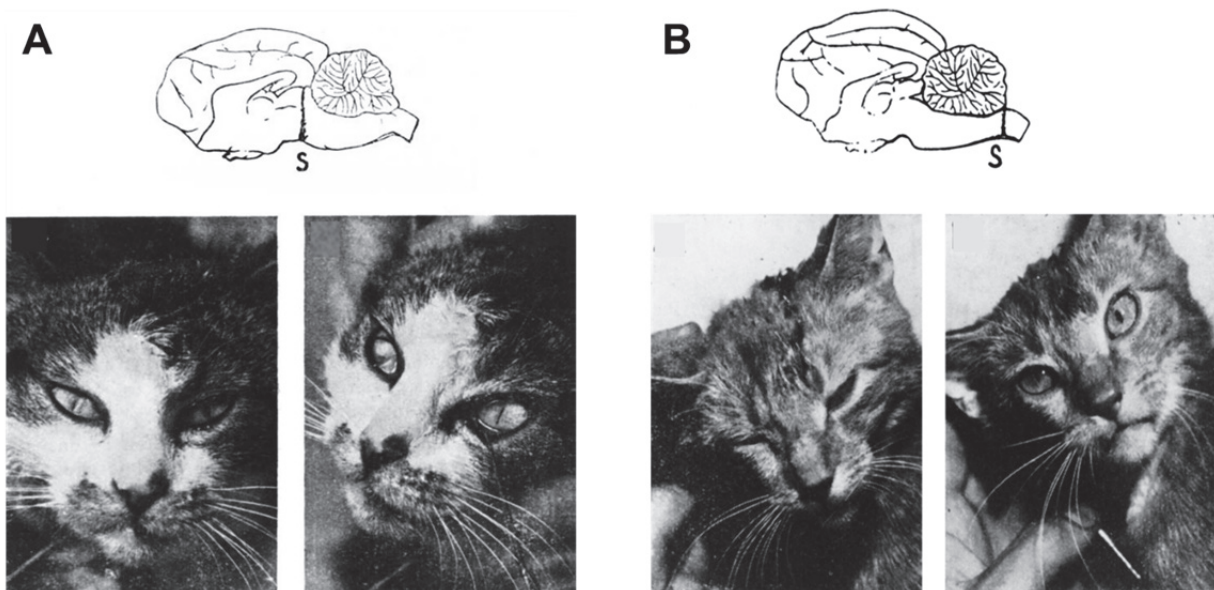
In uno dei primissimi manoscritti sul sonno, edito nel 1834, il chirurgo scozzese Robert MacNish esordì scrivendo: "*Sleep is the intermediate state between wakefulness and death: wakefulness being regarded as to the active state of all the animal and intellectual functions, and death as that of their total suspension*" (MacNish, 1834). In altre parole, con questa definizione MacNish affermò che il sonno fosse uno stato intermedio tra la veglia (stato attivo) e la morte (totale sospensione delle attività). L'idea del sonno come uno stato affine alla morte non era estranea a MacNish: già gli antichi Greci consideravano il dio del sonno (*Hypno*) fratello gemello del dio della morte (*Thanatos*), come descritto da Esiodo nella sua Teogonia (Esiodo, 2004).

Per molto tempo il sonno è stato visto come una sorta di periodica "morte reversibile", questo perché la responsività all'ambiente esterno durante questa fase è quasi del tutto assente. L'accostamento dell'attività ipnica alla morte ha rafforzato maggiormente il concetto di sonno come fenomeno passivo, in altre parole uno stato di coscienza generato dalla sola riduzione

degli scambi sensoriali con il mondo esterno. È comune osservazione che il sonno intervenga, almeno nell'uomo, durante la notte, in cui vi è una riduzione della stimolazione sensoriale (visiva, uditiva, tattile e olfattiva) ed è proprio questo calo informativo che sarebbe alla base dell'insorgenza del comportamento ipnico.

Nonostante queste osservazioni speculative siano a favore di una *teoria passiva* del sonno, agli albori della fisiologia sperimentale il quadro era molto diverso: Pavlov, nel 1927, osservò che la ripetizione di uno stimolo condizionato a un animale da esperimento (il cane), in maniera monotona e a intervalli regolari, senza che fosse seguito da rinforzo per opera di uno stimolo incondizionato, era in grado di produrre attivamente uno stato di sonnolenza e quindi sonno (Pavlov, 1927). Per Pavlov il sonno indotto da questa procedura sperimentale era dovuto a un processo d'inibizione interna che iniziava nell'area corticale specifica e si estendeva sulla restante parte del mantello neocorticale, interessando solo successivamente le strutture sottocorticali. Negli stessi anni Hess (Hess, 1927) riuscì a indurre sonno comportamentale nel gatto mediante stimolazione a bassa frequenza della massa intermedia (*adhaesio interthalamica*), un'area di connessione tra le due formazioni talamiche. Sia l'esperienza di Pavlov che quelle di Hess suggerivano comunque un'origine attiva del sonno. Presto, tuttavia, l'interesse dei fisiologi del sonno si spostò verso una diversa concezione del fenomeno. Kleitman, nel 1929, formulò una teoria, chiamata *teoria della deafferentazione*, secondo la quale il sonno è dovuto a una riduzione o abolizione di quelle afferenze sensoriali dalla periferia che sono in grado di mantenere tonicamente le condizioni di veglia (Kleitman, 1929).

La teorizzazione di Kleitman trovò una successiva conferma scientifica grazie agli studi di Frédéric Bremer su sezioni mesencefaliche del gatto. Bremer, interessato a studiare il meccanismo di regolazione del tono muscolare durante il sonno, eseguì delle registrazioni elettrofisiologiche su diversi preparati. Uno di questi preparati, denominato "*cerveau isolé*", era ottenuto mediante un taglio completo del tronco encefalico dietro al terzo nervo cranico, tra i corpi quadrigemini superiori e inferiori; questa sezione isolava il diencefalo e telencefalo dal neurasse dell'animale. In questo modo il cervello (telencefalo e diencefalo) era isolato da gran parte dell'informazione sensoriale, eccetto quella visiva e olfattiva, le cui vie sensoriali rimanevano intatte, trovandosi davanti alla lesione (fig. 2.1.A). Questo tipo di lesione provocava uno stato comportamentale irreversibile simile al sonno, caratterizzato da un quadro elettroencefalografico (EEG) sincronizzato con onde lente di alto voltaggio, pupilla miotica, respiro regolare e rallentato e nessuna risposta alla stimolazione esterna. Il "sonno irreversibile" del *cerveau isolé* fu interpretato da Bremer come conseguenza dell'interruzione delle grandi vie corticipete della sensibilità decorrenti nel tronco encefalico e dalla soppressione degli impulsi afferenti alla corteccia cerebrale (*teoria della deafferentazione*) capaci, in condizioni di normalità, di mantenere il mantello corticale a quel livello tonico di attività tipico della veglia



**FIGURA 2.1.** Studi di Bremer su sezioni mesencefaliche: **A.** *Cerveau isolé* ; **B.** *Encéphale isolé* [adattato da Kerkhofs and Lavie, 2000].

(Bremer, 1935). Al fine di confermare la sua ipotesi del sonno come “deafferentazione sensoriale”, Bremer condusse un successivo esperimento di controllo su un preparato in cui, rispetto al *cerveau isolé*, erano lasciate intatte molte più vie sensoriali. In questo preparato, più caudale, definito “*encéphale isolé*”, l’encefalo era isolato completamente dal midollo spinale tramite una sezione sopra la giunzione tra il bulbo e il midollo spinale (fig. 2.1.B). La lesione manteneva intatte le afferenze sensoriali (olfattive, visive, uditive, vestibolari e muscolo-cutanee) derivanti dai nervi cranici. In questo caso il ciclo veglia-sonno non era intaccato e si manteneva pressoché normale (Bremer, 1936; Bremer, 1937a). Da questi studi Bremer concluse che il sonno, nei mammiferi, era la manifestazione di una diminuzione del tono corticale, mantenuto dal continuo afflusso d’informazioni sensoriali al cervello. La diminuzione del tono corticale, causato dalla deafferentazione funzionale dei circuiti neurali, avrebbe potuto indurre una riduzione o una soppressione del continuo flusso di trasmissioni neurali alla corteccia cerebrale e al diencefalo, causando un’alterazione dello stato di vigilanza (Bremer, 1937b; Kerkhofs and Lavie, 2000). L’interpretazione di Bremer era un valido supporto all’ipotesi della deafferentazione sensoriale e quindi alla teoria del sonno come fenomeno passivo.

Negli stessi anni il neurologo austriaco Costantin von Economo, studiando le caratteristiche cliniche e neuropatologiche delle encefaliti, gettò le basi per un cambio di prospettiva nello studio del sonno. von Economo si accorse che pazienti con lesioni infiammatorie alle strutture ipotalamiche posteriori e tegmentali mesencefaliche soffrivano di encefalite letargica, contraddistinta da ipersonnia e letargia. Al contrario, pazienti con lesioni alla parte anteriore dell’ipotalamo (area preottica) e al prosencefalo basale presentavano encefalite accompagnata da insonnia e movimenti còreici (von Economo, 1930; von Economo, 1931). von Economo

ipotizzò, quindi, la presenza di due nuclei regolatori del ciclo veglia-sonno, predicendo l'esistenza di un "centro del sonno" e un "centro della veglia" (Triarhou, 2006; von Economo, 1930). Da questi studi s'intuì l'importanza del cervello nella generazione dell'attività ipnica e l'idea del sonno come un fenomeno dovuto a deafferentazione sensoriale fu abbandonata.

Alcuni anni più tardi, la ricerca neurofisiologica sulle funzioni della formazione reticolare del tronco encefalico (FR) portò evidenze a favore di una *teoria reticolare* del sonno, che poteva perfezionare la precedente teoria della deafferentazione. Moruzzi e Magoun, nel 1949, dimostrarono, infatti, che lo stimolo fondamentale per il mantenimento della veglia non fosse dato dalle afferenze cerebrali del sistema sensoriale, ma dalla formazione reticolare, una struttura che decorre longitudinalmente tutto il tronco dell'encefalo, dal mesencefalo al bulbo. I due fisiologi scoprirono che la stimolazione elettrica ad alta frequenza della FR provocava in gatti anestetizzati un cambiamento nel quadro EEG, nei termini di un'abolizione del ritmo sincronizzato (tipico dell'anestesia e del sonno) e la comparsa di onde a basso voltaggio e alta frequenza tipiche della veglia (Moruzzi and Magoun, 1949). In altre parole, stimolando elettricamente la formazione reticolare si ottenne un'attivazione corticale piuttosto diffusa e di lunga durata; per contro, lesioni a questa struttura indussero un pattern EEG sincronizzato e uno stato comatoso (French and Magoun, 1952). Queste evidenze portarono a teorizzare che la veglia, di cui la desincronizzazione è l'equivalente elettrofisiologico, è mantenuta da un "tono corticale" indotto dalla facilitazione ascendente delle strutture attivanti del tronco. Esperimenti compiuti in animali liberi di muoversi dimostrarono che la stimolazione reticolare del tronco, parallelamente alla desincronizzazione EEG, induceva risveglio comportamentale nell'animale da esperimento e fenomeni vegetativi (midriasi, polipnea, accelerazione cardiaca, moderato innalzamento della pressione arteriosa sistemica ecc.) tipici della veglia e sovrapponibili a quelli indotti da stimolazione sensoriale (Moruzzi, 1972; Rossi and Zanchetti, 1957). La successiva scoperta che la desincronizzazione EEG era ottenibile anche in un preparato *cerveau isolé* sia per stimolazione olfattoria (Arduini and Moruzzi, 1953) che elettrica di strutture rostrali alla sezione mesencefalica (Belardetti et al., 1957) fece abbandonare del tutto la teoria della deafferentazione.

Negli anni '50 Lindsley e collaboratori dimostrarono che la sola lesione della formazione reticolare del tronco encefalico, in cui le vie lemniscali della sensibilità erano conservate, riproduceva gli effetti della sezione completa del *cerveau isolé* eseguita da Bremer. Per contro, la sola lesione bilaterale delle vie lemniscali a livello del tronco non impediva il risveglio sensoriale né l'alternarsi del sonno e della veglia (Lindsley et al., 1950). Alla luce di queste osservazioni il sonno del *cerveau isolé* fu interpretato non tanto dovuto a deafferentazione sensoriale quanto a interruzione delle vie reticolo-corticali responsabili di quel tono corticale caratteristico dello stato di veglia.

La teoria reticolare che si sostituì a quella della deafferentazione tese a spostare il problema della genesi del sonno da una “passività corticale” indotta dal ridotto afflusso d’informazioni sensoriali, a una passività conseguente al diminuito tono attivante reticolare. Le ipotesi avanzate per spiegare il passaggio dallo stato di veglia al sonno erano molteplici, ma tutte facevano capo a meccanismi di caduta dell’attività dei neuroni reticolari facilitatori, sia per “fatica”, sia per modificazioni biochimiche date da una veglia prolungata, che per una loro ridotta attivazione a causa di un’acuta deafferentazione sensoriale che caratterizza il momento dell’addormentamento (Mancia, 1980). In seguito alle osservazioni di Moruzzi e Magoun, negli anni ’50 il sonno era ancora considerato un fenomeno esclusivamente passivo e legato all’inattivazione dei meccanismi della veglia. Questi ultimi erano considerati essere localizzati lungo il tronco encefalico, senza nessuna differenziazione funzionale tra i vari nuclei reticolari. Le altre strutture cerebrali (tele- e di-encefaliche) non erano chiamate in causa in maniera diretta nella generazione del ritmo veglia-sonno. Alla fine degli anni ’50, tuttavia, un gruppo di ricercatori dell’Istituto di Fisiologia di Pisa dimostrò che animali registrati continuamente per varie settimane e sui quali era stata eseguita una sezione a livello pontino, all’ingresso del trigemino (*preparato medio-pontino pretrigeminali*), presentavano un’insonnia comportamentale cronica e un quadro EEG d’intensa desincronizzazione per la maggior parte del tempo di registrazione. Viceversa, in animali in cui la sezione del tronco encefalico era eseguita pochi millimetri più rostralmente di quella appena descritta (*preparato rostro-pontino*), il quadro EEG da desincronizzato si trasformava in sincronizzato (Batini et al., 1958; Batini et al., 1959a; Batini et al., 1959b; Batini et al., 1959c). Questa evidenza unita ad altri esperimenti effettuati su sezioni del tronco encefalico a diversi livelli (Cordeau and Mancia, 1959) evidenziò la presenza di una differenziazione funzionale tra le strutture della formazione reticolare. Il quadro d’insonnia cronica del *preparato medio-pontino pretrigeminali*, contraddistinta da EEG desincronizzato e veglia comportamentale, era da attribuirsi a una “liberazione” della corteccia dalle influenze sincronizzanti che partivano da strutture situate più caudalmente alla lesione (regioni caudo-pontine e bulbari). La distruzione delle strutture a livello rostro-pontino (*preparato rostro-pontino*) portava, invece, a un quadro EEG sincronizzato; questo rilevava l’importanza delle strutture più rostrali nel mantenimento della veglia e nella desincronizzazione del prosencefalo. Da questi studi si evidenziò la presenza di un sistema rostrale del tronco encefalico con una funzione desincronizzante (veglia) e un sistema caudale capace di indurre sincronizzazione (sonno) dell’encefalo.

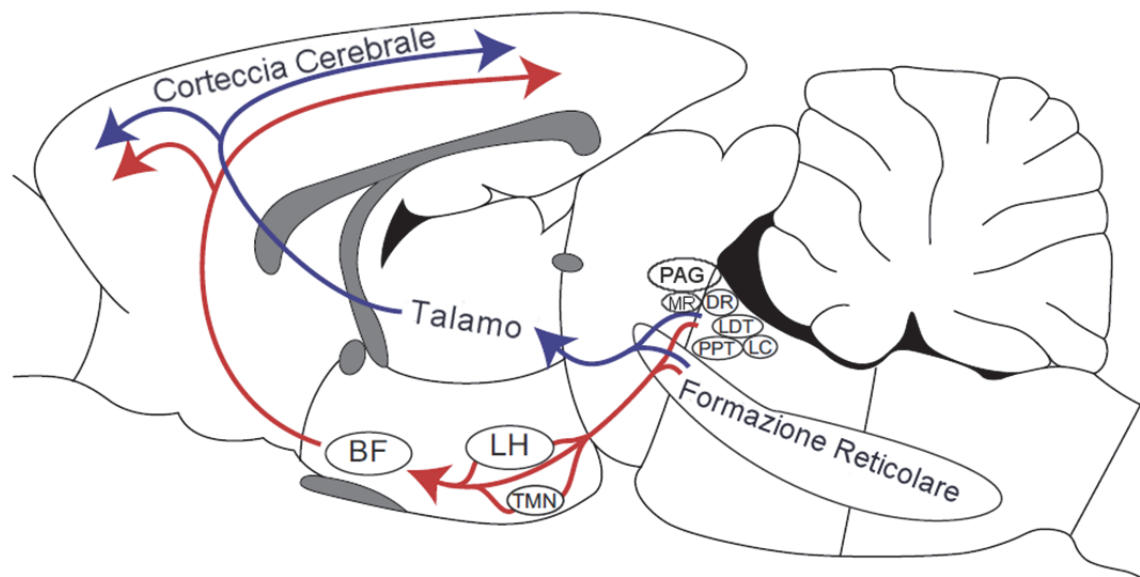
In seguito agli studi pionieristici di Moruzzi e Magoun, altri autori rilevarono che la formazione reticolare non fosse l’unica struttura coinvolta nel mantenimento della veglia, ma, anche altre regioni, più rostrali, fossero importanti a tal fine. Animali con lesioni piuttosto estese a livello della formazione reticolare, con il passare del tempo, erano in grado di recuperare una certa



attività corticale, mostrando un ritmo veglia-sonno nella norma (McGinty, 1969; Villablanca, 1965). Questo fenomeno di restituzione fu attribuito all'esistenza di un ulteriore sistema neuronale in grado di indurre autonomamente l'attivazione cerebrale (*arousal*).

Tutti questi risultati portarono alla formulazione del concetto di sistema reticolare ascendente attivante (*ascending reticular activating system, ARAS*), cioè una rete (reticolo) di fibre nervose che ascendendo dal tronco encefalico genera l'attivazione tipica della veglia. Questo sistema comprende due vie anatomicamente ben distinte:

- i. *Via dorsale*: ha origine dai neuroni glutamatergici della formazione reticolare e da quelli colinergici del *nucleo del tegmento peduncolo-pontino* (PPT) e del *nucleo del tegmento laterodorsale* (LDT). Questa via è direttamente connessa con il talamo, da cui proietta diffusamente in corteccia (fig. 2.2).
- ii. *Via ventrale*: comprende le proiezioni dei neuroni glutamatergici (*formazione reticolare, FR*), noradrenergici (*locus coeruleus, LC*), serotoninergici (*nucleo del rafe dorsale e mediale, DR e MR*) e dopaminergici (*grigio peri-acquedottale, PAG*). Tutte queste fibre convergono nei neuroni dell'ipotalamo laterale e posteriore, e, in seguito, fanno sinapsi a livello del prosencefalo basale, per poi proiettare diffusamente in neocorteccia (fig. 2.2).



**FIGURA 2.2.** Vie anatomiche dell'ARAS: a) *via dorsale* (in blu): si diparte dai neuroni glutamatergici della FR e da quelli colinergici del PPT e del LDT; questa via è collegata direttamente con il talamo e da qui proietta diffusamente in corteccia. b) *via ventrale* (in rosso): costituita dai neuroni glutamatergici della FR, noradrenergici del LC, serotoninergici del DR e MR, e dopaminergici del PAG. La via ventrale proietta ai nuclei dell'ipotalamo: nuclei dell'LH e ai nuclei TMN dell'ipotalamo posteriore. Da qui le proiezioni arrivano al BF, per poi proiettare diffusamente in corteccia. FR: formazione reticolare; PPT: nucleo del tegmento peduncolo-pontino; LDT: nucleo del tegmento laterodorsale; LC: locus coeruleus; DR: nucleo dorsale del rafe; MR: nucleo mediale del rafe; PAG: area del grigio periacquedottale; LH: nuclei dell'ipotalamo laterale; TMN: nuclei tubero-mammillari [adattato da Brown et al., 2012].

Negli anni '60, il focus della ricerca fisiologica sul sonno si spostò all'ipotalamo. Questa struttura, come già accennato, era stata indicata da von Economo come una struttura chiave

nella regolazione del ciclo veglia-sonno (von Economo, 1930). Successivi studi sperimentali dimostrarono che l'attivazione elettrica delle regioni basali preottiche in gatti liberi di muoversi era in grado di indurre sonno elettrico e comportamentale (Serman and Clemente, 1962a; Serman and Clemente, 1962b). Per contro, estese lesioni di quest'area portavano nel gatto a un'insonnia persistente (McGinty and Serman, 1968; Sallanon et al., 1989), mentre una stimolazione termica di questa zona causava un incremento del sonno (Roberts and Robinson, 1969). Da questi dati si dedusse l'importanza di alcune zone del prosencefalo basale, come il *nucleo preottico ventrolaterale* (VLPO) e l'*area preottica mediana* (MnPO) nella generazione del sonno. Queste aree, infatti, grazie alle loro diffuse connessioni inibitorie (GABAergiche e galaninergiche) verso le aree dell'ARAS riducono l'arousal corticale, inducendo un'azione tonica facilitatoria sui sistemi ipnogeni. Dall'altra parte, la stimolazione elettrica dell'ipotalamo posteriore portava a un quadro EEG desincronizzato e risveglio comportamentale, mentre il raffreddamento delle stesse regioni ipotalamiche induceva sincronizzazione e sonno (Naquet et al., 1965). L'ipotalamo posteriore ha, quindi, un'azione sinergica alla reticolare rostrale attivante. Si delineò così l'esistenza di due sistemi coinvolti attivamente nella generazione del ciclo veglia-sonno: un centro *ergotrofico* che promuove la veglia e la desincronizzazione mediante attivazione di strutture reticolari rostrali e ipotalamiche posteriori; queste influenzano diffusamente i ritmi elettrici sia direttamente attraverso una via extra-talamica, sia indirettamente attraverso un'azione che blocca le sequenze del pacemaker talamico; un centro *trofotrofico* che promuove il sonno e la sincronizzazione attraverso l'attivazione di strutture ipotalamiche anteriori (area preottica) che a loro volta reclutano i nuclei sincronizzanti caudo-pontini e bulbari. Le regioni caudali del tronco così attivate inducono sincronizzazione EEG attraverso tre vie: i) una prima via che permette alle regioni caudali del tronco di entrare in fase facilitandole con le sequenze sinaptiche dei neuroni talamici intralaminari della linea mediana (Mancia et al., 1974a); ii) una seconda via che agisce inibendo post-sinapticamente la reticolare ascendente attivante del mesencefalo realizzando con questa un feedback negativo (Mancia et al., 1974b); iii) una terza che influenza direttamente i neuroni corticali attraverso una via extra-talamica presumibilmente subtalamica (Scheibel and Scheibel, 1970). Prese forma l'idea che il sonno non fosse un semplice stato di riposo, ma un comportamento dinamico e attivo, generato da specifiche aree del cervello.

Una svolta nello studio del sonno e delle sue caratteristiche avvenne nel 1953 quando Kleitman e il suo studente Aserinsky scoprirono casualmente che in una certa fase del sonno si evidenziavano treni di movimenti rapidi degli occhi (REM, *Rapid Eye Movement*), atonia muscolare e un pattern EEG simile alla veglia (desincronizzato). La scoperta della fase di sonno REM era una chiara dimostrazione che il sonno non è un processo unitario, bensì uno stato bifasico in cui intervengono diversi comparti neurali (Aserinsky and Kleitman, 2003).

La scoperta della disomogeneità del comportamento ipnico aprì le porte a un maggiore interesse per il sonno e per le sue caratteristiche.

I passi compiuti in campo scientifico nello studio del sonno sono stati possibili grazie all'introduzione dell'elettroencefalografia (EEG). Grazie a questa tecnica fu possibile visualizzare l'attività elettrica cerebrale umana in maniera non invasiva (Tudor et al., 2005).

### **2.1.3 - PILLOLE DI ELETTROENCEFALOGRAFIA (EEG)**

L'elettroencefalografia è una metodica che permette di misurare le variazioni nel tempo dell'attività bioelettrica cerebrale mediante l'applicazione di elettrodi sulla cute dello scalpo (Saladini et al., 2010). Questa tecnica, nell'uomo, è totalmente non invasiva; tuttavia, in condizioni neurochirurgiche e/o sperimentali, la registrazione dell'attività bioelettrica cerebrale può avvenire per mezzo di elettrodi applicati direttamente sulla corteccia cerebrale (elettrocorticografia) o con elettrodi di profondità che s'inseriscono all'interno del tessuto cerebrale (stereo-elettroencefalografia) (Lopes da Silva, 2010). Negli animali da laboratorio (ad es., ratti e topi), invece, gli elettrodi sono solitamente epidurali e posti a contatto con la dura madre.

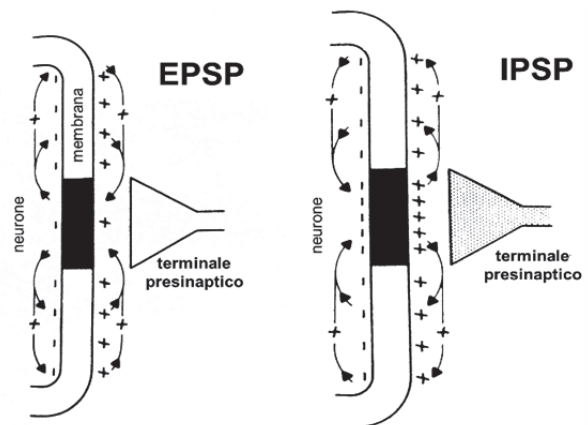
Il primo rudimentale sforzo di registrazione dell'attività elettrica cerebrale fu eseguito da Caton, che nel 1875 visualizzò variazioni di potenziale elettrico provenienti dalla superficie cerebrale di animali da laboratorio mediante l'uso di un galvanometro (Ormerod, 2006). Quest'osservazione fu dimenticata e solo nel 1929, Hans Berger, per la prima volta, applicò nell'uomo degli elettrodi a contatto con il cuoio capelluto, dimostrando la presenza di oscillazioni di potenziale elettrico tra essi (Tudor et al., 2005).

Il segnale elettroencefalografico deriva dall'attività elettrica totale di popolazioni di cellule cerebrali: neuroni e in minima parte cellule gliali. Quest'attività è dovuta a cambiamenti di flussi ionici attraverso le membrane cellulari. Essendo i neuroni cellule eccitabili hanno intrinsecamente proprietà elettriche e, mediante la loro attività, sono in grado di generare campi elettrici che possono essere registrati tramite elettrodi. I neuroni piramidali sono la principale sorgente del segnale EEG, infatti, nonostante i loro corpi cellulari si localizzino soprattutto a livello del III e V strato della corteccia cerebrale, i loro dendriti apicali raggiungono anche gli strati più superficiali della corteccia stessa. Questi neuroni di proiezione si sviluppano verticalmente e si estendono perpendicolarmente alla superficie cerebrale, ricevendo afferenze sia dal talamo (soprattutto a livello del IV strato) che dalla corteccia controlaterale (soprattutto a livello del II strato) (Koester and Siegelbaum, 2013; Westbrook, 2013). In generale, l'arrivo di un

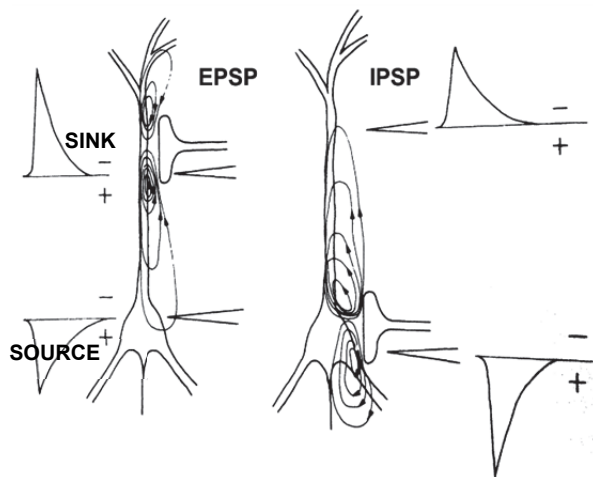
potenziale d'azione da un neurone afferente genera una modificazione della permeabilità ionica della membrana post-sinaptica mediante l'apertura o chiusura di specifici canali ionici con un conseguente cambiamento del potenziale della membrana post-sinaptica. Questa variazione di potenziale è definito potenziale graduale post-sinaptico (PSP, *Post-Synaptic Potential*) e, secondo il tipo di sinapsi, può essere sia di tipo eccitatorio (EPSP, *Excitatory Post-Synaptic Potential*) che inibitorio (IPSP, *Inhibitory Post-Synaptic Potential*). Entrambi questi tipi di potenziale sono caratterizzati da modificazioni dei flussi ionici attraverso la membrana cellulare tramite specifici canali ionici. La generazione di un EPSP provoca, ad esempio, un afflusso di cationi (ad es.,  $\text{Na}^+$ ) nell'ambiente intracellulare, portando quindi a una depolarizzazione della membrana che si trova vicino alla sinapsi.

Questo potenziale graduato induce all'interno della cellula una differenza di carica elettrica tra il mezzo intracellulare più vicino alla sinapsi (elettropositivo) e quello più lontano dalla sinapsi (elettro negativo): si crea così una corrente intracellulare che, per definizione, va dal polo positivo (sorgente, in inglese *source*), cioè lo spazio più vicino alla sinapsi, a quello negativo (scarica, in inglese *sink*), cioè lo spazio più lontano dalla sinapsi. I cambiamenti dei flussi ionici durante l'EPSP si riflettono anche nell'ambiente extracellulare: il flusso di cariche positive all'interno della cellula mobilita gli altri cationi da zone dell'ambiente

extracellulare lontane dalla sinapsi verso lo spazio intrasinaptico. Questo movimento di cariche provoca una corrente extracellulare, inversa a quella intracellulare, che fluisce dalle regioni più lontane dalla sinapsi (elettropositive) a quelle più vicine alla sinapsi (elettro negative) (fig. 2.3 – EPSP). Viceversa, nel caso di un IPSP si ha un efflusso verso l'ambiente extracellulare di ioni a carica positiva (ad es.,  $\text{K}^+$ ) e/o un influsso nello spazio intracellulare di ioni negativi (ad es.,  $\text{Cl}^-$ ), che genera un'iperpolarizzazione della membrana postsinaptica vicino alla sinapsi. In seguito a un IPSP, all'interno della cellula, si genera una corrente che, dallo spazio intracellulare più lontano dalla sinapsi (elettropositivo), fluisce verso quello più vicino alla sinapsi (elettro negativo). Nello spazio extracellulare si genera una corrente di senso opposto: dalle zone più vicine alla sinapsi a quelle più lontane dalla sinapsi (Speckmann and Elger, 1999) (fig. 2.3 – IPSP).



**FIGURA 2.3.** Cambiamenti dei potenziali di membrana e dei flussi di corrente durante l'attivazione sinaptica. Durante un EPSP (sinistra) e un IPSP (destra), i flussi di corrente ionica avvengono sia attraverso ma anche lungo la membrana neuronale, come mostrato dalle frecce. La densità di simboli "+" o "-" indica la polarizzazione della zona sotto la sinapsi (area in nero) ma anche quella della restante membrana durante l'attivazione sinaptica [adattato da Speckmann and Elger, 1999].



**FIGURA 2.4.** Schema di una cellula piramidale corticale raffigurante il modello di flusso di corrente dato dall'attivazione sinaptica in una sinapsi eccitatoria (a sinistra) e una inibitoria (a destra). Tipicamente i dendriti apicali di queste cellule sono orientati verso la superficie corticale. EPSP: il flusso di corrente generato dall'attivazione di una sinapsi eccitatoria a livello di un dendrite apicale crea una *corrente scarica (sink)* nel medium extracellulare vicino alla sinapsi. La registrazione extracellulare dell'EPSP è indicata a sinistra. Questa ha una polarità negativa a livello della sinapsi. A livello del soma è presente una distribuzione passiva di *corrente sorgente (source)*, conseguente a un potenziale extracellulare di polarità positiva. IPSP: il flusso di corrente causato da una sinapsi inibitoria a livello del soma genera una sorgente extracellulare vicino al soma stesso e una scarica passiva a livello dei dendriti basali e apicali. La registrazione dell'IPSP extracellulare a livello del soma e dei dendriti apicali è mostrata a destra. Notare che in entrambi i casi si crea una configurazione dipolare sorgente – scarica [adattato da Lopes da Silva and van Rotterdam, 1999].

“sorgenti (*source*) passive” ben distribuite lungo la membrana del soma e dei dendriti. Inversamente avviene nel caso di un IPSP: la “sorgente (*source*, +) attiva” a livello sinaptico, è compensata da “scariche (*sink*, -) passive” lungo il resto della membrana neuronale (Lopes da Silva and van Rotterdam, 1999) (fig. 2.4).

La generazione di siti di sorgente e di scarica dà origine a potenziali elettrici extracellulari. Tali potenziali sono generalmente conosciuti come potenziali di campo (*field potentials*) e si comportano come un dipolo elettrico (Speckmann and Caspers, 1979). Perché il dipolo possa essere rilevato da un elettrodo, occorre che molte cellule presentino lo stesso tipo di attività elettrica in maniera contemporanea, o quasi contemporanea (Saladini et al., 2010).

Il potenziale registrato dall'elettrodo è direttamente proporzionale alla carica  $q$  del dipolo, alla distanza ( $d$ ) tra polo positivo e negativo del dipolo e al coseno dell'angolo formato tra l'asse del dipolo e dalla retta che congiunge l'elettrodo con il centro del dipolo ( $\alpha$ ). Questo potenziale è, invece, inversamente proporzionale al quadrato della distanza ( $r$ ) dell'elettrodo dalla sorgente  $q$  e alla costante dielettrica del mezzo ( $\epsilon_0$ ). In sintesi:

L'attività sinaptica produce, quindi, un cambiamento del potenziale di membrana post-sinaptico (PSP). Questo induce una corrente ionica positiva in entrata (nello spazio intracellulare) nel caso di un EPSP, in uscita nel caso di un IPSP. Come conseguenza di questi flussi ionici, una “scarica (*sink*) attiva” è creata nello spazio extracellulare vicino alla sinapsi, nel caso questa sia eccitatoria (EPSP); viceversa, nel caso di una sinapsi inibitoria (IPSP), si genera una “sorgente (*source*) attiva” a livello sinaptico. Poiché non vi può essere accumulo di cariche nel *medium*, le correnti transmembranarie che scorrono all'interno e all'esterno del neurone, a livello del sito sinaptico attivo, sono compensate da correnti che scorrono in senso opposto in altri punti (lontani dalla sinapsi) lungo tutta la membrana neuronale. Conseguentemente, nel caso di un EPSP, accanto alla “scarica (*sink*) attiva” a livello della sinapsi, vi sono

$$V = \frac{qd \cos \alpha}{\varepsilon_0 r^2}$$

Queste relazioni che riguardano l'orientamento, la forza e la distanza del dipolo, e il mezzo che viene attraversato dal campo elettrico, hanno un'enorme importanza nella pratica. Per quanto riguarda l'orientamento, la specifica anatomia della superficie corticale determina una certa variabilità nell'orientamento dei dipoli. Questi possono essere: i) radiali, se orientati in modo perpendicolare alla superficie corticale; ii) tangenziali, se localizzati in un solco o in una scissura interemisferica, quindi paralleli alla superficie corticale; iii) trasversali, cioè obliqui alla corteccia cerebrale. Secondo l'orientamento del dipolo, il potenziale registrato dall'elettrodo subisce delle variazioni: se il dipolo è orientato radialmente, si avrà il massimo voltaggio registrabile ( $\cos 0 = 1$ ), mentre nessun potenziale sarà registrato nel caso di dipoli tangenziali ( $\cos \pi/2 = 0$ ); una situazione intermedia si verifica per dipoli a posizione trasversale (Saladini et al., 2010). Ciò significa che non tutti i dipoli incidono allo stesso modo nella generazione dell'EEG corticale (Olejniczak, 2006).

La relazione con la distanza sottolinea che, a parità di carica  $q$ , il potenziale registrato sarà più piccolo se la sorgente è più distante. Inoltre, il passaggio attraverso diversi dielettrici (meningi, teca cranica, cuoio capelluto) provocherà un'attenuazione del segnale.

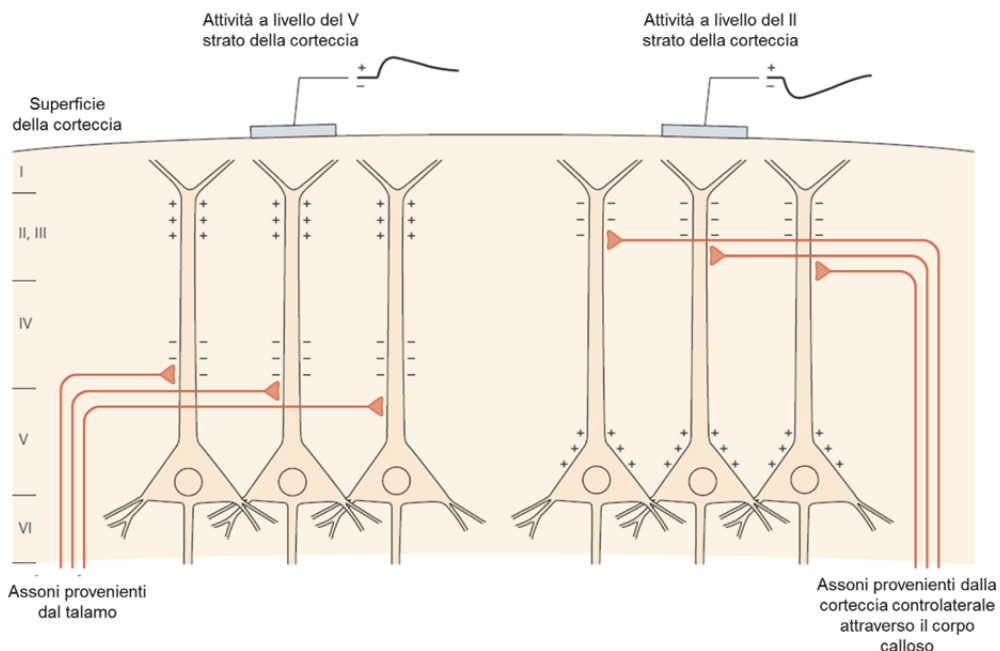
La polarità del potenziale registrato da un elettrodo di superficie dipende, invece, dalla sede dell'attività sinaptica. Sinapsi eccitatorie che si trovano in profondità creano un flusso di corrente extracellulare che dall'estremità apicale si dirige verso la parte basale del neurone (soma e dendriti basali), generando così una deflessione positiva del voltaggio registrato da un elettrodo di superficie (fig. 2.5). Sinapsi a livello più superficiale generano, invece, una deflessione negativa del voltaggio registrato dall'elettrodo posto nella stessa posizione (fig. 2.5). Lo stesso schema si osserva nel caso di una sinapsi inibitoria ma in maniera inversa: il potenziale di sinapsi profonde, registrato da un elettrodo superficiale, genererà una deflessione negativa della sua polarità; mentre sinapsi più superficiali indurranno una deflessione positiva.

Troppi fattori condizionano l'attività EEG e ne rendono difficile la teorizzazione, ad esempio, l'interazione tra sottotipi cellulari (amplificazione gliale), la complessa anatomia corticale, l'influenza di strutture sottocorticali, la conduttività elettrica dipendente dai vari strati dall'encefalo allo scalpo. Nonostante la corteccia cerebrale sia in grado di generare intrinsecamente attività elettrica, le strutture sottocorticali, in particolare il talamo (date le sue numerose afferenze nei diversi strati corticali), sono importanti nella generazione e nella modulazione di tale attività.

Tutto il processo di registrazione EEG prevede: i) la rilevazione del potenziale bioelettrico tramite l'applicazione di elettrodi secondo normative standard; ii) l'amplificazione del potenziale registrato, necessaria perché i potenziali bioelettrici sono caratterizzati da voltaggi molto bassi;

iii) il filtraggio del segnale per eliminare particolari fonti di rumore esterne al segnale; iv) la registrazione dei potenziali in forma digitale o analogica.

Alla fine di tutto il processo di registrazione si ottiene un segnale che si presenta sotto forma di linea oscillante contraddistinta da un'ampiezza (nell'ordine dei  $\mu\text{V}$ ) e una frequenza (Hz) tra loro inversamente proporzionali. L'ampiezza del segnale EEG è nell'ordine dei microvolt e non dei millivolt (mV), come invece accade per le registrazioni intracellulari. Questo è dovuto principalmente alla legge di Ohm ( $V = I \times R$ , dove  $V$  è il voltaggio,  $I$  la corrente e  $R$  la resistenza). Nelle registrazioni intracellulari un elettrodo è posto all'interno della cellula e l'altro all'esterno, mentre in quelle extracellulari (come l'EEG) entrambi gli elettrodi sono posti all'esterno della cellula. Nel primo tipo di registrazione (intracellulare) la resistenza è data dalla membrana plasmatica, nel secondo caso, invece, la resistenza è data dal fluido extracellulare. Registrando lo stesso fenomeno elettrico (corrente  $I$ ), intracellularmente ed extracellularmente, si ottengono valori di voltaggio diversi. Questo perché la resistenza della membrana plasmatica ha un valore molto più ampio del fluido extracellulare, di conseguenza il voltaggio registrato sarà di ordine di grandezza diverso (Westbrook, 2013). Unitamente a ciò, c'è anche da considerare che il segnale proveniente dai diversi gruppi neuronali, passando attraverso diversi tessuti (meningi, teca cranica e cuoio capelluto), subisce ulteriori distorsioni e attenuazioni. Nel caso della registrazione EEG da piccoli animali da laboratorio, come i roditori, è anche da considerare che



**FIGURA 2.5.** La polarità dell'EEG di superficie dipende dalla sede dell'attività sinaptica all'interno della corteccia. Un segnale convogliato da una fibra afferente eccitatoria talamocorticale, che termina a livello del IV strato (a sinistra), produce nell'elettrodo EEG di superficie una deflessione verso il basso perché l'elettrodo è più vicino alla sorgente (+). Al contrario un segnale ritrasmeso da una fibra afferente proveniente dall'emisfero controlaterale, che termina nel II strato della corteccia (a destra), produce una deflessione verso l'alto perché l'elettrodo è più vicino al minimo [adattato da: Westbrook, 2013].

le ridotte dimensioni del cervello e quindi la presenza di un più basso numero di generatori neurali, risulta in un'ampiezza del segnale molto ridotta. Per questi motivi il segnale in uscita che si ottiene ha una bassa ampiezza e quindi è indispensabile, prima della registrazione, amplificarlo, per mezzo di amplificatore, e filtrarlo in maniera opportuna.

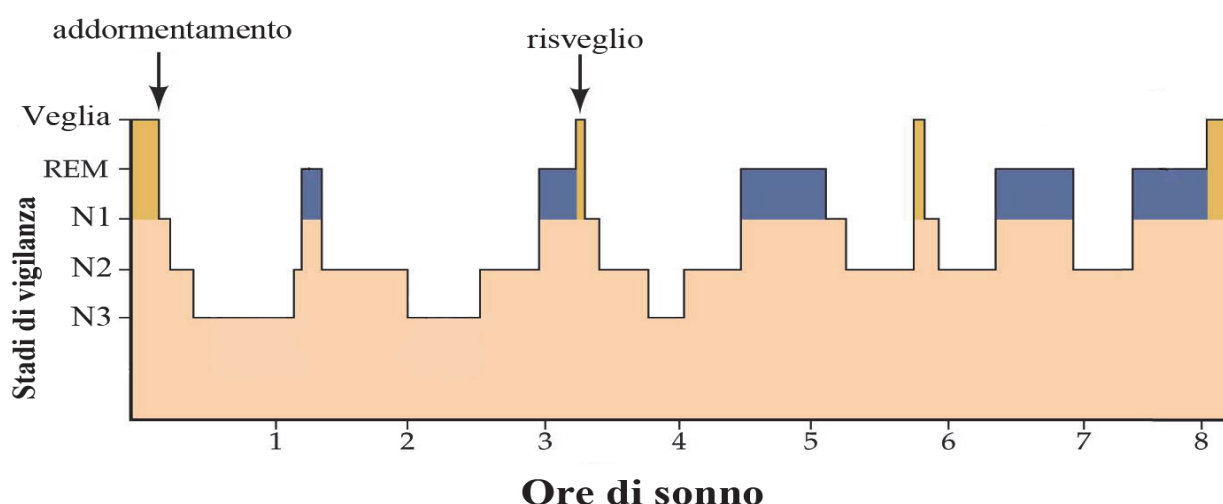
Lo sviluppo di una tecnica non invasiva per la visualizzazione dell'attività cerebrale come l'EEG ha aumentato le conoscenze sulle caratteristiche qualitative e quantitative del sonno, così da poter indagare questo fenomeno in maniera scientifica. Durante le 24 ore, l'elettroencefalogramma cambia configurazione passando da un ritmo desincronizzato a uno sincronizzato. I tracciati desincronizzati sono spesso associati a stati di maggiore *arousal* (attivazione cerebrale), poiché l'attività dei neuroni, scaricando in maniera asincrona, è scarsamente sommabile e il risultato è la generazione di onde di bassa ampiezza e alta frequenza; viceversa, un tracciato sincronizzato è caratterizzato da onde ad alta ampiezza e bassa frequenza, questo perché i neuroni scaricano in maniera sincrona e dunque la loro attività si somma, generando onde di grande ampiezza. La sincronia dell'EEG è considerata il substrato neurofisiologico degli stati neocorticali di minore *arousal*, come il sonno NREM (Parrino and Terzano, 1998).

L'unione dell'elettroencefalografia ad altri indici, come la registrazione dei movimenti oculari (elettroculografia, EOG), del tono muscolare (elettromiografia, EMG), dell'attività cardiaca (elettrocardiografia, ECG) ecc., ha portato alla polisonnografia (PSG), cioè una serie di tecniche che sono utilizzate per lo studio del sonno (Casagrande, 1998).



## 2.1.4 – COS'È IL CICLO VEGLIA-SONNO?

L'applicazione della polisonnografia ha reso possibile la descrizione dell'architettura del sonno e la distinzione dei tre diversi stati comportamentali che si alternano durante le 24 ore: la veglia, il sonno NREM e il sonno REM. Per sottolineare l'andamento ritmico delle fasi del sonno e della veglia si parla di ciclo veglia-sonno (V-S). Ogni fase di questo ciclo è caratterizzata da particolari modificazioni comportamentali e cambiamenti nel pattern EEG (descritti più avanti).



**FIGURA 2.6.** Ipnogramma di un giovane adulto: in ascissa sono rappresentate le ore di registrazione (ore della notte); in ordinata sono rappresentati gli stadi di vigilanza (Veglia, sonno REM e i tre sotto-stadi del sonno NREM) [adattato da *Breedlove, 2007*].

### 2.1.4.1 - L'ARCHITETTURA DEL CICLO VEGLIA-SONNO

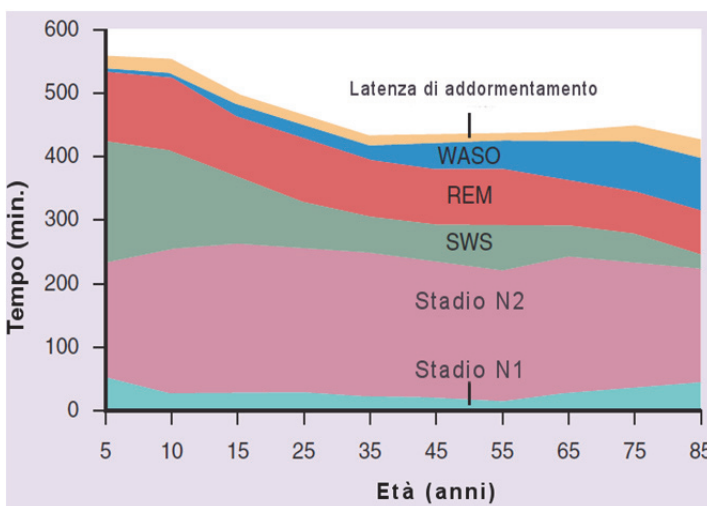
Il ciclo veglia-sonno è definito ciclo circadiano (dal latino *circa diem*: circa un giorno) poiché ha una periodicità di circa 24 ore. Nell'uomo, per esempio, i due stati (veglia e sonno) che contraddistinguono questo ciclo si alternano in maniera circadiana: la veglia si svolge durante le ore diurne, mentre il sonno nelle ore notturne. All'interno di questo ciclo circadiano s'inscrive un ciclo ultradiano (inferiore alle 24 ore) dato dall'alternarsi ciclico di due fasi del sonno: il sonno NREM e il sonno REM. Per questa ragione, si parla anche di ciclo di sonno NREM - REM.

La fine strutturazione del ciclo NREM - REM è ben descritta da un'ipnogramma, cioè una rappresentazione grafica in cui, in ascissa, sono presenti le ore di registrazione, mentre, in ordinata, le varie fasi del ciclo veglia-sonno (fig. 2.6). Mediante l'ipnogramma non solo è possibile visualizzare l'alternarsi delle fasi di sonno, ma anche valutare altri parametri come la

durata di ciascuna fase, la latenza di addormentamento e di comparsa di una specifica fase e la frammentazione del sonno. Per questo motivo esso è un utile strumento per valutare la qualità del sonno e delinearne l'architettura.

Come si osserva dalla figura 2.6 il ciclo veglia-sonno ha una precisa organizzazione: da uno stato di veglia si passa ai tre diversi sotto-stadi (N1, N2 e N3) del sonno NREM, che si caratterizzano per il crescente grado di profondità del sonno. Al crescere della profondità dell'attività ipnica aumenta sempre più la soglia di stimolazione per il risveglio, fino ad arrivare al sotto-stadio N3 in cui il risveglio, a seguito di stimolazione sensoriale, risulta essere molto difficile. Data la predominanza nel tracciato EEG di onde di ampio voltaggio e bassa frequenza (> 50% del tempo) questo stadio è definito anche sonno a onde lente (in inglese *Slow Wave Sleep*, SWS).

La progressione dalla veglia al sotto-stadio N3, all'inizio della notte, è molto rapida, avviene in circa trenta minuti (fig. 2.6): dallo stato di veglia si passa inizialmente a uno stato superficiale di sonno NREM (N1), per poi procedere verso stati di sonno NREM più profondo (N2-N3). Dopo circa 70 minuti dall'addormentamento, si passa, invece, a una fase di sonno REM (R), di durata variabile (circa 15 minuti), per poi ritornare allo stadio N1 e proseguire nuovamente attraverso le fasi del sonno NREM. L'intero ciclo ultradiano di sonno NREM - REM, nell'uomo, ha una durata media di circa 90 - 110 minuti. Durante l'intera notte si possono presentare circa cinque cicli di sonno NREM - REM, durante i quali possono essere presenti brevi periodi di veglia (risvegli). I cicli di sonno NREM - REM, che si alternano durante la notte, si differenziano tra loro per le percentuali di tempo spese nei vari stadi di sonno, infatti, con l'avvicinarsi delle ore mattutine aumenta il tempo speso in sonno REM a scapito degli stadi più profondi del sonno NREM (fig.



**FIGURA 2.7.** Cambiamenti del sonno età-dipendenti in soggetti sani. In ascissa è espressa l'età in anni; in ordinata il tempo in minuti per: la latenza di addormentamento, i risvegli durante il sonno (WASO), il sonno REM, il sonno a onde lente (SWS), lo stadio N2 e lo stadio N1. [adattato da: Carskadon and Dement, 2011].

2.6). I cambiamenti nelle percentuali di tempo trascorso nelle varie fasi si osservano anche con l'invecchiamento (fig. 2.7): in età prenatale e neonatale la gran parte del tempo è spesa in sonno, in particolare in quello REM. Con l'avanzare degli anni si assiste a un graduale aumento dello stato di veglia, a scapito del sonno NREM, soprattutto dei suoi stadi più profondi (SWS). Il sonno REM, invece, si mantiene pressoché stabile durante l'invecchiamento (Carskadon and Dement, 2011).

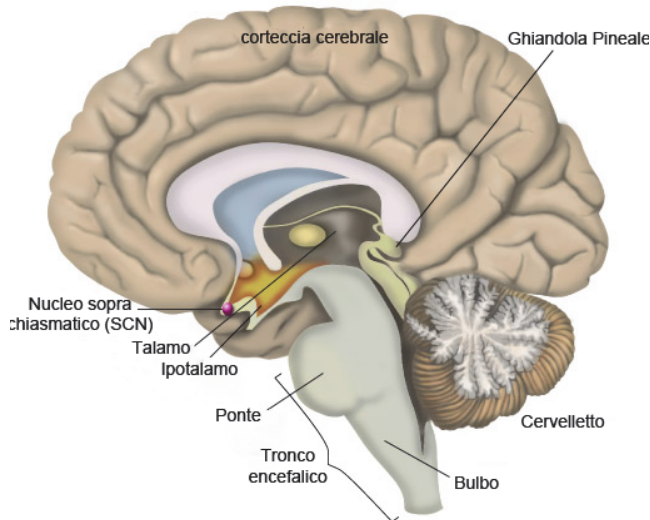
## 2.1.4.2 - LA REGOLAZIONE DEL CICLO VEGLIA-SONNO

Il ciclo veglia-sonno è un processo ben organizzato e regolato, ma cos'è che determina l'inizio del sonno e la fine della veglia? In altre parole, quali fattori determinano il “*timing*” tipico del sonno e delle sue fasi?

La regolazione del ciclo veglia-sonno e la durata delle sue fasi sono dovute all'azione di due processi: da una parte il processo circadiano (C); dall'altra, il processo omeostatico (S). In poche parole: il processo circadiano rappresenta la fluttuazione giornaliera della maggiore o minore propensione al sonno; il processo omeostatico sta invece a indicare l'aumento della propensione al sonno in funzione delle ore trascorse in veglia (debito di sonno). La complessa relazione tra questi due processi è alla base della regolazione temporale del ciclo veglia-sonno.

### 2.1.4.2.1 - IL SONNO COME CICLO CIRCADIANO

Una caratteristica saliente del sonno è la sua ritmicità circadiana (24 ore). Questo tipo di andamento caratterizza anche altri aspetti del comportamento, della fisiologia e della biochimica degli organismi viventi (ad es., la regolazione della temperatura o il rilascio di ormoni) (Turek, 2011). Storicamente questi ritmi circadiani erano ritenuti essere innati o risposte adattive a stimoli che variano durante il giorno, come la luce, l'umidità e la temperatura. Tuttavia, nel 1729 l'astronomo Jean-Jacques d'Ortous de Marain osservò che il ritmo circadiano di movimento delle foglie caratteristico delle piante eliotropiche (apertura delle foglie con la luce e chiusura con il buio) si manteneva anche in condizione di buio costante, ma con una variazione del suo periodo (Kraft and Martin, 1995). In seguito, molti studi confermarono che i ritmi circadiani in molte specie, tra cui l'uomo, si mantenevano anche in assenza d'indizi temporali esterni. Questo suggeriva la presenza di meccanismi endogeni di segnatempo, simili a orologi, che stabiliscono la periodicità del ciclo (Mistlberger and Rusak, 2011). Oggi si ritiene che tutti i ritmi biologici siano regolati in maniera endogena da particolari “orologi biologici interni” che forniscono il ritmo necessario a generare l'intero ciclo. Tutti gli orologi biologici risentono, comunque, dell'influenza di particolari indizi temporali esterni (ad es., ciclo luce-buio), meglio conosciuti con il termine tedesco *zeitgebers* (marca-tempo), che possono alterare oppure azzerare del tutto il ritmo in questione. Uno dei marca-tempo più importanti è il ciclo luce-buio, con cui il ciclo veglia-sonno è altamente sincronizzato. Nonostante l'importanza degli *zeitgebers* sul funzionamento degli orologi biologici interni, studi sperimentali hanno dimostrato che in assenza di qualsiasi riferimento temporale esterno, gli orologi endogeni sono in grado di funzionare autonomamente e producono tutto il ciclo che regolano, anche se con modificazioni nella sua periodicità temporale. Infatti, in assenza di *zeitgebers*, i ritmi biologici (ad es., il ciclo sonno-veglia, la temperatura corporea ecc.) sono mantenuti, ma presentano un periodo più



**FIGURA 2.8.** Localizzazione anatomica del nucleo soprachiasmatico (SCN) e della ghiandola pineale (epifisi). [Adattato da <http://healthysleep.med.harvard.edu>]

soprachiasmatico, ricevendo afferenze direttamente dalla retina attraverso il tratto retino-ipotalamico, è informato direttamente sulle condizioni di luminosità esterna. L'SCN stimola l'epifisi al rilascio di melatonina, che promuove il sonno ed è un forte sincronizzatore (Chowdhury et al., 2008). Per queste sue caratteristiche, il nucleo soprachiasmatico è particolarmente importante perché considerato l'orologio biologico interno *master* dal quale dipendono tutti gli altri orologi endogeni, detti *slave*. A prova del ruolo primario del SCN, alcuni esperimenti hanno dimostrato che, in ceppi mutanti di criceti che presentavano periodi circadiani diversi, il trapianto del SCN ripristinava i ritmi circadiani in animali che non li presentavano a causa della rimozione di questa struttura. I ritmi circadiani ripristinati presentavano la stessa periodicità del genotipo del donatore indipendentemente dalla direzione del trapianto e dal genotipo del ricevente (Ralph et al., 1990).

I ritmi circadiani, incluso il ciclo veglia-sonno, nei mammiferi sono regolati in maniera endogena dal SCN (Gooley and Saper, 2011). Le basi molecolari dei cicli circadiani sono state ampiamente studiate nelle piante (Bunning, 1969), nella *drosophila melanogaster* (Rensing et al., 1968) e nei mammiferi (Ashkenazi et al., 1993). Si ritiene che la regolazione circadiana sia mantenuta intracellularmente attraverso un controllo, a feedback positivo e negativo, della trascrizione (e quindi anche della sintesi di proteine) di vari geni (*Clock*, *Bmal1*, *Per* e *Cry*): per una completa trattazione riferirsi alla review di Schott e Hobson del 2002 (Pace-Schott and Hobson, 2002).

lungo (circa 25 ore) rispetto a condizioni normali (Aschoff and Wever, 1976), questo fenomeno è conosciuto come *free-running*.

La particolare organizzazione anatomica del nucleo soprachiasmatico (*suprachiasmatic nucleus*, SCN), situato nell'ipotalamo anteriore, appena sopra al chiasma ottico (fig. 2.8), conferisce a questa struttura la possibilità di coordinare la sua attività neuronale circadiana e integrare fattori temporali esterni (condizioni di luminosità, temperatura ecc.), modulando così i cicli circadiani. Il nucleo

Il nucleo soprachiasmatico, nei mammiferi, modula il ciclo veglia-sonno ed è a questo che si deve la fisiologica fluttuazione di una maggiore o minore propensione al sonno durante la giornata, come mostrato in fig. 2.9 (Cirelli, 2009).



**FIGURA 2.9.** Rappresentazione grafica della fluttuazione giornaliera di propensione al sonno, secondo il processo circadiano. [Adattato da: Cirelli, 2009].

#### **2.1.4.2.2 - IL SONNO COME PROCESSO OMEOSTATICO**

Se il sonno fosse sotto il solo diretto controllo del processo circadiano (C), la sua regolazione sarebbe semplice e meccanica. Tuttavia, esso risente anche del precedente periodo di veglia. Il solo ciclo circadiano non riesce, infatti, a spiegare il perché, ad esempio, nel caso di una notte “brava”, o in caso di turni di lavoro notturno, il ciclo veglia-sonno possa totalmente invertirsi: il sonno manifestarsi durante le ore diurne e la veglia durante quelle notturne. Questi, seppur banali esempi, indicano la presenza di qualcos’altro oltre al processo circadiano. Un’altra osservazione, meno aneddotica, dà adito a questa ipotesi: dalla registrazione EEG durante una normale notte di sonno, si può osservare come la *Slow Wave Activity* (SWA) durante il sonno NREM, definita come l’ammontare di onde EEG comprese tra 0,5 e 4 Hz (attività delta), sia maggiore nei primi episodi di NREM e decada durante la notte. Infatti, già tra il primo e il secondo episodio di NREM, si assiste a una diminuzione della SWA (Achermann and Borbely, 1997). È plausibile ipotizzare, quindi, che il bisogno di dormire sia molto alto nella parte iniziale del sonno e gradualmente declini con il progredire dell’attività ipnica. In accordo con questo, alcuni studi riportano che sia la soglia per il risveglio sia la predominanza di onde lente nell’EEG sono entrambe alte durante l’inizio del sonno e poi progressivamente diminuiscano (Blake and Gerard, 1937). Infatti, è stato osservato che in tutti i mammiferi, compresi gli uomini, la SWA è in relazione quantitativa e predittiva con la precedente quantità di sonno e veglia. Una perdita di sonno porta a un aumento della SWA durante il successivo periodo di sonno NREM che è direttamente proporzionale all’entità della perdita (Dijk et al., 1987; Tobler and Borbely, 1986).

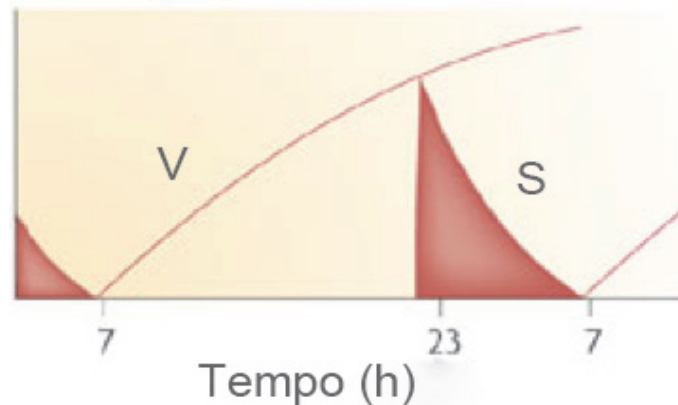
Al contrario, un eccesso di sonno porta, invece, a un'attenuazione della SWA (Vyazovskiy et al., 2006; Werth et al., 1996).

Anche dallo studio dei *naps* (pennichella) si sono ricavate importanti osservazioni per la regolazione del sonno. Alcuni studi, infatti, hanno rilevato che il livello di SWA, durante il *naps*, è più ampio nei *nap* che accadono più tardi nell'arco della giornata, rispetto a quelli che occorrono prima (Dijk et al., 1987; Dijk, 1995). Inoltre, è stato visto che la presenza di *nap* durante il giorno riduce la presenza di SWA durante la notte successiva (Werth et al., 1996); viceversa una riduzione nella durata del sonno notturno porta a un aumento della SWA durante i *naps* diurni successivi (Akerstedt and Gillberg, 1986; Gillberg and Akerstedt, 1991). Questi studi rendono evidente come l'attività ipnica, oltre ad essere regolata da un ciclo circadiano, è influenzata anche da un processo di tipo omeostatico, intendendo con omeostasi la condizione di stabilità interna degli organismi che deve mantenersi tale anche al variare delle condizioni esterne, attraverso meccanismi autoregolatori (Cannon, 1932).

Una delle maggiori evidenze a favore dell'omeostaticità dell'attività ipnica proviene da particolari protocolli sperimentali, in cui l'intero meccanismo ipnico è messo in crisi attraverso una riduzione o una totale assenza del tempo passato in sonno, in altre parole la deprivazione di sonno. In vari studi, sia su animali che su uomini, a seguito di una deprivazione parziale o totale di sonno, nella notte successiva si osserva un tipico effetto di *rebound* (letteralmente rimbalzo), caratteristico di tutti i processi omeostatici, palesato attraverso un aumento delle ore passate in sonno rispetto a una condizione basale. In particolare, si assiste a un aumento del sonno a onde lente (SWS, il più profondo), a scapito delle altre fasi del sonno NREM e del sonno REM (Belenky et al., 2003; Brunner et al., 1993; Guilleminault et al., 2003; Van Dongen et al., 2003). Il sonno a onde lente avviene principalmente nella prima parte del sonno dopo deprivazione a evidenziare l'importanza di questa tipologia di sonno (Berger and Oswald, 1962; Carskadon and Dement, 2011; Dement and Greenberg, 1966; Webb and Agnew, Jr., 1965). In altri termini, una veglia prolungata aumenta la pressione del sonno, che, poi, si esaurisce una volta che si mette in atto l'attività ipnica. Appena svegli il bisogno di sonno è minimo e aumenta secondo il processo omeostatico in maniera graduale per tutta la durata della veglia (fig. 2.10). Uno degli indicatori più importanti della necessità di sonno è la *Slow Wave Activity* durante il sonno NREM. Grazie all'introduzione dell'analisi spettrale dei segnali EEG è stato possibile riconoscere il processo costante e omeostatico sottostante al ciclo di veglia-sonno e a quello di sonno NREM - REM. Questo processo omeostatico (S) si riflette nella variazione temporale dell'attività delta (SWA) nel sonno NREM durante tutto il periodo del ciclo veglia-sonno (Tobler, 2011).

A livello molecolare s'ipotizza che il responsabile di questa "necessità" di sonno, sia un nucleoside purinico: l'adenosina (vedi più avanti, 2.1.4.3.3 - IL CIRCUITO "FLIP-FLOP": DALLA

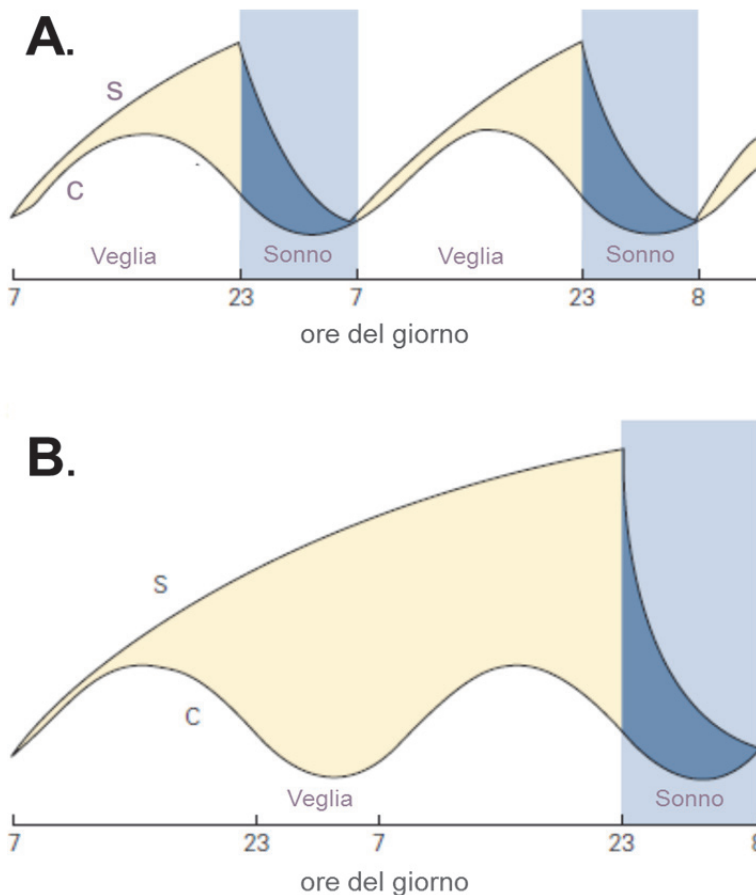
VEGLIA AL SONNO NREM). Questa molecola, essendo un prodotto del metabolismo, si accumula in diverse regioni cerebrali, soprattutto nel prosencefalo basale, promuovendo così, mediante secondi messaggeri, la transizione dalla veglia al sonno a onde lente. Questo effetto dell'adenosina è dovuto alla sua azione inibitoria, per mezzo del nucleo del tratto solitario, sul sistema colinergico e non-colinergico promotori della veglia, spiegando così anche gli effetti del *rebound* post-deprivazione (Basheer et al., 2004).



**FIGURA 2.10.** Rappresentazione grafica della propensione al sonno secondo il processo omeostatico [adattato da: *Cirelli, 2009*].

### **2.1.3.2.3 - IL CICLO CIRCADIANO E IL PROCESSO OMEOSTATICO: UN'INTEGRAZIONE**

La fisiologica fluttuazione della propensione al sonno e la lunghezza del precedente periodo di veglia stabiliscono il "timer" del sonno. Com'è possibile integrare i due fenomeni? Nel 1982, varie dimostrazioni sperimentali (Feinberg, 1974; Webb and Agnew, Jr., 1971) portarono Borbély a ipotizzare un modello che spiegasse il perché della propensione al sonno mediante la fine interazione tra i due caratteri distintivi del sonno: da una parte quello di tipo circadiano (C), che rappresenta le fluttuazioni giornaliere ritmiche di una maggiore o minore propensione all'addormentamento, quindi endogeno e del tutto indipendente dalle ore passate in veglia. Dall'altra parte quello di tipo omeostatico (S), che sta a indicare una pressione verso il sonno sempre maggiore dal momento del risveglio fino al successivo addormentamento (Borbely, 2009). Il modello matematico elaborato prevede che, assegnato un valore a entrambi i processi (circadiano e omeostatico), la propensione al sonno totale sia dovuta alla differenza tra questi due valori. Come si può notare dalla figura 2.11.A, al mattino il debito di sonno è nullo (processo S), allo stesso modo il processo circadiano si trova al suo minimo. La differenza tra i due processi è pari a zero, quindi si ha il risveglio. Durante la mattinata entrambi i processi crescono assieme, quindi, la loro differenza, che rappresenta la propensione al sonno, è bassa. Verso sera, invece, le ore di veglia accumulate accrescono sempre di più la necessità di sonno,



**FIGURA 2.11.** Rappresentazione grafica del modello a due processi. **A.** Interazione tra il processo circadiano (C) e omeostatico (S) in un normale ciclo veglia-sonno: la propensione al sonno aumenta durante il giorno (area gialla) e diminuisce durante il sonno (area blu). **B.** Interazione tra i suddetti processi durante deprivazione di sonno [adattato da: *McCormick e Westbrook, 2001*].

mentre il ritmo circadiano comincia a decrescere. La differenza tra i due processi aumenta sempre di più e questo stimola la sonnolenza e determina l'inizio del sonno. Una notte di sonno resetta il debito di sonno, quindi la differenza tra i due processi si azzerava e questo porta nuovamente al risveglio.

Durante una notte di deprivazione di sonno (fig. 2.11.B) si può esperire un'enorme difficoltà a rimanere svegli durante la fascia di ore comprese tra le 3:00 – 4:00 a.m.; questo perché il debito di sonno accresce sempre di più (processo S), mentre il ritmo circadiano raggiunge il suo minimo in queste ore. La differenza tra i due processi è molto ampia e ciò porta a una

maggior propensione al sonno. Il processo C, quindi, non risente della deprivazione, ma continua le sue fluttuazioni; mentre, il processo S si accumula sempre di più, accrescendo gradualmente la distanza dal processo C e incrementando conseguentemente la propensione al sonno (McCormick and Westbrook, 2011).



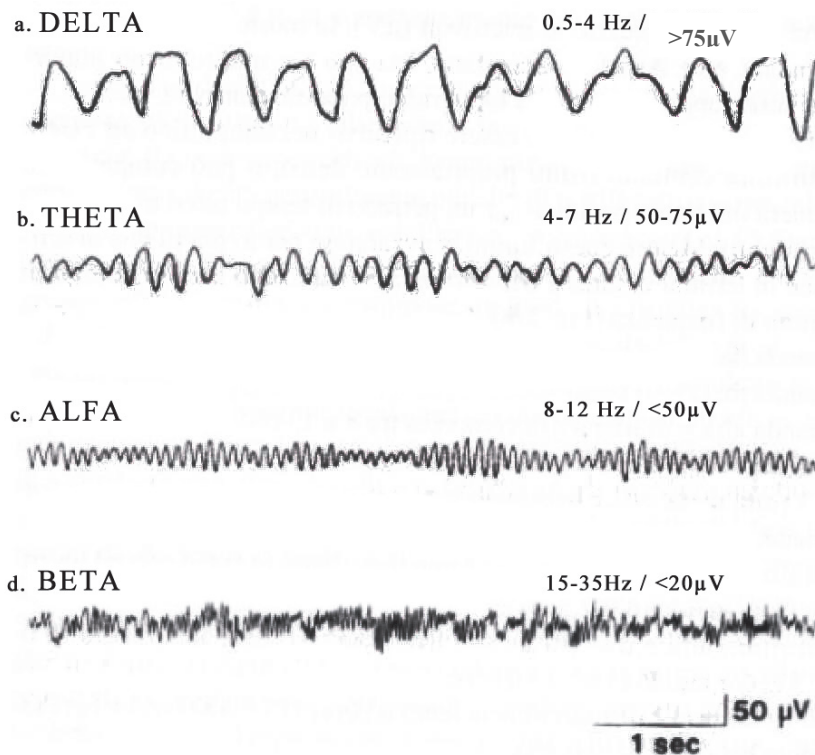
### 2.1.4.3 - LE FASI DEL CICLO VEGLIA-SONNO

Ciascuna fase del ciclo veglia-sonno è contraddistinta da un'attività cerebrale tipica, da caratteristiche comportamentali distintive ed è sostenuta da circuiti neuronali diversi.

Di seguito saranno descritte le tre fasi del ciclo veglia-sonno e le loro principali caratteristiche.

#### 2.1.4.3.1 - LA VEGLIA

**Caratteristiche.** La veglia è uno stato comportamentale caratterizzato da arousal e attivazione corticale, palesata in un tracciato EEG desincronizzato. Nell'uomo è contraddistinta da un ritmo di tipo beta (frequenza: 15 - 30 Hz; ampiezza: < 20  $\mu$ V, fig. 2.12.d) durante la veglia attiva e di tipo alfa (frequenza: 8 - 12 Hz; ampiezza: < 50  $\mu$ V, fig. 2.12.c) durante la veglia rilassata (fig. 2.13.A).



**FIGURA 2.12.** Ritmi EEG. a. Delta; b. Theta; c. Alfa; d. Beta. [Adattato da: De Gennaro e Casagrande, 1998]

**Regolazione neurale.** Questo stato comportamentale è sostenuto dall'interazione tra diverse regioni cerebrali (fig. 2.14.a) e da diverse tipologie di neuromodulatori.

### Glutammato (Glu)

A livello del tronco encefalico, la formazione reticolare (FR) è indispensabile per mantenere le caratteristiche attivanti tipiche della veglia. La FR fa parte del sistema ascendente attivante (ARAS) che mediante diffuse proiezioni dal tronco encefalico arriva fino in corteccia, causando desincronizzazione. Le proiezioni che si dipartano dai neuroni presenti nella parte orale della FR pontina e mesencefalica ascendono verso il prosencefalo e la corteccia, dove sostengono un tono corticale mediante una via dorsale, verso il talamo, e una via ventrale, verso l'ipotalamo e il prosencefalo basale (Lindsley et al., 1950; Starzl et al., 1951). Dall'altra parte, i neuroni presenti nella parte caudale della FR pontina e bulbare facilitano il tono dei muscoli posturali mediante le loro proiezioni verso i motoneuroni presenti nel midollo spinale (Jones, 2005). Uno dei neuromediatrici che è coinvolto nelle proiezioni dai nuclei della FR è probabilmente il glutammato (Glu) (Jones, 1995). L'importanza del glutammato nella veglia è sottolineata anche dal fatto che gran parte degli anestetici (inclusi anche quelli per inalazione e la ketamina) attenuano le neurotrasmissioni mediate dal glutammato (Rudolph and Antkowiak, 2004).

### Noradrenalina (NA)

Il *locus coeruleus* (LC) è un'altra struttura importante per la veglia: i suoi neuroni noradrenergici stimolano l'attivazione corticale e l'*arousal* mediante le loro diffuse proiezioni al prosencefalo, al tronco dell'encefalo e al midollo spinale. I neuroni del LC, infatti, scaricano molto frequentemente durante la veglia (soprattutto durante la veglia attiva), diminuiscono la loro scarica durante il sonno a onde lente e cessano la loro attività durante il sonno REM (Aston-Jones and Bloom, 1981; McCarley and Hobson, 1975). Il ruolo della noradrenalina (NA) è tuttavia ambivalente, in quanto dipende dal tipo di recettore su cui va ad agire; in generale, sui recettori  $\alpha$ -1 adrenergici ha un'azione eccitatoria (depolarizzazione per chiusura dei canali al potassio); sui recettori  $\alpha$ -2 adrenergici, ha un'azione inibitoria (iperpolarizzazione per apertura dei canali al potassio). Attraverso i suoi recettori, la NA eccita selettivamente gli altri sistemi che sono coinvolti nella veglia e inibisce quelle strutture che sostengono il sonno, soprattutto a livello del prosencefalo basale e dell'area preottica (Jones, 2005).

### Dopamina (DA)

A livello più rostrale, nella regione mesencefalica, la *substantia nigra* (SN), l'*area tegmentale ventrale* (VTA) e il *grigio periacqueduttale ventrale* (vPAG) svolgono un ruolo prioritario nei processi attentivi e nel mantenimento dell'*arousal*, mediante connessioni dopaminergiche dirette verso il nucleo striato, il prosencefalo basale e la corteccia (Lu et al., 2006). Questi neuroni dopaminergici mostrano il massimo livello di attività durante la veglia e il sonno REM,

mentre la loro scarica diminuisce durante il sonno a onde lente (Lena et al., 2005; Maloney et al., 2002).

### Serotonina (5-HT)

Lo stato di veglia è mantenuto anche dai neuroni di altre strutture del tronco encefalico: il *nucleo dorsale del raphe* (DR) e il *nucleo mediale del raphe* (MR). I neuroni di queste strutture utilizzano come neurotrasmettitore la serotonina (5-HT) e proiettano verso molte regioni del diencefalo, del sistema limbico e della neocorteccia. Queste strutture raggiungono il loro picco massimo di scarica durante la veglia, diminuiscono la loro attivazione durante il sonno NREM e sono silenti durante il sonno REM.

### Acetilcolina (ACh)

Strutture colinergiche ponto-mesencefaliche, come il *nucleo del tegmento laterodorsale* (LDT) e il *nucleo del tegmento peduncolopontino* (PPT), rivestono un ruolo importante nel mantenimento della veglia, ma anche del sonno REM, facilitando l'*arousal* corticale e la desincronizzazione. Entrambe le strutture, parallelamente ai neuroni della FR, proiettano verso il sistema di proiezione aspecifico talamo-corticale, dove causano una diffusa attivazione corticale (Jones, 1995; McCormick, 1992; Steriade et al., 1990). In minima parte, queste strutture proiettano anche all'ipotalamo posteriore, al prosencefalo basale e alla FR attraverso la via extra-talamica. L'attività di scarica di questi neuroni colinergici del LDT e PPT è alta durante la veglia, diminuisce durante il sonno NREM e aumenta nuovamente durante il sonno REM (el Mansari M. et al., 1989; Steriade et al., 1990). La scarica di questo sistema colinergico occorre in associazione con stati di attivazione corticale (Jones, 2005; Steriade et al., 1990), ma non è legato all'*arousal* comportamentale. Infatti, è stato dimostrato che l'iniezione a livello del tegmento ponto-mesencefalico di agonisti dell'acetilcolina (ACh), come il carbacholo, causa attivazione corticale accompagnata da inibizione del tono muscolare (Jones, 2004b). In accordo con questo, l'ACh può agire in differenti popolazioni di cellule bersaglio per promuovere l'attivazione corticale e inibire il tono muscolare. Nel talamo, ad esempio, l'ACh agisce sui recettori nicotinici (nAChRs) e muscarinici (M<sub>1</sub>ACh e M<sub>2</sub>ACh) per facilitare l'attivazione corticale (Curro et al., 1991; McCormick, 1992); l'ACh attiva, infatti, i nuclei di *relais* talamo-corticali attraverso un'azione eccitatoria diretta sui recettori nAChRs e M<sub>1</sub>ACh e attraverso una facilitazione indiretta: azione inibitoria sui neuroni GABAergici talamo-reticolari mediante i recettori M<sub>2</sub>ACh. In maniera simile, nella FR del tronco dell'encefalo l'ACh può agire su differenti recettori in modo da eccitare alcuni neuroni che sono coinvolti o nell'attivazione corticale o nell'inibizione motoria, e inibire altri neuroni, come quelli reticolo-spinali, che promuovono l'attività dei motoneuroni (Jones, 2004b). In conclusione, lo stesso sistema colinergico sta alla

base di due stati comportamentali, la veglia e il sonno REM, che sono tra loro simili per la desincronizzazione del tracciato, ma differiscono in altri aspetti, come la presenza o meno di atonia muscolare. Come si spiega questo fenomeno? In condizioni normali c'è un certo equilibrio tra il sistema noradrenergico e quello colinergico in modo che l'attivazione di entrambi i sistemi di neuroni mantenga lo stato di veglia, caratterizzato dall'attivazione del sistema motorio e dell'*arousal* corticale. Il sonno REM e la perdita del tono muscolare avvengono nel momento in cui il sistema noradrenergico è inattivo, mentre quello colinergico è attivo. Quest'associazione si rese evidente negli anni '70 in un modello animale mediante la somministrazione d'inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE), utilizzati per rafforzare l'attività dell'Ach. Quando erano somministrati da soli, gli inibitori dell'AChE stimolavano la veglia; viceversa, quando erano somministrati in seguito alla rimozione delle catecolamine (quindi anche della NA), per somministrazione di reserpina, stimolavano il sonno REM (Curro et al., 1991; Jones, 2004b; McCormick, 1992). Negli uomini, gli inibitori dell'acetilcolinesterasi, se somministrati durante la veglia, stimolano l'attivazione corticale e inducono un prolungamento dello stato di veglia; mentre, accelerano l'insorgenza del sonno REM se somministrati durante il sonno NREM, quando il sistema noradrenergico e altri sistemi di *arousal* sono inattivi (Gillin and Sitaram, 1984).

A livello più rostrale, nel prosencefalo basale, si trovano altri comparti neurali che utilizzano come neuromediatore l'acetilcolina, come il *setto mediale* (MS/vDB: *medial septum/vertical limb of the diagonal band*) e altri nuclei, che rivestono un ruolo principale nell'attivazione corticale, ricevendo input da strutture del tronco encefalico e dall'ipotalamo, e proiettando diffusamente verso la corteccia (Jones, 2004a; Lee et al., 2005). Questi neuroni sono molto importanti nella generazione del ritmo theta (4 - 7 Hz) e gamma (30 - 60 Hz) durante la veglia e il sonno REM. A questo livello si trovano anche altri neuroni GABAergici e glutammatergici che aumentano la loro scarica in associazione all'attivazione corticale (Gritti et al., 1997; Manns et al., 2003) e sembrano, soprattutto gli ultimi, essere responsabili dell'aumento dell'*arousal* comportamentale e del tono dei muscoli posturali (Gritti et al., 1994; Henny and Jones, 2006).

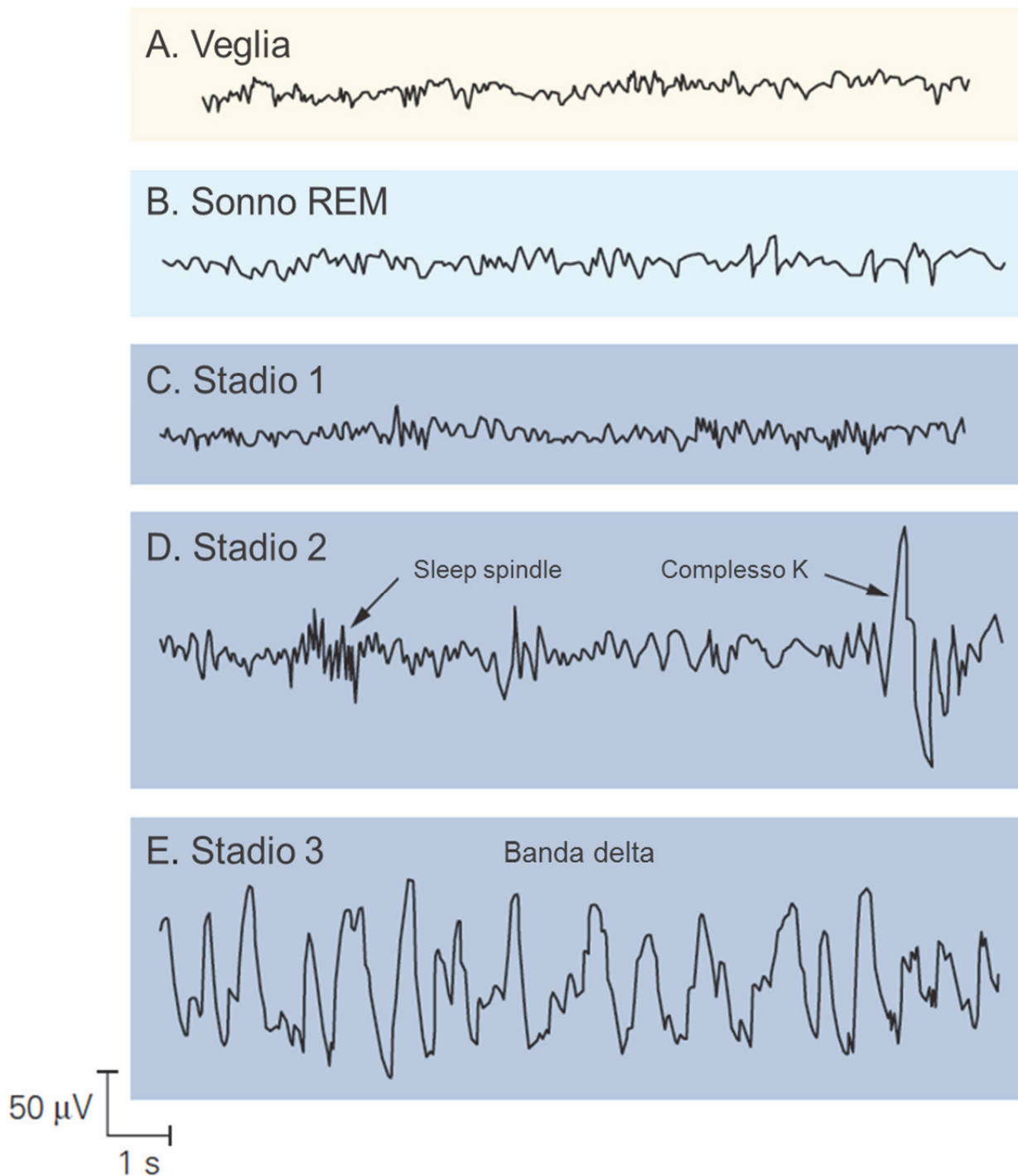
### Istamina (His)

Come già era stato osservato da von Economo (von Economo, 1930), un'altra regione importante per il mantenimento della veglia è l'ipotalamo. La parte posteriore e laterale di questa struttura sembra avere un ruolo specifico nell'attivazione corticale. I neuroni dei *nuclei tuberomammillari* (TMN), facenti parte dell'ipotalamo posteriore, utilizzano come mediatore l'istamina e stimolano, mediante proiezioni diffuse, l'attivazione corticale (Brown et al., 2001b; Saper et al., 2001). I neuroni istaminergici scaricano copiosamente durante la veglia, diminuiscono durante il sonno NREM e cessano la loro attività nel sonno REM. L'istamina ha un

effetto eccitatorio su gran parte dei nuclei dell'ARAS e, contrariamente, inibisce i neuroni "sleep-active" dell'area *preottica ventrolaterale* (VLPO), mediante sinapsi eccitatorie sugli interneuroni inibitori (Liu et al., 2010).

### Oressina/Ipocretina (Orx/Hcrt)

Infine, a livello dell'ipotalamo laterale (*Lateral Hypothalamus*, LH) si trovano neuroni che utilizzano come mediatore un peptide conosciuto con la doppia dicitura: oressina/ipocretina. Questa ha un ruolo fondamentale nel promuovere e stabilizzare lo stato di veglia, mentre sopprime il sonno REM. Una carenza di questo peptide porta alla narcolessia (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999; Mignot et al., 2002; Peyron et al., 2000), cioè un disordine neurologico caratterizzato da sonnolenza diurna accompagnata da cataplessia (repentina perdita del tono muscolare), allucinazioni ipnagogiche (allucinazioni uditive e/o visive durante le fasi di passaggio sonno/veglia o all'inizio del sonno) e paralisi del sonno (inabilità di muoversi o parlare durante i risvegli) (Yoss and Daly, 1957). I neuroni oressinergici hanno connessioni con tutti i nodi che intervengono nel ciclo veglia-sonno e sono attivamente inibiti durante la fase di sonno NREM dai neuroni GABAergici della regione preottica e del prosencefalo basale. Questi nuclei oressinergici mantengono la veglia tramite una diffusa proiezione verso i sistemi aminergici, in particolare verso il LC, dove promuovono la veglia a discapito del sonno REM (Bourgin et al., 2000; Hagan et al., 1999). La distribuzione anatomica delle connessioni dei neuroni oressinergici e il loro coinvolgimento nella narcolessia ha fatto ipotizzare che l'oressina oltre ad essere importante per il mantenimento della veglia, sia fondamentale per la stabilizzazione dello *switch* veglia-sonno (Saper et al., 2001).



**FIGURA 2.13.** Variazioni EEG durante le diverse fasi del ciclo veglia-sonno. **A.** Veglia rilassata. **B.** Sonno REM, con frequenze miste a basso voltaggio (ritmo theta). **C.** Stadio 1 del sonno NREM (N1), con comparsa del ritmo theta. **D.** Stadio 2 del sonno NREM (N2), con prevalenza del ritmo theta e comparsa dei grafo-elementi (*sleep spindles* e complessi K). **E.** Stadio 3 del sonno NREM (N3), con prevalenza del ritmo delta [adattato da: McCormick e Westbrook, 2001].

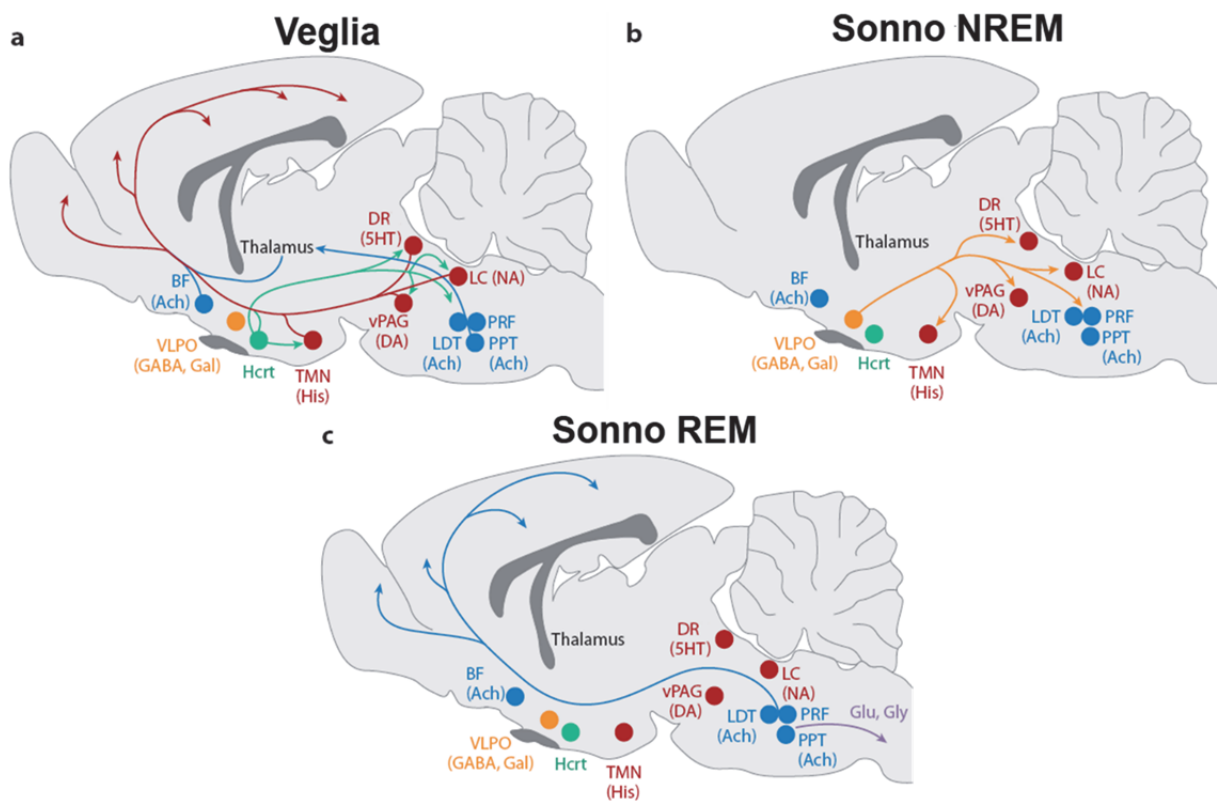
### 2.1.4.3.2 - IL SONNO NREM

In condizioni normali, alla veglia si sostituisce lo stato di sonno. Il sonno come già individuato da Aserinsky e Kleitman non è un processo unitario, ma, al suo interno presenta un ciclo ultradiano in cui si alternano due fasi: il sonno NREM e il sonno REM.

**Caratteristiche.** Il sonno NREM (il cui nome è l'acronimo di *Non Rapid Eye Movement*) è uno stato comportamentale caratterizzato da una caduta del tono muscolare, soprattutto della muscolatura antigravitaria, da un'assenza di movimenti oculari rapidi e da un pattern EEG sincronizzato. Durante questa fase si possono registrare sia onde theta (frequenza: 4 - 7 Hz; ampiezza: 50 – 75  $\mu$ V, fig. 2.12.b), soprattutto nelle fasi iniziali; sia onde a banda delta (frequenza: 0,5 - 4 Hz; ampiezza:  $\geq$  75  $\mu$ V, fig. 2.12.a) che sono indice di un sonno più profondo, chiamato sonno a onde lente (*Slow Wave Sleep*, SWS). Secondo la nuova classificazione dell'AASM (*American Academy of Sleep Medicine*), nell'uomo il sonno NREM è suddiviso in tre diversi stadi: N1, N2 e N3 (Iber et al., 2007). Ogni stadio si differenzia per un grado di profondità maggiore e una diversa attività cerebrale. Il primo stadio di sonno NREM (N1, fig. 2.13.C) è caratterizzato da un ritmo alfa, con la comparsa delle prime onde theta. Il secondo stadio (N2, fig. 2.13.D) è contraddistinto dalla presenza di elementi elettroencefalografici caratteristici come i complessi K e i fusi del sonno (*sleep spindles*) (De Gennaro and Casagrande, 1998; Rechtschaffen and Kales, 1968). I primi sono definiti come onde bi-trifasiche ad alto voltaggio (superiore a 75  $\mu$ V) che presentano una componente negativa immediatamente seguita da una positiva e hanno una durata di almeno 0,5 secondi. I complessi K hanno un'origine endogena ma possono essere anche elicitati da stimoli acustici improvvisi e registrabili in tutta la corteccia (Cash et al., 2009). I fusi del sonno sono treni d'onda caratterizzati da un progressivo aumento e un'altrettanta graduale diminuzione dell'ampiezza, con una frequenza di circa 12 - 14 Hz (De Gennaro and Ferrara, 2003). Questi sono generati a livello del circuito talamico e sono dovuti alle proprietà intrinseche delle membrane neuronali sia dei neuroni reticolari talamici sia dei neuroni talamici *relais*, e dalle reciproche interazioni tra questi due gruppi di neuroni (McCormick and Bal, 1997). Nelle fasi più profonde del sonno NREM (N3, fig. 2.13.E), invece, sono predominanti le oscillazioni a banda delta (sonno a onde lente, SWS), che riflettono le pause sincronizzate del pattern di scarica dei neuroni talamo-corticali e cortico-talamici iperpolarizzati (McCormick and Bal, 1997; Steriade et al., 1993; Steriade, 1999). Attraverso l'analisi di Fourier, si può ottenere una misura che quantifica l'attività delta (chiamata anche *Slow Wave Activity*, SWA) durante le fasi di sonno NREM. Questa misura (a volte definita anche *NREM delta power*) correla negativamente con la risposta a stimoli attivanti (Neckelmann and Ursin, 1993) e con la frammentazione del sonno a onde lente

(Franken et al., 1991), per questo motivo è spesso considerata come indice d'intensità del sonno NREM stesso.

**Regolazione neurale.** Il sonno NREM è regolato a livello cerebrale da fini meccanismi neurali (fig. 2.14.b). Già von Economo, studiando pazienti con encefalite accompagnata da insonnia, aveva ipotizzato la presenza di un "centro del sonno" a livello ipotalamico, in particolare nell'area preottica/prosencefalo basale (von Economo, 1930). Successivi studi sperimentali su animali da laboratorio confermarono l'importanza dell'area preottica (*Preoptic Area*, POA) nella generazione del sonno NREM. Lesioni a questo livello provocano, infatti, la scomparsa di sonno NREM; mentre, la stimolazione elettrica o termica ne aumenta la percentuale (McGinty and Szymusiak, 2001). Nell'area preottica sono presenti due nuclei essenziali per la produzione del sonno NREM: il nucleo preottico ventrolaterale (*ventrolateral*



**FIGURA 2.14.** Panoramica delle strutture neurali e dei neurotrasmettitori coinvolti nel ciclo veglia-sonno in una sezione sagittale del cervello di un roditore. **a.** La veglia è mantenuta da input colinergici (ACh: acetilcolina, in *blu*) provenienti dal tronco dell'encefalo (PRF: formazione reticolare pontina; LDT: nucleo tegmentale laterodorsale e PPT: nucleo del tegmento peduncolo pontino) al talamo, che a sua volta attiva la corteccia, e dai nuclei del prosencefalo basale (BF). In più la veglia è sostenuta dal sistema monoaminergico [in *rosso*; ad es., da quello serotoninergico (5-HT): nucleo dorsale del raphe (DR); noradrenergico (NA): locus coeruleus (LC); dopaminergico (DA): grigio periacquedottale (vPAG); istaminergico (His): nuclei tuberо mammillari (TMN) e oressinergico/ipocretinergico (Hcrt, in *verde*): ipotalamo laterale]. **b.** Il sonno NREM è iniziato e mantenuto dagli input inibitori (GABA e galanina, in *arancione*) derivanti dal nucleo preottico ventrolaterale (VLPO) verso tutti i siti *wake-active*. **c.** L'attivazione corticale durante il sonno REM è sotto il controllo dei sistemi colinergici e non colinergici del tronco dell'encefalo; mentre l'atonie tipica di questo stadio è data dalle connessioni glutammatergiche e glicinerliche (Glu, Gly, in *viola*) verso i neuroni della spina dorsale [adattato da: *Andreatic et al., 2008*].

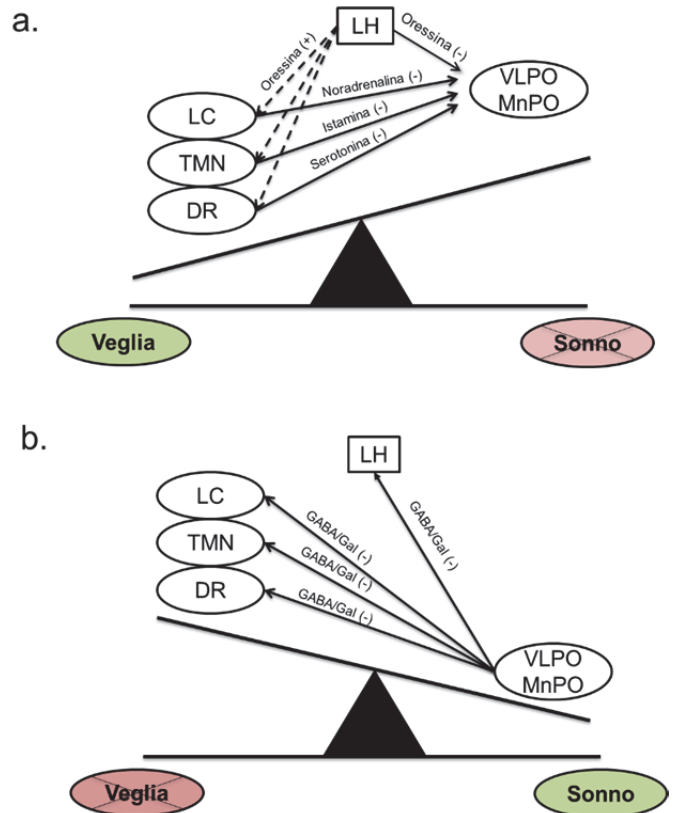


*preoptic nucleus*, VLPO) e l'area preottica mediana (*median preoptic area*, MnPO). I neuroni di queste due aree utilizzano neuromediatrici inibitori come il GABA e la galanina (Gal) e le loro connessioni sono dirette verso i nuclei dell'ARAS, che sottostanno allo stato di veglia. In particolare, l'area VLPO è anatomicamente connessa con i neuroni istaminergici dei nuclei TMN (Sherin et al., 1998) ma anche con i neuroni del DRN e LC, così come la MnPO (Steininger et al., 2001; Uschakov et al., 2007). Entrambe le aree preottiche, inoltre, proiettano diffusamente verso i neuroni oressinergici (ipocretinergici) dell'ipotalamo laterale (Uschakov et al., 2006). Studi sperimentali hanno dimostrato che i neuroni di VLPO e MnPO sono molto attivi durante il sonno, mentre la loro attività si annulla durante la fase di veglia. La maggior parte dei neuroni appartenenti al VLPO mostra un aumento della loro attività nel periodo di transizione tra la veglia e l'inizio del sonno NREM, e un progressivo aumento di scarica nel passaggio verso gli stadi più profondi del sonno NREM stesso; viceversa, i neuroni di MnPO hanno un'attivazione molto più graduale che inizia dopo l'insorgenza del sonno NREM e continua anche durante il sonno REM. L'attivazione di questi neuroni durante i periodi di deprivazione di sonno ne sottolinea l'importanza nella regolazione omeostatica dell'attività ipnica (Suntsova et al., 2002).

#### **2.1.4.3.3 - IL CIRCUITO “FLIP-FLOP”: DALLA VEGLIA AL SONNO NREM**

Le aree promotrici del sonno NREM (*sleep active*) sono inibite dai neuroni monoaminergici (adrenergici, serotoninergici, dopaminergici) e colinergici dei nuclei appartenenti alle aree promotrici della veglia (*wake active*). In altre parole, durante la veglia, i neuroni *wake-active* inibiscono il VLPO; viceversa, durante il sonno si ha un'inibizione del sistema che promuove la veglia da parte dei neuroni di VLPO e MnPO. Si crea così quello che in linguaggio elettronico è definito un circuito “flip-flop”, in cui le due metà del sistema, inibendosi a vicenda, creano un circuito a feedback bistabile, dove gli stati possibili sono due: o veglia o sonno, evitando così stadi intermedi. Secondo questo modello, le regioni monoaminergiche (TMN, LC e DR) promuovono la veglia sia per mezzo di connessioni dirette con la corteccia, sia inibendo i neuroni del VLPO e MnPO (fig. 2.15.a). Durante il sonno, i neuroni del VLPO inibiscono il sistema monoaminergico attivante, attraverso proiezioni GABAergiche e galaninergiche. Questa inibizione produce una disinibizione del VLPO (inibito dal sistema monoaminergico) e ciò garantisce una stabile produzione di sonno (fig. 2.15.b).

A questo livello è molto importante il ruolo dell'oressina/ipocretina che, influenzando entrambi le parti di questo sistema mediante proiezioni dirette sia al sistema *wake-active* sia al sistema *sleep-active*, aumenta la scarica dei neuroni del *locus coeruleus* (Hagan et al., 1999), del nucleo del *raphe* dorsale (Brown et al., 2001a) e dei nuclei tuberomammillari; mentre, inibisce, probabilmente con un meccanismo presinaptico, l'area del VLPO e MnPO (Methippara et al., 2000) (fig.13.a e 13.b). L'oressina/ipocretina si comporta, quindi, come una sorta di "dito" che preme il pulsante verso lo stato di veglia, prevenendo inappropriati stati intermedi (una deficienza di oressina porta a narcolessia). In altre parole, l'oressina/ipocretina incrementa il tono monoaminergico, mantenendo l'inibizione del VLPO; in questo modo previene l'addormentamento, stabilizzando questo complicato sistema (Hobson et al., 1975; Saper et al., 2001).



**FIGURA 2.15.** Rappresentazione grafica del circuito "flip-flop".  
**a.** Durante la veglia il sistema monoaminergico (LC, DR, TMN) è attivo e inibisce il sistema attivante il sonno (VLPO e MnPO). Le connessioni oressinergiche dell'ipotalamo laterale (LH) verso il sistema monoaminergico rafforzano la sua efficacia inibitoria.  
**b.** Durante il sonno NREM l'attivazione delle aree del VLPO e MnPO inibiscono attivamente il sistema monoaminergico e l'LH. LC= locus coeruleus; TMN= nuclei tuberomammillari; DR= nucleo del rafe dorsale; VLPO= nucleo preottico ventrolaterale; MnPO= area preottica mediana; LH= ipotalamo laterale [adattato da: Brown et al., 2012].

E allora cos'è che ci fa dormire? Cos'è che sposta quest'interruttore? Questa è la limitazione del "modello di Saper" appena illustrato. Forse la risposta è da ricercare nell'azione di alcuni agenti neurochimici che, accumulandosi durante la veglia, vanno ad agire poi sulle aree deputate al controllo del ciclo veglia-sonno, innescando quindi il sonno, com'è il caso dell'adenosina, delle prostaglandine o delle citochine (Brown et al., 2012). Inoltre, l'area preottica riceve afferenze dirette sia dalla retina sia dal nucleo soprachiasmatico (SCN) e di conseguenza la loro attività è regolata anche dalle condizioni esterne (Deurveilher and Semba, 2003), in primis dall'esposizione luminosa.

## Adenosina

Il ruolo dell'adenosina sul sonno è stato per molto tempo studiato. L'adenosina è una piccola molecola purinica che modula l'attività neuronale locale attraverso specifici recettori e costituisce l'elemento centrale dell'adenosintrifosfato (ATP). Molte evidenze suggeriscono che l'adenosina sia importante per favorire il sonno: la somministrazione centrale o sistemica di adenosina, o di agonisti dei recettori  $A_1$  dell'adenosina, induce sonnolenza e riduce lo stato di veglia, attraverso l'inibizione del sistema neuronale *wake-active* (Benington and Heller, 1995; Christie et al., 2008; Portas et al., 1997; Radek et al., 2004; Radulovacki et al., 1984). Anche i recettori  $A_{2A}$  sono implicati negli effetti ipnogeni dati dall'adenosina, a causa della loro attività eccitatoria sui neuroni del sistema *sleep-active* (Hayaishi et al., 2004; Huang et al., 2007; Satoh et al., 1998). Alcune sostanze stimolanti, come la caffeina, interferiscono con l'effetto ipnoinducente dell'adenosina, agendo come antagonisti sia dei recettori  $A_1$  sia  $A_{2A}$  dell'adenosina (Fredholm et al., 1999; Snyder et al., 1981).

I livelli di adenosina correlano, inoltre, con il tempo speso in veglia. Le quantità di adenosina endogena extracellulare a livello del prosencefalo basale e della corteccia (Blanco-Centurion et al., 2006; Kalinchuk et al., 2011; Porkka-Heiskanen et al., 1997; Porkka-Heiskanen et al., 2000) aumentano in proporzione al tempo trascorso in veglia. L'adenosina, quindi, induce il sonno e i suoi livelli extracellulari possono essere un indicatore della necessità di sonno, soddisfacendo l'ipotesi che questa molecola intervenga nella regolazione omeostatica del sonno. Le misurazioni dei livelli extracellulari di adenosina durante tutto il ciclo veglia-sonno e in risposta a deprivazione di sonno hanno sottolineato che questa molecola si accumula solamente in specifiche aree cerebrali (Porkka-Heiskanen et al., 2000; Strecker et al., 2000): nel prosencefalo basale, che possiede le proiezioni corticali ai neuroni *sleep-active*, e nella corteccia stessa. I livelli di adenosina nel prosencefalo basale subiscono un incremento anche in ratti esposti a un particolare protocollo sperimentale di frammentazione del sonno (McKenna et al., 2007). Che cosa provoca l'accumulo di adenosina extracellulare? In seguito ad una veglia prolungata l'interazione tra meccanismi neurali e gliali causa l'accumulo di questa molecola. La stimolazione glutammatergica e la conseguente attivazione dei recettori NMDA di alcune zone cerebrali (prosencefalo basale, neuroni colinergici del tronco encefalico e neuroni piramidali dell'ippocampo) induce un aumento del rilascio di adenosina e inibizione dell'attività neuronale (Brambilla et al., 2005; Manzoni et al., 1994; Wigren et al., 2007). Inoltre, alcune evidenze supportano anche un'origine astrocitaria dell'adenosina attraverso la cosiddetta "gliotrasmissione". Il rilascio di neurotrasmettitore, specialmente del glutammato, innesca un aumento dei livelli di calcio nell'astrocita, che porta a una gliotrasmissione di ATP combinata a quella di neurotrasmettitori, come glutammato e D-serina (Fellin et al., 2009; Parpura et al., 1994). A sua volta, la degradazione dell'ATP, rilasciato dagli astrociti, porta alla produzione di

adenosina, che deprime l'attività neuronale (Pascual et al., 2005; Zhang et al., 2003). L'interruzione della gliotrasmissione, mediante il blocco del rilascio vescicolare, a livello degli astrociti si ripercuote nel sonno riducendo l'accumulo dell'adenosina extracellulare (Fellin et al., 2009; Halassa et al., 2009).

#### **2.1.4.3.4 - IL SONNO REM**

A circa 70 minuti dall'addormentamento il pattern elettroencefalografico cambia radicalmente passando da un ritmo sincronizzato (onde di grande ampiezza e bassa frequenza) a un ritmo desincronizzato (onde di bassa ampiezza e alta frequenza). Questa fase prende il nome di sonno REM, così chiamato per la presenza di movimenti oculari rapidi (*Rapid Eye Movement*). Data la sua somiglianza con lo stato di veglia (EEG desincronizzato), questa fase viene anche definita sonno paradossale (*paradoxical sleep*, PS).

**Caratteristiche.** Il sonno REM è caratterizzato da una costellazione di fenomeni tonici e fasici che coinvolgono tutto l'organismo, tra cui:

- *Atonia muscolare.* L'atonia è la perdita del tono muscolare a carico dei muscoli scheletrici (soprattutto quelli antigravitari), accompagnata anche dalla presenza di piccole clonie muscolari (*twiches*).
- *EEG desincronizzato.* Nell'uomo, il sonno REM (fig. 2.13.b) è caratterizzato da un ritmo a bassa ampiezza e a frequenze miste, prevalentemente a banda theta (ampiezza: 50 - 75  $\mu$ V; frequenza: 4 - 7 Hz, fig. 2.12.a). Il ritmo theta è registrabile soprattutto a livello delle strutture del lobo temporale, in particolare dall'ippocampo (vedi più avanti), per questo è facilmente osservabile nell'EEG di animali da esperimento (roditori); nell'uomo, dove il lobo temporale è collocato ventralmente, il ritmo theta è registrabile nella corteccia frontale e nella linea mediana. Elemento EEG caratteristico del sonno REM, rilevato sia nell'uomo sia nell'animale, sono le onde a dente di sega (*sawtooth waves*), cioè delle salve di onde a forma triangolare, con frequenza di 2 - 6 Hz e ampiezza di 20 - 100  $\mu$ V. Una delle caratteristiche EEG del sonno REM è la presenza di onde PGO (ponto-genicolo-occipitali), ossia potenziali di campo elettrico sincronizzati, registrati a livello del ponte, del nucleo genicolato o della corteccia occipitale. Queste onde si manifestano sotto forma di potenziali isolati di grande ampiezza, pochi secondi (30 - 90 s) prima dell'effettivo inizio dell'episodio di sonno REM (Brooks and Bizzi, 1963; Jouvet et al., 1959) o come raffiche di onde di bassa ampiezza durante il sonno REM stesso (Bizzi and Brooks, 1963; Datta, 1997; Mouret and Guilleminet, 1963). Le onde PGO

sono considerate essere la base neurofisiologica dei sogni e delle immagini mentali durante il sonno REM, poiché occorrono simultaneamente ai movimenti degli occhi associati alla direzione dello sguardo durante gli episodi onirici (Dement and Kleitman, 1957; McCarley et al., 1983) e sono prominenti nei circuiti talamocorticali visivi.

- *Attività onirica.* Il sogno è una delle caratteristiche più affascinanti della fase REM e da sempre considerata relegata a questa fase. Questo perché svegliando un soggetto durante la fase di REM, è molto probabile che egli riporti di aver sognato. Si ritiene, tuttavia, che anche in fase NREM vi siano sogni, ciò che cambia è la qualità, infatti, il sonno REM è caratterizzato da un'attività immagine-simile (più vivida e con coinvolgimento emotivo); il sonno NREM, invece, da un'attività pensiero-simile (Dement and Kleitman, 1957; Hobson, 2009).
- *Movimenti oculari.* I movimenti oculari rapidi durante le fasi di sonno REM sono caratterizzati sia da componenti toniche sia fasiche. La componente tonica consiste in un forte movimento convergente di entrambi gli occhi e diretto verso il basso, dovuto al rilassamento dei muscoli retti e alla contrazione tonica dei muscoli mediali oculari (Escudero and Marquez-Ruiz, 2008). La componente fasica, invece, consiste in movimenti rapidi degli occhi sia isolati che raggruppati in salve (*bursts of REM's*); questo tipo di movimento è dovuto al treno di potenziali di azione a livello dei motoneuroni adducenti (Strassman et al., 1986a; Strassman et al., 1986b).
- *Modificazioni vegetative.* Dal punto di vista vegetativo, il sonno REM è caratterizzato da una sospensione dei meccanismi di controllo omeostatico, si parla, infatti, di "burrasca vegetativa". L'attività respiratoria durante il sonno REM diviene del tutto irregolare (Aserinsky and Kleitman, 2003; Duron, 1972), con incrementi soprattutto in corrispondenza dei *twitches* mioclonici (Bolton and Herman, 1974; Netick et al., 1977). Tutto ciò non dipende però da una rilevante riduzione o variazione a livello chemocettivo o barocettivo, ma da una profonda alterazione del controllo automatico della respirazione (Dawes et al., 1972; Foutz et al., 1979; Guazzi and Freis, 1969; Netick and Foutz, 1980). A livello cardiocircolatorio, in molte tra le specie studiate (Coccagna et al., 1971; Dufour and Court, 1977; Lacombe et al., 1988; Meunier et al., 1988), si assiste a un aumento della pressione arteriosa, che spesso non si associa a modificazioni significative di altre variabili correlate, come ad esempio la frequenza cardiaca o le resistenze vascolari (Coccagna et al., 1971; Khatri and Freis, 1967). Il battito cardiaco è molto variabile durante ogni episodio di sonno REM, a causa dell'alternarsi di periodi di tachicardia a periodi di bradicardia (Mancia, 1993). Si possono inoltre osservare pause del ritmo cardiaco e reali asistolie (Dickerson et al., 1993). Anche la risposta termoregolatoria, durante il sonno REM, risulta essere del tutto assente, vengono, infatti,

sospesi i meccanismi omeostatici di regolazione della temperatura corporea, come la sudorazione, e ciò risulta in una modificazione della temperatura corporea che segue la sua inerzia termica, così come ci si aspetterebbe da animali poichilotermini (Dickerson et al., 1993; Parmeggiani et al., 1971). Per quanto riguarda la temperatura cerebrale si assiste a un suo aumento rispetto al sonno NREM, coerentemente al grado di attività cerebrale. Le ingenti modificazioni vegetative che si presentano durante questa fase di sonno dimostrano come sia sbagliato considerare la fase REM sotto il solo diretto controllo del sistema simpatico, ma come esso sia, invece, contraddistinto da repentine modificazioni della bilancia simpato-vagale.

**Regolazione neurale.** Data la varietà dei fenomeni che si succedono durante la fase REM, la sua regolazione a livello neurale (fig. 2.14.c) è altrettanto complessa e ancora non del tutto delineata. I primi studi di sezione cerebrale, condotti da Jouvet, sottolinearono l'importanza del tronco encefalico nella generazione del REM e delle sue caratteristiche (Jouvet, 1962). Successivi studi, utilizzando altre tecniche d'indagine (lesioni elettrolitiche, somministrazione di neurotossine ecc.), hanno evidenziato che la regione più importante per la genesi del sonno REM è la parte dorsolaterale del ponte (Jones, 1991), in particolare la formazione reticolare pontina (PRF). Registrosi intracellulari hanno rilevato che l'eccitabilità dei neuroni glutammatergici appartenenti alla PRF è più alta in sonno REM rispetto al sonno NREM e alla veglia. Questi neuroni, infatti, iniziano a depolarizzarsi e ad aumentare i loro potenziali di azione all'occorrenza dei primi segni EEG di sonno REM. In seguito, la loro scarica aumenta ed è mantenuta durante tutta la fase di sonno REM (Ito et al., 2002). Tra questi neuroni glutammatergici, definiti anche effettori del sonno REM, si annoverano quelli del nucleo sublaterodorsale (SLD, *sub-lateral dorsal*), soprattutto la parte ventrale (vSLD), quelli dell'area parabrachiale (PB) e del *pericoeruleus* (PC) (Sakai et al., 1979; Sakai, 1986). I neuroni di queste strutture ricevono proiezioni anche da zone mesencefaliche importanti per l'attivazione corticale e il pattern EEG tipico.

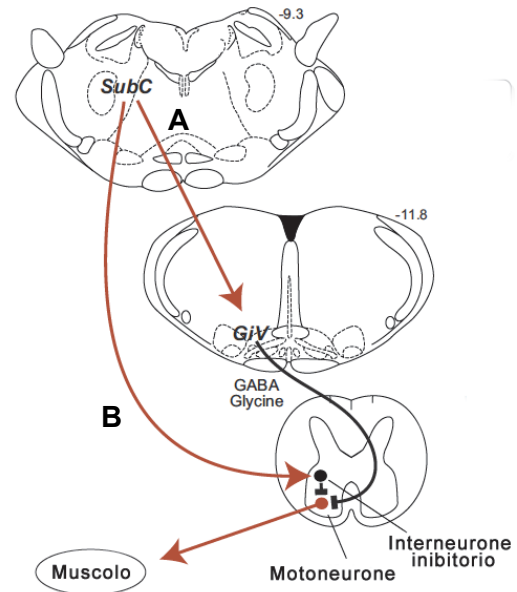
Come dimostrato da Mitani e collaboratori (Mitani et al., 1988) la PRF riceve proiezioni colinergiche da due nuclei che si trovano a livello della formazione reticolare mesencefalica: il nucleo tegmentale laterodorsale (LDT) e il nucleo tegmentale peduncolo-pontino (PPT), che, oltre ad essere due regioni importanti per la veglia, svolgono un ruolo nella generazione del sonno REM. Infatti, a seguito di un'estesa lesione dei neuroni di queste due strutture si assiste a una riduzione del sonno REM (Webster and Jones, 1988); mentre una bassa stimolazione elettrica produce un aumento dello stesso (Thakkar et al., 1996). Le due regioni, LDT e PPT, proprio per il loro pattern di scarica e per il mantenimento della depolarizzazione a livello della

formazione reticolare pontina, mediante diffuse proiezioni colinergiche attivanti a essa, sono denominate REM-on (McCarley, 2007), cioè attivanti il sonno REM.

La depolarizzazione dei neuroni glutammatergici della PRF, per opera dei centri REM-on (LDT e PPT), e l'interazione tra questi centri neuronali genera tutto il complesso caratteristico del sonno REM (fig. 2.17):

- a) *Movimenti oculari rapidi*. A livello della PRF e della MRF (formazione reticolare mesencefalica) sono presenti i nuclei regolatori delle saccadi, i quali mediante la loro interazione con il collicolo superiore alimentano e regolano i movimenti oculari rapidi, tipici del sonno REM (Brown et al., 2012; Strassman et al., 1986a; Strassman et al., 1986b).
- b) *Theta ippocampale*. L'attività tonica dei neuroni glutammatergici della PRF, in particolare il *nucleus reticularis pontis oralis* (PnO), ha un effetto eccitatorio a livello del nucleo supramammillare (*supramammillar nucleus*, SUM), il quale converte quest'attività tonica in attività fasica. L'output glutammatergico del SUM agisce a livello dei neuroni glutammatergici e GABAergici del prosencefalo basale (MS/vDB), che agiscono come *pace-maker* per il ritmo theta a livello ippocampale (Vertes and Kocsis, 1997).
- c) *EEG desincronizzato*. I nuclei della PRF e i neuroni colinergici proiettano diffusamente anche verso il talamo e il proencefalo basale, garantendo così un tono corticale attivo simile a quello della veglia (Brown et al., 2012).
- d) *Onde PGO*. Lo studio delle componenti delle onde PGO ha sottolineato che l'input iniziale per la loro genesi è dovuto alle proprietà intrinseche della membrana (bassa soglia per il calcio) dei neuroni non-colinergici, che si trovano nell'area del nucleo sublaterodorsale/area parabrachiale (SLD/PB) (Datta and Hobson, 1995). Questi neuroni proiettando verso i nuclei colinergici (LDT/PPT) li depolarizzano; da qui la scarica di questi ultimi porta alla depolarizzazione, mediante recettori nicotinici, dei neuroni del nucleo genicolato laterale (LGN) del talamo, arrivando fino in corteccia occipitale (Datta, 1997; Datta and Hobson, 1995).
- e) *Atonia*. L'atonìa della muscolatura scheletrica è uno dei principali segni del sonno REM. Registrazioni intracellulari hanno evidenziato che questo fenomeno sia dovuto alla diminuita sensibilità dei motoneuroni spinali in seguito ad iperpolarizzazione, data dalla successione di potenziali post sinaptici inibitori (IPSP) mediati dalla glicina (Chase and Morales, 1990). Il circuito che sta alla base dell'atonìa del REM è dovuto principalmente all'azione del nucleo pontino sub-latero dorsale (SLD), denominato anche nucleo subcoeruleus (SubC) o peri-locus coeruleus alpha (per-LCA), in quanto l'aumento dell'attività dei suoi neuroni causa atonia muscolare (Boissard et al., 2002; Jouvet, 1962; Lu et al., 2006; Morrison, 1988; Vertes, 1984). L'SLD agisce sui motoneuroni spinali, inibendoli, mediante due vie: i) nella *via indiretta* (fig.14.A), le proiezioni glutammatergiche

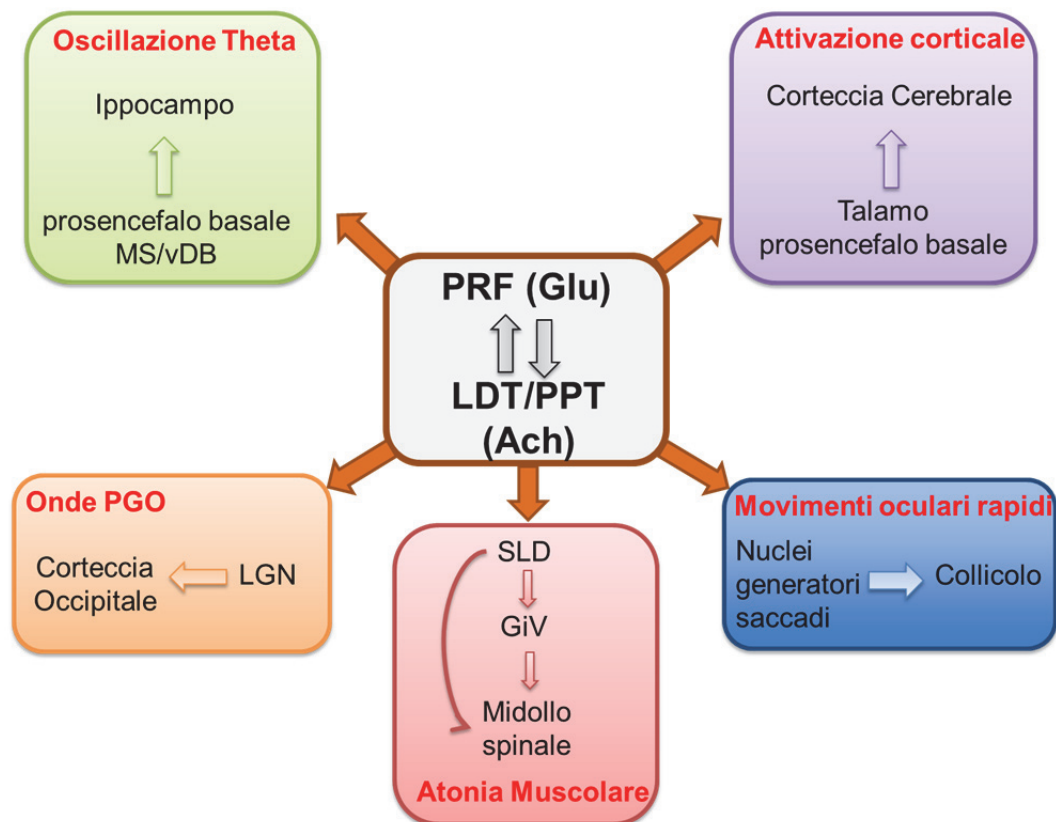
discendenti del SLD provocano un'attivazione dei neuroni glicinerfici della formazione reticolare bulbare, tra cui il nucleo bulbare ventrale gigantocellulare (GiV), noto anche come nucleo della formazione reticolare bulbare magnocellulare (MCRF). Gli output GABAergici/glicinerfici di questo nucleo inibiscono i motoneuroni alfa del midollo spinale, causando atonia (Boissard et al., 2002; Chase and Morales, 1990; Holstege and Bongers, 1991; Lai et al., 1999; Lai and Siegel, 1988; Magoun and Rhines, 1946; Rampon et al., 1996; Yamuy et al., 1994); ii) nella via *diretta* (fig.14.B), dal SLD si dipartono altre proiezioni discendenti di tipo eccitatorio (Glutammaterfici) che fanno sinapsi direttamente sugli interneuroni inibitori (GABAergici) del corno ventrale del midollo spinale, i quali a loro volta inibiscono i motoneuroni (Boeve et al., 2007; Brown et al., 2012; Lu et al., 2006). L'inibizione attiva dei motoneuroni è sempre stata riconosciuta come meccanismo causale dell'atonia, tuttavia, recentemente, è stata proposta un'altra spiegazione alla base dell'assenza del tono muscolare durante il REM: la disfacilitazione (Burgess et al., 2008). In altri termini, durante la veglia i motoneuroni ricevono input eccitatori (glutammaterfici, noradrenergici e serotoninergici) che hanno un'azione depolarizzante su di essi (White et al., 1991; White et al., 1996; White and Fung, 1989). La depolarizzazione accresce la risposta dei motoneuroni ad altri input eccitatori, facilitando così il mantenimento del tono muscolare. Durante la fase di sonno REM, i neuroni glutammaterfici, noradrenergici e serotoninergici sono silenti, i motoneuroni non ricevono più i loro input e la loro influenza eccitatoria (disfacilitazione) per le risposte ad altri input eccitatori è minore. Sebbene l'inibizione glicinerfica possa essere uno dei meccanismi principali della caduta del tono muscolare durante il sonno NREM e dell'atonia nel REM, è la combinazione dei meccanismi d'inibizione attiva e di disfacilitazione che meglio spiega il fenomeno (Brown et al., 2012).



**FIGURA 2.16.** Meccanismo alla base dell'atonia muscolare: **A.** *via indiretta*: le connessioni glutammatergiche del nucleo sub-coeruleo (SubC) fanno sinapsi sui neuroni inibitori del GiV (nucleo bulbare ventrale gigantocellulare); da qui si dipartono connessioni GABA/glicinergiche che inibiscono direttamente i motoneuroni  $\alpha$  del midollo spinale. **B.** *via diretta*: le connessioni glutammatergiche del SubC discendono direttamente sugli interneuroni inibitori del corno ventrale del midollo spinale, che vanno a inibire i motoneuroni. Le frecce rosse indicano connessioni eccitatorie, quelle nere, inibitorie [adattato da: Brown et al., 2012].



Accanto ai neuroni definiti REM-on (LDT e PPT) sono presenti centri REM-off che hanno un pattern di scarica inverso, ossia cessano la loro attività durante le fasi di sonno REM. Questi centri inibitori del sonno REM sono presenti a livello del ponte, tra cui: i) i neuroni serotonergici del nucleo del raphe, più in dettaglio quelli presenti a livello del nucleo dorsale del raphe (DR) (Hobson et al., 1983; Lydic et al., 1987a; Lydic et al., 1987b; Trulson and Jacobs, 1979), ma anche in altri nuclei, come il nucleo *linearis centralis* (Hobson et al., 1983), *centralis superior* (Rasmussen et al., 1984), *raphe magnus* (Cespuglio et al., 1981; Fornal et al., 1985) e *raphe pallidus* (Sakai et al., 1983); ii) i neuroni noradrenergici del LC (Aston-Jones and Bloom, 1981; Hobson et al., 1975); iii) recenti studi (Lu et al., 2006) hanno sottolineato che anche i neuroni dopaminergici del grigio periacqueduttale ventrale (vPAG) possano essere considerati come centri inibitori del REM, anche se il loro ruolo è ancora da definire.



**FIGURA 2.17.** Rappresentazione schematica delle caratteristiche del sonno REM e delle loro basi neurali. Per una completa trattazione riferirsi al testo. PRF= formazione reticolare pontina; LDT= nucleo del tegmento laterodorsale; PPT= nucleo del tegmento peduncolo pontino; SLD = nucleo sub-laterodorsale; GiV= nucleo bulbare ventrale gigantocellulare; LGN= nucleo genicolato laterale; MS/vDB= setto mediale (*medial septum/vertical limb of the diagonal band*); Glu= glutammato; Ach= acetilcolina [adattato da: Brown et al., 2012].

#### **2.1.4.3.5 - IL MODELLO AD INTERAZIONE RECIPROCA: DAL SONNO NREM AL SONNO REM.**

La presenza di due sistemi neuronali ben delineati, da una parte il sistema colinergico (LDT/PPT) attivante il sonno REM (REM-on) e dall'altra il sistema monoaminergico (DR/LC) inibente il sonno REM (REM-off) ha permesso l'implementazione di un primo modello per la regolazione del ciclo ultradiano NREM-REM. McCarley e Hobson, per primi, hanno proposto un modello, chiamato modello a interazione reciproca, basato sulle connessioni biunivoche tra questi due sistemi neuronali. Il modello postula che i neuroni REM-on abbiano connessioni eccitatorie verso se stessi (feedback positivo) e verso il sistema neuronale REM-off. Questo fa sì che la loro attività, oltre ad "auto-accrecersi", gradualmente incrementa l'attività dei neuroni inibitori del sonno REM. Viceversa il sistema monoaminergico (REM-off) possiede connessioni inibitorie verso se stesso (feedback negativo) e verso il sistema REM-on. In poche parole, a causa delle connessioni che si vengono a stabilire tra i centri REM-on (LDT e PPT) e quelli REM-off (DR e LC), durante la veglia i neuroni REM-on sono fortemente inibiti dal rilascio di noradrenalina e serotonina da parte del LC e DR. Durante la fase NREM, il rilascio di GABA, da parte del VLPO e di altre strutture, va a inibire progressivamente i centri della veglia, tra cui quelli REM-off, per cui la loro scarica si esaurisce lentamente. La diminuzione di scarica dei neuroni REM-off porta a una lenta disinibizione dei nuclei REM-on, che iniziando a scaricare danno inizio al sonno REM. Tuttavia i centri REM-on essendo collegati in maniera eccitatoria con i centri REM-off, attivandosi, vanno nuovamente a eccitare i centri REM-off, i quali inibiscono i neuroni REM-on, portando all'interruzione dell'episodio di sonno REM (Aloe et al., 2005; Hobson et al., 1975; Lu et al., 2006; McCarley and Hobson, 1975; Pace-Schott and Hobson, 2002).

Recentemente questo modello a interazione reciproca ha avuto un'integrazione grazie all'aumentato interesse per il ruolo del GABA nella regolazione del sonno REM. A livello del ponte sono presenti molti gruppi cellulari che, utilizzando il GABA come mediatore, proiettano verso quei nuclei che stanno alla base del controllo della fase REM. In particolare, due sono i gruppi funzionali GABAergici coinvolti nel sonno REM: i) *neuroni GABAergici REM-off*, che prevengono l'attivazione dei centri REM-on reticolari durante la fase di veglia; ii) i *neuroni GABAergici REM-on* che inibiscono l'attività dei neuroni aminergici. I neuroni della prima tipologia si trovano a livello del grigio periacquedottale ventro-laterale (vIPAG) e del nucleo laterale del tegmento pontino (LPT) (Boissard et al., 2003; Lu et al., 2006). Alla seconda tipologia appartengono, invece, i neuroni GABAergici del SLD (Boissard et al., 2002). È stato ipotizzato che l'Ach e le amine modulano l'attività di questi gruppi neuronali GABAergici: i neuroni GABAergici (SLD) eccitati dall'Ach sono neuroni REM-on e inibiscono i nuclei del LC e del DR; i neuroni GABAergici (vIPAG/LPT) inibiti dall'Ach sono REM-off e inibiscono i neuroni

effettori della PRF durante la veglia e il sonno NREM (Brown et al., 2012). I due gruppi di neuroni in questione hanno tra di loro connessioni mutuamente inibitorie, stabilendo così un circuito neuronale in cui all'attivazione dell'uno corrisponde l'inibizione dell'altro.

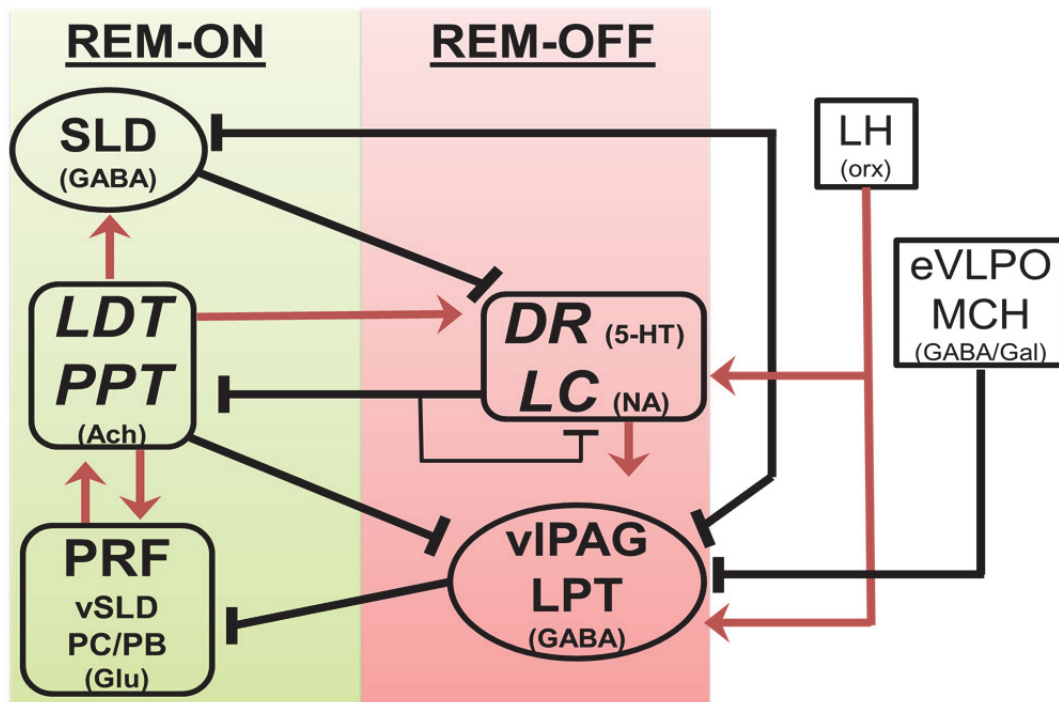
Il quadro quindi è molto più complesso del semplice modello a interazione reciproca prima descritto. Delineando tutto il sistema: durante il sonno REM, l'attività dei neuroni colinergici REM-on (LDT/PPT) ha un effetto eccitatorio sui centri effettori della formazione reticolare pontina (PRF: vSLD/PC/PB), i quali promuovono il sonno REM e tutte le caratteristiche toniche e fasiche a esso relate. A loro volta, i centri effettori del sonno REM, mediante connessioni glutammatergiche, hanno un'azione eccitatoria sui neuroni colinergici REM-on. Questo circuito di mutua eccitazione fa sì che, nel momento in cui un episodio di REM prende avvio, questo sia mantenuto per un certo periodo. Gli stessi neuroni LDT/PPT, inoltre, attivano anche gli interneuroni GABAergici REM-on (SLD). Questi ultimi, attivandosi, inibiscono i neuroni aminergici REM-off (DR/LC) e i neuroni GABAergici REM-off (VIPAG/LPT). In quanto, il rilascio di acetilcolina da parte dei neuroni REM-on (LDT/PPT) ha un effetto inibitorio sugli interneuroni GABAergici REM-off, che a loro volta inibiscono gli effettori del REM (PRF).

L'attivazione dei nuclei colinergici REM-on porta quindi alla genesi di tutta la fase REM e delle sue caratteristiche agendo direttamente e indirettamente sui nuclei effettori del REM. Più precisamente, i nuclei colinergici attivano direttamente la PRF mediante connessioni eccitatorie, allo stesso tempo tolgono l'inibizione attiva della PRF da parte dei neuroni GABAergici REM-off, sia attivando i neuroni GABAergici REM-on (connessi inibitoriamente con i neuroni GABAergici REM-off), sia inibendo direttamente i neuroni GABAergici REM-off (fig. 2.18).

Col procedere del sonno REM, tuttavia, i neuroni REM-on colinergici attivano gradualmente anche i neuroni REM-off aminergici (come nel modello d'interazione reciproca), portando alla cessazione del sonno REM.

Durante la fase di veglia e di sonno NREM, i neuroni REM-off (DR/LC) inibiscono i neuroni colinergici REM-on e attivano i neuroni GABAergici REM-off (VIPAG/LPT). Questo porta quindi a un'inibizione dei neuroni effettori del sonno REM e di conseguenza alla scomparsa delle caratteristiche tipiche di questa fase. Tuttavia, le proiezioni auto-inibitorie dei neuroni REM-off, portano alla disinibizione dei neuroni REM-on e quindi permettono nuovamente il sonno REM (Brown et al., 2012; Fuller et al., 2007; Lu et al., 2006; McCarley, 2007).

Questo modello è tuttavia poco esaustivo poiché non spiega completamente il "*timing*" di alternanza delle fasi NREM-REM. Recenti evidenze hanno sottolineato l'importanza di zone prosencefaliche nella regolazione del ciclo NREM-REM. In particolare, si ritiene che i neuroni oressinergici dell'ipotalamo laterale (LH), svolgano un ruolo cruciale, infatti: i) i neuroni oressinergici sono *wake-active*, ossia la loro scarica è massima durante la veglia e cessa durante il sonno REM; ii) la mancanza di oressina porta a narcolessia (come già riportato



**FIGURA 2.18.** Rappresentazione schematica del modello a interazione reciproca, con integrazione dei gruppi neuronali GABAergici. L'area in *verde* comprende i centri REM-on; quella in *rosso*, i centri REM-off. Per una completa trattazione riferirsi al testo. LDT= nucleo del tegmento laterodorsale; PPT= nucleo del tegmento peduncolo pontino; SLD = nucleo sub-laterodorsale; PRF= formazione reticolare pontina; vSLD= nucleo ventrale sub-laterodorsale; PC= pre-coeruleus; PB=area peribrachiale; DR= nucleo del rafe dorsale; LC= locus coeruleus; vIPAG= grigio periacquedottale ventro-laterale; LPT= nucleo laterale del tegmento pontino; LH= ipotalamo laterale; eVLPO= parte estesa del nucleo preottico ventro-laterale; MCH= ormone concentrante la melanina; Glu= glutammato; ACh= acetilcolina; NA= noradrenalina; 5-HT= serotonina; orx= oressina; Gal= galanina; GABA= acido gamma butirrico.

sopra), un disturbo del sonno caratterizzato da eccessiva sonnolenza diurna, alcuni sintomi relati a un anormale *timing* dei segni del sonno REM e la perdita, nell'uomo, del controllo diurno del REM; iii) i neuroni oressinergici, avendo diffuse proiezioni eccitatorie verso i neuroni aminergici e GABAergici REM-off (Bourgin et al., 2000; Hagan et al., 1999), indirettamente, hanno un effetto inibitorio sui neuroni REM-on. Queste evidenze sottolineano come l'azione dei neuroni oressinergici sopprima l'insorgenza del REM durante le ore diurne, o comunque nelle fasi di piena attività, comportandosi come "una sorta di dito che spinge sul pulsante veglia".

Altra struttura anteriore essenziale per la regolazione del REM è la parte estesa del VLPO (eVLPO), i cui neuroni GABA/galanin-ergici sono REM-on, e hanno un'azione inibitoria sui centri REM-off (Lu et al., 2002). I neuroni dell'eVLPO assieme ai neuroni dell'ipofisi che rilasciano l'ormone concentrante la melanina (*melanin-concentrating hormone*, MCH) sono importanti nella generazione del sonno REM, dato il loro effetto inibitorio sui neuroni GABAergici REM-off (Lu et al., 2006). L'orchestrazione di tutti questi nuclei cerebrali sta alla base della complessità del ciclo ultradiano NREM-REM e della sua architettura.

## 2.2. - SONNO E MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Le malattie neurodegenerative racchiudono un ampio spettro di patologie progressive del sistema nervoso, contraddistinte da una graduale perdita della struttura e delle funzioni neuronali. L'eziologia esatta alla base del processo patogenetico non è definita, tuttavia fattori di rischio di origine sia genetico sia ambientale sembrano giocare un ruolo fondamentale. Il deterioramento neuronale è causa di un irreversibile quanto inevitabile danno delle funzioni cerebrali che si manifesta, secondo il tipo di malattia, con deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie e disturbi comportamentali e psicologici, più o meno gravi. Nonostante le differenze nei quadri sintomatologici di queste malattie, recentemente si è evidenziato che i disturbi del sonno sono una manifestazione comune tra le diverse tipologie di malattie. Il fenotipo di queste patologie, e anche dei disturbi del sonno, è molto variabile e i meccanismi specifici di connessione tra patologia neurodegenerativa e sonno sono spesso poco chiari.

L'associazione tra patologia e disturbo del sonno, infatti, ha sempre trovato difficoltà ad affermarsi, soprattutto per la relazione di "causa - effetto" tra i due fenomeni. Le alterazioni del sonno osservate nelle patologie neurodegenerative possono, infatti, essere attribuite a una combinazione di fattori secondari alla malattia stessa, come per esempio: l'anomala esposizione alla luce dei pazienti ospedalizzati (Dumont and Beaulieu, 2007; Kolla and Auger, 2011), effetti collaterali dei farmaci (Wirz-Justice et al., 2001), una modificazione dell'ambiente sociale o la presenza di dolore dovuto alla patologia (Smith et al., 2000). Tuttavia, l'aumentato interesse per il sonno ha fatto sì che la ricerca spostasse la sua attenzione alle basi neurali e chimiche dell'attività ipnica. Lo stesso Hobson, riprendendo il discorso di Lincoln a Gettysburg, affermò: "Sleep is of the brain, by the brain and for the brain", ovvero "il sonno è del cervello, dal cervello e per il cervello" (Hobson, 2005). Con questa frase egli sottolineò che il sonno è un fenomeno indispensabile per il cervello e che trova le sue basi nell'attività neurale. Tutto il ciclo veglia-sonno è sostenuto, infatti, da una complessa interazione tra diverse regioni cerebrali, sistemi neurotrasmettitoriali e ormoni modulatori (vd. Sez. 2.1.3.3 – Le fasi del ciclo veglia-sonno). Il disinteresse per il collegamento "sonno - patologia" si è quindi attenuato per una maggiore crescita delle conoscenze sul ciclo veglia-sonno e sui suoi disturbi. Le patologie neurodegenerative, inoltre, andando a interessare il sistema nervoso, possono intaccare quelle strutture e quei sistemi neurotrasmettitoriali che sono alla base della regolazione del sonno, traducendosi in alterazioni dello stesso. Questo può essere causa di disturbi a livello del ritmo circadiano e del ciclo veglia-sonno. Gli effetti secondari alla malattia (trattamento farmacologico,

dolore, ecc.) potrebbero avere, quindi, il solo ruolo di esacerbare i già presenti disturbi del sonno.

Come vedremo più avanti, in alcune malattie neurodegenerative il disturbo del sonno è la manifestazione principale, in altre, invece, nonostante rientri nel quadro di presentazione della malattia, è spesso trascurato.

Il punto cruciale rimane tuttavia quello di stabilire il rapporto di “causa - effetto” tra patologia neurodegenerativa e disturbo a carico del ciclo veglia-sonno. In altri termini: è la patologia che causa i disturbi del sonno, o sono quest’ultimi a essere causa, o comunque fattore di rischio per la patologia? Una maggior comprensione delle complesse relazioni che intercorrono tra malattie neurodegenerative e alterazioni del sonno è essenziale al fine di poter spostare l’attenzione su quest’associazione e sulle potenzialità terapeutiche di una normalizzazione del ciclo veglia-sonno in caso di malattia.

## **2.2.1 - LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Di seguito è presentata una descrizione delle principali malattie neurodegenerative (ovviamente non esaustiva), in cui si sottolineano le cause eziologiche e il quadro sintomatico, rivolgendo l’attenzione soprattutto ai disturbi del sonno.

### **2.2.1.1 - LE PRIONOPATIE**

Sotto il nome di prionopatie, note anche con il nome di encefalopatie spongiformi trasmissibili (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*, TSEs), è racchiusa una vasta gamma di condizioni patologiche a esito fatale, diffuse sia negli animali che negli uomini, accomunate da disturbi motori e cognitivi (Aguzzi and Calella, 2009). Queste malattie sono caratterizzate a livello neuropatologico da degenerazione neuronale e aggregazione proteica, e possono presentarsi in forma sporadica (idiopatica), familiare o infettiva (iatrogena) (Knight and Will, 2004).

Le forme animali più note di TSE sono lo *scrapie* nelle pecore e ovini e l’encefalopatia spongiforme bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE) nei bovini. Tra le malattie prioniche umane più conosciute si possono elencare il Kuru, la malattia di Creutzfeldt-Jakob (*Creutzfeldt-Jakob Disease*, CJD), la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Sheinker (*Gerstmann-*

*Sträussler-Sheinker disease*, GSS) e l'insonnia fatale (*Fatal Insomnia*, FI). Il Kuru (in aborigeno "tremore") è una patologia descritta per la prima volta nella tribù aborigena dei *Fore* in Papua Nuova Guinea; questa si trasmette per via infettiva attraverso il rituale, molto diffuso, di endocannibalismo ed è contraddistinta da sintomi iniziali aspecifici che sfociano in tetraplegia flaccida, mioclonie e degenerazione cerebellare (Collinge et al., 2008). La GSS è una patologia prettamente familiare che si manifesta con una progressione molto lenta dell'atassia seguita dall'insorgere di demenza. L'FI può presentarsi in forma sporadica (*sporadic Fatal Insomnia*, sFI) o familiare (*Fatal Familial Insomnia*, FFI) ed è caratterizzata da forme d'insonnia refrattarie ai trattamenti farmacologici, allucinazioni, disautonomia e sintomi motori. La CJD è invece una patologia che può essere di origine sporadica, familiare o infettiva; i suoi sintomi distintivi sono una progressiva demenza, mioclonie e alterazioni del tracciato elettroencefalografico (Mead, 2006; Prusiner, 1998). Nonostante la diversa eziologia e sintomatologia, le prionopatie sono accumulate dall'accumulo di prioni a livello del sistema nervoso centrale. I prioni sono piccole particelle proteiche infettive, resistenti alle maggiori procedure di degradazione degli acidi nucleici. Il componente principale dei prioni è un'isoforma alterata della proteina prionica (PrP) resistente alla proteasi (PrP<sup>SC</sup>, "SC" deriva da scrapie).

La proteina prionica (*prion protein*, PrP o *cellular prion protein*, PrP<sup>C</sup>) è una molecola fisiologicamente espressa in tutti i vertebrati e la sua sequenza genica risulta filogeneticamente conservata (Krakauer et al., 1996; Pastore and Zagari, 2007). Essa è una glicoproteina di membrana altamente espressa nel sistema nervoso centrale, ma va specificato che il suo grado di espressione varia secondo l'area cerebrale e del tipo cellulare. Nello specifico, la PrP<sup>C</sup> è maggiormente espressa a livello della neocorteccia, dell'ippocampo e del talamo. Esistono, in letteratura, alcune differenze riguardo alla localizzazione neuronale della proteina prionica. Alcuni studi, infatti, mostrano come essa si localizzi esclusivamente a livello sinaptico, mentre altri studi indicano una sua localizzazione più estesa sulla membrana plasmatica dei neuroni. Molte componenti del sistema immunitario, del midollo osseo, del sangue e di vari tessuti periferici, inoltre, mostrano un'espressione di quantità più o meno elevata di PrP<sup>C</sup>. In particolare, la proteina prionica risulta espressa nei polmoni, milza, intestino, stomaco, cuore, reni, muscoli e pelle (Linden et al., 2008). Il grado di espressione della PrP è molto elevato a livello cerebrale e del midollo spinale e presenta un livello medio nel cuore e nei muscoli scheletrici e basso a livello della milza e dei reni.

Come ogni proteina, la PrP<sup>C</sup> è codificata da un gene, chiamato PRNP, situato sul braccio corto del cromosoma 20 nell'uomo, e sulla regione omologa del cromosoma 2 nel topo (Sparkes et al., 1986). La proteina prionica umana immatura è costituita da una sequenza di circa 253 amminoacidi; la catena amminoacidica nascente di PrP viene traslocata all'interno del reticolo endoplasmatico (*Endoplasmic Reticulum*, ER) grazie alla sequenza segnale costituita

dai primi 22 residui amminoacidici N-terminali. All'interno dell'ER la proteina prionica subisce molte modificazioni: rimozione del peptide segnale, N-glicosilazione, formazione di un ponte disolfuro N-terminale nella porzione C-terminale (Shamsir and Dalby, 2005), rimozione degli ultimi 23 amminoacidi C-terminali seguita dall'aggiunta dell'ancora glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI) (Pastore and Zagari, 2007). In seguito la PrP viene trasportata al Golgi, dove la glicosilazione cominciata nel reticolo viene completata con l'aggiunta di zuccheri complessi. La proteina prionica, infine, è indirizzata alla superficie cellulare, in particolare verso i così detti *lipid-rafts*: aree di membrana resistenti alla solubilizzazione in detergenti non ionici, ricche in colesterolo e lipidi contenenti acidi grassi saturi. L'ancora GPI serve per mantenere la PrP agganciata al lato extracellulare della membrana plasmatica.

La PrP<sup>C</sup> matura può essere suddivisa strutturalmente in due regioni: la parte N-terminale, flessibile e piuttosto disordinata, e quella C-terminale, globulare e strutturata in  $\alpha$ -eliche. All'interno della proteina prionica è possibile individuare una regione idrofobica chiamata HC (*Hydrophobic Core*) che si estende tra i residui 111 e 134; questa regione si ritiene possa fungere da segmento trans-membrana. La PrP<sup>C</sup>, infatti, è una proteina piuttosto inusuale poiché può adottare differenti topologie di espressione: la maggior parte della PrP<sup>C</sup> si localizza sulla superficie esterna della membrana plasmatica cellulare, alla quale è agganciata tramite l'ancora GPI (questa topologia viene designata con l'abbreviazione <sup>Sec</sup>PrP). Le altre topologie presenti possono essere quella citosolica non traslocata (<sup>Cy</sup>PrP) o quelle trans-membrana. Nel caso delle forme trans-membrana, il segmento HC di PrP s'inserisce nella membrana plasmatica lasciando all'esterno della cellula la parte C- o la parte N-terminale (rispettivamente, <sup>Ctm</sup>PrP o <sup>Ntm</sup>PrP); questo tipo di conformazione si ha fisiologicamente in meno del 10 % della PrP totale della cellula (Stewart and Harris, 2003).

La funzione fisiologica di questa proteina non è ancora stata chiarita. Tuttavia la sua conservazione nel corso evolutivo ne suggerisce un ruolo biologico importante. Uno degli approcci maggiormente utilizzati per risolvere questo problema è stato la creazione di diverse linee di topi con ablazione del gene codificante per la PrP (Biasini et al., 2012). Dal 1992 alcune linee di topi *knock out* per la PrP (PrP KO) sono state generate (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Questi animali mostravano una certa resistenza all'infezione prionica (Bueler et al., 1993). Con la sola eccezione di una linea transgenica, dovuta a un artefatto di *up-regolazione* di un gene adiacente (Moore et al., 1999), i topi PrP KO avevano un'attesa di vita paragonabile a quella dei controlli e non mostravano alterazioni nello sviluppo e anatomiche evidenti (Bueler et al., 1992). Alcuni di questi animali esibivano, comunque, alcune anomalie fenotipiche a livello comportamentale e cellulare (Steele et al., 2007), per esempio alterazioni nelle funzioni olfattive (Le Pichon et al., 2009) o nella mielinizzazione (Bremer et al., 2010). Le basi molecolari di queste alterazioni non sono tuttavia chiare. Alcune delle linee di PrP KO create (Sakaguchi et



al., 1996) mostravano in età avanzata una marcata atassia e una degenerazione diffusa delle cellule di Purkinje. Dal punto di vista comportamentale, inoltre, è stato osservato che l'assenza della PrP provoca alterazioni nell'apprendimento spaziale ippocampo-dipendente (Criado et al., 2005). Lo studio più approfondito del fenotipo di queste linee murine, in cui la PrP non era espressa, ha reso evidente la presenza di alterazioni a carico del ciclo veglia-sonno. La registrazione polisonnografica di topi PrP KO e *wild type*, sia in condizioni di baseline che durante deprivazione di sonno, ha mostrato che i topi PrP KO, rispetto ai topi controllo, abbiano una maggiore frammentazione del sonno, dovuta a una minore durata degli episodi degli stati di vigilanza; questo si rifletteva anche in un'alterazione del ritmo circadiano dell'attività motoria. I topi PrP KO mostravano, inoltre, un aumento della SWA rispetto ai topi *wild-type*, sia in condizioni normali che in seguito a deprivazione di sonno (Tobler et al., 1996; Tobler et al., 1997). Quest'ultimo dato è stato poi confermato anche da uno studio successivo (Huber et al., 1999). Va tenuto in larga considerazione, inoltre, che pazienti con malattie da prioni come l'FFI (Montagna, 2005) o la CJD (Landolt et al., 2006) presentano un ciclo sonno-veglia alterato. Questi dati potrebbero sottintendere un meccanismo comune nel quale la proteina prionica risulti associata a modificazioni nella quantità e nella qualità del sonno. Oltre agli studi sui topi PrP KO, data la localizzazione della PrP a livello della membrana plasmatica, è ragionevole pensare che essa partecipi a processi di segnalazione trans-membrana, come accade per molte altre proteine con ancora GPI (Tsui-Pierchala et al., 2002). Con approcci bio-informatici e attraverso *screening in vitro* sono state riconosciute molte molecole che potrebbero interagire sulla membrana plasmatica con la PrP. La natura di queste interazioni, tuttavia, non è ancora chiarita (Rutishauser et al., 2009). Sicuramente, l'interazione della PrP<sup>c</sup> con molecole di adesione come NCAM, laminina ed E-caderina o con componenti della matrice extracellulare può rafforzare l'ipotesi che la PrP sia coinvolta in processi di adesione cellulare e partecipi ad alcuni fenomeni relati, come la nascita e la crescita dei neuriti, la sopravvivenza e il differenziamento neuronale (Caughey and Baron, 2006; Chiesa and Harris, 2001; Malaga-Trillo et al., 2009; Santuccione et al., 2005). Alcune evidenze supportano l'idea che la PrP possa avere un ruolo importante nella regolazione dei canali ionici e nell'eccitabilità neuronale. Essa, infatti, si trova localizzata soprattutto a livello delle sinapsi (densità sinaptica), dove sono concentrati molti tipi di canali ionici, e questo sottolinea che la PrP possa essere importante per il normale sviluppo e funzionamento sinaptico (Kanaani et al., 2005; Moya et al., 2000). Inoltre, sono state descritte una serie di alterazioni elettrofisiologiche, come una ridotta *Long Term Potentiation* (LTP, correlato neurofisiologico della memoria e apprendimento) e una debole inibizione mediata dai recettori GABA<sub>A</sub> in fettine ippocampali di topi che non esprimevano la PrP, rispetto a quelle di topi *wild type* (Collinge et al., 1994). Come noto, l'influsso di calcio attraverso i canali VGCC (*Voltage Gated Calcium Channels*) genera il potenziale di post-

iperpolarizzazione ( $I_{AHP}$ ); è interessante notare come l'omeostasi del calcio risulti alterata in animali che non esprimono la PrP, portando a una condizione d'ipereccitabilità neuronale. Le correnti  $K^+$  indotte da  $Ca^{2+}$  sono ridotte in fettine ippocampali di topi che non esprimono la PrP paragonate ai controlli (Colling et al., 1996). Allo stesso modo, studi di *patch clamp* condotti su neuroni cerebellari di Purkinje mostrano una correlazione significativa tra alti livelli di espressione della PrP<sup>C</sup> e l'ampiezza massima delle correnti di  $K^+$  attivate dal  $Ca^{2+}$ ; l'assenza della PrP in queste cellule modula in modo indiretto i canali del  $K^+$  attraverso una diminuzione dell'influsso di  $Ca^{2+}$  nei canali VGCC di tipo L (Fuhrmann et al., 2006; Herms et al., 2000). L'elevata eccitabilità dei neuroni ippocampali dei topi non esprimenti la PrP correla con l'abbassamento della soglia epilettogena di questi animali dopo trattamento con acido kainico o con pilocarpina (Walz et al., 1999). Anche anatomicamente i topi PrP KO mostrano una riorganizzazione dell'ippocampo, specialmente della via delle fibre muscolari, molto simile a quella che si ritrova nei modelli di epilessia del lobo temporale (Colling et al., 1997). Tutti questi dati indicano che l'espressione di PrP<sup>C</sup> influenzi l'attività e la formazione delle sinapsi. La prova più convincente di un'interazione funzionale e fisica tra la PrP e recettori riguarda i canali per il glutammato. Un'anomala attivazione di un sottotipo di recettore ionotropico NMDA per il glutammato è ritenuta essere causa di danno e morte delle cellule nervose in molte condizioni neurologiche acute e croniche, poiché permette un afflusso anormale di calcio all'interno del neurone, un meccanismo questo chiamato eccitossicità (Gillissen et al., 2002). In un recente studio, neuroni ippocampali di topi PrP KO mostravano un aumento delle correnti indotte da NMDA, un effetto che era ribaltato dalla sovra-espressione di PrP (Khosravani et al., 2008). La co-immunoprecipitazione della PrP e della subunità NR2D del recettore NMDA ne suggerisce una diretta regolazione da parte della PrP. In seguito, recenti studi su topi transgenici esprimenti una forma di PrP priva della sua regione centrale (residui 105-125) hanno confermato il ruolo della PrP nell'eccitossicità mediata dal glutammato (Li et al., 2007). Successive evidenze sulla modulazione dell'attività del recettore kainato (Rangel et al., 2007) e dei recettori metabotropici per il glutammato (Beraldo et al., 2011) da parte della PrP, hanno suggerito una sua funzione sulla soppressione dell'eccitabilità neuronale mediata da canali multipli per il glutammato. Altre linee di ricerca si sono focalizzate sull'ipotesi che la PrP possa avere un ruolo citoprotettivo: è stato dimostrato che la sovra-espressione di PrP<sup>C</sup> possa avere un ruolo protettivo da diversi tipi di stimoli apoptotici in linee cellulari e neuronali (Diarra-Mehrpour et al., 2004; Kim et al., 2004; Milhavet and Lehmann, 2002; Roucou et al., 2003; Shyu et al., 2005). In particolare, è stato proposto un diretto coinvolgimento della parte N-terminale della PrP nella protezione delle cellule, quindi anche dei neuroni, dalle specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) indotte dalla deprivazione di siero (Haigh et al., 2009). Altre evidenze hanno rilevato che una molecola co-chaperonica citoplasmatica, la

proteina stress-inducibile (STI1), viene rilasciata dalla cellula nella matrice extracellulare, dove si lega alla regione centrale della PrP, promuovendo la sopravvivenza neuronale e la differenziazione (Zanata et al., 2002). Infine, alcune evidenze mettono in relazione la proteina prionica anche con la malattia di Alzheimer (AD): alcuni studi di Parkin e collaboratori hanno mostrato come l'espressione di PrP<sup>C</sup> si in grado di inibire il taglio di APP (*amyloid precursor protein*) da parte delle  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi riducendo la formazione di peptidi di  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -A), i maggiori costituenti delle placche amiloidi nell'AD (Parkin et al., 2007). Nell'ultimo decennio è, inoltre, emerso che le forme solubili oligomeriche di  $\beta$ -amiloide e non quelle aggregate insolubili siano alla base della disfunzione sinaptica e cognitiva propria dell'AD (Balducci et al., 2010; Lacor et al., 2007), anche se il meccanismo mediante il quale agiscono gli oligomeri di  $\beta$ -A non è ancora del tutto chiaro. E' stato proposto che la PrP<sup>C</sup>, data la sua alta affinità di legame con gli oligomeri di  $\beta$ -A, possa fungere da mediatore per l'azione tossica degli oligomeri (Balducci et al., 2010; Um et al., 2012) ma alcuni studi smentiscono questa ipotesi aprendo una diatriba sull'argomento (Balducci et al., 2010; Calella et al., 2010; Kessels et al., 2010).

Nonostante il ruolo della PrP sia ancora dibattuto, è chiaro che mutazioni al gene PRNP portano alla sua isoforma PrP<sup>SC</sup>, caratterizzata da un'alterazione (mal-ripiegamento) della struttura secondaria nativa (Pan et al., 1993; Pergami et al., 1996). Questa modificazione è un evento post-traduzionale (Borchelt et al., 1990): entrambe le forme dopo la traduzione, sono portate all'apparato di Golgi; da qui la forma normale, tramite le vescicole di secrezione, viene portata fino alla membrana esterna, alla quale resta ancorata (Safar et al., 1990; Stahl et al., 1987; Stahl et al., 1990a; Stahl et al., 1990b); la forma mutata, invece, si accumula in vescicole all'interno della cellula (Butler et al., 1988; Taraboulos et al., 1990), e a causa della sua componente idrofobica è possibile l'unione di numerose proteine anomale in aggregati insolubili (Gabizon et al., 1987; Prusiner, 1998; Taraboulos et al., 1990). Mentre la proteina cellulare (PrP<sup>C</sup>) mostra un contenuto in  $\alpha$ -eliche del 42% e un basso contenuto in struttura  $\beta$ -sheet (3%), la proteina alterata (PrP<sup>SC</sup>) mostra un contenuto in  $\alpha$ -eliche ridotto al 30% e un contenuto in  $\beta$ -sheet molto più elevato, attorno al 43% (Govaerts et al., 2004; Pan et al., 1993). Altre due peculiarità della PrP<sup>SC</sup> riguardano la sua parziale resistenza alla degradazione proteolitica con proteinasi K (PK) e la sua parziale insolubilità ai detergenti non denaturanti, cioè la sua predisposizione all'aggregazione (Petchanikow et al., 2001).

La presenza di PrP<sup>SC</sup> e il suo accumulo a livello cerebrale sono la causa delle malattie da prioni. Il termine prione (in inglese "*prion*") fu coniato per la prima volta da Prusiner dalle parole "*proteinaceous*" ed "*infectious*" e per assonanza con la parola "*virion*" (Prusiner, 1982). Il prione è quindi un agente altamente infettivo e di origine proteica, che sta alla base dell'infettività delle malattie prioniche. La proposta di Prusiner venne all'epoca considerata eretica poiché si poneva in netto antagonismo con il dogma secondo il quale l'RNA o il DNA sono necessari per la

riproduzione di qualunque agente infettivo. In seguito, gli studi condotti da Weissmann (Oesch et al., 1985) e Prusiner portarono al clonaggio del gene del prione legato allo scrapie e alla dimostrazione del fatto che esso fosse presente fisiologicamente nel DNA delle cellule dei vertebrati (Prusiner, 1998). I risultati ottenuti da molte linee di ricerca portarono Prusiner alla formulazione di una teoria denominata "*protein only hypothesis*" secondo la quale l'agente infettivo delle malattie da prioni è composto esclusivamente dall'isoforma alterata della proteina prionica cellulare (detta PrP<sup>SC</sup>) che è in grado di indurre il mal ripiegamento della proteina prionica fisiologica (PrP<sup>C</sup>). Secondo questa ipotesi, all'interno della conformazione di PrP<sup>SC</sup> sono contenute tutte le informazioni necessarie alla propagazione dell'agente infettivo (il prione) e alle specifiche caratteristiche cliniche e neuropatologiche che distinguono le differenti forme di malattie da prioni. I prioni, dunque, esemplificherebbero un meccanismo peculiare di trasferimento dell'informazione biologica basato sulla trasmissione della conformazione delle proteine piuttosto che sulla sequenza di acidi nucleici. Un'evidenza importante che avvalorava questa ipotesi è che l'espressione della PrP nell'organismo ricevente sia necessaria per la propagazione dell'agente infettivo e per lo sviluppo della malattia. È stato mostrato, infatti, che i topi PrP KO sono resistenti all'infezione da prioni e che la re-introduzione della PrP è in grado di rendere i topi suscettibili all'infezione (Brandner et al., 1996; Bueler et al., 1993). Quello che resta ancora sconosciuto, però, è il meccanismo attraverso il quale la conversione conformazionale della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>SC</sup> sia in grado di causare la morte neuronale e tutte le altre caratteristiche neuropatologiche delle malattie da prioni.

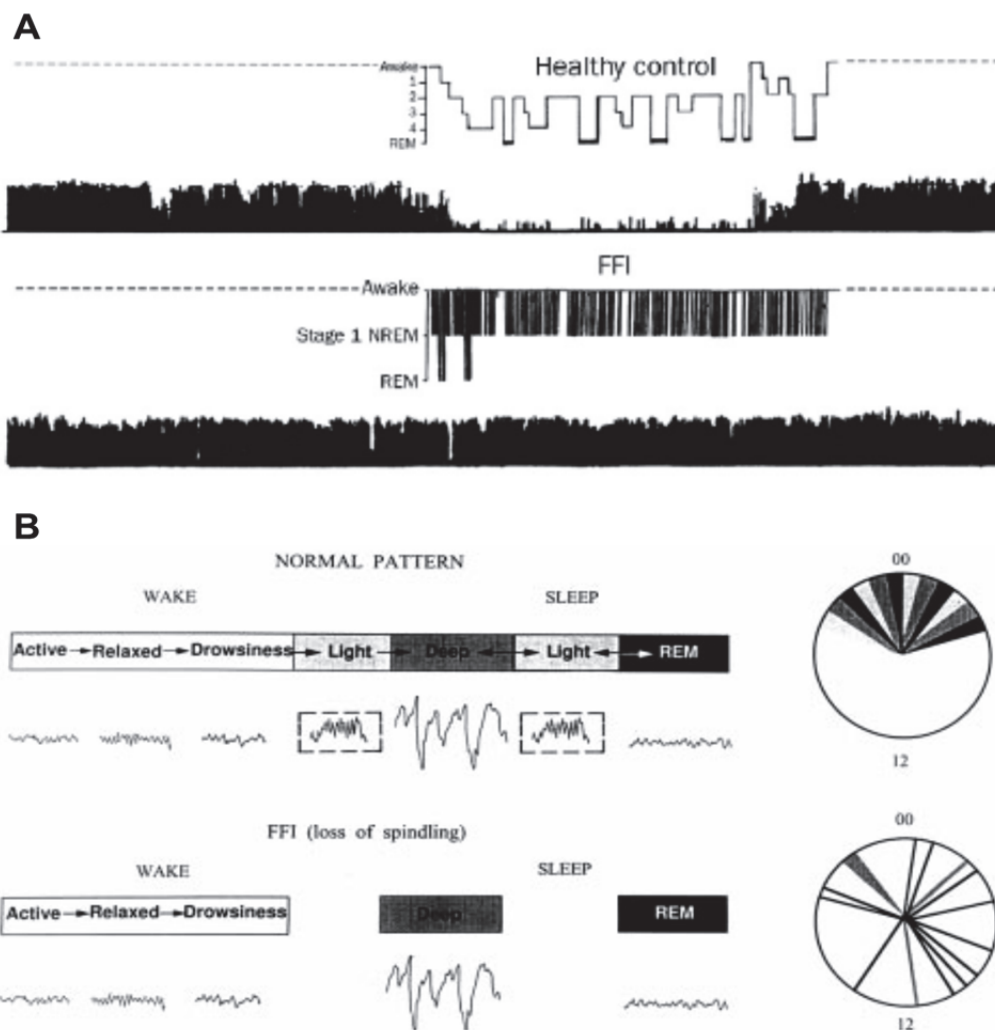
A livello generale, i sintomi primari delle malattie umane da prioni sono: demenza accompagnata da una serie di disfunzioni motorie quali atassia cerebellare, disturbi di tipo mioclonico. A livello neuropatologico, sono caratterizzate da perdita neuronale e astrogliosi e, in alcuni casi, da degenerazione cerebrale spongiforme e deposizione di placche amiloidi. Si può considerare, in generale, che le malattie da prioni abbiano un'incidenza sull'uomo di 1 caso ogni milione di persone l'anno (Chiesa and Harris, 2001).

Le malattie da prioni sono classificabili in 3 gruppi a seconda che abbiano origine infettiva, familiare o sporadica. Le malattie da prioni di tipo infettivo sono esemplificate in maniera molto chiara dal caso del Kuru, in cui il cannibalismo stava alla base della trasmissione della malattia. Le malattie familiari o genetiche sono legate in maniera autosomica dominante a mutazioni nel gene della proteina prionica. Per quanto riguarda le malattie da prioni di origine sporadica, infine, esse non hanno un'eziologia chiara e potrebbero essere originate da mutazioni spontanee dei singoli individui. Molto importante è sottolineare che anche i casi sporadici e molti dei casi familiari di malattie da prioni sono trasmissibili per via infettiva ad animali da laboratorio.

### 2.2.1.1.1 - L'INSONNIA FATALE FAMILIARE

L'insonnia fatale familiare (FFI) è una delle patologie prioniche in cui la compromissione del ciclo veglia-sonno è il segno più evidente.

L'FFI è una malattia neurodegenerativa autosomica dominante con insorgenza attorno ai 50 anni ( $50 \pm 7,1$  anni), legata a una mutazione puntiforme al codone 178 del gene PRNP. La sostituzione dell'acido aspartico con l'asparagina (D178N), in associazione con la presenza di metionina (Met) al codone polimorfico (metionina/valina) 129 dello stesso gene (D178N/M129),



**FIGURA 2.19. A.** (pannello più in alto) Ipnotogramma (in alto) e attività motoria (in basso) rappresentativi di un soggetto umano sano durante le 24 ore. Da notare il normale ciclo veglia-sonno contraddistinto da una veglia accompagnata da alta attività motoria durante le ore diurne e un ciclo ultradiano NREM-REM strutturato durante la notte. (pannello più in basso) Ipnotogramma (in alto) e attività motoria (in basso) rappresentativi di un soggetto umano con FFI. La circadianità del ciclo veglia-sonno e dell'attività motoria è del tutto persa e accompagnata da una notevole riduzione del sonno REM e degli stadi più profondi del sonno NREM [Adattato da *Montagna et al., 2003*]. **B.** Il pannello più in alto a sinistra mostra la sequenza normale d'inizio e mantenimento del sonno e i passaggi ciclici dalla veglia al sonno NREM (dagli stadi più superficiali a quelli più profondi) e al sonno REM. L'organizzazione del ciclo veglia-sonno durante le 24 ore è mostrata nel grafico a torta a destra. Il pannello più in basso mostra la perdita degli *spindles* nei pazienti FFI e la disorganizzazione del loro ciclo veglia-sonno [Adattato da *Lugaresi et al., 1993*].

risulta nella sintesi di una forma di PrP<sup>Sc</sup> caratteristica dell'FFI (Cortelli et al., 1999). Quando la metionina si trova anche al codone 129 dell'allele non mutato (omozigosi, Met - Met) il decorso della malattia è molto più rapido rispetto a quando la stessa posizione è occupata dalla valina (eterozigosi, Met - Val). Nel primo caso, pazienti omozigoti (Met - Met), il decorso della malattia è di  $12 \pm 4$  mesi; nel secondo caso, pazienti eterozigoti (Met - Val), di  $21 \pm 15$  mesi (Schenkein and Montagna, 2006).

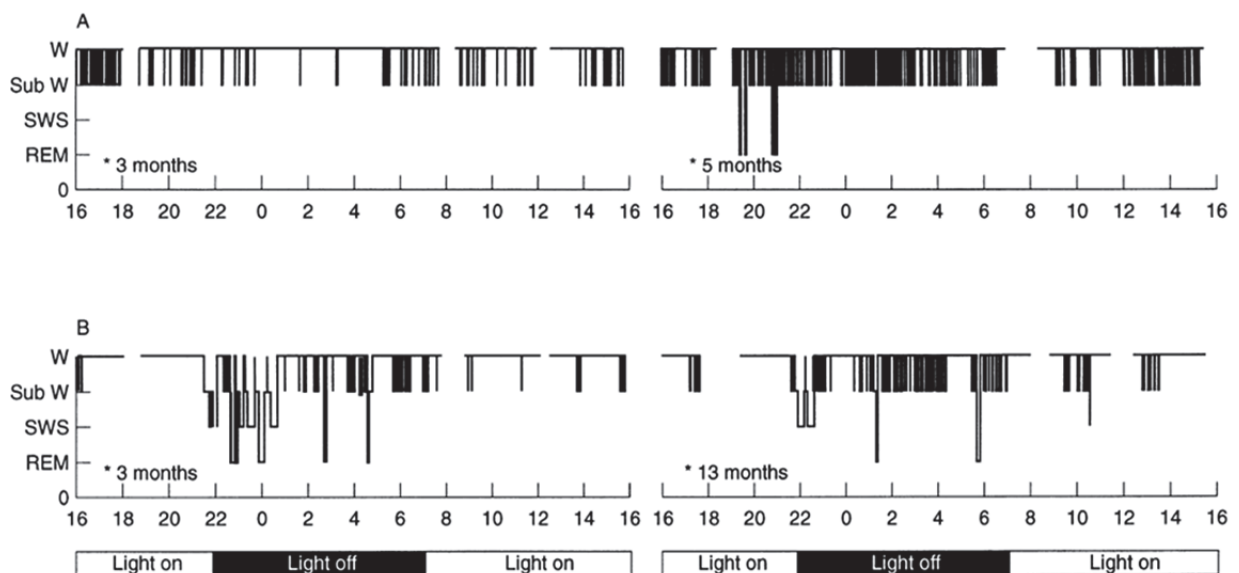
I sintomi caratteristici dell'FFI riguardano una marcata compromissione del ciclo sonno-veglia (fig. 2.19). Già nelle prime fasi della malattia, i pazienti lamentano difficoltà a iniziare e mantenere il sonno con un'eccessiva sonnolenza diurna (Montagna et al., 2003). Il monitoraggio EEG, in fasi più avanzate, rileva una riduzione delle componenti elettroencefalografiche tipiche degli stadi del sonno NREM, come i fusi del sonno e i complessi K, e un'organizzazione del ciclo veglia-sonno del tutto alterata.

I pazienti che presentano un'evoluzione rapida della malattia mostrano un'attività EEG caratterizzata dalla continua oscillazione tra una diffusa attività alfa (tipica della veglia rilassata) e una altrettanto diffusa attività lenta con onde theta, associata a condizioni di sonnolenza o sub-veglia. Sono del tutto assenti i segni caratteristici dello stadio del sonno NREM, cioè i fusi del sonno e complessi K. Brevi e ricorrenti episodi di sonno REM con o senza atonia o, più raramente, di sonno ad onde lente (SWS) emergono in maniera inusuale direttamente dallo stato di veglia. In questi pazienti è del tutto compromessa l'organizzazione ciclica del sonno (fig. 2.20.A). Nei pazienti con un'evoluzione più lenta, invece, i fusi del sonno persistono anche per un anno o più dopo l'insorgenza della malattia. Negli stadi più avanzati della malattia (1 o 2 anni dopo l'insorgenza) le registrazioni poligrafiche mostrano le stesse alterazioni che si ritrovano nei pazienti con decorso più rapido, ad esempio, il persistente stato di veglia o sonnolenza interrotto da brevi periodi di sonno REM o di SWS (fig. 2.20.B). A questo stadio della malattia, i fusi del sonno e i complessi K sono assenti e l'organizzazione ciclica del sonno è del tutto persa.

In generale, fin dai primi stadi della malattia (dopo alcuni mesi dall'insorgenza della malattia in pazienti omozigoti e dopo un anno nei pazienti eterozigoti) questa condizione di sub-veglia o sonnolenza è inframmezzata da episodi di mancata reattività all'ambiente esterno durante i quali il paziente presenta marcati spasmi muscolari e complessi movimenti finalizzati che, successivamente, egli riportava riguardare il sogno. Questi episodi, denominati *stupor onirico* o *enacted dream* ("agire il proprio sogno"), sono una delle caratteristiche più distintive dell'FFI e solitamente corrispondono a brevi episodi di sonno REM senza atonia muscolare (Cortelli et al., 1999). L'attività EEG di base mostra un progressivo rallentamento fino ad arrivare a un appiattimento nelle fasi terminali della malattia.

I pazienti con FFI mostrano, inoltre, una maggiore frammentazione del sonno (passaggi da uno stato di veglia all'altro più frequenti) e una riduzione del tempo totale di sonno rispetto a soggetti di controllo. Negli stadi più avanzati della malattia si osservano una perdita degli stadi più profondi del sonno NREM e un'assenza del sonno REM (Lugaresi et al., 1986; Montagna et al., 1998; Sforza et al., 1995) (fig. 2.19.A). Le scariche a picco periodiche (PSWC, *periodic sharp wave complexes*), che caratterizzano il tracciato EEG dei pazienti con Creutzfeldt-Jakob (vedi più avanti), non si rilevano nella maggior parte dei pazienti FFI; tuttavia, i pazienti con un lungo decorso della malattia possono presentare un'attività periodica transiente durante gli stadi più avanzati (Tinuper et al., 1989).

Oltre ai disturbi che riguardano il sonno, questa patologia è contraddistinta anche da una compromissione del controllo vegetativo nei termini di un'iperattivazione simpatica, contraddistinta da ipertensione, tachicardia, tachipnea, iperidrosi, elevata perspirazione e salivazione, ipertermia e piressia. Nei pazienti FFI sono molto comuni anche disturbi motori (andatura atassica, disartria e disfagia, dismetria, mioclonie), neuropsicologici (disturbi di attentivi, mnestici e di pianificazione) e un appiattimento dei cicli ormonali e della temperatura (Avoni et al., 1991; Montagna et al., 2003; Portaluppi et al., 1994). Le ultime fasi della patologia sono contraddistinte da uno stato confusionale (simile a quello riscontrato in pazienti affetti da demenza) e morte (Schenkein and Montagna, 2006). L'utilizzo della risonanza magnetica in pazienti con FFI ha permesso di individuare una dilatazione ventricolare con conseguente atrofia corticale e cerebellare. Inoltre, mediante PET (*positron emission tomography*) si è



**FIGURA 2.20.** Architettura del sonno durante le 24 ore in un paziente con FFI a decorso rapido (**A**) e un paziente con FFI a decorso lento (**B**). **A.** Nel caso di evoluzione rapida (paziente omozigote per Met al codone 129) il sonno è completamente perso a 3 mesi dall'insorgenza della malattia. **B.** In caso di evoluzione lenta (paziente per Met eterozigote al codone 129) il sonno a onde lente e quello REM persiste anche a 13 mesi dall'insorgenza dell'FFI. W: veglia; Sub W: sub-veglia; SWS: sonno a onde lente; REM: sonno REM; Light on: luce accesa; Light off: luce spenta. [Adattato da Cortelli et al. 1999].

evidenziato un ipometabolismo del talamo e del giro del cingolo (Perani et al., 1993). In linea con i dati di *brain imaging*, le analisi neuropatologiche hanno messo in luce una perdita neuronale, accompagnata da astrogliosi, a livello talamico, soprattutto del nucleo anteriore e dorso mediano, e dell'oliva inferiore (Macchi et al., 1997; Montagna, 2005).

La deposizione d'isoforme insolubili di PrP, segno caratteristico delle prionopatie, nell'FFI è molto diffusa soprattutto a livello del sistema limbico, dell'ipotalamo, del mesencefalo (vPAG) e del talamo (Cortelli et al., 1999; Perani et al., 1993).

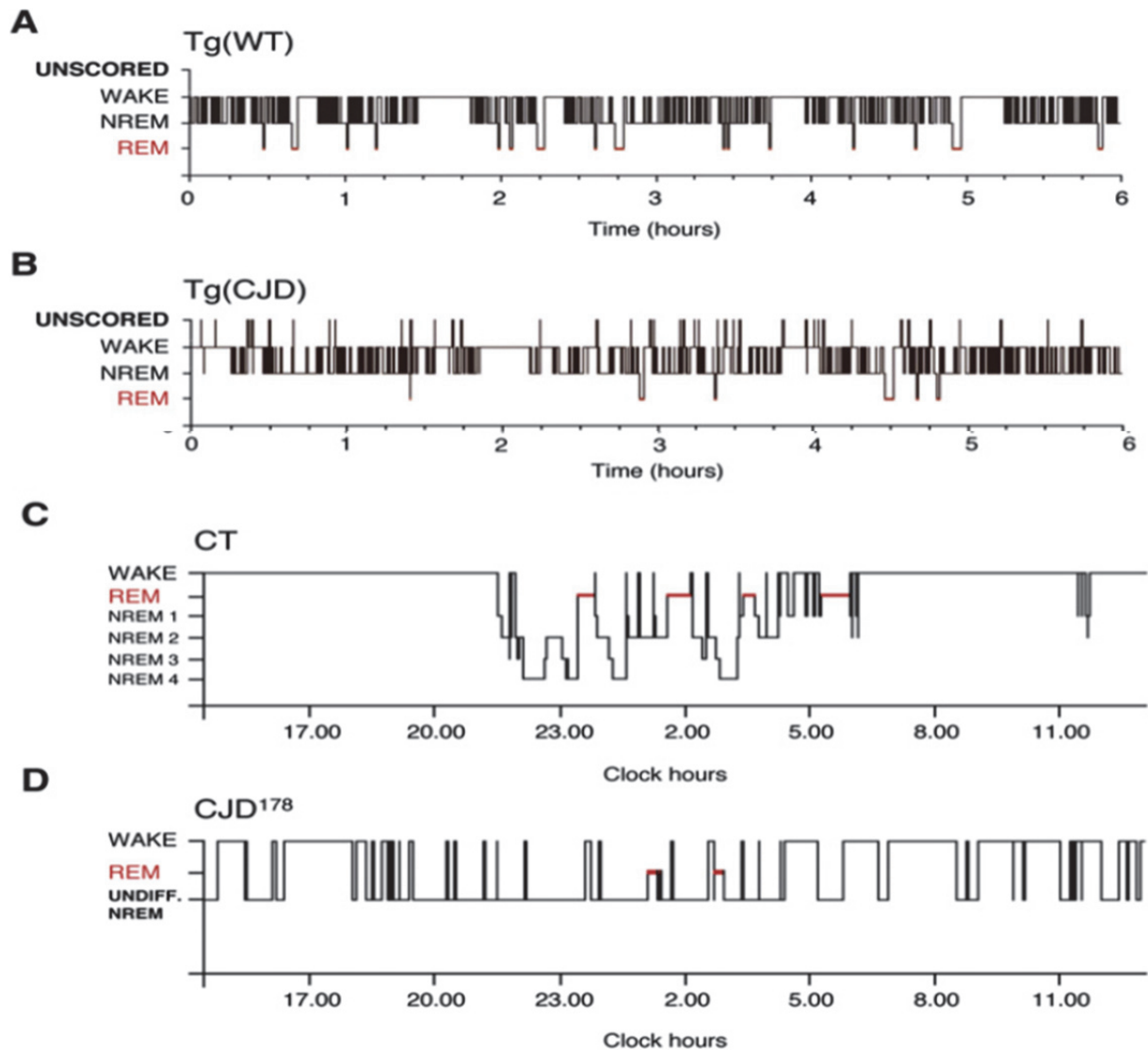
Il coinvolgimento dell'area talamica e la sua compromissione sono una delle ragioni esplicative degli evidenti sintomi a carico del ciclo veglia-sonno riscontrabili in pazienti affetti da FFI. Il talamo, infatti, ha un ruolo prioritario nella regolazione del ciclo veglia-sonno e nella produzione degli elementi caratteristici del sonno NREM (fusi del sonno) e del SWS (Sforza et al., 1995; Tinuper et al., 1989).

#### **2.2.1.1.2 - LA MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB**

La malattia di Creutzfeldt-Jakob è una delle più note encefalopatie spongiformi dovute all'anomalo accumulo di proteina prionica alterata a livello del sistema nervoso centrale. Esistono tre diverse forme di CJD: infettiva, familiare e sporadica. La forma infettiva è dovuta all'esposizione a materiale infetto, come i casi di CJD iatrogena legata alla contaminazione per mezzo di ferri chirurgici, o all'assunzione di ormone della crescita derivato da cadaveri di pazienti con CJD (Aguzzi et al., 2007; Brown, 1990). Tra le forme infettive è da ricordare anche i casi della variante di CJD (vCJD) che si origina dall'ingestione di carni di animali affetti da encefalopatia spongiforme bovina (BSE) (Weissmann and Aguzzi, 1997). La forma sporadica (sCJD) ha un'eziologia poco definita e potrebbe essere originata da mutazioni spontanee del gene PRNP nei singoli individui. Per quanto riguarda la forma familiare (fCJD), questa è legata in maniera autosomica dominante a mutazioni del gene che codifica per la proteina prionica. Tra le forme familiari di CJD quella più nota è la CJD<sup>178</sup>. Questa forma è dovuta a una sostituzione dell'acido aspartico all'asparagina nel codone 178 (D178N) del gene PRNP, in associazione con la valina al codone dimorfico 129 dello stesso gene (D178N/V129), al contrario della FFI, dove al codone 129 è presente la metionina (D178N/M129).



L'età d'esordio della CJD<sup>178</sup> è tra i 26 e i 47 anni e la durata media della malattia è di  $14 \pm 4$  mesi dall'esordio per i soggetti omozigoti per la valina al codone 129 (Val - Val), mentre, i pazienti eterozigoti al sito polimorfico (Val - Met) esordiscono dai 45 ai 65 anni e presentano una durata della malattia di  $29 \pm 22$  mesi (Gambetti et al., 2003b). I sintomi iniziali della CJD<sup>178</sup> sono molto eterogenei e dipendono dalle aree della corteccia cerebrale che sono inizialmente coinvolte dal processo patologico. In circa un terzo dei casi sono riportati sintomi prodromici, tra cui: affaticamento, disturbi del sonno (insonnia), depressione e perdita di peso, ma anche



**FIGURA 2.21.** A. Ipnogramma rappresentativo di un topo wild type Tg(WT) di 578 giorni. La sigla "Unscored" indica le epoche non assegnate a nessun dei tre stati di vigilanza (sonno NREM, sonno REM e veglia). B. Ipnogramma rappresentativo di un modello murino Tg(CJD) di CJD<sup>178</sup>(D177N/V128). Da notare la riduzione delle epoche di sonno REM (sottolineate in rosso) rispetto ai topi di controllo Tg(WT) e la presenza di epoche "unscored". Gli ipnogrammi presentati in A e in B sono relativi alle prime 6 ore della fase di luce del ciclo luce/oscurità e provvedono a fornire un quadro qualitativo del sonno e sulla sua distribuzione (architettura) durante questo intervallo. C. L'ipnogramma di 24 ore di un soggetto umano sano mostra un normale schema di veglia durante le ore diurne, un regolare ciclo NREM-REM durante la notte. D. Rudimentale ciclo veglia-sonno di un paziente con la mutazione D178N/V129, con una prevalenza della veglia durante il giorno e di epoche di sonno durante la notte. Da sottolineare, l'assenza del ciclo ultradiano NREM-REM, la riduzione del sonno REM e l'impossibilità di identificare le fasi del sonno NREM.[Adattato da *Dossena et al., 2008*].

alterazioni dell'appetito e della sudorazione, malessere generale, cefalee e sensazioni di dolore (Collinge, 2001).

Nelle prime fasi della malattia, i pazienti affetti da CJD<sup>178</sup> manifestano un iniziale deterioramento cognitivo e perdita di memoria spesso associate a momenti di depressione, irritabilità e alterazioni dell'umore e del comportamento (quadro demenziale). In aggiunta ai sintomi cognitivi, vi è un interessamento anche del sistema motorio che include: atassia, difficoltà nell'eloquio, disartria e afasia, tremori e mioclonie (Gambetti et al., 2003a).

L'utilizzo dell'EEG ha permesso di evidenziare in pazienti CJD la presenza di anomalie tipiche del tracciato, dette PSWC (*periodic sharp wave complexes*), che morfologicamente consistono sia in onde a picco semplici (incluse le bifasiche e trifasiche) o in onde complesse con *spikes* misti (sia in *polispikes* o onde lente) con una durata di 100 – 600 ms e una ricorrenza ogni 0,5 - 2 s (Gloor, 1980). A livello topografico i PSWC hanno una distribuzione bilaterale soprattutto a livello frontale e precentrale, anche se, a volte, possono essere unilaterali. Questi non sono comunemente associati alle mioclonie e sono presenti soprattutto durante la veglia, in particolare in associazione a un alto livello di vigilanza con apparente allerta e immobilità. I PSWC tendono a sparire durante il sonno. La topografia e le caratteristiche dei PSWC hanno evidenziato una loro possibile genesi a livello dei nuclei talamici (Wieser et al., 2006).

Le alterazioni del ciclo veglia-sonno, pur costituendo in molti casi un sintomo prodromico, non sono state oggetto di particolare attenzione per molto tempo. Solo recentemente, in molti pazienti è stata riportata una difficoltà a iniziare o mantenere il sonno, accompagnata da una totale assenza di fusi del sonno, complessi K e onde al vertice durante il sonno. Si osserva, inoltre, una quasi totale assenza della normale modulazione del ciclo ultradiano del sonno NREM - REM, con una virtuale perdita del sonno REM, accompagnata da una rilevante riduzione dell'ampiezza delle onde theta. Parimenti anche durante il sonno NREM si è osservata un'attenuazione delle onde trifasiche e una difficoltà nella discriminazione dei suoi sotto-stadi. Le alterazioni del sonno, come la perdita dell'organizzazione del ciclo veglia-sonno e la riduzione del sonno REM (fig. 2.21), si sono osservate sia nella forma sporadica che familiare della CJD nell'uomo (Dossena et al., 2008; Landolt et al., 2006; Taratuto et al., 2002; Terzano et al., 1995) e in un modello murino di CJD<sup>178</sup> (Dossena et al., 2008).

Le analisi di risonanza magnetica (MRI) nei pazienti CJD<sup>178</sup> non mostrano alterazioni particolari a livello cerebrale. Solo in alcuni pazienti è stata osservata un'atrofia non specifica della corteccia cerebrale in fase precoce. Nelle fasi tardive della malattia, i pazienti affetti da CJD mostrano atrofia dei gangli della base, accompagnata da anomalie del segnale derivante dalle regioni del talamo, dello striato e del nucleo pallido. L'alterazione del segnale è dovuta alla gliosi e ai cambiamenti spongiformi che interessano queste regioni (Finkenstaedt et al., 1996).

Le modifiche istopatologiche dei pazienti CJD<sup>178</sup> sono tipicamente: vacuolizzazione del parenchima cerebrale (spongiosi) con gliosi prominente e alto grado di perdita neuronale. Le lesioni rilevate interessano la corteccia cerebrale, specialmente le aree frontali e temporali. Modificazioni patologiche si rilevano anche a livello ippocampale (corteccia entorinale, subiculum e giro dentato). La spongiosi e la gliosi interessano solo in minima parte il talamo, cervelletto e il tronco encefalico.

Caratteristica della CJD è anche la cospicua deposizione della PrP<sup>Sc</sup>, che presenta una localizzazione puntinata e diffusa soprattutto a livello corticale e ippocampale la cui intensità varia al variare del grado di severità della patologia (Gambetti et al., 2003a; Gambetti et al., 2003b).

### **2.2.1.2 - LA MALATTIA DI ALZHEIMER**

La malattia di Alzheimer (AD) costituisce la causa più frequente di demenza, contribuendo al 50 – 60 % dei casi di deterioramento cognitivo in età anziana. L'AD si definisce attraverso caratteristiche cliniche e neuropatologiche specifiche. Alois Alzheimer nel 1907 descrisse per la prima volta la presenza di placche neuritiche e grovigli neurofibrillari nel cervello di una paziente affetta da demenza progressiva. Egli delineò anche i sintomi clinici della malattia, che Kraepelin, nel suo trattato di psichiatria del 1910, propose di chiamare con l'eponimo di Malattia di Alzheimer. In generale, l'AD è una patologia multifattoriale alla cui eziopatogenesi concorrono fattori genetici e ambientali. Tra i fattori di rischio non modificabili sono compresi l'età avanzata, il sesso femminile e le caratteristiche genetiche, individuali o familiari (Pizzolato and Cagnin, 2010). L'incidenza dell'AD oscilla tra i 2,5 e i 5 casi su 1.000 persone, con un notevole incremento legato all'invecchiamento: l'incidenza risulta dell'1% circa nei soggetti con più di 65 anni e sale al 3,5% negli ultraottantenni. L'età è, quindi, il più importante fattore di rischio per lo sviluppo della malattia di Alzheimer, la cui prevalenza e incidenza raddoppiano ogni 5 anni nelle persone tra i 65 e i 95 anni.

Le caratteristiche patologiche dell'AD si esprimono a livello macroscopico con un quadro di atrofia cerebrale, più marcata per le regioni temporali mesiali, dovuta a perdita neuronale e sinaptica. A livello microscopico, i segni caratteristici dell'AD consistono in una progressiva deposizione, partendo dalla corteccia temporale per poi arrivare a quella frontale, di placche neuritiche (placche senili), nell'ambiente extracellulare, e di grovigli neurofibrillari (o viluppi neurofibrillari, *neurofibrillary tangles*) in quello intracellulare. I grovigli neurofibrillari sono ammassi di filamenti elicoidali appaiati di proteina tau iperfosforilata, che si depositano nel

citoplasma dei neuroni. La proteina tau è normalmente espressa negli assoni poiché ha la funzione di stabilizzare i microtubuli del citoscheletro neuronale. La forma fosforilata, oltre a non essere in grado di svolgere questa funzione, tende ad assemblarsi in grovigli acquisendo una funzione tossica nel citoplasma neuronale (Masters et al., 2006). Le placche neuritiche sono costituite da un nucleo (*core*) centrale di deposito extracellulare di amiloide circondato da neuriti in degenerazione. La proteina amiloide è costituita da peptidi di 40 e 42 aminoacidi che derivano dal taglio proteolitico di una lunga proteina precursore dell'amiloide (*Amyloid Precursor Protein*, APP). Il riscontro di questi due elementi, grovigli neurofibrillari e placche neuritiche, è necessario per una diagnosi di certezza (autoptica) della malattia (Pizzolato and Cagnin, 2010). Un'accentuata rarefazione sinaptica con perdita neuronale si osserva nelle aree corticali associative, nell'ippocampo e nelle regioni entorinali del cervello di pazienti affetti da AD. All'esame macroscopico queste alterazioni si traducono in un'evidente assottigliamento della sostanza grigia e in una riduzione di circa il 20 % del peso totale dell'encefalo. L'ippocampo è severamente atrofico, soprattutto nelle ultime fasi della malattia. Un'altra regione cerebrale particolarmente coinvolta nel processo patologico dell'AD è il nucleo di Meynert, in cui è fortemente ridotto il numero di neuroni che danno origine alle proiezioni colinergiche verso la corteccia cerebrale (Pizzolato and Cagnin, 2010).

L'eziopatogenesi dell'Alzheimer non è ancora del tutto chiarita. L'ipotesi più convincente sembra essere quella della "cascata dell'amiloide" come elemento chiave dei processi patofisiologici della malattia (Fodero-Tavoletti et al., 2011; Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2001). Secondo questa ipotesi, gli eventi che portano alla degenerazione e alla morte neuronale sono scatenati dalla formazione e dal deposito di fibrille insolubili e tossiche di  $\beta$ -amiloide. La formazione delle fibrille deriva dal taglio proteolitico dell'APP; questa proteina in condizioni fisiologiche viene prevalentemente degradata in un grande frammento solubile di APP ( $\alpha$ -APP) grazie all'azione dell' $\alpha$ -secretasi (via non-amiloidogenica). Nella malattia di Alzheimer prevale, invece, la via di degradazione amiloidogenica, nella quale la  $\beta$ -secretasi taglia l'APP rilasciandone un grande frammento ( $\beta$ -APP). Il successivo metabolismo del  $\beta$ -APP da parte della  $\gamma$ -secretasi determina il rilascio del peptide beta-amiloide ( $\beta$ -A) formato da 40 o 42 aminoacidi (rispettivamente A- $\beta_{40}$  e A- $\beta_{42}$ ). Questi due peptidi, in particolare la A- $\beta_{42}$ , hanno la capacità di aggregarsi a formare fibrille insolubili che costituiscono il *core* della placca senile (Pizzolato and Cagnin, 2010). Una disregolazione nella produzione e nella degradazione di questi peptidi porta ad un loro accumulo e alla formazione di placche neuritiche. La presenza di depositi insolubili di aggregati di A- $\beta$  porterebbe, secondo questa ipotesi centrata sui peptidi A- $\beta$ , a una cascata di eventi secondari, che coinvolgono la gliosi, i processi infiammatori, l'eccitossicità, la formazione dei grovigli neurofibrillari, lo stress ossidativo e, infine, la disfunzione sinaptica e neuronale (Masters et al., 2006). Recenti studi hanno proposto che i

peptidi di A- $\beta$  siano neurotossici anche nella loro forma di oligomeri, prima, cioè, dello stadio di aggregazione in fibrille. Gli oligomeri di A- $\beta$  andrebbero ad alterare l'attività sinaptica, inducendo la fosforilazione della proteina tau e quindi la formazione di grovigli neurofibrillari (Haass and Selkoe, 2007).

Negli anni '70 molti studi hanno rilevato che è il sistema colinergico, soprattutto a livello del sistema limbico e della corteccia, a essere alterato in corso di AD. Si è evidenziato, infatti, una riduzione nel numero e nell'attività degli enzimi per la sintesi (colin O-acetiltransferasi, ChAT) e per la degradazione (acetilcolinesterasi, AChE) dell'acetilcolina, in associazione con una perdita dei neuroni colinergici (Davies and Maloney, 1976; Perry et al., 1977a; Perry et al., 1977b).

L'AD si caratterizza per una fase d'esordio subdola e un'evoluzione lentamente progressiva. Nelle prime fasi della malattia i pazienti presentano disturbi della memoria episodica con una progressiva difficoltà a ricordare informazioni apprese recentemente. Questo si accompagna a difficoltà nella pianificazione e organizzazione di attività professionali usuali o di lavori domestici. In questa fase l'eloquio spontaneo può essere interrotto da pause alla ricerca della parola appropriata (anomia) e il filo del discorso viene, di conseguenza, facilmente perso. In fasi più avanzate, anche altre funzioni cognitive sono compromesse: il pensiero astratto e il ragionamento sono impoveriti. Il disturbo dell'eloquio verbale si manifesta più evidentemente. Si notano difficoltà nelle abilità visuo-spaziali (guida di autoveicoli o riconoscimento di figure complesse). I disturbi mnestici s'intensificano maggiormente e compaiono anche agnosia visiva e aprassia. I disturbi psichici e del comportamento sono molto frequenti nell'AD, nei termini di apatia, depressione, disinteresse, irritabilità, labilità emotiva e mutamenti di personalità (Pizzolato and Cagnin, 2010).

Le componenti cognitive e psico-comportamentali sono quelle maggiormente compromesse nell'AD. In molti casi (~ 25 - 50%) si rilevano, tuttavia, anche disturbi a carico del ciclo veglia-sonno (Petit et al., 2011). La perdita dell'integrità del sistema colinergico e la progressiva neurodegenerazione che caratterizza la malattia di Alzheimer si riflette anche in molti aspetti del sonno e del controllo circadiano, data l'importanza dell'Ach nella sua regolazione. Le alterazioni del ciclo veglia-sonno riscontrate nell'AD consistono essenzialmente in un'esacerbazione delle fisiologiche modificazioni che si presentano con l'invecchiamento. Confrontati con soggetti sani, i pazienti AD presentano: un incremento del numero dei risvegli e un aumento dello stadio 1 del sonno NREM (N1); una marcata riduzione del tempo trascorso negli stadi più profondi del sonno NREM (N3) e un'assenza di fusi del sonno e complessi K, che caratterizzano lo stadio 2 del sonno NREM (Bliwise, 2004; Loewenstein et al., 1982; Prinz et al., 1982b; Vitiello and Prinz, 1989). A differenza degli anziani sani, in cui il sonno REM non risulta compromesso durante l'invecchiamento, i pazienti AD mostrano invece una marcata riduzione di questa fase (Bliwise, 2004; Petit et al., 2011). In aggiunta a queste modificazioni del ciclo veglia-sonno, si riscontra

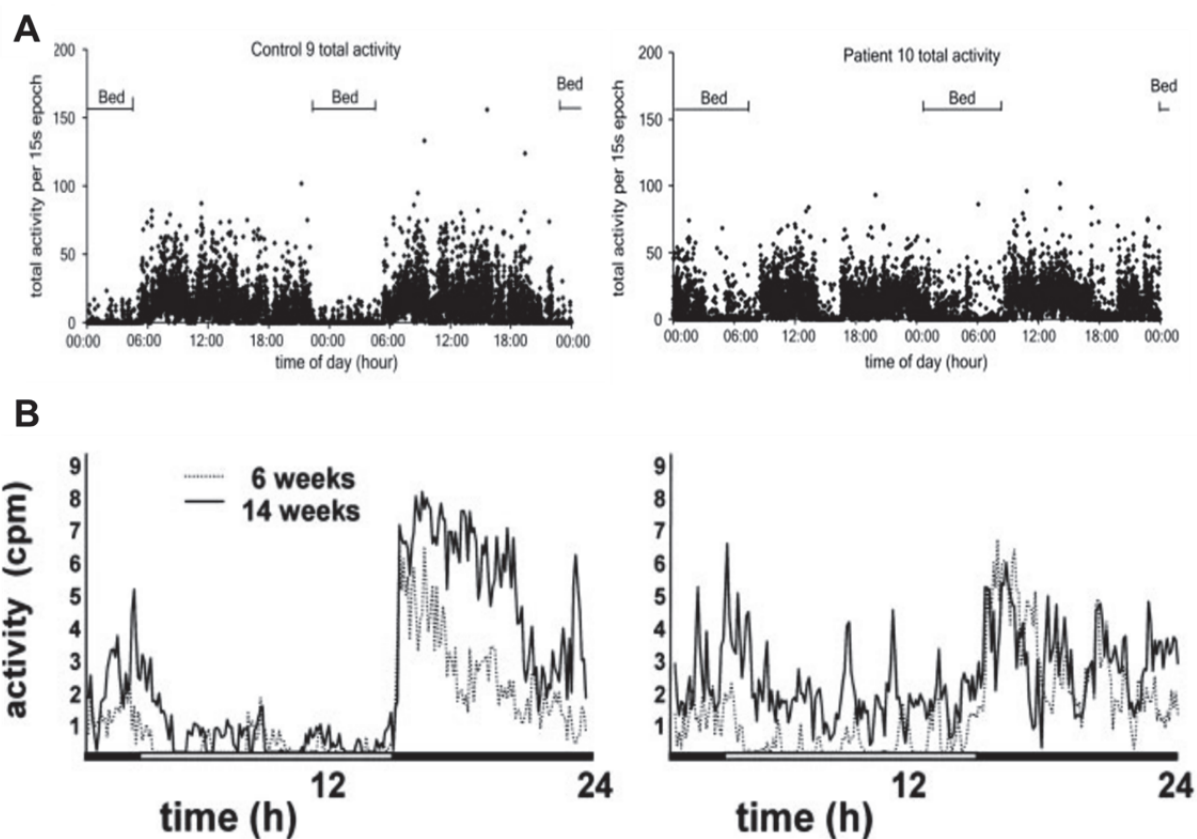
anche un'eccessiva sonnolenza diurna accompagnata dalla sindrome del tramonto (*sundowning syndrome*), ossia la tendenza a essere confusi e agitati nelle ore pomeridiane e serali (Bliwise et al., 1993). Meno frequenti, se pur presenti, possono essere le parasonnie a carico del sonno REM, come il disturbo comportamentale durante il sonno REM (*REM behaviour disorders*, RBD, trattato più avanti) e il sonno REM senza atonia (*REM Sleep Without Atonia*, RSWA) (Gagnon et al., 2006a). A livello qualitativo, i pazienti AD presentano un rallentamento dell'attività EEG con una predominanza dell'attività delta e theta durante la veglia rispetto a soggetti di controllo. Questo effetto di rallentamento dell'EEG è ancora più accentuato durante la fase di sonno REM, manifestandosi con un aumento di potenza delle bande delta e theta, e una riduzione delle bande alfa e beta (Hassainia et al., 1997; Prinz et al., 1992).

Le alterazioni del sonno e dell'attività EEG riscontrate nell'AD, soprattutto nella fase REM, possono essere la manifestazione dell'ingente perdita della funzionalità del sistema colinergico, che, come sottolineato sopra (vd. Sez. 2.1.4.3.4 - IL SONNO REM), sta alla base del complesso meccanismo regolatore del sonno REM e dell'attivazione corticale durante questa fase (Kodama et al., 1990).

### **2.2.1.3 - LA MALATTIA DI HUNTINGTON**

La malattia di Huntington (HD) prende il nome da colui che la descrisse nel 1872. È una rara patologia neurodegenerativa ereditaria (autosomica dominante) causata dall'anormale espansione (41 o più volte) della ripetizione della tripletta nucleotidica CAG nel gene HTT, che codifica per l'huntingtina (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). L'huntingtina (Htt) è una proteina espressa in tutte le cellule dei mammiferi ed è maggiormente presente nel cervello e nei testicoli (DiFiglia et al., 1995). La funzione dell'Htt non è ancora del tutto nota, si ritiene, tuttavia, che essa sia importante per un corretto sviluppo neuronale, per il mantenimento delle funzioni neurali e per l'innescare di meccanismi di neuroprotezione (Cattaneo et al., 2005). L'espansione della ripetizione comporta la formazione di aggregati di una forma anomala (mal-ripiegata) di huntingtina (mHtt), a livello del nucleo e del citosol, con una conseguente perdita delle sue funzioni e interazioni con le altre proteine (Clabough, 2013).

La forma mal-ripiegata di proteina si accumula a livello cerebrale e risulta essere tossica per alcuni compartimenti neuronali. La sua presenza provoca, per un meccanismo non ancora noto, una perdita neuronale e atrofia soprattutto a livello dell'area striatale, in particolare del putamen e del nucleo caudato, in modo da compromettere il circuito talamo-corticale dei gangli della base.



**FIGURA 2.22.** Anormalità circadiane dell'attività motoria in pazienti con HD e in un modello murino di HD. **A.** Monitoraggio mediante actigrafo durante 48ore in due soggetti rappresentativi: a sinistra in un soggetto neurologicamente sano; a destra in un soggetto con HD. **B.** Profilo dell'attività motoria durante le 24 ore a due età diverse (6 e 24 mesi) di un topo *wild type* (a sinistra) e di un modello murino di HD (R6/2, a sinistra). [Adattato da *Morton et al. 2005*].

I pazienti affetti da HD presentano inoltre anche alterazioni della sostanza nera, dell'ippocampo, del giro angolare del lobo parietale, delle cellule di Purkinje cerebellari, dell'ipotalamo e del talamo (Walker, 2007). È da ricordare che la forma mHtt oltre ad essere, di per sé, dannosa per l'organismo induce anche una perdita della normale funzione dell'Htt (Cattaneo et al., 2005; Clabough, 2013; Walker, 2007; Young, 2003).

L'HD ha una prevalenza media di 5 - 10 casi per 100.000 persone e un esordio in età adulta, solitamente tra i 40 e 50 anni, anche se, sono riportate forme giovanili in cui i sintomi possono comparire anche prima dei 20 anni (Foroud et al., 1999).

La manifestazione dell'HD è solitamente preceduta da una fase pre-sintomatica in cui i pazienti possono mostrare irritabilità o disinibizione e inaffidabilità nel lavoro. A questi sintomi si aggiunge una difficoltà a svolgere più azioni contemporaneamente e un aumento dell'ansia e delle dimenticanze. Nella fase sintomatica i pazienti con HD presentano principalmente disturbi motori, come movimenti coreici (movimenti involontari) che interessano inizialmente le mani e il volto, per poi coinvolgere molti distretti muscolari influenzando anche l'andatura, che assume la tipica forma danzante; impersistenza motoria, cioè l'incapacità di mantenere un atto motorio in

maniera continuata; l'alterazione della motilità oculare (soprattutto nelle saccadi); distonia, instabilità posturale e rigidità (Walker, 2007). Le disfunzioni cognitive sono spesso frequenti nei pazienti affetti da HD e rientrano nel quadro delle demenze sottocorticali, presentando bradifrenia, perdita delle funzioni esecutive, come le abilità di organizzazione, pianificazione e controllo, e relativo risparmio della memoria (Paulsen et al., 2001). Queste caratteristiche peggiorano con il decorso clinico arrivando anche a un deterioramento linguistico. I pazienti affetti da HD, frequentemente, sviluppano depressione, accompagnata anche da ideazione suicidaria e sintomi maniaci e psicotici (Di et al., 1993; Robins Wahlin et al., 2000).

Oltre ai disturbi motori e cognitivi, l'HD si caratterizza anche per la presenza di disturbi del sonno con eccessiva sonnolenza diurna e insonnia notturna. Recenti studi hanno rilevato anche anomalie a carico del ritmo circadiano dell'attività motoria. In particolare, mediante l'utilizzo di un actigrafo (un dispositivo simile a un orologio che consente di tener traccia dell'attività motoria) si è evidenziata una perdita nella struttura e nella definizione del profilo attività-riposo in pazienti con HD (Morton et al., 2005) (fig. 2.22.A). Allo stesso modo, in un modello murino di HD (linea R6/2) si è riscontrata una marcata alterazione dell'attività motoria, rispetto a topi di controllo, durante i periodi luce/buio (fig. 2.22.B). Quest'alterazione mostrava un peggioramento con la progressione della malattia (Kudo et al., 2011; Morton et al., 2005). In associazione con questi disturbi, molto spesso, si riportano cali nella vigilanza diurna, insonnia e sonnolenza diurna (Goodman et al., 2011; Videnovic et al., 2009).

La registrazione polisomnografica ha inoltre evidenziato che i pazienti con HD, in uno stadio intermedio della malattia, hanno una riduzione del tempo speso in sonno REM (Morton, 2013; Silvestri et al., 1995; Wiegand et al., 1991b) e in SWS (Wiegand et al., 1991b), accompagnata da un aumento degli stati più superficiali del sonno NREM, rispetto a soggetti di controllo (Hansotia et al., 1985; Ikhno, 1985). Il sonno REM oltre ad essere ridotto presenta una latenza di comparsa molto più lunga (Aziz et al., 2010) e spesso si accompagna al disturbo comportamentale durante il sonno REM (*REM Behaviour Disorder*, RBD) (Arnulf et al., 2008), che verrà affrontato più avanti (vd. Sez. 2.2.3.1 - COS'È IL DISTURBO COMPORTAMENTALE DURANTE IL SONNO REM?).

In generale, l'efficienza del sonno, definita come il rapporto tra la quantità totale di tempo passata dormendo e la quantità di tempo passata a letto, è molto ridotta (Hansotia et al., 1985; Silvestri et al., 1995; Wiegand et al., 1991a) data la riduzione del tempo totale di sonno (Silvestri et al., 1995) e l'aumento di frequenza dei passaggi tra uno stato di vigilanza e l'altro (Goodman et al., 2011).

Le considerazioni fatte sull'analisi quantitativa del sonno (riduzione, frammentazione ecc.) risentono comunque dei fattori legati all'HD, come per esempio la presenza di movimenti coreici



e/o l'assunzione di farmaci (Iwai et al., 1995), che possono interferire con una corretta misurazione dei parametri del ciclo veglia-sonno.

Riassumendo, i pazienti affetti da HD presentano in associazione ai disturbi motori e cognitivi anche una marcata alterazione dei cicli circadiani e del sonno, dovuti all'atrofia e alla degenerazione di strutture importanti per la regolazione del sonno e dei ritmi circadiani, come l'area neo-striatale, il tronco dell'encefalo, l'ipotalamo e il talamo.

#### **2.2.1.4 - LE SINUCLEINOPATIE**

Le sinucleinopatie sono un sottoinsieme di malattie neurodegenerative che condividono lesioni patologiche dovute ad aggregati fibrillari costituiti da una forma insolubile di  $\alpha$ -sinucleina (Marti et al., 2003).

L' $\alpha$ -sinucleina è una proteina di piccole dimensioni facente parte della famiglia delle sinucleine (George, 2002) ed espressa soprattutto a livello del sistema nervoso centrale, in particolare in neocorteccia, ippocampo, talamo e cervelletto (Iwai et al., 1995). Questa proteina si localizza soprattutto a livello dei terminali presinaptici. Per quanto la sua funzione non è ancora del tutto chiara, vi sono evidenze che ne indicano un ruolo fondamentale nel rilascio dei neurotrasmettitori, per la sua stretta interazione con il complesso SNARE (Burre et al., 2010; Darios et al., 2010), e nel mantenimento delle riserve di vescicole sinaptiche (Fortin et al., 2005; Liu et al., 2004; Murphy et al., 2000).

Per molto tempo, l' $\alpha$ -sinucleina è stata ritenuta essere una proteina non ripiegata nella sua forma nativa (*natively unfold protein*) poiché priva di una struttura secondaria (Weinreb et al., 1996). Recenti studi hanno messo in discussione questo modello suggerendo che l' $\alpha$ -sinucleina endogena, in condizioni di non denaturazione, potrebbe formare tetrameri solubili con una struttura ricca in  $\alpha$ -eliche resistenti all'aggregazione (Bartels et al., 2011). Questa conclusione è stata criticata da diversi gruppi di ricerca, che hanno evidenziato un'espressione dell' $\alpha$ -sinucleina prevalentemente in forma di monomero non strutturato tendente all'aggregazione (Burre et al., 2013; Fauvet et al., 2012). È noto, invece, che nel momento in cui essa si unisce alla membrana, in particolare ai fosfolipidi carichi negativamente, assume una conformazione ad  $\alpha$ -elica (Davidson et al., 1998). È stato, tuttavia, dimostrato che modificazioni nell'ambiente cellulare (temperatura e valore di pH) rendono l' $\alpha$ -sinucleina suscettibile a modificazioni strutturali, inducendo un parziale ripiegamento. L'intrinseca flessibilità di questo intermediario ( $\alpha$ -sinucleina parzialmente ripiegata) è essenziale per consentire il suo riarrangiamento, che andrà a costituire il nocciolo della struttura  $\beta$ -sheet delle fibrille che contraddistinguono le

sinucleinopatie (Uversky and Fink, 2004). Infatti, mentre in condizioni fisiologiche l' $\alpha$ -sinucleina è molto solubile, l'assunzione della struttura a  $\beta$ -sheet comporta una maggiore suscettibilità all'auto-aggregazione (oligomerizzazione) con la successiva strutturazione in fibrille filamentose (simil amiloide) insolubili e all'organizzazione in inclusioni intracellulari (Duda et al., 2000), che caratterizzano le sinucleinopatie. Molti fattori, endogeni ed esogeni, possono accelerare il grado di fibrillazione dell' $\alpha$ -sinucleina; in generale, l'accelerazione di questo processo dipende da quelle condizioni che aumentano la concentrazione dell' $\alpha$ -sinucleina parzialmente ripiegata. Tra i vari fattori fibrillogenici si elencano: l'esposizione a particolari pesticidi e metalli, mutazioni al gene per l' $\alpha$ -sinucleina e lo stress ossidativo (Fink, 2006). Mutazioni puntiformi al gene (SNCA), che codifica per l' $\alpha$ -sinucleina, ad esempio, portano all'espressione di una variante di  $\alpha$ -sinucleina che tende molto più all'aggregazione rispetto a quella fisiologica (Duda et al., 2000; Narhi et al., 1999). Recenti studi hanno sottolineato, inoltre, che alla base della progressiva diffusione della forma ricca in  $\beta$ -sheet dell' $\alpha$ -sinucleina vi sia un meccanismo di trasmissione simile a quello della propagazione dei prioni (George et al., 2013).

Le fibrille insolubili di  $\alpha$ -sinucleina costituiscono il principale componente dei corpi di Lewy (*Lewy bodies*, LBs) e dei neuriti distrofici (*Distrophic neurites*, DNs) (Irizarry et al., 1998; Spillantini et al., 1997) nonché delle inclusioni citoplasmatiche gliali (*Glial cytoplasmatic inclusions*, GCIs) e neuronali (Tu et al., 1998). Questi aggregati fanno parte dello spettro neuropatologico di tutte le sinucleinopatie, tra cui malattia di Parkinson (PD), demenza a corpi di Lewy (DLB) e l'atrofia multi-sistemica (MSA).

#### **2.2.1.4.1 - LA MALATTIA DI PARKINSON**

La malattia di Parkinson (PD) è la seconda patologia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer. La sua prevalenza negli stati industrializzati è di circa lo 0,3% della popolazione, ma incrementa con l'avanzare dell'età: da circa l'1% della popolazione in persone sopra i 60 anni a circa il 4% della popolazione in persone sopra gli 85 anni (de Lau and Breteler, 2006). Si può presentare sia in forma sporadica che ereditaria, entrambe sono caratterizzate dalla presenza di corpi di Lewy e neuriti distrofici, che portano a una diffusa neurodegenerazione (Duda et al., 2000).

La malattia di Parkinson, patologia a evoluzione progressiva e andamento ingravescente, presenta un quadro clinico complesso che comprende sintomi di tipo motori accanto a disturbi non motori e psichici. La malattia compare generalmente in modo insidioso, talora con esordio non motorio, e solo successivamente si manifesta in maniera tipica. Il classico quadro clinico comprende una triade sintomatologica caratterizzata da tremore, rigidità e bradicinesia. Il tremore è solitamente il sintomo di esordio e si manifesta prevalentemente a riposo. Nelle fasi iniziali, il tremore è presente solo alle mani ma poi si estende anche alle estremità inferiori. La

rigidità consiste in un aumento del tono muscolare di tutti i gruppi muscolari scheletrici. La bradicinesia è caratterizzata da un rallentamento motorio con un ritardo a iniziare o a modificare un dato movimento. Questa evolve, in stadi più avanzati, in acinesia, cioè nell'impossibilità o marcato ritardo nel compiere un movimento (Ricchieri and Battistin, 2010). Il quadro clinico descritto tende col tempo a complicarsi con la comparsa di una marcata instabilità posturale e riduzione dei riflessi posturali con tendenza alle cadute (Marti et al., 2003). Altri sintomi motori tipici sono *facies* amimica, micrografia e difficoltà nei movimenti motori fini (Boeve, 2013). Oltre alla sintomatologia motoria i pazienti con PD presentano anche sintomi depressivi, accompagnati da ansia, apatia e allucinazioni visive (Aarsland et al., 1999). Molto frequenti sono anche deficit cognitivi, tra cui difficoltà attentive e di concentrazione, disturbi visuo-spaziali, compromissione delle funzioni esecutive, dell'apprendimento e della memoria (Boeve, 2013; Marti et al., 2003).

A livello anatomo-patologico la presenza di LBs e DNs comporta una progressiva perdita della funzionalità del sistema dopaminergico nigro-striatale e di altri collegamenti neuronali, a causa della degenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNc) a livello mesencefalico (Jellinger, 2003). La degenerazione della via nigro-striatale ha come conseguenza la perdita dell'attività di controllo esercitata dai nuclei della base sull'attività motoria, con la comparsa della classica sintomatologia. La dopamina esercita un ruolo importante anche in alcune funzioni cognitive. La perdita di questo neuromodulatore contribuisce, quindi, alla comparsa dei deficit cognitivi, rilevabili soprattutto in fasi avanzate della malattia. Inoltre, essendo il PD un disordine multi-sistemico sono coinvolti anche altri sistemi oltre a quello dopaminergico; ad esempio, si trova una compromissione del sistema noradrenergico (LC), serotoninergico (DR) e del sistema colinergico per un coinvolgimento dei nuclei basali di Meynert. La perdita di funzionalità neuronale è stata osservata anche in alcuni nuclei del talamo, alcune strutture del sistema limbico (amigdala) e tronco encefaliche, come il complesso locus coeruleus-subcoeruleus (Del et al., 2002). La diffusa degenerazione neuronale porta anche a sintomi di tipo autonomico come ipotensione ortostatica, costipazione, impotenza e incontinenza urinaria (Marti et al., 2003).

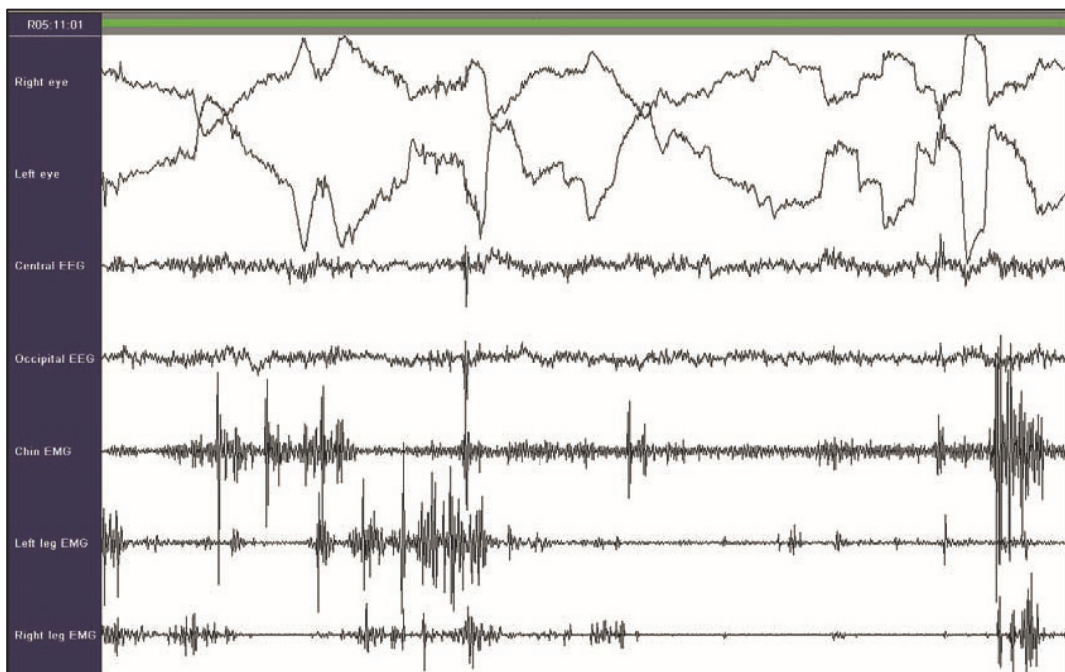
In circa il 70 % dei pazienti con PD, a causa della perdita di alcuni sistemi neurotrasmettitoriali importanti, sono presenti disturbi a carico del ciclo veglia-sonno (Kumar et al., 2002; Lees et al., 1988; Tandberg et al., 1998). I disturbi del sonno più frequenti sono insonnia, ipersonnia accompagnata da un'eccessiva sonnolenza diurna (EDS, *excessive diurnal somnolence*) con veri e propri attacchi di sonno (simili a un episodio narcolettico) e alta frequenza d'incubi notturni (Iranzo, 2011; Petit et al., 2004). L'insonnia in questi pazienti si manifesta come difficoltà di addormentamento e frequenti risvegli notturni per la difficoltà di mantenimento del sonno. Questa può essere legata a disturbi motori a letto, fenomeni distonici

e a crampi muscolari dolorosi degli arti inferiori. Questo quadro è aggravato dalla presenza della sindrome delle gambe senza riposo (*restless leg syndrome*, RLS), una condizione caratterizzata da una necessità impellente di muovere gli arti inferiori in associazione con parestesie, necessità di alzarsi e camminare, che si aggrava durante i periodi di riposo, soprattutto durante la notte (Petit et al., 2004). Inoltre, i movimenti periodici degli arti inferiori (*Periodic Leg Movements*, PLMs) disturbano il sonno notturno e determinano risvegli precoci, come pure i disturbi urinari, costituiti dalla nicturia, dalla pollachiuria e dall'urgenza minzionale. Molto frequenti sono anche le parasonnie rappresentate da *pavor* notturno con terrore, sonnambulismo, sonniloquio con frequenti vocalizzazioni. Particolarmente disturbanti possono essere i fenomeni allucinatori visivi, caratteristici dell'addormentamento (allucinazioni ipnagogiche) o della fase del risveglio (allucinazioni ipnopompiche) (Ricchieri and Battistin, 2010). Studi polisonnografici hanno evidenziato alterazioni dell'architettura ipnica, nei termini di: una maggiore frammentazione del sonno, un aumento dello stadio N1 e una riduzione del sonno REM rispetto a soggetti sani (Comella et al., 1993; Emser et al., 1988; Kales et al., 1971). Frequentemente nei pazienti PD si riporta durante la veglia un rallentamento dell'attività EEG a livello delle regioni frontali, temporali, parietali e occipitali (Gagnon et al., 2004; Soikkeli et al., 1991). Inoltre, circa il 46% dei pazienti con PD è affetto dal disturbo del comportamento durante il sonno REM (Sixel-Doring et al., 2011), una condizione patologica molto diffusa tra le sinucleinopatie, tanto che nel caso della demenza a corpi di Lewy, la presenza di RBD costituisce un criterio diagnostico (McKeith et al., 2005). In breve, l'RBD è caratterizzato da improvvisi e talvolta violenti movimenti con interruzione dell'atonìa muscolare, che contraddistingue il sonno REM.

## 2.3 - UN PUNTO DI CONTATTO: IL DISTURBO COMPORTAMENTALE DURANTE IL SONNO REM

### 2.3.1 - COS'E' IL DISTURBO COMPORTAMENTALE DURANTE IL SONNO REM?

Il disturbo comportamentale durante il sonno REM, in breve RBD (*REM sleep behaviour disorder*), è la parasonnia associata al sonno REM di più comune riscontro. L'RBD è caratterizzato da una perdita della normale atonia dei muscoli scheletrici durante il sonno REM in associazione a sogni vividi (fig. 2.23). La perdita dell'atonia della muscolatura volontaria si manifesta con la comparsa di comportamenti a volte semplici, a volte elaborati, che si verificano durante il sonno REM (Boeve, 2010b). I pazienti affetti da questa patologia si presentano tipicamente con un'anamnesi di sogni vividi e di movimenti eccessivi durante il sonno, questi ultimi talvolta così violenti che possono provocare lesioni al paziente stesso o alla persona che



**FIGURA 2.23.** Il polisonnogramma (20 secondi) di un paziente con RBD mostra la presenza di sonno REM senza atonia. I tracciati, dall'alto verso il basso, si riferiscono rispettivamente a: movimenti oculari (occhio destro in alto, occhio sinistro più in basso); EEG corticale (centrale più in alto e frontale in basso); elettromiogramma (in ordine di: mento, gamba sinistra, e gamba destra). I 20 secondi mostrano un'epoca di sonno REM, dovuta alla presenza di movimenti oculari rapidi e un EEG corticale desincronizzato. I tracciati dell'EMG rilevano un alto grado di attività motoria durante questa fase. [Adattato da *Gagnon et al., 2006*].

dorme con lui. Il paziente, per esempio, può sognare di difendere il compagno/a da alcuni aggressori, ma, di fatto, è lui stesso ad aggredirlo/a mentre sta sognando. Al risveglio il paziente è del tutto lucido, anche se costernato per quanto accaduto ed è in grado di raccontare il sogno al quale il suo comportamento si era evidentemente uniformato. E' importante sottolineare che questo atteggiamento violento si verifica esclusivamente durante il sonno, in quanto in veglia non si evidenzia alcun deficit comportamentale.

Un disturbo simile all'RBD fu identificato per la prima volta nel 1965 in esperimenti di sezione tronco-encefaliche in animali (Jouvet and Delorme, 1965), ma venne riconosciuto formalmente nell'uomo solo dopo 20 anni (Schenck et al., 1986).

L'RBD ha una prevalenza dello 0,5% della popolazione generale e i primi sintomi sono spesso rilevati tra i 40 e 70 anni (Boeve, 2010b). Si riporta che l'RBD sia più diffuso negli uomini che nelle donne (Wing et al., 2008) e, in alcuni casi, ci può essere familiarità. E' stato supposto che la predominanza maschile non sia legata a una differenza dei meccanismi che controllano il sonno REM ma a una diversità, di origine probabilmente ormonale, del contenuto dei sogni degli uomini rispetto a quelli delle donne (Mahowald and Schenck, 2011).

Dato che l'RBD occorre durante la fase di sonno REM, questo tipicamente appare circa dopo 90 minuti dall'addormentamento. La frequenza degli episodi è variabile, passando da un evento ogni 10 - 15 giorni a più attacchi (fino a quattro) per notte e per molte notti di seguito. La loro durata, invece, varia da 2 a 10 minuti (Ferini-Strambi and Zucconi, 2000).

Esistono due forme diverse di RBD: i) l'*RBD idiopatico (iRBD)*, ovvero non associato ad alcun ovvio segno o sintomo di altri disturbi neurologici; ii) l'*RBD sintomatico o secondario* (descritto più avanti), quando questa parasonnia è associata ad altri disturbi neurologici, come la narcolessia o malattie neurodegenerative, oppure ad assunzione di farmaci o alcol. Entrambe le forme sono caratterizzate dallo stesso quadro clinico e si manifestano, solitamente, in forma cronica (Boeve, 2010b; Ferini-Strambi and Zucconi, 2000).

Gli aspetti clinici primari dell'RBD possono essere riassunti in tre categorie: i) *Vocalizzazioni anomale*, come grida, imprecazioni, urla, pianto; ii) *Comportamenti motori anomali*, solitamente un attacco esordisce con spasmi motori e movimenti brevi, per poi sfociare in comportamenti motori più complessi, come difendersi dagli attacchi di qualcuno, prendere a pugni, calciare, balzare dal letto ecc. Durante questi episodi è compromessa l'incolumità non solo del soggetto affetto ma anche del compagno/a di letto, entrambi possono riportare lesioni come: ecchimosi, lacerazioni e fratture; iii) *Alterato resoconto onirico*, gran parte dei pazienti riporta sogni vividi, il cui contenuto prevede principalmente un ruolo difensivo o di fuga nei confronti di attacchi da parte di aggressori o di animali (Schenck and Mahowald, 2002). In poche parole, durante il sonno REM, i pazienti affetti da RBD è come se agissero secondo il proprio contenuto onirico

(*dream enactment behaviour*, DEB), che solitamente è caratterizzato da scene aggressive e violente.

In accordo con la seconda edizione della Classificazione Internazionale dei Disturbi del Sonno (ICDS-2) (American Academy of Sleep Medicine, 2005), l'RBD idiopatico (iRBD) può essere diagnosticato quando vi è:

- A. Presenza di sonno REM senza atonia (RSWA) attestata mediante polisonnografia (PSG)
- B. Presenza di almeno uno dei seguenti:
  - i. Storia di comportamenti correlati al sonno nocivi, potenzialmente nocivi o distruttivi (ad es., il DEB) e/o
  - ii. Comportamento anomalo del sonno REM documentato mediante un monitoraggio polisonnografico;
- C. Assenza di attività epilettiforme durante il sonno REM senza RBD, che può essere chiaramente distinto da ogni disordine concorrente nel sonno REM relato all'attacco epilettico;
- D. Il disturbo del sonno non è altrimenti spiegato da altri disturbi del sonno, da altri disturbi medici o neurologici, dall'uso di farmaci o sostanze.

Per fare una corretta diagnosi di RBD è necessario associare gli aspetti clinici a quelli polisonnografici. Infatti, benché l'anamnesi risulti spesso suggestiva, una diagnosi certa si può ottenere solo con la polisonnografia, al fine di rivelare l'assenza di atonia muscolare ed escludere la presenza di altre condizioni patologiche come: crisi epilettiche notturne del lobo temporale, attacchi di panico notturni, apnee ostruttive del sonno e parasonnie del sonno NREM (*pavor nocturnus*, sonnambulismo) (Iranzo et al., 2005).

L'architettura del sonno è generalmente normale nei pazienti con RBD, tuttavia, si può riscontrare una percentuale di sonno a onde lente e di sonno REM più elevata rispetto a quella di soggetti controllo. Il significato di quest'aumento resta, però, ancora sconosciuto. Alcuni autori hanno suggerito che ciò potrebbe giustificare il perché questi pazienti generalmente riportano di essere riposati dopo il risveglio e non mostrano ipersonnolenza nemmeno con misure oggettive (come il *Multiple Sleep Latency Test*, MSLT). Il sonno a onde lente, infatti, è considerato essere prioritario per la funzione ristorativa del sonno (Ferini-Strambi and Zucconi, 2000). Un'altra anomalia che può essere rilevata, anche se non in maniera costante, è l'aumento della densità dei movimenti oculari rapidi, calcolata in base al numero di movimenti oculari rapidi per ogni minuto di sonno REM.

I pazienti con RBD presentano, inoltre, eccessivi e improvvisi movimenti fascici degli arti inferiori e più raramente di quelli superiori che però tipicamente non sono accompagnati da un aumento della frequenza cardiaca. Questo probabilmente rappresenta un "blocco" delle

modificazioni vegetative caratteristiche del sonno REM. In uno studio Ferini-Strambi e collaboratori hanno valutato l'attività autonoma durante la veglia e il sonno riportando che solo il 36% dei pazienti con RBD considerati aveva una normale risposta ai test durante la veglia; durante il sonno la variabilità della frequenza cardiaca (indice dell'attività vegetativa) era ridotta in tutti i pazienti con RBD, rispetto a soggetti di controllo. Questo indica che l'RBD si caratterizza anche per una compromissione del sistema vegetativo (Ferini-Strambi et al., 1996).

I pazienti possono avere, inoltre, altri disturbi motori del sonno: attraverso una registrazione EMG dei muscoli tibiali anteriori è emerso, infatti, che molti soggetti con RBD presentano movimenti periodici degli arti, eccessive mioclonie e altri movimenti periodici associati alla fase NREM, a dimostrazione del fatto che la disfunzione motoria non riguarda il solo sonno REM.

La patofisiologia del RBD non è ancora molto chiara. Mediante studi volti a comprendere il meccanismo alla base dell'atonìa muscolare durante il sonno REM (descritto in precedenza, vd. sez. 2.1.4.3.4 IL SONNO REM), si è fatta luce sulla patofisiologia del RBD. Studi sperimentali su sezioni tronco-encefaliche di animali da laboratorio (Boissard et al., 2002; Boissard et al., 2003; Lu et al., 2006) e l'osservazione di pazienti con lesioni di diversa eziologia a livello del ponte e del tegmento (Kimura et al., 2000; Plazzi and Montagna, 2002; Provini et al., 2004; Zambelis et al., 2002), hanno rilevato che una delle strutture maggiormente coinvolte nell'RBD potrebbe essere il nucleo sub-latero dorsale (SLD). Questo nucleo, nell'uomo definito nucleo del peri-locus coeruleus (peri-LC), ha un ruolo cruciale nell'atonìa associata al sonno REM. Lu e collaboratori, infatti, hanno dimostrato che lesioni citotossiche dell'SLD e delle regioni limitrofe portano a episodi di sonno REM senza atonia con movimenti complessi, quali la locomozione (Lu et al., 2006). Questo e altri studi (Clement et al., 2011; Lu et al., 2006) hanno evidenziato, inoltre, che le proiezioni dell'SLD discendenti al midollo spinale utilizzano come mediatore il glutammato. Da questi e altri studi si è intuito che l'SLD mediante connessioni glutammatergiche agisce sugli interneuroni inibitori (GABAergici) del corno ventrale del midollo spinale, i quali a loro volta inibiscono i motoneuroni. Le proiezioni glutammatergiche discendenti dell'SLD provocano, tuttavia, un'attivazione anche dei neuroni glicinerfici della formazione reticolare bulbare, tra cui il nucleo bulbare ventrale gigantocellulare (GiV), noto anche come nucleo della formazione reticolare bulbare magnocellulare (MCRF). Gli output GABAergici/glicinerfici di questo nucleo inibiscono i motoneuroni alfa del midollo spinale, causando atonia muscolare durante il sonno REM. L'SLD, quindi, mediante due vie, una diretta e un'indiretta, agisce sui motoneuroni spinali inibendoli e portando all'atonìa muscolare tipica del REM. La compromissione di questo nucleo, quindi la mancata inibizione dei motoneuroni, potrebbe generare il tipico "agire il proprio sogno", riscontrato nei pazienti con RBD. Riguardo all'atonìa muscolare nel sonno REM, tuttavia, molti neuroni monoaminergici e oressinerfici discendono al midollo spinale, sia direttamente che indirettamente, tramite il VIPAG e l'SLD.



Questo indica che l'attività dei motoneuroni e, quindi, il tono muscolare sono influenzati anche da altri tipi di connessione (Kodama et al., 2003; Lai et al., 2001; Mileykovskiy et al., 2002; Peever, 2011). Da un punto di vista clinico, la compromissione di questo tipo di connessioni può spiegare la presenza di RBD in caso di assunzione di antidepressivi o di RBD associato a narcolessia (Dauvilliers et al., 2007; Gagnon et al., 2006c).

La terapia dell'RBD prevede innanzitutto l'utilizzo di ausili per minimizzare ed evitare le ferite sia al paziente che al compagno/a di letto, utilizzando per esempio cuscini e/o barriere imbottite nel letto del paziente (Boeve, 2010b). Farmacologicamente si è osservata una risposta positiva all'uso di clonazepam (0,5-2 mg/notte), che agisce sopprimendo i comportamenti anomali e riducendo l'attività muscolare fasica durante il REM, tuttavia non ristabilisce l'atonia muscolare tipica del sonno REM (Lapierre and Montplaisir, 1992).

### **2.3.2 - RBD E MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Oltre alla forma idiopatica, l'RBD si presenta frequentemente in associazione con molte categorie eziologiche di disturbi neurologici, tra cui: lesioni vascolari, tumori, malattie demielinizzanti, disordini autoimmuni/infiammatori e malattie neurodegenerative; oppure può essere indotto, in forma acuta, dall'utilizzo di alcuni farmaci o sostanze psicotrope, come antidepressivi triciclici, inibitori del *re-uptake* della serotonina o dell'adrenalina, e abuso di alcool (Gagnon et al., 2006b; Winkelman and James, 2004). Questa forma di RBD viene definita RBD sintomatico o secondario (Boeve, 2010a).

La presenza di RBD in corso di patologie neurodegenerative è ormai un dato consolidato e recentemente molto studiato (Boeve et al., 2001; Boeve et al., 2007; Boeve, 2010b; Boeve, 2013; Gagnon et al., 2004; Gagnon et al., 2006b; Iranzo et al., 2005; McCarter et al., 2012; Postuma et al., 2012; Postuma et al., 2013; Schenck and Mahowald, 2002). In particolare, questo tipo di parasonnia si presenta frequentemente in associazione con le sinucleinopatie. Come ricordato sopra, circa il 46 % dei pazienti con malattia di Parkinson sviluppa RBD, la frequenza di comparsa è simile (50 - 80 % dei pazienti) anche nella demenza con corpi di Lewy (DLB), mentre raggiunge l'80 - 95 % nell'atrofia multi-sistemica (McCarter et al., 2012).

La relazione tra RBD e malattie neurodegenerative è molto complessa. Recentemente la ricerca clinica si è occupata di questo complesso rapporto. Lo studio del RBD nelle sinucleinopatie ha rilevato che la forma idiopatica di questo disturbo può anticipare il completo sviluppo della malattia. In altre parole, l'iRBD potrebbe fungere da marcatore prodromico di un processo neurodegenerativo. Numerosi dati retrospettivi e prospettici hanno sottolineato l'importanza dell'iRBD: una parte rilevante di pazienti con iRBD presenta segni e sintomi che

possono essere relati a una manifestazione precoce dell'insorgenza di una patologia neurodegenerativa. I pazienti con iRBD presentano, infatti, una forma più attenuata di alcuni segni clinici tipici di patologie neurodegenerative. Tra questi vanno annoverati: alterazioni nella percezione olfattiva (anosmia/disosmia) (Stiasny-Kolster et al., 2005); rallentamento dell'attività EEG durante la veglia (Fantini et al., 2003; Massicotte-Marquez et al., 2005); deficit a livello cognitivo/neuropsicologico, soprattutto nelle abilità visuo-costruttive e nell'apprendimento visuo-spaziale (Ferini-Strambi et al., 2004), ma anche basse prestazioni in test di attenzione, apprendimento e funzioni esecutive (Massicotte-Marquez et al., 2008); alterazioni del sistema dopaminergico rilevate mediante SPECT (tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone) e PET (tomografia ad emissione di positroni) (Albin et al., 2000; Eisensehr et al., 2000; Eisensehr et al., 2003; Mazza et al., 2006); modificazioni nella discriminazione dei colori (Postuma and Montplaisir, 2006); alterazioni nella regolazione simpatica dell'attività cardiaca (Ferini-Strambi et al., 1996); lievi modificazioni al sistema motorio e vegetativo (Postuma and Montplaisir, 2006). L'insieme di tutte queste caratteristiche cliniche viene a costituire un quadro sintomatologico molto simile a quello riscontrabile nelle fasi precoci di malattie neurodegenerative e in particolare delle sinucleinopatie. Per questo motivo si è ipotizzato che la presenza d'iRBD possa essere un fattore predittivo dello sviluppo di patologie neurodegenerative. Già in uno studio pionieristico del 1996 Schenck e collaboratori seguendo pazienti affetti da iRBD scoprirono che il 38 % di questi sviluppò un parkinsonismo nei 5 anni successivi all'insorgenza della parasonnia del sonno REM (Schenck et al., 1996). Successivi studi di coorte hanno dimostrato che il rischio dell'insorgenza di una patologia neurodegenerativa in pazienti con iRBD aumentava col passare del tempo di *follow-up*, arrivando al 65 % dei casi di iRBD in 10 anni di *follow-up* (Postuma et al., 2012). In successivi studi si sono trovate delle differenze nelle percentuali di rischio dello sviluppo di una patologia neurodegenerativa. Tuttavia, in una delle ultime *review* sull'argomento si attesta che il rischio di sviluppare un disordine cognitivo, un parkinsonismo o entrambi, nei 12 - 14 anni dopo l'insorgenza dell'iRBD, è del 50-73% (Boeve, 2013). I dati sopra riportati rilevano che la presenza d'iRBD in molti casi anticipa lo sviluppo di patologie neurodegenerative.

In generale, si riporta che circa l'81 % dei pazienti con iRBD evolve spesso in patologie quali: malattia di Parkinson (PD), demenza con corpi di Lewy (DLB), atrofia multi-sistemica (MSA) ma anche *Mild Cognitive Impairment* (MCI, deterioramento cognitivo lieve), una situazione che si trova a metà strada tra l'invecchiamento e la demenza (Boeve, 2013). La grande percentuale di conversione tardiva in una patologia neurodegenerativa, ha fatto recentemente proporre di sostituire il termine RBD idiopatico con RBD criptogenico, questo perché se il paziente con iRBD viene semplicemente seguito per un lungo periodo, i caratteri distintivi della malattia neurodegenerativa alla base si manifesteranno (Mahowald et al., 2010).

L'RBD è stato sempre designato come un mero disturbo del sonno. Recentemente alcuni dati hanno, tuttavia, sottolineato la sua stretta associazione con patologie neurodegenerative (soprattutto con le sinucleinopatie). La scoperta di segni attenuati di neurodegenerazione in pazienti con iRBD e il loro sviluppo in una malattia neurodegenerativa conclamata, ha fatto ipotizzare una certa predittività di questa parasonnia per il parkinsonismo o per la demenza. Il trattamento di patologie neurodegenerative prevede un'azione quanto più repentina sul processo di deterioramento neuronale, l'identificazione di pazienti con iRBD e il loro *follow up* regolare, potrebbe aumentare l'efficacia di terapie neuroprotettive per molte delle patologie neurodegenerative.



## **2.4 - PREMESSA ALLA FASE SPERIMENTALE**

### **2.4.1 - L'UTILIZZO DI MODELLI ANIMALI NELLA RICERCA**

L'utilizzo di modelli animali nello studio di patologie umane di varia natura ha sempre rappresentato un utile strumento d'indagine per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici e l'individuazione di marcatori precoci. L'identificazione dei processi fisiologici in questi modelli ha consentito di ampliare le conoscenze disponibili sulle patologie indagate, nonché la scoperta di nuove tecniche e molecole utili per il trattamento di queste condizioni.

Tra i modelli animali, i più utilizzati nella ricerca biomedica sono sicuramente i modelli murini. La scelta del topo come modello animale deriva dalla similarità tra il suo genoma e quello umano. I topi condividono, infatti, circa il 98 % del loro DNA con il nostro. Il largo impiego del topo nella ricerca scientifica ha fatto sviluppare, nel corso degli anni, una grande varietà di sofisticati strumenti molecolari e genetici. Allo stesso tempo, la facilità di allevamento e la rapidità dei cicli riproduttivi hanno fatto aumentare la preferenza per questa specie. L'impegno di topi nella ricerca scientifica ha permesso lo sviluppo di molte manipolazioni genetiche, che consentono una migliore comprensione dei meccanismi fisiologici e dei circuiti cerebrali alla base di una patologia. Grazie all'ingegneria genetica attualmente esiste una vasta gamma di modelli murini che ricapitolano molte delle malattie neurodegenerative umane (AD, malattia di Parkinson, HD, CJD).

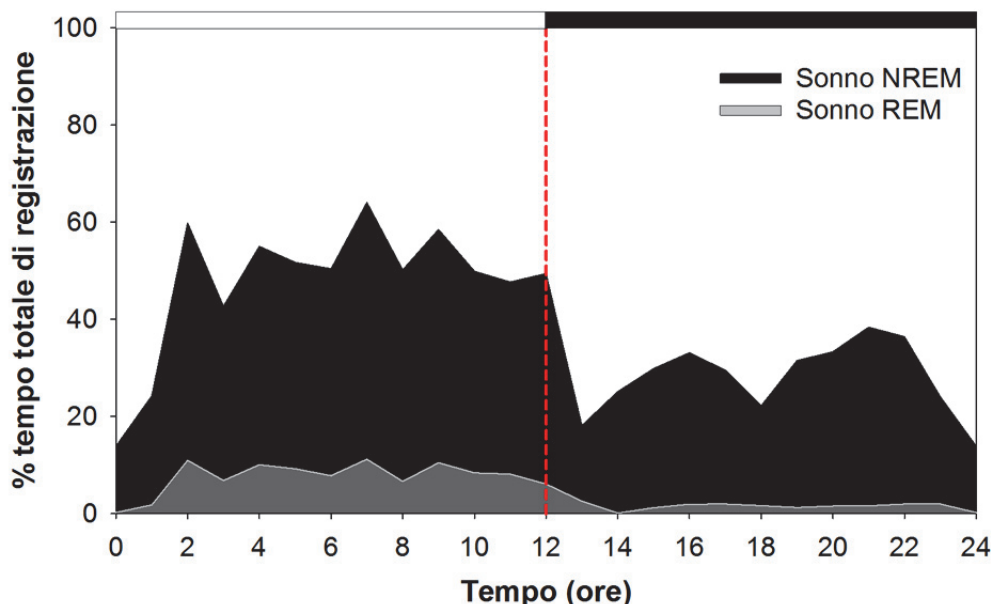
Nonostante il grande successo riscosso dall'utilizzo dei modelli animali nella medicina traslazionale, è, tuttavia, necessario considerare che vi sono delle differenze inter-specie (topo-uomo) ineludibili. Molto spesso questi modelli animali non riescono a ricapitolare in maniera fedele tutta la sintomatologia e tutte le manifestazioni patologiche presenti nell'uomo (aspetti anatomo-patologici, elettroencefalografici ecc.). Per questo motivo, i risultati derivanti dallo studio di modelli animali devono essere interpretati alla luce delle differenze che intercorrono tra uomo e animale (Paterson et al., 2011).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare il ciclo veglia-sonno in modelli murini di patologie neurodegenerative. Prima di procedere nella trattazione, è doveroso, quindi, accennare al ciclo veglia-sonno nei roditori ed evidenziarne le differenze con quello umano, al fine di interpretare in maniera più completa i risultati di questo studio.

## 2.4.2 - IL SONNO NEI RODITORI

In molti primati, tra cui l'uomo, il sonno è definito monofasico, cioè si svolge in un'unica fase strutturata e consolidata durante le ore notturne. Questo significa che a una singola fase di veglia ininterrotta, si sostituisce un'unica fase di sonno. Tuttavia, sotto certe condizioni, si può osservare, nell'uomo e nei primati, un certo schema bifasico (a due fasi), com'è il caso dei sonnellini diurni (*nap*), che condividono con il sonno le stesse caratteristiche (Tobler, 1995). Al contrario dei primati, il sonno dei roditori è definito polifasico. In altre parole, durante tutte le 24 ore, questi animali presentano un'alternanza di fasi di veglia e di sonno, che si avvicendano molto velocemente. Il rapido e frequente passaggio da uno stato di vigilanza all'altro comporta, quindi, una maggiore frammentazione del sonno nei roditori, rispetto ai primati. Pur avendo un sonno di tipo polifasico, i roditori mostrano, comunque, un periodo di maggior attività e una fase in cui è prevalente il riposo. Nei topi, ma anche nei ratti, il periodo con maggiore attività coincide con la fase di buio, per questo sono definiti animali notturni. Viceversa, durante la fase di luce, presentano un'attività molto più ridotta. Questo indica che anche nei roditori il ciclo veglia-sonno ha una peculiare circadianità: durante le fasi di luce, la percentuale di sonno è molto elevata; mentre durante il periodo di buio questa diminuisce, a favore di un aumento della veglia.

La figura 2.24 rappresenta le variazioni giornaliere medie delle fasi di sonno di 8 topi *wild type* in età adulta, registrati in condizioni normali di laboratorio (utilizzati nell'esperimento n.1).

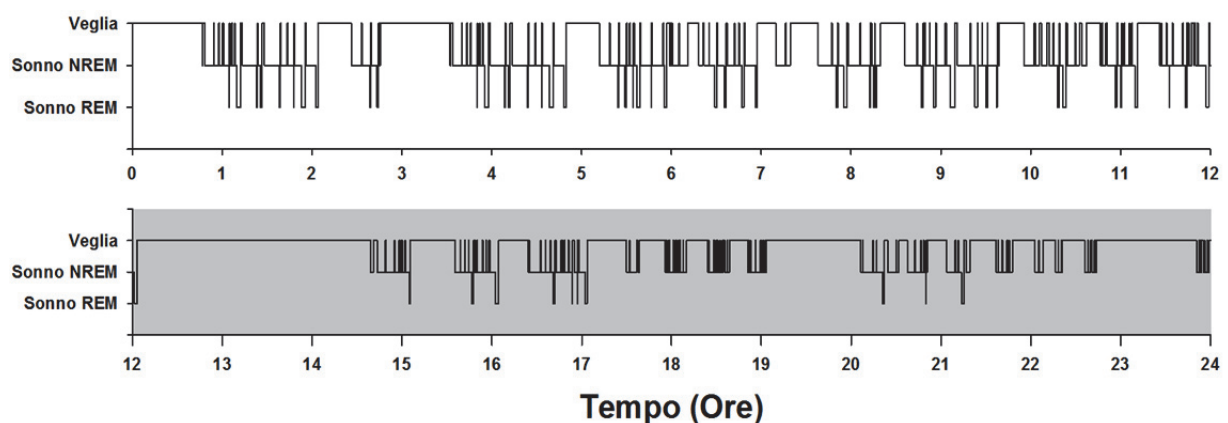


**FIGURA 2.24.** Rappresentazione grafica delle percentuali medie di sonno NREM (in *nero*) e sonno REM (in *grigio*) durante 24 ore di registrazione poligrafica, in condizioni normali di laboratorio. In ordinata sono rappresentate le percentuali di tempo medie spese nei due stati di vigilanza sul tempo totale di registrazione; in ascissa sono indicate le ore di registrazione. Per differenza, la regione bianca del grafico rappresenta la fase di veglia. In alto, le barre bianca e nera indicano rispettivamente il periodo di luce e quello di buio. La linea rossa tratteggiata segna lo spegnimento delle luci. I dati sono stati ottenuti da topi *wild type* C57BL/6J utilizzati nell'esperimento n.1 .

Si può osservare che durante la fase di luce (0 - 12 ore) le percentuali di sonno NREM e REM siano più alte rispetto alla fase di buio (12 - 24 ore): in luce il sonno NREM è in media del 50 %, mentre il sonno REM dell'8 % del tempo totale di registrazione; nel periodo di buio, invece, si osserva una notevole riduzione di queste percentuali arrivando al 30 % per il sonno NREM e all'1 % per il sonno REM. In generale, si passa quindi da una percentuale di sonno totale del 58% nella fase di luce, a una del 31 % in buio. Lo stesso andamento, ma in maniera più accentuata, si osserva anche nel ratto in cui la percentuale di sonno totale è dell'80 %, nelle ore diurne, e del 20 % nelle ore notturne (Tobler, 1995).

Le differenze tra uomo e roditori riguardano anche la durata del ciclo ultradiano NREM-REM; mentre nell'uomo questo ha una durata di circa 90 - 110 minuti, nel ratto è molto minore, circa 10 - 12 minuti (Tobler, 1995); nel topo la durata è ancora più breve, nell'ordine di qualche minuto (fig. 2.25).

Le differenze sopra elencate sono dovute al fatto che il sonno, essendo un comportamento, si modifica secondo le necessità biologiche di ciascuna specie. In letteratura è noto che la presenza di un sonno di tipo polifasico, piuttosto che monofasico, sia dovuto principalmente all'indice di massa corporea. Infatti, il sonno polifasico è tipico di quelle specie che hanno una piccola massa corporea. Le specie di taglia più piccola (per esempio i roditori), a causa del loro alto indice metabolico e delle loro limitate riserve di grasso, sono costrette a foraggiare più frequentemente rispetto agli animali di grande taglia. Il vincolo energetico e di foraggiamento delle specie con basso indice di massa corporea, come nel caso dei roditori, può spiegare la presenza di un sonno di tipo polifasico (Capellini et al., 2008), caratterizzato da un rapido alternarsi di molti episodi di sonno e veglia, ma di brevissima durata ciascuno.



**FIGURA 2.25.** Ipnogramma di un topo wild type C57BL/6J durante le 24 ore. In ascissa sono presenti le ore di registrazione; in ordinata gli stati di vigilanza. Da notare la brevità degli episodi di sonno NREM e REM e la frequenza con cui si alternano. Lo sfondo *grigio* indica le ore di buio del ciclo luce/oscurità.

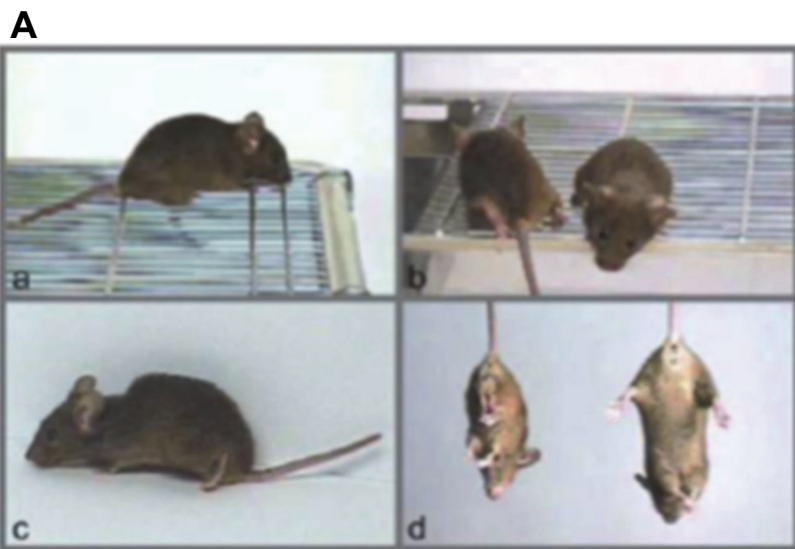
## 2.4.3 - I MODELLI MURINI

Di seguito sono descritti i tre modelli murini utilizzati in questo studio, evidenziandone la generazione e le loro caratteristiche patologiche.

### 2.4.3.1 - IL MODELLO MURINO DI MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB FAMILIARE

Il gruppo ricerca di Roberto Chiesa, presso i laboratori dell'Istituto di Ricerca Farmacologica Mario Negri (IRFMN), nel 2008 ha messo a punto il primo modello murino di malattia di Creutzfeldt Jakob di tipo familiare (Dossena et al., 2008). Questo modello esprime l'omologo murino (MoPrP D177N/V128)

della mutazione umana D178N/V129, legata al fenotipo CJD<sup>178</sup>. Il modello è stato ottenuto mediante la micro iniezione del transgene MoPrP D177N/V128 nei pronuclei di ovuli fecondati derivanti da topi parentali C57BL/6J X CBA/J. Nel transgene, inoltre, è stato introdotto l'epitopo per l'anticorpo 3F4, in modo da poter distinguere la PrP endogena da quella transgenica senza alterarne le caratteristiche biochimiche. La micro-iniezione ha permesso la generazione di cinque fondatori che sono stati incrociati con topi knock-out per la PrP in modo da ottenere una progenie che esprimesse la sola proteina mutante. In questo modo



#### B

#### Malattia clinica in topi CJD

	Emizigoti (CJD <sup>+/-</sup> )		Omozigoti (CJD <sup>+/+</sup> )	
Età d'insorgenza	425 ± 15	(67)	144 ± 7	(20)
Età di morte	704 ± 26	(34)	284 ± 11	(19)
Durata malattia	293 ± 28	(31)	130 ± 13	(13)

**FIGURA 2.26. A.** Fenotipo motorio di topi CJD<sup>+/+</sup>. Da sinistra verso destra in senso orario: (a) incapacità di un topo CJD<sup>+/+</sup> di 201 giorni di camminare correttamente sulla griglia; (b) postura atassica con estensione delle zampe posteriori e postura sbilanciata di due topi CJD<sup>+/+</sup> di 201 e 223 giorni; (c) andatura anomala e chiara cifosi in un topo di 671 giorni; (d) sospeso per la coda, un topo CJD<sup>+/+</sup> di 118 giorni (a sinistra) mostra una postura inarcata e *foot-clasping* degli arti inferiori, cosa che non si osserva in un topo non-CJD fratello (a destra). **B.** Decorso clinico della malattia in topi CJD emizigoti e omozigoti per il transgene. È indicata la media del numero dei giorni ± l'errore standard dalla media. Il numero di soggetti per ogni gruppo è dato tra parentesi. [Adattato da Dossena et al. 2008].

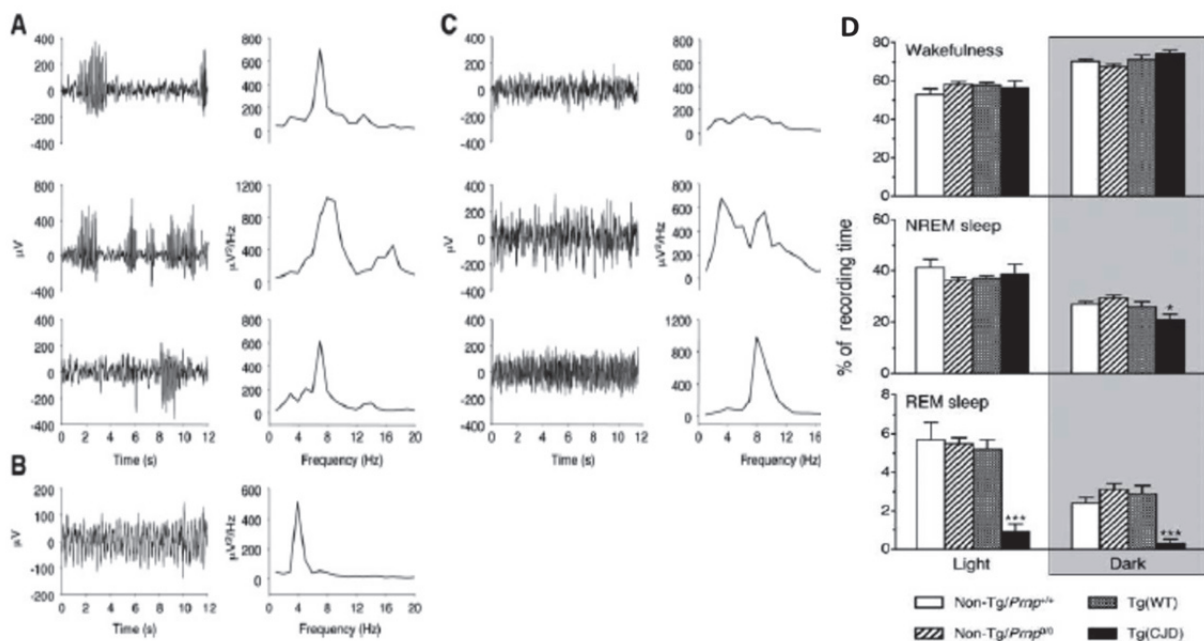


sono state ottenute linee diverse di topi esprimenti la proteina transgenica a livelli compresi tra 0,03 e 8 volte quello della proteina fisiologica.

Nei topi transgenici la quantità di PrP non glicosilata risultava minore rispetto ai topi esprimenti la proteina fisiologica; la PrP mutata era inoltre parzialmente resistente alla proteinasi K e circa il 50% risultava insolubile, così come si osserva nei pazienti.

Tutti i topi transgenici CJD analizzati hanno sviluppato una malattia neurologica progressiva, caratterizzata da atassia, postura anomala (fig. 2.26.A.b), difficoltà di deambulazione (fig. 2.26.A.a), cifosi (fig. 2.26.A.c) e riflesso di *foot clasp* (fig. 2.26.A.d). Lo sviluppo di un evidente segno di malattia neurologica si verificava attorno ai 450 giorni e il suo decorso portava a morte in  $293 \pm 8$  giorni, in emizigosi (CJD<sup>+/-</sup>). In caso di omozigosi (CJD<sup>+/+</sup>) l'insorgenza era anticipata ai 145 giorni e il decorso era più rapido: la morte sopraggiungeva in  $130 \pm 15$  giorni (fig. 2.27.B). Oltre ai disturbi motori questo modello murino era caratterizzato anche da alterazioni della memoria di lavoro spaziale.

Le anomalie del tracciato EEG sono tipiche dei pazienti con CJD (Wieser et al., 2006). Per questo motivo il modello murino è stato sottoposto ad analisi EEG. Lo studio poligrafico di 24

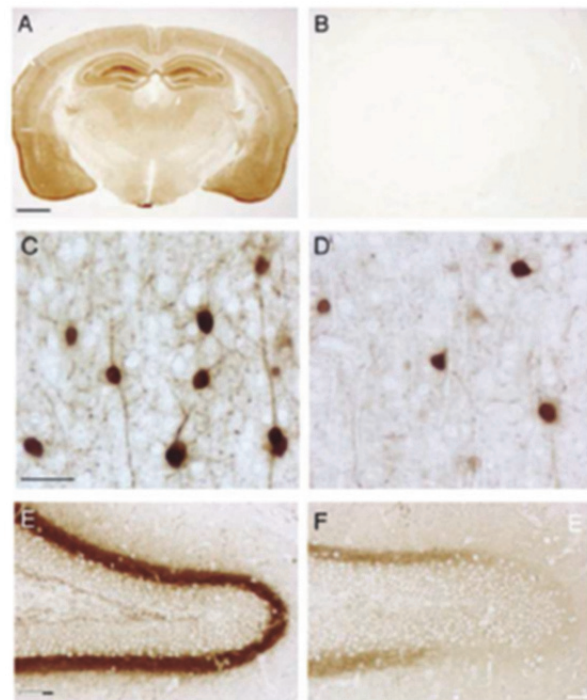


**FIGURA 2.27.** Alterazioni del sonno in topi CJD<sup>+/-</sup>. **A.** Tre esempi di scariche di complessi polifasici (pannello di sinistra) e il corrispondente spettro di potenza delle frequenze, ottenuto mediante trasformata veloce di Fourier (pannello a destra). Queste alterazioni sono state osservate in tutti i topi CJD<sup>+/-</sup>. **B.** Esempio delle tipiche onde a dente di sega (pannello di sinistra) e il relativo spettro di potenze delle frequenze (a destra). Queste onde sono state osservate in 5 dei 6 topi CJD<sup>+/-</sup> analizzati. **C.** Esempi di normali registrazioni elettroencefalografiche (a sinistra) con il corrispettivo spettro di potenza delle frequenze (a destra) durante epoche di veglia (pannello in alto), di sonno NREM (pannello in mezzo) e di sonno REM (pannello più in basso). **D.** Percentuali di tempo (media  $\pm$  SEM) trascorse in veglia, sonno NREM e sono REM durante le 24 ore, di 6 topi Non-Tg/Prnp<sup>+/+</sup> (WT), 6 topi Non-Tg/Prnp<sup>0/0</sup> (KO), 6 CJD<sup>+/-</sup> e 6 Tg(WT) di circa 600 giorni. Lo sfondo grigio identifica la fase di buio del ciclo luce/oscurità. L'ANOVA a 2 vie ha rilevato una riduzione statisticamente significativa nella percentuale di tempo spesa in sonno REM, sia nella fase di luce che di buio, dai topi CJD<sup>+/-</sup> ( $F_{3,42} = 4.8$ ;  $p = 0.01$ ). Un singolo asterisco (\*) indica una significatività pari a  $p \leq 0,05$ , due asterischi (\*\*) paria a  $p \leq 0,01$ . [Adattato da Dossena et al. 2008].

ore ha mostrato una marcata riduzione del sonno REM, sia durante la fase di luce che di buio, in topi CJD<sup>+/-</sup> a 18 mesi, rispetto ai controlli (fig. 2.27.D). In questi topi, inoltre, si è osservata una diminuzione del sonno NREM rispetto ai controlli, durante la fase di buio (fig. 2.27.D). A livello elettroencefalografico nei topi CJD analizzati sono stati registrati complessi polifasici con una frequenza di circa 7 - 8 Hz, presenti in tutti e tre gli stadi di vigilanza (fig. 2.27.A).

Nella maggior parte dei topi transgenici analizzati, inoltre, sono state evidenziate anomale “onde a dente di sega” con una frequenza media attorno ai 4 Hz (fig. 2.27.B), nel periodo di luce ma soprattutto durante la fase di buio. La presenza di molti episodi di attività EEG anomala all’interno di una stessa epoca, ne rendeva impossibile l’attribuzione ai classici stati comportamentali. Queste epoche sono state definite “unscored” ed erano presenti sia nelle fasi di luce ( $3,9 \pm 2,1\%$  del tempo di registrazione) sia nelle fasi di buio ( $4,7 \pm 1,9\%$ ). Non si sono rilevate differenze significative né nel numero di passaggi da uno stato comportamentale all’altro, né nelle potenze spettrali stato - specifiche. L’analisi della distribuzione circadiana del sonno e dell’attività motoria non ha rilevato particolari differenze tra i topi CJD e i controlli (Dossena et al., 2008).

La linea transgenica ha mostrato inoltre molte anomalie neuropatologiche: la deposizione di PrP resistente alla proteinasi interessava molte aree cerebrali e si presentava puntinata (*synaptic-*



**FIGURA 2.28.** Immunoistochimica sul cervello topi CJD<sup>+/-</sup> e sui relativi controlli. **A.** Immunoistochimica per la rilevazione di PrP con l’utilizzo dell’anticorpo monoclonale 12B2 dopo digestione con proteinasi K di una sezione cerebrale di un topo CJD<sup>+/-</sup> di 290 giorni. **B.** Stessa analisi condotta su un topo non transgenico di 290 giorni. **C.** Sezione della corteccia di un topo PrP KO di 245 giorni, marcata con l’anticorpo anti-calretinina. **D.** Stessa indagine condotta sulla corteccia di un topo CJD<sup>+/-</sup>. **E.** Sezione dell’ippocampo a livello dei terminali sinaptici delle cellule muscoidi, nella zona soprargranulare del giro dentato, marcata con l’anticorpo anti-calretinina, di un topo PrP KO di 808 giorni. **F.** Stessa indagine condotta sulla corteccia di un topo CJD<sup>+/-</sup> di 279 giorni. [Adattato da Dossena et al. 2008].

*like*) soprattutto a livello ippocampale, in particolare nello strato molecolare. Inoltre, alcuni depositi focali di PrP sono stati evidenziati in varie regioni come la fimbria ippocampale, il nucleo reticolare del talamo e il corpo calloso (fig. 2.28.A e B). La deposizione di PrP si accompagnava alla proliferazione astrocitaria soprattutto in ippocampo, amigdala e ipotalamo. In nessun caso si sono evidenziate modificazioni in senso spongiforme del parenchima cerebrale. I topi CJD, inoltre, mostravano una netta diminuzione dell'immunoreattività all'anticorpo anti-calretinina soprattutto a livello della corteccia e delle terminazioni sinaptiche delle cellule muscolari nell'ippocampo (fig. 2.28.C, D, E, F). In condizioni normali l'anticorpo anti-calretinina evidenzia i neuroni bipolari del II e III strato della corteccia.

Le analisi istologiche di topi CJD non hanno mostrato segni di degenerazione cerebellare: il cervelletto non sembrava essere atrofico e non erano evidenti alterazioni delle cellule di Purkinje e delle cellule granulari. L'utilizzo della microscopia elettronica per la visualizzazione dell'ultrastruttura di colture *in vitro* di cellule granulari del cervelletto, però, ha mostrato la presenza di grosse alterazioni: il reticolo endoplasmatico (ER) di queste cellule risultava essere molto allargato e frammentato, se confrontato con quello di cellule sane; esso conteneva, inoltre, quantità anomale di PrP. Questa osservazione suggerisce che la PrP mutata dei topi CJD possa essere trattenuta all'interno dell'ER e indurre la disfunzione neuronale.

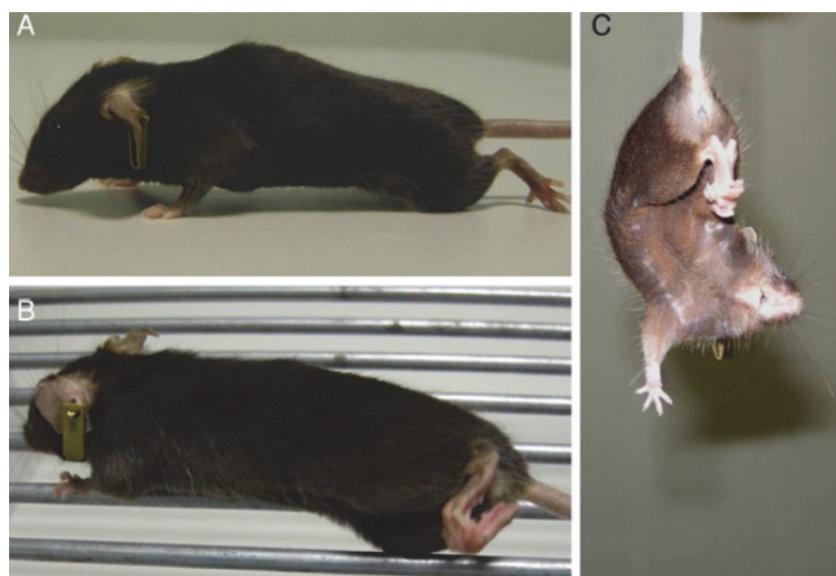
#### **2.4.3.2. - IL MODELLO MURINO DI INSONNIA FATALE FAMILIARE**

L'unico modello murino di FFI descritto in letteratura è stato proposto dal gruppo di ricerca di Susan Lindquist nel 2009. Nel loro studio è stata descritta la generazione e la caratterizzazione di una linea transgenica di topi recanti l'omologo murino della mutazione umana associata all'FFI (D178N/M129) e con l'epitopo per il 3F4 (Jackson et al., 2009). I topi transgenici ottenuti mostravano tra i 12 e 20 mesi di età anomalie come: allargamento dei ventricoli, atrofia cerebrale della corteccia motoria e riduzione del segnale talamico in MRI dopo somministrazione di MnCl<sub>2</sub>. Le analisi immunoistochimiche hanno rilevato la presenza di gliosi diffusa soprattutto a livello della sostanza bianca cerebellare, sede anche di vacuolizzazione, e del talamo, dove è stata evidenziata anche una perdita neuronale. Tuttavia, non è stata trovata, in questo studio, la presenza di PrP<sup>res</sup> nonostante le diverse tecniche impiegate a tal fine. La linea transgenica ottenuta mostrava spontaneamente una patologia degenerativa caratterizzata da anomalie comportamentali rilevate mediante AMBA (*automated mouse behavioral analysis*). Questa tecnica prevedeva 24 ore di videoregistrazione e l'analisi *off-line* del comportamento in

ogni fotogramma, permettendone la quantificazione. Da quest'analisi è risultato che i topi della linea transgenica presentavano una riduzione dell'attività motoria generale (come saltare, appendersi alla gabbia ecc.) rispetto ai controlli. Allo stesso tempo, mostravano un aumento sia delle attività motorie tipiche della veglia, sia delle attività di scrollamento (*twitches*, un'attività che interrompe la fase di riposo), in confronto a topi di controllo. I topi FFI mostravano, inoltre, delle anomalie nella temperatura corporea, nei termini di un aumento o una diminuzione rispetto ai topi di controllo, come osservato anche in pazienti FFI. L'analisi dell'attività motoria in unione alle alterazioni della temperatura, ha portato gli autori a inferire che la loro linea transgenica non mostrasse stadi profondi di sonno NREM. Tuttavia, non è stata implementata, nei loro topi FFI, nessuna analisi poligrafica, in modo da definire con chiarezza il ciclo veglia-sonno di questi animali e dei loro controlli.

Gli omogenati cerebrali di questa linea transgenica sono stati inoculati in altri topi: *Knock Out* per la PrP, transgenici *wild type* e topi che sovra esprimevano la PrP fisiologica (Tga20). In seguito all'inoculo, in tutti i topi, tranne che nei topi KO, si sviluppava atassia, cifosi, prurito, dermatite e tremore parossistico degli arti posteriori. Analisi neuropatologiche hanno mostrato un allargamento dei ventricoli e, solo nei topi Tga20, gliosi talamica. Questo modello murino accenna, dunque, a mostrare caratteristiche reminiscenti l'FFI umana e la PrP FFI dei topi transgenici risulta essere infettiva. Nonostante ciò, in questa linea mancano studi più approfonditi, come la polisonnografia, in grado di rilevare le caratteristiche più tipiche dell'FFI, ovvero le alterazioni circadiane del ciclo veglia-sonno.

Per questo motivo, il gruppo di ricerca di Roberto Chiesa ha proposto un nuovo modello murino di FFI, che esprime l'omologo murino (MoPrP D177N/M128) della mutazione umana D178N/M129, associato al fenotipo FFI (*in preparazione*). La procedura per la generazione



**FIGURA 2.29.** Sintomi neurologici di un topo FFI di 300 giorni. **A.** postura cifotica; **B.** camminamento su griglia, il topo non è in grado di muoversi normalmente perché le zampe anteriori sono paralizzate; **C.** riflesso del *foot-clasp*.

della linea transgenica è del tutto simile a quella utilizzata per il modello CJD, ma il transgene esprime il DNA della PrP murina contenente la mutazione D177N/M128. Una delle linee transgeniche create (utilizzata per l'esperimento n.1, cfr. sez 4.2.1 ESPERIMENTO N.1 – IL CICLO VEGLIA-SONNO NEL MODELLO FFI) iniziava a presentare i primi sintomi neurologici più tardi rispetto ai topi CJD, attorno ai 250 giorni. Questi animali presentavano cifosi (fig. 2.29.A) accompagnata da un'iniziale perdita dell'equilibrio durante la deambulazione e, successivamente, una paralisi delle zampe posteriori (fig. 2.29.B). Il riflesso del *foot-clasp* era presente in modo spiccato e spesso coinvolgeva anche le zampe anteriori (fig. 2.29.C). Caratteristico di questa linea era la presenza di un accentuato tremore associato a brevi mioclonie (*twiches*).

Le analisi di risonanza magnetica hanno rilevato differenze nel volume di alcune strutture cerebrali, come il talamo, tra i topi FFI e i topi controllo. I topi FFI presentano, inoltre, marcate alterazioni della memoria spaziale in confronto a topi di controllo (*in preparazione*).

La deposizione di PrP<sup>res</sup> in questo modello è stata osservata soprattutto a livello corticale e ippocampale. Analisi di microscopia elettronica hanno messo in luce che i neuroni dei topi FFI mostravano chiare alterazioni dell'apparato del Golgi, che si presenta con una forma alterata "a cipolla" e con cisterne in sovra numero. In queste cellule, inoltre, sono evidenti numerosi residui di lipofuscina (detriti cellulari non degradabili) che non sono presenti nei controlli. Questo tipo di alterazioni erano molto marcate nei neuroni ippocampali e corticali, in maniera meno massiccia nei neuroni talamici e cerebellari.

L'analisi poligrafica del ciclo veglia-sonno durante le 24 ore ha rilevato delle marcate alterazioni del sonno REM, nei termini di una sua riduzione, rispetto a topi di controllo. I topi FFI, confrontati con topi *wild type*, presentavano, inoltre, un appiattimento della circadianità del ciclo veglia-sonno e dell'attività motoria. Le alterazioni del ciclo veglia-sonno saranno maggiormente approfondite nel corso della trattazione della tesi.

Da queste osservazioni se ne deduce che questo modello murino ricapitola gran parte delle alterazioni osservate nell'uomo, per questo è stato utilizzato come soggetto sperimentale in questo studio.

### **2.4.3.3 - IL MODELLO MURINO DI MALATTIA DI ALZHEIMER**

L'elemento caratteristico della patologia di Alzheimer è la deposizione di placche amiloidi a livello cerebrale. Queste placche sono dovute all'accumulo di peptidi di  $\beta$ -amiloide (A- $\beta$ ), soprattutto dei residui A- $\beta$ <sub>1-40</sub> e A- $\beta$ <sub>1-42</sub>, che, aggregandosi, causano neurodegenerazione.

Molti gruppi di ricerca hanno messo a punto dei modelli murini recanti mutazioni ai geni che codificano per l'APP (proteina precursore della A- $\beta$ ) e a quelli che codificano per la presenilina-1 e presenilina-2 (Braidy et al., 2012). Questi geni, infatti, sono maggiormente coinvolti nelle forme genetiche di malattia di Alzheimer (Hardy, 1997).

Da sempre si è ritenuto che la formazione di placche amiloidi sia responsabile della neurodegenerazione e delle alterazioni comportamentali dell'AD. Non c'è dubbio, infatti, che il progressivo accumulo di A- $\beta$  contribuisca all'evoluzione dell'Alzheimer stesso. Recentemente, è stato notato un certo grado di correlazione tra la quantità totale di A- $\beta$  nel cervello di pazienti e il loro declino cognitivo. Questo indica che è la quantità di A- $\beta$ , ma non necessariamente la formazione di placche, a essere principale nella progressione dell'AD (Haass and Selkoe, 2007; Watson et al., 2005). Inoltre, topi esprimenti una forma alterata di APP mostravano alterazioni cognitive già prima della formazione e della deposizione di placche amiloidi nel loro cervello (Holcomb et al., 1998). Da questo tipo di osservazione si è delineato il concetto che non è tanto l'esistenza di placche amiloidi nel cervello, quanto la presenza di oligomeri (dimeri, trimeri ecc.) di A- $\beta$  a essere tossici e produrre tutta la neurodegenerazione e il declino cognitivo osservato nei pazienti AD (Cleary et al., 2005). Molti studi *in vitro* e *in vivo* hanno rilevato che minime concentrazioni di oligomeri solubili di A- $\beta$  sono in grado di bloccare il potenziamento a lungo termine (*Long Term Potentiation*, LTP) in culture cellulari ippocampali (Walsh et al., 2002), causare ritrazione delle spine dendritiche dalle cellule piramidali (Lacor et al., 2007; Shankar et al., 2007) e peggiorare le prestazioni in compiti di memoria spaziale nei roditori (Lesne et al., 2006). I depositi extracellulari di amiloide possono, quindi, costituire un solo aspetto della vasta cascata di eventi patologici ed essere un'indiretta conseguenza di una possibile risposta protettiva atta al sequestro degli oligomeri tossici di A- $\beta$ . In uno studio del 2009, infine, Claudia Balducci e collaboratori, hanno scoperto che la somministrazione intra-cerebro-ventricolare acuta dei soli oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  provoca, nei topi, alterazioni della memoria di riconoscimento, rispetto a una condizione di controllo (veicolo); viceversa la somministrazione di fibrille insolubili (stadio più avanzato di oligomerizzazione) non ha nessun effetto nelle prestazioni mnestiche (Balducci et al., 2010).

La somministrazione di oligomeri di A- $\beta$  produce, quindi, un chiaro parallelismo con i segni più rilevanti dell'AD nell'uomo tra cui: atrofia dei neuriti, perdita neuronale, degenerazione sinaptica e perdita della sua plasticità, nonché deficit mnestici (Zussy et al., 2013). Per le ragioni sopra elencate in questo studio si è preferito utilizzare questo tipo di modello in acuto piuttosto che un modello murino transgenico. Le procedure di somministrazione e di preparazione degli oligomeri sono descritte più avanti e si rifanno a quelle utilizzate dal gruppo della Balducci.

## 2.5 - TIRANDO LE SOMME

Tutte le patologie neurodegenerative prese in considerazione hanno un quadro sintomatologico e un'eziologia molto diversi, tuttavia un denominatore patologico comune è la presenza di proteine anomale e di aggregati proteici patogenici. Dalle prionopatie alle sinucleinopatie, tutte queste proteiopatologie sono, infatti, caratterizzate dalla presenza di una proteina (prionica,  $\alpha$ -sinucleina, beta amiloide, huntingtina) espressa in forma anomala (mal-ripiegata), che tendendo all'aggregazione e al successivo accumulo a livello cerebrale, causa la neurodegenerazione e, quindi, tutto il quadro sintomatico tipico. Approcci differenti derivanti dalla neuropatologia, dalla genetica, dallo studio di modelli animali e dalla biofisica hanno stabilito il ruolo cruciale del mal-ripiegamento proteico nel processo patogenico. Tuttavia, ancora oggi vi è un grande dibattito sulla natura delle specie proteiche nocive e come le isoforme tossiche possano danneggiare selettivamente una popolazione neuronale. Alcune recenti evidenze dimostrano che già gli oligomeri solubili sono associati ad alterazioni patologiche precoci, e sorprendentemente, gli aggregati oligomericici di proteine associate alle diverse patologie potrebbero condividere caratteristiche strutturali comuni. Un passo avanti nella comprensione dei meccanismi implicati nella degenerazione neuronale è stata l'identificazione di geni, che sono responsabili della variante familiare delle diverse patologie neurodegenerative. Studi basati su questi geni associati alla patologia hanno chiarito la doppia faccia del mal-ripiegamento proteico nella neurodegenerazione. Da una parte l'assenza della proteina nella sua forma normale comporta una perdita della sua fisiologica funzione (*loss of function*), che può essere anche di protezione della cellula. Dall'altra parte, la presenza di una proteina con una conformazione anomala (mal-ripiegata), tendente all'aggregazione, risulta essere di per sé tossica a livello neuronale (*gain of function*) (Winklhofer et al., 2008).

L'analisi dettagliata del quadro sintomatologico di queste patologie ha reso evidente anche un ulteriore denominatore comune: i disturbi a carico del ciclo veglia-sonno. Dall'insonnia fatale familiare, in cui le anomalie del sonno sono il sintomo principale, tanto da conferirne anche il nome; alle altre patologie, in cui i disturbi del sonno, sia nei termini di una riduzione di particolari stati di sonno che lo sviluppo di una parasonnia o un'anomalia nel normale ritmo circadiano del sonno, fanno comunque parte del quadro di presentazione della malattia. Il sonno REM sembra essere lo stato che maggiormente è intaccato nel corso di neurodegenerazione. Si riscontra frequentemente una riduzione della sua durata, una modificazione nel suo tracciato EEG

(rallentamento) o la presenza di alterazioni nella sua manifestazione, come il disturbo comportamentale durante il sonno REM (RBD) o il sonno REM senza atonia (RSWA).

I disturbi del sonno sono quindi una manifestazione sintomatica molto diffusa nelle malattie neurodegenerative. Se questi disturbi sono parte integrante della sintomatologia di molte patologie umane è ragionevole pensare che essi si presentino anche in modelli animali che ricapitolano la neurodegenerazione osservata nell'uomo. Questa ipotesi trova conferma negli studi di alcuni modelli animali delle patologie prima analizzate. Ad esempio, in uno studio su Neuron del 2008 si è messo in evidenza che un modello murino di CJD presenta alterazioni EEG e modificazioni del ciclo veglia-sonno paragonabili a quelle osservate in pazienti con CJD familiare (Dossena et al., 2008). In maniera simile, anche un modello murino di HD si riportano alterazioni nell'attività motoria circadiana reminiscenti quelle osservate nell'uomo (Morton et al., 2005).

L'utilizzo di modelli animali per lo studio delle patologie, deve però tener conto delle ovvie differenze biologiche che intercorrono tra uomo e animale. Come per altri sintomi, anche per quanto riguarda i disturbi del sonno è da sottolineare che questi, nel modello animale, possono presentarsi in forma diversa rispetto a quanto accade nell'uomo. Per fare un banale esempio di come le differenze uomo - animale possano interferire con il processo conoscitivo, basti considerare la domanda: gli animali sognano? La risposta a questa domanda non è così scontata. Essendo il sogno inscindibilmente legato al suo resoconto verbale, è impossibile conoscere se gli animali possano sognare o meno, poiché sono privi della funzione cognitiva della parola. Tuttavia, analizzando il ciclo veglia-sonno se ne possono studiare le caratteristiche e affermare che molti animali (roditori, felini ecc.) presentano sonno REM, una fase questa che solitamente è associata all'attività onirica. Inoltre, da studi su sezione di alcuni nuclei del ponte che bloccano l'atonia durante la fase REM, come per esempio l'SLD, si è rilevato che questi animali, in fase REM, attuano dei movimenti che sembrano mimare il sogno in atto. In altre parole, a causa di una diversità nello sviluppo cognitivo, non è possibile sapere se il sogno sia presente o meno negli animali, tuttavia alcune manifestazioni secondarie ne fanno intuire la sua presenza. Un discorso simile può essere esteso anche ai disturbi del sonno in animali che recano la stessa mutazione del gene associato alle diverse patologie neurodegenerative: a causa delle differenze tra uomo e animale non è detto che le alterazioni del sonno riscontrate nell'uomo siano identiche a quelle del modello murino.

Ritornando all'uomo, il punto cruciale è che i disturbi del sonno non solo sono parte integrante della sintomatologia di queste patologie, ma in alcuni casi sembrano anche anticipare il decorso stesso della malattia. Questa ipotesi trova conferma nelle teorizzazioni di Ferini-Strambi e altri autori, i quali hanno suggerito che il disturbo comportamentale durante il sonno REM sia un fattore prodromico dell'insorgenza di una sinucleinopatia. Tuttavia, anche



nelle altre patologie, in fasi precoci della malattia, i pazienti spesso lamentano sintomi riconducibili ad alterazioni del ciclo veglia-sonno come per esempio: difficoltà di addormentamento, eccessiva sonnolenza diurna, insonnia ecc. Tutto questo porta a dire che non solo le alterazioni a carico del sonno sono un sintomo molto diffuso nelle patologie neurodegenerative, ma si può avanzare l'ipotesi che i disturbi del sonno possano precedere l'insorgenza della patologia. Questo non solo nell'uomo ma anche in modelli animali.

Da queste osservazioni ha preso corpo lo scopo di questo studio.



## **3. - SCOPO**



Nel precedente capitolo è stata illustrata l'idea di una possibile associazione tra alterazioni del ciclo veglia-sonno e malattie neurodegenerative.

La disponibilità, nel nostro laboratorio, di modelli murini di tre patologie neurodegenerative: Creutzfeldt-Jakob (CJD), Insonnia Fatale Familiare (FFI) e malattia di Alzheimer (AD), ha permesso lo studio poligrafico del ciclo veglia-sonno in questi tre modelli.

Mediante l'applicazione della poligrafia è stato possibile:

- analizzare il ciclo veglia-sonno di tutti e tre i modelli murini nel corso della patologia e analizzarne l'architettura e le caratteristiche. Questo al fine di evidenziare eventuali alterazioni e confermare (o meno) la stretta associazione tra malattia neurodegenerativa e modificazioni del ciclo veglia-sonno;

Nel modello murino di CJD sono già state descritte alterazioni del ciclo veglia-sonno in una fase avanzata della malattia (18 mesi) (Dossenna et al., 2008). La disponibilità di questo modello murino di CJD a tre diversi stadi evolutivi della patologia, ha reso possibile:

- confermare (o meno) i dati già presenti in letteratura;
- seguire longitudinalmente il ciclo veglia-sonno di questo modello murino, anche prima dello sviluppo della patologia e l'insorgenza della sintomatologia tipica.

Tutto questo al fine di poter verificare (o meno) la presenza di alterazioni del sonno anche in modelli murini di patologie neurodegenerative, in modo da rafforzare l'idea di un'associazione tra patologia e disturbi del sonno. Inoltre, si è potuta avanzare l'ipotesi di un possibile ruolo del sonno nello sviluppo di malattie neurodegenerative.

La verifica di queste ipotesi potrebbe essere molto vantaggiosa allo scopo di individuare precocemente il processo neurodegenerativo e intervenire quanto prima con trattamenti adeguati.



# 4. - MATERIALI E METODI





Negli esperimenti che seguono tutti gli animali sono sempre stati trattati con dignità e rispetto, in accordo con le leggi dettate dall'Unione Europea (EEC, Council Directive 86/609, OJ L 358, 1; 12 dicembre 1987) dall'Italia (decreto legge n°116, supplemento 40; 18 febbraio 1992) e con le politiche del Department of Agriculture Animal Welfare degli Stati Uniti d'America.

## **4.1 - ESPERIMENTO N.1 – IL CICLO VEGLIA- SONNO NEL MODELLO MURINO FFI**

In questo primo esperimento si è andati ad analizzare il ciclo veglia sonno nel modello murino di Insonnia Fatale Familiare, sopra descritto (cfr. sez. 2.4.3.2 – IL MODELLO MURINO DI INSONIA FATALE FAMILIARE). Lo studio poligrafico di questo modello ha permesso l'analisi dei parametri distintivi del sonno di topi che sviluppano una prionopatia a confronto con topi "sani" e topi che non esprimono la proteina prionica (animali di controllo).

### **4.1.1 - ANIMALI E STABULAZIONE – I**

Per questo esperimento sono stati utilizzati come soggetti sperimentali tre diversi ceppi di topi (*mus musculus*), su background genetico C57BL/6J, nati e allevati presso l'Istituto di Ricerca Farmacologiche "Mario Negri" di Milano (IRFMN), dal dott. Roberto Chiesa. I tre ceppi di topi utilizzati consistevano in: i) topi *wild type*: i quali esprimevano la forma fisiologica di proteina prionica, d'ora in avanti indicati con la sigla WT (n = 8); ii) topi *knock-out* per la proteina prionica, i quali non esprimevano la PrP, indicati nell'archivio europeo dei topi transgenici (*European Mutant Mouse Archive*, EMMA) con la sigla C57BL/6J/PrP<sup>0/0</sup> (KO, n = 10); iii) topi transgenici che esprimevano l'omologo murino (D177N/M128) della mutazione D178N/M129 che nell'uomo è associata all'Insonnia Fatale Familiare (FFI, n = 8).

I topi dall'IRFMN erano trasferiti al nostro laboratorio di Fisiologia del Sonno presso il Dipartimento di Scienze della Salute (DISS) dell'Università degli Studi di Milano. Una volta giunti a tale destinazione, erano stabulati singolarmente in apposite gabbie di misura 60 x 22 x

20 cm, con cibo e acqua *ad libitum*. La stanza di stabulazione aveva un ciclo luce-buio di 24 ore: 12 ore di luce (9.30 - 21.30) e 12 ore di buio (21.30 - 9.30); una temperatura e un grado di umidità costante, rispettivamente di  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $60 \pm 5\%$ . I topi erano qui acclimatati per almeno 20 giorni dopo il loro arrivo, prima di procedere con le procedure sperimentali.

## 4.1.2 - LE PROCEDURE CHIRURGICHE – I

Ai fini della registrazione poligrafica i topi erano sottoposti a chirurgia per impianto cronico di elettrodi per la registrazione elettroencefalografica (EEG). In totale sono stati utilizzati 26 topi a 12 mesi di età ( $12 \pm 1$  mesi) con un peso medio di  $33 \pm 7$  g al momento della chirurgia. Tutte le chirurgie erano compiute in una stanza attrezzata e in condizioni asettiche.

La chirurgia era eseguita in condizione di narcosi profonda mediante un sistema di anestesia gassosa Isotec 3 Ohmeda BOCK HEALTH CARE, che utilizzava come anestetico l'isofluorano (Merial) unito a ossigeno ( $\text{O}_2$ ). Questo sistema prevedeva la presenza di una camera d'induzione e un sistema di assorbimento di gas di scarico FLUOVAC (Harvard Apparatus).

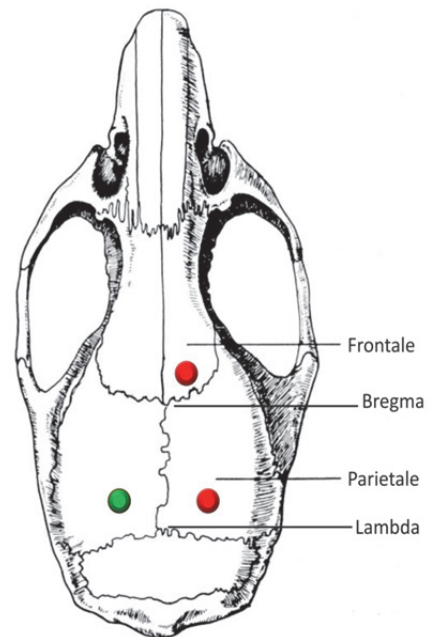
I topi, prelevati dalla stanza di stabulazione, erano introdotti all'interno della camera d'induzione, di cui sopra, al fine di essere anestetizzati mediante una percentuale d'isofluorano del 4 - 5% e un flusso di ossigeno stabile a  $\sim 0,6$  L/min. Dopo aver constatato l'assenza di riflessi a livello degli arti posteriori e delle vibrisse, si procedeva con una tricotomia della cute cranica mediante l'uso di apposite pinze. Una volta terminata quest'operazione, il topo veniva posto su di un apparecchio stereotassico per roditori (Kopf Instrument), al fine di garantire l'immobilità del cranio dell'animale e un adeguato afflusso di anestesia gassosa e ossigeno (rispettivamente di 1,5 - 2,5% e  $\sim 0,6$  L/min). Fissato in maniera corretta l'animale all'apparato stereotassico, si applicava sui bulbi oculari, una goccia di gel oftalmico con sodio ialuronato allo 0,30 % (Blue Gel, Sooft Italia), per garantire protezione e idratazione agli occhi durante tutta la fase operatoria. In seguito, la cute del cranio veniva recisa, a livello mediano, mediante bisturi chirurgico. I lembi della cute cranica recisa erano tenuti separati con l'aiuto di 4 micro-angiostati in modo da esporre bene la teca cranica e lasciare libero il piano operatorio.

In un primo momento, mediante l'utilizzo di una lama da bisturi, il cranio era pulito dal periostio. Una volta che il cranio era stato ripulito, mediante l'utilizzo di un trapano dentistico flessibile (130 W e 10000 giri/min) con punta di 0,5 mm, erano eseguiti i fori per l'impianto di tre elettrodi EEG. Le perforazioni erano eseguite a livello: i) dell'osso frontale destro (AP: + 1,0; L: - 1,0 mm dal bregma); ii) dell'osso parietale destro (AP: + 1,0; L: -2,0 mm dal lambda) e iii) dell'osso parietale sinistro (AP: + 1,0; L: + 2,0 mm dal lambda). Una volta effettuati i fori si procedeva

all'inserimento degli elettrodi EEG (fig. 4.1), che consistevano in viti (testa Ø 2,5 mm, filettatura Ø 1,5 mm, lunghezza 3,8 mm) autofilettanti in acciaio inossidabile (INOX), alle quali era stato saldato un pezzo di filo di rame isolato (circa 1 cm). Il segnale EEG aveva una derivazione fronto-parietale (elettrodo frontale e parietale destro); il terzo elettrodo (parietale sinistro) era utilizzato come sito di messa a terra. L'elettrodo parietale destro, inoltre, si trovava nella regione che anatomicamente corrisponde all'area ippocampale, dalla quale è derivabile l'attività theta, importante per il successivo *scoring* (Bland, 1986).

In una seconda fase le tre estremità libere degli elettrodi EEG erano saldate a un micro-connettore di plastica a cinque poli. Infine, gli elettrodi e il micro-connettore erano isolati e assicurati alla teca cranica mediante l'utilizzo di una resina dentistica polimerizzabile a freddo (Paladur, Heraeus Kulzer, GmbH). Da ultimo, erano applicati i punti di sutura necessari per facilitare la rimarginazione della cute recisa, attraverso filo da sutura 6-0.

Una volta terminate queste operazioni, era somministrato per via sottocutanea una dose, pari a 5 volte il peso dell'animale, di analgesico Finadyne (flunixin meglumina) a una concentrazione di 50 µg/L. Inoltre, per evitare possibili infezioni durante il periodo post-operatorio, veniva somministrato un antibiotico spray ad ampio spettro, per uso topico, il cui principio attivo era l'ossitetraciclina cloridrato (Terramicina, Pfizer). Le chirurgie e i trattamenti a esse relate sono state eseguite con le stesse modalità in tutti i topi utilizzati per questo esperimento.



**FIGURA 4.1.** Rappresentazione della localizzazione degli elettrodi per la registrazione EEG. In rosso sono indicati i siti attivi per la registrazione (asse fronto-parietale); in verde l'elettrodo di terra.

### 4.1.3 - IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - I

Terminata la procedura chirurgica, il topo veniva tolto dall'apparato stereotassico e dopo alcune ore dalla chirurgia alloggiato e collegato al sistema di registrazione. Il collegamento avveniva per mezzo di un altro micro-connettore posto all'estremità di un cavo ultra-flessibile a cinque poli di circa 50 cm di lunghezza (Cooner Wire). Al fine di garantire la massima libertà di movimento, il cavo era sorretto da un reggi-cavo controbilanciato, multi-assiale (Instech, MCLA/SMCLA). Quest'ultimo era assicurato a un box cilindrico in plexiglass di 30 cm di diametro e altezza 35 cm, all'interno del quale era presente della lettiera per roditori e cibo e acqua *ad libitum*. Sopra il box di registrazione, era presente un'unità di osservazione (Biobserve, GmbH, Bonn, Germany), che mediante sensore a infrarosso, registrava i movimenti dei topi (*motor activity*, MA).

I box di registrazione erano collocati all'interno di una stanza silente con un ciclo luce-oscurezza di 12 / 12 ore (9.30 - 21.30 / 21.30 - 9.30) e con una temperatura e un grado di umidità costante, rispettivamente di  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $60 \pm 5\%$  (stesse condizioni della stanza di stabulazione). Nei due giorni seguenti alla chirurgia, i topi erano trattati con la medesima dose di analgesico descritta sopra e con lo stesso antibiotico spray.

### 4.1.4 - IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - I

Il protocollo sperimentale prevedeva la suddivisione dell'intero campione di soggetti ( $n = 26$ ) in 6 gruppi da 4 animali ciascuno e un gruppo da due animali. I topi erano assegnati casualmente al gruppo e randomizzati per ceppo di appartenenza.

La fase sperimentale aveva inizio dopo circa 15 giorni dalla chirurgia, per permettere agli animali la ripresa dallo stress della chirurgia e l'adattamento al nuovo ambiente e al cavo di registrazione. Tutti gli animali venivano registrati poligraficamente (EEG e MA) a circa 13 mesi d'età ( $12,5 \pm 1,5$  mesi) per 24 ore continue, in condizioni normali di laboratorio, partendo dalla fase di luce (9.30 a.m.).

## 4.1.5 - LA REGISTRAZIONE DEI SEGNALI – I

In totale erano registrati tre segnali: elettroencefalogramma (EEG), attività motoria (MA) e temperatura ambientale.

- i) Segnale EEG.* Il segnale EEG dal micro-connettore posto sulla testa dell'animale era mandato a uno stativo e da qui ad un amplificatore DC GRASS Instrument (Quincy, MA USA, mod.7DAG) per essere opportunamente amplificato e filtrato. Il segnale era amplificato con un fattore pari a 3000 e filtrato mediante un filtro passa-alto di  $\pm 3$  dB a 0,1 Hz, un filtro passa-basso di  $\pm 3$  dB a 35 Hz e un filtro *notch* a 50 Hz, per eliminare artefatti dovuti alla corrente di rete. Il segnale, amplificato e filtrato, arrivava a una scheda di conversione analogica/digitale (A/D) della Texas Instruments (PCI6023E) attraverso la quale era acquisito a una frequenza di campionamento di 128Hz.
- ii) Attività motoria.* Per quanto riguarda l'attività motoria, questa era costantemente registrata mediante sensore infrarosso situato sopra il box di registrazione. Ogni movimento del topo era rilevato e trasformato in un valore di voltaggio in uscita proporzionale all'entità del movimento. Questo segnale era già amplificato dalla stessa unità di registrazione. Per questo motivo non passava dall'amplificatore sopra descritto, ma andava direttamente alla scheda di conversione A/D, di cui sopra. Il segnale dell'attività motoria era acquisito a una frequenza di 8 Hz.
- ii) Temperatura ambientale.* Durante tutta la fase sperimentale, la temperatura ambientale era costantemente tenuta sotto controllo mediante l'utilizzo di un termistore. Le variazioni termiche rilevate erano convertite in valori di voltaggio, che opportunamente amplificate e registrate, erano inviate alla scheda di conversione A/D. Il segnale della temperatura ambientale era acquisito alla frequenza di 1 Hz.

I valori digitali dei tre segnali erano registrati e salvati nel computer sotto forma di file binari proprietari mediante apposito software (Icelus Aquisition, M. Opp, Università di Washington) scritto in Labview per Windows.

## 4.2 - ESPERIMENTO N.2 – IL CICLO VEGLIA-SONNO NEL MODELLO MURINO DI CJD

In letteratura sono già state descritte alterazioni del ciclo veglia-sonno in questo modello murino (cfr. sez. 2.4.3.1 – IL MODELLO MURINO DI MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB), ma in una fase avanzata della malattia (Dossena et al., 2008). Con questo esperimento si è andati a valutare il ciclo veglia-sonno di questo modello murino, non solo in una fase avanzata, ma anche in stadi precoci della patologia, prima ancora dell'insorgenza della sintomatologia già descritta.

### 4.2.1 - ANIMALI E STABULAZIONE - II

In questo secondo esperimento sono stati utilizzati tre diversi ceppi di topi (*mus musculus*), su background genetico C57BL/6J, nati e allevati presso l'Istituto di Ricerca Farmacologiche "Mario Negri" di Milano (IRFMN). I tre ceppi di topi utilizzati consistevano in: i) topi *wild type*: che esprimevano la forma fisiologica di proteina prionica (WT); ii) topi *knock-out* per la proteina prionica, che non esprimevano la proteina prionica, indicati nell'archivio europeo dei topi transgenici (*European Mutant Mouse Archive*, EMMA) con la sigla C57BL/6J/PrP<sup>0/0</sup> (KO); iii) topi transgenici che esprimevano l'omologo murino della mutazione D178N/V129 che nell'uomo è associata ad una forma familiare di malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD<sup>178</sup>).

Al fine di indagare l'evoluzione della patologia e le relative modificazioni del ciclo veglia-sonno, ciascun ceppo è stato analizzato a tre diverse età: 6, 12 e 18 mesi. Queste sono state scelte considerando la vita media di un topo. Infatti, si può considerare che i 6 mesi rappresentino l'età giovanile, i 12 mesi l'età adulta e i 18 mesi l'età anziana.

In totale, sono stati analizzati 76 topi: in dettaglio, per il ceppo WT sono stati utilizzati 7 topi a 6 mesi, 9 topi a 12 mesi e 7 topi a 18 mesi. Per il ceppo KO, 9 topi a 6 mesi, 9 topi a 12 mesi e 9

	<b>WT</b>	<b>KO</b>	<b>CJD</b>	<b>Totale</b>
<b>6 mesi</b>	7	9	7	23
<b>12 mesi</b>	9	9	9	27
<b>18 mesi</b>	7	9	10	26
<b>Totale</b>	23	27	26	<b>76</b>

**TABELLA 4.1.** Numerosità, per ogni ceppo ed età, del campione utilizzato. Sono indicati anche i marginali di riga e di colonna e il totale. WT= topi *wild type*; KO= topi *knock-out* per la proteina prionica; CJD= topi transgenici con malattia di Creutzfeldt-Jakob.

topi a 18 mesi. Infine per il ceppo CJD sono stati impiegati 7 topi a 6 mesi, 9 topi a 12 mesi e 10 topi a 18 mesi (tab. 4.1).

Le condizioni di trasferimento e di stabulazione degli animali erano del tutto simili a quelle descritte per l'esperimento N.1 (cfr. sez. 4.1.1 - ANIMALI E STABULAZIONE - I).

## **4.2.2 - LE PROCEDURE CHIRURGICHE - II**

Le procedure di impianto di elettrodi dell'EEG per la registrazione del ciclo veglia-sonno erano le stesse dell'Esperimento n.1 (cfr. sez. 4.1.2 – PROCEDURE CHIRURGICHE - I).

## **4.2.3 - IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - II**

Il sistema di registrazione utilizzato in questo esperimento era identico a quello utilizzato per il precedente esperimento (cfr. sez.4.1.3 – IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - I).

## **4.2.4 - IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - II**

L'intero campione di 76 animali era suddiviso in 19 gruppi da 4 animali ciascuno. I topi erano assegnati casualmente a ciascun gruppo ed erano randomizzati per ceppo di appartenenza ed età.

La fase sperimentale aveva inizio dopo circa 15 giorni dalla chirurgia, per permettere agli animali di adattarsi alle nuove condizioni e recuperare un normale ciclo veglia-sonno. Tutti gli animali erano registrati poligraficamente (EEG e MA) a tre età diverse (6, 12 e 18 mesi) per 24 ore continue, in condizioni normali di laboratorio, partendo dalla fase di luce (9.30 a.m.).

## **4.2.5 - LA REGISTRAZIONE DEI SEGNALI - II**

I segnali registrati erano gli stessi dell'esperimento n.1 (EEG, MA e temperatura ambientale) ed erano amplificati e filtrati con lo stesso sistema e con i medesimi valori (cfr. sez. 4.1.5 – REGISTRAZIONE DEI SEGNALI - I).

## **4.3 - ESPERIMENTO N.3 – IL CICLO VEGLIA-SONNO NEL MODELLO MURINO DI AD**

Nel terzo e ultimo esperimento si sono andate a considerare le alterazioni del ciclo veglia-sonno in seguito alla somministrazione ICV in acuto di oligomeri sintetici di beta-amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ). Quest'operazione ha lo scopo di mimare gli effetti della patologia di Alzheimer, come sopra spiegato (cfr. sez. 2.4.3.1 – IL MODELLO MURINO DI MALATTIA DI ALZHEIMER).

### **4.3.1 - ANIMALI E STABULAZIONE - III**

In questo terzo esperimento sono stati utilizzati 10 topi C57BL/6J provenienti dai laboratori della Harlan. Arrivati presso il nostro laboratorio, gli animali venivano stabulati nelle medesime condizioni dell'esperimento n.1 (cfr. sez. 4.2.1 – ANIMALI E STABULAZIONE - I).

### **4.3.2 - LE PROCEDURE CHIRURGICHE - III**

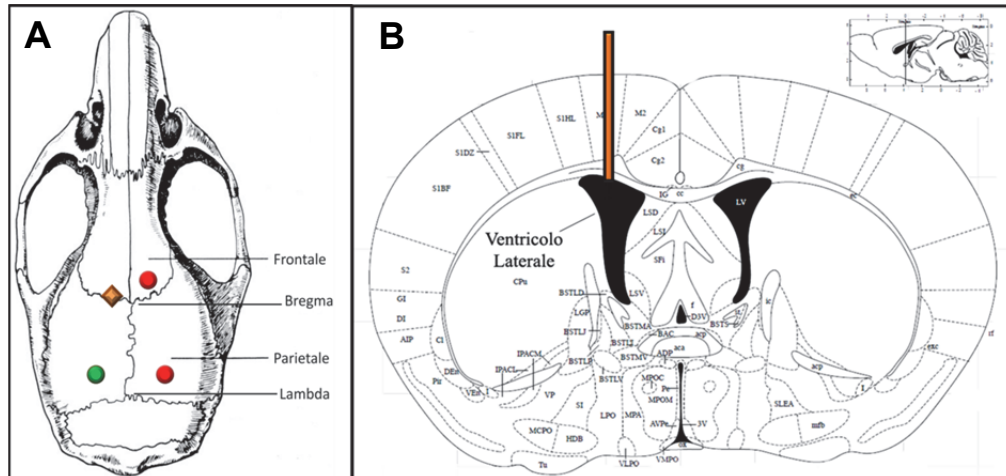
La procedura chirurgica per l'impianto degli elettrodi EEG è simile a quella del primo esperimento (cfr. sez. 4.2.2 – PROCEDURE CHIRURGICHE – II). Di seguito verrà descritta brevemente con l'aggiunta di informazioni per il fissaggio della cannula per ICV.

Tutti gli animali, a circa quattro mesi di età, sono stati sottoposti a chirurgia stereotassica per impianto cronico di tre elettrodi per la registrazione elettroencefalografica (EEG) e di una cannula per iniezione intra-cerebro-ventricolare (ICV). Gli elettrodi EEG constavano di tre viti di acciaio inossidabile (testa  $\varnothing$  2,5 mm, filettatura  $\varnothing$  1,5 mm) cui era saldato un pezzo di filo di rame isolato (~ 1 cm). Sotto profonda anestesia generale (isofluorano: 5% induzione, 2% mantenimento) le tre viti erano impiantate epiduralmente in area frontale (dal bregma, AP: + 1,0 mm; L: - 1,0 mm; fig. 4.2.A) e in area parietale (dal lambda, AP: + 1,0 mm; L:  $\pm$  2,0 mm; fig.4.2.A). Gli elettrodi erano successivamente saldati ad un micro-connettore.

Mediante torre stereotassica si procedeva all'inserimento di una cannula-guida per iniezioni ICV. La cannula-guida, consistente in un segmento (7 mm) di micro-tubo di acciaio inossidabile (23 gauge, Coopers Needle), era impiantata a livello del ventricolo laterale sinistro, dal bregma: AP: 0,0 mm L: + 1,0 mm, DV: - 1,0 mm dalla dura madre (fig. 4.2.A e B) (Balducci et al., 2010). Per mezzo di resina dentistica polimerizzabile a freddo (Paladur, Heraeus-Kulzer, GmbH)



elettrodi e cannula-guida venivano assicurati al cranio e isolati dall'ambiente esterno. Al termine della chirurgia e per i due giorni seguenti i topi erano trattati con una dose (2,5 µl/g del peso dell'animale) di analgesico (Finadyne, *Flunixin Meglumina*) somministrato per via sottocutanea. Gli animali erano poi collegati al sistema di registrazione ed erano loro concessi 15 giorni di recupero e di adattamento alle nuove condizioni.



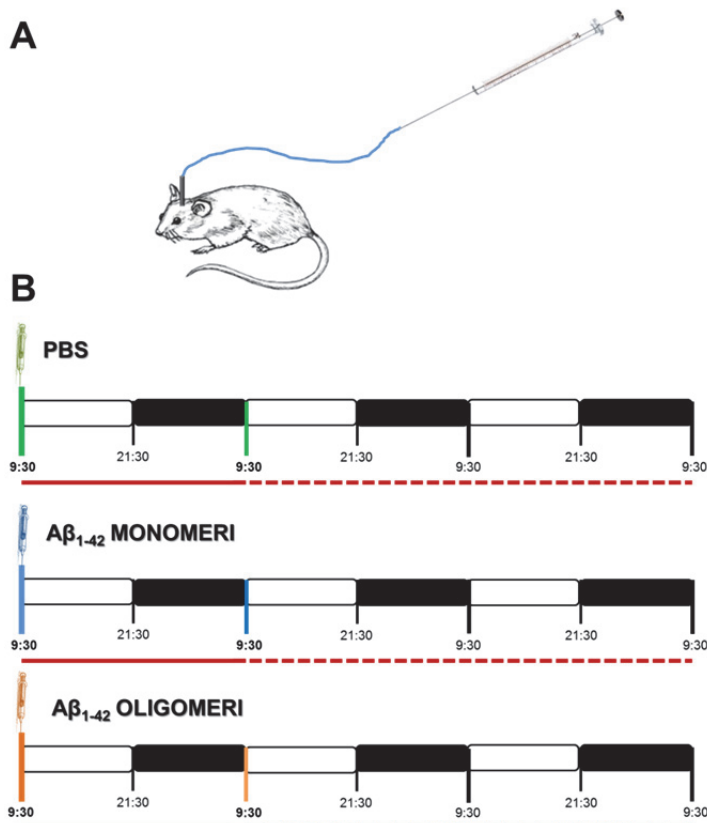
**FIGURA 4.2.** **A.** Rappresentazione della locazione degli elettrodi per la registrazione EEG e della cannula per iniezioni ICV. I cerchietti indicano gli elettrodi: In rosso i siti attivi per la registrazione (asse fronto-parietale); in verde l'elettrodo di terra. La cannula è indicata dal rombo in arancione. **B.** Sezione coronale del cervello di un topo (modificata da Paxinos and Franklin, 2004), in arancione è indicata la posizione della cannula guida.

### 4.3.3 - IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE - III

Il sistema di registrazione e le caratteristiche delle stanze sperimentali erano le stesse dei precedenti esperimenti (cfr. sez. 4.1.3. – IL SISTEMA DI REGISTRAZIONE – I).

### 4.3.4 - IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE - III

L'esperimento prevedeva che ciascun animale fosse registrato poligraficamente per 24 ore ininterrotte in seguito a somministrazione, via ICV, di 1,5 µl di tre soluzioni diverse: i) tampone fosfato salino 0,5x (PBS); ii) una soluzione contenente ~ 1 µM in PBS di monomeri sintetici di beta-amiloide<sub>1-42</sub> (Aβ<sub>1-42</sub>); iii) una soluzione contenente ~ 1 µM in PBS di oligomeri sintetici di Aβ<sub>1-42</sub>. Tutte e tre le soluzioni erano somministrate a ciascun topo all'inizio della fase di luce (9.30 a.m.), in tre giornate diverse, con la stessa successione: per primo era iniettato il PBS, poi i monomeri sintetici di Aβ<sub>1-42</sub> e infine gli oligomeri sintetici di Aβ<sub>1-42</sub>. Tra un trattamento e l'altro intercorrevano 72 ore, di cui 24 ore erano di registrazione sperimentale, mentre le altre 48 di



**FIGURA 4.3.** Protocollo sperimentale del terzo esperimento. **A.** L'illustrazione della procedura d'iniezione mostra che durante il trattamento l'animale era libero di muoversi. **B.** Schema dei trattamenti. Le bande *bianche* indicano le ore di luce del ciclo luce/oscurità; quelle *nere* le ore di buio dello stesso ciclo. La linea *rossa* continua segnala le ore di registrazione, quella *tratteggiata* le ore di recupero, in cui l'animale non era registrato. In *verde* è rappresentato il trattamento con PBS, in *blu* l'iniezione di monomeri di  $A\beta_{1-42}$  e in *arancione* la somministrazione di oligomeri di  $A\beta_{1-42}$ . In breve: il primo giorno tutti gli animali erano trattati con PBS (in *verde*) all'inizio della fase di luce (9:30) del ciclo luce/oscurità ed erano registrati per 24 ore. Dopo 48 ore, il quarto giorno era somministrato a tutti gli animali monomeri di  $A\beta_{1-42}$  (in *blu*) e i topi erano registrati per 24 ore. Infine il settimo giorno tutti gli animali, all'inizio della fase di luce, erano trattati con oligomeri di  $A\beta_{1-42}$  (in *arancione*) e registrati per le successive 24 ore.

muoversi (fig. 4.3.A).

Al termine della fase sperimentale si procedeva alla verifica del corretto posizionamento della cannula guida, come criterio d'inclusione dei soggetti nelle analisi successive.

#### 4.3.4.1 - VERIFICA POSIZIONAMENTO CANNULA GUIDA

Al fine di verificare il corretto posizionamento della cannula guida nel ventricolo laterale si sono eseguite due prove: una funzionale e l'altra anatomica.

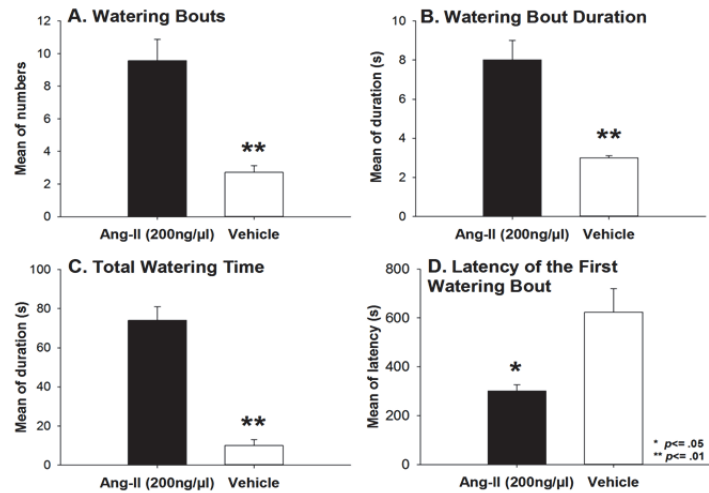
recupero (*wash out*). In seguito a ciascun trattamento, quindi, gli animali erano registrati poligraficamente per 24 ore continue, in condizioni normali di laboratorio (fig. 4.3.B).

Ogni iniezione era effettuata mediante l'utilizzo di un apposito ago (micro-tubo d'acciaio inossidabile, lunghezza: 9 mm, 30 gauge), posto all'interno della cannula guida. L'ago era collegato mediante micro-tubo flessibile (Tygon, ID: 0,25 mm, OD: 0,76 mm) a una siringa Hamilton da 10  $\mu$ l. Il sito d'iniezione era a livello del ventricolo laterale sinistro, con coordinate stereotassiche di: AP: 0,0 mm L: + 1,0 mm dal bregma, DV: - 3,0 mm dalla dura madre. Il tempo totale di somministrazione era di quattro minuti: due minuti d'infusione di 1,5  $\mu$ l di soluzione e due minuti di attesa, con l'ago ancora inserito, per consentirne la diffusione. Al fine di minimizzare lo stress, gli animali durante l'iniezione erano liberi di

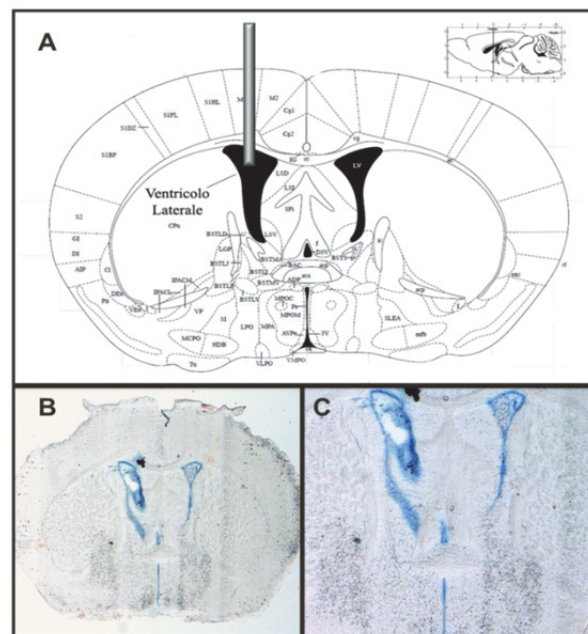
**Prova funzionale.** L'angiotensina II (ang-II) è un peptide coinvolto principalmente nelle risposte compensatorie all'ipovolemia, come nell'aumento della pressione sanguigna e la stimolazione neurale all'assunzione di acqua e di sali (Fitzsimons, 1998). Studi sperimentali hanno confermato che in molte specie animali, tra le quali i

roditori, la somministrazione sistemica o intracranica di ang-II causa un immediato aumento di assunzione di acqua (Buggy and Johnson, 1978). In un esperimento, condotto nel nostro laboratorio, topi cui erano somministrati ICV 200 ng di angiotensina-II mostravano un aumento del comportamento di abbeveraggio nei 30 minuti successivi all'iniezione, rispetto alla condizione in cui erano iniettati con un veicolo (acqua sterile apirogena). Questo comportamento di ricerca di acqua era palesato in un aumento degli episodi, della durata media e totale di abbeveraggio, e in una minor latenza al primo comportamento di abbeveraggio (fig. 4.4).

Per questo motivo l'iniezione ICV di ang-II è un buon metodo funzionale per valutare il corretto posizionamento della cannula guida. Alla fine della fase sperimentale di questo esperimento, quindi, era



**FIGURA 4.4.** Prova funzionale. Grafici rappresentanti l'osservazione del comportamento di abbeveraggio nei 30 minuti successivi alla somministrazione ICV di 1µl di angiotensina-II (Ang-II 200 ng/µl, colonne in *nero*) e di 1µl di acqua sterile apirogena (*vehicle*, colonne in *bianco*) in 7 topi C57BL/6J. **A.** media del numero totale di comportamenti di abbeveraggio; **B.** Media dei secondi di ogni singolo comportamento di abbeveraggio; **C.** Media dei secondi totali passati ad abbeverarsi; **D.** Media dei secondi di latenza al primo episodio di abbeveraggio dopo la somministrazione dei trattamenti. L'analisi del comportamento si è ottenuta mediante t-test per campioni appaiati. Un asterisco (\*) indica un valore di *p* minore o uguale a 0,05; due asterischi (\*\*) indicano un valore di *p* minore o uguale a 0,01.



**FIGURA 4.5.** Prova anatomica. **A.** sezione coronale del cervello di un topo (modificata da Paxinos and Franklin, 2004), in *grigio* è segnalato l'ago per l'iniezione. **B.** e **C.** stessa sezione coronale del cervello di un topo di questo esperimento dopo iniezione ICV di colorante (cresyl violetto) a due diversi ingrandimenti (**B.** 6.3X; **C.** 11X).

somministrato ICV 1  $\mu$ l di ang-II (200 ng/ $\mu$ l) in tre minuti: un minuto d'infusione e due minuti di attesa con ago inserito, per permettere la diffusione della soluzione. Al termine dell'iniezione si osservava il comportamento per i seguenti 30 minuti, valutando la latenza, frequenza e numero di comportamenti di abbeveraggio.

**Prova anatomica.** A fine esperimento, dopo il sacrificio, gli animali erano iniettati ICV con 2  $\mu$ l di colorante (*cresyl violetto*) in un intervallo di tempo di quattro minuti (due minuti d'infusione e due di attesa). Dopo quest'operazione si procedeva all'estrazione dell'encefalo e al suo congelamento. Al fine di ottenere una valutazione istologica, l'encefalo era sezionato e analizzato al microscopio. In questo modo era possibile valutare se le regioni colorate corrispondevano ai soli ventricoli (fig. 4.5) e quindi includere o meno il soggetto nelle successive analisi.

In tutti gli animali analizzati entrambe le prove hanno avuto un esito positivo. Per questo motivo i topi sono stati tutti inclusi nelle analisi successive.

#### 4.3.4.2 - PREPARAZIONE SOLUZIONI

Di seguito saranno descritte le procedure utili alla preparazione delle tre soluzioni che sono state utilizzate in questo esperimento.

**PBS.** Il tampone fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*) era preparato mediante la seguente formulazione: 2,5 g/L di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 15,76 g/L di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 9 g/L di NaCl. Il PBS 1X così preparato aveva pH di 7,4. Per essere utilizzato sia come trattamento di controllo sia come veicolo di diluizione degli oligomeri e monomeri di  $\text{A}\beta_{1-42}$ , era portato a una concentrazione di 0,5X.

**Monomeri e oligomeri di  $\text{A}\beta_{1-42}$ .** Il depsi-peptide  $\text{A-}\beta_{1-42}$  era sintetizzato seguendo procedure già descritte in letteratura (Coin et al., 2007;Sohma et al., 2004). Al contrario della forma nativa del peptide, il depsi-peptide è molto solubile e possiede una minore propensione a formare aggregati spontanei in soluzione (Taniguchi et al., 2007;Taniguchi et al., 2009). L'aggiunta di una soluzione basica al depsi-peptide ha permesso di ottenere, mediante un processo denominato *switching*, il peptide nativo di  $\text{A}\beta_{1-42}$ .

La soluzione alcalina così ottenuta era diluita in PBS e immediatamente utilizzata così da ottenere monomeri di  $\text{A}\beta_{1-42}$ : in queste condizioni i peptidi non erano in grado di potersi aggregare, dato il breve tempo intercorso dallo *switching* all'iniezione di questa soluzione.

Al fine di ottenere gli oligomeri di  $\text{A-}\beta_{1-42}$  la soluzione alcalina era diluita in questo modo: 100  $\mu$ M di  $\text{A-}\beta_{1-42}$  in 50 mM PBS, 150 mM NaCl e il pH 7,4; in seguito era incubata per 24 ore a 22°C

(Lauren et al., 2009). Così facendo data l'alta temperatura e il lungo tempo d'incubazione, i peptidi di A- $\beta_{1-42}$  tendevano all'aggregazione in oligomeri.

Tutte le preparazioni di A- $\beta_{1-42}$  (monomeri e oligomeri) erano diluite a 1  $\mu$ M in PBS prima di essere somministra intra-cerebro-ventricolarmente.

### **4.3.5 - REGISTRAZIONE DEI SEGNALI – III**

I segnali registrati in questo esperimento erano gli stessi dei precedenti esperimenti (EEG, MA e temperatura ambientale) ed erano trattati con le medesime condizioni (cfr. sez. 4.1.5 – REGISTRAZIONI DEI SEGNALI – I).



## 4.4 - ANALISI DEI DATI

La registrazione dei segnali e la loro analisi sono state eseguite con le stesse modalità per tutti e tre gli esperimenti. Per questa ragione sono descritte unicamente in questo paragrafo.

### 4.4.1 - ANALISI DEL CICLO VEGLIA-SONNO

I segnali registrati sono stati analizzati visivamente (*scoring* visivo) per epoche di 12 secondi al fine di determinare lo stato di vigilanza (veglia, sonno NREM, sonno REM) in cui si trovava l'animale in quella specifica epoca. La determinazione dello stato comportamentale era effettuata grazie all'analisi del tracciato EEG e dell'attività motoria mediante un apposito software (ICELUS Analysis, M. Opp, Università del Washington). Il software provvedeva anche a sottoporre il segnale EEG a una trasformata di Fourier veloce (*fast Fourier transform*, FFT), producendo spettri di potenza tra gli 0,5 e 20 Hz in intervalli di 1 Hz, per ogni epoca di 12 secondi. Di questi spettri erano tenute in considerazione due bande di frequenza: delta (0,5 - 4 Hz) e theta (6 - 9 Hz), che erano utili per lo *scoring* visivo.

#### 4.4.1.1 - ANALISI QUANTITATIVA DEL SONNO

A ogni epoca di 12 secondi era assegnato un determinato stato di vigilanza (sonno REM, sonno NREM e veglia) sulla base dei cambiamenti stato-dipendenti in molteplici parametri considerati, tra cui il segnale EEG, FFT del segnale EEG e attività motoria (Baracchi and Opp, 2008). In breve, all'epoca era assegnato lo stato di veglia se il segnale EEG mostrava una bassa ampiezza e una frequenza mista, accompagnati da un elevato grado di attività motoria. Il sonno NREM era attribuito se vi era un incremento nell'ampiezza assoluta del segnale EEG, una prevalenza, nello spettro di potenza, della banda delta rispetto a quella theta, e un calo dell'attività motoria. Il sonno REM era identificato da un tracciato EEG di bassa ampiezza e una marcata prevalenza della banda theta a dispetto di quelle delta, e un'assenza di attività motoria. Epoche che presentavano artefatti di movimento o elettrici venivano segnalate ed escluse dall'analisi. Inoltre, i ceppi di topi transgenici (FFI e CJD) e i topi dopo la somministrazione di oligomeri sintetici di  $\beta$ -A<sub>1-42</sub>, mostravano epoche in cui l'attività EEG non era attribuibile a nessuno dei tre stati di vigilanza, perciò erano siglate come quarto ("*unscored*") stato e

analizzate in maniera indipendente. Queste epoche erano caratterizzate da *burst* di complessi polifasici con durata da 0,5 a 4,5 secondi, di ampiezza varia, ma in molti casi più alta dell'ampiezza durante il sonno NREM; mentre il picco di frequenza di questi complessi era attorno ai 7 - 8 Hz (Dossena et al., 2008). Gli stessi topi, inoltre, mostravano anche delle anomale onde a dente di sega, caratterizzate da una frequenza di circa 4 Hz. Queste attività EEG anomale non erano riscontrate né negli altri due ceppi di topi non transgenici (KO e WT) né in topi in seguito alla somministrazione di PBS e di monomero di  $\beta$ -A<sub>1-42</sub> (esperimento III).

#### **4.4.1.2 - ANALISI DELL'ARCHITETTURA DEL SONNO**

Una volta terminato lo *scoring* era possibile, quindi, avere informazioni sia sulla quantità di ogni stato di vigilanza sia sulla sua precisa architettura, ossia il numero di episodi di ciascuno stato di vigilanza e la loro relativa durata, nonché il numero di transizioni di fase da uno stato all'altro. I criteri per la determinazione del numero degli episodi e la loro durata sono stati precedentemente descritti (Opp, 1997) e includevano un numero minimo di epoche consecutive spese in un dato stato di vigilanza. In altri termini, episodi di sonno NREM, sonno REM e veglia inferiori ai 24 secondi non venivano considerati come episodi di per sé. Da quest'analisi era derivabile anche il numero di passaggi da uno stato di vigilanza all'altro (transizioni), che rappresenta un indice importante per valutare la frammentazione del ciclo veglia-sonno e di conseguenza la sua qualità.

#### **4.4.1.3 - ANALISI SPETTRALE DEL SONNO**

Le caratteristiche spettrali dell'EEG sono state analizzate *off-line* mediante la trasformata di Fourier veloce (FFT). Questa è stata utilizzata per ottenere i poteri spettrali in ciascun stato di vigilanza per ogni animale. L'FFT era calcolata in 6 consecutivi segmenti di 2 secondi dell'intero EEG privo di artefatti. In seguito, si eseguiva la media di questi 6 segmenti in modo da ottenere uno spettro unico per ogni epoca (ogni 12 secondi). In un secondo tempo, per ogni ora era eseguita una media all'interno di ogni stato di vigilanza (sonno REM, sonno NREM e veglia). Date le differenze nel segnale EEG tra gli animali, le medie orarie degli spettri stato-dipendente sono state sottoposte a un processo di normalizzazione in base al potere spettrale medio di ogni animale. Al fine di ottenere dei valori di riferimento, il potere spettrale totale di ogni stato di vigilanza era ottenuto dalla media degli spettri di tutte le frequenze tra 0,5 e 20 Hz. Una volta fatto ciò si ottenevano valori di riferimento separati per la luce e il buio, ottenuti dalla media



degli spettri durante le 12 ore di luce e le 12 di buio. La potenza spettrale EEG relativa in ogni frequenza era quindi espressa come percentuale della potenza EEG media di quel determinato stato di vigilanza durante quella porzione del ciclo luce-buio.

#### **4.4.1.4 - ANALISI DELLA POTENZA SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM**

Un altro indice utilizzato per l'analisi del ciclo veglia-sonno è la potenza spettrale della banda delta durante il sonno NREM, chiamato anche attività a onde lente (Slow Wave Activity, SWA). Questo indice rappresenta la potenza spettrale dell'EEG che è presente nella banda delta (0,5 - 4 Hz) durante gli episodi di sonno NREM. Dato che le oscillazioni a ritmo delta, solitamente, si osservano durante il sonno NREM, questo valore (a volte chiamato NREM *delta power*) è guidato dalla distribuzione dello stesso sonno NREM durante le 24 ore: nel periodo di luce, quando il sonno NREM è più alto, il NREM *delta power* decresce gradualmente; mentre durante il periodo di buio, il sonno NREM diminuisce, mentre il NREM *delta power* aumenta, soprattutto dopo l'inizio della fase di luce. L'andamento della potenza del delta è un indice della necessità di sonno. In questi esperimenti, grazie alla trasformata di Fourier veloce, il NREM *delta power* di ogni topo è stato calcolato e normalizzato sulla media totale delle 24 ore.

#### **4.4.2 - ANALISI DELL'ATTIVITÀ MOTORIA**

Il segnale dell'attività motoria era costituito da variazioni di potenziale proporzionale all'entità del movimento rilevato. Queste variazioni, mediante apposito software, erano rese tutte positive per integrazione dei valori di ogni animale in ciascun'epoca di 12 secondi. In seguito, era eseguita una media per ogni ora dei valori, in modo da valutare le variazioni circadiane dell'attività motoria.



## 4.5 - ANALISI STATISTICHE

Nei tre esperimenti, sopra descritti, sono stati utilizzati modelli statistici diversi per l'analisi dei dati, per questo, di seguito, sono descritti in maniera separata per ogni esperimento.

### 4.5.1 - ESPERIMENTO N.1

#### 4.5.1.1 - CICLO VEGLIA-SONNO

**Analisi quantitativa.** In seguito allo *scoring* visivo, per ogni ora di registrazione erano calcolate le percentuali di tempo passate nei tre diversi stati comportamentali (veglia, sonno NREM, sonno REM). Ottenuti questi dati, era eseguita un'analisi statistica su blocchi di 12 ore, in cui erano considerate due variabili indipendenti: i) il ceppo (topi WT, topi KO, e topi FFI), al fine di poter rilevare le differenze statistiche nelle diverse variabili dipendenti; ii) il tempo (fase di luce e fase di buio), per valutare la variazione temporale delle percentuali di tempo spese nei diversi stati di vigilanza tra le ore diurne e quelle notturne. Le variabili dipendenti erano costituite dalle percentuali di tempo spese in veglia, sonno NREM e sonno REM.

Le differenze statistiche sono state evidenziate mediante l'implementazione di un modello misto lineare con covarianza auto-regressiva di primo ordine, in cui la variabile "ceppo" era un fattore fisso (*between-subject*, tra i soggetti), viceversa il tempo era un fattore ripetuto (*within-subject*, entro i soggetti). Per evidenziare la direzione della differenza statistica rilevata dal modello misto, i risultati forniti erano approfonditi mediante ulteriori analisi. Quando necessario, era implementata un'ANOVA (analisi della varianza) univariata ad una via con fattore ceppo su ogni livello della variabile tempo (luce-buio), seguita dal relativo test *post hoc* con correzione di Bonferroni.

**Analisi dell'architettura.** Ottenuti i parametri distintivi dell'architettura del sonno, per ogni ora erano calcolati: il numero di transizioni di fase, il numero di episodi e la durata media di ciascuna fase del ciclo veglia-sonno. In seguito, queste variabili erano analizzate, in blocchi di 12 ore, mediante lo stesso modello statistico e le stesse modalità descritte per l'analisi quantitativa.

**Analisi spettrale.** I valori di potenza spettrale sono stati ottenuti sia per la fase di luce che per quella di buio ed espresse come percentuali del potere spettrale totale. Questi dati sono stati suddivisi in due bande d'interesse: delta (0,5 – 5 Hz) e theta (6 – 10 Hz). La banda delta è

stata analizzata nei soli valori spettrali derivanti dalle epoche di sonno NREM; mentre la banda theta solo in quei valori derivanti dalle epoche di sonno REM.

In ognuna di queste bande è stato applicato lo stesso modello misto, descritto in precedenza, ma in questo caso il fattore ripetuto era costituito dalla frequenza stessa (0,5 – 5 Hz o 6 – 10 Hz), mentre il fattore fisso era sempre il ceppo. Sulla base dei risultati sono stati eseguiti confronti multipli per ceppo su ogni banda d'interesse mediante correzione di Fisher (LSD).

**Potenza spettrale della banda delta durante il sonno NREM.** Le variazioni del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM sono state analizzate separatamente per la fase di luce e quella di buio. I valori orari sono stati normalizzati sulla media totale delle 24 ore di registrazione e analizzati in blocchi di due ore. Il confronto statistico è stato ottenuto mediante il solito modello misto, in cui il ceppo era il fattore fisso e il tempo (blocchi di 2 ore) quello ripetuto. Sulla base dei risultati forniti sono stati implementati modelli misti (ceppo x tempo) su blocchi di 6 ore, in modo da renderne più chiara l'interpretazione. In seguito, l'applicazione di un'ANOVA a una via (fattore ceppo) in ogni blocco di 6 ore e del relativo test *post hoc* con correzione di Bonferroni, sono stati utili alla comprensione della direzione delle differenze rilevate.

#### **4.5.1.2 - ATTIVITÀ MOTORIA**

Al fine di valutare le differenze nell'attività motoria generale tra i tre ceppi è stato implementato lo stesso modello misto su blocchi di 12 ore, in cui il fattore fisso era costituito dal ceppo, quello ripetuto dalla fase del ciclo luce-buio. I risultati sono stati, successivamente, approfonditi mediante l'utilizzo di un'ANOVA a una via con fattore ceppo, sia nel periodo di luce sia in quello di buio. L'applicazione del relativo test *post hoc* con correzione di Bonferroni ha sottolineato la direzione delle differenze. Inoltre, per valutare la circadianità dell'attività motoria in ciascun ceppo è stato eseguito un *t-test* per campioni appaiati, in cui è stata messa a confronto l'attività motoria delle ore diurne con quella delle ore notturne.

## 4.5.2 - ESPERIMENTO N.2

### 4.5.2.1 - CICLO VEGLIA-SONNO

Le procedure statistiche utilizzate per questo esperimento sono molto simili a quelle utilizzate per l'esperimento n.1. Verranno riportate in maniera riassuntiva di seguito.

**Analisi quantitativa e dell'architettura.** Il modello statistico utilizzato per questo secondo esperimento è lo stesso del primo esperimento, ad eccezione della presenza di un secondo fattore fisso: l'età. Il modello misto sopra descritto, quindi, in questo caso, era costituito da due fattori fissi: il ceppo (topi WT, topi KO e topi CJD) e l'età dei topi (topi a 6, 12 e 18 mesi) e da un fattore ripetuto: il tempo (luce e buio). Le misure dipendenti erano costituite dalle stesse variabili quantitative (percentuali di sonno NREM, REM e veglia) e qualitative (episodi e durata degli episodi di ogni stato comportamentale; transizioni di fase). In seguito all'applicazione del modello misto e all'ANOVA a due vie (ceppo x età) su ogni livello della variabile tempo, i dati venivano suddivisi inizialmente per ceppo e poi per età. In questo modo era possibile evidenziare, nel primo caso, le differenze tra le diverse età all'interno dello stesso ceppo; nel secondo caso, si ottenevano i confronti tra ceppi in topi della stessa età. Questo al fine valutare le differenze tra i ceppi analizzati e la progressione delle alterazioni di sonno nelle diverse età.

**Analisi Spettrale.** Come descritto sopra, i valori di potenza spettrale sono stati ottenuti sia per la fase di luce che per quella di buio, come percentuali della potenza spettrale durante le fasi di sonno REM. Questi dati sono stati suddivisi in due bande d'interesse: delta (0,5 – 5 Hz) e theta (6 – 10 Hz). La banda delta è stata analizzata nei soli valori spettrali derivanti dalle epoche di sonno NREM; mentre la banda theta solo in quei valori derivanti dalle epoche di sonno REM. In ognuna di queste bande è stato applicato lo stesso modello misto, in precedenza descritto, ma in questo caso il fattore ripetuto era costituito dalla frequenza stessa (0,5 – 5 Hz o 6 – 10 Hz). In seguito ai risultati forniti, si procedeva a dividere i dati per ceppo e per età, in modo da confrontare i topi sia per età che per ceppo di appartenenza, mediante test post-hoc con correzione di Fisher.

**Potenza spettrale della banda delta durante il sonno NREM.** Il modello misto (ceppo x età x tempo) è stato applicato su ogni blocco di 6 ore (come descritto per l'esperimento n.1, cfr. sez. 4.2.5.1 – ESPERIMENTO N.1). In seguito, i dati sono stati suddivisi per ceppo ed età, in modo da applicare test *post hoc* con correzione Bonferroni.

### 4.5.2.2 - ATTIVITÀ MOTORIA

In questo esperimento non sono state ancora valutate le differenze nell'attività motoria, proponiamo di provvedervi quanto prima.

### 4.5.3 - ESPERIMENTO N. 3

#### 4.5.3.1 - CICLO VEGLIA-SONNO

**Analisi quantitativa.** Mediante *scoring* visivo si sono ottenute le percentuali di tempo orarie spese nei diversi stati comportamentali in seguito ai tre trattamenti: PBS, monomero e oligomeri. Queste percentuali di tempo sono state suddivise in blocchi di quattro ore. Su questi dati è stata implementata un'ANOVA a misure ripetute (ANOVA RM) a 2 vie: il tempo (sei livelli) e il trattamento (tre livelli: PBS, monomeri e oligomeri). Sulla base dei risultati ottenuti, su ogni blocco di ore, è stata eseguita un'ANOVA RM ad una via (fattore trattamento), seguita dal relativo test *post hoc* con correzione di Fisher, al fine di evidenziare la direzione delle differenze statistiche rilevate.

**Analisi dell'architettura.** I parametri qualitativi del ciclo veglia-sonno (transizioni, numero di episodi di ciascuna fase e relativa durata) erano determinati per ogni ora di registrazione. In seguito, questi erano analizzati con le medesime procedure descritte per l'analisi quantitativa.

**Analisi spettrale.** I valori di potenza stato-dipendenti di ogni frequenza (0,5 - 20 Hz) sono stati ottenuti in ogni blocco di quattro ore, come percentuale rispetto al potere spettrale totale dell'EEG. In un secondo tempo, le potenze spettrali sono state suddivise in due bande d'interesse: delta (0,5 – 5 Hz) e theta (6 – 10 Hz). In ogni banda di frequenza considerata è stata implementata un'ANOVA RM a due vie: frequenza e trattamento. Questa era seguita da confronti multipli con correzione di Fisher. L'analisi statistica delle potenze spettrali è stata eseguita separatamente per le ore di luce e le ore di buio e, in seguito, solo nei blocchi orari in cui si sono evidenziate delle alterazioni del ciclo veglia-sonno con le precedenti analisi.

**Potenza spettrale della banda delta durante il sonno NREM.** I valori spettrali della potenza della banda delta durante le fasi di sonno NREM sono stati ottenuti per ogni ora di registrazione e normalizzati sulla potenza spettrale media nelle 24 ore di registrazione. In seguito è stata applicata un'ANOVA RM a due vie (tempo x trattamento) su blocchi di quattro ore, seguita da relativo test *post hoc* con correzione di Fisher.

#### 4.5.3.2 - ATTIVITÀ MOTORIA

I confronti tra l'attività motoria dopo la somministrazione dei 3 trattamenti sono stati eseguiti sia su blocchi di 12 ore che di 4 ore, mediante un ANOVA RM a due vie (tempo x trattamento), seguita dal relativo test *post hoc* con correzione di Bonferroni. Per valutare la circadianità dell'attività motoria generale, un *t test* a campioni appaiati è stato utilizzato per confrontare l'attività durante le ore diurne e notturne dopo ciascun trattamento.

# 5. - RISULTATI





I risultati ottenuti sono presentati in maniera separata per ogni esperimento. I valori dei confronti multipli sono espressi come medie o differenze di medie  $\pm$  l'errore standard della media (ES); Questi quando non presenti nel testo sono riportati in tabella.

Con il termine ANOVA s'intende l'analisi della varianza.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il pacchetto statistico SPSS v. 20 (IBM Corp.). I grafici sono stati realizzati con il pacchetto Sigmaplot v. 12.5 (Systat Software, Inc.).

Le tabelle e i grafici sono riportati alla fine di ogni sezione riguardante l'esperimento preso in analisi, questo per rendere più scorrevole la lettura del testo.

## **5.1 – ESPERIMENTO N. 1:**

### **MODELLO MURINO DI FFI**

#### **5.1.1 - RISULTATI**

##### **5.1.1.1 - RIDUZIONE DI SONNO REM IN TOPI FFI**

L'analisi delle percentuali del tempo trascorso nei diversi stati comportamentali mostra che, durante il periodo di luce, i topi FFI presentano una marcata riduzione dell'ammontare del sonno REM rispetto agli altri due ceppi di topi. Nel periodo di buio, invece, non si osservano differenze significative nelle quantità di sonno REM tra i vari ceppi analizzati (fig. 5.1.A; tab. 5.1).

La perdita di sonno REM osservata non è diretta conseguenza di una riduzione del sonno NREM. Durante le fasi di luce e di buio, infatti, non si rilevano differenze statisticamente significative nelle percentuali di sonno NREM tra i tre ceppi (fig. 5.1.B; tab. 5.1).

In accordo con la riduzione del sonno REM, durante le ore di luce i topi FFI spendono più tempo svegli rispetto agli altri due ceppi analizzati (tab. 5.1). Durante la fase di buio, le percentuali di veglia sono, invece, comparabili tra i ceppi (tab. 5.1).

### **5.1.1.2 - LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONI DELLA SUA ARCHITETTURA**

La decurtazione di sonno REM nei topi FFI è interamente dovuta a una marcata riduzione nel numero dei suoi episodi. Durante la fase di luce, i topi FFI mostrano una certa inerzia a iniziare le fasi di sonno REM. Questo è dimostrato dalla diminuzione del numero degli episodi di sonno REM rispetto agli altri due ceppi (fig. 5.2.A; tab. 5.2). La durata di ogni singolo episodio di sonno REM è, invece, comparabile con gli altri due ceppi, sia in fase di luce che di buio (fig. 5.2.B; tab. 5.2).

Il numero di episodi degli altri stati di vigilanza (sonno NREM e veglia) è simile tra i tre ceppi analizzati (tab. 5.3). Durante le ore di luce, i topi FFI mostrano una riduzione nella durata degli episodi di sonno NREM rispetto ai topi WT (tab. 5.2). Nelle ore di buio, invece, la durata degli episodi di veglia si riduce nei topi FFI rispetto agli altri due ceppi (tab. 5.2), in accordo con l'aumento delle percentuali di tempo trascorse in veglia (come descritto sopra).

### **5.1.1.3 - LA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO È AUMENTATA IN TOPI FFI**

La frammentazione del sonno è un indice proporzionale al numero di passaggi di fase da uno stato di vigilanza all'altro (detto anche transizioni). L'analisi delle transizioni di fase rende evidente un significativo aumento della frammentazione del sonno, sia nelle fasi di luce che di buio, nei topi FFI rispetto ai ceppi di controllo (fig. 5.2.C; tab. 5.2). Il sonno dei topi FFI risulta, quindi, essere più frammentato rispetto agli altri due ceppi di topi.

### **5.1.1.4 - IL POTERE SPETRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM È RIDOTTO IN TOPI FFI**

Durante la fase di luce, la potenza spettrale della banda theta (6 – 10 Hz) durante le fasi di sonno REM si riduce significativamente nei topi FFI rispetto ai topi WT (differenza delle medie  $\pm$  ES: 1,58%  $\pm$  0,60%,  $p = 0,01$ , i valori sono espressi come percentuale del potere spettrale della banda theta rispetto al potere spettrale totale durante le fasi di REM prive di artefatti, fig. 5.3.a) e ai topi KO (differenza delle medie  $\pm$  ES: 1,16%  $\pm$  0,56%,  $p = 0,04$ , fig. 5.3.a). Una simile riduzione si trova anche nel periodo di buio, in cui la potenza spettrale della banda theta è più alta nei topi WT in confronto ai topi FFI (differenza delle medie  $\pm$  ES: 2,04  $\pm$  0,64,  $p = 0,03$ , fig. 5.3.b).

### **5.1.1.5 - LA VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM È ALTERATA IN TOPI FFI**

L'analisi delle variazioni spettrali della banda delta durante gli episodi di sonno NREM nelle 24 ore mostra una sua riduzione nei topi FFI rispetto agli altri ceppi, durante le prime 6 ore della fase di luce (FFI vs WT:  $11,14 \pm 2,11$ ,  $p < 0,001$ ; FFI vs KO:  $8,66 \pm 2$ ,  $p < 0,001$ ; i valori indicano la differenza tra le medie  $\pm$  ES, fig. 5.4). Durante le prime 6 ore di buio, i topi WT mostrano un aumento della variazione del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM rispetto sia ai topi FFI ( $10,31 \pm 2,67$ ,  $p = 0,001$ ; i valori indicano la differenza tra le medie  $\pm$  ES) che ai topi KO ( $7,72 \pm 2,61$ ,  $p = 0,017$ ; i valori indicano la differenza tra le medie  $\pm$  ES, fig. 5.4).

### **5.1.1.6 - PRESENZA DI ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI FFI**

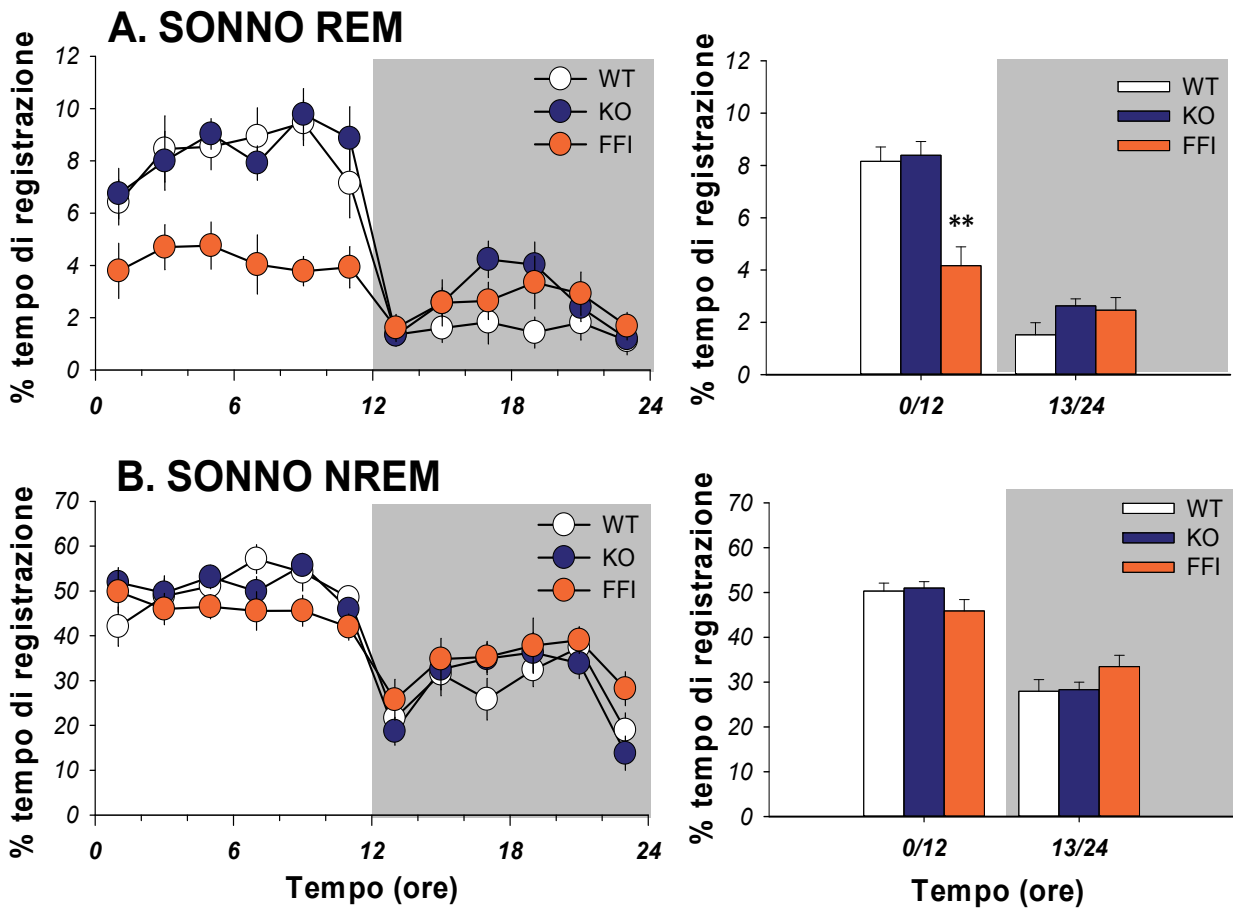
Nei topi FFI si rileva un'attività EEG anomala e patologica. Quest'attività consiste in complessi polifasici ad alto voltaggio con un picco di frequenza attorno ai 7 - 8 Hz (fig. 5.5). Questo tipo di attività si distribuisce egualmente durante le ore di luce e di buio del ciclo luce/oscurità (rispettivamente  $8,81\% \pm 3,42\%$  e  $12,02\% \pm 3,70\%$ , i valori, espressi come media  $\pm$  ES, rappresentano le percentuali di epoche in cui è presente almeno un complesso polifasico sul numero totale di epoche del periodo di luce e della fase di buio). I complessi polifasici sono presenti nel  $9,60\% \pm 3,07\%$ ,  $2,14\% \pm 0,99\%$  e  $16,36\% \pm 5,25\%$  di epoche siglate rispettivamente come sonno REM, sonno NREM e veglia. Questo tipo di attività non si rileva negli altri due ceppi di topi (WT e KO).

### **5.1.1.7 - RIDUZIONE DELL'ATTIVITÀ MOTORIA E APPIATTIMENTO DEI RITMI CIRCADIANI IN TOPI FFI**

L'attività motoria generale dei topi FFI è ridotta rispetto agli altri due ceppi (FFI vs WT:  $73,94 \pm 17,53$ ,  $p < 0,001$ ; FFI vs KO:  $66,9 \pm 16,58$ ,  $p < 0,001$ ). Il risultato principale è che durante il periodo di massima attività nei roditori (fase di buio), i topi FFI mostrano una riduzione dell'attività motoria rispetto agli altri due ceppi (tab. 5.3). Questa riduzione comporta un appiattimento del ritmo circadiano dell'attività motoria. Infatti, mentre i topi WT e KO mostrano una differenza significativa nella quantità di attività motoria tra il periodo di luce e di quello di buio, questo cambiamento non è osservabile in topi FFI (tab. 5.3).

L'appiattimento dell'attività motoria si riflette anche in una perdita della circadianità del ritmo veglia-sonno: analizzando le percentuali totali di sonno (percentuali di sonno NREM + percentuali di sonno REM) i topi FFI presentano una riduzione della differenza tra le percentuali di sonno durante la fase di luce e le percentuali di sonno durante le ore di buio, rispetto agli altri due ceppi (tab. 5.3).

## 5.1.2 - GRAFICI E TABELLE

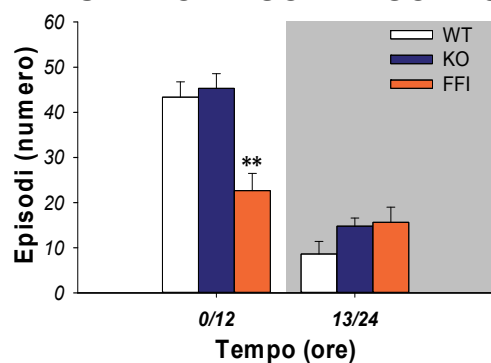


**FIGURA 5.1.** Percentuali di tempo (media  $\pm$  ES) spese in sonno REM (A) e in sonno NREM (B) durante le 24 ore. Nei pannelli di sinistra i dati sono rappresentati in blocchi di due ore; in quelli di destra, in blocchi di 12 ore. In ascissa è indicato il tempo di registrazione; in ordinata le percentuali di tempo spese in sonno REM e NREM sul tempo totale di registrazione (24 ore). Lo sfondo *grigio* identifica il periodo di buio del ciclo luce/oscurità. Ogni cerchietto (a sinistra) e ogni barra dell'istogramma (a destra) rappresenta un diverso ceppo: WT in *bianco* (n = 8), KO in *blu* (n = 10) e FFI in *arancione* (n = 9). Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati eseguiti su blocchi di 12 ore. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

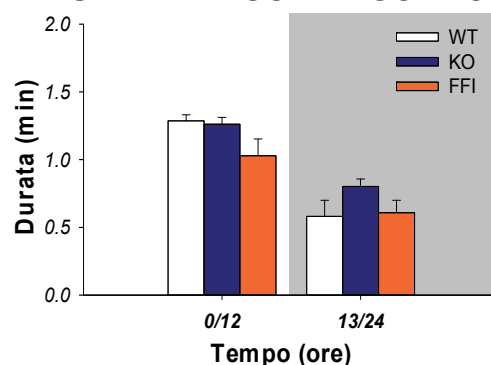
% tempo totale di registrazione			SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA
<b>Luce</b>	WT	(8)	8,16 $\pm$ 0,55 **	50,30 $\pm$ 1,81	41,54 $\pm$ 1,92 *
	KO	(10)	8,39 $\pm$ 0,53 **	51,01 $\pm$ 1,43	40,59 $\pm$ 1,42 *
	FFI	(9)	4,17 $\pm$ 0,72	45,89 $\pm$ 2,54	49,49 $\pm$ 2,70
<b>Buio</b>	WT	(8)	1,53 $\pm$ 0,46	27,94 $\pm$ 2,63	70,53 $\pm$ 2,86
	KO	(10)	2,63 $\pm$ 0,27	28,34 $\pm$ 1,66	69,03 $\pm$ 1,86
	FFI	(9)	2,46 $\pm$ 0,49	33,47 $\pm$ 2,54	63,63 $\pm$ 2,95

**TABELLA 5.1.** Confronti multipli. Percentuali di tempo spese in sonno REM, sonno NREM e veglia durante le ore di luce e le ore di buio. I valori sono stati ottenuti da topi *wild type* controllo (WT), topi *knock out* per la PrP (KO) e topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione associata a insonnia fatale familiare (FFI). I numeri tra parentesi indicano la numerosità di ciascun ceppo di animali. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES per ogni ceppo, suddivisi in blocchi di 12 ore (luce: 0/12 ore; buio: 13/24 ore). Simboli differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative dei confronti multipli per ceppo. (+), (§) e (\*) sono stati impiegati per l'analisi tra ceppi e indicano rispettivamente: WT, KO e FFI. Ciascun simbolo indica una differenza statisticamente significativa tra il valore del ceppo rappresentato e quello del ceppo cui è posto di fianco. Un singolo simbolo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

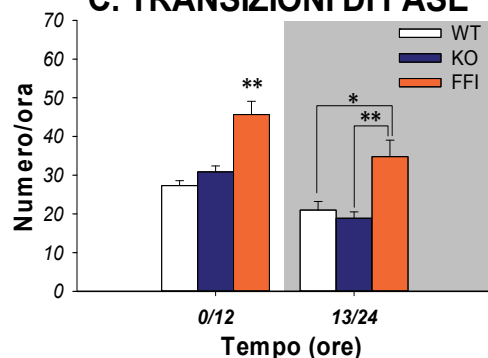
### A. NUMERO EPISODI DI SONNO REM



### B. DURATA EPISODI DI SONNO REM



### C. TRANSIZIONI DI FASE



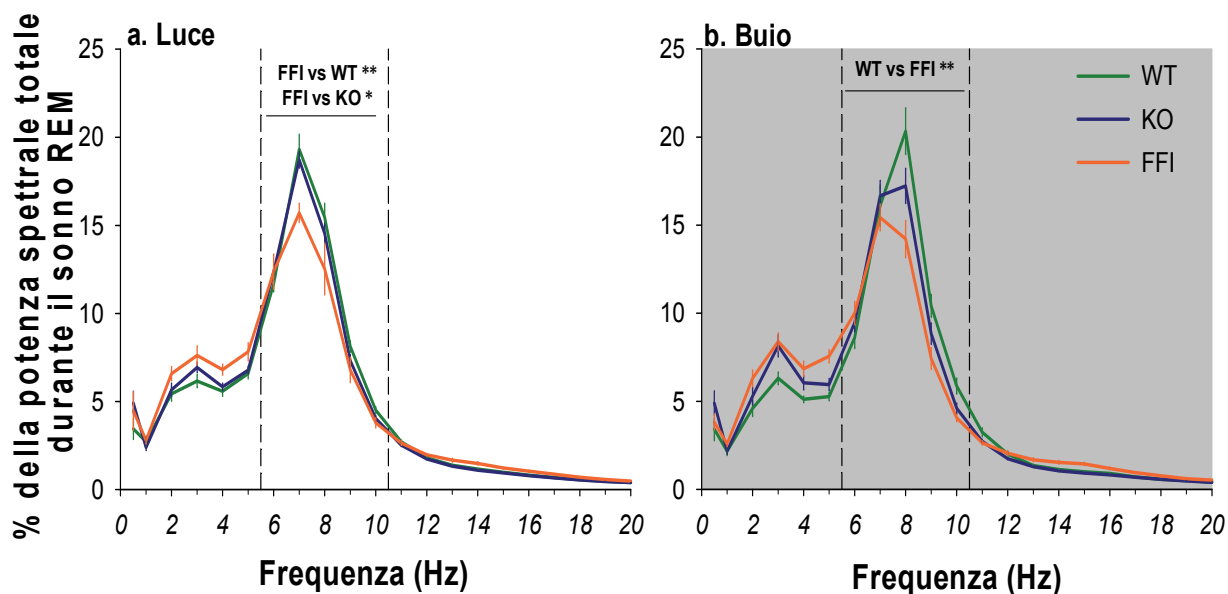
**FIGURA 5.2.** Parametri dell'architettura del sonno. **A.** Numero (media  $\pm$  ES) degli episodi di sonno REM. **B.** Durata (media  $\pm$  ES) di ogni singolo episodio di sonno REM. **C.** Numero per ora (media  $\pm$  ES) delle transizioni di fase da uno stato comportamentale all'altro. In tutti i grafici, i dati sono stati ottenuti per blocchi di 12 ore, come indicato dall'asse delle ascisse. Lo sfondo grigio indica la fase di buio del ciclo luce/oscurità. Ogni barra dell'istogramma rappresenta un diverso ceppo: WT in *bianco* ( $n = 8$ ), KO in *blu* ( $n = 10$ ) e FFI in *arancione* ( $n = 9$ ). Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati compiuti su blocchi di 12 ore. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

		EPISODI (numero)			DURATA EPISODI (min)		
		SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA	SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA
Luce	WT (8)	43,38 $\pm$ 3,41 **	99,85 $\pm$ 5,90	62,50 $\pm$ 6,08	1,29 $\pm$ 0,05	3,62 $\pm$ 0,20 *	6,46 $\pm$ 0,76
	KO (10)	45,30 $\pm$ 3,25 **	110,90 $\pm$ 3,00	72,82 $\pm$ 5,39	1,26 $\pm$ 0,05	3,38 $\pm$ 0,18	5,35 $\pm$ 0,61
	FFI (9)	22,67 $\pm$ 3,81	119,46 $\pm$ 9,69	86,66 $\pm$ 9,39	1,03 $\pm$ 0,12	2,76 $\pm$ 0,28	5,56 $\pm$ 0,84
Buio	WT (8)	8,63 $\pm$ 2,79	72,75 $\pm$ 7,16	49,63 $\pm$ 6,48	0,58 $\pm$ 0,12	2,55 $\pm$ 0,28	15,88 $\pm$ 1,85 *
	KO (10)	14,80 $\pm$ 1,79	64,40 $\pm$ 5,62	41,05 $\pm$ 3,04	0,80 $\pm$ 0,05	2,84 $\pm$ 0,26	18,67 $\pm$ 1,81 **
	FFI (9)	15,67 $\pm$ 3,36	86,10 $\pm$ 7,83	56,76 $\pm$ 3,84	0,61 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,34	9,89 $\pm$ 0,93

		TRANSIZIONI (numero/ora)	
Luce	WT (8)	27,33 $\pm$ 1,30	**
	KO (10)	30,88 $\pm$ 1,54	**
	FFI (9)	45,70 $\pm$ 3,43	
Buio	WT (8)	21,00 $\pm$ 2,24	**
	KO (10)	18,88 $\pm$ 1,68	*
	FFI (9)	34,82 $\pm$ 4,23	

**TABELLA 5.2.** Confronti multipli. (Pannello in alto) numero e durata degli episodi di sonno REM, sonno NREM e veglia, durante le ore di luce e le ore di buio; (pannello in basso) numero di transizioni di fase, durante le ore di luce e di buio. I valori sono stati ottenuti da topi *wild type* controllo (WT), topi *knock out* per la PrP (KO) e topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione associata a insonnia fatale familiare (FFI). I numeri tra parentesi indicano la numerosità di ciascun ceppo di animali. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES per ogni ceppo, suddivisi in blocchi di 12 ore (luce: 0/12 ore; buio: 13/24 ore). Simboli differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative dei confronti multipli per ceppo. (+), (§) e (\*) sono stati impiegati per l'analisi tra ceppi e indicano rispettivamente: WT, KO e FFI. Ciascun simbolo indica una differenza statisticamente significativa tra il valore del ceppo rappresentato e quello del ceppo cui è posto di fianco. Un singolo simbolo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

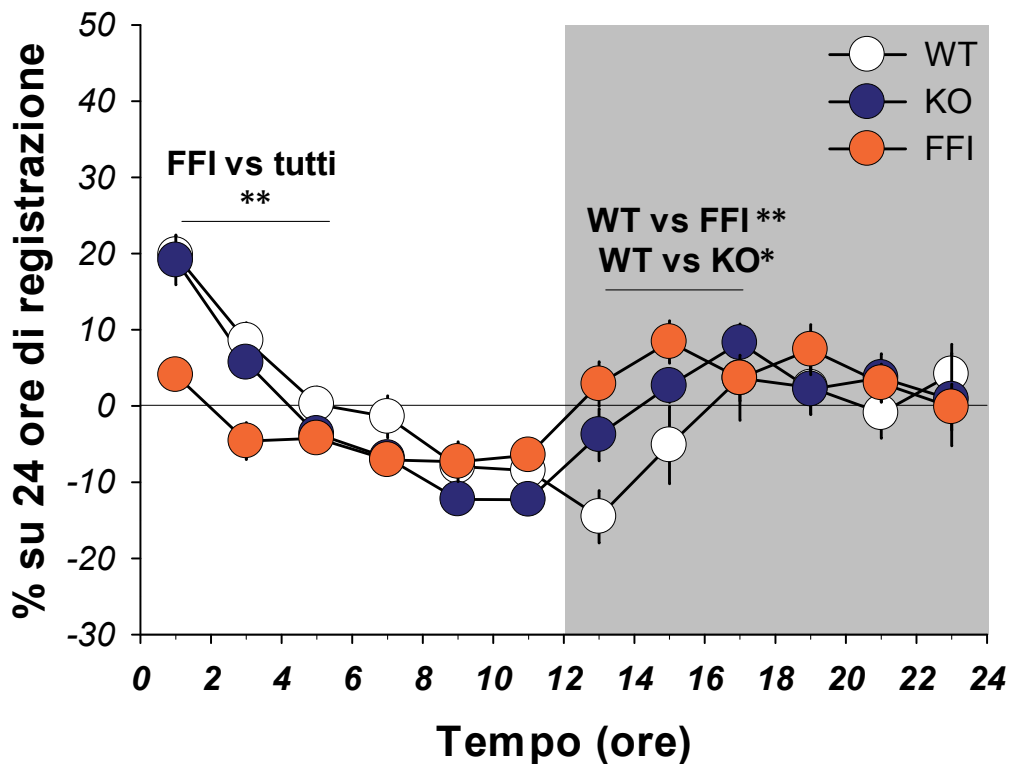
## SPETTRO DI POTENZA DURANTE IL SONNO REM



**FIGURA 5.3.** Potere spettrale normalizzato della registrazione elettroencefalografica nelle epoche di sonno REM prive di artefatti. I valori sono stati ottenuti durante le ore di luce (**a**) e quelle di buio (**b**) da tre ceppi di topi: WT in verde (n = 8), KO in blu (n = 10) e FFI in arancione (n = 9). Gli spettri sono stati i) normalizzati come percentuale del potere spettrale totale di tutte le frequenze durante il sonno REM, ii) calcolati all'interno delle ore di luce e di buio del ciclo luce/oscurità e iii) rappresentati come percentuale media  $\pm$  ES per ogni frequenza. Le analisi statistiche sono state eseguite nella banda theta (6 – 10 Hz). Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

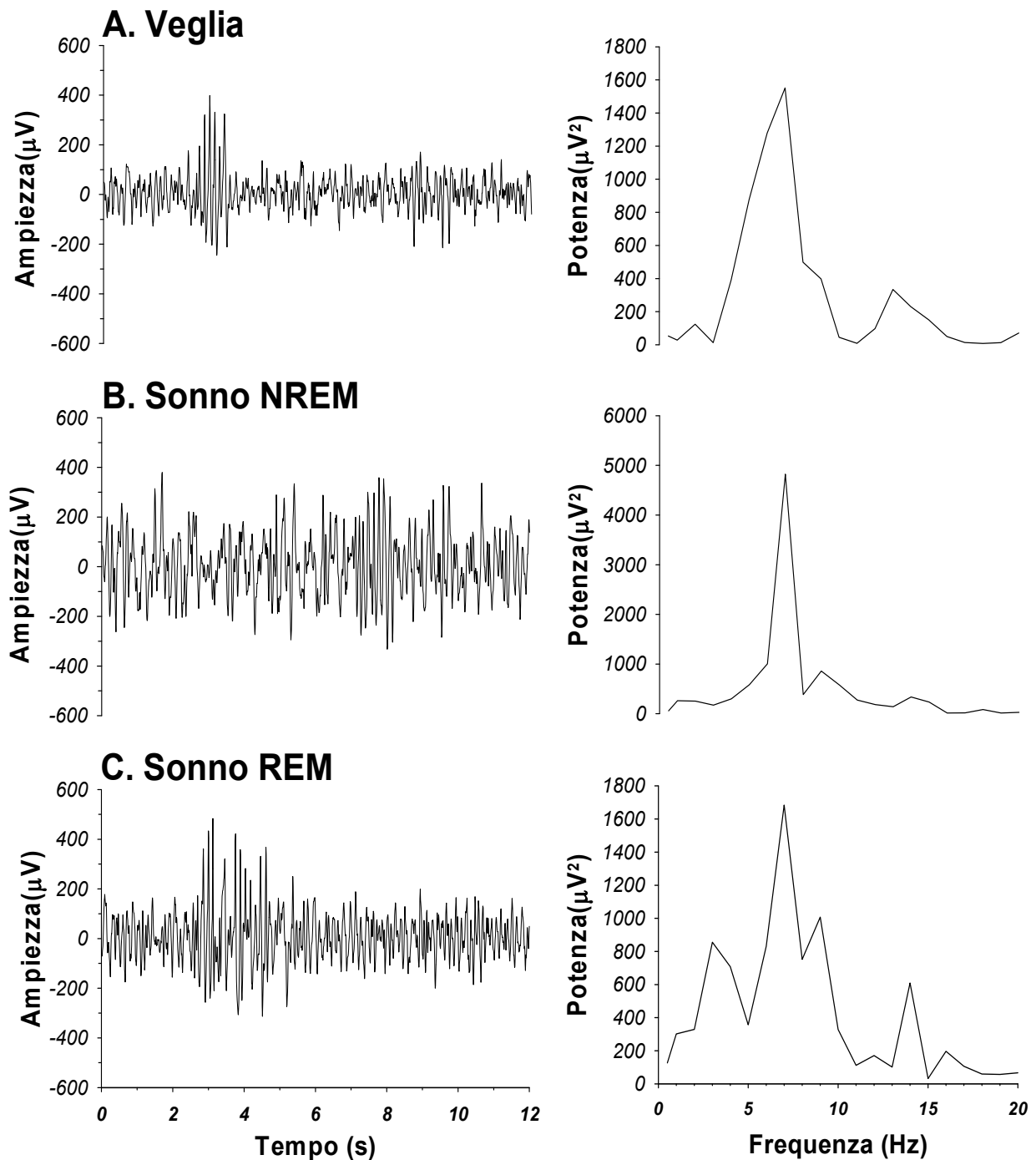


## VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM



**FIGURA 5.4.** Variazione giornaliera del potere spettrale della banda delta (0.5 – 4 Hz) durante epoche di sonno NREM, prive di artefatti, nei tre ceppi di topi: WT in *bianco* (n = 8), KO in *blu* (n = 10) e FFI in *arancione* (n = 9). I dati (media  $\pm$  ES) sono presentati in blocchi temporali di due ore, come percentuale della media totale (24 ore) del potere spettrale della banda delta durante epoche di NREM (indicata dalla linea sullo zero). Lo sfondo *grigio* rappresenta il periodo di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche sono state eseguite su blocchi di 6 ore. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq .05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq .01$ .

## ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI FFI



**FIGURA 5.5.** Esempi di tre epoche EEG (12 s) con un complesso polifasico (pannello di sinistra) e il corrispondente spettro di frequenza ottenuto mediante trasformata veloce di Fourier (pannello di destra), durante la veglia (A), il sonno NREM (B) e il sonno REM (C). I tracciati EEG sono stati ottenuti da un topo FFI. Nei pannelli a sinistra, in ordinata è presente l'ampiezza ( $\mu\text{V}$ ) del tracciato EEG; in ascissa, il tempo di registrazione (s). Nei pannelli a destra in ordinata è presente la potenza spettrale ( $\mu\text{V}^2$ ). In ascissa, le frequenze (Hz) prese in considerazione. Notare come il picco di frequenza del complesso polifasico si colloca a 7 Hz.

<b>SONNO TOTALE (% tempo totale di registrazione)</b>				
<b>Differenze tra periodo di luce e di buio</b>	<i>WT</i>	(8)	28.99 ± 2.47	*
	<i>KO</i>	(10)	28.43 ± 2.36	**
	<i>FFI</i>	(9)	14.59 ± 2.86	
<b>ATTIVITA' MOTORIA (unità arbitraria)</b>				
<b>Luce</b>	<i>WT</i>	(8)	70.70 ± 7.82	** aa
	<i>KO</i>	(10)	52.28 ± 3.72	aa
	<i>FFI</i>	(9)	40.77 ± 4.99	
<b>Buio</b>	<i>WT</i>	(8)	191.57 ± 10.81	**
	<i>KO</i>	(10)	195.92 ± 13.46	**
	<i>FFI</i>	(9)	73.64 ± 20.01	

**TABELLA 5.3.** In alto: differenze nelle percentuali di tempo (media ± ES) trascorse in sonno (sonno NREM + sonno REM) tra le ore di luce e quelle di buio. In basso: quantità di attività motoria (media ± ES) durante il periodo di luce e quello di buio. I valori sono stati ottenuti da topi *wild type* controllo (WT), topi *knock out* per la PrP (KO) e topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione associata a insonnia fatale familiare (FFI). I numeri tra parentesi indicano la numerosità di ciascun ceppo di animali. Simboli differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative dei confronti multipli per ceppo. (+), (\$) e (\*) sono stati impiegati per l'analisi tra ceppi e indicano rispettivamente: WT, KO e FFI. Ciascun simbolo indica una differenza statisticamente significativa tra il valore del ceppo rappresentato e quello del ceppo cui è posto di fianco. La lettera "a" è stata utilizzata, nel pannello in basso, per indicare i confronti effettuati mediante t-test per campioni appaiati e indica una differenza significativa tra l'attività motoria durante le ore di luce e l'attività motoria durante le ore di buio di quel particolare ceppo. Un singolo simbolo o lettera rappresenta un livello di significatività di  $p \leq .05$ ; due simboli o lettere indicano un livello di significatività di  $p \leq .01$ .



## **5.2 - ESPERIMENTO N.2:**

# **MODELLO MURINO DI CJD**

### **5.2.1 - RISULTATI**

#### **5.2.1.1 - PRECOCE RIDUZIONE DI SONNO REM IN TOPI CJD**

Durante la fase di luce, il sonno REM si riduce in maniera significativa nei topi CJD a 18 mesi (anziani) rispetto ai topi di controllo (topi WT e KO) della stessa età, come già è stato descritto in letteratura (Dossena et al., 2008). Il dato più innovativo di questo studio consiste nella riduzione dell'ammontare di sonno REM osservata nei topi CJD anche in una fase precoce della malattia. Già a 12 mesi (età adulta), i topi CJD mostrano una marcata riduzione della quantità di tempo spesa in sonno REM rispetto ai topi WT, durante la fase di luce (fig. 5.6.A; tab. 5.4). A conferma di questo dato, i confronti multipli tra le età, all'interno dello stesso ceppo, rilevano che i topi CJD adulti e anziani hanno una significativa riduzione di sonno REM rispetto ai topi giovani dello stesso ceppo (fig. 5.6.A; tab.5.4). Al contrario, i topi CJD adulti e anziani spendono la stessa percentuale di tempo in sonno REM (fig. 5.6.A; tab. 5.4). A 6 mesi di età (topi giovani), il confronto tra i ceppi mostra che le percentuali di sonno REM sono comparabili tra i ceppi analizzati (fig. 5.6.A; tab. 5.4). In altre parole, i topi CJD giovani (6 mesi) hanno un sonno REM simile agli altri ceppi analizzati. Col procedere dell'età, tuttavia, i topi CJD adulti (12 mesi) mostrano una notevole riduzione del sonno REM che rimane stabile anche in età anziana (18 mesi). Viceversa, il sonno REM negli altri due ceppi di controllo si mantiene stabile nel corso dell'invecchiamento, tranne i WT che spendono un minor tempo in questo stato a 18 mesi d'età rispetto a topi giovani dello stesso ceppo (fig. 5.6.A; tab. 5.4). Le alterazioni sopra descritte valgono per la sola fase di luce, mentre durante le ore di buio non si rilevano differenze statisticamente significative nelle percentuali di sonno REM né tra i ceppi né tra le diverse età. La perdita di sonno REM in topi CJD a 12 e 18 mesi, non è, tuttavia, attribuibile a una diminuzione del sonno NREM; infatti, le quantità di sonno spese in questa fase, nel periodo di luce, sono comparabili tra i vari ceppi nelle diverse età analizzate (fig. 5.6.B; tab. 5.4). Inoltre, durante la fase di luce, i topi CJD anziani spendono meno tempo in sonno NREM in confronto a topi adulti dello stesso ceppo. A conferma di questo dato, durante le ore di luce, topi CJD a 18

mesi di età (anziani) rimangono svegli più a lungo rispetto a topi adulti e giovani dello stesso ceppo (tab. 5.4).

Nella fase di buio, i topi KO adulti mostrano una riduzione della quantità di sonno NREM e un conseguente aumento del tempo trascorso in veglia rispetto ai topi WT della stessa età (fig. 5.6.B; tab. 5.4). Inoltre, i topi KO anziani spendono più tempo in sonno NREM rispetto a topi a 6 mesi di età dello stesso ceppo (fig. 5.6.B; tab. 5.4). In accordo con questo dato, le percentuali di tempo passate in veglia sono più alte in topi KO giovani rispetto a topi anziani dello stesso ceppo (tab. 5.4).

### **5.2.1.2 - LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONI DELLA SUA ARCHITETTURA**

La perdita di sonno REM dei topi CJD nel corso dell'invecchiamento è dovuta ad una diminuzione del numero e della durata dei suoi episodi. Durante la fase di luce, i topi CJD anziani hanno, infatti, un minor numero di episodi di sonno REM rispetto ai topi giovani e adulti dello stesso ceppo (fig. 5.7.A; tab. 5.5). In aggiunta, i topi CJD anziani mostrano una riduzione della durata media di ciascun episodio del sonno REM, rispetto a topi giovani (6 mesi) del medesimo ceppo (fig. 5.7.B; tab. 5.5). Il confronto tra i tre ceppi analizzati mostra che i topi CJD adulti hanno una diminuzione del numero di episodi di sonno REM, rispetto a topi WT della stessa età, durante le ore di luce (fig. 5.7.A; tab. 5.5). Questo dato è in accordo con la diminuzione della quantità di tempo spesa in sonno REM da parte di topi CJD adulti rispetto a topi WT della stessa età, come riportato sopra (fig. 5.6.A). Inoltre, durante le ore di luce, la decurtazione di sonno REM osservata nei topi CJD anziani rispetto ai topi KO della stessa età (fig. 5.6.A.) è attribuibile a una riduzione del numero di episodi di questa fase (fig. 5.7.A; tab. 5.5). A 6 mesi di età topi WT presentano un maggior numero di episodi di sonno REM rispetto agli altri due ceppi di topi (KO e CJD), durante il periodo di luce. Inoltre, i topi WT mostrano, nelle ore di luce, una riduzione delle percentuali di tempo trascorse in sonno REM per effetto dell'invecchiamento (fig. 5.6.A); questa perdita era principalmente dovuta a un minor numero di episodi di questa fase (fig. 5.7.A; tab. 5.5).

Nel periodo di buio le variazioni nell'architettura del sonno REM sono minime e interessano solo la durata media degli episodi di questa fase (fig. 5.7.A e B; tab. 5.5).

L'analisi dell'architettura del sonno NREM non rileva alterazioni durante il periodo di luce del ciclo luce/oscurità. Nella fase di buio, i topi KO anziani mostrano un aumento del numero di episodi di sonno NREM rispetto a topi giovani dello stesso ceppo (tab. 5.5). Questo dato è in

accordo con l'aumento della quantità di sonno NREM in topi KO anziani rispetto a topi giovani dello stesso ceppo (fig. 5.6.B).

Come osservato sopra (tab. 5.4) i topi CJD anziani rimangono svegli più a lungo rispetto a topi più giovani dello stesso ceppo. In questi topi si osserva, infatti, un aumento della durata media degli episodi della veglia rispetto a topi più giovani (tab. 5.5). Allo stesso tempo a 6 mesi di età topi CJD mostrano un numero di episodi di veglia maggiore rispetto agli altri due ceppi (WT e KO) e a topi adulti dello stesso ceppo (tab. 5.5).

### **5.2.1.3 - LA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO NON È ALTERATA IN TOPI CJD**

Il numero di transizioni di fase nei topi CJD è comparabile sia con gli altri ceppi analizzati, sia tra le diverse età dello stesso ceppo (tab. 5.5). A differenza dei topi WT e KO, i topi CJD non mostrano un aumento della frammentazione del sonno con l'avanzare dell'età. Questi dati indicano che la frammentazione del sonno dei topi CJD è paragonabile ai topi di controllo e non mostra cambiamenti con l'avanzare dell'età.

### **5.2.1.4 - IL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM È RIDOTTO IN TOPI CJD ANZIANI**

Durante le ore di luce, la banda di frequenza EEG theta (6 - 10 Hz) durante le epoche di sonno REM si riduce in maniera significativa sia in animali CJD adulti ( $3\% \pm 0,80\%$ ,  $p = 0,001$ ; i valori rappresentano la differenza tra le medie  $\pm$  ES ed esprimono la percentuale del potere spettrale della banda theta sullo spettro totale durante la fase di REM) che anziani ( $2,26\% \pm 0,78\%$ ,  $p = 0,006$ ) in confronto ad animali giovani dello stesso ceppo. La riduzione del picco dell'onda theta si osserva anche durante la fase di buio del ciclo luce-oscurità (giovani vs adulti:  $3,13\% \pm 0,75\%$ ,  $p < .001$ ; giovani vs vecchi:  $2,26\% \pm 0,73\%$ ,  $p = 0,004$ ), quando la quantità di sonno REM dei topi CJD anziani non è ridotta rispetto ai topi di età e ceppo differenti.

I confronti tra ceppi hanno rilevato che il potere spettrale della banda theta in fase REM è del tutto comparabile tra i tre ceppi di topi a 6 mesi (fig. 5.8.a). In età adulta i topi CJD, così come i topi KO, mostrano una diminuzione del picco dell'onda theta rispetto a topi WT della stessa età (fig. 5.8.b), sia in fase di luce (WT vs CJD:  $2,59\% \pm 0,93\%$ ,  $p = 0,009$ ; WT vs KO:  $2,12\% \pm 0,93\%$ ,  $p = 0,029$ ; i valori rappresentano la differenza tra le medie  $\pm$  ES ed esprimono la percentuale del potere spettrale della banda theta sullo spettro totale durante la fase di REM)

che di buio (WT vs CJD:  $2,17\% \pm 0,88\%$ ,  $p = 0,019$ ; WT vs KO:  $2,10\% \pm 0,88\%$ ,  $p = 0,024$ ). A 18 mesi di età la banda di frequenza del theta in fase REM si riduce in topi CJD rispetto a topi KO della stessa età (fig. 5.8.c), sia nelle ore di luce ( $2,10\% \pm 0,78\%$ ,  $p = 0,011$ ) sia in quelle di buio ( $1,80\% \pm 0,77\%$ ,  $p = .024$ ).

### **5.2.1.5 - LA VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM È ALTERATA IN TOPI CJD.**

Durante la seconda metà del periodo di luce, l'ampiezza dell'oscillazione diurna del potere spettrale della banda di frequenza EEG delta (0.5 – 4 Hz), registrata durante il sonno NREM, si riduce in topi CJD anziani, in confronto a topi giovani e adulti dello stesso ceppo (rispettivamente:  $10,39\% \pm 2,36\%$ ,  $p = 0,001$ , i valori espressi rappresentano la differenza tra le medie  $\pm$  ES ed esprimono la percentuale del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM normalizzato sulla media giornaliera del potere spettrale della stessa banda durante il sonno NREM;  $9,48\% \pm 2,20\%$ ,  $p = 0,001$ ) (fig. 5.9). Nelle prime 6 ore della fase di buio, invece, i topi CJD adulti mostrano un aumento del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM nei confronti dei topi giovani dello stesso ceppo ( $9,37\% \pm 3,53\%$ ,  $p = 0,039$ ; fig. 5.9). Infine, nella seconda metà del periodo di buio, i topi CJD adulti e anziani mostrano una marcata riduzione dell'ampiezza del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM rispetto a topi CJD giovani (giovani vs adulti:  $10,16\% \pm 3,54\%$ ,  $p = 0,028$ ; giovani vs anziani:  $12,32\% \pm 3,48\%$ ,  $p = 0,006$ ; fig. 5.9).

### **5.2.1.6 - PRESENZA DI ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI CJD**

I tracciati EEG di topi CJD, a qualsiasi età analizzata, si caratterizzano per la presenza di attività anomala e patologica, che consiste in complessi polifasici con un picco di frequenza attorno ai 7 – 8 Hz (fig. 5.10). Questo tipo di attività è specifico del solo ceppo CJD e non si osserva in nessun altro ceppo preso in considerazione in questo esperimento, a nessuna età studiata.

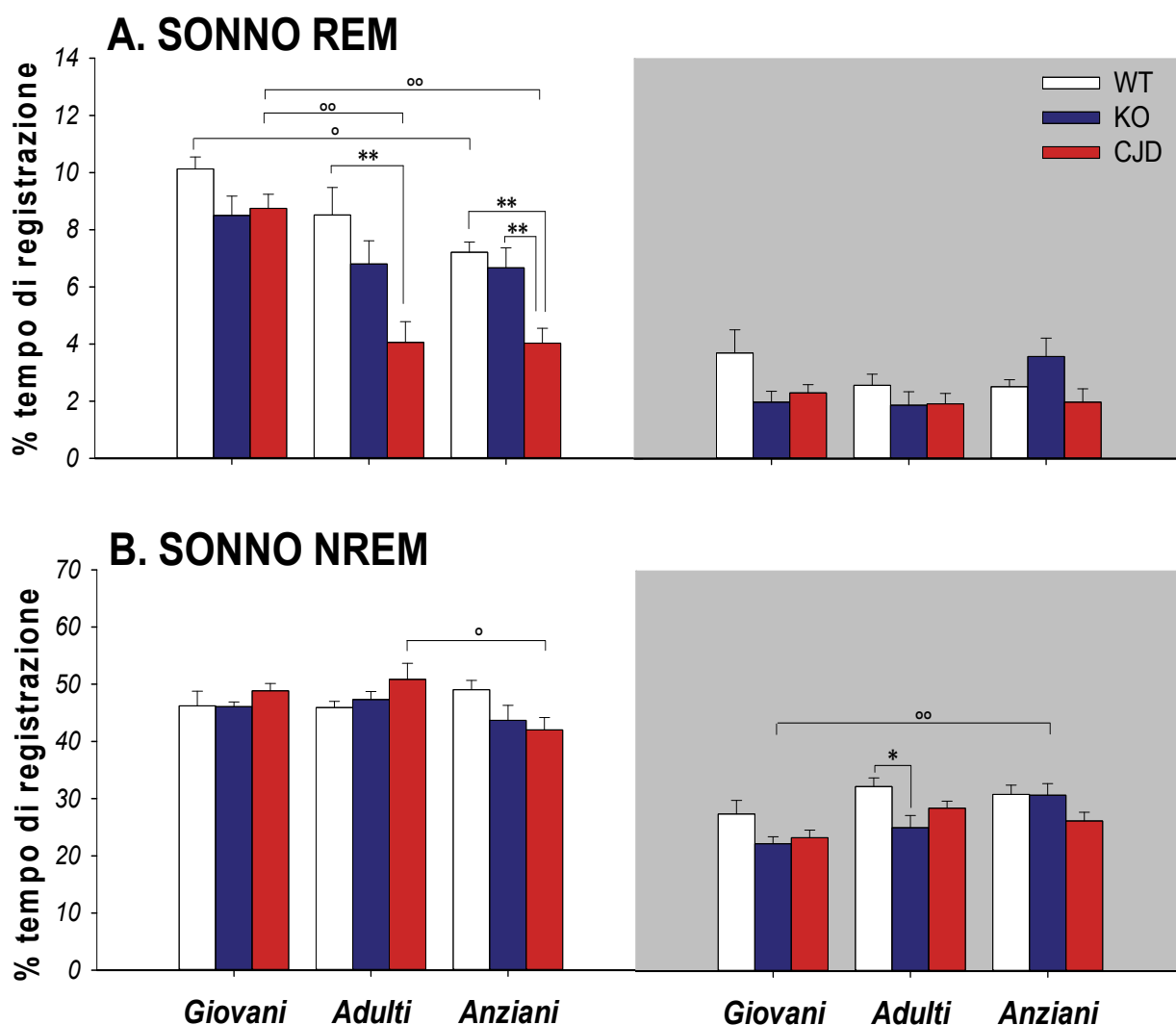
Le epoche di 12 secondi contenenti uno o più picchi di complessi polifasici si distribuivano equamente in tutte le tre età analizzate durante il periodo di luce e buio (6 mesi:  $1,4\% \pm 0,3\%$  e  $1,2\% \pm 0,3\%$ , rispettivamente; 12 mesi:  $9,8\% \pm 3,0\%$  e  $13,6\% \pm 4,0\%$ ; 18 mesi:  $13,8\% \pm 5,0\%$  e  $12,1\% \pm 5,3\%$ ; i valori, espressi come media  $\pm$  SE, rappresentano le percentuali di epoche in cui è presente almeno un complesso polifasico sul numero totale di epoche del periodo di luce e della fase di buio). I complessi polifasici si presentano nelle epoche di tutti e tre stati di



vigilanza ma in percentuali diverse: in topi giovani nel  $2,0\% \pm 0,5\%$ ,  $1,2\% \pm 0,3\%$  e  $1,6\% \pm 0,5\%$  di epoche segnate rispettivamente come veglia, sonno REM e sonno NREM. In animali adulti le percentuali erano, rispettivamente di:  $12,5\% \pm 3,6\%$ ,  $8,1\% \pm 2,6\%$  e  $2,9\% \pm 1,2\%$ . A 18 mesi di età i complessi polifasici si presentano nel  $7,5\% \pm 2,6\%$ ,  $2,3\% \pm 0,6\%$  e  $1,4\% \pm 0,6\%$  delle epoche rispettivamente siglate come veglia, sonno NREM e sonno REM.



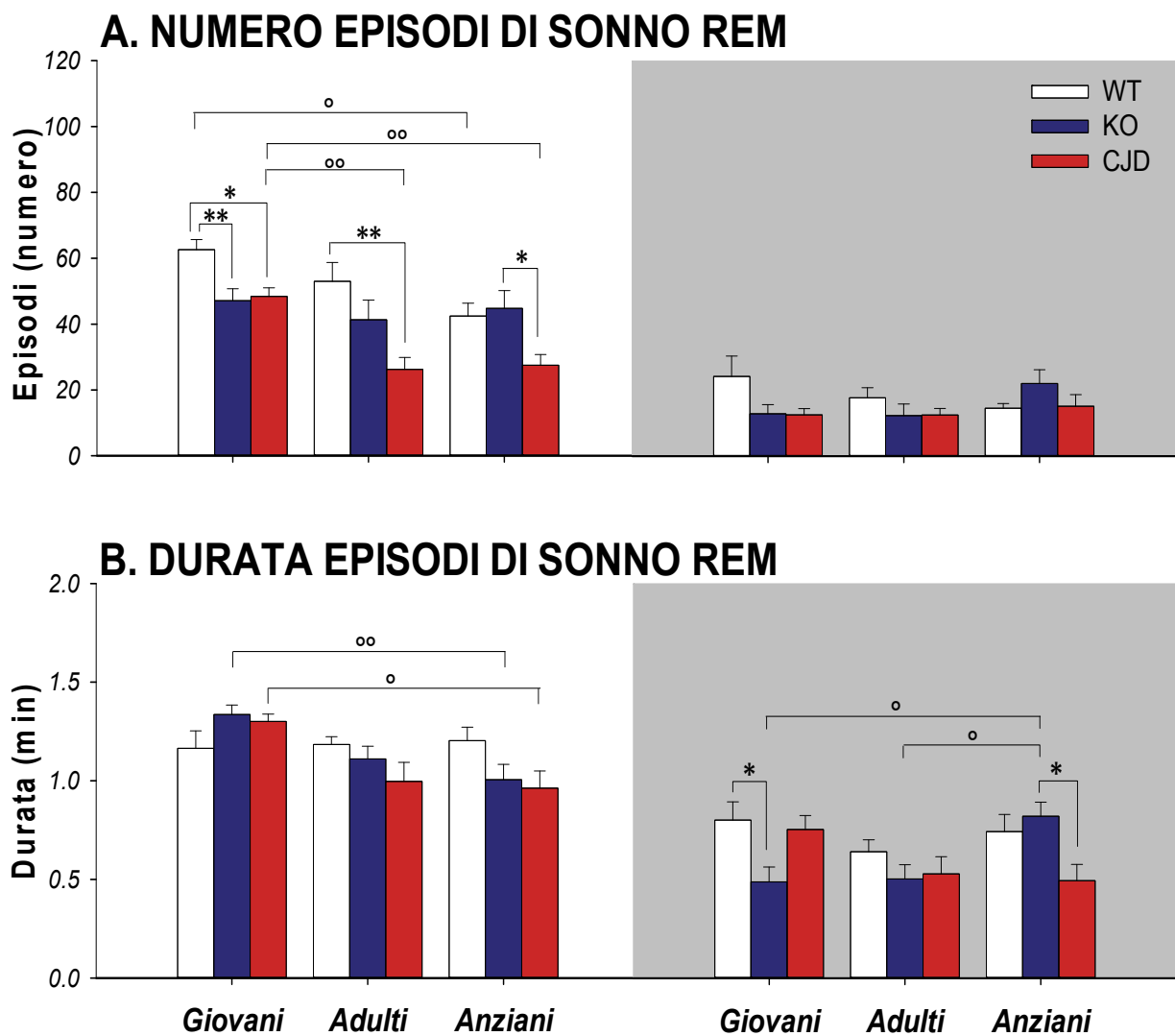
## 5.2.2 - GRAFICI E TABELLE



**FIGURA 5.6.** Percentuali di tempo (media  $\pm$  ES) spese in sonno REM (A) e in sonno NREM (B) durante le 24 ore. In ascissa sono indicate l'età dei topi analizzati (giovani: 6 mesi; adulti: 12 mesi; anziani: 18 mesi). In ordinata le percentuali di tempo spese in sonno REM e NREM sul tempo totale di registrazione. Ogni barra degli istogrammi rappresenta un diverso ceppo di topi: WT in bianco (giovani n= 7; adulti n= 9; anziani n= 7), KO in blu (giovani n= 9; adulti n= 9; anziani n= 9) e CJD in rosso (giovani n= 7; adulti n= 9; anziani n= 10). I dati sono presentati in blocchi di 12 ore e lo sfondo grigio identifica il periodo di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati compiuti su blocchi di 12 ore. I simboli (\*) e (°) indicano rispettivamente differenze tra i ceppi di topi e differenze tra le diverse età. Un simbolo solo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

		Topi Giovani	Topi Adulti	Topi Anziani
<b>SONNO REM</b>				
<b>Luce</b>	<i>WT</i>	10,13 ± 0,41 <sub>c</sub>	8,52 ± 0,96 <sup>**</sup>	7,21 ± 0,36 <sup>**</sup>
	<i>KO</i>	8,50 ± 0,68	6,81 ± 0,81	6,67 ± 0,69 <sup>**</sup>
	<i>CJD</i>	8,75 ± 0,49 <sub>bb,cc</sub>	4,06 ± 0,72	4,03 ± 0,52
<b>Buio</b>	<i>WT</i>	3,70 ± 0,81	2,57 ± 0,39	2,52 ± 0,24
	<i>KO</i>	1,98 ± 0,37	1,88 ± 0,47	3,58 ± 0,64
	<i>CJD</i>	2,30 ± 0,28	1,92 ± 0,36	1,98 ± 0,46
<b>SONNO NREM</b>				
<b>Luce</b>	<i>WT</i>	46,21 ± 2,56	45,90 ± 1,09	49,04 ± 1,60
	<i>KO</i>	46,07 ± 0,81	47,31 ± 1,41	43,68 ± 2,60
	<i>CJD</i>	48,84 ± 1,27 <sub>c</sub>	50,83 ± 2,80	42,02 ± 2,15
<b>Buio</b>	<i>WT</i>	27,48 ± 2,38	32,27 ± 1,53 <sub>§</sub>	30,90 ± 1,60
	<i>KO</i>	22,27 ± 1,23 <sub>cc</sub>	25,09 ± 2,11	30,75 ± 2,04
	<i>CJD</i>	23,34 ± 1,30	28,49 ± 1,22	26,27 ± 1,50
<b>VEGLIA</b>				
<b>Luce</b>	<i>WT</i>	43,67 ± 2,64	45,59 ± 1,77	43,75 ± 1,91
	<i>KO</i>	45,43 ± 1,07	45,87 ± 1,92	49,64 ± 3,12
	<i>CJD</i>	42,40 ± 1,36 <sub>c</sub>	44,96 ± 2,66 <sub>c</sub>	53,23 ± 2,37
<b>Buio</b>	<i>WT</i>	68,83 ± 2,97	65,17 ± 1,58 <sub>§</sub>	66,58 ± 1,61
	<i>KO</i>	75,74 ± 1,50 <sub>cc</sub>	73,04 ± 2,36	65,64 ± 2,52
	<i>CJD</i>	74,35 ± 1,39	69,32 ± 1,16	69,83 ± 1,90

**TABELLA 5.4.** Confronti multipli. Percentuali di tempo spese in sonno REM, sonno NREM e veglia durante le ore di luce e le ore di buio. I valori sono stati ottenuti da topi *wild type* controllo (WT: giovani n = 7; adulti n = 9; anziani n = 7), topi *knock out* per la PrP (KO: giovani n = 9; adulti n = 9; anziani n = 9) e topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione associata a Creutzfeldt-Jakob (CJD: giovani n = 7; adulti n = 9; anziani n = 10). I topi giovani sono quelli analizzati a 6 mesi d'età, quelli adulti a 12 mesi d'età e quelli anziani a 18 mesi d'età. I dati sono espressi come media ± ES per ogni ceppo e per ogni età, suddivisi in blocchi di 12 ore (luce: 0/12 ore; buio: 13/24 ore). Simboli e lettere differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative sia tra topi della stessa età ma con diverso genotipo (mediante *post hoc* tra età), sia tra topi di età diverse all'interno dello stesso ceppo (mediante *post hoc* tra ceppi). I simboli (+), (§) e (\*) sono stati usati per le differenze tra ceppi e indicano rispettivamente: topi WT, KO e CJD. Le lettere (a), (b) e (c) sono state utilizzate per le differenze statisticamente significative tra età e indicano rispettivamente: topi giovani (6 mesi), adulti (12 mesi) e anziani (18 mesi). Ciascun simbolo o lettera indica una differenza statisticamente significativa tra il valore della categoria rappresentata e quello cui è posto di fianco. Un singolo simbolo o lettera rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli o lettere indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

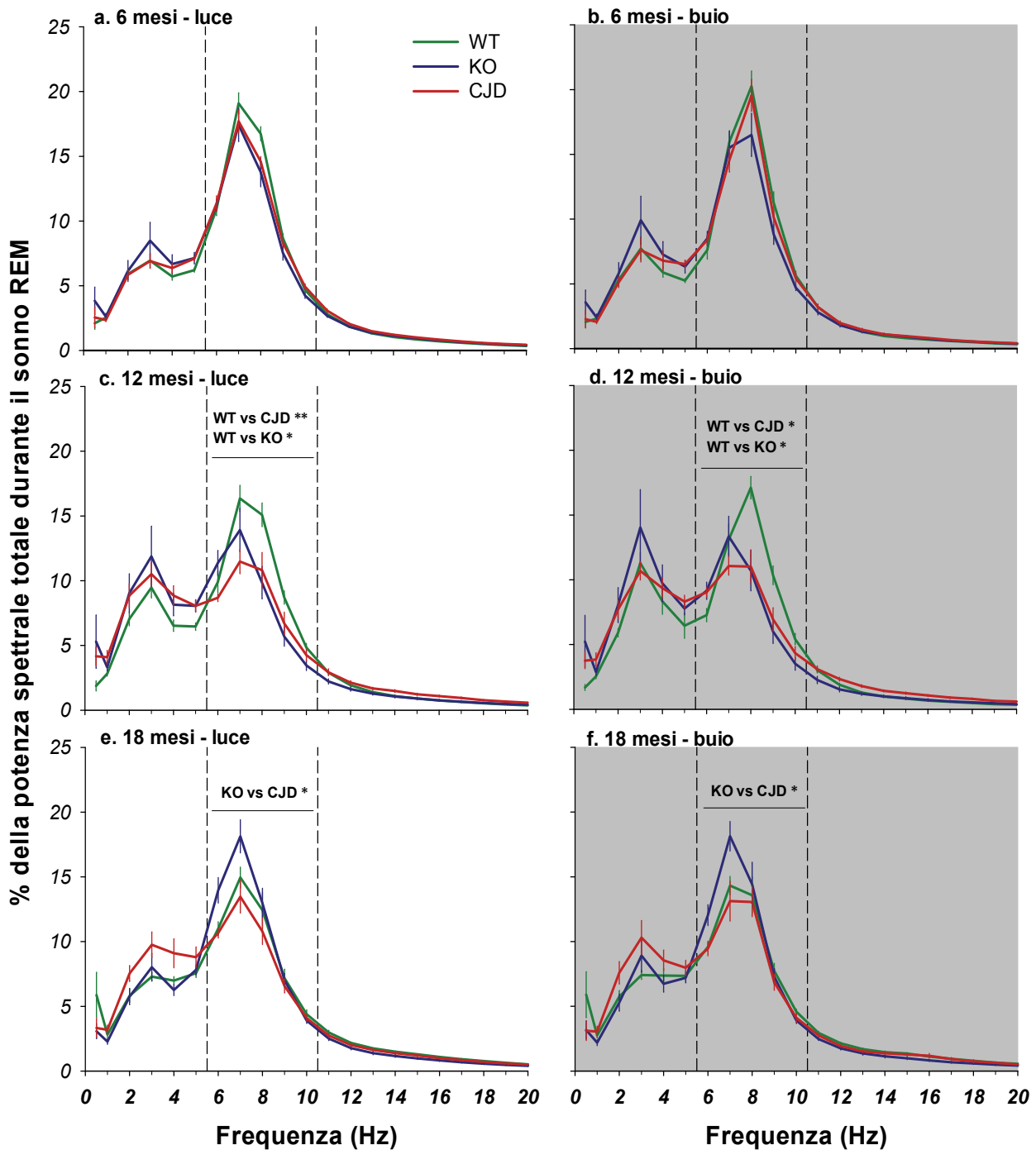


**FIGURA 5.7.** Parametri dell'architettura del sonno REM. **A.** Numero (media  $\pm$  ES) degli episodi di sonno REM. **B.** Durata (media  $\pm$  ES) di ogni singolo episodio di sonno REM. In tutti i grafici, i dati sono suddivisi per età: giovani (6 mesi), adulti (12 mesi) e anziani (18 mesi). Ogni barra dell'istogramma rappresenta un diverso ceppo: WT in *bianco* (giovani  $n = 7$ ; adulti  $n = 9$ ; anziani  $n = 7$ ), KO in *blu* (giovani  $n = 9$ ; adulti  $n = 9$ ; anziani  $n = 9$ ) e CJD in *rosso* (giovani  $n = 7$ ; adulti  $n = 9$ ; anziani  $n = 10$ ). I dati sono presentati in blocchi di 12 ore e lo sfondo *grigio* indicano la fase di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati eseguiti su blocchi di 12 ore. I simboli (\*) e (°) indicano rispettivamente differenze tra i ceppi di topi e differenze tra le diverse età. Un simbolo solo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

			Episodi (numero)			Durata (min)						
			Topi Giovani	Topi Adulti	Topi Anziani	Topi Giovani	Topi Adulti	Topi Anziani				
<b>SONNO REM</b>												
Luce	WT	62,63 ± 3,07	c	53,00 ± 5,73	**	42,43 ± 3,95	1,16 ± 0,09	1,18 ± 0,04	1,20 ± 0,07			
	KO	47,11 ± 3,68	++	41,33 ± 5,99		44,78 ± 5,42	*	1,34 ± 0,05	cc	1,11 ± 0,07	1,01 ± 0,08	
	CJD	48,43 ± 2,59	+	26,22 ± 3,69	aa	27,50 ± 3,28	aa	1,30 ± 0,04	c	1,00 ± 0,10	0,96 ± 0,09	
Buio	WT	24,25 ± 6,19		17,78 ± 3,06		14,57 ± 1,49	0,80 ± 0,09	0,64 ± 0,06		0,74 ± 0,09		
	KO	12,89 ± 2,81		12,33 ± 3,53		22,11 ± 4,20	0,49 ± 0,08	+c	0,50 ± 0,07	c	0,82 ± 0,07	*
	CJD	12,57 ± 1,91		12,56 ± 2,00		15,20 ± 3,53	0,75 ± 0,07		0,53 ± 0,09		0,49 ± 0,08	
<b>SONNO NREM</b>												
Luce	WT	130,89 ± 6,61		127,42 ± 4,22		146,86 ± 9,14	2,68 ± 0,17	2,65 ± 0,07		2,40 ± 0,14		
	KO	123,90 ± 6,46		114,97 ± 12,03		129,31 ± 7,39	2,88 ± 0,21	3,18 ± 0,28		2,46 ± 0,25		
	CJD	144,84 ± 5,60		126,77 ± 5,08		125,51 ± 7,62	2,56 ± 0,14	3,00 ± 0,33		2,52 ± 0,27		
Buio	WT	77,64 ± 8,23		77,34 ± 2,82		98,73 ± 6,88	2,48 ± 0,24	2,94 ± 0,19		2,22 ± 0,15		
	KO	54,54 ± 5,58	cc	56,98 ± 8,23	cc	94,66 ± 9,83	2,56 ± 0,17	2,86 ± 0,29		2,27 ± 0,18		
	CJD	67,44 ± 4,94		72,10 ± 7,59		81,61 ± 11,51	2,22 ± 0,08	2,83 ± 0,27		2,38 ± 0,19		
<b>VEGLIA</b>												
Luce	WT	86,36 ± 7,63	*	88,32 ± 3,39		88,01 ± 7,56	4,22 ± 0,52	4,08 ± 0,29		4,15 ± 0,73		
	KO	88,23 ± 4,18	*	77,54 ± 4,25		88,31 ± 7,79	4,06 ± 0,43	5,89 ± 0,91		5,70 ± 1,16		
	CJD	110,57 ± 4,34	b	85,54 ± 5,63		93,69 ± 7,22	2,96 ± 0,21	c	4,44 ± 0,42	c	4,48 ± 0,40	
Buio	WT	54,96 ± 5,12	§	58,02 ± 3,76		62,47 ± 5,51	14,29 ± 2,17	§	11,97 ± 1,24		9,65 ± 1,10	
	KO	37,92 ± 2,90	cc	44,01 ± 5,30	c	63,99 ± 6,38	21,45 ± 1,59	19,29 ± 3,20	c	11,09 ± 2,25		
	CJD	50,00 ± 3,80		53,22 ± 5,56		63,74 ± 10,38	15,83 ± 1,56	12,99 ± 1,53		13,60 ± 2,57		
<b>TRANSIZIONI (numero/ora)</b>												
Luce	WT	38,05 ± 2,04		35,51 ± 1,77	cc	45,81 ± 2,64						
	KO	36,70 ± 1,85		34,85 ± 4,52		42,65 ± 4,20						
	CJD	39,33 ± 1,53		41,77 ± 3,34		46,70 ± 5,11						
Buio	WT	21,69 ± 2,61	c	20,61 ± 0,83	cc	31,37 ± 3,21						
	KO	15,70 ± 1,54	c	16,01 ± 3,29	c	31,98 ± 5,30						
	CJD	16,79 ± 1,07		27,18 ± 4,73		30,80 ± 6,00						

**TABELLA 5.5.** Confronti multipli. (*Pannello in alto*) Numero degli episodi e durata media (minuti) di: (dall'alto verso il basso) sonno REM, sonno NREM e veglia. (*Pannello in basso*) numero orario delle transizioni di fase. I valori sono stati ottenuti da topi *wild type* controllo (WT: giovani n = 7; adulti n = 9; anziani n = 7), topi *knock out* per la PrP (KO: giovani n = 9; adulti n = 9; anziani n = 9) e topi transgenici recanti l'omologo murino della mutazione associata a Creutzfeldt-Jakob (CJD: giovani n = 7; adulti n = 9; anziani n = 10). I topi giovani sono quelli analizzati a 6 mesi d'età, quelli adulti a 12 mesi d'età e quelli anziani a 18 mesi d'età. I dati sono espressi come media ± ES per ogni ceppo e per ogni età, suddivisi in blocchi di 12 ore (luce: 0/12 ore; buio: 13/24 ore). Simboli e lettere differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative sia tra topi della stessa età ma con diverso genotipo (mediante *post-hoc* tra età), sia tra topi di età diverse all'interno dello stesso ceppo (mediante *post-hoc* tra ceppi). I simboli (+), (§) e (\*) sono stati usati per le differenze tra ceppi e indicano rispettivamente: topi WT, KO e FFI. Mentre le lettere (a), (b) e (c) sono state utilizzate per le differenze tra età ed indicano rispettivamente: topi giovani (6 mesi), adulti (12 mesi) e anziani (18 mesi). Ciascun simbolo o lettera indica una differenza statisticamente significativa tra il valore della categoria rappresentata e il valore cui è posto di fianco. Un singolo simbolo o lettera rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli o lettere indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

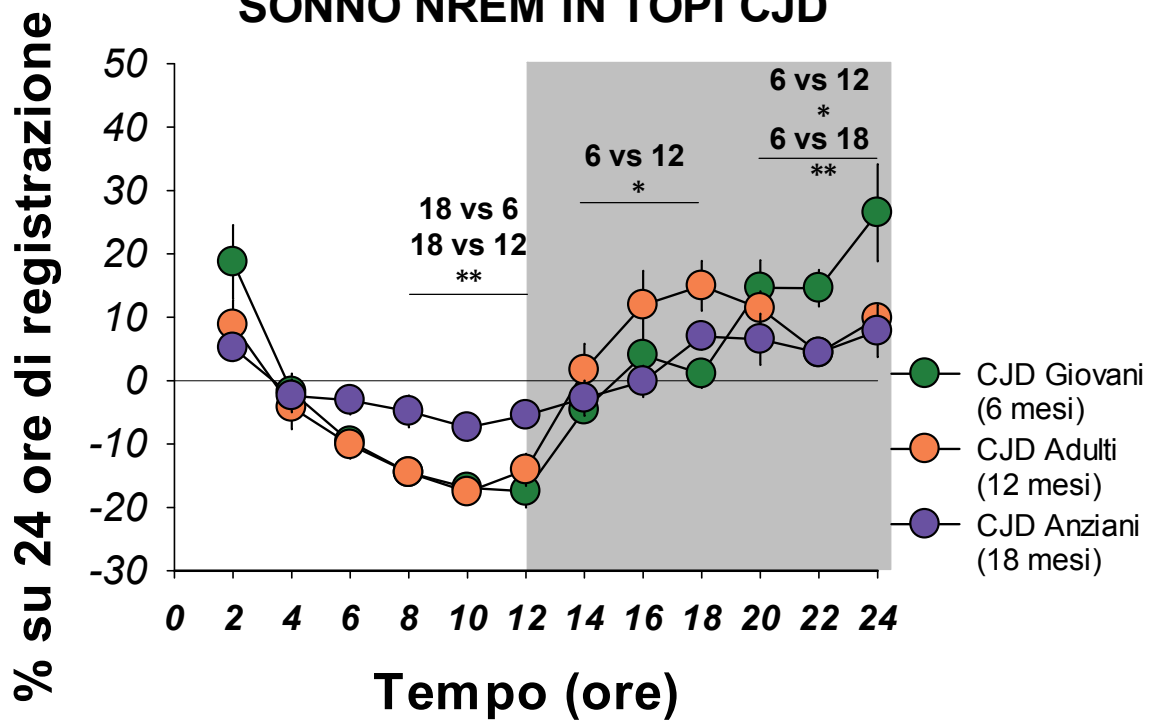
## SPETTRO DI POTENZA DURANTE IL SONNO REM



**FIGURA 5.8.** Potere spettrale normalizzato della registrazione elettroencefalografica ottenuto durante le epoche di sonno REM prive di artefatti. I valori sono stati ottenuti durante le ore di luce (*pannelli a sinistra*) e quelle di buio (*pannelli a destra*, identificate dallo sfondo grigio) da topi di tre età diverse: topi giovani (6 mesi, **a**); topi adulti (12 mesi, **b**); topi anziani (18 mesi, **c**). In ogni pannello sono rappresentati gli spettri ottenuti da tre diversi ceppi di topi: WT in *bianco* (giovani n= 7; adulti n=9; anziani n= 7), KO in *blu* (giovani n= 9; adulti n=9; anziani n= 9) e CJD in *rosso* (giovani n= 7; adulti n=9; anziani n= 10). Gli spettri sono stati i) normalizzati come percentuale del potere totale di tutte le frequenze durante il sonno REM, ii) calcolati all'interno delle ore di luce e di buio del ciclo luce/oscurità e iii) rappresentati come media  $\pm$  SE per ogni frequenza. Le analisi statistiche sono state eseguite nella banda theta (6 – 10 Hz). Le differenze tra i ceppi sono state riportate sopra la linea che evidenzia la banda di frequenze presa in considerazione. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

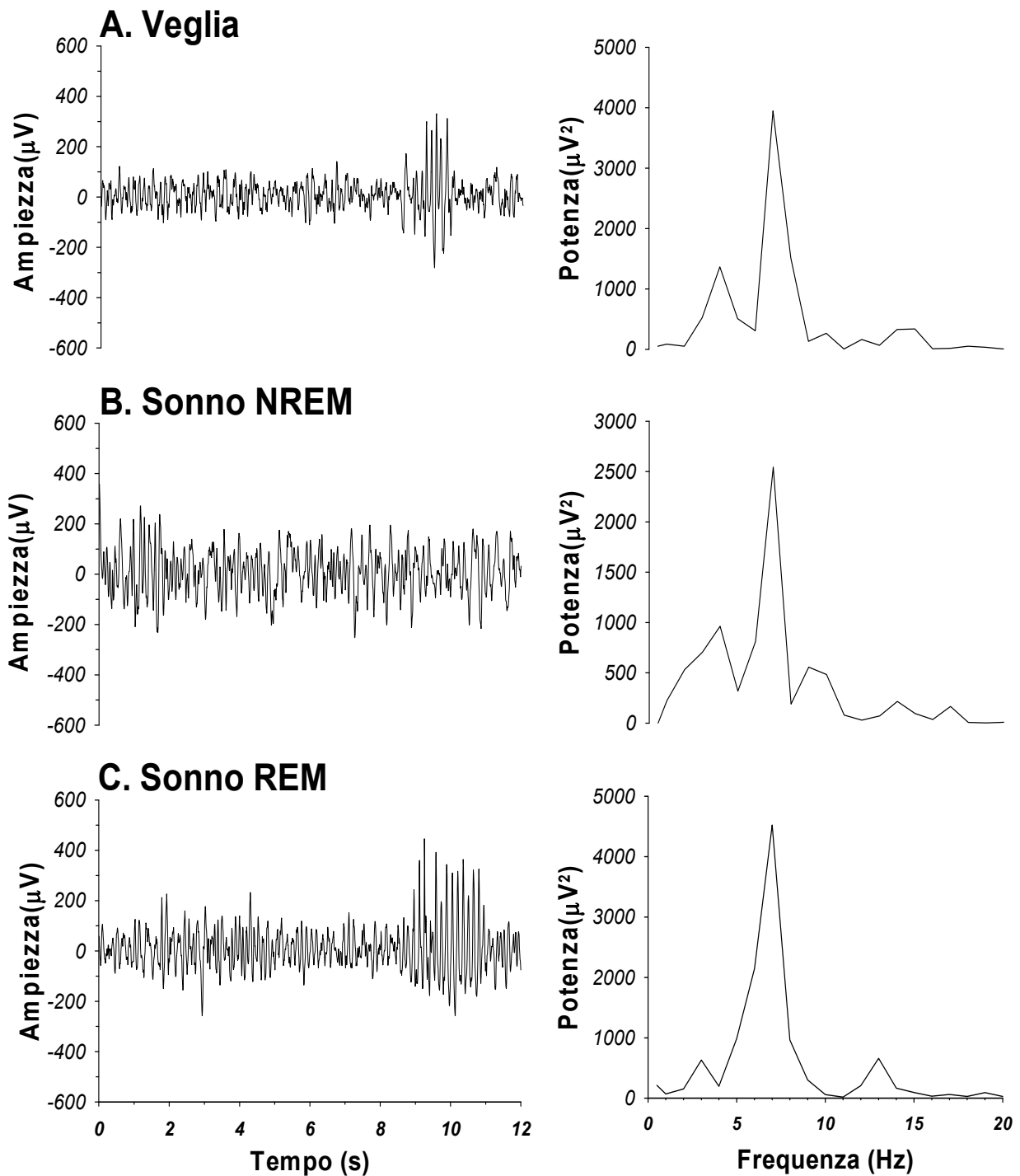


## VARIAZIONE GIORNALIERA DEL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA DELTA DURANTE IL SONNO NREM IN TOPI CJD



**FIGURA 5.9.** Variazione temporale del potere spettrale della banda delta (0.5 – 4 Hz) durante epoche prive di artefatti nel solo ceppo di topi CJD. Ciascun cerchietto indica le età: in *verde* topi giovani (6 mesi, n= 7), in *arancione* topi adulti (12 mesi, n= 9) e in *viola* topi anziani (18 mesi, n= 10). I dati (media ± ES) sono presentati in blocchi temporali di due ore, come percentuale della media totale (24 ore) del potere spettrale della banda delta durante epoche di NREM (indicata dalla linea sullo zero). Lo sfondo *grigio* rappresenta il periodo di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche sono state eseguite su blocchi di 6 ore. Le differenze statistiche tra le diverse età sono riportate, mediante numeri che esprimono i mesi di età, sopra ogni linea indicante il blocco di 6 ore. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

# ATTIVITÀ EEG ANOMALA IN TOPI CJD



**FIGURA 5.10.** Esempi di tre epoche EEG (12 s) con un complesso polifasico (*pannello di sinistra*) e il corrispondente spettro di frequenza ottenuto mediante trasformata veloce di Fourier (*pannello di destra*), durante la veglia (A), il sonno NREM (B) e il sonno REM (C). I tracciati EEG sono stati ottenuti da un topo CJD a 6 mesi di età. Nei pannelli a sinistra, in ordinata è presente l'ampiezza ( $\mu V$ ) del tracciato EEG; in ascissa, il tempo di registrazione (s). Nei pannelli a destra, in ordinata è presente la potenza spettrale ( $\mu V^2$ ). In ascissa, le frequenze (Hz) prese in considerazione. Notare come il picco di frequenza del complesso polifasico si colloca a 7 Hz.

## **5.3 - ESPERIMENTO N.3:**

### **MODELLO MURINO DI AD**

#### **5.3.1 - RISULTATI**

##### **5.3.1.1 - GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ RIDUCONO IL SONNO REM DURANTE IL PERIODO DI BUIO**

La somministrazione in acuto di oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  induce una decurtazione di sonno REM nella seconda parte del periodo di buio, rispetto alla somministrazione di PBS. Topi iniettati con oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  mostrano, infatti, una riduzione del sonno REM dopo circa 16 ore dalla somministrazione (blocco di ore: 17 - 20), rispetto agli stessi topi iniettati con PBS (fig. 5.11; tab. 5.6).

Gli effetti della somministrazione di oligomeri di A- $\beta_{1-42}$  si rilevano nel solo sonno REM, infatti, non si osservano alterazioni delle percentuali di tempo spese in sonno NREM (fig. 5.11; tab. 5.6) e veglia (tab. 5.6), rispetto alla condizione di controllo. La somministrazione di monomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  non causa nessuna alterazione delle percentuali di tempo trascorse nei diversi stati comportamentali, rispetto agli altri due trattamenti (PBS e oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$ ).

##### **5.3.1.2 - LA RIDUZIONE DI SONNO REM È DOVUTA A MODIFICAZIONI DELLA SUA ARCHITETTURA**

La somministrazione di oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  induce una perdita di sonno REM nel blocco di ore 17 – 20. Questa decurtazione è attribuibile a una diminuzione del numero di episodi di sonno REM, ma anche a una riduzione della durata media di ciascun episodio di questa fase rispetto al trattamento con PBS (fig. 5.12; tab. 5.7). L'iniezione di oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  induce, inoltre, una riduzione del numero degli episodi di veglia nelle prime 4 ore (1 – 4 ore) rispetto alla condizione di controllo (tab. 5.12). Sempre nello stesso blocco di ore, i monomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$  causano alterazioni nell'architettura delle fasi del ciclo veglia-sonno rispetto al trattamento con PBS (tab. 5.7). In dettaglio, si osserva una diminuzione degli episodi di sonno NREM e veglia, e un aumento degli episodi di sonno REM. Inoltre, la riduzione degli

episodi di sonno NREM, a seguito della somministrazione di monomeri, s'intensifica nel blocco di ore successivo (5 – 8, tab. 5.7).

### **5.3.1.3 - GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ NON CAUSANO ALTERAZIONI NELLA FRAMMENTAZIONE DEL SONNO**

L'analisi delle transizioni di fase da uno stato comportamentale all'altro non rileva differenze statisticamente significative in seguito alla somministrazione di oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$ . Tuttavia, topi iniettati con gli oligomeri, dalla nona ora in poi, mostrano una tendenza ad avere un maggior numero di passaggi di fase da uno stato comportamentale all'altro rispetto agli stessi topi iniettati con PBS (tab. 5.7), tuttavia le differenze non sono statisticamente significative.

La somministrazione di monomeri di A- $\beta_{1-42}$  induce, nel blocco di ore 5 – 8, una riduzione delle transizioni di fase rispetto agli altri due trattamenti (tab. 5.7).

### **5.3.1.4 - GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ RIDUCONO IL POTERE SPETTRALE DELLA BANDA THETA DURANTE IL SONNO REM**

Durante le 24 ore il potere spettrale della banda theta (6 – 10 Hz) nelle fasi di sonno REM è comparabile tra i diversi trattamenti. Tuttavia, nel blocco di ore in cui si è osservata la perdita di sonno REM (ore 17 - 20), i topi iniettati con gli oligomeri presentano una diminuzione dell'ampiezza della banda theta durante il sonno REM, in confronto agli stessi topi iniettati con PBS (0,1%  $\pm$  0,04%,  $p = 0,038$ , i valori rappresentano la differenza tra le medie  $\pm$  SE ed esprimono la percentuale della banda theta durante il sonno REM nel blocco di ore 17 – 20 sulla potenza spettrale totale dell'EEG, fig. 5.13).

Non si osservano modificazioni trattamento-dipendenti nell'oscillazione dell'ampiezza del potere spettrale della banda delta durante il sonno NREM, nelle 24 ore.

### **5.3.1.5 - GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ INDUCONO ATTIVITÀ EEG ANOMALA**

In seguito alla somministrazione di oligomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$ , in 7 dei 10 topi analizzati, si rileva un'attività patologica nel tracciato EEG. Quest'attività consiste in: i) complessi polifasici con un picco di frequenza attorno ai 7 Hz (fig. 5.14.A), simili a quelli già descritti negli altri due esperimenti; ii) complessi polifasici rallentati, con picco di frequenza attorno ai 4 Hz (fig. 5.14.B).

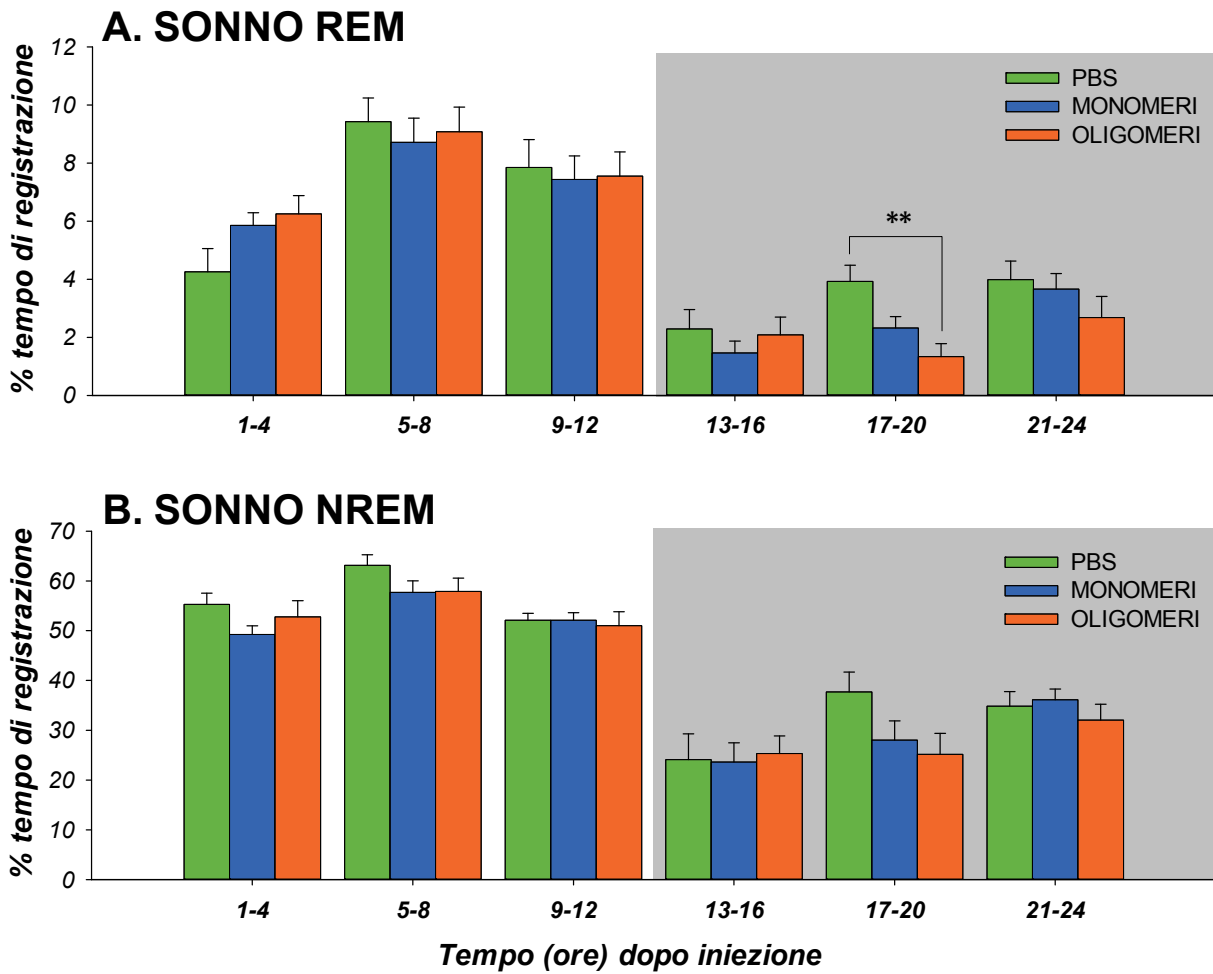
Le epoche in cui si presenta almeno un episodio di attività EEG anomala sono equamente distribuite nelle ore di luce ( $1,39\% \pm 0,72\%$ ) e in quelle di buio ( $1,87\% \pm 1,21\%$ , i valori rappresentano la percentuale media di epoche con almeno un episodio di attività EEG anomala sul totale delle epoche di luce e di buio  $\pm$  ES). I complessi polifasici erano presenti in tutti e tre gli stati di vigilanza: nell' $1,73\% \pm 0,91\%$  di epoche siglate come veglia, nello  $0,65\% \pm 0,21\%$  di epoche siglate come sonno NREM e nello  $0,25\% \pm 0,18\%$  di epoche di sonno REM. Questo tipo di attività EEG non si presenta in seguito a somministrazione di PBS e di monomeri sintetici di A- $\beta_{1-42}$ .

### **5.3.1.6 - GLI OLIGOMERI DI A- $\beta_{1-42}$ ANON INDUCONO ALTERAZIONI DELL'ATTIVITÀ MOTORIA**

L'attività motoria generale è paragonabile in seguito alla somministrazione dei tre diversi trattamenti. Non si riscontrano differenze significative dipendenti dal trattamento in nessun blocco di ore. Parimenti, in seguito a somministrazione di oligomeri di A $\beta_{1-42}$  è mantenuta anche la fluttuazione circadiana tipica dell'attività motoria ( $140,70 \pm 83,75$ ,  $p < .001$ , i valori indicano la differenza tra le medie dell'attività motoria durante le ore di luce e durante le ore di buio  $\pm$  SE)



## 5.3.2 - GRAFICI E TABELLE

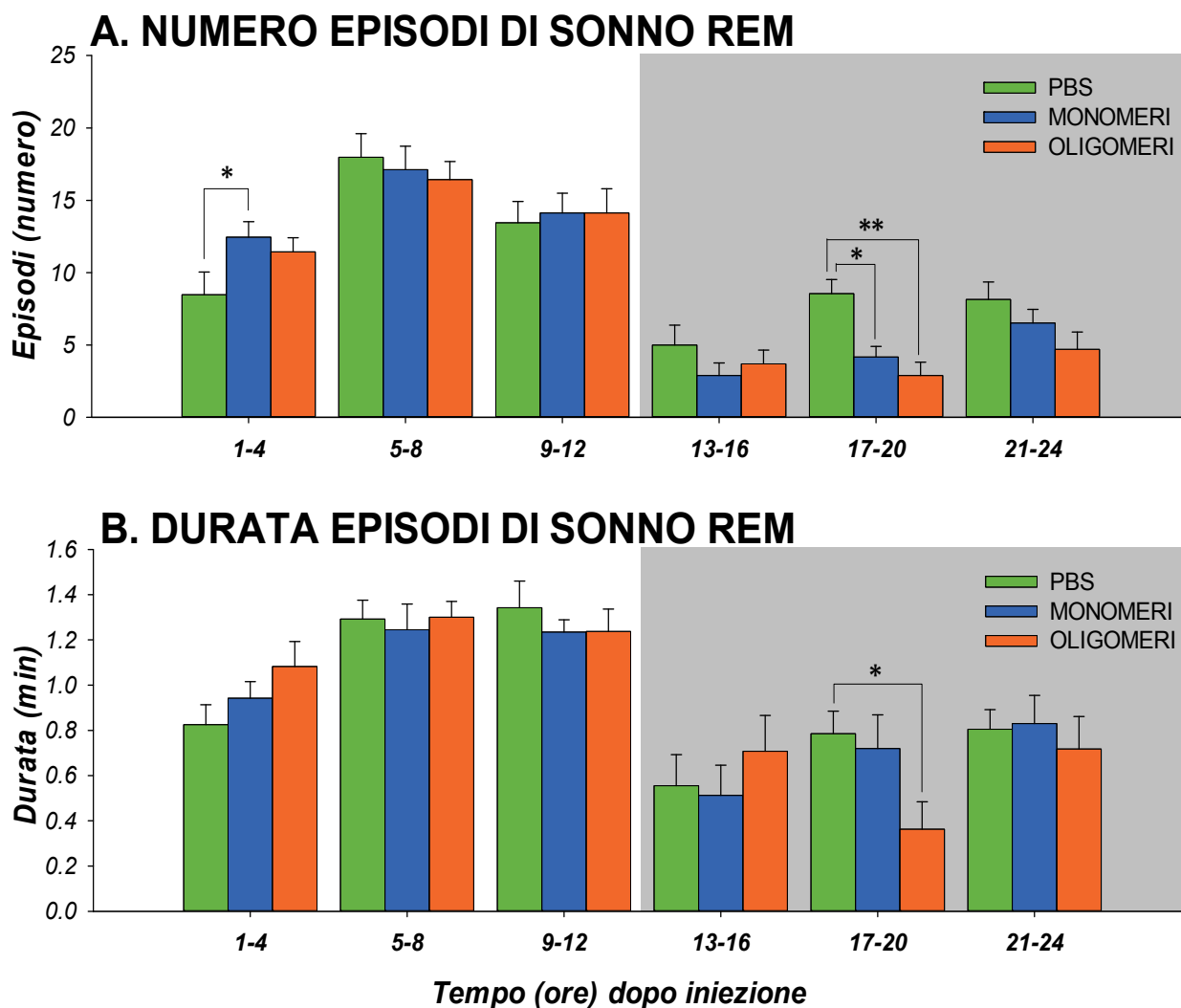


**FIGURA 5.11.** Percentuali di tempo (media  $\pm$  ES) spese in sonno REM (**A**) e in sonno NREM (**B**) in seguito ad iniezione ICV. In ascissa è indicato, in blocchi di 4 ore, il tempo dopo la somministrazione dei 3 trattamenti. In ordinata sono indicate le percentuali di tempo spese in sonno REM e NREM sul tempo totale di registrazione (24 h). Ogni barra degli istogrammi rappresenta un trattamento: PBS in *verde*, monomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *blu* e oligomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *arancione*. Tutti gli animali ( $n = 10$ ) hanno ricevuto i tre trattamenti (disegno sperimentale *within-subject*). I dati sono presentati in blocchi di 4 ore e lo sfondo *grigio* identifica il periodo di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati compiuti su blocchi di 4 ore. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .



% tempo totale di registrazione		SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA
<b>1 - 4 ore</b>	<i>PBS</i>	4,26 ± 0,80	55,29 ± 2,25	40,44 ± 2,52
	<i>MONOMERI</i>	5,86 ± 0,44	49,24 ± 1,75	44,90 ± 1,97
	<i>OLIGOMERI</i>	6,26 ± 0,63	52,80 ± 3,24	40,94 ± 3,28
<b>5 - 8 ore</b>	<i>PBS</i>	9,43 ± 0,82	63,13 ± 2,13	27,45 ± 2,44
	<i>MONOMERI</i>	8,72 ± 0,83	57,68 ± 2,34	33,59 ± 2,53
	<i>OLIGOMERI</i>	9,08 ± 0,85	57,89 ± 2,68	33,01 ± 2,58
<b>9 - 12 ore</b>	<i>PBS</i>	7,85 ± 0,96	52,13 ± 1,35	40,02 ± 2,10
	<i>MONOMERI</i>	7,44 ± 0,82	52,10 ± 1,50	40,46 ± 1,86
	<i>OLIGOMERI</i>	7,56 ± 0,83	51,01 ± 2,80	41,34 ± 3,16
<b>13 - 16 ore</b>	<i>PBS</i>	2,30 ± 0,67	24,10 ± 5,17	73,61 ± 5,74
	<i>MONOMERI</i>	1,47 ± 0,41	23,65 ± 3,83	74,89 ± 4,13
	<i>OLIGOMERI</i>	2,09 ± 0,61	25,33 ± 3,53	71,79 ± 3,61
<b>17 - 20 ore</b>	<i>PBS</i>	3,93 ± 0,56	37,70 ± 4,00	58,37 ± 4,47
	<i>MONOMERI</i>	2,33 ± 0,39	28,02 ± 3,85	69,65 ± 4,18
	<i>OLIGOMERI</i>	1,34 ± 0,45 <sup>++</sup>	25,16 ± 4,23	73,31 ± 4,59
<b>21 - 24 ore</b>	<i>PBS</i>	3,99 ± 0,64	34,85 ± 2,93	61,16 ± 3,28
	<i>MONOMERI</i>	3,66 ± 0,54	36,13 ± 2,15	60,21 ± 2,32
	<i>OLIGOMERI</i>	2,69 ± 0,73	32,04 ± 3,19	65,04 ± 3,46

**TABELLA 5.6.** Confronti multipli. Percentuali di tempo spese in sonno REM, sonno NREM e veglia nelle ore successive alla somministrazione dei trattamenti. I valori sono stati ottenuti da 10 topi C57BL/6J iniettati con PBS, monomeri sintetici di A $\beta$ <sub>1-42</sub> e oligomeri sintetici di A $\beta$ <sub>1-42</sub> in tempi diversi (disegno sperimentale *within-subject*) I dati indicano le percentuali sul tempo totale di registrazione (24 ore) e sono espressi come media ± ES per ogni trattamento, suddivisi in blocchi di 4 ore. Simboli differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative tra i trattamenti. I simboli (+), (\$) e (\*) indicano rispettivamente: PBS, monomeri e oligomeri. Ciascun simbolo indica una differenza statisticamente significativa tra il valore della categoria rappresentata e il valore cui è posto di fianco. Un singolo simbolo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .



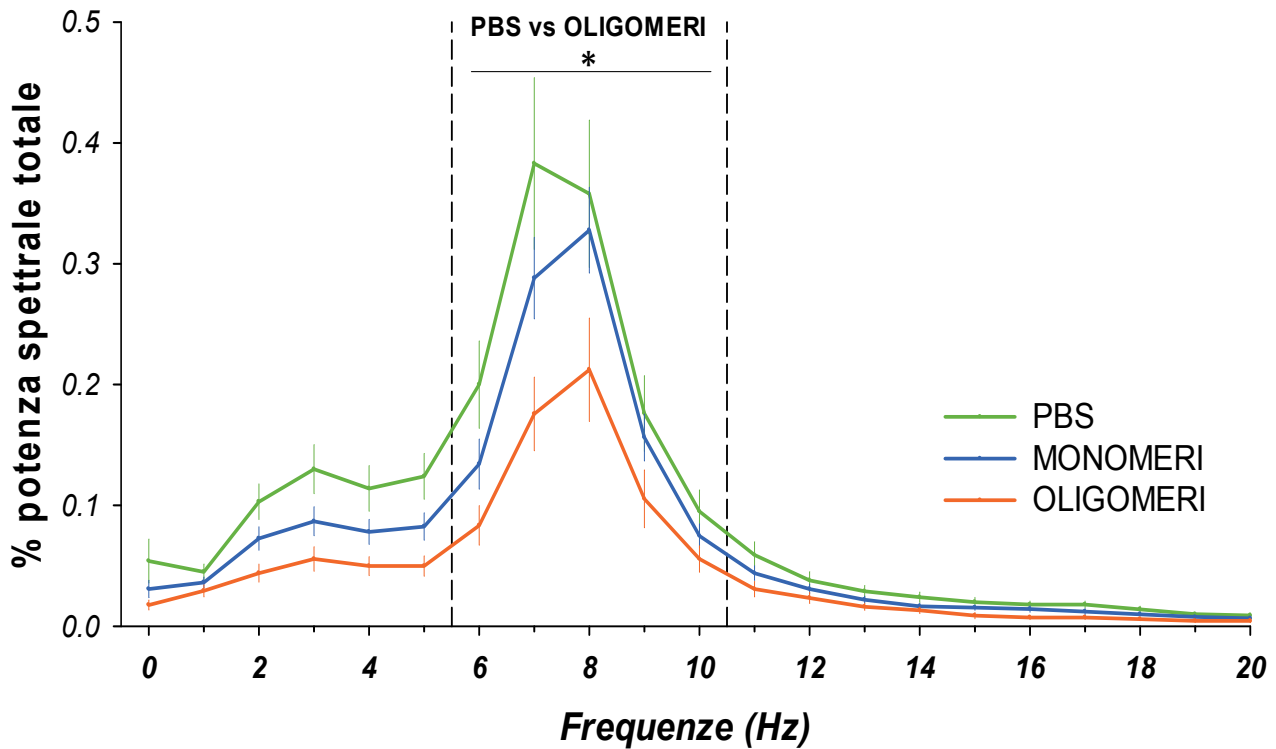
**FIGURA 5.12.** Parametri dell'architettura del sonno REM. **A.** Numero (media  $\pm$  ES) degli episodi di sonno REM. **B.** Durata (media  $\pm$  ES) di ogni singolo episodio di sonno REM. In tutti i grafici, i dati sono suddivisi per blocchi di 4 ore. Ogni barra degli istogrammi rappresenta un trattamento: PBS in *verde*, monomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *blu* e oligomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *arancione*. Tutti gli animali ( $n = 10$ ) hanno ricevuto i tre trattamenti (disegno sperimentale *within-subject*). I dati sono presentati per blocchi di 4 ore e lo sfondo *grigio* indica la fase di buio del ciclo luce/oscurità. Le analisi statistiche e i confronti multipli sono stati compiuti su blocchi di 4 ore. Un singolo asterisco (\*) indica un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

EPISODI (numero)				DURATA (min)			
		SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA	SONNO REM	SONNO NREM	VEGLIA
<b>1 - 4 ore</b>	PBS	8,48 ± 1,57	37,94 ± 4,12	27,16 ± 2,75	0,83 ± 0,09	4,14 ± 0,40	8,64 ± 1,64
	MONOMERI	12,45 ± 1,07 +	25,97 ± 3,14 +	17,14 ± 2,52 ++	0,94 ± 0,07	4,64 ± 0,33	11,07 ± 1,77
	OLIGOMERI	11,44 ± 0,97	30,88 ± 2,38	20,46 ± 2,37 +	1,08 ± 0,11	4,42 ± 0,57	8,70 ± 2,16
<b>5 - 8 ore</b>	PBS	17,97 ± 1,64	48,21 ± 2,66	27,71 ± 2,09	1,29 ± 0,08	3,33 ± 0,25	2,25 ± 0,31
	MONOMERI	17,12 ± 1,61	39,36 ± 2,67 ++	25,14 ± 2,75	1,25 ± 0,11	3,64 ± 0,41	3,57 ± 0,52
	OLIGOMERI	16,43 ± 1,25	43,66 ± 2,97	30,01 ± 3,30	1,30 ± 0,07	3,22 ± 0,32	2,84 ± 0,58
<b>9 - 12 ore</b>	PBS	13,45 ± 1,47	38,87 ± 2,30	24,17 ± 1,90	1,34 ± 0,12	3,32 ± 0,26	4,07 ± 0,43
	MONOMERI	14,13 ± 1,36	44,39 ± 3,13	28,50 ± 2,45	1,24 ± 0,05	3,05 ± 0,43	3,62 ± 0,42
	OLIGOMERI	14,13 ± 1,67	44,26 ± 2,69	29,63 ± 2,32	1,24 ± 0,10	2,74 ± 0,25	3,42 ± 0,28
<b>13 - 16 ore</b>	PBS	5,00 ± 1,37	21,20 ± 4,30	14,80 ± 2,53	0,56 ± 0,14	2,09 ± 0,38	19,75 ± 6,05
	MONOMERI	2,90 ± 0,86	24,38 ± 4,16	16,26 ± 2,48	0,51 ± 0,13	2,06 ± 0,24	16,72 ± 4,37
	OLIGOMERI	3,70 ± 0,94	27,51 ± 5,32	18,17 ± 3,25	0,71 ± 0,16	1,96 ± 0,21	14,42 ± 4,88
<b>17 - 20 ore</b>	PBS	8,55 ± 0,97	26,45 ± 4,46	16,86 ± 3,30	0,79 ± 0,10	3,40 ± 0,61	16,35 ± 3,16
	MONOMERI	4,18 ± 0,73 +	21,90 ± 5,80	14,83 ± 4,33	0,72 ± 0,15	3,05 ± 0,23	20,82 ± 3,65
	OLIGOMERI	2,90 ± 0,91 ++	18,19 ± 3,58	11,72 ± 2,33	0,36 ± 0,12 +	2,82 ± 0,60	23,65 ± 5,81
<b>21 - 24 ore</b>	PBS	8,15 ± 1,21	24,15 ± 3,03	15,77 ± 2,28	0,81 ± 0,09	3,13 ± 0,26	17,06 ± 2,86
	MONOMERI	6,52 ± 0,95	24,74 ± 4,99	16,90 ± 4,43	0,83 ± 0,12	3,33 ± 0,35	19,29 ± 3,46
	OLIGOMERI	4,70 ± 1,20	27,10 ± 5,04	19,68 ± 4,69	0,72 ± 0,14	2,61 ± 0,42	16,27 ± 4,05

TRANSIZIONI (numero/ora)		
<b>1 - 4 ore</b>	PBS	32,45 ± 3,26
	MONOMERI	23,30 ± 2,92
	OLIGOMERI	25,83 ± 2,75
<b>5 - 8 ore</b>	PBS	37,75 ± 2,48 §§
	MONOMERI	31,58 ± 1,90
	OLIGOMERI	39,50 ± 2,43 §§
<b>9 - 12 ore</b>	PBS	31,05 ± 0,97
	MONOMERI	35,00 ± 2,67
	OLIGOMERI	39,13 ± 2,61
<b>13 - 16 ore</b>	PBS	20,50 ± 3,74
	MONOMERI	24,80 ± 3,53
	OLIGOMERI	30,15 ± 4,55
<b>17 - 20 ore</b>	PBS	20,58 ± 3,34
	MONOMERI	19,13 ± 4,50
	OLIGOMERI	19,40 ± 3,86
<b>21 - 24 ore</b>	PBS	18,48 ± 2,01
	MONOMERI	20,63 ± 3,53
	OLIGOMERI	23,63 ± 4,56

**TABELLA 5.7.** Confronti multipli. (*Pannello in alto*) Numero degli episodi e durata media (minuti) di: (dall'alto verso il basso) sonno REM, sonno NREM e veglia. (*Pannello in basso*) numero, per ora, delle transizioni di fase. I valori sono stati ottenuti da 10 topi C57BL/6J iniettati con PBS, monomeri sintetici di A $\beta$ <sub>1-42</sub> e oligomeri sintetici di A $\beta$ <sub>1-42</sub> in tempi diversi (disegno sperimentale *within-subject*) I dati sono espressi come media ± ES per ogni trattamento, suddivisi in blocchi di 4 ore. Simboli differenti sono stati utilizzati per identificare le differenze statisticamente significative tra i trattamenti. I simboli (+), (§) e (\*) indicano rispettivamente: PBS, monomeri e oligomeri. Ciascun simbolo indica una differenza tra il valore della categoria rappresentata e il valore cui è posto di fianco. Un singolo simbolo rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due simboli indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

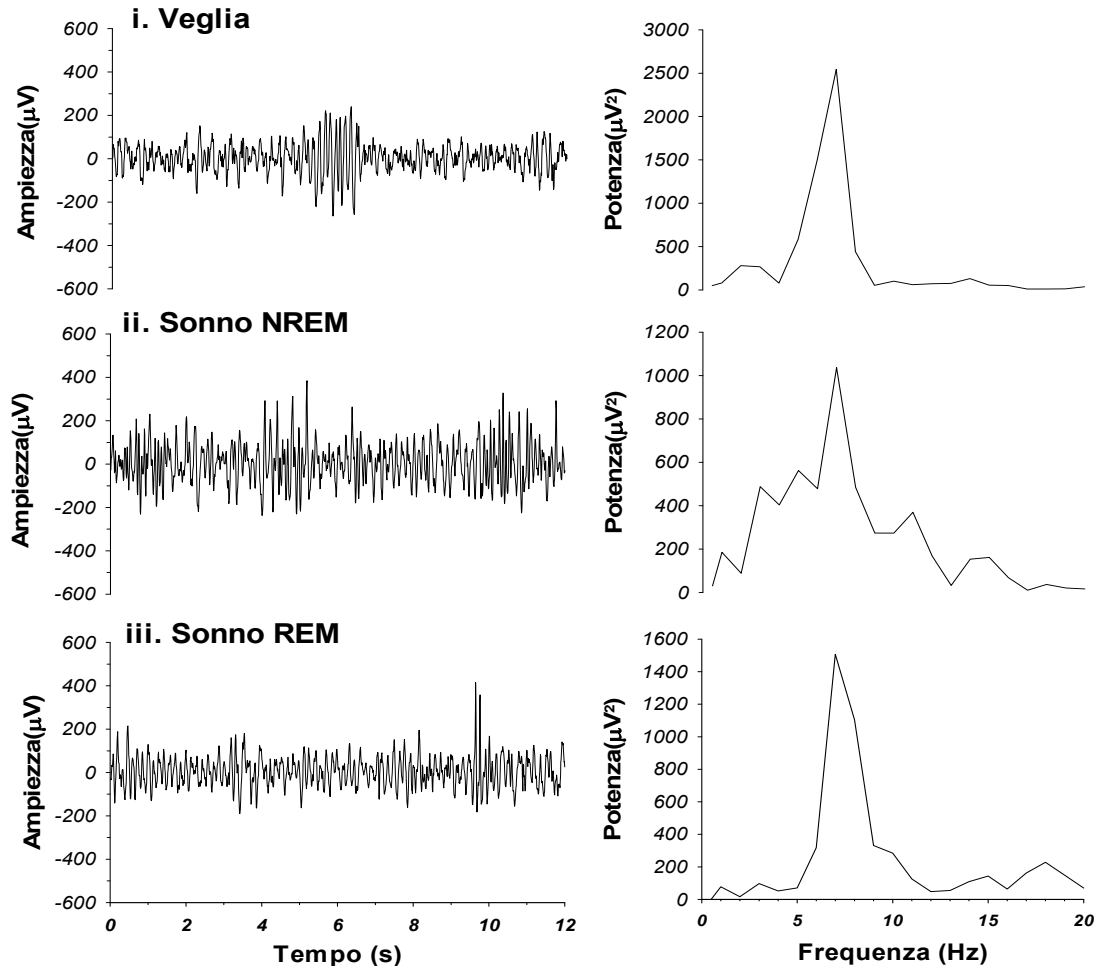
## SPETTRO DI POTENZA DURANTE IL SONNO REM NEL BLOCCO DI ORE 17-20



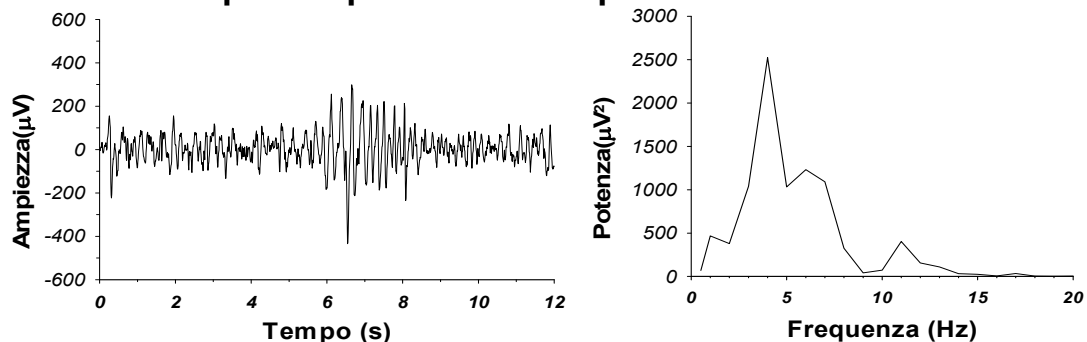
**FIGURA 5.13.** Potere spettrale normalizzato della registrazione elettroencefalografica, ottenuto durante le epoche di sonno REM. I valori sono stati ottenuti nel blocco di ore 17 - 20 in seguito ad iniezione di: PBS in *verde*, monomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *blu* e oligomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$  in *arancione*. Tutti gli animali ( $n = 10$ ) hanno ricevuto i tre trattamenti (disegno sperimentale *within-subject*). Gli spettri sono stati i) normalizzati come percentuale del potere spettrale totale di tutte le frequenze, ii) calcolati all'interno delle ore 17 - 20 e iii) rappresentati come media  $\pm$  SE per ogni frequenza. Le analisi statistiche sono state eseguite nella banda theta (6 - 10 Hz). Le differenze tra i ceppi sono state riportate sopra alla linea che evidenzia la banda di frequenze presa in considerazione. Un singolo asterisco (\*) rappresenta un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ ; due asterischi (\*\*) indicano un livello di significatività di  $p \leq 0,01$ .

# ATTIVITA' EEG ANOMALA IN TOPI DOPO SOMMINISTRAZIONE DI OLIGOMERI SINTETICI DI $A\beta_{1-42}$

## A. Complessi polifasici con picco a 7 Hz



## B. Complesso polifasico con picco a 4 Hz



**FIGURA 5.14.** Esempi di quattro epoche di EEG (12 s) con complessi polifasici (*pannello di sinistra*) e il corrispondente spettro di frequenza ottenuto mediante trasformata veloce di Fourier (*pannello di destra*). **A.** Complessi polifasici con picco a 7 Hz durante epoche di: (i) veglia, (ii) sonno NREM e (iii) sonno REM. **B.** Complesso polifasico rallentato con picco a 4 Hz. I tracciati EEG sono stati ottenuti da un topo dopo somministrazione di oligomeri sintetici di  $A\beta_{1-42}$ . Nei pannelli a sinistra in ordinata è presente l'ampiezza ( $\mu V$ ) del tracciato EEG; in ascissa il tempo di registrazione (s). Nei pannelli a destra in ordinata è presente la potenza spettrale ( $\mu V^2$ ). In ascissa le frequenze (Hz) prese in considerazione.



## **6. - DISCUSSIONE**





I disturbi del sonno costituiscono uno dei sintomi più comuni nelle malattie neurodegenerative. Recentemente la ricerca clinica si è molto interessata all'associazione tra alterazioni del ritmo veglia-sonno e patologia neurodegenerativa. Insonnia, ipersonnia, parasonnie, eccessiva attività motoria notturna, alterazioni del ritmo veglia-sonno e apnee ostruttive del sonno sono, infatti, alcuni tra i più comuni disturbi che i pazienti accusano in corso di patologie neurodegenerative (Chokroverty, 2009).

Uno degli strumenti più utilizzati in campo biomedico per studiare le patologie e il loro evolversi è la generazione di modelli animali che siano in grado di ricapitolare gran parte delle manifestazioni cliniche e neuropatologiche della malattia stessa. Se, come visto, i disturbi del sonno sono parte del quadro di presentazione di molte malattie legate a processi di neurodegenerazione cellulare, è ragionevole pensare che questo tipo di alterazioni si possano ritrovare anche in modelli animali di patologie neurodegenerative umane. Il lavoro di questa tesi si è rivolto, in prima istanza, a validare (o meno) questa ipotesi. Lo scopo è stato quello di verificare la presenza di disturbi del ciclo veglia-sonno in tre modelli murini di patologie neurodegenerative umane: l'insonnia fatale familiare (FFI), la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) e la malattia di Alzheimer (AD).

Recenti studi hanno suggerito che i disturbi del sonno possano essere considerati come una delle prime manifestazioni delle patologie neurodegenerative. Il caso più emblematico riguarda il disturbo del comportamento durante il sonno REM nella sua forma idiopatica (iRBD), che sembra avere un valore predittivo per lo sviluppo di una successiva sinucleinopatia (Postuma et al., 2013). La disponibilità, presso il nostro laboratorio, di un modello murino di CJD a diversi stadi evolutivi della patologia ha permesso l'analisi longitudinale del ciclo veglia-sonno anche prima dello sviluppo dei sintomi tipici della malattia. In questo modo è stato possibile indagare l'ipotesi di una precoce insorgenza delle alterazioni del sonno nel decorso della patologia.



## 6.1 - LE ALTERAZIONI DEL SONNO NEL MODELLO MURINO DI FFI

Le alterazioni a carico del ciclo veglia-sonno sono un segno patognomico dell'insonnia fatale familiare (Montagna, 2005). Scopo di questo primo esperimento è stato quello di valutare il ciclo veglia-sonno in un modello murino di FFI al fine di confermare (o meno) la presenza di alterazioni del sonno anche in un suo modello animale. A questo scopo abbiamo registrato poligraficamente il ciclo veglia-sonno di tre ceppi di topi: i) quelli che esprimono l'omologo murino della mutazione D178N/M129 della proteina prionica (PrP) associata, nell'uomo, a FFI; ii) topi che esprimono la forma fisiologica della PrP (*wild type*) e iii) topi che non esprimono la PrP (*knock out*). I topi recanti la forma alterata di proteina prionica mostrano una marcata riduzione (circa il 50%) del sonno REM rispetto agli altri ceppi analizzati, durante la fase di luce. La riduzione è specifica della sola fase REM e non è dovuta a una diminuzione del sonno NREM, ma a una riduzione del numero degli episodi di sonno REM. Questo dato è interessante perché mentre la durata degli episodi di sonno REM è comparabile tra i ceppi analizzati, i topi che esprimono la mutazione del gene della PrP associata a FFI mostrano una certa difficoltà nell'entrare in fase REM.

La transizione tra sonno NREM e REM è regolata da diverse popolazioni neuronali a livello del tronco encefalico. I neuroni REM-on e REM-off s'interfacciano mediante un sistema mutuamente inibitorio (Luppi et al., 2004; Luppi et al., 2006; Sapin et al., 2009) dando origine al circuito "*flip-flop*" NREM - REM che determina una rapida transizione tra i due stati (Lu et al., 2006; Saper et al., 2001). Normalmente il sonno REM è uno stato che si manifesta nella cornice del sonno NREM e una riduzione di quest'ultimo potrebbe limitare gli episodi di sonno REM. I risultati di questo studio dimostrano, invece, che il sonno NREM è comparabile tra i diversi ceppi di topi analizzati, quindi la riduzione del sonno REM non è correlata ad alterazioni della fase NREM. Da queste osservazioni si può ipotizzare che la riduzione del numero degli episodi di sonno REM e, quindi, anche della sua quantità sia dovuta a una compromissione del meccanismo *flip-flop* NREM - REM. La regolazione di questo sistema è dovuta a una fine interazione tra diversi sistemi neurotrasmettitoriali, in primo luogo tra il sistema serotoninergico/noradrenergico (REM-off) e quello colinergico (REM-on). In letteratura è stato proposto che molti sistemi neurotrasmettitoriali sono alterati in corso di prionopatie, in particolare quello serotoninergico (Ledoux, 2005). In pazienti con insonnia fatale familiare l'immunoistochimica per la triptofano idrossilasi, un enzima coinvolto nel metabolismo della

serotonina, mostra un aumento dell'attività nel nucleo del rafe mediano, senza una perdita dei neuroni serotoninergici nello stesso nucleo (Wanschitz et al., 2000). Questa è una chiara indicazione del fatto che i pazienti affetti da FFI mostrano una marcata alterazione al sistema serotoninergico, nei termini di una sua iperattivazione (Cortelli et al., 2001). Data l'importanza del sistema serotoninergico nel circuito di regolazione NREM - REM, la sua alterazione potrebbe determinare una disregolazione del passaggio tra questi due stati comportamentali. In particolare, l'iperattivazione del sistema serotoninergico potrebbe causare un'inibizione dell'insorgenza del sonno REM (Monti, 2011) e quindi spiegare la riduzione del numero dei suoi episodi e della sua quantità totale.

Le alterazioni del sonno REM non si limitano al solo aspetto quantitativo: rispetto ai topi che esprimono la normale forma di proteina prionica, il modello murino di FFI mostra una marcata riduzione del potere spettrale della banda theta (6 – 10 Hz) durante gli episodi di sonno REM. La formazione ippocampale è ritenuta essere il principale generatore delle oscillazioni theta (Bland, 1986; Brown et al., 2012; Pignatelli et al., 2012) tipiche dello stato di veglia e del sonno paradossale (Cantero et al., 2003). Le analisi immunoistochimiche eseguite sui cervelli di topi FFI hanno evidenziato una marcata deposizione sinaptica della PrP a livello della formazione ippocampale, accompagnata da ipertrofia e proliferazione astrocitaria (*in preparazione*). I segni di degenerazione ippocampale potrebbero spiegare la riduzione del ritmo theta osservata in questi topi. Il ruolo primario delle oscillazioni theta nella formazione della memoria spaziale (Cornwell et al., 2008; McNaughton et al., 2006) è in accordo con i deficit della memoria spaziale riportati nel nostro modello murino (*in preparazione*).

L'alterazione del sistema "flip-flop" NREM - REM in topi FFI si riflette anche in un maggior numero di passaggi da uno stato di vigilanza all'altro. Questo valore, chiamato indice di frammentazione del sonno, correla negativamente con la qualità dell'attività ipnica. I topi FFI mostrano una maggiore frammentazione del sonno rispetto a topi di controllo. Normalmente, durante l'invecchiamento si assiste a un aumento del numero di passaggi di stato e a un peggioramento della qualità del sonno (Bliwise, 2008). Alcuni studi su animali hanno dimostrato che la maggior parte dei cambiamenti della struttura del sonno legati all'invecchiamento, come l'aumento del numero delle transizioni, sia dovuta essenzialmente a un'alterazione del sistema oressinergico (Downs et al., 2007; Zhang et al., 2005b). È possibile ipotizzare, quindi, che l'aumento del numero di transizioni dei topi FFI sia correlato a un'alterazione del sistema oressinergico. Come ricordato nell'introduzione (vd. 2.1.4.3.5 IL MODELLO AD INTERAZIONE RECIPROCA: DAL SONNO NREM AL SONNO REM), l'oressina stabilizza il meccanismo di passaggio tra il sonno e la veglia, favorendo quest'ultimo stato. In questo esperimento non sono state analizzate le alterazioni del sistema oressinergico, potrebbe essere quindi un buon

proposito per il futuro. In pazienti FFI, tuttavia, non sono state trovate alterazioni in questo modulatore (Martinez-Rodriguez et al., 2003).

L'instabilità del ciclo veglia-sonno dei topi FFI dovuto all'intrusione della veglia in periodi di sonno è alla base della perdita della fisiologica fluttuazione circadiana (luce vs buio) che contraddistingue il sonno dei roditori (Tobler, 1995). L'appiattimento della ritmicità circadiana del ciclo veglia-sonno si riflette anche sull'attività motoria, che, oltre ad essere globalmente ridotta rispetto agli altri ceppi, non mostra l'atteso aumento durante le ore di buio. Questo dato è coerente con l'appiattimento del ritmo circadiano e la perdita della macrostruttura del sonno osservate nei pazienti affetti da FFI (Cortelli et al., 1999; Montagna, 2005).

Assieme alle alterazioni del sonno, i topi FFI in tutti gli stadi di vigilanza mostrano un'attività EEG anomala. Questa consiste in complessi polifasici ad ampio voltaggio e un picco di frequenza attorno ai 7 Hz. Questo tipo di attività è stato già descritto sia in un modello murino di CJD (Dossena et al., 2008) che in un modello felino di CJD (Gourmelon et al., 1987) e può essere considerata come l'equivalente dei *periodic sharp wave complexes* (PSWC) osservati in pazienti affetti da CJD (Wieser et al., 2006). Nonostante i PSWC non sono stati osservati nell'FFI umana, pazienti con un lungo decorso della malattia (eterozigoti) possono presentare un'attività periodica transiente (simile ai PSWC) negli stadi più avanzati della malattia (Tinuper et al., 1989). L'origine dell'attività EEG anomala nei topi FFI non è ancora del tutto chiara. Recenti studi hanno rilevato un'attività simile sia in un modello murino di narcolessia (Bastianini et al., 2012) che in bambini narcolettici (Vassalli et al., 2013). Si ritiene che questo tipo di attività prenda origine da zone extra-ippocampali (Vassalli et al., 2013). È possibile ipotizzare, quindi, che l'attività anomala riscontrata in topi FFI possa essere dovuta a un'alterazione del sistema oressinergico.

In generale, il modello murino di FFI mostra un appiattimento del ciclo circadiano veglia-sonno accompagnato da una marcata riduzione degli episodi di sonno REM e della banda theta. L'FFI è una patologia in cui i disturbi del sonno sono caratteristici. Allo stesso modo, il modello murino di questa patologia mostra marcate alterazioni del ciclo veglia-sonno.

Come atteso, il modello animale non ricapitola in maniera sovrapponibile le modificazioni del sonno osservate nell'uomo, a causa delle differenze inter-specie. I pazienti affetti da FFI, ad esempio, mostrano molti episodi di sonno REM, ma di breve durata, che insorgono direttamente dalla veglia (Cortelli et al., 1999). Contrariamente, nel nostro modello murino si osservano pochi episodi di sonno REM ma di una durata paragonabile agli altri ceppi di controllo. In fasi avanzate della patologia, tuttavia, pazienti omozigoti mostrano una quasi totale assenza di episodi di sonno REM come osservato nel modello murino preso in esame. Per questo motivo, sembra che il modello murino ricapitoli in maniera migliore la patologia nelle sue fasi più avanzate. Inoltre, sia nei pazienti affetti da FFI sia nel nostro modello murino si riscontra la

totale perdita della circadianità e dell'architettura del sonno. Il ciclo ultradiano NREM - REM è del tutto alterato e a livello macroscopico non si riconosce una chiara distinzione tra un periodo di attività e di riposo.

Il sonno NREM merita una trattazione più approfondita. In questo modello murino di FFI non si osservano modificazioni in questo stato, se non un'alterazione della distribuzione circadiana della banda delta durante gli episodi di sonno NREM. Nei pazienti affetti da FFI, il sonno NREM, in particolare gli stadi più profondi sono ridotti e allo stesso tempo vi è una totale assenza di complessi K e fusi del sonno (*sleep spindles*). In una futura analisi si confronteranno le quantità di fusi del sonno nei diversi ceppi di topi presi in considerazione. Questo potrebbe costituire un maggiore punto di adesione tra patologia nell'uomo e nell'animale, poiché l'FFI umana è contraddistinta da una marcata riduzione (o totale assenza) del numero dei fusi del sonno rispetto a soggetti di controllo sani (Montagna, 2005). L'analisi di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) in topi FFI ha, infatti, evidenziato una riduzione del volume di alcune strutture cerebrali, tra cui il talamo. La riduzione talamica è accompagnata anche da una diffusa alterazione dell'apparato del Golgi che interessa i neuroni talamici. L'importanza di alcuni nuclei del talamo nella genesi dei fusi del sonno e nel ciclo veglia-sonno è noto in letteratura (Luthi, 2013). Un'analisi preliminare ha permesso di osservare una riduzione nel numero dei fusi del sonno durante il sonno NREM rispetto a topi *wild type*. Questo dato, seppur preliminare, indica che anche il sonno NREM sia compromesso nel nostro modello murino.

In conclusione le alterazioni del sonno si presentano anche nel modello murino di FFI e quindi costituiscono una caratteristica cardine della patologia.

## 6.2 - LA PRECOCE ALTERAZIONE DEL CICLO VEGLIA-SONNO NEL MODELLO MURINO DI CJD

Le alterazioni del sonno nella malattia di Creutzfeldt-Jakob, pur facendo parte del quadro di presentazione della patologia, sono sempre state trascurate. Solo recentemente alcuni autori hanno riportato e descritto sistematicamente i disturbi del sonno in una forma familiare e sporadica di Creutzfeldt-Jakob (Dossena et al., 2008; Landolt et al., 2006; Taratuto et al., 2002; Terzano et al., 1995). Alterazioni del ciclo veglia-sonno simili a quelle riscontrate in pazienti affetti da CJD sono state descritte in un modello murino di CJD in età avanzata (Dossena et al., 2008).

La disponibilità del modello murino di CJD descritto in un lavoro di Neuron del 2008 (Dossena et al., 2008) a tre diversi stadi evolutivi (6, 12 e 18 mesi) ha permesso di valutarne il ciclo veglia-sonno in momenti diversi dello sviluppo della patologia. Scopo di questo secondo esperimento è stato quello di indagare e determinare lo sviluppo temporale delle alterazioni nel ciclo veglia-sonno nel modello murino di CJD, prima citato. Per far questo abbiamo registrato poligraficamente tre diversi ceppi di topi: i) topi controllo che esprimono la forma fisiologica di PrP; ii) topi knock-out per la PrP e iii) topi che esprimono l'omologo murino della mutazione (D178N/V129) della PrP associata, nell'uomo, a CJD familiare (CJD<sup>178</sup>). Ciascun ceppo di topi è stato registrato a tre diverse età in modo da valutare l'andamento temporale del ciclo veglia-sonno. Tutti i topi sono stati, infatti, analizzati a 6, 12 e 18 mesi, che possiamo considerare rappresentare rispettivamente l'età giovane, adulta e anziana.

I topi recanti il transgene associato a CJD (Dossena et al., 2008) esprimono una forma anomala di PrP che si accumula a livello cellulare portando allo sviluppo, attorno ai 15 mesi di età, di una patologia neurologica progressiva. Questa è caratterizzata da disturbi motori, deficit alla memoria spaziale, attività EEG anomala e alterazioni del ciclo veglia-sonno. In questo studio si è scoperto che topi CJD a 6 mesi di età, pur non presentando ancora alterazioni motorie e comportamentali, mostrano complessi polifasici con un picco di frequenza attorno ai 7 Hz, già descritti in precedenza. Quest'attività EEG anomala può essere considerata come l'equivalente murino dei *periodic sharp wave complexes* (PSWC) che si osservano nei pazienti

affetti da CJD (Wieser et al., 2006). I PSWC sono considerati un segno tipico della CJD e sono inseriti nella classificazione dei criteri diagnostici per la malattia (Wieser et al., 2006). Il fatto che queste alterazioni dell'attività EEG siano presenti in topi CJD giovani, prima ancora della presenza di segni clinici evidenti, può indicare che i PSWC – o grafo elementi analoghi – nell'uomo potrebbero essere trovati in pazienti pre-sintomatici e potrebbero quindi costituire un criterio importante per una diagnosi precoce di CJD. La diagnosi delle malattie prioniche è attualmente ancora probabilistica e si basa solo su segni clinici che si manifestano solo in stadi avanzati della patologia (Wieser et al., 2006). Per questo motivo l'identificazione d'indizi clinici nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) è cruciale, non solo per escludere altre potenziali encefalopatie trattabili, ma anche per trattare le malattie prioniche quando gli interventi terapeutici saranno efficaci.

A fianco delle alterazioni dell'attività EEG, i topi CJD a 6 mesi d'età mostrano un normale ciclo veglia-sonno, con quantità di sonno e un potere spettrale EEG comparabile con gli altri ceppi controllo della stessa età.

Le prime alterazioni del ritmo veglia-sonno compaiono a 12 mesi di età. I topi CJD, a questa età, mostrano una marcata riduzione della quantità del tempo speso in sonno REM rispetto agli altri ceppi. La riduzione del sonno REM si mantiene stabile anche in topi a 18 mesi d'età, confermando i dati già presenti in letteratura (Dossena et al., 2008). Sia in topi adulti che anziani, la diminuzione della quantità di sonno REM è dovuta a un minor numero di episodi di sonno REM rispetto ai ceppi di controllo delle stesse età. Questo dato indica una certa difficoltà a entrare in sonno REM. Il sonno NREM è invece comparabile tra i ceppi alle diverse età analizzate. Solo a 18 mesi di età i topi CJD mostrano una riduzione del sonno NREM rispetto ai topi dello stesso ceppo a 12 mesi d'età. Dato che il sonno REM insorge dal sonno NREM, la riduzione della fase REM di topi CJD a 18 mesi può essere in parte spiegata dalla perdita della quantità di sonno NREM per effetto dell'invecchiamento. A 12 mesi di età le percentuali di sonno NREM sono, invece, paragonabili a topi dello stesso ceppo più giovani e a topi di ceppi diversi della stessa età. Questo dato indica che la perdita di sonno REM è specifica e non è dovuta a una riduzione delle quantità di sonno NREM. Come già descritto per il precedente esperimento, anche in questo caso si può ipotizzare una compromissione del meccanismo "flip-flop" alla base del ciclo ultradiano NREM - REM e quindi un'alterazione del sistema oressinergico. I topi CJD mostrano, inoltre, depositi di PrP, gliosi e perdita di cellule GABAergiche in molte regioni cerebrali (Belichenko et al., 1999; Dossena et al., 2008; Guentchev et al., 1997). Tra queste, alcune, come talamo, ipotalamo, ippocampo e tronco encefalico, sono primariamente coinvolte nel controllo del ciclo veglia-sonno. E' possibile che queste alterazioni neurologiche possano giocare un ruolo nelle modificazioni del sonno.



Un'altra possibile spiegazione per l'inibizione del sonno REM può essere trovata nell'azione delle citochine, in particolare dell'interleuchina-1 (IL-1). L'IL-1 è un potente inibitore del sonno REM (Opp, 2005) ed è noto essere elevata in pazienti affetti da CJD e in topi infettati, sperimentalmente, dall'agente umano della CJD (Kordek et al., 1996; Schultz et al., 2004; Sharief et al., 1999; Van et al., 2002). E' stato recentemente descritto che l'IL-1 riduce la quantità di sonno di sonno REM quando viene somministrata a livello del nucleo tegmentale laterodorsale (LDT) (Brambilla et al., 2010). Lo studio *in vitro* ha mostrato che l'IL-1 riduce la scarica dei neuroni colinergici dell'LDT agendo sulle connessioni eccitatorie glutammatergiche (Brambilla et al., 2010). Inoltre, l'IL-1 potenzia l'effetto del GABA, agendo a livello sia pre- che post-sinaptico (Brambilla et al., 2007; De et al., 2002; Miller et al., 1991; Miller and Fahey, 1994). I neuroni GABAergici del vIPAG inibiscono i neuroni del nucleo sub-laterodorsale (Lu et al., 2006). Considerando che alcune delle popolazioni neuronali REM-off e REM-on sono un misto di neuroni GABAergici e glutammatergici (Saper et al., 2001), l'IL-1 potrebbe avere un ruolo importante nelle alterazioni del sonno REM in corso di malattie prioniche. Comunque, al fine di provare questa ipotesi sono necessari ulteriori studi.

Le alterazioni nel sonno REM non sono limitate solo alla quantità di tempo spesa in questo stato. L'analisi spettrale durante gli episodi di sonno REM rileva, infatti, una riduzione della potenza della banda theta nei topi CJD sia a 12 che a 18 mesi, rispetto a topi di controllo della stessa età. Nei topi CJD è stata già descritta una riduzione dei neuroni GABAergici calretinin-positivi nel giro dentato dell'ippocampo (Dossena et al., 2008), una regione importante per la generazione dell'attività theta. I neuroni GABAergici calretinin-positivi sono una popolazione di cellule il cui bersaglio principale sono gli altri interneuroni. Questi neuroni GABAergici coordinano l'attività di differenti sottoclassi di neuroni GABAergici (Freund and Buzsaki, 1996; Gonchar and Burkhalter, 1999). La perdita di questi neuroni potrebbe contribuire alla riduzione dell'attività theta, dato che questa è generata dalla sincronizzazione dei gruppi neuronali ippocampali (Borhegyi et al., 2004). Una simile riduzione nell'attività theta è stata descritta in topi in seguito ad iniezione di  $\beta$ -amiloide a livello ippocampale. In questi topi le alterazioni dell'attività theta erano associate con un progressivo peggioramento della memoria visuo-spaziale (Villette et al., 2010). In questa cornice bene s'inseriscono le alterazioni della memoria di lavoro osservate nei topi CJD in età avanzata (Dossena et al., 2008). La riduzione della banda theta durante la fase REM potrebbe, infatti, spiegare la compromissione della memoria nel nostro modello murino di CJD.

A 18 mesi di età il sonno REM è ridotto anche nei topi WT rispetto ai 6 mesi di età e anche il sonno NREM è minore rispetto ai 12 mesi di età. Queste alterazioni sono in linea con alcuni studi sia su modelli animali che nell'uomo (Espirito, 2008; Ohayon, 2004), i quali riportano che la riduzione del sonno REM è correlata all'invecchiamento (Colas et al., 2005; Hasan et al.,

2012; Mendelson and Bergmann, 1999). Il peggioramento della qualità del sonno età-dipendente è dovuto non tanto alla perdita neuronale (Shiromani et al., 2000) quanto all'alterazione di alcuni modulatori del ciclo veglia-sonno come l'oressina (Downs et al., 2007; Zhang et al., 2005b) o l'adenosina (Mackiewicz et al., 2006; Meerlo et al., 2004; Meyer et al., 2007). Questo tipo di alterazioni si possono sommare ai disordini già descritti nei CJD, fornendo una spiegazione del perché la riduzione del sonno REM è molto più ampia nel ceppo di topi che esprimono una forma alterata di PrP rispetto a tutti gli altri ceppi.

In conclusione, questi dati mostrano che anche a 6 mesi d'età i topi CJD presentano alterazioni EEG patologiche che possono essere considerate l'omologo dei PSWC nell'uomo e quindi potrebbero essere considerati come un segno precoce della malattia. Inoltre, abbiamo confermato la presenza di alterazioni del ciclo veglia-sonno in uno stadio avanzato della patologia (18 mesi), già descritte in letteratura (Dossena et al., 2008). Il dato innovativo di questo studio è che alcune alterazioni del sonno esordiscono in uno stadio evolutivo precedente allo sviluppo della malattia e sono visibili prima dell'insorgenza delle disfunzioni motorie tipiche della malattia.

Questo studio evidenzia che le alterazioni del sonno sono presenti anche in un modello murino di CJD, una patologia in cui esse non sono la manifestazione principale. Dallo studio dell'evoluzione clinica della patologia in un modello murino, inoltre, abbiamo rilevato che le alterazioni a carico del ciclo veglia-sonno insorgono prima dello sviluppo di altri sintomi caratteristici della CJD.

## 6.3 - LE MODIFICAZIONI DEL SONNO NEL MODELLO MURINO DI AD

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa la cui eziologia è diversa dalle malattie prioniche, considerate in precedenza. L'ipotesi più accreditata è che le caratteristiche cliniche dell'AD siano dovute all'anomalo accumulo di  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -A) sotto forma di placche a livello cerebrale. Recenti evidenze hanno, tuttavia, rilevato che la neurodegenerazione e la sintomatologia tipica dell'AD non siano dovute tanto alla presenza di placche quanto dei suoi costituenti, ossia gli oligomeri solubili di  $\beta$ -amiloide.

In circa il 50% dei pazienti affetti da malattia di Alzheimer sono state riscontrate marcate alterazioni a carico del ciclo veglia-sonno, i cui meccanismi non sono stati ancora chiariti. Una delle modificazioni più specifiche nell'attività veglia-sonno nell'Alzheimer è la compromissione del sonno REM che comunemente include la riduzione sia del tempo speso in questa fase che dell'attività fasica correlata al sonno REM, per esempio i movimenti oculari rapidi e i *twitches* motori (Bliwise, 2004; Prinz et al., 1982a; Prinz et al., 1982b). In aggiunta, l'analisi spettrale rileva un rallentamento dell'attività EEG durante il sonno REM in pazienti con AD (Montplaisir et al., 1995; Petit et al., 1992; Prinz et al., 1992).

Scopo di questo esperimento è stato quello di indagare la presenza di modificazioni del sonno in un modello murino di AD in forma acuta. A questo scopo il ciclo veglia-sonno di topi è stato registrato in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (ICV) di oligomeri sintetici di  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -A).

In questo studio si è dimostrato che il sonno REM è inibito dall'iniezione di oligomeri sintetici di  $\beta$ -A dopo circa 16 ore dalla somministrazione, rispetto a una condizione di controllo. La riduzione del sonno REM è specifica e non interessa gli altri stati di vigilanza. Alla base dell'alterazione riscontrata nella fase REM vi è una diminuzione del numero degli episodi di sonno REM e una riduzione della durata di ciascun episodio dello stesso stadio.

Questi risultati sono in linea con i dati riportati in un modello murino di AD familiare, in cui la sovra-espressione del gene APP (topi Tg2576, hAPP<sup>swe</sup>) provoca il progressivo accumulo dei peptidi di  $\beta$ -A accompagnato da una decurtazione del sonno REM e della durata dei suoi episodi (Zhang et al., 2005a). Le alterazioni del sonno REM, in questo modello, erano associate a un deterioramento dei neuroni colinergici del nucleo peduncolo pontino (Zhang et al., 2005a). Si può ipotizzare, quindi, che la perdita del sonno REM in topi iniettati con oligomeri di  $\beta$ -amiloide sia dovuta a una temporanea disfunzione del sistema colinergico pontino. Come

descritto nella parte introduttiva, questo sistema comprende essenzialmente i nuclei PPT e LDT ed è prioritario nella generazione del sonno REM e delle sue manifestazioni (Jones, 1991). Alcuni studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione di oligomeri di  $\beta$ -amiloide a livello cerebrale (Harkany et al., 1995) induce un'ipofunzione colinergica e deficit mnestici (Itoh et al., 1996). Allo stesso modo, altri studi *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione di cellule a minime concentrazioni (picomolari) di oligomeri di  $\beta$ -amiloide influisce negativamente nella biosintesi e nel rilascio di acetilcolina (Hoshi et al., 1997; Nunes-Tavares et al., 2012; Satoh et al., 2001).

Il meccanismo cellulare attraverso il quale i peptidi di  $\beta$ -amiloide riducono il rilascio dell'ACh in determinate regioni cerebrali è ancora poco chiaro. Si ritiene che alla base della perdita dei neuroni colinergici possa esserci l'alterazione delle concentrazioni di calcio intracellulare e/o la produzione di mediatori tossici e infiammatori come i ROS (*Reactive Oxygen Species*), il monossido di azoto (*Nitric Oxide*, NO) e le citochine (Grasso et al., 1991; Hensley et al., 1994; Mattson et al., 1992). Alcuni studi hanno, infatti, dimostrato che gli oligomeri di beta amiloide inducono un aumento dell'espressione di alcuni mediatori pro-infiammatori, tra cui l'interleuchina-1 beta (Carrero et al., 2012; Hou et al., 2011). Come ricordato sopra, l'IL-1 agisce riducendo la quantità di sonno REM (Brambilla et al., 2010; Opp, 2005), per questo motivo potrebbe essere chiamata in causa per spiegare la specifica inibizione del sonno REM trovata in questo studio.

La perdita del sonno REM si osserva solo durante il periodo di buio, dopo 16 ore dalla somministrazione degli oligomeri. Questo dato è interessante poiché essendo i topi animali notturni, nel periodo di buio, il sonno REM è già fisiologicamente ridotto rispetto alla fase di luce. La sua riduzione ne sottolinea, quindi, una perdita rilevante. Si può ipotizzare che la latenza nell'effetto della somministrazione degli oligomeri di  $\beta$ -amiloide sia dovuta a un ritardo nella manifestazione a livello del comportamento sonno.

Un'altra ipotesi esplicativa potrebbe chiamare in causa la fisiologica fluttuazione dei livelli di  $\beta$ -amiloide endogena. I peptidi di  $\beta$ -amiloide solubili sono, infatti, un prodotto dell'attività sinaptica (Cirrito et al., 2005; Kamenetz et al., 2003) e vengono riversati nel fluido interstiziale cerebrale (ISF). Uno studio ha recentemente dimostrato che la fluttuazione circadiana dei livelli di concentrazione della  $\beta$ -amiloide endogena correla con il ciclo veglia-sonno. In altre parole, in topi Tg2576 e *wild type* la microdialisi *in vivo* ha evidenziato che i livelli di  $\beta$ -amiloide nell'ISF correlano positivamente con il tempo trascorso in veglia (Kang et al., 2009). Viceversa, diminuiscono durante i periodi di sonno. In entrambi i ceppi di topi, le concentrazioni di  $\beta$ -amiloide erano, infatti, maggiori durante il periodo di buio (aumento della veglia) rispetto al periodo di luce (diminuzione della veglia). Questo tipo di variazione correlata alle ore spese in veglia è stata evidenziata anche dall'analisi del liquido cerebrospinale (CSF) di soggetti umani

sani (Kang et al., 2009). È quindi ragionevole pensare che nel nostro esperimento il ritardo nell'effetto degli oligomeri sia proprio dovuto alla circadianità dei livelli di  $\beta$ -amiloide. L'alterazione del sonno, infatti, si osserva solo durante la fase di buio, nel momento in cui i livelli di concentrazione della  $\beta$ -amiloide endogena sono massimi. La somministrazione degli oligomeri di  $\beta$ -amiloide esogeni con i peptidi endogeni potrebbe amplificare l'effetto neurotossico e indurre l'inibizione del sonno REM. Per confermare questa ipotesi sono, tuttavia, necessari altri esperimenti. Per esempio si potrebbe provare a somministrare gli oligomeri di  $\beta$ -amiloide sintetici all'inizio della fase di buio e monitorare il ciclo veglia-sonno nelle successive 24 ore.

La decurtazione del sonno REM in seguito alla somministrazione di oligomeri sintetici di  $\beta$ -A è accompagnata anche da una marcata riduzione del potere spettrale della banda theta durante gli episodi di sonno REM nelle stesse ore. Questo dato è in linea con quanto riportato in un modello murino di AD, Tg2576, già menzionato prima, in cui l'inibizione degli episodi di sonno REM si accompagnava anche a una riduzione del potere spettrale della banda theta durante gli episodi di sonno REM rispetto a topi di controllo (Zhang et al., 2005a). Questo tipo di alterazioni spettrali è stato riportato anche in un altro modello murino di AD. I topi APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> recanti i transgeni mutati per la proteina precursore della  $\beta$ -amiloide (APP, APP<sup>swe</sup>= mutazione APP svedese) e per la presenilina-1 (PS1, dE9= delezione dell'esone 9) ricapitolano in maniera fedele l'aggregazione e la deposizione di  $\beta$ -amiloide che si trova nei pazienti affetti da AD (Garcia-Alloza et al., 2006). Uno studio ha rilevato che in questi topi la potenza spettrale della banda theta era ridotta rispetto ai topi *wild type* (Gurevicius et al., 2013), confermando quanto trovato nel nostro modello di AD.

La somministrazione di oligomeri sintetici di  $\beta$ -A induce, inoltre, un'attività EEG anomala comprendente complessi polifasici di grande ampiezza e con un picco di frequenza attorno ai 7 Hz o ai 4 Hz. Nel caso dei complessi con picco a 7 Hz si può ipotizzare che, come descritto in precedenza, questo tipo di attività sia dovuta a una compromissione del sistema oressinergico. Si ritiene che questo sistema neurotrasmettitoriale sia importante per la regolazione del ciclo veglia-sonno e di conseguenza anche per la fisiologica fluttuazione della  $\beta$ -amiloide nell'ISF (Kang et al., 2009). Dall'altra parte, i complessi polifasici con un'oscillazione più lenta potrebbero, invece, indicare un'alterazione del sistema talamico, essendo questo nucleo importante per la generazione di onde lente (Steriade, 1999).

In conclusione, in questo esperimento si sono evidenziate alterazioni del sonno in seguito alla somministrazione di oligomeri di  $\beta$ -amiloide, reminiscenti alcune di quelle osservate in pazienti affetti da malattia di Alzheimer.



## 6.4 - CONCLUSIONE

Come ampiamente trattato nella parte introduttiva, i disturbi del sonno accomunano gran parte delle malattie neurodegenerative, dalle sinucleinopatie alle prionopatie. Per questa ragione, l'analisi del ciclo veglia-sonno mediante polisonnografia nei disordini neurodegenerativi potrebbe essere un valido strumento per la loro valutazione e diagnosi. Data la precoce occorrenza delle alterazioni del ciclo veglia-sonno, la loro individuazione potrebbe costituire una base di partenza per studiare l'efficacia di agenti neuroprotettivi in grado di prevenire o ritardare il completo sviluppo della patologia neurodegenerativa. La causa primaria dei disturbi del sonno non è ancora chiara, questi possono essere attribuiti a diversi fattori, come a modificazioni correlate all'età, ai sintomi della malattia, a condizioni di comorbidità e/o al processo neurodegenerativo stesso (Gagnon et al., 2008).

Grazie a questa serie di esperimenti si è dimostrato che le alterazioni del sonno sono ampiamente diffuse anche nei modelli murini di alcune di queste patologie, in maniera simile a quanto riscontrato nelle forme umane. Questo dato indica che il deterioramento del ciclo veglia-sonno è una manifestazione principale delle malattie neurodegenerative e non solo un aspetto secondario. Le alterazioni del sonno si sono riscontrate, infatti, sia in un modello murino in cui esse sono la manifestazione principale, come l'FFI, ma, anche in modelli in cui l'alterazione del ciclo veglia-sonno non costituisce il sintomo cardinale, come nella CJD. Nel nostro modello murino di CJD, inoltre, si è osservato che il disturbo del sonno precede l'insorgenza di altri aspetti che caratterizzano il quadro clinico tipico della patologia. L'analisi del ciclo veglia-sonno in un modello murino di AD, ha rilevato, infine, che le alterazioni a suo carico sono presenti anche in uno stadio precoce, ancora prima della formazione degli elementi neuropatologici tipici dell'AD.

Questi dati possono far ipotizzare che il sonno sia, in caso di neurodegenerazione, una delle prime funzioni a essere coinvolte nel processo degenerativo, ancora prima dello sviluppo di altri sintomi. In particolare, lo studio di questi tre modelli murini di patologie neurodegenerative suggerisce che le alterazioni principali sono a carico del sonno REM.

Il motivo per cui sia la fase REM a essere maggiormente alterata non è del tutto chiaro. Una possibile spiegazione potrebbe essere data dalla cosiddetta "fragilità" del sonno REM. Questa, infatti, è una fase del sonno in cui il sistema vegetativo subisce variazioni molto importanti a causa di una perdita del controllo omeostatico delle regolazioni fisiologiche da parte delle strutture diencefaliche (Glotzbach and Heller, 1994; Parmeggiani, 1980; Parmeggiani, 1987). Durante il sonno si passa da uno stato, il sonno NREM, in cui le regolazioni omeostatiche sono pienamente operanti, a un secondo stato in cui queste regolazioni vengono meno, il sonno

REM. Il passaggio da una fase all'altra del sonno può essere considerato un rischio fisiologico per l'organismo, soprattutto in condizioni sfavorevoli sia di tipo esterno (ambientali) sia di tipo interno (patologia). Per questo la comparsa del sonno REM deve essere finemente regolata e sottoposta a un controllo piuttosto rigido. L'insorgenza del sonno REM necessita, quindi, di condizioni, interne ed esterne, ottimali per l'organismo; per questo motivo si parla di "fragilità" della fase REM. In altre parole, il sonno REM è uno stadio molto delicato e avviene solo se vi sono le condizioni ideali. Alcuni studi hanno, per esempio, rilevato che ratti esposti a basse temperature ambientali mostravano una marcata riduzione del sonno REM, fino alla sua completa abolizione (Amici et al., 1998; Cerri et al., 2005). L'alterazione della proteina prionica o la somministrazione di oligomeri di  $\beta$ -amiloide potrebbero portare a una condizione "patologica", non compatibile con il sonno REM e la sua totale manifestazione, o comunque a una situazione non ideale per l'insorgenza del sonno REM. In alcune patologie prioniche, tra cui l'FFI, si sono rilevate ingenti modificazioni a carico del sistema vegetativo (Montagna, 2005); allo stato attuale anche nella malattia di Creutzfeldt-Jakob sono state riportate alterazioni del controllo vegetativo (Pomfrett et al., 2004; Pomfrett et al., 2007), ma non ancora del tutto dimostrate. Il sonno REM, quindi, potrebbe essere ridotto in queste patologie a seguito di modificazioni vegetative che ne impediscono una normale manifestazione. Questa è solo un'ipotesi che dovrà essere confermata mediante future indagini circa la reale presenza di alterazioni del sistema vegetativo e della loro entità.

A livello molecolare, si può ipotizzare, che nelle prime fasi delle malattie neurodegenerative, sia presente una diffusa attivazione dei meccanismi di difesa del nostro organismo, in particolare del sistema gliale, che porta alla produzione aumentata di citochine. Tra le citochine, l'IL-1 è potente inibitore del sonno REM (Brambilla et al., 2010; Opp, 2005). Questo potrebbe essere il meccanismo alla base della riduzione del sonno REM osservata in tutti e tre modelli murini di malattie neurodegenerative.

Sotto un'altra prospettiva, si può ipotizzare che la decurtazione del sonno REM sia dovuta a un deterioramento del complicato sistema "flip-flop" alla base della regolazione e della transizione tra sonno NREM e REM. In particolare, si può supporre che alcuni dei sistemi neurotrasmettitoriali alla base del ciclo veglia-sonno siano compromessi già nei primi stadi della patologia, portando a disturbi del sonno. Tra questi sistemi si possono annoverare il sistema oressinergico e quello colinergico. L'oressina è un neuromodulatore che stabilizza il meccanismo del ciclo veglia-sonno favorendo uno stato di piena attività. Nella narcolessia l'insorgenza del sonno REM durante un periodo di veglia è dovuta a una riduzione di oressina (Chemelli et al., 1999). Questo peptide è quindi coinvolto anche nel determinare il giusto "timing" dell'insorgenza delle varie fasi di sonno e della comparsa del sonno REM. Nelle patologie neurodegenerative si può supporre la presenza di un'alterazione dell'oressina, nei



termini di un suo incremento, che porta a una riduzione del sonno REM e un'inerzia nella sua insorgenza. Allo stato attuale, tuttavia, non vi sono prove di un ruolo primario dell'oressina. Conseguentemente, sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio il suo ruolo nelle malattie neurodegenerative. Un altro sistema che può essere chiamato in causa è quello colinergico, soprattutto per quanto concerne la patologia di AD. L'alterazione del sistema colinergico nell'AD è un dato ormai consolidato in letteratura (Bierer et al., 1995). I neuroni colinergici del tronco encefalico sono alla base della generazione e della manifestazione del sonno REM. Per questo motivo una qualsiasi modificazione a questo sistema neurotrasmettitoriale porta a un chiaro effetto sulla fase di sonno REM.

Queste sono solo ipotesi, per essere confermate sono necessari nuovi studi più approfonditi, in modo da comprendere i meccanismi molecolari e fisiologici che stanno alla base delle alterazioni del sonno nelle patologie neurodegenerative. L'analisi dei processi molecolari e fisiopatologici potrebbe anche chiarire se il deterioramento del ciclo veglia-sonno è causa o conseguenza della patologia e stabilire il ruolo di causa - effetto tra questi due fenomeni.

Le patologie prese in considerazione in questo studio condividono un aspetto importante: tutte e tre sono dovute all'anomalo accumulo di una proteina presente in forma alterata. La presenza di proteine alterate, mal-ripiegate o non ripiegate, e la loro ridotta eliminazione può essere alla base del loro accumulo e degli effetti tossici che si osservano in corso di patologia neurodegenerativa. L'accumulo di proteine alterate induce uno stress del reticolo endoplasmatico (*Endoplasmic Reticulum*, ER) e la conseguente risposta adattiva dell'organismo. Questa risposta, che prende il nome di UPR (*Unfold Protein Response*), prevede l'attivazione di diversi processi atti a ristabilire l'omeostasi dell'ER e limitare l'accumulo di proteine non ripiegate. Si è visto che quando lo stress dell'ER è prolungato e le risposte dell'UPR non sono sufficienti a ristabilire l'equilibrio, a livello dell'ER vengono attivati una serie di meccanismi apoptotici che portano a morte cellulare. Questo meccanismo è considerato una delle spiegazioni della neurodegenerazione che si osserva in molte malattie da accumulo proteico. In altre parole, la presenza di grandi quantità di proteine mal ripiegate, che tendono all'accumulo, induce uno stress prolungato dell'ER che porta all'attivazione di meccanismi apoptotici (Brown and Naidoo, 2012). È stato, tuttavia, dimostrato che anche la perdita di sonno porta all'attivazione del sistema UPR come in caso di stress dell'ER indotto da accumulo proteico (Naidoo et al., 2005). In aggiunta, con l'avanzare dell'età la probabilità di errori nel processo di ripiegamento proteico aumenta, e di conseguenza accresce la presenza di proteine mal ripiegate. Da queste osservazioni si può ipotizzare che la riduzione del sonno in età avanzata possa creare delle condizioni di prolungato stress dell'ER che porta all'attivazione di vie apoptotiche e di accumulo proteico e di conseguenza a neurodegenerazione. Naidoo e collaboratori (Naidoo et al., 2008) hanno, infatti, dimostrato che la risposta dell'UPR indotto da

perdita di sonno è inefficace nel ristabilire l'equilibrio dell'ER e porta all'attivazione di segnali apoptotici in topi anziani rispetto a quelli giovani.

L'integrità del ciclo veglia-sonno è quindi importante per uno svolgimento ottimale di alcune delle funzioni dell'organismo. La conservazione del sonno attraverso le specie ne suggerisce, infatti, una funzione vitale. Qual è questa funzione indispensabile? Uno studio appena pubblicato su *Science* dimostra che il sonno ha una funzione principale nella regolazione dell'omeostasi metabolica (Xie et al., 2013). Nel 2012 uno studio del gruppo di ricerca di Nedergaard ha scoperto l'esistenza di un meccanismo nel SNC chiamato "glymphatic system" (sistema glinfatico), per accennare alla sua dipendenza dalle cellule gliali. Questo sistema, analogamente a quello linfatico, è un complesso sistema di vasi linfatici che sfruttando il flusso convettivo tra il liquido cerebrospinale (CSF) e il liquido interstiziale (ISF) è responsabile della rimozione (*clearance*) dai tessuti cerebrali di potenziali metaboliti tossici, di aggregati di proteine e di fluido interstiziale in eccesso (Iliff et al., 2012). Xie e collaboratori hanno dimostrato che questo sistema è fortemente stimolato dal sonno e dall'anestesia ed è associato a un aumento del volume interstiziale (circa del 60%), probabilmente dato da una riduzione delle cellule astrogliali. Quest'aumento provoca un impressionante accrescimento degli scambi tra CSF e ISF. A seguire, i flussi convettivi dell'ISF aumentano il tasso di eliminazione dei metaboliti, tra cui la  $\beta$ -amiloide e la proteina tau, durante il sonno e lo stato di anestesia. La funzione ristoratrice dell'attività ipnica, quindi, potrebbe essere dovuta a un rafforzamento del processo di rimozione di "prodotti di scarto", potenzialmente neurotossici, che si accumulano durante la veglia a livello del sistema nervoso centrale. La *clearance* durante le fasi di sonno è, infatti, molto più rapida rispetto alle ore di veglia. Molte delle proteine associate a malattie neurodegenerative, come la  $\beta$ -amiloide (Cirrito et al., 2005), l' $\alpha$ -sinucleina (Larson et al., 2012) e la proteina tau (Yamada et al., 2011), sono presenti nello spazio interstiziale che circonda le cellule cerebrali. Grazie al sistema glinfatico (*glymphatic system*), sopra descritto, le proteine interstiziali, compresa la  $\beta$ -amiloide, sono rimosse, limitando il loro accumulo e la loro potenziale tossicità. Una disfunzione a livello di questo sistema potrebbe giocare un ruolo importante nella patogenesi delle malattie neurodegenerative. Una migliore caratterizzazione di questo sistema nell'uomo e della sua relazione con il ciclo veglia-sonno potrebbe portare a nuove terapie e metodi di prevenzione delle malattie neurodegenerative.

Il perché abbiamo necessità di dormire sembra farsi sempre più chiaro. Il sonno occupa circa un terzo di tutta la nostra vita e, ingenuamente, può sembrare tempo "prezioso" sottratto alle nostre quotidiane attività. È noto, tuttavia, che il sonno è essenziale per la formazione e il consolidamento della memoria e gioca un ruolo centrale nella genesi di nuove connessioni neurali e nella rimozione (*pruning*, letteralmente potatura) di quelle ormai vecchie e inutilizzate (Tononi and Cirelli, 2014). Recentemente, alcuni studi (Xie et al., 2013) hanno rilevato che il

sonno possa avere un ruolo cruciale nel mantenimento fisiologico del nostro cervello. Mentre dormiamo, infatti, sarebbero rimossi dal tessuto cerebrale tutti i prodotti di rifiuto che si sono accumulati durante l'attività giornaliera. Per comprendere meglio ciò che succede durante il sonno all'interno del nostro cervello si può pensare a ciò che accade nei muscoli. Durante un esercizio fisico, all'inizio si è carichi di energia, ma presto il respiro inizia a farsi affannoso, i muscoli s'indeboliscono e la fatica comincia a farsi sentire. Ciò che accade è che il nostro organismo non è più in grado di trasportare ossigeno in maniera efficiente ai muscoli e quindi s'inizia a generare energia in maniera anaerobica (in assenza di ossigeno). Questo processo anaerobico ci permette di continuare l'esercizio fisico senza problemi. La produzione di energia in assenza di ossigeno comporta, tuttavia, l'accumulo di sottoprodotti tossici a livello muscolare. Questi sottoprodotti vengono rimossi tramite il sistema linfatico del corpo, che permette un ritorno alle condizioni normali senza nessun danno permanente. Il nostro cervello, utilizzando il 20% dell'energia del nostro organismo, è sede di accumulo di sottoprodotti derivanti dall'attività neurale. Il sistema glinfatico, parimenti a quello linfatico, permette di eliminare dal tessuto nervoso tutti i prodotti che si sono accumulati durante la normale attività e di ripristinare il funzionamento cerebrale. Questo meccanismo, come detto sopra, agisce soprattutto durante la fase di sonno.

Nella società moderna circa l'80 % degli adulti è sottoposto a una cronica limitazione o alterazione delle ore di sonno a causa del lavoro (lavoratori turnisti, stress lavorativo ecc.), dell'insonnia e di altre problematiche. Qualunque sia la causa, quando il sonno è disturbato, il sistema di *reset* del nostro cervello è compromesso. Ciò comporta un accumulo di prodotti tossici nel tessuto cerebrale che, all'estremo, potrebbe portare ad accelerare la comparsa di patologie neurodegenerative. Sebbene il rapporto tra malattie neurodegenerative e disturbi del sonno sia molto simile al classico dilemma "dell'uovo e della gallina", è ovvio che l'alterazione del sonno porta a una scarsa efficienza di tutti quei meccanismi che sono attivi durante il sonno. Una delle iniziative che si potrebbe portare avanti è quella di intervenire migliorando la qualità del sonno, soprattutto in età adulta e anziana, proponendo una vera e propria igiene del sonno. In un recente studio Roh e collaboratori hanno, infatti, dimostrato che la normalizzazione del ciclo veglia-sonno e delle alterazioni biochimiche in un modello murino di AD preveniva l'aggregazione e la deposizione della  $\beta$ -amiloide (Roh et al., 2012). Partendo da questa semplice osservazione si potrebbero pianificare studi atti a verificare il potenziale terapeutico e/o neuroprotettivo della normalizzazione del ciclo veglia-sonno in caso di malattia neurodegenerativa.

Con questo studio abbiamo portato dati a supporto dell'ipotesi che l'alterazione del sonno è una manifestazione tipica delle patologie neurodegenerative anche nei rispettivi modelli murini.

Frequentemente, il disturbo del sonno oltre a manifestarsi in corso di neurodegenerazione, precede l'insorgenza della sintomatologia tipica della patologia.

In questo contesto è quindi possibile proporre che l'individuazione di alterazioni a livello del ciclo veglia-sonno ha un ruolo importante: da una parte perché questi potrebbero essere un indice precoce dello sviluppo di una futura malattia neurodegenerativa; dall'altra perché il miglioramento di queste alterazioni potrebbe portare avere un ruolo neuroprotettivo nei confronti della malattia neurodegenerativa in corso o futura.

La trattazione a questo punto diventa lunga e tortuosa, trovo quindi molto appropriato concludere con un passo dell'Eneide. Alla richiesta di Didone di narrarle la caduta di Troia e i successivi sette anni di peregrinazione, Enea rispose:

*“et iam nox umida caelo  
praecipitat suadentque cadentia sidera somnos”*

*“e ormai la notte umida scende dal cielo  
e le stelle che cadono ci invitano al sonno.”*

(Virgilio, Eneide, II, 3)

# 7. - RINGRAZIAMENTI



Un ringraziamento va al mio tutor: Professor Luca Imeri.

Ringrazio il coordinatore del dottorato: Professor Michele Mazzanti.

Ringrazio tutti i miei colleghi di lavoro: Susanna Bianchi, Loris Ferrari e Francesca Baracchi per il supporto e la grande collaborazione.

Ringrazio tutti i collaboratori dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano: in particolare, il dottor Roberto Chiesa, Susanna Mantovani e Ilaria Bertani per avermi dato la possibilità di utilizzare i loro modelli animali di malattie prioniche; il dottor Mario Salmona, Massimo Messa e Laura Colombo per la fornitura degli oligomeri sintetici di  $\beta$ -amiloide e per i loro utili consigli. Claudia Balducci per i validi suggerimenti sulla tecnica d'incannulazione intracerebroventricolare.

Infine un ringraziamento alla mia famiglia e a Emanuele, per il supporto e per il grande affetto dimostratomi.





## 8. BIBLIOGRAFIA



- Aarsland,D., Larsen,J.P., Lim,N.G., Janvin,C., Karlsen,K., Tandberg,E., and Cummings,J.L. (1999). Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *67*, 492-496.
- Achermann,P., and Borbely,A.A. (1997). Low-frequency (< 1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram. *Neuroscience* *81*, 213-222.
- Aguzzi,A., and Calella,A.M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev.* *89*, 1105-1152.
- Aguzzi,A., Heikenwalder,M., and Polymenidou,M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 552-561.
- Akerstedt,T., and Gillberg,M. (1986). Sleep duration and the power spectral density of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *64*, 119-122.
- Albin,R.L., Koeppe,R.A., Chervin,R.D., Consens,F.B., Wernette,K., Frey,K.A., and Aldrich,M.S. (2000). Decreased striatal dopaminergic innervation in REM sleep behavior disorder. *Neurology* *55*, 1410-1412.
- Aloe,F., Azevedo,A.P., and Hasan,R. (2005). [Sleep-wake cycle mechanisms.]. *Rev. Bras. Psiquiatr.* *27 Suppl 1*, 33-39.
- American Academy of Sleep Medicine (2005). *International Classification of Sleep Disorders* (Westchester, IL).
- Amici,R., Zamboni,G., Perez,E., Jones,C.A., and Parmeggiani,P.L. (1998). The influence of a heavy thermal load on REM sleep in the rat. *Brain Res.* *781*, 252-258.
- Andretic,R., Franken,P., and Tafti,M. (2008). Genetics of sleep. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 361-388.
- Arduini,A., and Moruzzi,G. (1953). Olfactory arousal reactions in the cerveau isole cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *5*, 243-250.
- Arnulf,I., Nielsen,J., Lohmann,E., Schiefer,J., Wild,E., Jennum,P., Konofal,E., Walker,M., Oudiette,D., Tabrizi,S., and Durr,A. (2008). Rapid eye movement sleep disturbances in Huntington disease. *Arch. Neurol.* *65*, 482-488.
- Aschoff,J., and Wever,R. (1976). Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Fed. Proc.* *35*, 236-32.
- Aserinsky,E., and Kleitman,N. (2003). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. 1953. *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *15*, 454-455.
- Ashkenazi,I.E., Reinberg,A., Bickova-Rocher,A., and Ticher,A. (1993). The genetic background of individual variations of circadian-rhythm periods in healthy human adults. *Am. J. Hum. Genet.* *52*, 1250-1259.
- Aston-Jones,G., and Bloom,F.E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* *1*, 876-886.
- Avoni,P., Cortelli,P., Montagna,P., Tinuper,P., Sforza,E., Contin,M., Parchi,P., Pierangeli,G., Maltoni,P., Pavani,A., and . (1991). Circadian hormonal rhythms in two new cases of fatal familial insomnia. *Acta Neurol. (Napoli)* *13*, 574-576.

- Aziz,N.A., Anguelova,G.V., Marinus,J., Lammers,G.J., and Roos,R.A. (2010). Sleep and circadian rhythm alterations correlate with depression and cognitive impairment in Huntington's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 16, 345-350.
- Balducci,C., Beeg,M., Stravalaci,M., Bastone,A., Scip,A., Biasini,E., Tapella,L., Colombo,L., Manzoni,C., Borsello,T., Chiesa,R., Gobbi,M., Salmona,M., and Forloni,G. (2010). Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 2295-2300.
- Baracchi,F., and Opp,M.R. (2008). Sleep-wake behavior and responses to sleep deprivation of mice lacking both interleukin-1 beta receptor 1 and tumor necrosis factor-alpha receptor 1. *Brain Behav. Immun.* 22, 982-993.
- Bartels,T., Choi,J.G., and Selkoe,D.J. (2011). alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107-110.
- Basheer,R., Strecker,R.E., Thakkar,M.M., and McCarley,R.W. (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.* 73, 379-396.
- Bastianini,S., Silvani,A., Berteotti,C., Lo,M., V, and Zoccoli,G. (2012). High-amplitude theta wave bursts during REM sleep and cataplexy in hypocretin-deficient narcoleptic mice. *J. Sleep Res.* 21, 185-188.
- Batini,C., Magni,F., Palestini,M., Rossi,G.F., and Zanchetti,A. (1959a). Neural mechanisms underlying the enduring EEG and behavior activation in the midpontine pretrigeminal cat. *Arch. Ital. Biol.* 97, 13-25.
- Batini,C., Moruzzi,G., Palestini,M., Rossi,G.F., and Zanchetti,A. (1958). Persistent pattern of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science* 128, 30-32.
- Batini,C., Moruzzi,G., Palestini,M., Rossi,G.F., and Zanchetti,A. (1959b). Effects of complete pontine transection on the sleep-wakefulness rhythm: the midpontine pretrigeminal preparation. *Arch. Ital. Biol.* 97, 1-12.
- Batini,C., Palestini,M., Rossi,G.F., and Zanchetti,A. (1959c). EEG activation patterns in the midpontine pretrigeminal cat following sensory deafferentation. *Arch. Ital. Biol.* 97, 26-32.
- Belardetti,E., Borgia,R., and Mancina,M. (1957). Prosencephalic mechanisms of ECoG desynchronization in Cerveau isole cats. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 42, 213-225.
- Belenky,G., Wesensten,N.J., Thorne,D.R., Thomas,M.L., Sing,H.C., Redmond,D.P., Russo,M.B., and Balkin,T.J. (2003). Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *J Sleep Res.* 12, 1-12.
- Belichenko,P.V., Miklossy,J., Belser,B., Budka,H., and Celio,M.R. (1999). Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Dis.* 6, 269-279.
- Benington,J.H., and Heller,H.C. (1995). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog. Neurobiol.* 45, 347-360.
- Beraldo,F.H., Arantes,C.P., Santos,T.G., Machado,C.F., Roffe,M., Hajj,G.N., Lee,K.S., Magalhaes,A.C., Caetano,F.A., Mancini,G.L., Lopes,M.H., Americo,T.A., Magdesian,M.H., Ferguson,S.S., Linden,R., Prado,M.A., and Martins,V.R. (2011). Metabotropic glutamate

receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J.* 25, 265-279.

Berger, R.J., and Oswald, I. (1962). Effects of sleep deprivation on behaviour, subsequent sleep, and dreaming. *J Ment. Sci.* 108, 457-465.

Biasini, E., Turnbaugh, J.A., Unterberger, U., and Harris, D.A. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci.* 35, 92-103.

Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P., and Davis, K.L. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 64, 749-760.

Bizzi, E., and Brooks, D.C. (1963). Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during deep sleep. *Arch. Ital. Biol.* 101, 666-680.

Blake, H., and Gerard, R.W. (1937). Brain potentials during sleep. *Am J Physiol* 119, 692-703.

Blanco-Centurion, C., Xu, M., Murillo-Rodriguez, E., Gerashchenko, D., Shiromani, A.M., Salin-Pascual, R.J., Hof, P.R., and Shiromani, P.J. (2006). Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain. *J. Neurosci.* 26, 8092-8100.

Bland, B.H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Progress in Neurobiology* 26, 1-54.

Bliwise, D.L. (2004). Sleep disorders in Alzheimer's disease and other dementias. *Clin. Cornerstone.* 6 *Suppl 1A*, S16-S28.

Bliwise, D.L. (2008). Normal aging. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, C. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Saunders), pp. 24-38.

Bliwise, D.L., Carroll, J.S., Lee, K.A., Nekich, J.C., and Dement, W.C. (1993). Sleep and "sundowning" in nursing home patients with dementia. *Psychiatry Res.* 48, 277-292.

Boeve, B.F. (2010a). Predicting the future in idiopathic rapid-eye movement sleep behaviour disorder. *Lancet Neurol.* 9, 1040-1042.

Boeve, B.F. (2010b). REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1184, 15-54.

Boeve, B.F. (2013). Idiopathic REM sleep behaviour disorder in the development of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 12, 469-482.

Boeve, B.F., Silber, M.H., Ferman, T.J., Lucas, J.A., and Parisi, J.E. (2001). Association of REM sleep behavior disorder and neurodegenerative disease may reflect an underlying synucleinopathy. *Mov Disord.* 16, 622-630.

Boeve, B.F., Silber, M.H., Saper, C.B., Ferman, T.J., Dickson, D.W., Parisi, J.E., Benarroch, E.E., Ahlskog, J.E., Smith, G.E., Caselli, R.C., Tippman-Peikert, M., Olson, E.J., Lin, S.C., Young, T., Wszolek, Z., Schenck, C.H., Mahowald, M.W., Castillo, P.R., Del, T.K., and Braak, H. (2007). Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* 130, 2770-2788.

- Boissard,R., Fort,P., Gervasoni,D., Barbagli,B., and Luppi,P.H. (2003). Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 1627-1639.
- Boissard,R., Gervasoni,D., Schmidt,M.H., Barbagli,B., Fort,P., and Luppi,P.H. (2002). The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 1959-1973.
- Bolton,D.P., and Herman,S. (1974). Ventilation and sleep state in the new-born. *J. Physiol* *240*, 67-77.
- Borbely,A.A. (2009). Refining sleep homeostasis in the two-process model. *J. Sleep Res.* *18*, 1-2.
- Borchelt,D.R., Scott,M., Taraboulos,A., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* *110*, 743-752.
- Borhegyi,Z., Varga,V., Szilagyi,N., Fabo,D., and Freund,T.F. (2004). Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J. Neurosci.* *24*, 8470-8479.
- Bourgin,P., Huitron-Resendiz,S., Spier,A.D., Fabre,V., Morte,B., Criado,J.R., Sutcliffe,J.G., Henriksen,S.J., and de,L.L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* *20*, 7760-7765.
- Braidy,N., Munoz,P., Palacios,A.G., Castellano-Gonzalez,G., Inestrosa,N.C., Chung,R.S., Sachdev,P., and Guillemin,G.J. (2012). Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *J. Neural Transm.* *119*, 173-195.
- Brambilla,D., Barajon,I., Bianchi,S., Opp,M.R., and Imeri,L. (2010). Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons in vitro and REM sleep when microinjected into the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Sleep* *33*, 919-929.
- Brambilla,D., Chapman,D., and Greene,R. (2005). Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron* *46*, 275-283.
- Brambilla,D., Franciosi,S., Opp,M.R., and Imeri,L. (2007). Interleukin-1 inhibits firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and enhances GABAergic inhibitory postsynaptic potentials. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 1862-1869.
- Brandner,S., Raeber,A., Sailer,A., Blattler,T., Fischer,M., Weissmann,C., and Aguzzi,A. (1996). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 13148-13151.
- Breedlove,S.M., Rosenzweig,M.R., and Watson,N.V. (2007). *Biological Rhythms, Sleep and Dreamings*. In *Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, Cognitive, and Clinical Neuroscience*, (Sunderland: Sinauer Associates).
- Bremer,F. (1935). Cerveau "isolé" et Physiologie du Sommeil. *C R Soc Biol* *118*, 1235-1241.
- Bremer,F. (1936). Nouvelles recherches sur le mécanisme du sommeil. *C R Soc Biol* *122*, 460-464.

- Bremer, F. (1937a). Etude oscillographique des activités sensorielles du cortex cérébral. *C R Soc Biol* 124, 842-846.
- Bremer, F. (1937b). L'activité cérébrale au cours du sommeil et de la narcose. Contribution à l'étude du mécanisme du sommeil. *Bull Acad Roy Med Belg* 4, 68-86.
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.A., Weis, J., and Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* 13, 310-318.
- Brooks, D.C., and Bizzi, E. (1963). Brainstem electrical activity during deep sleep. *Arch. Ital. Biol.* 101, 648-665.
- Brown, L.K. (2012). Can sleep deprivation studies explain why human adults sleep? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 18, 541-545.
- Brown, M.K., and Naidoo, N. (2012). The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol* 3, 263.
- Brown, P. (1990). Transmissible spongiform encephalopathies in humans: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Strausler-Scheinker disease. *Can. J. Vet. Res.* 54, 38-41.
- Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E., and McCarley, R.W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 92, 1087-1187.
- Brown, R.E., Sergeeva, O., Eriksson, K.S., and Haas, H.L. (2001a). Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 40, 457-459.
- Brown, R.E., Stevens, D.R., and Haas, H.L. (2001b). The physiology of brain histamine. *Prog. Neurobiol.* 63, 637-672.
- Brunner, D.P., Dijk, D.J., and Borbely, A.A. (1993). Repeated partial sleep deprivation progressively changes in EEG during sleep and wakefulness. *Sleep* 16, 100-113.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Buggy, J., and Johnson, A.K. (1978). Angiotensin-induced thirst: effects of third ventricle obstruction and periventricular ablation. *Brain Res.* 149, 117-128.
- Bunning, E. (1969). Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochem. Photobiol.* 9, 219-228.
- Burgess, C., Lai, D., Siegel, J., and Peever, J. (2008). An endogenous glutamatergic drive onto somatic motoneurons contributes to the stereotypical pattern of muscle tone across the sleep-wake cycle. *J. Neurosci.* 28, 4649-4660.
- Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Sudhof, T.C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663-1667.

- Burre, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A.T., and Sudhof, T.C. (2013). Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature* 498, E4-E6.
- Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T., and Prusiner, S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* 62, 1558-1564.
- Calella, A.M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I.M., and Aguzzi, A. (2010). Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol. Med* 2, 306-314.
- Cannon, W.B. (1932). *The wisdom of the body.* (New York: Norton).
- Cantero, J.L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M.J., Madsen, J.R., and Kocsis, B. (2003). Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.* 23, 10897-10903.
- Capellini, I., Nunn, C.L., McNamara, P., Preston, B.T., and Barton, R.A. (2008). Energetic constraints, not predation, influence the evolution of sleep patterning in mammals. *Funct. Ecol.* 22, 847-853.
- Carrero, I., Gonzalo, M.R., Martin, B., Sanz-Anquela, J.M., Arevalo-Serrano, J., and Gonzalo-Ruiz, A. (2012). Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol.* 236, 215-227.
- Carskadon, M.A., and Dement, W.C. (2011). Normal Human Sleep: An Overview. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, C. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Elsevier - Saunders), pp. 16-26.
- Casagrande, M. (1998). La registrazione poligrafica del sonno. In *Psicofisiologia del sonno*, M. Casagrande, and L. De Gennaro, eds. (Milano: Raffaello Cortina), pp. 3-35.
- Cash, S.S., Halgren, E., Dehghani, N., Rossetti, A.O., Thesen, T., Wang, C., Devinsky, O., Kuzniecky, R., Doyle, W., Madsen, J.R., Bromfield, E., Eross, L., Halasz, P., Karmos, G., Csercsa, R., Wittner, L., and Ulbert, I. (2009). The human K-complex represents an isolated cortical down-state. *Science* 324, 1084-1087.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 919-930.
- Caughey, B., and Baron, G.S. (2006). Prions and their partners in crime. *Nature* 443, 803-810.
- Cerri, M., Ocampo-Garces, A., Amici, R., Baracchi, F., Capitani, P., Jones, C.A., Luppi, M., Perez, E., Parmeggiani, P.L., and Zamboni, G. (2005). Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep* 28, 694-705.
- Cespuglio, R., Faradji, H., Gomez, M.E., and Jouvet, M. (1981). Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neurosci. Lett.* 24, 133-138.
- Chase, M.H., and Morales, F.R. (1990). The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu. Rev. Psychol.* 41, 557-584.



- Chemelli,R.M., Willie,J.T., Sinton,C.M., Elmquist,J.K., Scammell,T., Lee,C., Richardson,J.A., Williams,S.C., Xiong,Y., Kisanuki,Y., Fitch,T.E., Nakazato,M., Hammer,R.E., Saper,C.B., and Yanagisawa,M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-451.
- Chiesa,R., and Harris,D.A. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.* 8, 743-763.
- Chokroverty,S. (2009). Sleep and neurodegenerative diseases. *Semin. Neurol.* 29, 446-467.
- Chowdhury,I., Sengupta,A., and Maitra,S.K. (2008). Melatonin: fifty years of scientific journey from the discovery in bovine pineal gland to delineation of functions in human. *Indian J. Biochem. Biophys.* 45, 289-304.
- Christie,M.A., Bolortuya,Y., Chen,L.C., McKenna,J.T., McCarley,R.W., and Strecker,R.E. (2008). Microdialysis elevation of adenosine in the basal forebrain produces vigilance impairments in the rat psychomotor vigilance task. *Sleep* 31, 1393-1398.
- Cirelli,C. (2009). The genetic and molecular regulation of sleep: from fruit flies to humans. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 549-560.
- Cirelli,C., and Tononi,G. (2008). Is sleep essential? *PLoS. Biol.* 6, e216.
- Cirrito,J.R., Yamada,K.A., Finn,M.B., Sloviter,R.S., Bales,K.R., May,P.C., Schoepp,D.D., Paul,S.M., Mennerick,S., and Holtzman,D.M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48, 913-922.
- Clabough,E.B. (2013). Huntington's Disease: The Past, Present, and Future Search for Disease Modifiers. *Yale J. Biol. Med.* 86, 217-233.
- Cleary,J.P., Walsh,D.M., Hofmeister,J.J., Shankar,G.M., Kuskowski,M.A., Selkoe,D.J., and Ashe,K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79-84.
- Clement,O., Sapin,E., Berod,A., Fort,P., and Luppi,P.H. (2011). Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep* 34, 419-423.
- Coccagna,G., Mantovani,M., Brignani,F., Manzini,A., and Lugaresi,E. (1971). Laboratory note. Arterial pressure changes during spontaneous sleep in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 31, 277-281.
- Coin,I., Beyermann,M., and Bienert,M. (2007). Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat. Protoc.* 2, 3247-3256.
- Colas,D., Cespuglio,R., and Sarda,N. (2005). Sleep wake profile and EEG spectral power in young or old senescence accelerated mice. *Neurobiol. Aging* 26, 265-273.
- Colling,S.B., Collinge,J., and Jefferys,J.G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci. Lett.* 209, 49-52.
- Colling,S.B., Khana,M., Collinge,J., and Jefferys,J.G. (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res.* 755, 28-35.

- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 519-550.
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Frosh, A., Mead, S., Hill, A.F., Brandner, S., Thomas, D., and Alpers, M.P. (2008). A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos. Trans. R Soc Lond B Biol Sci.* *363*, 3725-3739.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., and Jefferys, J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* *370*, 295-297.
- Comella, C.L., Tanner, C.M., and Ristanovic, R.K. (1993). Polysomnographic sleep measures in Parkinson's disease patients with treatment-induced hallucinations. *Ann. Neurol.* *34*, 710-714.
- Cordeau, J.P., and Mancina, M. (1959). Evidence for the existence of an electroencephalographic synchronization mechanism originating in the lower brain stem. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *11*, 551-564.
- Cornwell, B.R., Johnson, L.L., Holroyd, T., Carver, F.W., and Grillon, C. (2008). Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial navigation predicts performance on a virtual Morris water maze. *J. Neurosci.* *28*, 5983-5990.
- Cortelli, P., Gambetti, P., Montagna, P., and Lugaresi, E. (1999). Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics. *J Sleep Res.* *8 Suppl 1*, 23-29.
- Cortelli, P., Polinsky, R., Montagna, P., and Lugaresi, E. (2001). Alteration of the serotonergic system in fatal familial insomnia. *Ann. Neurol.* *50*, 421-422.
- Criado, J.R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J.L., Wills, D.N., Henriksen, S.J., Race, R., Manson, J.C., Chesebro, B., and Oldstone, M.B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.* *19*, 255-265.
- Curro, D.R., Pare, D., and Steriade, M. (1991). Short-lasting nicotinic and long-lasting muscarinic depolarizing responses of thalamocortical neurons to stimulation of mesopontine cholinergic nuclei. *J. Neurophysiol.* *65*, 393-406.
- Darios, F., Ruiperez, V., Lopez, I., Villanueva, J., Gutierrez, L.M., and Davletov, B. (2010). Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO Rep.* *11*, 528-533.
- Datta, S. (1997). Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell Mol. Neurobiol.* *17*, 341-365.
- Datta, S., and Hobson, J.A. (1995). Suppression of ponto-geniculo-occipital waves by neurotoxic lesions of pontine caudo-lateral peribrachial cells. *Neuroscience* *67*, 703-712.
- Dauvilliers, Y., Rompre, S., Gagnon, J.F., Vendette, M., Petit, D., and Montplaisir, J. (2007). REM sleep characteristics in narcolepsy and REM sleep behavior disorder. *Sleep* *30*, 844-849.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* *273*, 9443-9449.

- Davies,P., and Maloney,A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- Dawes,G.S., Fox,H.E., Leduc,B.M., Liggins,G.C., and Richards,R.T. (1972). Respiratory movements and rapid eye movement sleep in the foetal lamb. *J. Physiol* 220, 119-143.
- De Gennaro L., and Ferrara,M. (2003). Sleep spindles: an overview. *Sleep Med. Rev.* 7, 423-440.
- De Gennaro,L., and Casagrande,M. (1998). *Psicofisiologia del sonno: metodi e tecniche di ricerca* (Milano: pp. 3-373).
- de Lau,L.M., and Breteler,M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525-535.
- De,A., Churchill,L., Obal,F., Jr., Simasko,S.M., and Krueger,J.M. (2002). GHRH and IL1beta increase cytoplasmic Ca(2+) levels in cultured hypothalamic GABAergic neurons. *Brain Res.* 949, 209-212.
- Del,T.K., Rub,U., De Vos,R.A., Bohl,J.R., and Braak,H. (2002). Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 413-426.
- Dement,W.C. (1976). *Some must watch while some must sleep* (New York: W.W.Norton & Co).
- Dement,W.C., and Greenberg,S. (1966). Changes in total amount of stage four sleep as a function of partial sleep deprivation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 20, 523-526.
- Dement,W.C., and Kleitman,N. (1957). The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J. Exp. Psychol.* 53, 339-346.
- Deurveilher,S., and Semba,K. (2003). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. *Brain Res.* 987, 100-106.
- Di,M.L., Squitieri,F., Napolitano,G., Campanella,G., Trofatter,J.A., and Conneally,P.M. (1993). Suicide risk in Huntington's disease. *J. Med. Genet.* 30, 293-295.
- Diarra-Mehrpour,M., Arrabal,S., Jalil,A., Pinson,X., Gaudin,C., Pietu,G., Pitaval,A., Ripoche,H., Eloit,M., Dormont,D., and Chouaib,S. (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res.* 64, 719-727.
- Dickerson,L.W., Huang,A.H., Nearing,B.D., and Verrier,R.L. (1993). Primary coronary vasodilation associated with pauses in heart rhythm during sleep. *Am J Physiol* 264, R186-R196.
- DiFiglia,M., Sapp,E., Chase,K., Schwarz,C., Meloni,A., Young,C., Martin,E., Vonsattel,J.P., Carraway,R., Reeves,S.A., and . (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075-1081.
- Dijk,D.J. (1995). EEG slow waves and sleep spindles: windows on the sleeping brain. *Behav. Brain Res.* 69, 109-116.
- Dijk,D.J., Beersma,D.G., and Daan,S. (1987). EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness. *J Biol. Rhythms* 2, 207-219.

- Dossena,S., Imeri,L., Mangieri,M., Garofoli,A., Ferrari,L., Senatore,A., Restelli,E., Balducci,C., Fiordaliso,F., Salio,M., Bianchi,S., Fioriti,L., Morbin,M., Pincherle,A., Marcon,G., Villani,F., Carli,M., Tagliavini,F., Forloni,G., and Chiesa,R. (2008). Mutant prion protein expression causes motor and memory deficits and abnormal sleep patterns in a transgenic mouse model. *Neuron* 60, 598-609.
- Downs,J.L., Dunn,M.R., Borok,E., Shanabrough,M., Horvath,T.L., Kohama,S.G., and Urbanski,H.F. (2007). Orexin neuronal changes in the locus coeruleus of the aging rhesus macaque. *Neurobiol. Aging* 28, 1286-1295.
- Duda,J.E., Lee,V.M., and Trojanowski,J.Q. (2000). Neuropathology of synuclein aggregates. *J. Neurosci. Res.* 61, 121-127.
- Dufour,R., and Court,L. (1977). [Output of the cerebral circulation during paradoxical sleep in the rabbit]. *Arch. Ital. Biol.* 115, 57-76.
- Duron,B. (1972). [Respiratory function during physiological sleep]. *Bull. Physiopathol. Respir. (Nancy.)* 8, 1031-1057.
- Eisensehr,I., Linke,R., Noachtar,S., Schwarz,J., Gildehaus,F.J., and Tatsch,K. (2000). Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. Comparison with Parkinson's disease and controls. *Brain* 123 ( Pt 6), 1155-1160.
- Eisensehr,I., Linke,R., Tatsch,K., Kharraz,B., Gildehaus,J.F., Wetter,C.T., Trenkwalder,C., Schwarz,J., and Noachtar,S. (2003). Increased muscle activity during rapid eye movement sleep correlates with decrease of striatal presynaptic dopamine transporters. IPT and IBZM SPECT imaging in subclinical and clinically manifest idiopathic REM sleep behavior disorder, Parkinson's disease, and controls. *Sleep* 26, 507-512.
- el Mansari M., Sakai,K., and Jouvet,M. (1989). Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.* 76, 519-529.
- Emser,W., Brenner,M., Stober,T., and Schimrigk,K. (1988). Changes in nocturnal sleep in Huntington's and Parkinson's disease. *J. Neurol.* 235, 177-179.
- Escudero,M., and Marquez-Ruiz,J. (2008). Tonic inhibition and ponto-geniculo-occipital-related activities shape abducens motoneuron discharge during REM sleep. *J. Physiol* 586, 3479-3491.
- Esiodo (2004). *Teogonia. Mondadori*, a cura di Vasta E.
- Espiritu,J.R. (2008). Aging-related sleep changes. *Clin. Geriatr. Med* 24, 1-14, v.
- Fantini,M.L., Gagnon,J.F., Petit,D., Rompre,S., Decary,A., Carrier,J., and Montplaisir,J. (2003). Slowing of electroencephalogram in rapid eye movement sleep behavior disorder. *Ann. Neurol.* 53, 774-780.
- Fauvet,B., Mbefo,M.K., Fares,M.B., Desobry,C., Michael,S., Ardah,M.T., Tsika,E., Coune,P., Prudent,M., Lion,N., Eliezer,D., Moore,D.J., Schneider,B., Aebischer,P., El-Agnaf,O.M., Masliah,E., and Lashuel,H.A. (2012). alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol Chem.* 287, 15345-15364.
- Feinberg,I. (1974). Changes in sleep cycle patterns with age. *J Psychiatr. Res.* 10, 283-306.

- Fellin,T., Halassa,M.M., Terunuma,M., Succol,F., Takano,H., Frank,M., Moss,S.J., and Haydon,P.G. (2009). Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* 106, 15037-15042.
- Ferini-Strambi,L., Di Gioia,M.R., Castronovo,V., Oldani,A., Zucconi,M., and Cappa,S.F. (2004). Neuropsychological assessment in idiopathic REM sleep behavior disorder (RBD): does the idiopathic form of RBD really exist? *Neurology* 62, 41-45.
- Ferini-Strambi,L., Oldani,A., Zucconi,M., and Smirne,S. (1996). Cardiac autonomic activity during wakefulness and sleep in REM sleep behavior disorder. *Sleep* 19, 367-369.
- Ferini-Strambi,L., and Zucconi,M. (2000). REM sleep behavior disorder. *Clin. Neurophysiol.* 111 *Suppl* 2, S136-S140.
- Fink,A.L. (2006). The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc. Chem. Res.* 39, 628-634.
- Finkenstaedt,M., Szudra,A., Zerr,I., Poser,S., Hise,J.H., Stoebner,J.M., and Weber,T. (1996). MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology* 199, 793-798.
- Fitzsimons,J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 78, 583-686.
- Fodero-Tavoletti,M.T., Villemagne,V.L., Rowe,C.C., Masters,C.L., Barnham,K.J., and Cappai,R. (2011). Amyloid-beta: the seeds of darkness. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 43, 1247-1251.
- Fornal,C., Auerbach,S., and Jacobs,B.L. (1985). Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. *Exp. Neurol.* 88, 590-608.
- Foroud,T., Gray,J., Ivashina,J., and Conneally,P.M. (1999). Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 52-56.
- Fortin,D.L., Nemani,V.M., Voglmaier,S.M., Anthony,M.D., Ryan,T.A., and Edwards,R.H. (2005). Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 25, 10913-10921.
- Foutz,A.S., Netick,A., and Dement,W.C. (1979). Sleep state effects on breathing after spinal cord transection and vagotomy in the cat. *Respir. Physiol* 37, 89-100.
- Franken,P., Dijk,D.J., Tobler,I., and Borbely,A.A. (1991). Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am. J. Physiol* 261, R198-R208.
- Fredholm,B.B., Battig,K., Holmen,J., Nehlig,A., and Zvartau,E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133.
- French,J.D., and Magoun,H.W. (1952). Effects of chronic lesions in central cephalic brain stem of monkeys. *AMA. Arch. Neurol. Psychiatry* 68, 591-604.
- Freund,T.F., and Buzsaki,G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.
- Fuhrmann,M., Bittner,T., Mitteregger,G., Haider,N., Moosmang,S., Kretschmar,H., and Herms,J. (2006). Loss of the cellular prion protein affects the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurochem.* 98, 1876-1885.

- Fuller,P.M., Saper,C.B., and Lu,J. (2007). The pontine REM switch: past and present. *J. Physiol* 584, 735-741.
- Gabizon,R., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1987). Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 4017-4021.
- Gagnon,J.F., Fantini,M.L., Bedard,M.A., Petit,D., Carrier,J., Rompre,S., Decary,A., Panisset,M., and Montplaisir,J. (2004). Association between waking EEG slowing and REM sleep behavior disorder in PD without dementia. *Neurology* 62, 401-406.
- Gagnon,J.F., Petit,D., Fantini,M.L., Rompre,S., Gauthier,S., Panisset,M., Robillard,A., and Montplaisir,J. (2006a). REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in probable Alzheimer disease. *Sleep* 29, 1321-1325.
- Gagnon,J.F., Postuma,R.B., Mazza,S., Doyon,J., and Montplaisir,J. (2006b). Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 5, 424-432.
- Gagnon,J.F., Postuma,R.B., and Montplaisir,J. (2006c). Update on the pharmacology of REM sleep behavior disorder. *Neurology* 67, 742-747.
- Gambetti,P., Kong,Q., Zou,W., Parchi,P., and Chen,S.G. (2003a). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br. Med. Bull.* 66, 213-239.
- Gambetti,P., Parchi,P., and Chen,S.G. (2003b). Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin. Lab Med.* 23, 43-64.
- Garcia-Alloza,M., Robbins,E.M., Zhang-Nunes,S.X., Purcell,S.M., Betensky,R.A., Raju,S., Prada,C., Greenberg,S.M., Bacskai,B.J., and Frosch,M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516-524.
- George,J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3002.
- George,S., Rey,N.L., Reichenbach,N., Steiner,J.A., and Brundin,P. (2013). alpha-Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol.* 23, 350-357.
- Gillberg,M., and Akerstedt,T. (1991). The dynamics of the first sleep cycle. *Sleep* 14, 147-154.
- Gillessen,T., Budd,S.L., and Lipton,S.A. (2002). Excitatory amino acid neurotoxicity. *Adv. Exp. Med Biol* 513, 3-40.
- Gillin,J.C., and Sitaram,N. (1984). Rapid eye movement (REM) sleep: cholinergic mechanisms. *Psychol. Med* 14, 501-506.
- Gloor,P. (1980). EEG characteristics in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 8, 341.
- Glotzbach,S.F., and Heller,H.C. (1994). Temperature regulation. In *Principles and Practice of Sleep Medicine*, W.B. Saunders, ed. (Philadelphia): pp. 260-275.
- Gonchar,Y., and Burkhalter,A. (1999). Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. *Cereb. Cortex* 9, 683-696.

- Goodman,A.O., Rogers,L., Pilsworth,S., McAllister,C.J., Shneerson,J.M., Morton,A.J., and Barker,R.A. (2011). Asymptomatic sleep abnormalities are a common early feature in patients with Huntington's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11, 211-217.
- Gooley,J.J., and Saper,C.B. (2011). Anatomy of the Mammalian Circadian System. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, T. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Saunders), pp. 376-389.
- Gourmelon,P., Amyx,H.L., Baron,H., Lemerrier,G., Court,L., and Gibbs,C.J., Jr. (1987). Sleep abnormalities with REM disorder in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in cats: a new pathological feature. *Brain Res.* 411, 391-396.
- Govaerts,C., Wille,H., Prusiner,S.B., and Cohen,F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 8342-8347.
- Grasso,A., Pepino,A., Aceto,G., and Bracale,M. (1991). An adjustment method for spinal cord stimulators based on simplified gait analysis (1). *Acta Neurol. (Napoli)* 13, 261-274.
- Gritti,I., Mainville,L., and Jones,B.E. (1994). Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *J. Comp Neurol.* 339, 251-268.
- Gritti,I., Mainville,L., Mancina,M., and Jones,B.E. (1997). GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J. Comp Neurol.* 383, 163-177.
- Guazzi,M., and Freis,E.D. (1969). Sino-aortic reflexes and arterial pH, PO<sub>2</sub>, and PCO<sub>2</sub> in wakefulness and sleep. *Am. J. Physiol* 217, 1623-1627.
- Guentchev,M., Hainfellner,J.A., Trabattoni,G.R., and Budka,H. (1997). Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1119-1124.
- Guilleminault,C., Powell,N.B., Martinez,S., Kushida,C., Raffray,T., Palombini,L., and Philip,P. (2003). Preliminary observations on the effects of sleep time in a sleep restriction paradigm. *Sleep Med.* 4, 177-184.
- Gurevicius,K., Lipponen,A., and Tanila,H. (2013). Increased cortical and thalamic excitability in freely moving APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice modeling epileptic activity associated with Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 23, 1148-1158.
- Haass,C., and Selkoe,D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101-112.
- Hagan,J.J., Leslie,R.A., Patel,S., Evans,M.L., Wattam,T.A., Holmes,S., Benham,C.D., Taylor,S.G., Routledge,C., Hemmati,P., Munton,R.P., Ashmeade,T.E., Shah,A.S., Hatcher,J.P., Hatcher,P.D., Jones,D.N., Smith,M.I., Piper,D.C., Hunter,A.J., Porter,R.A., and Upton,N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10911-10916.
- Haigh,C.L., Drew,S.C., Boland,M.P., Masters,C.L., Barnham,K.J., Lawson,V.A., and Collins,S.J. (2009). Dominant roles of the polybasic proline motif and copper in the PrP<sup>23-89</sup>-mediated stress protection response. *J. Cell Sci.* 122, 1518-1528.

- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213-219.
- Hansotia, P., Wall, R., and Berendes, J. (1985). Sleep disturbances and severity of Huntington's disease. *Neurology* 35, 1672-1674.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20, 154-159.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harkany, T., Lengyel, Z., Soos, K., Penke, B., Luiten, P.G., and Gulya, K. (1995). Cholinotoxic effects of beta-amyloid (1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res.* 695, 71-75.
- Hasan, S., Dauvilliers, Y., Mongrain, V., Franken, P., and Tafti, M. (2012). Age-related changes in sleep in inbred mice are genotype dependent. *Neurobiol. Aging* 33, 195-26.
- Hassainia, F., Petit, D., Nielsen, T., Gauthier, S., and Montplaisir, J. (1997). Quantitative EEG and statistical mapping of wakefulness and REM sleep in the evaluation of mild to moderate Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 37, 219-224.
- Hayaishi, O., Urade, Y., Eguchi, N., and Huang, Z.L. (2004). Genes for prostaglandin d synthase and receptor as well as adenosine A2A receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep. *Arch. Ital. Biol* 142, 533-539.
- Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A., and Pack, A.I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 25, 129-138.
- Henny, P., and Jones, B.E. (2006). Vesicular glutamate (VGlut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus. *J. Comp Neurol.* 496, 453-467.
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A., and Butterfield, D.A. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* 91, 3270-3274.
- Herms, J.W., Korte, S., Gall, S., Schneider, I., Dunker, S., and Kretzschmar, H.A. (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J. Neurochem.* 75, 1487-1492.
- Hess, W.R. (1927). Stammganglien Reizversuche. *Ber. ges. Physiol.* 42, 554-555.
- Hobson, J.A. (2005). Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. *Nature* 437, 1254-1256.
- Hobson, J.A. (2009). REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 803-813.
- Hobson, J.A., McCarley, R.W., and Nelson, J.P. (1983). Location and spike-train characteristics of cells in anterodorsal pons having selective decreases in firing rate during desynchronized sleep. *J. Neurophysiol.* 50, 770-783.



Hobson, J.A., McCarley, R.W., and Wyzinski, P.W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55-58.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., and Duff, K. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97-100.

Holstege, J.C., and Bongers, C.M. (1991). A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res.* 566, 308-315.

Hoshi, M., Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1997). Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol Chem.* 272, 2038-2041.

Hou, L., Liu, Y., Wang, X., Ma, H., He, J., Zhang, Y., Yu, C., Guan, W., and Ma, Y. (2011). The effects of amyloid-beta42 oligomer on the proliferation and activation of astrocytes in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol Anim* 47, 573-580.

Huang, Z.L., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2007). Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 33-38.

Huber, R., Deboer, T., and Tobler, I. (1999). Prion protein: a role in sleep regulation? *J Sleep Res.* 8 *Suppl* 1, 30-36.

Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.

Iakhno, N.N. (1985). [Disorders of nocturnal sleep in Huntington chorea]. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im S. S. Korsakova* 85, 340-346.

Iber, C., Ancoli-Israel, S., and Quan, S.F. (2007). The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications. (Westchester: American Academy of Sleep Medicine).

Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., Nagelhus, E.A., and Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci. Transl. Med* 4, 147ra111.

Iranzo, A. (2011). Sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease. *J. Neurol. Sci.* 310, 283-285.

Iranzo, A., Santamaria, J., Rye, D.B., Valldeoriola, F., Marti, M.J., Munoz, E., Vilaseca, I., and Tolosa, E. (2005). Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology* 65, 247-252.

Irizarry, M.C., Growdon, W., Gomez-Isla, T., Newell, K., George, J.M., Clayton, D.F., and Hyman, B.T. (1998). Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 334-337.

- Ito,K., Yanagihara,M., Imon,H., Dauphin,L., and McCarley,R.W. (2002). Intracellular recordings of pontine medial gigantocellular tegmental field neurons in the naturally sleeping cat: behavioral state-related activity and soma size difference in order of recruitment. *Neuroscience* 114, 23-37.
- Itoh,A., Nitta,A., Nadai,M., Nishimura,K., Hirose,M., Hasegawa,T., and Nabeshima,T. (1996). Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein--infused rats. *J. Neurochem.* 66, 1113-1117.
- Iwai,A., Masliah,E., Yoshimoto,M., Ge,N., Flanagan,L., de Silva,H.A., Kittel,A., and Saitoh,T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467-475.
- Jackson,W.S., Borkowski,A.W., Faas,H., Steele,A.D., King,O.D., Watson,N., Jasanoff,A., and Lindquist,S. (2009). Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron* 63, 438-450.
- Jellinger,K.A. (2003). Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord.* 18 *Suppl* 6, S2-12.
- Jones,B.E. (1991). Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40, 637-656.
- Jones,B.E. (1995). Reticular Formation. Cytoarchitecture, transmitters and projections. In *The Rat Nervous System*, G. Paxinos, ed. Accademic Press Australia), pp. 155-171.
- Jones,B.E. (2004a). Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 145, 157-169.
- Jones,B.E. (2004b). Paradoxical REM sleep promoting and permitting neuronal networks. *Arch. Ital. Biol.* 142, 379-396.
- Jones,B.E. (2005). From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 578-586.
- Jouvet,M. (1962). [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep.]. *Arch. Ital. Biol.* 100, 125-206.
- Jouvet,M., and Delorme,F. (1965). Locus coeruleus et sommeil paradoxical. *C R Soc Biol* 159, 895-899.
- Jouvet,M., MICHEL,F., and Courjon,J. (1959). [Electric activity of the rhinencephalon during sleep in cats.]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 153, 101-105.
- Kales,A., Ansel,R.D., Markham,C.H., Scharf,M.B., and Tan,T.L. (1971). Sleep in patients with Parkinson's disease and normal subjects prior to and following levodopa administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 12, 397-406.
- Kalinchuk,A.V., McCarley,R.W., Porkka-Heiskanen,T., and Basheer,R. (2011). The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade. *J. Neurochem.* 116, 260-272.

- Kamenetz,F., Tomita,T., Hsieh,H., Seabrook,G., Borchelt,D., Iwatsubo,T., Sisodia,S., and Malinow,R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kanaani,J., Prusiner,S.B., Diacovo,J., Baekkeskov,S., and Legname,G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J. Neurochem.* 95, 1373-1386.
- Kang,J.E., Lim,M.M., Bateman,R.J., Lee,J.J., Smyth,L.P., Cirrito,J.R., Fujiki,N., Nishino,S., and Holtzman,D.M. (2009). Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* 326, 1005-1007.
- Kerkhofs,M., and Lavie,P. (2000). Frederic Bremer 1892-1982: a pioneer in sleep research. *Sleep Med. Rev.* 4, 505-514.
- Kessels,H.W., Nguyen,L.N., Nabavi,S., and Malinow,R. (2010). The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466, E3-E4.
- Khatri,I.M., and Freis,E.D. (1967). Hemodynamic changes during sleep. *J Appl. Physiol* 22, 867-873.
- Khosravani,H., Zhang,Y., Tsutsui,S., Hameed,S., Altier,C., Hamid,J., Chen,L., Villemaire,M., Ali,Z., Jirik,F.R., and Zamponi,G.W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J. Gen. Physiol* 131, i5.
- Kim,B.H., Lee,H.G., Choi,J.K., Kim,J.I., Choi,E.K., Carp,R.I., and Kim,Y.S. (2004). The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 124, 40-50.
- Kimura,K., Tachibana,N., Kohyama,J., Otsuka,Y., Fukazawa,S., and Waki,R. (2000). A discrete pontine ischemic lesion could cause REM sleep behavior disorder. *Neurology* 55, 894-895.
- Kleitman,N. (1929). Sleep. *Physiol Rev.* 9, 624-655.
- Knight,R.S., and Will,R.G. (2004). Prion diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75 *Suppl* 1, i36-i42.
- Kodama,T., Lai,Y.Y., and Siegel,J.M. (2003). Changes in inhibitory amino acid release linked to pontine-induced atonia: an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci.* 23, 1548-1554.
- Kodama,T., Takahashi,Y., and Honda,Y. (1990). Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brain stem. *Neurosci. Lett.* 114, 277-282.
- Koester,J., and Siegelbaum,S.A. (2013). Propagated signaling: the action potential. In *Principles of Neural Science*, E.R. Kandel, J.H. Schwartz, and T.M. Jessel, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 148-174.
- Kordek,R., Nerurkar,V.R., Liberski,P.P., Isaacson,S., Yanagihara,R., and Gajdusek,D.C. (1996). Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9754-9758.
- Kraft,M., and Martin,R.J. (1995). Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis. Mon.* 41, 506-575.

- Kraskauer,D.C., Pagel,M., Southwood,T.R., and Zanotto,P.M. (1996). Phylogenesis of prion protein. *Nature* 380, 675.
- Kudo,T., Schroeder,A., Loh,D.H., Kuljis,D., Jordan,M.C., Roos,K.P., and Colwell,C.S. (2011). Dysfunctions in circadian behavior and physiology in mouse models of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 228, 80-90.
- Kumar,S., Bhatia,M., and Behari,M. (2002). Sleep disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 17, 775-781.
- Lacombe,J., Nosjean,A., Meunier,J.M., and Laguzzi,R. (1988). Computer analysis of cardiovascular changes during sleep-wake cycle in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 254, H217-H222.
- Lacor,P.N., Buniel,M.C., Furlow,P.W., Clemente,A.S., Velasco,P.T., Wood,M., Viola,K.L., and Klein,W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27, 796-807.
- Lai,Y.Y., Clements,J.R., Wu,X.Y., Shalita,T., Wu,J.P., Kuo,J.S., and Siegel,J.M. (1999). Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J. Comp Neurol.* 408, 419-436.
- Lai,Y.Y., Kodama,T., and Siegel,J.M. (2001). Changes in monoamine release in the ventral horn and hypoglossal nucleus linked to pontine inhibition of muscle tone: an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci.* 21, 7384-7391.
- Lai,Y.Y., and Siegel,J.M. (1988). Medullary regions mediating atonia. *J. Neurosci.* 8, 4790-4796.
- Landolt,H.P., Glatzel,M., Blattler,T., Achermann,P., Roth,C., Mathis,J., Weis,J., Tobler,I., Aguzzi,A., and Bassetti,C.L. (2006). Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 66, 1418-1424.
- Lapierre,O., and Montplaisir,J. (1992). Polysomnographic features of REM sleep behavior disorder: development of a scoring method. *Neurology* 42, 1371-1374.
- Larson,M.E., Sherman,M.A., Greimel,S., Kuskowski,M., Schneider,J.A., Bennett,D.A., and Lesne,S.E. (2012). Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. *J. Neurosci.* 32, 10253-10266.
- Lauren,J., Gimbel,D.A., Nygaard,H.B., Gilbert,J.W., and Strittmatter,S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128-1132.
- Le Pichon,C.E., Valley,M.T., Polymenidou,M., Chesler,A.T., Sagdullaev,B.T., Aguzzi,A., and Firestein,S. (2009). Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat. Neurosci.* 12, 60-69.
- Ledoux,J.M. (2005). Effects on the serotonergic system in sub-acute transmissible spongiform encephalopathies: current data, hypotheses, suggestions for experimentation. *Med Hypotheses* 64, 910-918.
- Lee,M.G., Hassani,O.K., Alonso,A., and Jones,B.E. (2005). Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J. Neurosci.* 25, 4365-4369.

- Lees,A.J., Blackburn,N.A., and Campbell,V.L. (1988). The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* *11*, 512-519.
- Lena,I., Parrot,S., Deschaux,O., Muffat-Joly,S., Sauvinet,V., Renaud,B., Suaud-Chagny,M.F., and Gottesmann,C. (2005). Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci. Res.* *81*, 891-899.
- Lesne,S., Koh,M.T., Kotilinek,L., Kaye,R., Glabe,C.G., Yang,A., Gallagher,M., and Ashe,K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* *440*, 352-357.
- Li,A., Christensen,H.M., Stewart,L.R., Roth,K.A., Chiesa,R., and Harris,D.A. (2007). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO J.* *26*, 548-558.
- Lin,L., Faraco,J., Li,R., Kadotani,H., Rogers,W., Lin,X., Qiu,X., de Jong,P.J., Nishino,S., and Mignot,E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* *98*, 365-376.
- Linden,R., Martins,V.R., Prado,M.A., Cammarota,M., Izquierdo,I., and Brentani,R.R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* *88*, 673-728.
- Lindsley,D.B., Schreiner,L.H., Knowles,W.B., and Magoun,H.W. (1950). Behavioral and EEG changes following chronic brain stem lesions in the cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *2*, 483-498.
- Liu,S., Ninan,I., Antonova,I., Battaglia,F., Trinchese,F., Narasanna,A., Kolodilov,N., Dauer,W., Hawkins,R.D., and Arancio,O. (2004). alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J.* *23*, 4506-4516.
- Liu,Y.W., Li,J., and Ye,J.H. (2010). Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *J. Physiol* *588*, 4103-4116.
- Loewenstein,R.J., Weingartner,H., Gillin,J.C., Kaye,W., Ebert,M., and Mendelson,W.B. (1982). Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol. Aging* *3*, 371-377.
- Lopes da Silva,F. (2010). EEG: origin and measurement. In *EEG - fMRI: Physiological Basis, Technique, and Applications*, C. Mulert, and L. Lemieux, eds. Springer), pp. 19-38.
- Lopes da Silva,F., and van Rotterdam,A. (1999). Biophysical Aspects of EEG and Magnetoencephalogram Generation. In *Elettroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, E. Niedermeyer, and F. Lopes da Silva, eds. (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 109-27.
- Lu,J., Bjorkum,A.A., Xu,M., Gaus,S.E., Shiromani,P.J., and Saper,C.B. (2002). Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J. Neurosci.* *22*, 4568-4576.
- Lu,J., Sherman,D., Devor,M., and Saper,C.B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* *441*, 589-594.

- Lugaresi,E., Medori,R., Montagna,P., Baruzzi,A., Cortelli,P., Lugaresi,A., Tinuper,P., Zucconi,M., and Gambetti,P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J Med.* *315*, 997-1003.
- Luppi,P.H., Gervasoni,D., Boissard,R., Verret,L., Goutagny,R., Peyron,C., Salvert,D., Leger,L., Barbagli,B., and Fort,P. (2004). Brainstem structures responsible for paradoxical sleep onset and maintenance. *Arch. Ital. Biol* *142*, 397-411.
- Luppi,P.H., Gervasoni,D., Verret,L., Goutagny,R., Peyron,C., Salvert,D., Leger,L., and Fort,P. (2006). Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J. Physiol Paris* *100*, 271-283.
- Luthi,A. (2013). Sleep Spindles: Where They Come From, What They Do. *Neuroscientist*.
- Lydic,R., McCarley,R.W., and Hobson,J.A. (1987a). Serotonin neurons and sleep. I. Long term recordings of dorsal raphe discharge frequency and PGO waves. *Arch. Ital. Biol.* *125*, 317-343.
- Lydic,R., McCarley,R.W., and Hobson,J.A. (1987b). Serotonin neurons and sleep. II. Time course of dorsal raphe discharge, PGO waves, and behavioral states. *Arch. Ital. Biol.* *126*, 1-28.
- Macchi,G., Rossi,G., Abbamondi,A.L., Giaccone,G., Mancina,D., Tagliavini,F., and Bugiani,O. (1997). Diffuse thalamic degeneration in fatal familial insomnia. A morphometric study. *Brain Res.* *771*, 154-158.
- Mackiewicz,M., Nikonova,E.V., Zimmermann,J.E., Romer,M.A., Cater,J., Galante,R.J., and Pack,A.I. (2006). Age-related changes in adenosine metabolic enzymes in sleep/wake regulatory areas of the brain. *Neurobiol. Aging* *27*, 351-360.
- MacNish,R. (1834). Introduction. In *The Philosophy of Sleep*, D Appleton, ed. (New York: pp. 9-14.
- Magoun,H.W., and Rhines,R. (1946). An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *J. Neurophysiol.* *9*, 165-171.
- Mahowald,M.W., Bornemann,M.A., and Schenck,C.H. (2010). When and where do synucleinopathies begin? *Neurology* *75*, 488-489.
- Mahowald,M.W., and Schenck,C.H. (2011). REM Sleep Parasomnias. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, C. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Elsevier - Saunders), pp. 1083-1097.
- Malaga-Trillo,E., Solis,G.P., Schrock,Y., Geiss,C., Luncz,L., Thomanetz,V., and Stuermer,C.A. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS. Biol* *7*, e55.
- Maloney,K.J., Mainville,L., and Jones,B.E. (2002). c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur. J Neurosci.* *15*, 774-778.
- Mancina,G. (1993). Autonomic modulation of the cardiovascular system during sleep. *N. Engl. J Med.* *328*, 347-349.
- Mancina,M. (1980). Fisiologia del sonno e della veglia. In *Neurofisiologia e vita mentale*, Zanichelli, ed. (Bologna: pp. 186-205.

- Mancia,M., Margnelli,M., Mariotti,M., Spreafico,R., and Broggi,G. (1974a). Brain stem-thalamus reciprocal influences in the cat. *Brain Res.* 69, 297-314.
- Mancia,M., Mariotti,M., and Spreafico,R. (1974b). Caudo-rostral brain stem reciprocal influences in the cat. *Brain Res.* 80, 41-51.
- Manns,I.D., Alonso,A., and Jones,B.E. (2003). Rhythmically discharging basal forebrain units comprise cholinergic, GABAergic, and putative glutamatergic cells. *J. Neurophysiol.* 89, 1057-1066.
- Manson,J.C., Clarke,A.R., Hooper,M.L., Aitchison,L., McConnell,I., and Hope,J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8, 121-127.
- Manzoni,O.J., Manabe,T., and Nicoll,R.A. (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265, 2098-2101.
- Marti,M.J., Tolosa,E., and Campdelacreu,J. (2003). Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord.* 18 Suppl 6, S21-S27.
- Martinez-Rodriguez,J.E., Sanchez-Valle,R., Saiz,A., Lin,L., Iranzo,A., Mignot,E., and Santamaria,J. (2003). Normal hypocretin-1 levels in the cerebrospinal fluid of patients with fatal familial insomnia. *Sleep* 26, 1068.
- Massicotte-Marquez,J., Carrier,J., Decary,A., Mathieu,A., Vendette,M., Petit,D., and Montplaisir,J. (2005). Slow-wave sleep and delta power in rapid eye movement sleep behavior disorder. *Ann. Neurol.* 57, 277-282.
- Massicotte-Marquez,J., Decary,A., Gagnon,J.F., Vendette,M., Mathieu,A., Postuma,R.B., Carrier,J., and Montplaisir,J. (2008). Executive dysfunction and memory impairment in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 70, 1250-1257.
- Masters,C.L., Cappai,R., Barnham,K.J., and Villemagne,V.L. (2006). Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J. Neurochem.* 97, 1700-1725.
- Mattson,M.P., Cheng,B., Davis,D., Bryant,K., Lieberburg,I., and Rydel,R.E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389.
- Mazza,S., Soucy,J.P., Gravel,P., Michaud,M., Postuma,R., Massicotte-Marquez,J., Decary,A., and Montplaisir,J. (2006). Assessing whole brain perfusion changes in patients with REM sleep behavior disorder. *Neurology* 67, 1618-1622.
- McCarley,R.W. (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med.* 8, 302-330.
- McCarley,R.W., and Hobson,J.A. (1975). Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 189, 58-60.
- McCarley,R.W., Winkelman,J.W., and Duffy,F.H. (1983). Human cerebral potentials associated with REM sleep rapid eye movements: links to PGO waves and waking potentials. *Brain Res.* 274, 359-364.

McCarter,S.J., St Louis,E.K., and Boeve,B.F. (2012). REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia as an early manifestation of degenerative neurological disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *12*, 182-192.

McCormick,D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol.* *39*, 337-388.

McCormick,D.A., and Bal,T. (1997). Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* *20*, 185-215.

McCormick,D.A., and Westbrook,G.L. (2011). Sleep and Dreaming. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, C. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Elsevier - Saunders), pp. 1140-1158.

McGinty,D., and Szymusiak,R. (2001). Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus. *Sleep Med. Rev.* *5*, 323-342.

McGinty,D.J. (1969). Effects of prolonged isolation and subsequent enrichment on sleep patterns in kittens. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *26*, 335.

McGinty,D.J., and Serman,M.B. (1968). Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science* *160*, 1253-1255.

McKeith,I.G., Dickson,D.W., Lowe,J., Emre,M., O'Brien,J.T., Feldman,H., Cummings,J., Duda,J.E., Lippa,C., Perry,E.K., Aarsland,D., Arai,H., Ballard,C.G., Boeve,B., Burn,D.J., Costa,D., Del,S.T., Dubois,B., Galasko,D., Gauthier,S., Goetz,C.G., Gomez-Tortosa,E., Halliday,G., Hansen,L.A., Hardy,J., Iwatsubo,T., Kalaria,R.N., Kaufer,D., Kenny,R.A., Korczyn,A., Kosaka,K., Lee,V.M., Lees,A., Litvan,I., Londos,E., Lopez,O.L., Minoshima,S., Mizuno,Y., Molina,J.A., Mukaetova-Ladinska,E.B., Pasquier,F., Perry,R.H., Schulz,J.B., Trojanowski,J.Q., and Yamada,M. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* *65*, 1863-1872.

McKenna,J.T., Tartar,J.L., Ward,C.P., Thakkar,M.M., Cordeira,J.W., McCarley,R.W., and Strecker,R.E. (2007). Sleep fragmentation elevates behavioral, electrographic and neurochemical measures of sleepiness. *Neuroscience* *146*, 1462-1473.

McNaughton,N., Ruan,M., and Woodnorth,M.A. (2006). Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus* *16*, 1102-1110.

Mead,S. (2006). Prion disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet.* *14*, 273-281.

Meerlo,P., Roman,V., Farkas,E., Keijsers,J.N., Nyakas,C., and Luiten,P.G. (2004). Ageing-related decline in adenosine A1 receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study. *J. Neurosci. Res.* *78*, 742-748.

Mendelson,W.B., and Bergmann,B.M. (1999). Age-related changes in sleep in the rat. *Sleep* *22*, 145-150.

Methippara,M.M., Alam,M.N., Szymusiak,R., and McGinty,D. (2000). Effects of lateral preoptic area application of orexin-A on sleep-wakefulness. *Neuroreport* *11*, 3423-3426.

Meunier,J.M., Nosjean,A., Lacombe,J., and Laguzzi,R. (1988). Cardiovascular changes during the sleep-wake cycle in spontaneous hypertensive rats and their genetically normotensive precursors. *Pflugers Arch.* *411*, 195-199.



- Meyer,P.T., Elmenhorst,D., Boy,C., Winz,O., Matusch,A., Zilles,K., and Bauer,A. (2007). Effect of aging on cerebral A1 adenosine receptors: A [18F]CPFPX PET study in humans. *Neurobiol. Aging* 28, 1914-1924.
- Mignot,E., Taheri,S., and Nishino,S. (2002). Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat. Neurosci.* 5 *Suppl*, 1071-1075.
- Mileykovskiy,B.Y., Kiyashchenko,L.I., and Siegel,J.M. (2002). Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J. Neurophysiol.* 87, 2480-2489.
- Milhavet,O., and Lehmann,S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 328-339.
- Miller,L.G., and Fahey,J.M. (1994). Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 739, 292-298.
- Miller,L.G., Galpern,W.R., Dunlap,K., Dinarello,C.A., and Turner,T.J. (1991). Interleukin-1 augments gamma-aminobutyric acidA receptor function in brain. *Mol. Pharmacol.* 39, 105-108.
- Mistlberger,R.E., and Rusak,B. (2011). Circadian Rhythms in Mammals: Formal Properties and Environmental Influences . In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, T. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Saunders), pp. 363-375.
- Mitani,A., Ito,K., Hallanger,A.E., Wainer,B.H., Kataoka,K., and McCarley,R.W. (1988). Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res.* 451, 397-402.
- Montagna,P. (2005). Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology. *Sleep Med. Rev.* 9, 339-353.
- Montagna,P., Cortelli,P., Avoni,P., Tinuper,P., Plazzi,G., Gallassi,R., Portaluppi,F., Julien,J., Vital,C., Delisle,M.B., Gambetti,P., and Lugaresi,E. (1998). Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol.* 8, 515-520.
- Montagna,P., Gambetti,P., Cortelli,P., and Lugaresi,E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol.* 2, 167-176.
- Monti,J.M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev.* 15, 269-281.
- Montplaisir,J., Petit,D., Lorrain,D., Gauthier,S., and Nielsen,T. (1995). Sleep in Alzheimer's disease: further considerations on the role of brainstem and forebrain cholinergic populations in sleep-wake mechanisms. *Sleep* 18, 145-148.
- Moore,R.C., Lee,I.Y., Silverman,G.L., Harrison,P.M., Strome,R., Heinrich,C., Karunaratne,A., Pasternak,S.H., Chishti,M.A., Liang,Y., Mastrangelo,P., Wang,K., Smit,A.F., Katamine,S., Carlson,G.A., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., Melton,D.W., Tremblay,P., Hood,L.E., and Westaway,D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* 292, 797-817.
- Morrison,A.R. (1988). Paradoxical sleep without atonia. *Arch. Ital. Biol.* 126, 275-289.

- Morton,A.J. (2013). Circadian and sleep disorder in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 243, 34-44.
- Morton,A.J., Wood,N.I., Hastings,M.H., Hurelbrink,C., Barker,R.A., and Maywood,E.S. (2005). Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 25, 157-163.
- Moruzzi,G. (1972). The sleep-waking cycle. *Ergeb. Physiol* 64, 1-165.
- Moruzzi,G., and Magoun,H.W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1, 455-473.
- Mouret,P., and Guilleminet,M. (1963). Value and indications for the milch operation. *Rhumatologie.* 15, 55-64.
- Moya,K.L., Sales,N., Hassig,R., Creminon,C., Grassi,J., and Di,G.L. (2000). Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc. Res. Tech.* 50, 58-65.
- Murphy,D.D., Rueter,S.M., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20, 3214-3220.
- Naidoo,N., Ferber,M., Master,M., Zhu,Y., and Pack,A.I. (2008). Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J. Neurosci.* 28, 6539-6548.
- Naidoo,N., Giang,W., Galante,R.J., and Pack,A.I. (2005). Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex. *J. Neurochem.* 92, 1150-1157.
- Naquet,R., Denevit,M., Lanoir,J., and Albe-Fessard,D. (1965). Altérations transitoires ou définitives des zones diencephaliques chez le chat: leurs effets sur l'activité électrique corticale et le sommeil. In *Neurophysiologie des États de Sommeil*, M. Jouvet, ed. (Paris: Centre National de la Recherche Scientifique;), p. 107.
- Narhi,L., Wood,S.J., Steavenson,S., Jiang,Y., Wu,G.M., Anafi,D., Kaufman,S.A., Martin,F., Sitney,K., Denis,P., Louis,J.C., Wypych,J., Biere,A.L., and Citron,M. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* 274, 9843-9846.
- Neckelmann,D., and Ursin,R. (1993). Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep* 16, 467-477.
- Netick,A., and Foutz,A.S. (1980). Respiratory activity and sleep-wakefulness in the deafferented, paralyzed cat. *Sleep* 3, 1-12.
- Netick,A., Orem,J., and Dement,W.C. (1977). Neuronal activity specific to REM sleep and its relationship to breathing. *Brain Res.* 120, 197-207.
- Nunes-Tavares,N., Santos,L.E., Stutz,B., Brito-Moreira,J., Klein,W.L., Ferreira,S.T., and de Mello,F.G. (2012). Inhibition of choline acetyltransferase as a mechanism for cholinergic dysfunction induced by amyloid-beta peptide oligomers. *J. Biol Chem.* 287, 19377-19385.

- Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- Ohayon,M.M. (2004). Sleep and the elderly. *J. Psychosom. Res.* 56, 463-464.
- Olejniczak,P. (2006). Neurophysiologic basis of EEG. *J. Clin. Neurophysiol.* 23, 186-189.
- Opp,M.R. (1997). Rat strain differences suggest a role for corticotropin-releasing hormone in modulating sleep. *Physiol Behav.* 63, 67-74.
- Opp,M.R. (2005). Cytokines and sleep. *Sleep Med Rev.* 9, 355-364.
- Ormerod,W. (2006). Richard Caton (1842-1926): pioneer electrophysiologist and cardiologist. *J. Med. Biogr.* 14, 30-35.
- Pace-Schott,E.F., and Hobson,J.A. (2002). The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 591-605.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10962-10966.
- Parkin,E.T., Watt,N.T., Hussain,I., Eckman,E.A., Eckman,C.B., Manson,J.C., Baybutt,H.N., Turner,A.J., and Hooper,N.M. (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 11062-11067.
- Parmeggiani,P.L. (1980). Temperature regulation during sleep: a study in homeostasis. In *Physiology in Sleep*, J. Orem, and C.D. Barnes, eds. (New York: Accademic Press), pp. 98-143.
- Parmeggiani,P.L. (1987). Interaction between sleep and thermoregulation: an aspect of the control of behavioral states. *Sleep* 10, 426-435.
- Parmeggiani,P.L., Franzini,C., Lenzi,P., and Cianci,T. (1971). Inguinal subcutaneous temperature changes in cats sleeping at different environmental temperatures. *Brain Res.* 33, 397-404.
- Parpura,V., Basarsky,T.A., Liu,F., Jeftinija,K., Jeftinija,S., and Haydon,P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744-747.
- Parrino,L., and Terzano,M.G. (1998). Microstruttura del sonno: il Cyclic Alternating Pattern (CAP). In *Psicofisiologia del sonno*, M. Casagrande, and L. De Gennaro, eds. (Milano: Raffaello Cortina), pp. 37-65.
- Pascual,O., Casper,K.B., Kubera,C., Zhang,J., Revilla-Sanchez,R., Sul,J.Y., Takano,H., Moss,S.J., McCarthy,K., and Haydon,P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310, 113-116.
- Pastore,A., and Zagari,A. (2007). A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion.* 1, 185-197.
- Paterson,L.M., Nutt,D.J., and Wilson,S.J. (2011). Sleep and its disorders in translational medicine. *J. Psychopharmacol.* 25, 1226-1234.

- Paulsen, J.S., Ready, R.E., Hamilton, J.M., Mega, M.S., and Cummings, J.L. (2001). Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 71, 310-314.
- Pavlov, I.P. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex* (Oxford: Oxford University Press).
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Orlando, Florida: Elsevier Science- Accademic Press).
- Peever, J. (2011). Control of motoneuron function and muscle tone during REM sleep, REM sleep behavior disorder and cataplexy/narcolepsy. *Arch. Ital. Biol* 149, 454-466.
- Perani, D., Cortelli, P., Lucignani, G., Montagna, P., Tinuper, P., Gallassi, R., Gambetti, P., Lenzi, G.L., Lugaresi, E., and Fazio, F. (1993). [18F]FDG PET in fatal familial insomnia: the functional effects of thalamic lesions. *Neurology* 43, 2565-2569.
- Pergami, P., Jaffe, H., and Safar, J. (1996). Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal. Biochem.* 236, 63-73.
- Perry, E.K., Gibson, P.H., Blessed, G., Perry, R.H., and Tomlinson, B.E. (1977a). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* 34, 247-265.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., and Tomlinson, B.E. (1977b). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1, 189.
- Petchanikow, C., Saborio, G.P., Anderes, L., Frossard, M.J., Olmedo, M.I., and Soto, C. (2001). Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism. *FEBS Lett.* 509, 451-456.
- Petit, D., Gagnon, J.F., Fantini, M.L., Ferini-Strambi, L., and Montplaisir, J. (2004). Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *J. Psychosom. Res.* 56, 487-496.
- Petit, D., Montplaisir, J., and Boeve, B.F. (2011). Alzheimers's disease and other dementias. In *Principles and practices of sleep medicine*, M.H. Kryger, C. Roth, and W.C. Dement, eds. (St.Louise: Elsevier), pp. 1038-1047.
- Petit, D., Montplaisir, J., Lorrain, D., and Gauthier, S. (1992). Spectral analysis of the rapid eye movement sleep electroencephalogram in right and left temporal regions: a biological marker of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 32, 172-176.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G.J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S., and Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.* 6, 991-997.
- Piéron, H. (1913). *The physiological problem of sleep* (in French). Masson et Cie., Paris.
- Pignatelli, M., Beyeler, A., and Leinekugel, X. (2012). Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J. Physiol Paris* 106, 81-92.

- Pizzolato,G., and Cagnin,A. (2010). Le Demenze. In *Neurologia Clinica*, C. Angelini, and L. Battistin, eds. (Bologna: Esculapio), pp. 453-474.
- Plazzi,G., and Montagna,P. (2002). Remitting REM sleep behavior disorder as the initial sign of multiple sclerosis. *Sleep Med.* 3, 437-439.
- Pomfrett,C.J., Glover,D.G., Bollen,B.G., and Pollard,B.J. (2004). Perturbation of heart rate variability in cattle fed BSE-infected material. *Vet. Rec.* 154, 687-691.
- Pomfrett,C.J., Glover,D.G., and Pollard,B.J. (2007). The vagus nerve as a conduit for neuroinvasion, a diagnostic tool, and a therapeutic pathway for transmissible spongiform encephalopathies, including variant Creutzfeldt Jacob disease. *Med. Hypotheses* 68, 1252-1257.
- Porkka-Heiskanen,T., Strecker,R.E., and McCarley,R.W. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 99, 507-517.
- Porkka-Heiskanen,T., Strecker,R.E., Thakkar,M., Bjorkum,A.A., Greene,R.W., and McCarley,R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265-1268.
- Portaluppi,F., Cortelli,P., Avoni,P., Vergnani,L., Maltoni,P., Pavani,A., Sforza,E., Degli Uberti,E.C., Gambetti,P., and Lugaresi,E. (1994). Progressive disruption of the circadian rhythm of melatonin in fatal familial insomnia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 78, 1075-1078.
- Portas,C.M., Thakkar,M., Rainnie,D.G., Greene,R.W., and McCarley,R.W. (1997). Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79, 225-235.
- Postuma,R.B., Gagnon,J.F., and Montplaisir,J.Y. (2012). REM sleep behavior disorder: from dreams to neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 46, 553-558.
- Postuma,R.B., Gagnon,J.F., and Montplaisir,J.Y. (2013). REM Sleep Behavior Disorder and Prodromal Neurodegeneration - Where Are We Headed? *Tremor. Other Hyperkinet. Mov (N. Y.)* 3.
- Postuma,R.B., and Montplaisir,J. (2006). Potential early markers of Parkinson's disease in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder. *Lancet Neurol.* 5, 552-553.
- Prinz,P.N., Larsen,L.H., Moe,K.E., and Vitiello,M.V. (1992). EEG markers of early Alzheimer's disease in computer selected tonic REM sleep. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 83, 36-43.
- Prinz,P.N., Peskind,E.R., Vitaliano,P.P., Raskind,M.A., Eisdorfer,C., Zemcuznikov,N., and Gerber,C.J. (1982a). Changes in the sleep and waking EEGs of nondemented and demented elderly subjects. *J. Am. Geriatr. Soc* 30, 86-93.
- Prinz,P.N., Vitaliano,P.P., Vitiello,M.V., Bokan,J., Raskind,M., Peskind,E., and Gerber,C. (1982b). Sleep, EEG and mental function changes in senile dementia of the Alzheimer's type. *Neurobiol. Aging* 3, 361-370.
- Provini,F., Vetrugno,R., Pastorelli,F., Lombardi,C., Plazzi,G., Marliani,A.F., Lugaresi,E., and Montagna,P. (2004). Status dissociatus after surgery for tegmental ponto-mesencephalic cavernoma: a state-dependent disorder of motor control during sleep. *Mov Disord.* 19, 719-723.

- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13363-13383.
- Radek, R.J., Decker, M.W., and Jarvis, M.F. (2004). The adenosine kinase inhibitor ABT-702 augments EEG slow waves in rats. *Brain Res.* 1026, 74-83.
- Radulovacki, M., Virus, R.M., Djuricic-Nedelson, M., and Green, R.D. (1984). Adenosine analogs and sleep in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 268-274.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975-978.
- Rampon, C., Luppi, P.H., Fort, P., Peyron, C., and Jouvet, M. (1996). Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75, 737-755.
- Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A., and Del Rio, J.A. (2007). Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J. Neurosci. Res.* 85, 2741-2755.
- Rasmussen, K., Heym, J., and Jacobs, B.L. (1984). Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats. *Exp. Neurol.* 83, 302-317.
- Rattenborg, N.C., Amlaner, C.J., and Lima, S.L. (2000). Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 817-842.
- Rechtschaffen, A., and Bergmann, B.M. (1995). Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav. Brain Res.* 69, 55-63.
- Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A., and Gilliland, M.A. (2002). Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. 1989. *Sleep* 25, 68-87.
- Rechtschaffen, A., and Kales, A. (1968). A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages in human subjects, National Institute of Health Publication 204 (Washington, DC: US Government printing office).
- Rensing, L., Brunken, W., and Hardeland, R. (1968). On the genetics of a circadian rhythm in *Drosophila*. *Experientia* 24, 509-510.
- Ricchieri, G.L., and Battistin, L. (2010). Malattia di Parkinson e i disturbi del movimento. In *Neurologia Clinica*, C. Angelini, and L. Battistin, eds. (Bologna: Esculapio), pp. 436-452.
- Roberts, W.W., and Robinson, T.C. (1969). Relaxation and sleep induced by warming of preoptic region and anterior hypothalamus in cats. *Exp. Neurol.* 25, 282-294.
- Robins Wahlin, T.B., Backman, L., Lundin, A., Haegermark, A., Winblad, B., and Anvret, M. (2000). High suicidal ideation in persons testing for Huntington's disease. *Acta Neurol. Scand.* 102, 150-161.
- Roh, J.H., Huang, Y., Bero, A.W., Kasten, T., Stewart, F.R., Bateman, R.J., and Holtzman, D.M. (2012). Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of beta-amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci. Transl. Med* 4, 150ra122.

- Ross, J.J. (1965). Neurological finding after prolonged sleep deprivation. *Arch. Neurol.* *12*, 399-403.
- Rossi, G.F., and Zanchetti, A. (1957). The brain stem reticular formation. *Anatomy and Physiology. Arch. Ital. Biol.* *95*, 199-435.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A.C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J. Biol. Chem.* *278*, 40877-40881.
- Rudolph, U., and Antkowiak, B. (2004). Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 709-720.
- Rutishauser, D., Mertz, K.D., Moos, R., Brunner, E., Rulicke, T., Calella, A.M., and Aguzzi, A. (2009). The comprehensive native interactome of a fully functional tagged prion protein. *PLoS. One.* *4*, e4446.
- Safar, J., Ceroni, M., Piccardo, P., Liberski, P.P., Miyazaki, M., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J., Jr. (1990). Subcellular distribution and physicochemical properties of scrapie-associated precursor protein and relationship with scrapie agent. *Neurology* *40*, 503-508.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., and Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* *380*, 528-531.
- Sakai, K. (1986). Central mechanisms of paradoxical sleep. *Brain Dev.* *8*, 402-407.
- Sakai, K., Sastre, J.P., Salvert, D., Touret, M., Tohyama, M., and Jouvet, M. (1979). Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. *Brain Res.* *176*, 233-254.
- Sakai, K., Vanni-Mercier, G., and Jouvet, M. (1983). Evidence for the presence of PS-OFF neurons in the ventromedial medulla oblongata of freely moving cats. *Exp. Brain Res.* *49*, 311-314.
- Saladini, M., Vidali, A., and Ermani, M. (2010). Elettroencefalogramma: basi teoriche e applicazioni pratiche. In *Neurologia Clinica*, C. Angelini, and L. Battistin, eds. (Bologna: Esculapio), pp. 60-81.
- Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N., and Jouvet, M. (1989). Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience* *32*, 669-683.
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* *169*, 341-354.
- Saper, C.B., Chou, T.C., and Scammell, T.E. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* *24*, 726-731.
- Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clement, O., Hanriot, L., Fort, P., and Luppi, P.H. (2009). Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS. One.* *4*, e4272.

- Satoh,S., Matsumura,H., and Hayaishi,O. (1998). Involvement of adenosine A2A receptor in sleep promotion. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 155-162.
- Satoh,Y., Hirakura,Y., Shibayama,S., Hirashima,N., Suzuki,T., and Kirino,Y. (2001). Beta-amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray. *Neurosci. Lett.* 302, 97-100.
- Scheibel,M.E., and Scheibel,A.B. (1970). Elementary processes in selected thalamic and cortical subsystem - the structural substrates. In *The Neurosciences*, F.O. Schmitt, ed. (New York: Rockefeller Univ. Press).
- Schenck,C.H., Bundlie,S.R., Ettinger,M.G., and Mahowald,M.W. (1986). Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep* 9, 293-308.
- Schenck,C.H., Bundlie,S.R., and Mahowald,M.W. (1996). Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 46, 388-393.
- Schenck,C.H., and Mahowald,M.W. (2002). REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP. *Sleep* 25, 120-138.
- Schenkein,J., and Montagna,P. (2006). Self management of fatal familial insomnia. Part 1: what is FFI? *MedGenMed.* 8, 65.
- Schultz,J., Schwarz,A., Neidhold,S., Burwinkel,M., Riemer,C., Simon,D., Kopf,M., Otto,M., and Baier,M. (2004). Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am. J. Pathol.* 165, 671-678.
- Selkoe,D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766.
- Sforza,E., Montagna,P., Tinuper,P., Cortelli,P., Avoni,P., Ferrillo,F., Petersen,R., Gambetti,P., and Lugaresi,E. (1995). Sleep-wake cycle abnormalities in fatal familial insomnia. Evidence of the role of the thalamus in sleep regulation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 94, 398-405.
- Shamsir,M.S., and Dalby,A.R. (2005). One gene, two diseases and three conformations: molecular dynamics simulations of mutants of human prion protein at room temperature and elevated temperatures. *Proteins* 59, 275-290.
- Shankar,G.M., Bloodgood,B.L., Townsend,M., Walsh,D.M., Selkoe,D.J., and Sabatini,B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866-2875.
- Sharief,M.K., Green,A., Dick,J.P., Gawler,J., and Thompson,E.J. (1999). Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 52, 1289-1291.
- Shaw,P.J., Tononi,G., Greenspan,R.J., and Robinson,D.F. (2002). Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila*. *Nature* 417, 287-291.



- Sherin, J.E., Elmquist, J.K., Torrealba, F., and Saper, C.B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J. Neurosci.* *18*, 4705-4721.
- Shiromani, P.J., Lu, J., Wagner, D., Thakkar, J., Greco, M.A., Basheer, R., and Thakkar, M. (2000). Compensatory sleep response to 12 h wakefulness in young and old rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *278*, R125-R133.
- Shyu, W.C., Chen, C.P., Saeki, K., Kubosaki, A., Matusmoto, Y., Onodera, T., Ding, D.C., Chiang, M.F., Lee, Y.J., Lin, S.Z., and Li, H. (2005). Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J. Neurosci. Res.* *80*, 887-894.
- Siegel, J.M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* *437*, 1264-1271.
- Silvestri, R., Raffaele, M., De, D.P., Tisano, A., Mento, G., Casella, C., Tripoli, M.C., Serra, S., and Di, P.R. (1995). Sleep features in Tourette's syndrome, neuroacanthocytosis and Huntington's chorea. *Neurophysiol. Clin.* *25*, 66-77.
- Sixel-Doring, F., Trautmann, E., Mollenhauer, B., and Trenkwalder, C. (2011). Associated factors for REM sleep behavior disorder in Parkinson disease. *Neurology* *77*, 1048-1054.
- Snyder, S.H., Katims, J.J., Annau, Z., Bruns, R.F., and Daly, J.W. (1981). Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 3260-3264.
- Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T., and Kiso, Y. (2004). Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl isopeptides. *Chem. Commun. (Camb.)* 124-125.
- Soikkeli, R., Partanen, J., Soininen, H., Paakkonen, A., and Riekkinen, P., Sr. (1991). Slowing of EEG in Parkinson's disease. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *79*, 159-165.
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., and . (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 7358-7362.
- Speckmann, E.J., and Caspers, H. (1979). *Origin of Cerebral Field Potentials* (Stuttgart: Thieme).
- Speckmann, E.J., and Elger, C.E. (1999). Introduction to the Neurophysiological Basis of the EEG and DC Potentials. In *Elettroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, E. Niedermeyer, and F. Lopes da Silva, eds. (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 15-27.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* *388*, 839-840.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1990a). Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* *29*, 8879-8884.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* *51*, 229-240.

- Stahl,N., Borchelt,D.R., and Prusiner,S.B. (1990b). Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 29, 5405-5412.
- Starzl,T.E., Taylor,C.W., and Magoun,H.W. (1951). Ascending conduction in reticular activating system, with special reference to the diencephalon. *J Neurophysiol* 14, 461-477.
- Steele,A.D., Lindquist,S., and Aguzzi,A. (2007). The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion*. 1, 83-93.
- Steininger,T.L., Gong,H., McGinty,D., and Szymusiak,R. (2001). Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J. Comp Neurol.* 429, 638-653.
- Stephenson,R., Chu,K.M., and Lee,J. (2007). Prolonged deprivation of sleep-like rest raises metabolic rate in the Pacific beetle cockroach, *Diploptera punctata* (Eschscholtz). *J. Exp. Biol.* 210, 2540-2547.
- Steriade,M. (1999). Coherent oscillations and short-term plasticity in corticothalamic networks. *Trends Neurosci.* 22, 337-345.
- Steriade,M., Datta,S., Pare,D., Oakson,G., and Curro Dossi,R.C. (1990). Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J. Neurosci.* 10, 2541-2559.
- Steriade,M., McCormick,D.A., and Sejnowski,T.J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262, 679-685.
- Sterman,M.B., and Clemente,C.D. (1962a). Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp. Neurol.* 6, 91-102.
- Sterman,M.B., and Clemente,C.D. (1962b). Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp. Neurol.* 6, 103-117.
- Stewart,R.S., and Harris,D.A. (2003). Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *J. Biol Chem.* 278, 45960-45968.
- Stiasny-Kolster,K., Doerr,Y., Moller,J.C., Hoffken,H., Behr,T.M., Oertel,W.H., and Mayer,G. (2005). Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. *Brain* 128, 126-137.
- Strassman,A., Highstein,S.M., and McCrea,R.A. (1986a). Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. I. Excitatory burst neurons. *J. Comp Neurol.* 249, 337-357.
- Strassman,A., Highstein,S.M., and McCrea,R.A. (1986b). Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. II. Inhibitory burst neurons. *J. Comp Neurol.* 249, 358-380.
- Strecker,R.E., Morairty,S., Thakkar,M.M., Porkka-Heiskanen,T., Basheer,R., Dauphin,L.J., Rainnie,D.G., Portas,C.M., Greene,R.W., and McCarley,R.W. (2000). Adenosinergic modulation

- of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav. Brain Res.* *115*, 183-204.
- Suntsova,N., Szymusiak,R., Alam,M.N., Guzman-Marin,R., and McGinty,D. (2002). Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J. Physiol* *543*, 665-677.
- Tandberg,E., Larsen,J.P., and Karlsen,K. (1998). A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* *13*, 895-899.
- Taniguchi,A., Sohma,Y., Hirayama,Y., Mukai,H., Kimura,T., Hayashi,Y., Matsuzaki,K., and Kiso,Y. (2009). "Click peptide": pH-triggered in situ production and aggregation of monomer Abeta1-42. *Chembiochem.* *10*, 710-715.
- Taniguchi,A., Yoshiya,T., Abe,N., Fukao,F., Sohma,Y., Kimura,T., Hayashi,Y., and Kiso,Y. (2007). 'O-Acyl isopeptide method' for peptide synthesis: Solvent effects in the synthesis of Abeta1-42 isopeptide using 'O-acyl isodipeptide unit'. *J. Pept. Sci.* *13*, 868-874.
- Taraboulos,A., Serban,D., and Prusiner,S.B. (1990). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell Biol.* *110*, 2117-2132.
- Taratuto,A.L., Piccardo,P., Reich,E.G., Chen,S.G., Sevlever,G., Schultz,M., Luzzi,A.A., Rugiero,M., Abecasis,G., Endelman,M., Garcia,A.M., Capellari,S., Xie,Z., Lugaresi,E., Gambetti,P., Dlouhy,S.R., and Ghetti,B. (2002). Insomnia associated with thalamic involvement in E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* *58*, 362-367.
- Terzano,M.G., Parrino,L., Pietrini,V., Mancina,D., Spaggiari,M.C., Rossi,G., and Tagliavini,F. (1995). Precocious loss of physiological sleep in a case of Creutzfeldt Jakob disease: a serial polygraphic study. *Sleep* *18*, 849-858.
- Thakkar,M., Portas,C., and McCarley,R.W. (1996). Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res.* *723*, 223-227.
- Tinuper,P., Montagna,P., Medori,R., Cortelli,P., Zucconi,M., Baruzzi,A., and Lugaresi,E. (1989). The thalamus participates in the regulation of the sleep-waking cycle. A clinico-pathological study in fatal familial thalamic degeneration. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *73*, 117-123.
- Tobler,I. (1995). Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behav. Brain Res.* *69*, 35-41.
- Tobler,I. (2011). Phylogeny of Sleep Regulation. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, T. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Saunders), pp. 112-125.
- Tobler,I., and Borbely,A.A. (1986). Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *64*, 74-76.
- Tobler,I., Deboer,T., and Fischer,M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci.* *17*, 1869-1879.
- Tobler,I., Gaus,S.E., Deboer,T., Achermann,P., Fischer,M., Rulicke,T., Moser,M., Oesch,B., McBride,P.A., and Manson,J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* *380*, 639-642.

Tononi,G., and Cirelli,C. (2014). Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron* 81, 12-34.

Triarhou,L.C. (2006). The percipient observations of Constantin von Economo on encephalitis lethargica and sleep disruption and their lasting impact on contemporary sleep research. *Brain Res. Bull.* 69, 244-258.

Trulson,M.E., and Jacobs,B.L. (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.* 163, 135-150.

Tsui-Pierchala,B.A., Encinas,M., Milbrandt,J., and Johnson,E.M., Jr. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25, 412-417.

Tu,P.H., Galvin,J.E., Baba,M., Giasson,B., Tomita,T., Leight,S., Nakajo,S., Iwatsubo,T., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M. (1998). Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann. Neurol.* 44, 415-422.

Tudor,M., Tudor,L., and Tudor,K.I. (2005). [Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]. *Acta Med. Croatica* 59, 307-313.

Turek,F.W. (2011). Introduction: Master Circadian Clock, Master Circadian Rhythm. In *Principles and practice of sleep medicine*, M.H. Kryger, T. Roth, and W.C. Dement, eds. (Philadelphia: Saunders), pp. 360-362.

Um,J.W., Nygaard,H.B., Heiss,J.K., Kostylev,M.A., Stagi,M., Vortmeyer,A., Wisniewski,T., Gunther,E.C., and Strittmatter,S.M. (2012). Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 1227-1235.

Uschakov,A., Gong,H., McGinty,D., and Szymusiak,R. (2006). Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3284-3296.

Uschakov,A., Gong,H., McGinty,D., and Szymusiak,R. (2007). Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience* 150, 104-120.

Uversky,V.N., and Fink,A.L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta* 1698, 131-153.

Van Dongen,H.P., Maislin,G., Mullington,J.M., and Dinges,D.F. (2003). The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep* 26, 117-126.

Van,E.B., Dewulf,E., Pals,P., Lubke,U., Martin,J.J., and Cras,P. (2002). The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Aging* 23, 59-64.

Vassalli,A., Dellepiane,J.M., Emmenegger,Y., Jimenez,S., Vandi,S., Plazzi,G., Franken,P., and Tafti,M. (2013). Electroencephalogram paroxysmal theta characterizes cataplexy in mice and children. *Brain* 136, 1592-1608.

Vassalli,A., and Dijk,D.J. (2009). Sleep function: current questions and new approaches. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1830-1841.

- Vertes,R.P. (1984). A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The upper brainstem. *Neuroscience* 11, 669-690.
- Vertes,R.P., and Kocsis,B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81, 893-926.
- Videnovic,A., Leurgans,S., Fan,W., Jaglin,J., and Shannon,K.M. (2009). Daytime somnolence and nocturnal sleep disturbances in Huntington disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 15, 471-474.
- Villablanca,J. (1965). The electrocorticogram in the chronic cerveau isole cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 19, 576-586.
- Villette,V., Poindessous-Jazat,F., Simon,A., Lena,C., Roullot,E., Bellessort,B., Epelbaum,J., Dutar,P., and Stephan,A. (2010). Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J. Neurosci.* 30, 10991-11003.
- Virgilio (1999). *Eneide*, pp. vv 1-267.
- Vitiello,M.V., and Prinz,P.N. (1989). Alzheimer's disease. Sleep and sleep/wake patterns. *Clin. Geriatr. Med.* 5, 289-299.
- von Economo,C. (1930). Sleep as a problem of localization. *J. Nerv. Ment. Dis.* 71, 249-259.
- von Economo,C. (1931). *Encephalitis Lethargica, Us Sequelae and Treatment.* Southern Medical Journal 24.
- Vyazovskiy,V.V., Ruijgrok,G., Deboer,T., and Tobler,I. (2006). Running wheel accessibility affects the regional electroencephalogram during sleep in mice. *Cereb. Cortex* 16, 328-336.
- Walker,F.O. (2007). Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228.
- Walsh,D.M., Klyubin,I., Fadeeva,J.V., Cullen,W.K., Anwyl,R., Wolfe,M.S., Rowan,M.J., and Selkoe,D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- Walz,R., Amaral,O.B., Rockenbach,I.C., Roesler,R., Izquierdo,I., Cavalheiro,E.A., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40, 1679-1682.
- Wanschitz,J., Kloppel,S., Jarius,C., Birner,P., Flicker,H., Hainfellner,J.A., Gambetti,P., Guentchev,M., and Budka,H. (2000). Alteration of the serotonergic nervous system in fatal familial insomnia. *Ann. Neurol.* 48, 788-791.
- Watson,D., Castano,E., Kokjohn,T.A., Kuo,Y.M., Lyubchenko,Y., Pinsky,D., Connolly,E.S., Jr., Esh,C., Luehrs,D.C., Stine,W.B., Rowse,L.M., Emmerling,M.R., and Roher,A.E. (2005). Physicochemical characteristics of soluble oligomeric A $\beta$  and their pathologic role in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 27, 869-881.
- Webb,W.B., and Agnew,H.W., Jr. (1965). Sleep: effects of a restricted regime. *Science* 150, 1745-1747.
- Webb,W.B., and Agnew,H.W., Jr. (1971). Stage 4 sleep: influence of time course variables. *Science* 174, 1354-1356.

- Webster,H.H., and Jones,B.E. (1988). Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res.* 458, 285-302.
- Weinreb,P.H., Zhen,W., Poon,A.W., Conway,K.A., and Lansbury,P.T., Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715.
- Weissmann,C., and Aguzzi,A. (1997). Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 695-700.
- Werth,E., Dijk,D.J., Achermann,P., and Borbely,A.A. (1996). Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations. *Am J Physiol* 271, R501-R510.
- Westbrook,G.L. (2013). Seizures and epilepsy. In *Principle of Neural Science*, E.R. Kandel, J.H. Schwartz, and T.M. Jessel, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 1116-1139.
- White,S.R., and Fung,S.J. (1989). Serotonin depolarizes cat spinal motoneurons in situ and decreases motoneuron afterhyperpolarizing potentials. *Brain Res.* 502, 205-213.
- White,S.R., Fung,S.J., and Barnes,C.D. (1991). Norepinephrine effects on spinal motoneurons. *Prog. Brain Res.* 88, 343-350.
- White,S.R., Fung,S.J., Jackson,D.A., and Imel,K.M. (1996). Serotonin, norepinephrine and associated neuropeptides: effects on somatic motoneuron excitability. *Prog. Brain Res.* 107, 183-199.
- Wiegand,M., Moller,A.A., Lauer,C.J., Stolz,S., Schreiber,W., Dose,M., and Krieg,J.C. (1991a). Nocturnal sleep in Huntington's disease. *J. Neurol.* 238, 203-208.
- Wiegand,M., Moller,A.A., Schreiber,W., Lauer,C., and Krieg,J.C. (1991b). Brain morphology and sleep EEG in patients with Huntington's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240, 148-152.
- Wieser,H.G., Schindler,K., and Zumsteg,D. (2006). EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Neurophysiol.* 117, 935-951.
- Wigren,H.K., Schepens,M., Matto,V., Stenberg,D., and Porkka-Heiskanen,T. (2007). Glutamatergic stimulation of the basal forebrain elevates extracellular adenosine and increases the subsequent sleep. *Neuroscience* 147, 811-823.
- Wing,Y.K., Lam,S.P., Li,S.X., Yu,M.W., Fong,S.Y., Tsoh,J.M., Ho,C.K., and Lam,V.K. (2008). REM sleep behaviour disorder in Hong Kong Chinese: clinical outcome and gender comparison. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 1415-1416.
- Winkelman,J.W., and James,L. (2004). Serotonergic antidepressants are associated with REM sleep without atonia. *Sleep* 27, 317-321.
- Winklhofer,K.F., Tatzelt,J., and Haass,C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* 27, 336-349.
- Xie,L., Kang,H., Xu,Q., Chen,M.J., Liao,Y., Thiyagarajan,M., O'Donnell,J., Christensen,D.J., Nicholson,C., Iliff,J.J., Takano,T., Deane,R., and Nedergaard,M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342, 373-377.

- Yamada,K., Cirrito,J.R., Stewart,F.R., Jiang,H., Finn,M.B., Holmes,B.B., Binder,L.I., Mandelkow,E.M., Diamond,M.I., Lee,V.M., and Holtzman,D.M. (2011). In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J. Neurosci.* *31*, 13110-13117.
- Yamuy,J., Jimenez,I., Morales,F., Rudomin,P., and Chase,M. (1994). Population synaptic potentials evoked in lumbar motoneurons following stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis during carbachol-induced atonia. *Brain Res.* *639*, 313-319.
- Yoss,R.E., and Daly,D.D. (1957). Criteria for the diagnosis of the narcoleptic syndrome. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.* *32*, 320-328.
- Young,A.B. (2003). Huntingtin in health and disease. *J. Clin. Invest* *111*, 299-302.
- Zambelis,T., Paparrigopoulos,T., and Soldatos,C.R. (2002). REM sleep behaviour disorder associated with a neurinoma of the left pontocerebellar angle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *72*, 821-822.
- Zanata,S.M., Lopes,M.H., Mercadante,A.F., Hajj,G.N., Chiarini,L.B., Nomizo,R., Freitas,A.R., Cabral,A.L., Lee,K.S., Juliano,M.A., de,O.E., Jachieri,S.G., Burlingame,A., Huang,L., Linden,R., Brentani,R.R., and Martins,V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* *21*, 3307-3316.
- Zhang,B., Veasey,S.C., Wood,M.A., Leng,L.Z., Kaminski,C., Leight,S., Abel,T., Lee,V.M., and Trojanowski,J.Q. (2005a). Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. *Am. J. Pathol.* *167*, 1361-1369.
- Zhang,J.H., Sampogna,S., Morales,F.R., and Chase,M.H. (2005b). Age-related changes of hypocretin in basal forebrain of guinea pig. *Peptides* *26*, 2590-2596.
- Zhang,J.M., Wang,H.K., Ye,C.Q., Ge,W., Chen,Y., Jiang,Z.L., Wu,C.P., Poo,M.M., and Duan,S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* *40*, 971-982.
- Zussy,C., Brureau,A., Keller,E., Marchal,S., Blayo,C., Delair,B., Ixart,G., Maurice,T., and Givalois,L. (2013). Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid-beta peptide injection in rats. *PLoS. One.* *8*, e53117.