

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA “LA SAPIENZA”

Dipartimento di Psicologia

Dottorato di Ricerca in Psicobiologia e Psicofarmacologia

RITMI ULTRADIANI: UN APPROCCIO COMPARATO

Dott. VITTORIO PASQUALI

XVIII Ciclo

INDICE

CAPITOLO 1 – Introduzione generale	7
1.1 Cronobiologia	10
1.2 Ritmi infradiani	12
1.3 Ritmi circadiani	15
1.4 Ritmi ultradiani	18
1.5 Ontogenesi del ritmo ultradiano di attività motoria	21
CAPITOLO 2 – Studi a carattere metodologico	25
2.1 Uso di un sistema radar a microonde in una ricerca di cronobiologia: un'applicazione con <i>Periplaneta Americana</i>	27
2.2 Validazione di un nuovo sistema per il monitoraggio dei ritmi di attività nei topi	39
2.3 Un sistema infrarosso per lo studio dei ritmi di attività motoria in misidacei cavernicoli	55
CAPITOLO 3 – Studi su mammiferi: topi	70
3.1 Ritmi circadiani ed ultradiani nell'attività locomotoria di ceppi inbred di topo	73
3.2 Differenze sessuali nei ritmi di attività motoria di topi c57bl/6 e balb/c	88
3.3 Ritmi ultradiani nell'attività locomotoria di ibridi f1 (balb/c e c57bl/6)	104
3.4 Ritmi ultradiani temperatura-compensati in topi inbred	120
CAPITOLO 4 – Studi su Invertebrati: animali cavernicoli	132
4.1 Attività locomotoria in grilli cavernicoli del genere <i>dolichopoda</i> . Uno studio cronobiologico su popolazioni provenienti da grotte naturali ed artificiali	134
4.2 Comparazione fra i pattern ritmici di attività locomotoria espresso da tre specie di cavernicoli con un elevato grado di adattamento all'ambiente sotterraneo	148
CAPITOLO 5 - Conclusioni generali	156

PREFAZIONE

Il manoscritto è una collazione di articoli pubblicati, in referaggio o in preparazione su buona parte delle ricerche condotte da me nel periodo del dottorato di ricerca svolto sotto la supervisione del Prof. Paolo Renzi. La collazione è organizzata seguendo un filo logico: nel capitolo 2 vengono prima presentati gli articoli metodologici nei quali è stata validata la strumentazione utilizzata nelle ricerche principali. Nel capitolo 3 viene presentata tutta la linea di ricerca svolta sui topi. Ed in fine nel capitolo 4 la linea di ricerca secondaria con lo sviluppo di un nuovo modello animale per lo studio dei ritmi biologici, gli animali cavernicoli. Nel quinto ed ultimo capitolo sono state tracciate le conclusioni generali di tutti gli studi presentati e gli sviluppi futuri.

CAPITOLO 1

Introduzione generale

Il termine ritmo (dal greco *rein*, scorrere), ricorda il movimento delle onde del mare, ma in realtà nella filosofia ionica questo termine (*rutmos*) veniva utilizzato per esprimere il concetto di forma (Benveniste, 1951). Già nel IV secolo a. C. Aristoteno di Taranto, discepolo di Aristotele, parlava di ritmo affermando che esso "è una serie di durate così come la gamma è una serie di intervalli" (Laloy, 1904). Erodoto e Leucippo applicavano questo termine alla forma delle lettere dell'alfabeto, essendo ancora lontani da una sua interpretazione in chiave "ondulatoria", mentre Platone fu il primo ad assegnargli una definizione che andasse oltre il concetto di forma, considerandolo come un ordine del movimento assoggettato ai numeri alla stessa stregua dei suoni musicali. In tal senso Platone riconduceva il senso dato dagli antichi di ritmo-forma alla forma dei movimenti umani.

Il termine ritmo, o fluttuazione periodica, si usa oggi in riferimento ad un evento che si discosta da un punto di origine per tornarvi dopo un certo periodo, indipendentemente dal tempo impiegato per tornare al punto stesso. Nel 1962 Aschoff affermava che "l'esame degli organismi viventi, ad ogni livello di organizzazione fisiologica, porta all'osservazione che le variabili in esame si manifestano con variazioni non casuali nel tempo". Molti di questi cambiamenti tempo-dipendenti ricorrono ad intervalli regolari e rappresentano ritmi che sono, ad un certo grado, predicibili nel tempo.

L'introduzione del termine ritmo per descrivere questo fenomeno si deve in realtà ad Halberg (1965), che utilizzava il termine per riferirsi ai ritmi circadiani, dal latino *circa dies* (di circa un giorno). Il suffisso *circa* è di particolare importanza, dal momento che con esso si fa riferimento all'origine endogena dei ritmi stessi; infatti questi ritmi non seguono un ciclo preciso di 24 ore, così come dovrebbe avvenire nel caso in cui dipendessero da stimoli esterni. E' chiaro che i ritmi biologici si siano sviluppati per un'esigenza di adattamento agli stimoli ambientali: infatti l'ambiente fisico in cui vive un organismo è caratterizzato da una molteplicità di eventi periodici che derivano dai movimenti terrestri e lunari rispetto al sole. Fin dalla sua origine, più di un miliardo di anni fa, la "vita" ha dovuto affrontare sia i cambiamenti ciclici giornalieri di luminosità e temperatura connessi alla rotazione terrestre, che quelli ciclici annuali (stagionali) del rapporto giornaliero ore di luce/ore di buio e di temperatura connessi al movimento di rivoluzione terrestre intorno al sole. Inoltre, il fenomeno delle maree, dovuto alla rivoluzione della luna intorno alla terra, e le fluttuazioni periodiche nei livelli di umidità, ponevano ulteriori vincoli di sopravvivenza alle forme di vita acquatiche e terrestri (Haus e Touitou, 1992). L'adattamento degli organismi a questi cambiamenti ambientali periodici fu, allora, una necessità che la selezione naturale dovette affrontare. La stabilità temporale degli eventi ciclici ambientali rese loro il carattere della predicibilità, il quale offrì una chiara opportunità per la selezione naturale di seguire la strategia della "programmazione anticipatoria" (Pittendrigh, 1981). Il risultato fu un'ampia diffusione negli organismi eucarioti di programmi temporali innati per il metabolismo ed il comportamento, i quali sono intrapresi

appropriatamente durante un determinato intervallo di tempo del ciclo ambientale esterno. Si passò così da una ciclicità delle funzioni biologiche come reazione all'occorrenza ciclica di specifici stimoli ambientali esterni, ad una ciclicità propria di queste funzioni, la cui esistenza non dipendeva più così strettamente da quella esterna, dalla quale era stata generata, essendosi ormai impressa nel corredo genetico dell'organismo. Nel momento in cui l'evoluzione naturale rese indipendenti dalle periodicità ambientali esterne le fluttuazioni di molte funzioni biologiche, approntando programmi temporali basati su specifiche strutture biologiche, dette "pacemaker", in grado di generare endogenamente oscillazioni stabili autosostenentisi, si rese disponibile un dispositivo biologico altamente adattativo in quanto capace di controllare autonomamente le fluttuazioni delle funzioni biologiche, con chiari vantaggi omeostatici, senza perdere la sensibilità alle periodicità esogene dalle quali prese origine, ovvero la plasticità necessaria per rispondere alle variazioni dei loro parametri.

1.1 Cronobiologia

La cronobiologia è "la scienza che studia e quantifica oggettivamente i meccanismi della struttura biologica, includendoli in una dimensione temporale" (Halberg et al., 1977). Come abbiamo osservato, i cambiamenti delle funzioni fisiologiche degli organismi viventi, che ricorrono ad intervalli regolari, rappresentano ritmi che sono, in un certo grado, predicibili nel tempo. Con l'uso di procedure statistiche di ritmometria, una grande porzione della variabilità incontrata nelle serie di misure delle variabili biologiche si può ricondurre ad una moltitudine di ritmi che oscillano a differenti frequenze (Halberg et al., 1965a, b; Halberg e Panofsky, 1961; Halberg e Reinberg, 1967; Haus et al., 1980, 1981; Panofsky e Halberg, 1961). I ritmi idealmente vengono descritti come andamenti sinusoidali (anche se in realtà è difficile osservare una perfetta senoide) e, come tali, si utilizza la terminologia legata a tali andamenti per descrivere e quantificare questi fenomeni.

Come si è detto, tutti gli animali presentano variazioni cicliche di funzioni biologiche. Molti processi fisiologici e molte attività comportamentali si ripetono ad intervalli di tempo regolari, come le contrazioni del muscolo cardiaco, l'attività motoria, la veglia, la riproduzione, possiamo classificare genericamente questi ritmi col nome di bioritmi.

Un fenomeno periodico può essere rappresentato graficamente da un'onda sinusoidale, la quale può essere generata dalla rotazione di un vettore. Di un ritmo possiamo misurare: il periodo, la frequenza, l'ampiezza e la fase (o acrofase)(figura 1-2).

E' bene definire subito alcuni termini cui si fa riferimento in ambito cronobiologico. Con il termine **ciclo** si intende descrivere una successione di eventi che si ripetono sempre nello stesso ordine, ad esempio il ciclo sonno/veglia, il ciclo mestruale. Il tempo necessario a completare un ciclo, cioè la

durata, viene denominato **periodo** (t); quindi il ciclo sonno/veglia presenterà un periodo di circa 24 ore mentre il ciclo mestruale ha un periodo di circa 28 giorni. L'inverso del periodo è la **frequenza** ($f=1/t$). Il succedersi regolare nel tempo di un ciclo determina un **ritmo**. - Lo scopo degli studi cronobiologici è verificare se una funzione manifesta un ciclo e se tale ciclo si ripete in maniera regolare nel tempo, ovvero se manifesta un ritmo - Il valore medio di un ritmo è idealmente rappresentato dalla media dei valori puntuali del parametro oscillante entro un periodo. Poiché le serie temporali che si incontrano in biologia non sempre sono costituite da rilevazioni sufficientemente ravvicinate (continue) ed equidistanti del parametro d'interesse, ma più spesso si riferiscono ad intervalli discreti e a volte irregolari, allora la media aritmetica non rappresenterà correttamente la media del ritmo, ma risulterà spostata laddove le misure del parametro in esame siano più dense. In queste condizioni, se il ritmo sotto studio può essere approssimato e definito da un modello matematico, allora una stima migliore del valore medio del ritmo si può ottenere dalla cosiddetta "stima statistica della linea mediana del ritmo" - **MESOR** - (Halberg et al., 1977), ovvero del valore intermedio tra il valore più alto e quello più basso della funzione usata per descrivere il ritmo. Il Mesor coinciderà con la media aritmetica dei dati solo se essi corrispondono a punti equidistanti su un ciclo intero del ritmo. L'**ampiezza** indica la deviazione massima rispetto al valore medio di una grandezza variabile periodicamente, cioè è data dalla semidifferenza tra il punto più alto e quello più basso della sinusoide. Ci possono essere differenze consistenti tra il range dei dati e la doppia ampiezza del modello matematico sinusoidale a causa della non sinusoidalità del parametro misurato o per la presenza di dati fuori misura. L'**acrofase** è la distanza che intercorre da un punto di riferimento al picco della funzione che approssima il ritmo. Le unità di misura sono i gradi centigradi oppure le unità di tempo. L'acrofase quindi è un preciso indice matematico, una misura microscopica della localizzazione temporale e non deve essere confusa con il picco del grafico dei dati posti in funzione del tempo. L'acrofase viene usata anche per stabilire il rapporto temporale tra uno o più ritmi. Infatti due ritmi sono sincronizzati (o in fase) fra loro se possiedono un'identica acrofase, cioè entrambe i ritmi raggiungono i valori massimi nello stesso momento della giornata; oppure sono fuori fase l'uno con l'altro se possiedono differenti acrofasi

Possiamo distinguere differenti ritmi in funzione della frequenza delle oscillazioni, che possono essere ad alta frequenza o sincronizzate con le cinque periodicità naturali fondamentali. La prima categoria comprende ad esempio il battito del cuore, il ritmo di scarica di un neurone ma anche ritmicità ultradiane con periodi abbastanza variabili: dalle 20 ore in giù. La seconda categoria comprende: i ritmi tidali con periodo di 12,4 ore, in sincronia con i due picchi di bassa ed alta marea che si verificano durante il giorno lunare di 24,8 ore; i ritmi giornalieri di 24 ore, in sincronia con l'alternanza del giorno e della notte; i ritmi semilunari di 14,8 ore, in sincronia con le maree

sizigiali; i ritmi lunari di 29,5 giorni, in sincronia col ciclo lunare; i ritmi annuali di 365 giorni, in sincronia con l'anno solare.

I cinque ritmi sincronizzati con le periodicità naturali sono ampiamente diffusi nel regno animale e sono determinanti per la variazione di molte funzioni biologiche e comportamentali.

1.2 Ritmi infradiani

Mentre i ritmi con periodicità circadiana sono stati per anni il centro d'interesse per molti ricercatori, in letteratura si trovano scarsissime ricerche sui ritmi a periodo breve o a periodo lungo; solo di recente l'interesse dei cronobiologi si è spostato sui ritmi infradiani ed ultradiani.

I ritmi infradiani sembrerebbero giocare un ruolo rilevante nella modificazione dei ritmi circadiani: ad esempio, è stata osservata nell'essere umano una differenza significativa tra l'acrofase del ritmo della temperatura in Marzo e quella in Dicembre, differenza quantificabile in circa un'ora. Relazioni come queste hanno guidato Halberg (1969) a sostenere la necessità di considerare il sistema circadiano nel contesto di un più ampio spettro di ritmi (Folkard e Monk, 1983). Infatti molti ritmi infradiani rispondono ai cambiamenti stagionali della lunghezza del giorno, come il ritmo annuale dell'attività riproduttiva nei criceti dorati maschi, ed alcuni sono accoppiati ai processi circadiani (Miller, 1990).

I ritmi infradiani comprendono le ciclicità annuali (come l'ibernazione), stagionali (come la migrazione), lunari (come le maree ed il ciclo mestruale) e settimanali (Webb, 1982).

Rispetto alle periodicità circadiane, alcuni ritmi superano di poco le 24 ore, mentre altri si presentano con variazioni periodiche di giorni, settimane, mesi o anni. Proprio sulla base del loro periodo, i ritmi infradiani si suddividono fondamentalmente in ritmi circamensili e ritmi circannuali, a seconda che il loro ciclo duri 29 o 365 giorni circa.

La maggior parte di questi ritmi lenti (a bassa frequenza) conosciuti sono legati alle condizioni ecologiche ed in particolare ai ritmi delle stagioni, altri sembrano dipendere dalle fasi lunari.

Ritmi circamensili sono stati trovati nelle variazioni endocrine che avvengono sia nell'organismo femminile che in quello maschile. Il ritmo psicofisiologico più noto e indagato, per il suo significato nella funzione riproduttiva, è il ciclo mestruale. Il suo periodo, di 29,57 giorni nella specie umana, è quasi coincidente con la durata del ciclo lunare (29,59). Per visualizzare la condizione fisiologica ed emozionale di ogni persona in ogni momento del ciclo si tracciano delle "mappe circamensili" che sintetizzano il grado di sincronismo delle varie funzioni metaboliche ed endocrine che avvengono durante il ciclo. Lo studio delle variazioni periodiche mostra come tutta la costellazione ormonale dell'organismo vada incontro ad una modificazione periodica, condizionando sia il metabolismo che il tono emozionale.

Durante questo ciclo l'ipofisi produce l'ormone follicolo-stimolante (FSH), che stimola lo sviluppo dei follicoli ovarici con un aumento degli estrogeni circolanti. A metà ciclo, gli estrogeni raggiungono il loro valore massimo e, attraverso un feedback ipotalamico, si verifica un aumento di ormone luteinizzante (LH). A questo punto si verifica l'ovulazione ed il corpo luteo comincia a produrre progesterone che, nel caso in cui non sia avvenuta la fecondazione, riduce i suoi valori circa sei giorni prima della mestruazione. Nel corso del ciclo mestruale si verificano anche altre variazioni ormonali, quale un aumento acuto della prolattina a metà ciclo. L'aldosterone presenta un picco secretorio nove o dieci giorni prima della mestruazione ed una successiva ricaduta molto rapida, mentre gli androgeni presentano una maggiore attività secretoria attorno alla metà del ciclo (Katz et al., 1972; McNeilly et al., 1974). Il ciclo mestruale, oltre che come bioritmo circamensile legato alle funzioni riproduttive, è importante per le sue implicazioni psicosomatiche e somatopsichiche. Infatti, a livello psicosomatico sono noti gli effetti degli stressor emozionali acuti o dei disturbi emozionali cronici nel determinare la desincronizzazione o la perdita di fascità del ciclo mentre, a livello somatopsichico, è stata messa in rilievo una tendenza alle variazioni cicliche del tono dell'umore, fino alla comparsa di manifestazioni di malessere soggettivo di tipo disforico immediatamente prima o durante la mestruazione (disforia premenstruale). Anche nell'organismo maschile si verificano variazioni endocrine e metaboliche con periodicità circamensile, ma sono meno studiate e di minore entità rispetto alle conoscenze sulla fisiologia del ritmo femminile (Pancheri, 1979).

Lo studio sui ritmi annuali presenta maggiori difficoltà, in quanto richiede osservazioni condotte anno dopo anno, per lunghi periodi. I ritmi annuali più evidenti si riscontrano nelle piante, che seguono dei ritmi che sono in accordo con l'andamento stagionale: iniziano la loro attività in primavera, germogliando; questa attività raggiunge la sua massima espressione in estate, periodo in cui la pianta produce i suoi frutti, dopodiché si ha una fase decrescente, che termina in inverno con una fase di relativo riposo.

Due ricercatori francesi, Jacques Benoit e Ivan Assenmacher, sembra siano stati i primi a intraprendere questo tipo di ricerche sugli animali. Essi scelsero come soggetto il ciclo riproduttivo del maschio dell'anitra domestica. Tenendolo in condizioni di illuminazione costante, misurarono l'attività dei testicoli nei vari periodi dell'anno non ottenendo risultati significativi.

Una forte accelerazione a questo tipo di studi è stata offerta con lo sviluppo dello studio in laboratorio dei fenomeni biologici: grazie a questo metodo si è chiarito che le modificazioni cicliche osservate nelle piante e negli animali non dipendono dall'ambiente esterno.

La prima prova chiara dell'esistenza di un orologio annuale fu scoperta incidentalmente, nel corso di una ricerca avente uno scopo ben diverso, da Fisher negli anni '60, studiando il fenomeno della

ibernazione sul *Citellus lateralis*, uno scoiattolo di terra. L'animale venne tenuto in una cassetta priva di finestre, mantenuta alla temperatura costante di 0°C, illuminata artificialmente per 12 ore al giorno. Lo stesso Fisher (1967), in seguito, ha indagato questo fenomeno utilizzando tre gruppi di scoiattoli posti in tre diverse condizioni di temperatura ambientale: 0°C, 22°C e 35°C. L'autore osservò che, indipendentemente dalla temperatura, gli animali seguivano un ciclo annuale in cui dapprima aumentarono il loro consumo di cibo ed ingrassarono, poi si ibernarono, tornarono ad essere attivi e nutrirsi per alcuni mesi ed infine si ibernarono di nuovo, seguendo un ciclo il cui periodo (324-329 giorni) non corrisponde esattamente all'anno solare. Gli scoiattoli del terzo gruppo non si ibernarono perché la temperatura ambientale era quasi identica a quella corporea di 37°C, però mostrarono ugualmente una riduzione del consumo di cibo durante il periodo che avrebbe dovuto essere invernale ed un aumento nel periodo primaverile. Tale ciclicità, indipendente da variazioni esterne, sembra dimostrare l'esistenza di un orologio circannuale endogeno, geneticamente determinato.

La migrazione degli uccelli è forse il fenomeno più ampiamente studiato tra tutti i comportamenti stagionali degli animali. Gwinner (1986) ha riscontrato la presenza di un orologio circannuale negli uccelli migratori in un esperimento su piccoli Passeriformi della famiglia dei Selvidi. Questi animali sono stati divisi in due gruppi, uno tenuto vicino Monaco, l'altro inviato in Africa centrale, dove normalmente svernava la specie. Entrambi questi gruppi sono stati ulteriormente suddivisi in due ulteriori gruppi, dei quali uno era sottoposto a condizioni di temperatura costante di 21°C e ad un ciclo di LB (12:12), mentre l'altro era lasciato alle normali variazioni esterne (gruppi di controllo). I quattro gruppi di animali mostrarono le stesse variazioni stagionali: migrazione in primavera e autunno, preceduta da un aumento dell'attività notturna, ed il fenomeno della muta nei periodi intermedi.

Una ulteriore prova a conferma dell'esistenza di un orologio annuale negli uccelli è il fatto che le variazioni stagionali dipendono dal periodo in cui è avvenuta la nascita: se la schiusa è tarda, i fenomeni che precedono la migrazione sono posticipati rispetto a quando la schiusa avviene in anticipo. Dal punto di vista evolutivo l'instaurarsi di un orologio circannuale sembrerebbe essere importante sia per una "preparazione" da parte dell'animale ai cambiamenti ambientali, sia come ulteriore fonte di informazione riguardo all'ambiente nelle situazioni in cui gli stimoli esterni non siano chiari.

E' stato osservato come anche l'uomo possieda un tale orologio annuale. Halberg e coll. (1975) hanno riferito alcuni interessanti dati su un soggetto maschio normale, che è stato osservato per circa 15 anni. Questi ricercatori hanno misurato la secrezione giornaliera di 17-chetosteroidi nelle urine. La quantità di ormoni escreti presentava numerose piccole oscillazioni: una avente un periodo

di circa una settimana; un'altra di circa 20 giorni; un'altra di un mese e un'altra ancora di circa un anno. Il soggetto mostrò dunque un chiaro ciclo annuale con un minimo nel mese di maggio e un massimo nell'autunno-inverno. Questo ritmo non sembra essere collegato apparentemente con alcun segnale proveniente dall'esterno e sembra indipendente dalla temperatura, il che fa ritenere che dipenda da un orologio endogeno.

1.3 Ritmi circadiani

Tutti gli organismi viventi, da quelli unicellulari all'uomo, sono caratterizzati da oscillazioni autonome delle loro funzioni che si presentano con un periodo di circa 24 ore.

Alcune funzioni biologiche non mostrano una ritmicità endogena, dal momento che la loro espressione è fortemente legata a fluttuazioni giornaliere di temperatura, luce e/o umidità ambientale: questi cicli, essendo guidati da fattori esterni, scompaiono quando le condizioni ambientali sono stabili. I ritmi circadiani endogeni, al contrario, mantengono una periodicità che si approssima alle 24 ore anche in presenza di condizioni ambientali costanti: il ritmo circadiano endogeno dipende da quello che Halberg et al. (1965) hanno chiamato "orologio biologico", una struttura nervosa capace di sostenere un ritmo, in assenza di stimoli ambientali.

Una delle problematiche connesse con lo studio dei ritmi è il rapporto tra eventi ambientali e ritmicità. Infatti in natura l'alternarsi di luce e buio (LB) nel corso delle 24 ore rappresenta il fattore di sincronizzazione dominante per i ritmi di riposo ed attività, così come per quelli di sonno e veglia: le specie diurne, come quella umana, sono attive nelle ore di luce mentre si verifica il contrario in quelle notturne, così come accade in numerosi felini e roditori. In assenza di un sincronizzatore esterno, come in condizioni di oscurità continua (BB) o di luce continua (LL), i ritmi circadiani si divincolano da fattori di regolazione ambientale e divengono autonomi, entrano in "free running", con un periodo che varia intorno alle 24 ore.

Richter (1927) ha descritto per primo la persistenza di ritmi circadiani di attività nel ratto posto in condizioni di oscurità costante. Più tardi Johnson (1939) ha osservato come una specie di roditore selvatico, il *Peromyscus Leucopus*, fosse attivo durante le ore di oscurità e riposasse durante quelle di luce: questo animale manteneva un'attività ritmica anche in condizioni di oscurità continua, ma presentava uno spostamento dell'attività anche alle ore diurne.

Il mantenimento delle funzioni ritmiche, come abbiamo osservato, è dovuto alla presenza di un orologio biologico che sia in grado di sincronizzare queste fluttuazioni endogene all'alternanza periodica esterna (come l'alternanza di luce e di buio) e di sostenerle in condizioni ambientali costanti.

Il ritmo circadiano più evidente e conosciuto è quello della veglia e del sonno: anche in assenza di informazioni esterne, di un regolare ciclo giorno-notte, gli animali e gli uomini passano da fasi di attività-veglia a fasi di riposo e di sonno. In condizioni di oscurità totale gli animali ricreano un proprio ciclo, appena più breve o più lungo di 24 ore, in cui si alternano attività e sonno. Il sonno e la veglia sono soltanto gli esempi più appariscenti delle attività ritmiche fisiologiche. Il ben noto ritmo umano della temperatura venne descritto per la prima volta da Gierse nel 1842 (anche se per alcuni anni venne considerato una semplice conseguenza di una regolare alternanza di attività e riposo muscolare): la temperatura corporea tende a decrescere durante la notte; in maniera analoga anche il consumo di ossigeno, la pressione arteriosa e il ritmo cardiaco tendono a decrescere nelle ore notturne e ad aumentare durante il giorno. I primi studi sul sistema respiratorio, circolatorio e sull'escrezione urinaria si sono estesi a studi sulle performance sensoriali e motorie, così come su processi metabolici a livello cellulare.

Come abbiamo avuto modo di osservare, i ritmi circadiani si divincolano dagli eventi esterni, entrando in "free running", quando l'organismo viene posto in condizioni ambientali costanti. La lunghezza del periodo (t) del ritmo in "free running" dipende da diversi fattori, tra cui le differenze genetiche tra le specie ed entro le specie (individuali), le condizioni ambientali, e la storia "sperimentale" del soggetto.

In molte specie, il periodo (t) di un ritmo in "free running" dipende dall'intensità della luce. Nella maggior parte delle specie non mammifere t è correlato con l'intensità della luce in modo negativo nelle specie diurne e positivo in quelle notturne. I mammiferi si comportano diversamente: infatti anche la maggior parte delle specie diurne mostrano una correlazione positiva tra il periodo e la luminosità (Aschoff, 1981). Allo stesso tempo, se la luminosità non è troppo elevata, nelle specie diurne aumenta l'attività mentre nelle specie notturne diminuisce. Queste relazioni tra periodo in "free running" e condizioni di illuminazione sono conosciute nell'insieme come "regola di Aschoff" (Pittendrigh, 1960). Aumentando l'intensità o la "quantità" di esposizione alla luce, molti ritmi diventano irregolari, mentre altri scompaiono gradualmente, e questo ad una soglia di luminosità che appare più alta nelle specie diurne rispetto a quelle notturne e nei mammiferi rispetto ad altre classi di vertebrati (Aschoff, 1981). Gli effetti dell'esposizione prolungata alla luce continua (LL) sono stati studiati in un recente lavoro di Depress-Brummer et al. (1995). Questi autori hanno trovato una perdita progressiva dei ritmi circadiani di attività e di temperatura in ratti mantenuti in LL; allo stesso tempo, la ritmicità circadiana era, altrettanto progressivamente, sostituita da ritmi ultradiani di frequenza diversa da quella osservata in ratti tenuti in condizioni di alternanza luce/buio (LB) o di buio continuo (BB).

La lunghezza del periodo circadiano dei mammiferi tenuti in BB tendono ad essere maggiori di 24 ore nelle specie diurne (in media, $t=24,24 \pm 0,52$ ore; 11 specie) e minori di 24 ore nelle specie notturne (in media, $t=23,85 \pm 0,56$ ore; 26 specie) (Aschoff, 1979). Differenze genetiche nei valori di t si osservano sia tra le specie che entro le specie; ad esempio, Possidente e Hegmann (1982) trovarono che in 7 ceppi di topi, una specie notturna, il periodo era compreso tra le 22,7 e le 23,9 ore in BB e tra le 23,4 e le 25,4 ore in LL.

L'influenza delle differenze genetiche nella manifestazione del periodo si estendono anche a livello individuale. Sebbene i ceppi puri siano stati selezionati per ridurre le differenze individuali, entro ogni ceppo è ancora possibile riscontrare qualche differenza interindividuale. Ad esempio, è noto che gli individui di un ceppo possono essere distinti tra quelli che concentrano la loro attività prevalentemente durante le prime ore della notte soggettiva e quelli che, invece, preferiscono concentrare la loro attività prevalentemente nella seconda metà della notte soggettiva (Edgar et al., 1991).

Anche se la maggioranza degli organismi, inclusi i mammiferi, mostra soltanto una leggera dipendenza di t dalle variazioni della temperatura esterna, sembrerebbe esserci una correlazione negativa tra questi due parametri nelle specie diurne e positiva in quelle notturne (Aschoff, 1979). Il periodo sembrerebbe, comunque, mostrare una dipendenza alle variazioni di temperatura inferiore rispetto alla dipendenza dall'intensità luminosa e, certamente, molto inferiore alla dipendenza che ci si potrebbe attendere dagli effetti della temperatura sul metabolismo (Aschoff, 1981).

Se in un roditore si osserva, per un lungo periodo di tempo, un ritmo di attività in "free running", ci si accorge che spesso il suo periodo (t) fluttua intorno ad un valore medio di una quantità che è correlata positivamente con il valore dello scostamento di t dalle 24 ore (Pittendrigh e Daan, 1976b). Questa non perfetta stabilità dei ritmi in free running è una regola che si applica sia a differenze intra- e inter-individuali, che a differenze tra le specie (Pittendrigh e Daan, 1976).

Mentre la stabilità di un ritmo riguarda gli andamenti di lungo periodo della sua frequenza, lo scostamento degli intervalli consecutivi di un ritmo attorno al loro periodo medio (t_m) riguarda la precisione (P) di t . Come per la stabilità, P raggiunge il suo valore massimo quando t è di circa 24 ore, ed anche qui esistono differenze intraindividuali, interindividuali e tra le specie (ad es., nel topo domestico la P massima si registra quando $23 < t < 24$ ore). La precisione di t dipende dalla fase scelta come punto di riferimento per il suo calcolo. Aschoff et al. (1971) hanno osservato che nei ritmi di attività dei roditori la fase di riferimento più affidabile, da questo punto di vista, è quella relativa all'inizio del periodo di attività, mentre la fase corrispondente alla fine dell'attività produce t meno precisi. Gli stessi autori hanno ipotizzato, a tal proposito, l'esistenza di una correlazione positiva tra il rapporto P_{fine}/P_{inizio} e t .

Un'ulteriore interdipendenza osservabile in registrazioni di attività locomotoria dei roditori è la correlazione negativa esistente tra la durata del periodo di attività (a) e quella del successivo periodo di riposo (r), fenomeno che risulta in una stabilizzazione del periodo t (Aschoff et al., 1971). Se si assume l'equivalenza riposo=sonno, allora queste scoperte sono in conflitto con le teorie che assumono che il sonno sia un processo di recupero ("restoring") delle energie biochimiche spese durante le ore di attività, poiché, in tal caso, si dovrebbe registrare una correlazione positiva tra attività e riposo (Aschoff, 1981).

Come è stato notato da Pittendrigh (1960), il valore del periodo di un ritmo in "free running" può dipendere dalle proprietà temporali del precedente sincronizzatore, un fenomeno conosciuto come "aftereffect" (Aschoff, 1981). Nel caso in cui il sincronizzatore sia la luce, possono essere osservati due tipi importanti di "aftereffect": il periodo (t) del ritmo può essere influenzato 1) dal rapporto ore di luce/ore di buio (L/B, il cosiddetto fotoperiodo) del sincronizzatore e 2) dalla lunghezza del suo periodo (T). Aschoff (1979) conclude che, mentre in molti roditori da laboratorio c'è solo una debole correlazione negativa, spesso non significativa, tra fotoperiodo e t, esiste, invece, una forte correlazione positiva tra t e T.

Un'ulteriore classe di "aftereffect" è il risultato degli spostamenti dell'angolo di fase j prodotti o da una sincronizzazione interposta tra due ritmi in "free running" oppure da un singolo stimolo sincronizzante, come, ad esempio, un impulso luminoso somministrato in condizioni di buio continuo. Spesso, un anticipo dell'angolo di fase produce un accorciamento di t ed un suo ritardo un allungamento (Aschoff, 1979; Pittendrigh e Daan, 1976a).

1.4 Ritmi ultradiani

I ritmi ultradiani vengono generalmente identificati come quei "ritmi biologici che si presentano con un periodo più breve rispetto al circadiano" (Halberg et al., 1965), la cui durata si esprime nel range che va da alcuni secondi o frazioni di secondo sino a circa 20 ore.

In confronto alla letteratura sull'organizzazione circadiana del comportamento, gli studi relativi ai pattern ultradiani sono relativamente pochi. Questo disinteresse per le ritmicità ultradiane è dovuto essenzialmente al fatto che la maggior parte delle specie sono attive solo in alcune specifiche ore del giorno e della notte, mostrando, in tal modo, un pattern di attività circadiano sovrainposto a quello ultradiano. Inoltre nella revisione della letteratura si deve considerare il fatto che i pattern di comportamento ultradiani sono stati frequentemente trascurati, o, più semplicemente, considerati errori dovuti ad una misurazione imperfetta, come ad esempio avvenne inizialmente per l'oscillazione di breve periodo osservata nell'LH (Gerkema et al., 1990).

Mentre i ritmi circadiani sono fondamentali per un buon adattamento degli organismi al ciclo

naturale luce-buio, i ritmi ultradiani promuovono l'organizzazione delle funzioni dei sistemi biologici in risposta a necessità primarie del corpo. Queste funzioni sono associate con attività quali "il lavorare", "il riposarsi", "il mangiare", coinvolte nell'autoconservazione dell'organismo e nella continuità della specie (Shannahoff-Khalsa, 1991).

E' infatti ormai noto che la periodicità ultradiana favorisce il coordinamento di processi fisiologici e l'ottimizzazione energetica (Aschoff e Gerkema, 1985), funzioni, queste, che si possono sintetizzare in due principi. In primo luogo i ritmi permettono una suddivisione in compartimenti temporali di componenti mutualmente incompatibili di un processo che avviene nello stesso spazio (ad es. le fasi conflittuali di respirazione, oppure i diversi passi nella reazione della glicolisi o della gluconeogenesi: Boiteux et al., 1980). Inoltre, l'alternanza temporale delle funzioni riflette la necessità della presenza di un principio economico all'interno dell'organismo, ovvero la necessità di non spendere continuamente energia, ma di evitarne il sovraccarico e la dissipazione, attraverso un meccanismo di alternanza di consumo e recupero dell'energia (Aschoff e Wever, 1962).

Non è chiaro se, nel corso dell'evoluzione, la comparsa dei ritmi ultradiani abbia preceduto quella dei circaritmi, tuttavia, da un punto di vista funzionale, sembra che i primi rivestano un ruolo di maggiore rilevanza per l'integrità dell'organismo. Infatti, nell'ontogenesi i ritmi ultradiani appaiono prima dei ritmi circadiani: nel neonato umano è stata riscontrata la presenza dei soli ritmi brevi (di breve periodicità) del ciclo sonno-veglia (Hellbrugge, 1974). Inoltre, numerosi esperimenti testimoniano la presenza di ritmi ultradiani di attività motoria nel feto umano: l'attività ultradiana inizia ad essere visibile già a partire da 20 settimane dal concepimento, e diventa sempre più chiara durante il terzo trimestre di gravidanza (Serman, 1988).

La rilevanza di questi ritmi è inoltre testimoniata dal fatto che la ritmicità ultradiana persiste, e può anche arrivare ad esprimersi più chiaramente dei circaritmi, in animali adulti che abbiano perduto la ritmicità circadiana, ad esempio dopo lesioni dei nuclei soprachiasmatici (Aschoff e Gerkema, 1988).

Nel regno vegetale, tra i ritmi più rapidi si possono citare quelli delle ciglia e dei flagelli o dei vacuoli pulsatili. Le piante hanno spesso dei movimenti oscillatori il cui periodo varia da un'ora a qualche ora: tali sono i movimenti di rivoluzione dei rami volubili, dei viticci, delle foglie (Baillaud, 1964).

I primi studi nel regno animale, furono condotti da Wada nel 1922. I suoi studi si basavano su ricerche sulla motilità gastrica in soggetti umani. L'autore riscontrò come, sia negli adulti che nei neonati, fosse manifesta una ritmicità ultradiana nella motilità gastrica, che nei primi assumeva un periodo di 90-100 minuti, mentre nei bambini avveniva con un periodo di circa 45 minuti.

Wada condusse, inoltre, ricerche sui ritmi della fame mettendoli in relazione a sogni, attività motoria e mentale, giungendo al sorprendente risultato che gli uomini sognano di più durante la fase di contrazione gastrica da fame, piuttosto che durante fasi di calma gastrica. L'autore ha inoltre osservato come, anche durante la veglia, l'attività motoria sia maggiore durante periodi di contrazioni gastriche rispetto a periodi di calma o alla fine del pranzo. Questi risultati portarono Wada a vedere il meccanismo della fame come uno dei più primitivi, e come l'aspetto centrale della regolazione fisiologica.

Nei piccoli mammiferi i pattern di attività spontanea sono caratterizzati non solo da ritmi circadiani, ma anche da fluttuazioni ultradiane che si presentano con un periodo compreso tra 1 e 4 ore (Ashoff, 1962). Mentre per quanto riguarda l'organizzazione circadiana del comportamento è stata ormai osservata la presenza di un pacemaker centrale, localizzato nel nucleo soprachiasmatico (SCN) dell'ipotalamo (Stephan e Zucker, 1972; Rusak, 1989), il meccanismo che sottende la ritmicità ultradiana del comportamento non è ancora stata identificata.

Come abbiamo osservato, i tratti comportamentali e fisiologici che mostrano un'organizzazione temporale circadiana condividono caratteristiche adattive e di predicibilità, essendo sintonizzati sullo stesso ciclo esterno, quale ad esempio l'alternanza di luce e buio. Al contrario, l'ampia varietà di pattern ultradiani rappresentano strutture temporali che promuovono differenti funzioni nell'organizzazione interna, e queste periodicità brevi sono presumibilmente generate da diversi meccanismi. E' stato infatti osservato che i ritmi ultradiani possono essere prodotti sia da sistemi di feedback omeostatici del comportamento, così come avviene, ad esempio, nella cura periodica del nido negli spinarelli (Nelson, 1965) sia da sistemi di pacemaker neuronali, come nel battito cardiaco.

I pattern di attività ultradiani particolarmente pronunciati riscontrati nelle arvicole (Madison, 1985) sono, essenzialmente, ritmi di assunzione di cibo e di digestione. La periodica alternanza di nutrizione e digiuno è stata inizialmente interpretata come il risultato di un cambiamento nei livelli di sazietà, regolato da un sistema a feedback gastrointestinale (Le Magnen, 1981). Questa ipotesi non sembrerebbe però essere del tutto valida: si è infatti osservato come nel *Microtus Arvalis* (il comune topo campagnolo) i ritmi ultradiani di nutrizione/digiuno continuino a manifestarsi anche in condizioni di deprivazione di cibo (Daan e Slopsema, 1978; Gerkema e Daan, 1985).

Una ipotesi alternativa consiste nel considerare la possibilità che i ritmi ultradiani comportamentali siano generati da pacemaker neuronali indipendenti dal comportamento da essi stessi generato. A sostegno di questa seconda ipotesi Gerkema (1990) ha osservato la perdita dei pattern ultradiani di attività nel *Microtus Arvalis*, in seguito a lesioni dell'area retrochiasmatica (RCA) e del nucleo arcuato (Arc). Partendo da questi risultati Gerkema ha ipotizzato che queste due aree possano essere

considerate come i due pacemaker strutturali delle ritmicità ultradiane comportamentali delle arvicole.

Per quanto riguarda i ratti, è stata lungamente osservata la presenza di componenti ultradiane di circa 2-3 ore nel comportamento di nutrizione, nell'attività locomotoria, nel sonno e nella temperatura corporea. Queste componenti si evidenziano in modo cospicuo in seguito alla scomparsa del ritmo circadiano sia mediante lesione degli SCN (Stephan e Zucker, 1972; Eastman et al., 1984; Groos, 1984), che in seguito ad isolamento neuronale degli SCN (Honma et al., 1984) che, infine, dopo una prolungata esposizione a condizioni di luce continua (Honma e Hiroshige, 1978). Questi risultati suggeriscono che anche nel ratto la manifestazione dei ritmi ultradiani sia indipendente dagli SCN, ma non è ancora chiaro se le strutture coinvolte nella manifestazione di questi ritmi siano le stesse di quelle che sono state trovate nelle arvicole.

E' stato infatti dimostrato che nel ratto l'Arc è coinvolto nella generazione di ritmicità ultradiane quali il rilascio di LHRH (Kawakami et al., 1982) e del GRF (Wehrenberg et al., 1982), ma non ci sono ancora prove a favore del fatto che quest'area possa essere coinvolta nella generazione dei ritmi ultradiani comportamentali.

Diversamente dai ritmi circadiani, quelli ultradiani sembrano "free-run" a frequenze diverse e, le conoscenze relative ai possibili zeitgeber sono tutt'oggi molto scarse, producendo difficoltà di analisi. Solo recentemente (Teicher et al., 1988) è stato osservato che nei ratti in fase di sviluppo, durante la quale le fluttuazioni ultradiane sono più evidenti rispetto allo stadio adulto, l'anfetamina accelera e attenua la ritmicità ultradiana. Questi risultati, riflettendo i cambiamenti temporali nel magazzino delle monoamine, sembrerebbero indicare un ruolo delle monoamine nella regolazione dell'attività ultradiana.

Un altro studio (Barber et al., 1989) ha confermato che nel ratto neonato la modulazione dei ritmi di attività sia influenzata da sostanze che attivano i sistemi monaminergici centrali, in particolare la norepinefrina.

1.5 Ontogenesi del ritmo ultradiano di attività motoria

Richter (1927), osservando l'ontogenesi dei ritmi spontanei di attività nei ratti di laboratorio, ha rilevato una notevole somiglianza tra questi ed i ritmi ultradiani del sonno, della motilità gastrica e del comportamento di alimentazione trovati negli umani. Più tardi, Teicher e Flaum (1979) hanno replicato il lavoro pionieristico di Richter, registrando, mediante un poligrafo, l'attività di ratti a diverse età (a 6, 9, 12, 15, 18 e 25 giorni di vita). I risultati hanno mostrato che all'età di 6 giorni i ratti spendono la maggior parte del tempo in attività il cui livello è uniforme, sebbene ci siano periodi occasionali di alta attività, in cui le componenti di attività (bout) sono brevi e non è possibile

rilevare alcun tipo di periodicità. Il profilo di attività a 9 giorni è transitorio: il numero dei bout aumenta, mostrando una periodicità di 1-2 ore, mentre l'intensità degli stessi è moderata. Il pattern osservato all'età di 12 giorni è più chiaro: le componenti di attività sono pronunciate e ritmiche. All'età di 15 giorni, i ratti mostrano dei ritmi ultradiani molto netti caratterizzati da ampi periodi di attività sostenuta separati da ampi periodi di inattività, che si presentano in modo ritmico. I profili ottenuti all'età di 18 e 25 giorni sono simili a quelli registrati a 15 giorni sebbene non si evidenzino in modo marcato né con periodi così ampi. Partendo da questi risultati, gli autori hanno condotto una successiva analisi, definendo i picchi positivi (attività) come quelli che contengono più del 2% dell'attività totale, e quelli negativi (attività parziale o inattività) come periodi che contengono meno dell'1% della quantità totale di attività. Lo sviluppo dei picchi positivi e negativi è stato poi eseguito considerando quattro parametri: numero, durata totale, durata media e intervallo tra i picchi. Per quanto riguarda i picchi positivi, si è evidenziato come il loro numero aumenti notevolmente da 1, all'età di sei giorni, a 8,5 all'età di 12 giorni; questo numero diminuisce all'età di 15-18 giorni ed aumenta di nuovo a 25 giorni. Questa funzione risulta dall'interazione tra i due fattori: l'incremento tra i 6 e i 12 giorni è dovuto allo sviluppo di un ritmo ultradiano di attività, mentre la diminuzione osservata tra i 15 e i 18 giorni è determinata dallo sviluppo di un pattern notturno che modula i ritmi ultradiani. Anche il tempo totale speso nell'attività varia in modo simile: i ratti di sei giorni spendono solo una piccola frazione del loro tempo nell'attività rispetto ai ratti di 9-12 giorni. Inoltre, sebbene i ratti di 15 giorni emettano un numero di picchi inferiore rispetto a quello emesso all'età di 9-12 giorni, il tempo speso nell'attività è maggiore rispetto a quello emesso in altri giorni. D'altra parte, i ratti di 18 giorni mostrano una diminuzione nella durata dei picchi rivelando che la loro riduzione non necessariamente determina un aumento della durata degli stessi. Globalmente, fatta eccezione per i picchi emessi all'età di 15 giorni, i picchi di attività sono piuttosto brevi, variabili tra i 10 e i 20 minuti. Mentre il numero e la durata dei picchi subiscono delle variazioni ontogenetiche, l'intervallo di tempo tra i picchi rimane costante tra i 9 e i 25 giorni di età. Esaminando i periodi di inattività relativa (picchi negativi) emergono dei risultati sorprendenti: i picchi negativi sembrano più stabili rispetto a quelli positivi e non sono modulati dal pattern notturno di attività. Inoltre, mentre l'analisi dei picchi positivi indica che i primi ritmi ultradiani emergono tra i 9 e i 12 giorni, l'analisi dei picchi negativi rivela una ritmicità sottostante a partire dall'età di 6 giorni. Inoltre sembra esservi una tendenza, non significativa, verso un aumento del numero dei picchi negativi con l'età.

L'aspetto più interessante emerso da questo lavoro è la riduzione del numero dei picchi ultradiani di attività tra il 15° e il 18° giorno, che potrebbe dipendere dallo sviluppo del ritmo circadiano, caratteristico della seconda settimana di vita. Durante lo sviluppo questo mascheramento diminuisce

e i ritmi ultradiani possono manifestarsi durante la fase di luce. In generale, i ritmi di attività ultradiana, del periodo di 1-2 ore, emergono in anticipo rispetto a quello circadiano e sono più evidenti durante il primo stadio di sviluppo. Questi diventano meno distinti durante la fase adulta, quando la componente circadiana diventa dominante, ma possono riemergere o durante l'invecchiamento, o in condizioni di luce continua oppure in alcune condizioni patologiche.

La relazione tra i due ritmi non è chiara; si ritiene che ci sia un'influenza reciproca anche se, come già detto, il ritmo circadiano sembra mascherare l'oscillazione ultradiana sottostante (Teicher et al., 1988).

CAPITOLO 2

Studi a carattere metodologico

2.1 Uso di un sistema radar a microonde in una ricerca di cronobiologia: un applicazione con *Periplaneta Americana*

[Behavior Research Methods, Instruments & Computers (2005), Vol. 37, N. 2, pp 523-528]

Introduzione

L'attività locomotoria è un parametro utile per monitorare le funzioni di un orologio biologico, studi che richiedono l'utilizzo di sistemi automatici di rilevamento.

Le strumentazioni per il monitoraggio e la registrazione automatica dell'attività locomotoria si è notevolmente evoluta, piccoli mammiferi ed insetti sono stati monitorati con: ultrasuoni (Hinano Akaka & Houck, 1980), sensori ad infrarosso (Clarke & Smith, 1985), stabilimetri (Zeier & Tschannen, 1968), tamburi rotanti (Roberts, 1956), condensatori a capacità (Schechter, Dutky, & Sullivan, 1963), rilevatori di suoni (Jones, 1964) e radar (Vanuytven, Vermeire, & Niemegeers, 1979; Martin & Unwin, 1980; Kropveld & Chamuleau, 1993). I sistemi basati sui radar hanno diversi vantaggi: 1) non sono intrusivi, 2) producono un output facilmente utilizzabile per le analisi computerizzate, 3) si adattano a differenti condizioni. Il sistema di rilevamento radar provvede automaticamente a rilevare l'attività locomotoria generale dell'animale nella sua gabbia di stabulazione e senza perturbarne il comportamento, come ad esempio l'aumento di attività dovuto al trasferimento dell'animale nella gabbia sperimentale.

Il primo utilizzo del radar per il monitoraggio dell'attività di insetti fu sviluppato da Buchan & Sattelle (1979). Il loro strumento si mostrò abbastanza sensibile per il monitoraggio del volo e dell'attività locomotoria di insetti, come mosche tsetse (Van der Goes van Naters & Den Otter, 1992), farfalle notturne (Den Otter, De Cristofaro, Voskamp, & Rotundo, 1996; Renou, Bertheir, Desbarats, Van der Pers, & Querrero, 1999), zanzare *Anopheles* (Van de Broek, Den Otter, & Van der Pers, 1999) e *Drosophila* (Knoppien, Van der Pers, & Van Delden, 2000). Questo lavoro descrive un sistema radar a microonda autocostruito per il monitoraggio dell'attività di insetti e piccoli mammiferi. L'attività locomotoria è un unità di misura definita arbitrariamente che dipende dalla risoluzione del sistema di detezione e dall'obbiettivo dell'esperimento. Se l'esperimento desidera definire solo i grossi movimenti del corpo come segnale mentre i movimenti dovuti alla cura come rumore, allora solo un sistema sofisticato e certamente costoso può essere utilizzato.

Il sistema di monitoraggio radar qui descritto, deriva dalla modifica del sistema sviluppato e validato dal nostro gruppo (Conte, D'Olimpio, & Renzi, 1995a; D'Olimpio, Conte, & Renzi, 1996, D'Olimpio & Renzi, 1997) per lo studio del comportamento dei topi. Il sistema consiste principalmente nella modifica di un radar commerciale per i sistemi di allarme domestici. I vantaggi del nostro sistema sono: 1) la semplicità con cui può essere adattato alle diverse condizioni sperimentali, 2) la sistemazione dell'apparato sulla gabbia di stabulazione dell'animale. Basse emissioni elettromagnetiche ad alta frequenza con potenza di circa 10 mW cm^{-2} non interferiscono con il comportamento dell'insetto; diversamente, la sensibilità sonora agli ultrasuoni e le manovre evasive in risposta agli impulsi di ultrasuoni sono altamente sviluppate in diverse specie dei 5 ordini di insetti (Hoy, 1992). Noi abbiamo modificato l'approccio originale per adattare il sistema radar all'utilizzo con piccoli animali per un esperimento di cronobiologia.

Gli organismi possono sincronizzare la loro attività con l'ambiente e con altri organismi per aumentare la fitness. Poiché i cambiamenti ambientali sono ciclici, anche molti comportamenti presentano ritmicità temporali, come l'alimentazione, l'accoppiamento, la locomozione ecc... Blatte adulte esprimono un robusto ritmo circadiano nell'attività locomotoria in condizioni di buio continuo. Il ritmo circadiano dell'attività locomotoria delle blatte adulte è controllato da un "orologio biologico" che si mostra temperatura-compensato. Il Q_{10} è il rapporto fra la lunghezza del periodo alla temperatura X e la lunghezza dello stesso alla temperatura X+10 gradi Centigradi. Una caratteristica fondamentale del ritmo circadiano è quella di essere compensato in temperatura con un $Q_{10} \sim 1$. Nel presente lavoro noi identificammo parametri affidabili del ritmo circadiano nelle blatte che confermano l'efficienza della nostra apparecchiatura radar.

Costruzione e calibrazione

L'attività locomotoria era registrata automaticamente dal radar a microonde (Mw-12, 9,9 Ghz, Lince Italia Srl) collegato ad un personal computer (IBM compatibile). La lunghezza dell'onda radar è di 3 cm, oggetti più piccoli della lunghezza d'onda possono essere rilevati solo dopo un accurata regolazione della sensibilità ed una corretta centratura del cono di emissione. Nella versione commerciale del radar da noi utilizzato, la sensibilità è controllata da una resistenza regolabile con un range di variazione di 22 Kohm, noi sostituimmo il trimmer con uno di 100 Kohm al fine di ottenere una scala di resistenza molto più ampia così da controllare maggiormente la sensibilità.

Il radar era connesso al computer tramite una scheda di input/output digitale (PIO-12, Keithley Instruments). Il segnale in ingresso alla scheda era derivato dalla connessione di un LED presente sul radar. La funzione del LED era quella di segnalare la detezione del movimento, è stato quindi sufficiente prelevare da quel punto il segnale elettrico (+5volt) necessario alla scheda di acquisizione. Un semplice programma scritto in linguaggio BASIC leggeva i canali della scheda di acquisizione. Parametri quali: frequenza di lettura del canale, intervallo di emissione record, lunghezza dell'esperimento, erano facilmente impostabili tramite il programma. Il numero di radar supportati dal sistema dipendeva solo dal numero di canali presenti sulla scheda di acquisizione. L'apparato necessitava di alcuni importanti controlli quali: a) interferenze fra i radar; b) l'utilizzo del medesimo valore di sensibilità fra i radar; c) che tutti i radar rilevassero la medesima quantità di movimenti; d) ed in fine che questi settaggi rimanessero costanti nel tempo. In fine noi schermammo i radar adiacenti e settammo il trimmer sul valore di 12 Kohm (a questo valore il radar rispondeva solo ai movimenti del corpo dell'animale e non ai movimenti di parti del corpo, quali antenne, zampe, ali).

Al fine di controllare il corretto funzionamento del sistema noi abbiamo utilizzato un oggetto con movimento regolare. E' stato utilizzato un piccolo motore elettrico sincrono che effettuava due rivoluzioni al minuto, sull'asse di rotazione era installato un braccio lungo quindici centimetri, il tutto posizionato a cinquanta centimetri dal radar. All'altra estremità del braccio vi era un foglio di alluminio di 2 x 2 centimetri. Tra il motore elettrico ed il radar vi era uno schermo di metallo che copriva la rotazione del braccio per 270°. Il radar era focheggiato sulla finestra di 90°. In tal modo il target era visibile al radar solo per un totale di 15 secondi ogni due rivoluzioni.

La corretta calibrazione della sensibilità dei radar avveniva in funzione del numero dei segnali contati dal software, rispettivamente per ogni radar. Durante il test, noi utilizzammo una frequenza di 1000 millisecondi, in tal modo il software poteva contare al massimo un segnale al secondo quindi circa quindici ogni minuto. Ogni minuto il totale delle acquisizioni era salvato sull'hard disk, la lunghezza della registrazione era di 540 minuti. Noi ci aspettavamo un conteggio di 8100 segnali (15 segnali al minuto per 540 minuti). Il risultato dei conteggi dei segnali acquisiti da ogni radar fu: radar1 = 6423 and radar2 = 5971, con un accuratezza di 79.2% e 73.7%. Per l'analisi statistica i dati sono stati sommati a 30 minuti, non sono state osservate differenze significative tra le due serie registrate rispettivamente con i due radar durante la fase di test: radar1 = 356.83 ± 88.58 (mean \pm SD) e radar2 = 331.72 ± 98.49 (mean \pm SD) ($t = 0.80$, $df = 34$, $p = 0.42$). Inoltre abbiamo eseguito una comparazione fra la prima metà e la seconda metà delle serie registrate dal radar, e non sono state viste differenze significative: radar1 1a = 359.11 ± 80.55 (mean \pm SD) e 1b = 354.55 ± 100.86 (mean \pm SD) ($t = 0.10$, $df = 16$, $p = 0.91$); radar2 1a = 342 ± 100.61 (mean \pm SD) e 1b = $321.44 \pm$

101.26 (mean \pm SD) ($t = 0.43$, $df = 16$, $p = 0.67$). In fine noi abbiamo controllato che i radar non emettessero falsi segnali in assenza di movimento.

Validazione dell'apparato

Materiali e metodi

Soggetti

Nove blatte maschio furono ottenute dall'allevamento dell'Istituto Superiore di Sanità, le blatte erano stabulate individualmente in box di plexiglass trasparente (15 X 15 X 10 cm) (Fig. 1). Abbiamo utilizzato solo soggetti maschi al fine di evitare che il ciclo ormonale delle femmine interferisse con l'attività locomotoria (Tsai & Lee, 2000). Gli insetti sono stati mantenuti in condizioni di buio costante (DD) e temperatura costante a 23°C con cibo ed acqua *ad libitum*.

Procedura

Prima di iniziare le registrazioni, tutti gli insetti rimanevano per oltre 30 giorni in fotoperiodo DD e temperature di 18°C. Dopo questo periodo di abituação noi abbiamo registrato l'attività locomotoria per 7 giorni a 18°C. Successivamente elevammo la temperatura a 28°C e dopo un nuovo periodo di abituação di 20 giorni, noi registrammo l'attività locomotoria per altri 7 giorni.

Analisi dei dati

Per tutte le serie temporali vennero eseguiti i seguenti calcoli: media mobile su tre punti, rimozione del trend lineare e standardizzazione. Vennero eseguite due differenti analisi: 1) per ogni soggetto venne eseguita l'analisi spettrale per mezzo della trasformata discreta di Fourier (DFT). Venne eseguito il test di Kolmogorov–Smirnov al fine di verificare l'ipotesi che lo spettro fosse originato da un processo casuale. Negli spettri dove vi era una differenza significativa vennero considerati significativi tutti i picchi che mostravano una potenza spettrale superiore a 2.81 deviazioni standard (Conte, Ferlazzo, & Renzi, 1995b). 2) Per stimare l'esatta lunghezza dei periodi circadiani e ultradiani osservati nell'analisi spettrale noi utilizzammo il periodogramma del Chi quadro di Sokolove & Bushell (1978) e calcolammo il periodo circadiano in un range compreso tra 22 e 26 ore e tra 1 e 8 ore per gli ultradiani con un livello di significatività di 0.05.

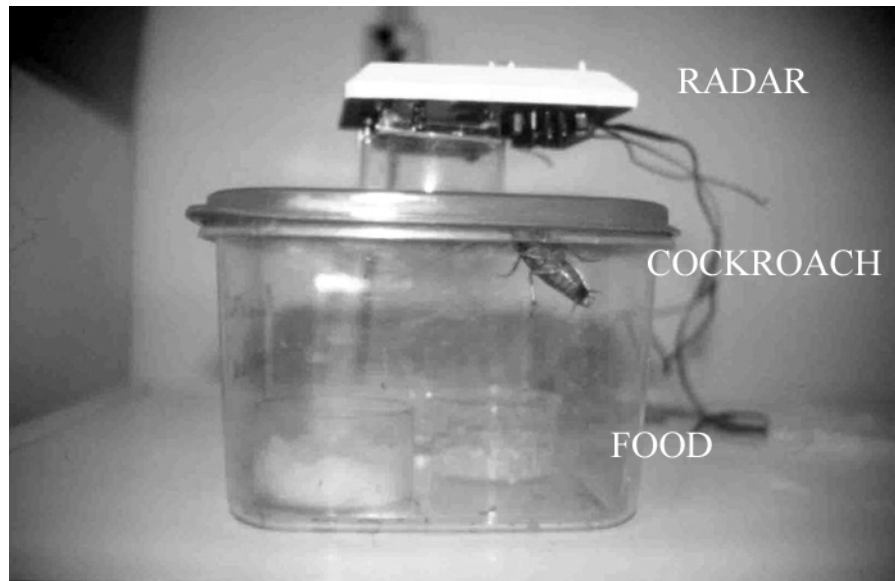


Fig. 1 Experimental cage with radar above.

Risultati

Il sistema radar riuscì a registrare i movimenti di nove blatte lunghe circa 4 centimetri e stabulate singolarmente nelle gabbie. Le misurazioni effettuate su periodo di sette giorni permisero di individuare chiaramente i ritmi ultradiani e circadiani al pari di registrazioni più lunghe (15 giorni, non mostrati). L'analisi spettrale e l'analisi del periodogramma calcolate per ogni singola blatta rivelarono ritmi significativi sia circadiani che ultradiani nell'attività locomotoria in free running (DD).

L'analisi del periodogramma mostrò un ritmo circadiano con un periodo medio in free running (τ) a 18°C di 23.7 ± 0.53 h (mean \pm SE) (Tab.1). Contemporaneamente noi calcolammo il valore Q_{10} ($Q_{10} = \tau_{18^\circ\text{C}} / \tau_{28^\circ\text{C}}$), la media era 0.94 ± 0.02 (mean \pm SE)(Fig.2). I dati sulla ritmicità circadiana furono altresì confermati dalla DFT, la quale rivelò la presenza di picchi circadiani significativi in tutti gli insetti. Inoltre la potenza spettrale circadiana si rivelò più bassa a nella condizione a 28°C piuttosto che a 18°C (Fig. 3).

Oltre al ritmo circadiano, in ogni blatta vi erano ritmi ultradiani nell'attività locomotoria, ritmi che riuscimmo ad evidenziare per mezzo dell'analisi spettrale. DFT mostrò che in tutti gli insetti vi erano picchi significativi in un range tra 1 e 8 ore. Al fine di valutare la reale esistenza e ricorrenza di questi ritmi nei nostri dati noi eseguiamo l'analisi spettrale sia sulla prima che sulla seconda metà dei dati, trovando nuovamente gli stessi ritmi (Fig. 4).

Noi osservammo picchi con alta potenza spettrale tra 100 e 200 minuti, a circa 5 ore e a circa 8 ore. Questi periodi furono trovati sia a 18°C che a 28°C. Una comparazione tra gli spettri ad entrambe le temperature non rivelò differenze significative (Fig. 3). Generalmente la potenza spettrale nel range 1-8 h era superiore nella condizione a 28°C.

I dati rivelano la presenza di periodi temperature-compensati. Tutte le blatte mostrarono un $Q_{10} \sim 1$ per il ritmo circadiano. Nella banda ultradiana molti animali mostrarono periodi temperatura-compensati: circa 80% delle blatte a 8 ore e 5 ore, mentre solo una piccola percentuale sotto le 5 ore (Fig. 2).

Table 1
Circadian free-running period (τ) in continuous darkness and Q_{10}

cockroach	18°C	28°C	Q10
# 1	23.8	24.4	0.98
# 2	23.6	25.8	0.91
# 3	20.0	25.4	0.79
# 4	25.6	23.8	1.08
# 5	23.8	25.6	0.93
# 6	23.2	26.0	0.80
# 7	24.4	25.0	0.98
# 8	25.2	25.8	0.98
# 9	23.4	26.0	0.90

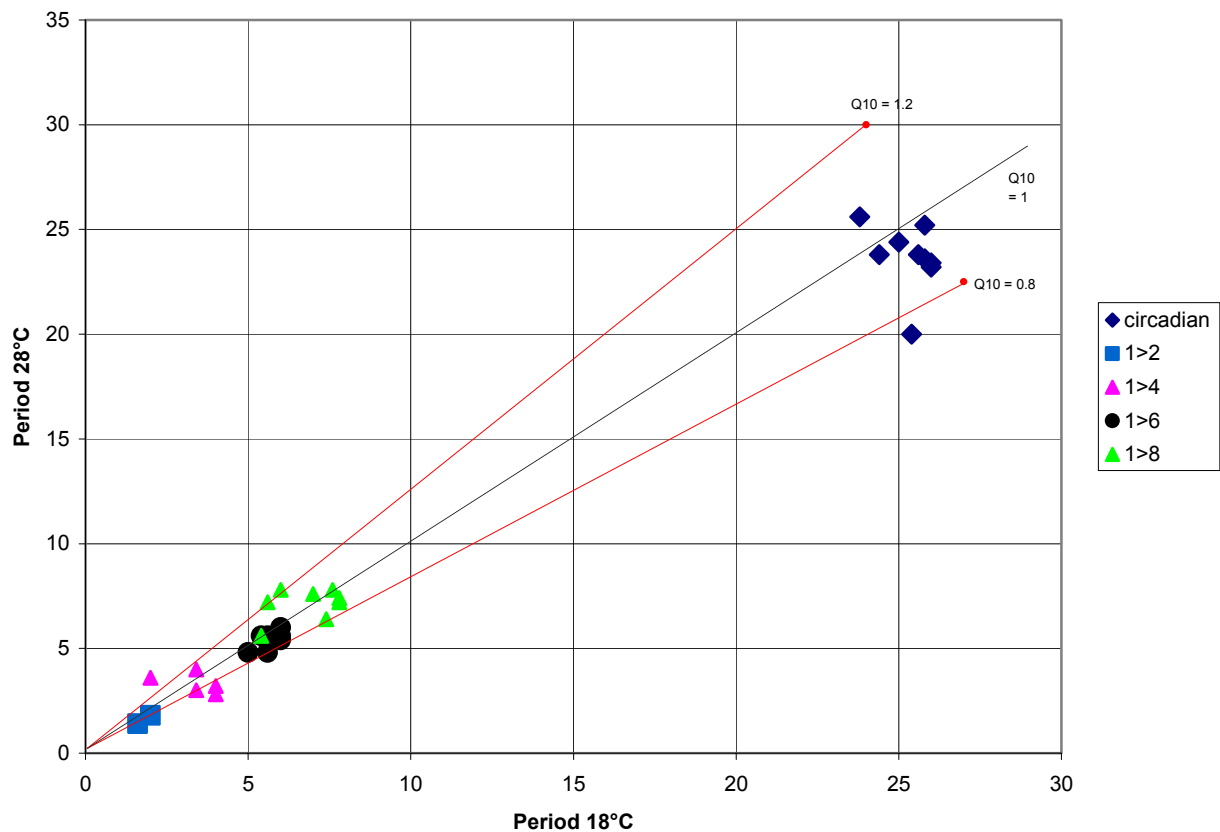


Fig. 2 Bands of frequencies that are temperature-compensated. Every point represents a cockroach: all animals show a compensation in temperature of the circadian rhythm. In the ultradian bands few cockroaches are under 5 hr and a great number above 5 hr. Center line represent $Q_{10}=1$, up and lower line limits of significativity.

Discussione

In questo studio abbiamo descritto un attometro radar con il quale è possibile registrare l'attività locomotoria di singoli insetti. Noi usammo questo strumento per misurare la ritmicità circadiana ed ultradiana nell'attività locomotoria di blatte. Comparato ad altri strumenti simili il nostro sistema presenta: un minor costo, la possibilità di modificare la sensibilità in funzione delle dimensioni dell'animale, la possibilità di registrare l'attività locomotoria generale di un animale nella sua gabbia di stabulazione.

I nostri risultati sulla ritmicità circadiana sono in accordo con altri nostri dati: noi trovammo un periodo di 24.5 in DD a 22°C (Renzi & Pasquali, 2000). Tutti questi dati sono in accordo con i dati presenti in letteratura (Saunders, 1976). Anche il Q_{10} mostrò un valore di ~ 1 , questo è coerente con una delle 5 "regole di Pittendrigh" (Pittendrigh, 1966) per dimostrare che un ritmo è generato da un

orologio biologico endogeno: "... Q_{10} between 0.8 and 1.2 ...is an absolute functional prerequisite for a clock mechanism" (Saunders, 1976, p. 3).

Inoltre noi comparammo questi dati con altri dati più vecchi ottenuti monitorando le blatte con un sistema ad infrarossi (Pasquali, 2001). La comparazione visiva degli attogrammi non mostra differenze macroscopiche (Fig. 5). La comparazione tra il periodo circadiano in free running rilevato con un sistema ad infrarosso fu di 24.5 ± 0.50 h (mean \pm SE) mentre con un radar fu di 23.7 ± 0.53 h (mean \pm SE), le misurazioni non sono statisticamente differenti ($t = -0.95$, $df = 11$, $p = 0.36$). Entrambi i sistemi si mostrarono efficaci ma il radar mostrò una sensibilità maggiore.

Questo sistema e questo tipo di lavorazione dei dati anche per mezzo dell'analisi spettrale a permesso di rivelare la presenza di ritmicità ultradiane. L'analisi spettrale evidenziò picchi significativi nella banda 1 – 8 ore con un ricorrente periodo a 200 minuti. Un periodo simile è stato osservato anche in altri studi sulla ritmicità ultradiana.

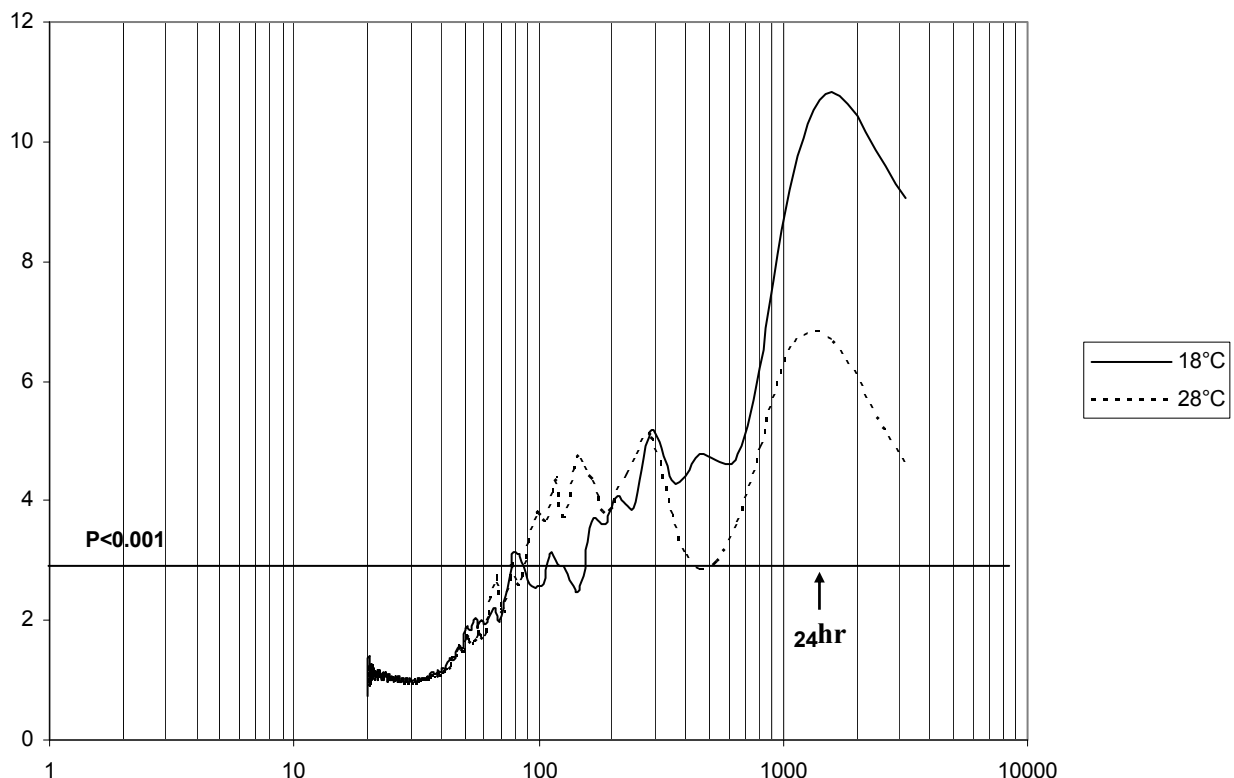


Fig. 3 Mean power spectra at 18°C and 28°C in continuous darkness. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

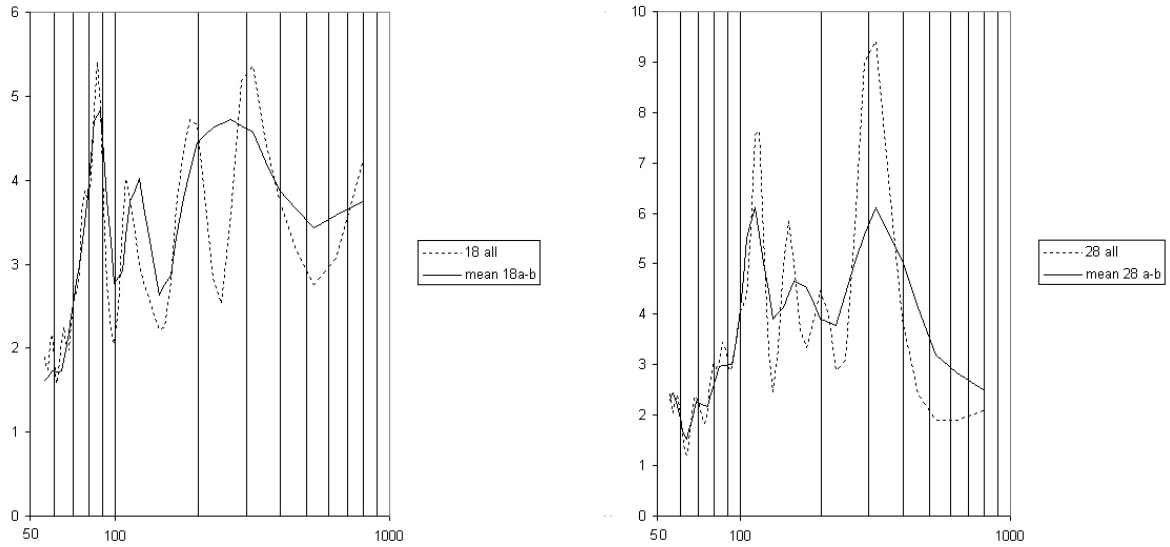


Fig. 4. Comparison between the spectral analysis of all recording and the mean of the spectral analysis of the 1st half and 2nd half of the same recording (cockroach #1).

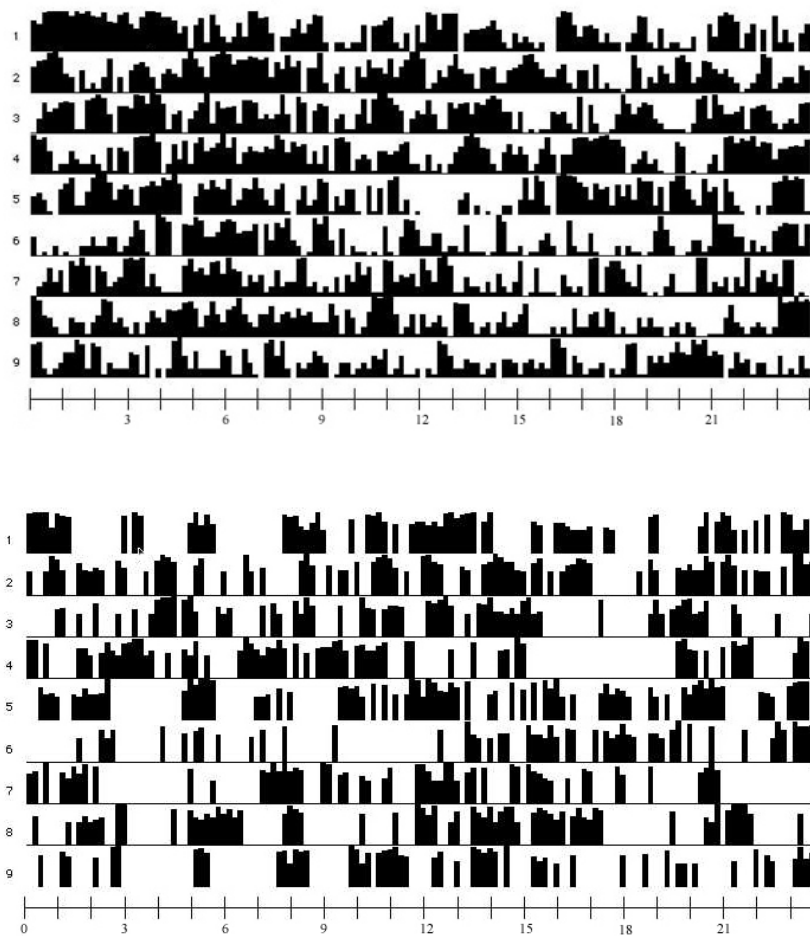


Fig. 5 Activity records, in two different experiments, with radar (top) and infra-red beam (bottom). The actograms below show the locomotor activity of two cockroaches with 10 mins intervals.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato in parte dell'Istituto Superiore di Sanità ed in parte dell'Università di Roma "La Sapienza". Desideriamo ringraziare il Dr. Michele Nino Maroli per il supporto alla ricerca; il Prof. Fabio Ferlazzo e la Prof.ssa Francesca D'Olimpio per i suggerimenti al testo ed alla revisione; il Sig. Pietro Fermani per le modifiche al circuito elettronico. Infine desideriamo ringraziare Benjamin Kenward e Matteo Ippoliti per la revisione inglese.

Note

Il software utilizzato e la nuova versione create, sono disponibili freeware, richiederli a: vittorio.pasquali@uniroma1.it

Bibliografia

- Buchan, P.B. & Sattelle, D.B. (1979). A radar-Doppler autocorrelation analysis of insect activity. *Physiological Entomology*, 4, 103-109.
- Clarke, R.L. & Smith, R.F. (1985). An infrared device for detecting locomotor activity. *Behavior Research Methods Instruments & Computers*, 17, 519-525.
- Conte, S., D'Olimpio, F. & Renzi, P. (1995a). Uno strumento per la registrazione dell'attività motoria [An instrument for the recording of motor activity]. *Rivista di Psicologia*, LXXX (1), 69-69.
- Conte, S., Ferlazzo, F. & Renzi, P. (1995b). Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biological Psychology*, 39, 159-172.
- Den Otter, C.J., De Cristofaro, A., Voskamp, K.E. & Rotundo, G. (1996). Electrophysiological and behavioural responses of chestnut moths, *Cydia fagiglandana* and *C. splendana* (Lep., Tortricidae), to sex attractants and odours of host plants. *Journal of Applied Entomology*, 120, 413-421.
- D'Olimpio, F., Conte, S. & Renzi, P. (1996). Ritmi ultradiani di attività motoria in topi tenuti in condizioni di luce alternata e luce costante [Ultradian Rhythms of motor activity in mice kept in conditions of alternate light and constant light]. *Proceedings of the Italian Association of Psychology (Experimental Chapter) National Conference*. Capri, September 30th – October 2nd, 128-129.

- D'Olimpio, F. & Renzi, P. (1997). Effetti dell'attività sui ritmi biologici dei roditori [Effects of the activity on the biological rhythms of the rodents]. *Proceedings of the Italian Association of Psychology (Experimental Chapter) National Conference*. Capri, September 22nd – 24th, 129-130.
- Hinano Akaka, W. & Houck, B.A. (1980). The use of an ultrasonic monitor for recording locomotor activity. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 12, 514-516.
- Hoy, R.R. (1992). The evolution of hearing in insects as an adaptation to predation from bats. In: *The Evolutionary Biology of Hearing* (Webster, D.B., Fay, R.R. & Popper, A.N., eds). Springer-Verlag, New York, pp. 115-129.
- Knoppien, P., Van der Pers, J.N.C., & Van Delden, W. (2000). Quantification of locomotion and the effect of food deprivation on locomotor activity in *Drosophila*. *Journal of Insect Behavior*, 13, 27-43.
- Kropveld, D., & Chamuleau, R. (1993). Doppler radar device as a useful tool to quantify the liveliness of the experimental animal. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 31, 340-342.
- Jones, M.D.R. (1964). The automatic recording of mosquito activity. *Journal of Insect Physiology*, 10, 343-351.
- Martin, P.H. & Unwin, D.M. (1980). A microwave doppler radar activity monitor. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 12, 517-520.
- Pasquali, V. (2001). *Evidenze sperimentali circa la presenza di ritmicità ultradiana nell'attività locomotoria di insetti* [Experimental evidences about the presence of ultradian rhythmicity in the locomotor activity of insects]. Unpublished master's thesis, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma, Italia.
- Pasquali, V. & Renzi, P. (2002). Study on endogenous rhythmicity and social rhythmicity of activity in *Formica lugubris*. *Insect Social Life*, 4, 27-32.
- Pasquali, V., Carola, V., Migliore, M., Kovacev, I. & Renzi, P. (2003). Ritmi circadiani ed ultradiani di attività locomotoria in ceppi inbred di topo [Circadian and ultradian rhythms of locomotor activity in inbred mice]. *Proceedings of the Italian Society of Neuroscience National Conference*. Pisa, September 26th – 28th, 32.
- Pittendrigh, C. S. (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 54, 257-307.
- Renzi P. & Pasquali V. (2000). Presenza di ritmi ultradiani nell'attività locomotoria in *Formica pratensis* e *Periplaneta americana* [Presence of ultradian rhythms in the locomotor activity in

Formica pratensis and *Periplaneta americana*]. *Proceedings of the Italian Society of Ethology National Conference*. San Giuliano Terme, October 4th – 6th, 73.

- Renou, R., Bertheir, A., Desbarats, L., Van der Pers, J. & Querrero, A. (1999) Actographic analysis of the effects of an esterase inhibitor on male moth responses to sex pheromone. *Chemical Senses*, 24, 423-428.
- Roberts, S.K. de F. (1956) "Clock" controlled activity rhythms in the fruit fly. *Science*, 124, 172
- Saunders, D.S. (1976). *Insect clocks*. Pergamon Press. Oxford.
- Schechter, M.S., Dutky, S.R. & Sullivan, W.N. (1963). Recording circadian rhythms of the cockroach with a capacity-sensing device. *Journal of Economic Entomology*, 56, 76-79.
- Sokolove, P.G. & Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, 72, 131-160.
- Tsai, C. & Lee, H. (2000). Circadian locomotor rhythm masked by the female reproduction cycle in cockroaches. *Physiological Entomology*, 25, 63-73.
- Van der Broek, I.V.F., Den Otter, C.J., & Van der Pers, J.N.C. (1999). Actometers for evaluating mosquito activity: daily activity and stimulus-induced activation. *Proceeding of Experimental & Applied Entomology*, N.E.V. Amsterdam 10, 85-90.
- Van der Goes van Naters, W.N. & Den Otter, C.J. (1992). Olfactory sensitivity of tsetse flies: a daily rhythms. *Chemical Senses*, 23, 351-357.
- Vanuytven, M., Vermeire, J. & Niemegeers, C.J.E. (1979). A new motility meter based on the Doppler principle. *Psychopharmacology*, 64, 333-336.
- Zeier, H. & Tschannen, G. (1968). A new device for measuring general locomotor activity in instrumental conditioning situation. *Journal of Experimental Analysis Behavior*, 11, 63-64.

2.2 Validazione di un nuovo sistema per il monitoraggio dei ritmi di attività nei topi

[Journal of Circadian Rhythms (submitted)]

Introduzione

L'attività motoria generale o spontanea negli animali è un parametro utile in cronobiologia. Questo tipo di ricerche richiede generalmente una gran quantità di dati con monitoraggi di decine di giorni, quindi il necessario utilizzo di sistemi automatizzati.

In letteratura si possono trovare diversi esempi di sistemi automatici per misurare l'attività locomotoria dei roditori: ruote di attività (Roberts 1956), condensatori a capacità (Tarpy & Murcek 1984), sistemi ad effetto Doppler (Rose et al.1985), stabilimetri (Parreño et al. 1985), rilevatori ad ultrasuoni (Young et al.1996), touchplate (Clarke et al.1992; Moraes et al.1997), infrarossi (Clarke et al.1988), sistemi di video-tracking (Noldus et.al 2001), sistemi di telemetria (Toth, 1999), solo per citare i più comuni. Ad una valutazione critica dei sistemi di monitoraggio, risulta necessario che gli stessi rispondano ad una serie di criteri: 1) il comportamento che viene registrato deve essere definito chiaramente; 2) l'attività dell'animale non deve essere vincolata dalla struttura dell'apparato stesso; 3) la sensibilità dell'apparato deve essere omogenea nello spazio; 4) la tecnica di registrazione non deve essere intrusiva; 5)il monitoraggio deve essere continuo e automatico; 6) l'output deve essere ininterrotto e facile da analizzare, preferibilmente per mezzo di un computer; 7) l'apparato deve avere un semplice metodo di calibrazione, questo consente che la sensibilità dell'apparato sia replicabile evitando anche variazioni con il trascorrere del tempo; 8) l'apparato dovrebbe essere validato confrontando il suo output con la registrazione dell'attività ottenuta in un altro modo, preferibilmente attraverso la registrazione manuale delle osservazioni.

I sistemi di monitoraggio basati su sistemi radar si sono già dimostrati efficaci nell'ambito dello studio del comportamento, sia su animali di piccolissime dimensioni come gli insetti (Pasquali e Renzi 2005) che su animali di sezione maggiore come piccoli mammiferi (Vanuytven, 1979). I sistemi radar infatti presentano diversi vantaggi (per la cui trattazione rimandiamo al lavoro di Pasquali e Renzi 2005) primo fra tutti la possibilità di monitorare l'animale nella sua cella di stabulazione. Una variabile che in studi di tipo farmacologico o sui fattori di stress si mostra essere molto importante.

Scopo di questo lavoro è validare un apparato per il monitoraggio e la registrazione dell'attività locomotoria di topi. L'apparato è stato sviluppato sulla base di un sistema elettronico di rilevamento messo a punto e validato dal nostro gruppo (Conte, D'Olimpio, & Renzi, 1995), ma al contempo lo si è sottoposto ad una nuova serie di prove più rigorose.

L'apparato denominato VIVARD-12 permette di monitorare l'attività motoria generale di 12 topi stabulati singolarmente in gabbie standard di allevamento.

Sistema elettronico per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'attività locomotoria dell'animale veniva rilevata automaticamente per mezzo di radar a microonde basato sull'effetto Doppler. I radar a microonde operano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl), con una lunghezza d'onda di circa 3 cm. La sensibilità è normalmente controllata da un trimmer con un ristretto range di regolazione (22 Kohm). Noi abbiamo sostituito il componente utilizzando un trimmer da 100 Kohm al fine di ottenere una scala di regolazione più fine e un maggior controllo della sensibilità del circuito. Le emissioni elettromagnetiche ad alta frequenza prodotte dal radar avevano una potenza di circa 10 mW cm^{-2} , emissioni che non interferiscono con il comportamento dell'animale. I radar erano collegati al computer per mezzo di una scheda di I/O digitale (PIO-12, Keithley Instruments). I segnali in ingresso alla scheda venivano derivati dal punto di connessione di un LED che segnala la rilevazione del movimento con un impulso di +5V CC. Un semplice programma, scritto in linguaggio C, legge in continuazione i canali della scheda di I/O. Tutti i parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti), ecc..., sono facilmente impostabili per mezzo del programma. Il numero di radar supportato dal computer è strettamente dipendente dal numero di canali della scheda I/O. Sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) impostazione dello stesso valore di sensibilità (76 Kohm, con questo valore il radar rispondeva unicamente al movimento del corpo e non di parti di esso), c) misurazione della stessa quantità di movimenti, d) mantenimento della stabilità delle regolazioni nel tempo, e) assenza di emissioni di segnale in mancanza di movimento. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato.

Struttura dell'apparato

L'apparato è stato progettato per il monitoraggio e la registrazione simultanea di 12 animali stabulati singolarmente. Ogni radar era posizionato sul fondo di una struttura di alluminio (17 x 36 x 40 cm) che aveva la funzione di sorreggere la gabbia dell'animale, schermare il radar dalle eventuali interferenze dei radar vicini, garantire un perfetto allineamento della gabbia rispetto all'area di copertura dell'radar (fig. 1). Questa ultima funzione era garantita da alcuni elementi in legno montati sulla struttura di alluminio. Gli elementi erano posizionati su una scaffalatura con piani di appoggio metallici al fine di isolare ulteriormente i radar posti ai vari livelli (fig. 2).



Figura 1 Alloggiamento del radar sul fondo dell'elemento



Figura 2. L'apparato nel suo completo. Sotto, un piano con 3 elementi ed una gabbia posizionata sull'elemento.

I radars erano collegati alla scheda di acquisizione dati installata sul computer tramite un cavo elettrico multipolare (singolo filo \varnothing 1 mm) intrecciato al fine di migliorare la reiezione ai campi elettromagnetici

Al fine di valutare l'apparato sono stati eseguiti diversi test, sia con oggetti meccanici dal movimento standardizzato che dei test comportamentali con animali.

TEST 1

La metodologia messa a punto per il primo test mirava alla verifica circa la capacità del sistema di rilevamento e delle successive analisi, di rilevare l'esatta frequenza di movimento di un oggetto dal movimento standardizzato. A tal fine si è utilizzata la lancetta dei secondi di un orologio la cui frequenza è di 1 minuto.

Materiali

Sul vertice della struttura, dove solitamente viene alloggiata la gabbia dell'animale, era stato posizionato un orologio da parete a lancette (marca Wellgain), sulla lancetta dei secondi era stato fissato un riflettore radar consistente in un pezzo di alluminio (3 x 6 cm). Anteriormente all'area di rotazione delle lancette era stato fissato uno schermo di alluminio che presentava una finestra di $\frac{1}{4}$ di giro (fig. 3). La finestra fu posizionata esattamente sulla perpendicolare del cono di rilevamento del radar, in tal modo la lancetta dei secondi risultava visibile, quindi in movimento, soltanto 15 secondi ogni minuto. In tal modo si ottenne un oggetto con frequenza di movimento di un minuto.

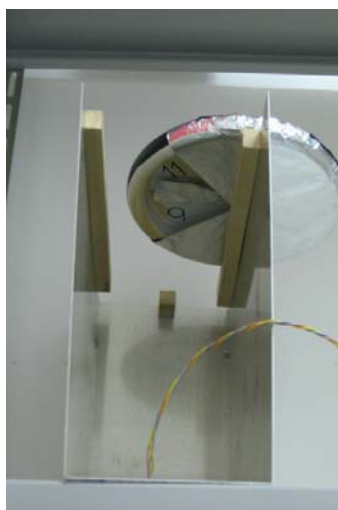


Figura 3. Posizione dell'orologio e finestra di acquisizione

Procedura

Furono eseguite 12 registrazioni, una per ogni radar, della durata di 24 ore. Fu impostato un tempo di acquisizione di 3 secondi con un delay di 500 msec. Per ogni serie temporale si procedette all'accumulo dei dati in bin da 30 secondi, successivamente venne applicata l'analisi di Fourier al fine di individuare la ritmicità presente nella registrazione

Risultati e discussione

In tutti gli spettri era visibile un picco corrispondente alla frequenza di 1 minuto (grafico 1). La potenza del ritmo risultava frequentemente diversa e negli spettri erano osservabili anche altre ritmicità. Ciò poteva essere implicato al sistema di rilevamento, con un conseguente significato di perdita di stabilità nelle misurazioni degli apparati di rilevamento. Oppure probabilmente era da implicarsi agli ingranaggi dell'orologio che non essendo di precisione potevano avere differenti attriti ed imprecisioni durante le rotazioni. Fu quindi approntato un secondo test al fine di verificare la stabilità nel tempo della sensibilità dei radar

Esempio relativo al radar3

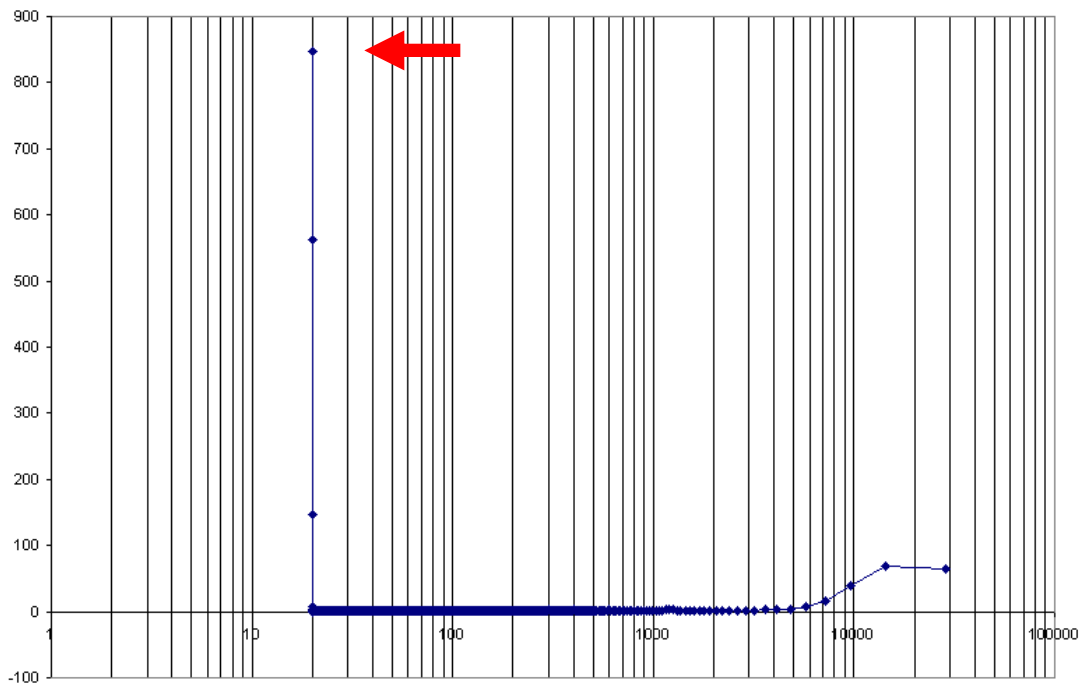


Grafico 1. Il picco a 20 bin corrisponde al 60 secondi (1 bin = 1 sec)

TEST 2

Una caratteristica fondamentale che un sistema di monitoraggio deve possedere, è rappresentata dalla stabilità nel tempo, cioè le misurazioni devono mantenersi costanti. La taratura dell'apparato non deve modificarsi con il passare del tempo e l'utilizzo. È stato quindi sviluppato un test per verificare questa condizione ma anche per verificare le ritmicità spurie osservate nel test n.1.

Materiali

Per il secondo test si è utilizzato un metronome (mark Wittner) posizionata sul vertice dell'apparato. Sull'apice del pendolo venne incollato un riflettore radar consistente in un pezzo di alluminio di (3 x 2,5 cm). L'oscillazione minima espressa dal metronomo era di 1 al secondo, quindi 60 oscillazioni al minuto. L'intero metronomo è stato posto in un contenitore di cartone completamente chiuso, tranne che per un foro quadrato (3,5 x 3,5 cm) (fig. 4). Il foro era rivolto verso il radar e attraverso di esso era visibile il passaggio periodico del foglio di alluminio.



Figura 4. Schermatura del metronomo, posizione dell'apparato e finestra di acquisizione

Procedura

Furono effettuate registrazioni della durata di 90 minuti su 6 dei 12 radar. Fu impostato un tempo di acquisizione di 30 secondi con un delay di 500 msec. Per valutare la costanza nel tempo nelle rilevazioni di ogni singolo radar, si è scelto di considerare le registrazioni come costituite da tre parti di trenta minuti. Su i dati è stata effettuata un'analisi della varianza considerando le tre parti in cui sono state divise le registrazioni come le tre condizioni sperimentali, e le registrazioni di trenta secondi, come i singoli casi.

Risultati e discussione

In nessun caso furono osservate differenze statisticamente significative nel numero di movimenti contati. Ciò evidenziò che la sensibilità di ogni radar durante i 90 minuti si era mantenuta uniforme. (Tab. 1)

Tabella 1. Medie delle 3 parti di registrazione e risultato statistico

RADAR 2		RADAR 5	
17.02		12.80	
16.85	F (2,177) = 0.27, p < 0.7671	13.27	F (2,177) = 0.95, p < 0.3878
16.83		12.78	
RADAR 12		RADAR 9	
18.53		16.27	
18.93	F (2,177) = 0.44, p < 0.6416	16.13	F (2,177) = 0.83, p < 0.4382
18.78		15.80	
RADAR 10		RADAR 11	
15.07		15.22	
15.18	F (2,177) = 2.5, p < 0.0851	15.55	F (2,177) = 0.83, p < 0.4359
14.67		15.48	

TEST 3

Successivamente ai test con oggetti dal movimento standardizzato, abbiamo eseguito dei test comportamentali con animali. Lo scopo di questo test era verificare ciò che i radar rilevano effettivamente circa il movimento dell'animale, e valutare la sensibilità del radar alle rispettive classi di movimento.

Materiali

Due topi maschi appartenenti al ceppo C57BL/6 (Charles Rivers Laboratory; Calco, Como, Italia) furono stabulati singolarmente in gabbie di pexiglass di 369 x 156 x 132(h) mm; in condizioni di luce:buio 12:12, temperatura costante 21°C ed acqua e cibo *ad libitum*.

Ogni animale fu video-registrato per mezzo di una videocamera Sony Handycam posta a 30 cm sopra la gabbia (fig. 5). Inoltre venne derivato un led dal radar e posto nella visuale della videocamera ma non del topo. Il led serviva ad evidenziare quando il radar rilevava il movimento.



Figura 5. Video-registrazione dell'animale

Procedure

Ogni animale fu video-registrato per 8 ore. L'analisi del video venne eseguito analizzando l'attività del topo 1 minuto ogni 10 minuti per un totale di 48 minuti. Vennero stabilite delle categorie comportamentali in base alle quali si verificò se in corrispondenza di esse il radar le rilevava o no. Le categorie considerate erano:

- locomozione (marcia, corsa, balzo);
- arrampicata (appendersi e arrampicarsi sulle barre della griglia, con due o quattro zampe);
- scavare (la segatura è spostata in avanti o indietro con la testa o con le zampe anteriori);
- bere/mangiare/mordere griglia (l'animale sta in piedi e lecca la bottiglia, mastica il cibo, morde le barre);
- grooming (strofinare, pulire, leccare il muso, la pelliccia, le orecchie, la coda, i genitali);
- alzarsi su due zampe/abbassarsi su quattro zampe ;
- girarsi (ruotare la parte anteriore del corpo, rimanendo fermo sulle due zampe posteriori);
- movimenti ampi della testa;
- distendersi;
- grattarsi la pelliccia con le zampe posteriori.

Le registrazioni vennero esaminate da due osservatori in modo indipendente.

Risultati e discussione

Dall'osservazione della videoregistrazioni relative all'attività degli animali e della contemporanea eventuale accensione del led, è stato riscontrato che i radar sono molto sensibili ad attività che

riguardano uno spostamento di tutto il corpo dell'animale (tab. 2). I radar hanno rilevato in una percentuale minore di casi le altre categorie comportamentali.

Tabella 2. Concordanza fra categoria comportamentale rilevata dall'osservatore e rilevamento radar

	OSS. 1 radar7	OSS. 2 radar7	OSS. 1 radar6	MEDIE
LOCOMOZIONE	100%	99%	99%	99.3 %
ARRAMPICATA	100%	93%		96.5 %
DISTENDERSI	100%	100%	100%	100.0 %
SCAVARE	100%	85%	59%	81.3 %
ALZARSI/ABBASSARSI	100%	91%	86%	92.3 %
TORSIONE	98%	78%	87%	87.7 %
MORDERE GRIGLIA	0%	0%		0 %
BERE/MASTICARE	0%	0%	0%	0 %
GROOMING	13%	46%	7%	22.0 %
GRATTARSI	37%	50%	25%	37.3 %
MUOVERE TESTA	54%	63%	44%	53.7 %

TEST 4

Nel quarto ed ultimo test si è registrata ed analizzata l'attività locomotoria di topi i cui parametri comportamentali relativi all'attività locomotoria sono ben conosciuti, in particolare: quantità di attività, lunghezza del periodo circadiano, ampiezza del periodo circadiano.

Materiali

Abbiamo utilizzato 10 topi maschi di 8 settimane appartenenti al ceppo BALB/c Charles Rivers Laboratory (Calco, Como, Italia). I topi erano stabulati individualmente con cibo ed acqua ad libitum. Gli animali erano in condizioni di fotoperiodo luce:buio 12:12 (luce accesa 8-20), temperatura di 21 ± 1 °C ed umidità al 55 ± 5 %.

Procedura

I topi venivano stabulati individualmente in gabbie di in pexiglass di 369 x 156 x 132(h) mm, e dopo tre giorni di abitazione venivano avviate le registrazioni. Gli animali vennero registrati per 28 giorni, la prima settimana in LD 12:12 successivamente tre settimane in DD. Per le analisi

comportamentali sono stati considerati solo i 7 gg in LD 12:12 e gli ultimi 7 gg in DD (le due settimane centrali erano considerate abitazione quindi escluse). Le registrazioni venivano effettuate in una stanza insonorizzata e climatizzata.

Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state detrendizzate e trattate con un procedimento di media mobile a tre punti. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi di Fourier sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2.88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.001$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

I risultati relativi al numero di movimenti e lunghezza e potenza spettrale del periodo circadiano sono stati analizzati mediante ANOVA.

Risultati e discussione

Noi determinammo il livello di attività di ogni animale, in termini di numero di segnali contati dal software. I topi mostrarono una significativa differenza nella lunghezza del periodo in LD e DD (23.98 hr - 23.04 hr) [$F = 17.33$, $df = 18$, $p < 0.001$]. Mentre sia l'ampiezza del circadiano (76.0 - 47.4) che la quantità di attività (139175 - 116815), pur evidenziando una diminuzione in condizioni DD non mostrarono differenze statisticamente significative. In fine dall'analisi spettrale è stato possibile osservare la presenza di ritmi ultradiani con diversi picchi significativi nel range 1-8 ore ed un picco preponderante a 12 ore (Fig. 6)

Questi risultati sono in accordo con i dati in letteratura che riportano per il ceppo Balb/c un periodo circadiano endogeno, geneticamente determinato, più corto e poco stabile; cioè fortemente influenzato dalle variazioni delle condizioni ambientali, infatti in condizioni DD il periodo si discosta significativamente dalle 24 ore. Inoltre anche gli altri 3 parametri considerati sono in accordo con la letteratura, in particolare l'ampiezza, dove la condizione DD favorisce una diminuzione dell'ampiezza del ritmo. E' stato quindi evidenziato come tale strumento sia in grado di rilevare con elevate precisione i vari parametri dell'attività locomotoria.

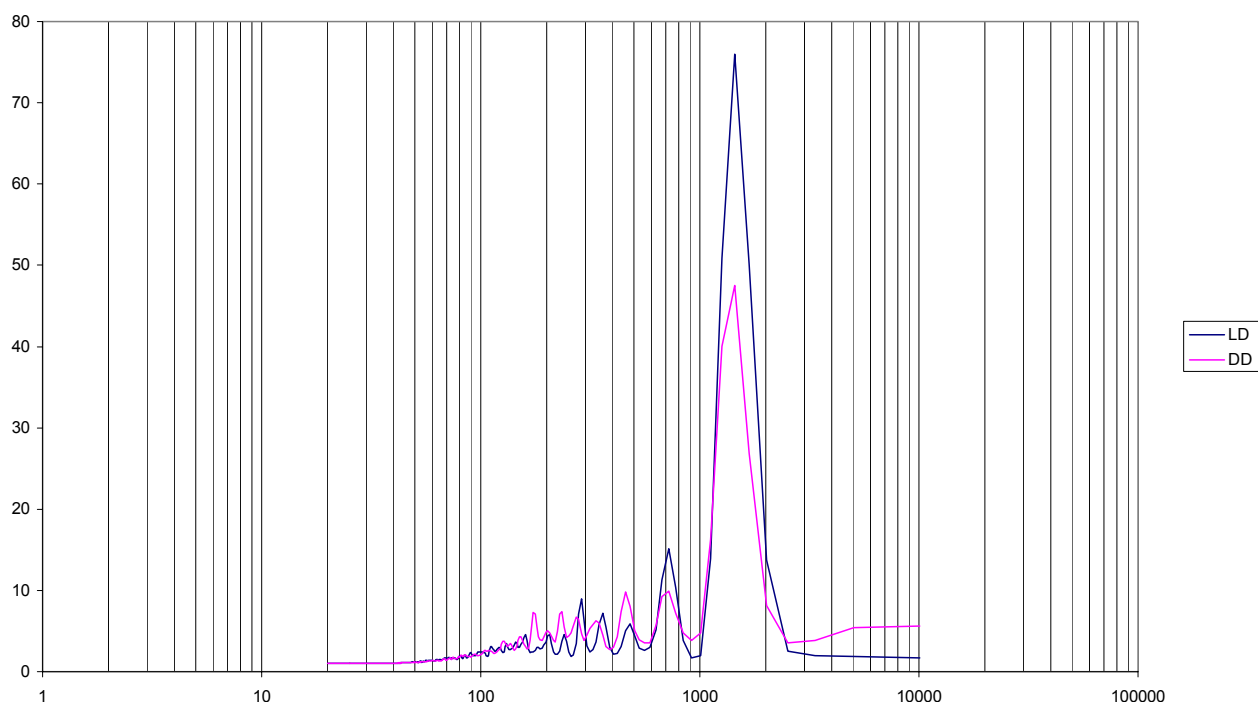


Fig. 6. Analisi spettrale; asse-X minuti in scala logaritmica, asse-Y potenza spettrale

Conclusioni

Obiettivo di questo lavoro era sviluppare un apparato composto da una batteria di sensori, precedentemente messi a punto dal nostro gruppo, in modo da consentire uno studio numericamente significativo sui ritmi di attività dei topi. Inoltre volevamo sottoporre ad ulteriore validazione il sistema di rilevamento dell'attività locomotoria che diversi anni or sono il nostro gruppo ha sviluppato e validato

L'apparato ha permesso una più agevole registrazione degli animali utilizzando una batteria di radar alloggiati in specifici elementi e sistemati in spazio ridotto rispetto al vecchio sistema.

Diversamente dal primo studio di validazione (Conte, D'Olimpio, & Renzi, 1995), i nostri test non si sono basati su un confronto con un altro apparato ma sulla capacità del sistema di monitoraggio di individuare delle frequenze e dei ritmi nel moto di oggetti dal movimento standardizzato. Inoltre abbiamo eseguito dei test con topi appartenenti a ceppi inbred i cui parametri comportamentali, in particolare la lunghezza del periodo endogeno circadiano, sono geneticamente determinati e ben conosciuti.

In generale il nostro sistema si è dimostrato in grado di rilevare l'esatta ritmicità dell'oggetto in movimento nel test 1 ma anche di mantenere i conteggi costanti nel tempo. Le categorie

comportamentali rilevate rientrano fra quelle definite di “attività locomotoria generale” ed i parametri di attività del ceppo Balb/c, in particolare il periodo circadiano è coerente con i molti dati in letteratura. Anche le periodicità ultradiane rilevate si mostrano coerenti con quei pochi dati presenti in letteratura (Honma & Hiroshige, 1978; Buttner & Wollnik, 1984; Wollnik & Dohler, 1986; Wollnik et al., 1987; Beau, 1991; Gerkema et al., 1993) Lo studio dei ritmi ultradiani, infatti, si mostra particolarmente difficile, sia per l’identificazione dei ritmi brevi che mostrano una grande variabilità, mediante algoritmi matematici; che per il sistema di monitoraggio che non deve creare effetti di mascheramento, né interagire o influenzare il normale comportamento dell’animale. Ad esempio, uno degli strumenti maggiormente utilizzati, i tamburi rotanti, tendono ad influenzare i pattern di attività dei roditori e devono essere considerati dei sistemi di rilevamento attivi i quali mascherano la struttura endogena dei ritmi espressi dall’animale, soprattutto gli ultradiani (Thicher & Ashkenazi 1995). Riteniamo quindi che questo strumento sia particolarmente adatto allo studio dei ritmi di attività di topi, sia per l’uso di onde elettromagnetiche che non interferiscono con il comportamento dell’animale, ma anche perché questo sistema permette di lasciare gli animali nella loro gabbia di stabulazione evitando il cambio di ambiente e gli effetti dovuti all’attività esplorativa (Amassari-Teule et al. 1998).

Inoltre il sistema computerizzato di registrazione permette dei lunghissimi monitoraggi dagli animali creando serie temporali continue. File che vengono automaticamente salvati sull’hard disk consentendo un immediata analisi computerizzata dei dati.

Bibliografia

Amassari-Teule M, Fombon AM, Bloch V (1984). Facilitation of generalization performances in spatial learning problems by posttrial stimulation of the mesencephalic reticular formation.

Physiol Behav. Jun;32(6):1027-31

Beau, J. (1991) Activity rhythms in inbred mice: genetic analysis with recombinant inbred strains Behavior Genetics, 21, n°2, 117-129

Büttner, D. Wollnik, F. (1984). Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat Behavior Genetics, vol.14, n°2, 137-152

- Clarke, R.L. & Smith, R.F. (1985). An infrared device for detecting locomotor activity. *Behavior Research Methods Instruments & Computers*, 17, 519-525.
- Clarke, R. L., Smith, R. F., & Justesen, D. R. (1992). A programmable proximity-contact sensor to detect location or locomotion of animals. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 24, 515-518.
- Conte, S., D'Olimpio, F. & Renzi, P. (1995a). Uno strumento per la registrazione dell'attività motoria. *Rivista di Psicologia*, LXXX (1), 69-69.
- Gerkema, M.P., S. Daan, H. Wilbrink, M. W. Hop and F. van der Leest (1993) Phase control of ultradian feeding rhythms in the common vole (*Microtus arvalis*) the roles of light and the circadian system. *J. Biol. Rhythms* 8: 151-171.
- Honma K, Hiroshige T, (1987). Endogenous ultradian rhythms in rat exposed to prolonged continuous light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 235: R250-R256
- Moraes, M.F.D, Ferrarezi, C., Mont'Alverne, F.J.A. & Garcia-Cairasco, N. (1997). Low-cost automatic activity data recording system. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 30:1009-16
- Pasquali V. & Renzi P. (2005). On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: an application with *Periplaneta Americana*. *Behavior Research Methods, Instrumentation & Computers*. Vol. 37, N. 2, pp 523-528 .
- Parreno A, Saraza ML, Subero C. (1985) A new stabilimeter for small laboratory animals. *Physiol Behav.* 34(3):475-8.
- Roberts, S.K. de F. (1956) "Clock" controlled activity rhythms in the fruit fly. *Science*, 124, 172
- Rose FD, Dell PA, Love S. (1985). Doppler shift radar monitoring of activity of rats in a behavioural test situation. *Physiol Behav.* 35(1):85-7

Tarpy, R. M., & Murcek, R. J. (1984). An electronic device for detecting activity in caged rodents. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 16, 383-387.

Ticher, A. Ashkenazi, J.E. (1995) Compound structure of rodents activity rhythm
Physiology and Behavior vol.57, n°1, 37-40

Toth, L.A Williams, R.W (1999) A quantitative genetic analysis of locomotor activity in CXB recombinant inbred mice. *Behavior Genetics*, vol.29, n°5, 319-328

Vanuytven, M., Vermeire, J. & Niemegeers, C.J.E. (1979). A new motility meter based on the Doppler principle. *Psychopharmacology*, 64, 333-336.

Wollnik F, Dohler KD. (1986). Effects of adult or perinatal hormonal environment on ultradian rhythms in locomotor activity of laboratory LEW/Ztm rats.
Physiol Behav. 38(2):229-40.

Wollnik, F. Gärtner, K. Büttner, D. (1987) Genetic analysis of circadian and ultradian rhythms in laboratory rats. *Behavior Genetics*, vol.17, n°2, 167-178

Young C.W, Young, M.S., Li, Y.C. & Lin, M.T. (1996). A new ultrasonic method for measuring minute motion activities on rats. *J. Neurosc.*, 70: 45-49

2.3 Un sistema infrarosso per lo studio dei ritmi di attività motoria in misidacei cavernicoli

[Thalassia Salentia (2006), suppl. vol 29 (in press)]

Introduzione

L'attività motoria o locomotoria è un parametro utile per lo studio del comportamento, ma anche per il comprendere il funzionamento degli orologi biologici. In questo tipo di ricerche sono spesso necessari monitoraggi molto lunghi per i quali è necessario ricorrere all'utilizzo di sistemi automatici.

La tecnologia per la detezione e la registrazione automatica dell'attività locomotoria si è notevolmente evoluta; piccoli mammiferi ed insetti sono stati monitorati con ultrasuoni (Hinano Akaka and Houck, 1980), infrarossi (Clarke and Smith, 1985), stabilimetri (Zeier and Tschannen, 1968), tamburi rotanti (Roberts, 1956), condensatori a capacità (Schechter *et al.*, 1963), microfoni (Jones, 1964) e radar (Vanuytven *et al.*, 1979; Martin and Unwin, 1980; Kropveld and Chamuleau, 1993; Pasquali and Renzi 2005b, Pasquali *et al.*, 2005 unpublisher). I sistemi ad infrarossi hanno diversi vantaggi: essi permettono di monitorare l'animale nella sua gabbia di stabulazione senza perturbare il normale pattern di attività o causare attività spuria dovuta all'esplorazione di un nuovo ambiente; non sono intrusivi; producono un output direttamente analizzabile dai software; si adattano alle differenti condizioni di utilizzo.

Gli animali cavernicoli rappresentano un eccellente modello per comprendere l'evoluzione e l'adattamento alla vita sotterranea, ma anche per lo studio dei ritmi biologici. In letteratura vi sono pochi studi che si sono interessati al ritmo circadiano nell'attività locomotoria di animali troglobi, inoltre sono state studiate poche specie. Attualmente, le maggiori conoscenze sui ritmi di attività degli animali cavernicoli, in particolare insetti, ci vengono dai lavori di Lamprecht e Weber (1979, 1983, 1991). Gli autori hanno riportato evidenze circa la presenza di un ritmo circadiano endogeno sia in specie troglobie che troglofile, ma anche molti dati circa la presenza di pattern aperiodici. Recentemente, altri autori si sono interessati agli animali cavernicoli. Hoenen e Gnaspini (1999) trovarono in un ragno cavernicolo (*Pachilospeleus strinatii*) l'espressione di un pattern ritmico circadiano nell'attività locomotoria, ricorrendo per l'analisi dei dati alla statistica circolare. Koilraj *et al.*, (2000) riportarono risultati non chiari sull'attività motoria di millepiedi troglobi *Glyphiulus cavernicolus sulu*. Alcuni millepiedi mostravano ritmi circadiani, mentre altri si mostravano

aritmici. Pati (2001) evidenziò la presenza di ritmi circadiani in pesci gatto ipogei ed epigei, ma anche la presenza di ritmi ultradiani con periodi compresi in un range 10-17 ore. Trajano et al. (2001), usando l'analisi di Fourier per lo studio dei ritmi di attività di pesci troglobi, riportò l'assenza di significative componenti circadiane nell'attività motoria di questi pesci, registrati sia in condizioni di buio continuo che di luce:buio. Più recentemente Pasquali et al. (2005c) concentrandosi sullo studio dell'attività locomotoria su popolazioni di grilli cavernicoli del genere *Dolicopoda* provenienti da grotte naturali e grotte artificiali. I dati preliminari hanno evidenziato una significativa variabilità del circadiano nelle due popolazioni. Inoltre l'analisi spettrale e l'analisi del periodogramma rivelarono la presenza di ritmicità ultradiana.

In questo lavoro descriviamo la costruzione e la validazione di un sistema automatico di rilevamento ad infrarossi per il monitoraggio dell'attività locomotoria in *Spelaeomysis bottazzii* Caroli (Crustacea: Mysidacea). L'attività motoria viene definita arbitrariamente da un unità di misura che dipende dalla risoluzione del sistema di detezione e dagli obiettivi che ci si è posti per l'esperimento. Volendo infatti definire come segnale solo l'attività grossolana dell'animale, mentre come rumore l'attività di "mantenimento", allora solo strumenti molto sofisticati e costosi possono essere in grado di discriminarlo.

Il sistema ad infrarossi qui descritto, è un'implementazione del sistema utilizzato dal nostro gruppo per gli studi sul comportamento delle formiche (Renzi and Pasquali, 2000). Noi abbiamo modificato l'approccio originale per adattare il circuito e la parte di rilevamento all'utilizzo con animali acquatici molto piccoli, come i misidacei *Spelaeomysis bottazzii*, utilizzando l'apparato per uno studio cronobiologico.

Al fine di testare l'apparato e quantificare l'attività dei misidacei, abbiamo utilizzato un approccio cronobiologico. Era quindi indispensabile costruire un apparato elettronico per registrare in modo automatico e continuo l'attività di singoli misidacei *Spelaeomysis bottazzii*. Le nostre analisi si sono basate su metodi inferenziali, al fine di ottenere una risoluzione quantitativa dei parametri ritmici di attività: ritmi espressi, lunghezza del periodo e ampiezza.

Materiali e metodi

Animali

Il materiale impiegato per la presente ricerca è un misidaceo, *Spelaeomysis bottazzii*, proveniente dalla grotta “Spundurata di S. Isidoro” (Lecce) situata nella Penisola Salentina.

Spelaeomysis bottazzii è un specie dulciacquicola stigobionte endemica per la regione pugliese.

Descritta da Caroli nel 1924 su materiale proveniente dai sistemi anchialini della Grotta Zinzulusa (Castro, Lecce) la specie è stata successivamente ridescritta da Pesce (1976) e ritrovata, con ampie distribuzioni, sia in altri sistemi cavernicoli del Salento (Buco dei Diavoli, L' Abisso, Grotta dei Cervi, Grotta del Leone) che freatici della Puglia (area Murgiana, litorale tra Bari e Brindisi, Penisola Salentina) (Inguscio et al., 1999; Pesce et al. , 2004).

Si tratta di un misidaceo di lunghezza variabile tra i 6 e i 13 mm, eurialino ed euritermo, in grado di resistere a condizioni variabili di illuminazione, sino alla completa oscurità.

Ricerche genetiche sulla sua variabilità (De Matthaeis et al., 1982) hanno dimostrato che *Spelaeomysis bottazzii* avrebbe colonizzato il dominio ipogeo in tempi relativamente recenti, a seguito delle regressioni Mio-Plioceniche del Mediterraneo.

Procedura

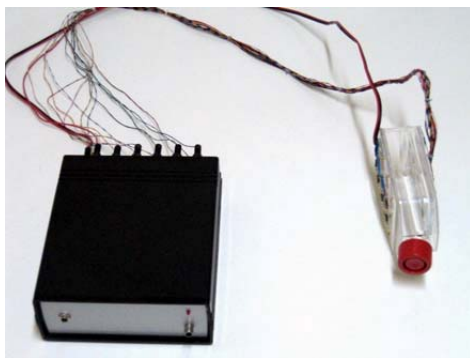
Per il monitoraggio dei misidacei si è provveduto a registrare l'attività di animali stabulati singolarmente in celle di coltura da 30 ml (5x5x2 cm). L'apparato era sistemato in una camera termostata (Department of Biology, University of Lecce) in condizioni utilizzate successivamente per l'esperimento: buio continuo (DD), temperatura costante a $16^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, umidità costante all' 85%, cibo ed acqua *ad libitum*. Tutti i misidacei rimanevano in DD per oltre 15 gg prima di sottoporli al monitoraggio dell'attività locomotoria. Dopo questo periodo di abituazione, gli animali venivano posti nell'apparato di registrazione, un computer registrava sull'hard disk il numero di movimenti ogni minuto.

Apparato ad infrarossi per il monitoraggio: componenti elettronici e costruzione

L'attività locomotoria veniva rilevata per mezzo di 9 barriere ad infrarosso, montate su un box per colture cellulari da 30 ml. I sensori erano controllati da un circuito elettronico che inviava i segnali ad un persona computer che gli archiviava sull'hard disk.

I sensori optoelettronici (RS Components, Italia) erano: a) diodo emettitore infrarosso a GaAlAs da Ø3 mm con involucro plastico OP298B (λ 890 nm, ϕ 25°, max output power 4.8 mW/cm²); b) fototransistor NPN da Ø3 mm OP598B (λ 860 nm, ϕ 25°). Il segnale rx di ogni sensore era

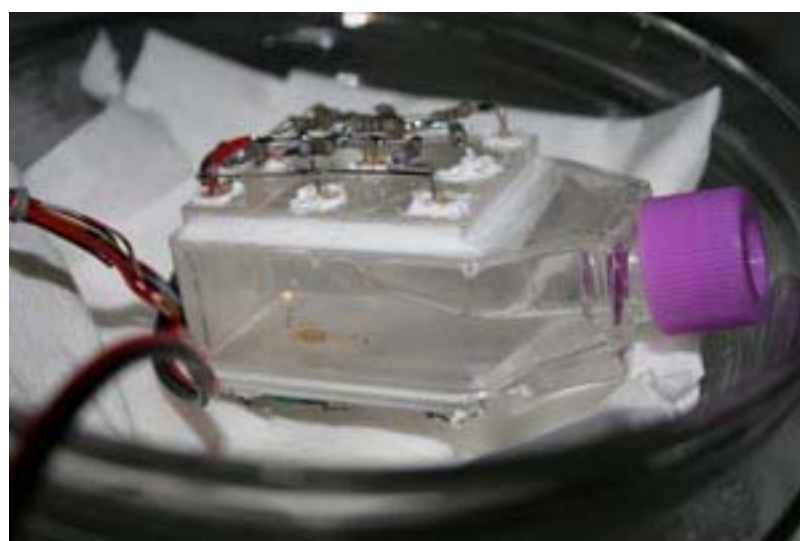
amplificato per mezzo di un operazionale 3303, successivamente un circuito integrato logico 7421 (positive-AND gate) sommava tutti i segnali. L'input della scheda di acquisizione (PIO-12, Keithley Instruments) veniva derivato da un monostabile μA 555, il quale formava un impulso di 15 msec +5V CC. Un programma scritto in C (Micaloni, Renzi and Pasquali), leggeva i canali della scheda. Tramite software era possibile modificare diversi parametri quali frequenza di lettura del canale, intervallo di raccolta, lunghezza dell'esperimento. Il numero di apparati supportati è correlato ai canali della scheda. Tutto il sistema, composto da apparato di monitoraggio e computer, era stato sistemato in una camera refrigerata a 8°C poichè le resistenze poste in vicinanza dei tx, in condizioni normali elevavano la temperatura dell'acqua sino a 30°C. In quella posizione la temperatura dell'acqua si manteneva costante a 16°C. Prima dell'avvio delle registrazioni sono stati eseguiti i seguenti controlli: a) assenza di interferenze fra i sensori; b) che tutti i sensori misurassero la medesima quantità; c) controllo che i settaggi non si modificassero con il passare del tempo e l'utilizzo. In fine abbiamo verificato che l'apparato non emettesse falsi segnali.



a)



b)



c)

Pictures show the cell of recording and the connection to the electric circuit (a); cell view of side and position of the sensors (b). Cell and mysid in recording (c)

Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state trattate con un procedimento di media mobile su tre punti ed il trend lineare rimosso. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi di Fourier sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2,88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.001$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

Risultati

L'apparato ad infrarossi ha registrato i movimenti di 3 misidacei di differenti dimensioni, dagli 8 mm ai 13 mm, stabulati singolarmente. Sono state eseguite registrazioni per un totale di 20 giorni (12 gg il primo, 4 il secondo ed il terzo), durante tale periodo di utilizzo non sono stati riportati problemi e le registrazioni si sono mostrate sufficientemente accurate.

L'ispezione visiva dei singoli attogrammi non mostra presenza di pattern ritmici di attività (fig. 2a, 3a, 4a). Conseguentemente, per ogni animale è stata eseguita l'analisi spettrale ed il periodogramma: le analisi hanno rivelato la presenza di picchi significativi sia per il ritmo circadiano che per i ritmi ultradiani, in condizioni di free-running (DD).

È stata calcolata la lunghezza del periodo circadiano in free-running, trovando un periodo medio di $24.7 \text{ hr} \pm 1.2 \text{ hr}$ (mean \pm SD, $n = 3$). I dati sul circadiano sono stati anche confermati dalla DFT, la quale ha rivelato la presenza di un picco a circa 24 hr in tutte le registrazioni esaminate, evidenziando inoltre una bassa potenza spettrale 4.8 ± 1.2 (mean \pm SD, $n = 3$).

Oltre al ritmo circadiano, in tutte le registrazioni ricorrevano ritmi ultradiani nell'attività locomotoria dei misidacei, periodicità che abbiamo potuto evidenziare solo per mezzo dell'analisi spettrale. La DFT ha infatti evidenziato che in tutti gli animali vi erano picchi significativi nel range 1-8 hr. Calcolando uno spettro medio si è visto che i picchi maggiormente significativi avevano un periodo di 2 hr, 3.3 hr e 5.6 hr, quest'ultimo con la più alta potenza spettrale (fig. 1). La potenza spettrale media dei picchi ultradiani era di 6.6 ± 0.6 (mean \pm SD, $n = 4$), ben più alta del circadiano.

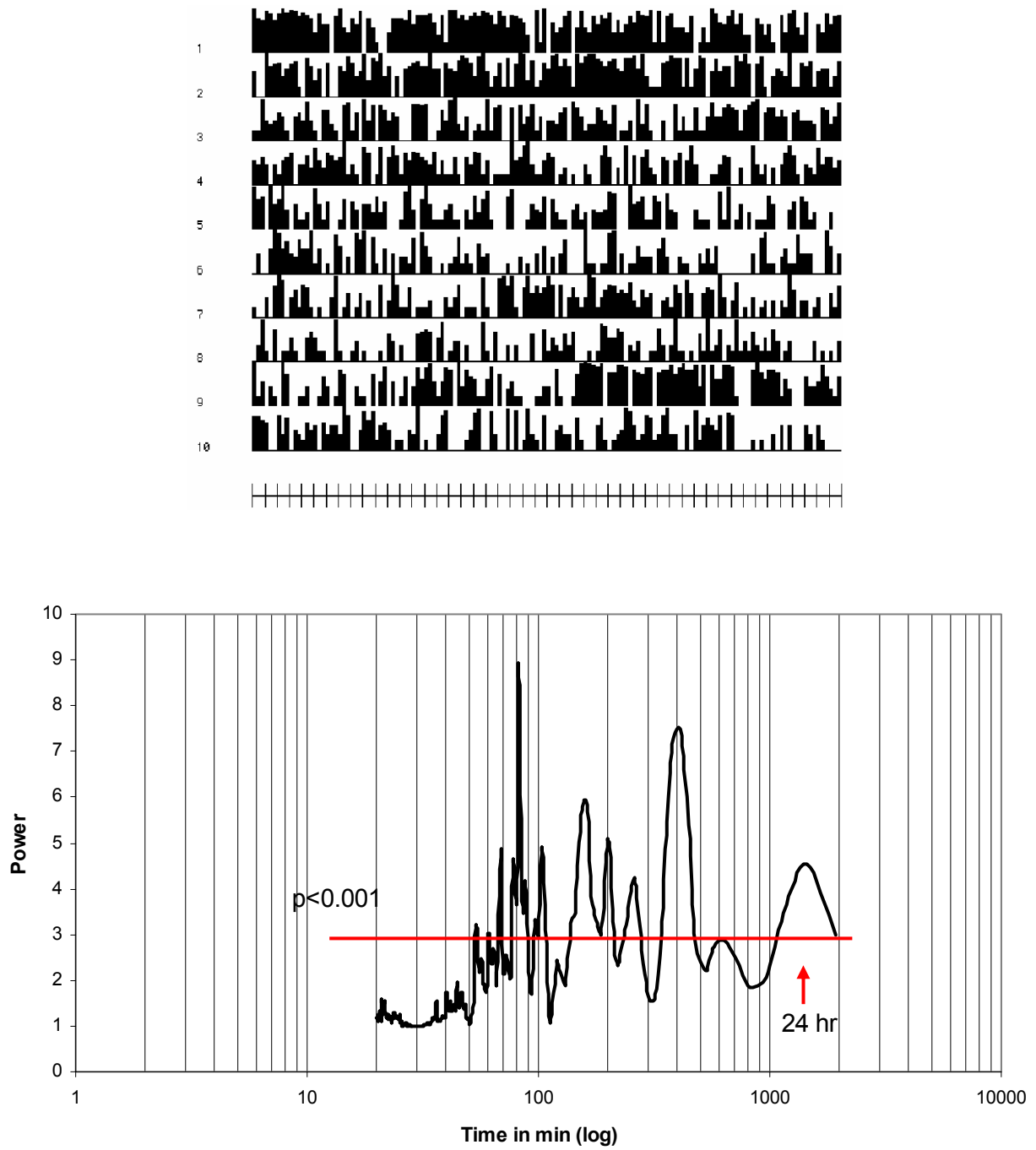


Fig. 2. Power spectrum and actogram mysid #1. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

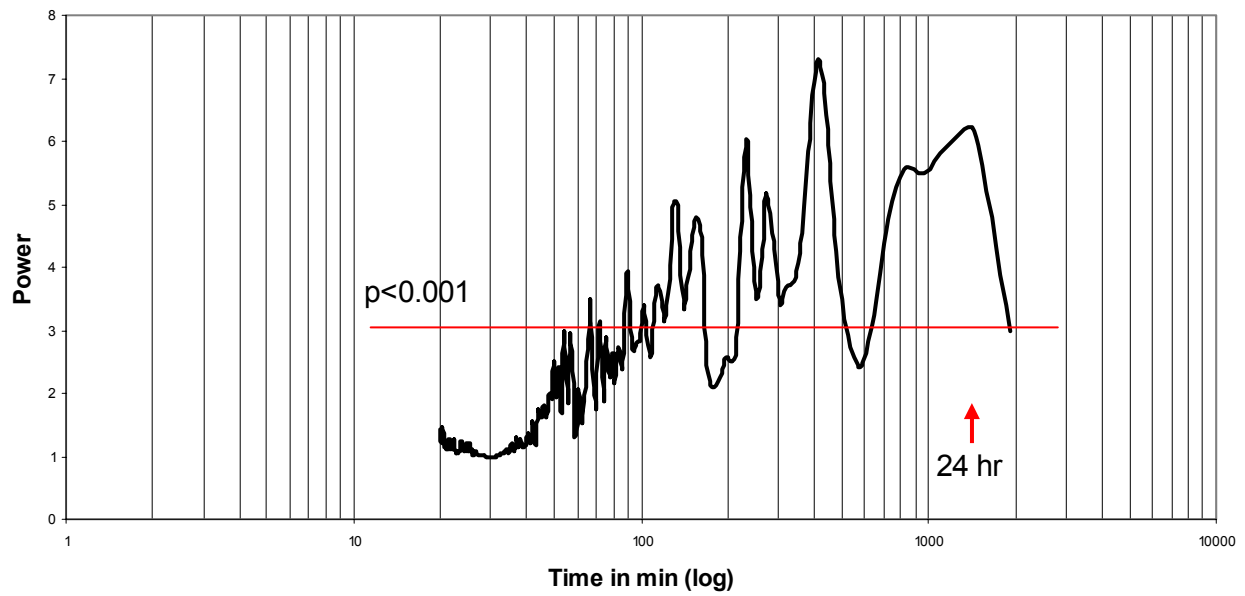
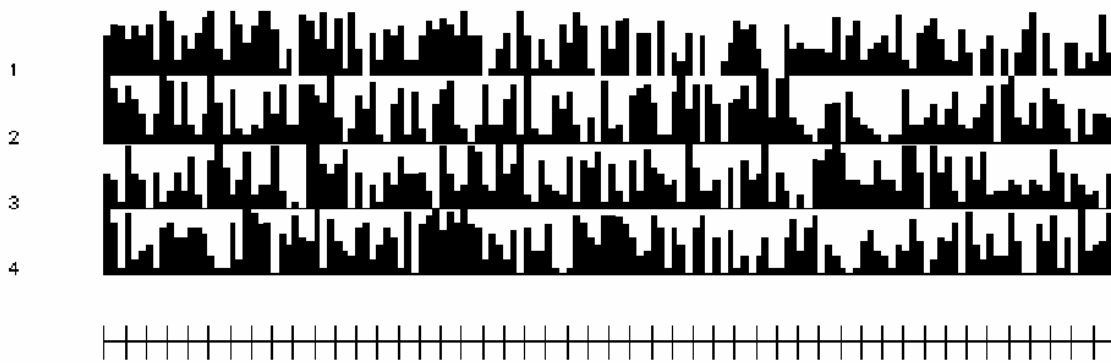


Fig. 3. Power spectrum and actogram mysid #2. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

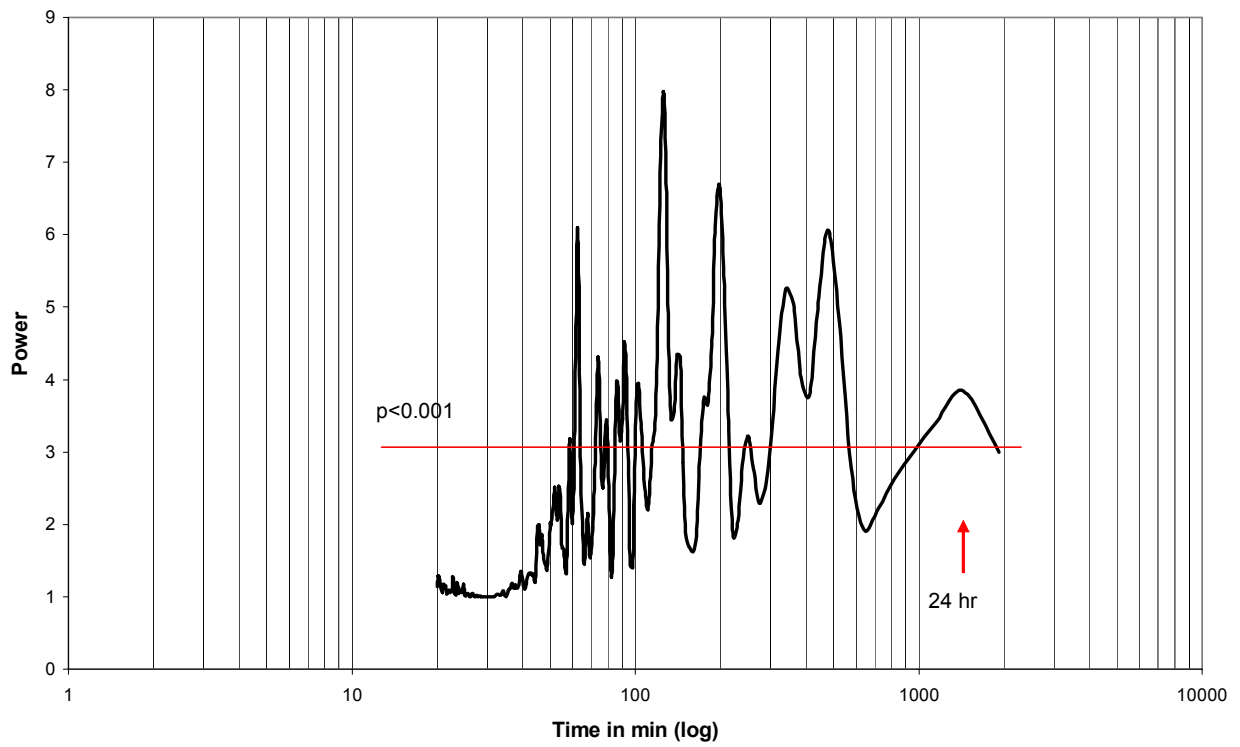
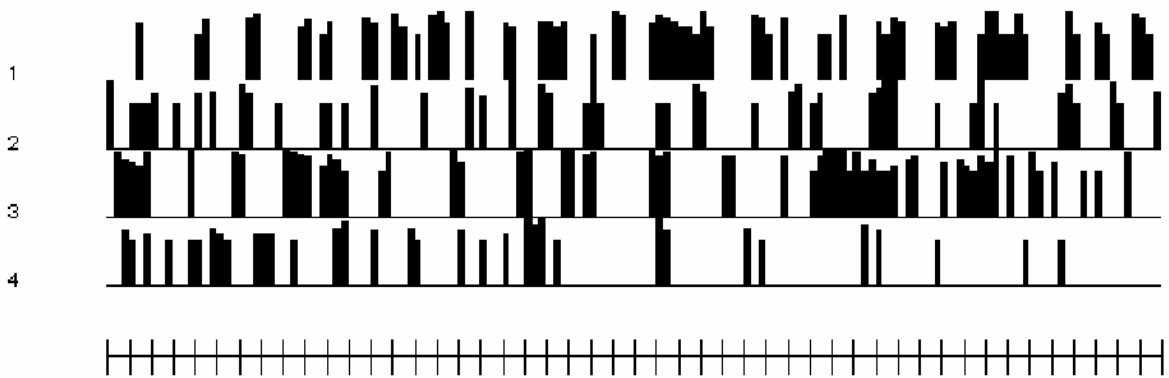


Fig. 4. Power spectrum and actogram mysid #3. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

Discussione

Nel presente studio abbiamo presentato lo sviluppo, la costruzione e la validazione di un apparato ad infrarossi per lo studio dell'attività motoria in misidacei cavernicoli (*Spelaeomysis bottazzii*). Durante precedenti test compiuti con altri prototipi, taglia e ambiente del misidaceo avevano causato i maggiori problemi, ma anche alcuni problemi tecnici dovuti all'allineamento dei sensori. In questo lavoro abbiamo registrato 3 misidacei di diverse taglie; i migliori risultati sono stati ottenuti con gli individui di taglia grande e media. Per i campioni di taglia piccoli invece l'apparato non ha mostrato la medesima definizione ma la qualità dei dati è comunque adeguata per un'analisi del comportamento o per delle analisi computerizzate.

Sono stati registrati in tutto 3 soggetti per un totale di 20 giorni di registrazione. Benché la quantità di dati a nostra disposizione sia alquanto scarsa, riteniamo di poter considerare le informazioni quantitative circa i parametri dell'attività locomotoria, una prima indicazione riguardo la specie. I dati mostrarono un ritmo circadiano significativo ma dall'ampiezza molto bassa, questo suggerisce una base endogena del ritmo circadiano di attività. Rispetto alla letteratura presente, molti autori hanno osservato un ritmo circadiano nel comportamento locomotorio di diverse specie cavernicole, come insetti, invertebrati acquatici, pesci. Non possiamo dare una risposta circa la presenza di un orologio biologico circadiano, esso è vantaggioso oppure è una regressione della vita epigea? Probabilmente, la "organizzazione" circadiana è importante per il mantenimento di un'organizzazione temporale interna (Oda et al. 2000).

È interessante notare che la ritmicità ultradiana osservata in questi dati è simile, per i picchi predominanti, a quella osservata nelle blatte e nei topi (Pasquali et al. 2004, 2005a; Pasquali e Renzi, 2005b).

Abbiamo ritenuto interessante operare una comparazione fra i pochi dati ottenuti in questo lavoro con i dati di Pasquali et al. (2005b) su *Dolichopoda baccettii*. Popolazioni provenienti da grotta naturale, ed in particolare dal primo lago della Grotta degli Stretti (questa popolazione vista la particolare morfologia della grotta può essere considerata troglobia), mostra una similitudine interessante con i misidacei, si veda il confronto fra gli attogrammi e l'analisi spettrale (fig. 5-6). Questa è solamente un'osservazione speculativa ma noi la consideriamo meritevole per nuove osservazioni sperimentali. La realizzazione e la validazione di questo apparato, ha rappresentato il primo passo per studi futuri.

Mean power spectrum

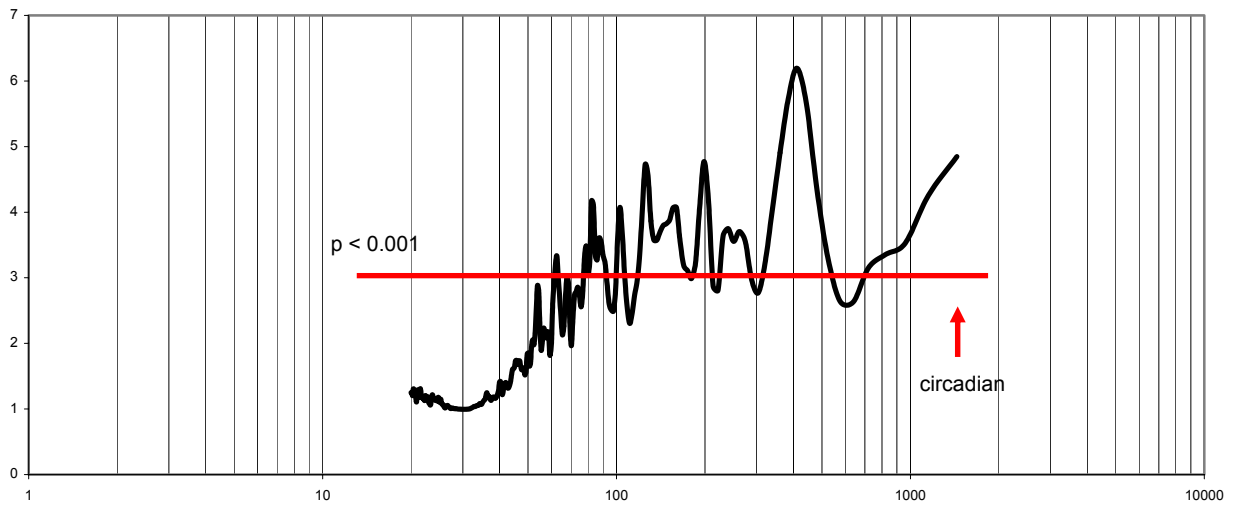


Fig. 5. Mean power spectra of 3 mysids. Power values on the y-axis, x-axis is period (in minutes) in logarithmic scale.

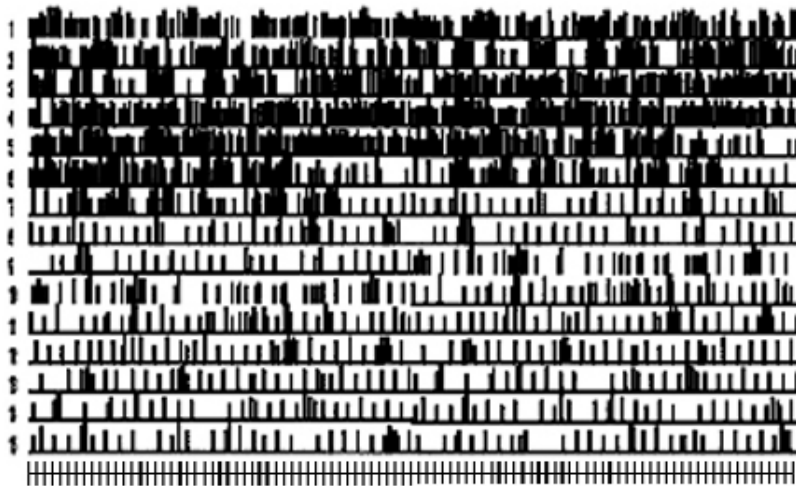
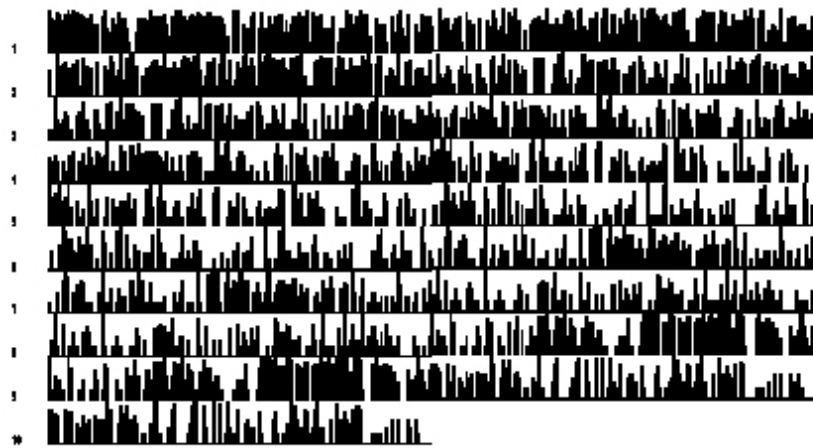
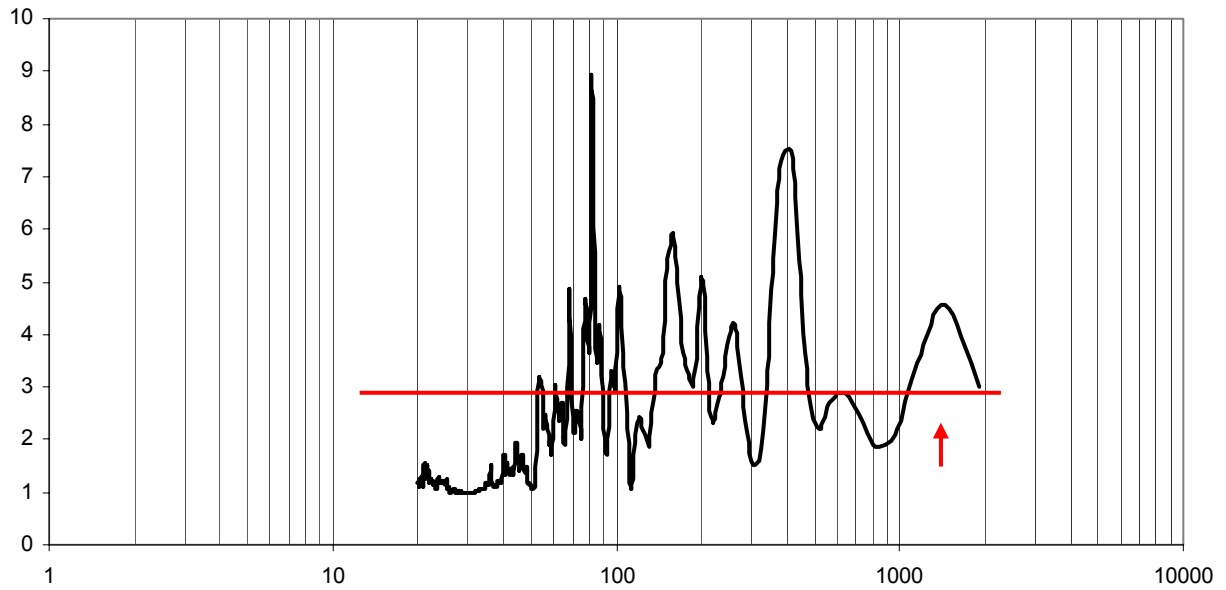


Fig. 5. Double-plot actogram of *Spelaemyia bottazzii* #1 (up) and *Dolichopoda baccettii* #10 (down) in continuous darkness

***Spelaeomysis bottazzii* #1**



***Dolichopoda baccettii* #10 - Punta degli Stretti**

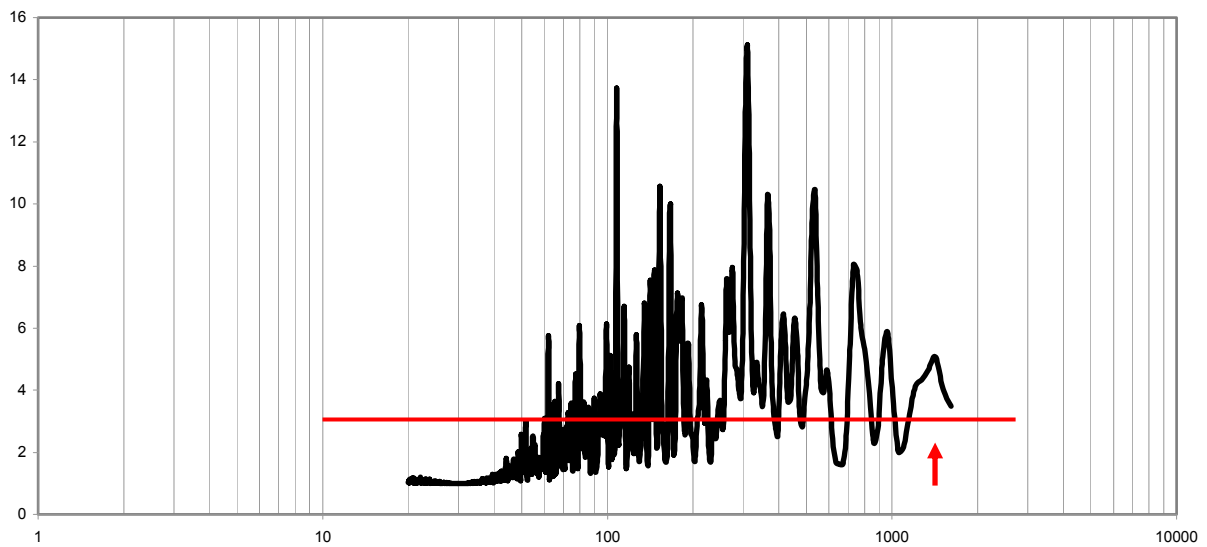


Fig. 6. Spectral analysis of activity rhythms of *Spelaeomysis bottazzii* #1 (up) and *Dolichopoda baccettii* #10 (down). Power values on the y-axis; x-axis is period (in minutes) in logarithmic scale.

Aknowledgements

We thank Pietro Fermani for the electronic circuit. We are grateful to Dr. Gianpietro DiSansebastiano and Prof. Silvano Marchiori for the thermostatic room

Note

The software and the electronic scheme circuit are available freeware.
vittorio.pasquali@uniroma1.it

Bibliografia

CONTE S., FERLAZZO F., RENZI P., - 1995 Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biol. Psych.*, 39: 159-172

DE MATTHAEIS E., COLOGNOLA R., SBORDONI V., COBOLLI-SBORDONI M., PESCE G. L., - 1982 Genetic differentiation and variability in cave dwelling and brackish water populations of Mysidacea (Crustacea). *Z. zool., Syst. Evolut.-forsch.*, Hamburg und Berlin, Germania, 20: 198-208

KOILRAJ A. J., SHARMA V. K., MARIMUTHU G., CHANDRASHEKARAN M.K., - 2000 Presence of circadian rhythms in the locomotor activity of a cave-dwelling millipede *Glyphiulus cavernicolus sulu* (Cambalidae, Spirostreptida). *Chron. Int.*, 17: 757-765

HINANO AKAKA W., HOUCK B. A. - 1980 The use of an ultrasonic monitor for recording locomotor activity. *Behav. Res. Meth. Instr.*, 12: 514-516

KROPVELD D., CHAMULEAU R. - 1993 Doppler radar device as a useful tool to quantify the liveliness of the experimental animal. *Med. Biol. Eng. Comp.*, 31: 340-342.

JONES M. D. R., - 1964 The automatic recording of mosquito activity. *J. Ins. Phys.*, 10: 343-351

- MARTIN P. H., UNWIN D. M., - 1980 A microwave doppler radar activity monitor. *Behav. Res. Meth. Instr.*, 12: 517-520
- LAMPRECHT G., WEBER F., - 1979 The regressive evolution of the circadian system controlling locomotion in cavernicolous animals. *Misc. Papers L.H. Wageningen*, 18: 69-82
- LAMPRECHT G., WEBER F., - 1983. Activity control in the eyeless carabid beetle *Typhlochoromus stolzi*, an inhabitant of a superficial underground compartment. *Mém. Biospél.*, X: 377-383
- LAMPRECHT G., WEBER F., - 1991. Spontaneous locomotion behavior in cavernicolous animals: the regression of the endogenous circadian system. Pp. 225–262. In *The Natural History of Biospeleology* (A.I. Camacho, ed.). *Mon. Mus. Nac. Cien. Nat.*, Madrid.
- HOENEN S., GNASPINI P. - 1999 Activity rhythms and behavioral characterization of two epigeal and one cavernicolous harvestmen (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *J. Arach.*, 27: 159-164
- INGUSCIO S., PESCE G. L., PAGLIANI T., - 1999 Variabilità morfologica in popolazioni di *Speleomysis bottazzii* Caroli (Crustacea: Mysidacea). *Thal. Sal.*, Lecce, suppl. al n. 23: 159-65
- ODA G. A., CALDAS I. L., PIQUEIRA J. R. C., WATERHOUSE J. M., MARQUES M. D., -2000 Coupled biological oscillators in a cave insect. *J. Theor. Biol.*, 206: 515-524
- PASQUALI V., MIGLIORE M., RENZI P., - 2004 Studio sulle periodicità ultradiane temperatura-compensate in topi inbreed. Congresso AIP Sezione di Psicologia Sperimentale. Siacca (AG), settembre 2004
- PASQUALI V., MIGLIORE M., SCANNAPIECO E., RENZI P., - 2005a Ritmi ultradiani nell'attività locomotoria di ibridi F1 (BALB/C e C57BL/6). Congresso AIP, Sezione di Psicologia Sperimentale. Cagliari, settembre 2005
- PASQUALI V., RENZI P., - 2005b On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: an application with *Periplaneta Americana*. *Behav. Res. Meth. Instr. Comp.*, 37: 455-461

- PASQUALI V., RENZI P., LUCARELLI M., SBORDONI V., - 2005c Locomotor activity in *dolichopoda* cave crickets. A chronobiological study of populations from natural and artificial caves. *Subter. Biol.*, 3: 49-55
- PATI A. K., - 2001 Temporal organization in locomotor activity of the hypogean loach, *Nemacheilus evezardi*, and its epigeal ancestor. *Env. Biol. Fish.*, 62: 119-129
- PESCE G. L., - 1976 A new locality for *Spelaeomysis bottazzii* with redescription of the species (Crustacea, Mysidacea). *Boll. Mus.Civ.St.Nat.Verona*,2: 345-354
- PESCE G. L., CICCARESE G., ONORATO R., - 2004 Ricerche biologiche nell' acquifero del complesso carsico di Badisco (Otranto). *Thal. Sal.*, 27: 91-97
- RENZI P., PASQUALI V., - 2000 Circadian and ultradian rhythms of locomotor activity in workers of ant *Formica pratensis*. XXI International Congress of Entomology, Iguassu, p. 893
- ROBERTS, S. K. F., - 1956 Clock controlled activity rhythms in the fruit fly. *Science* 124: 172
- SCHECHTER M. S., DUTKY S. R., SULLIVAN W. N., - 1963 Recording circadian rhythms of the cockroach with a capacity-sensing device. *J. Econ. Entom.*, 56: 76-79
- SOKOLOVE P.G., BUSHELL W.N., - 1978 The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.*, 72: 131-160
- TRAJANO E., DUARTE L., MENA-BARRETO L., - 2001 Subterranean organisms as model for chronobiological studies: the case of troglobitic fishes. *Chron. Int.*, 18:1204-1205
- VANUYTVEN M., VERMEIRE J., NIEMEGERES C. J. E., - 1979 A new motility meter based on the Doppler principle. *Psychopharmacology*, 64: 333-336
- ZEIER H., TSCHANNEN G., - 1968 A new device for measuring general locomotor activity in instrumental conditioning situation. *J. Exp. Anal. Behav.*, 11: 63-64

CAPITOLO 3

Studi su mammiferi: topi

3.1 Ritmi circadiani ed ultradiani nell'attività locomotoria di ceppi inbred di topo

[Physiology and Behavior (submitted)]

Introduzione

In tutti gli organismi viventi sono presenti “orologi biologici” che regolano molte funzioni fisiologiche e comportamentali con ritmi simili a quelli geofisici della terra, con un evidente valore adattativo (Sharma, 2003). Nei mammiferi i neuroni pacemaker che generano il ritmo circadiano endogeno sono localizzati nel nucleo soprachiasmatico, che riceve informazioni dalla retina. Alla base di queste oscillazioni vi sono degli orologi molecolari capaci di mantenere un ritmo anche in assenza di segnali esterni (Aschoff et al., 1965; Daan et al., 1976; Aschoff, 1981). Diversi geni sono implicati nel controllo dell'orologio molecolare e dei parametri espressi dall'orologio biologico, ad esempio il periodo (Mayeda, 1999; Toth, 1999). I ceppi puri come anche topi knock-out sono un potente strumento per le ricerche comportamentali poiché permettono di comprendere il ruolo di specifici geni nel comportamento (Goldowitz *et al.*, 1992) (Sprott and Staats, 1979). Ceppi puri di topo sono ben conosciuti per la loro differenza nell'espressione del ritmo circadiano endogeno, nell'ampiezza dell'attività locomotoria giornaliera così come la quantità giornaliera di attività, tutti parametri ceppo – dipendenti (Possidente and Stephan, 1988; Schwartz and Zimmerman, 1990; Hofstetter et al., 1995; Mayeda et al., 1996). Ma ad una attenta lettura della letteratura, si trovano dati discordanti circa questi parametri, sia per animali appartenenti allo stesso ceppo ma anche allo stesso laboratorio o monitorati nelle stesse condizioni.

Gran parte delle ricerche però si è concentrata sullo studio dei ritmi circadiani, dedicando scarsa attenzione ai ritmi ultradiani. I ritmi brevi differiscono dai circadiani poiché essi non corrispondono a nessuna periodicità ambientale. Ciò nonostante essi mostrano frequentemente oscillazioni molto precise e di notevole ampiezza; andrebbero quindi considerate un importante fattore dell'organizzazione temporale del comportamento (Daan & Aschoff, 1981). In letteratura vi sono diversi studi che hanno riportato la presenza di ritmi ultradiani nell'attività locomotoria di roditori (Honma & Hiroshige, 1978a, 1978b, 1978c; Beau, 1991, 1992; Gerkema et al., 1993; Poon et al., 1997;). In alcuni studi molto dettagliati su diversi ceppi di ratti sono stati osservati ritmi ultradiani con periodi di 12, 6, 4 e 4.8 ore, soprattutto quando il circadiano era meno preponderante come in condizioni di illuminazione continua (Buttner & Wollnik, 1984; Wollnik & Dohler, 1986; Wollnik et al., 1987).

Altre osservazioni su ratti e topi, monitorati in differenti cicli di illuminazione, hanno nuovamente confermato la presenza di ritmi ultradiani con periodi particolarmente significativi a 8 e 6 ore (Ticher, 1995). Più recentemente il gruppo di Ashkenazi ha replicato quelle osservazioni riportando la presenza di ritmi ultradiani a 12 e 8 ore sia in C57 che Balb, inoltre solo in questi ultimi è stato osservato un periodo a 4 ore (Peleg et al. 2001).

Lo studio dei ritmi ultradiani è particolarmente difficile, sia per l'identificazione dei ritmi brevi che mostrano una grande variabilità, mediante algoritmi matematici; che per il sistema di monitoraggio che non deve creare effetti di mascheramento, né interagire o influenzare il normale comportamento dell'animale. Ad esempio, uno degli strumenti maggiormente utilizzati, i tamburi rotanti, tendono ad influenzare i pattern di attività dei roditori e devono essere considerati dei sistemi di rilevamento attivi i quali mascherano la struttura endogena dei ritmi espressi dall'animale, soprattutto gli ultradiani (Ticher, 1995).

In questo studio abbiamo voluto caratterizzare i dualcuni parametri comportamentali dei ritmi endogeni di attività locomotoria di due ceppi inbred, ponendo particolare attenzione ai ritmi ultradiani.

Materiali e metodi

Soggetti

Abbiamo utilizzato topi maschi BALB/c (C) n=12 e C57BL/6 (B6) n=12 di 8 settimane, ottenuti dalla Charles River Lab. (Calco, Como, Italia). I topi erano stabulati individualmente con cibo ed acqua ad libitum. Gli animali erano in condizioni di fotoperiodo luce:buio 12:12 (LD), con luce accesa dalle 8 alle 20; la temperatura era di $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ed umidità di $55 \pm 5\%$.

Procedura sperimentale

I topi venivano stabulati individualmente in gabbie di 369 x 156 x 132(h) mm, dopo tre giorni di abitazione venivano avviate le registrazioni. Gli animali venivano registrati per 28 giorni, la prima settimana in LD 12:12 successivamente tre settimane in DD. Per le analisi comportamentali sono stati considerati solo i 7 gg in LD 12:12 e gli ultimi 7 gg in DD (le due settimane centrali erano considerate abitazione quindi escluse). Le registrazioni venivano effettuate in una stanza insonorizzata e climatizzata.

Apparato radar per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'apparato utilizzato per il monitoraggio degli animali era un sistema autocostruito, il VIVARD-12 (Pasquali, paragrafo 2.2), una batteria di 12 radar a microonde basati sul principio dell'effetto Doppler che operano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl)(Fig.1). Tutti i radar erano collegati ad personal computer che per mezzo di una scheda di I/O ed un programma scritto in C fungeva da data logger. Il programma permetteva inoltre di impostare diversi parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti). Prima di avviare le registrazioni sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) medesime misurazioni da parte di tutti i radar, c) mantenimento della stabilità delle regolazioni nel tempo. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato.

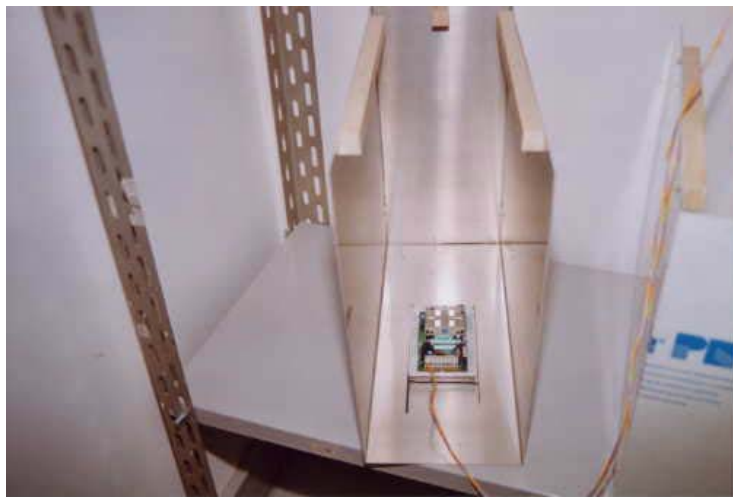


Fig. 1 Uno degli elementi di cui è composto l'apparato

Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state detrendizzate e trattate con un procedimento di media mobile a tre punti. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi della DFT sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2,88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.001$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

L'ampiezza del periodo circadiano e di quelli ultradiani era definita in termini di potenza spettrale dei picchi come presentata dall'analisi spettrale (Low-Zeddies, 2001). Abbiamo considerato diverse misure di potenza spettrale: valore massimo di un singolo picco e media ponderata di un range. I valori massimi sono stati considerati per il periodo a 24 h, 12 h, 8 h e 4h, mentre per le bande temporali 480-300 min e 300-100 min abbiamo considerato la potenza totale media ponderata. I dati relativi alle variabili fotoperiodo (LD 12:12 and DD) e ceppo (B6 and C) sono stati analizzati mediante ANOVA a misure ripetute. Quando appropriato abbiamo utilizzato il test post-hoc (Fisher Test). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$.

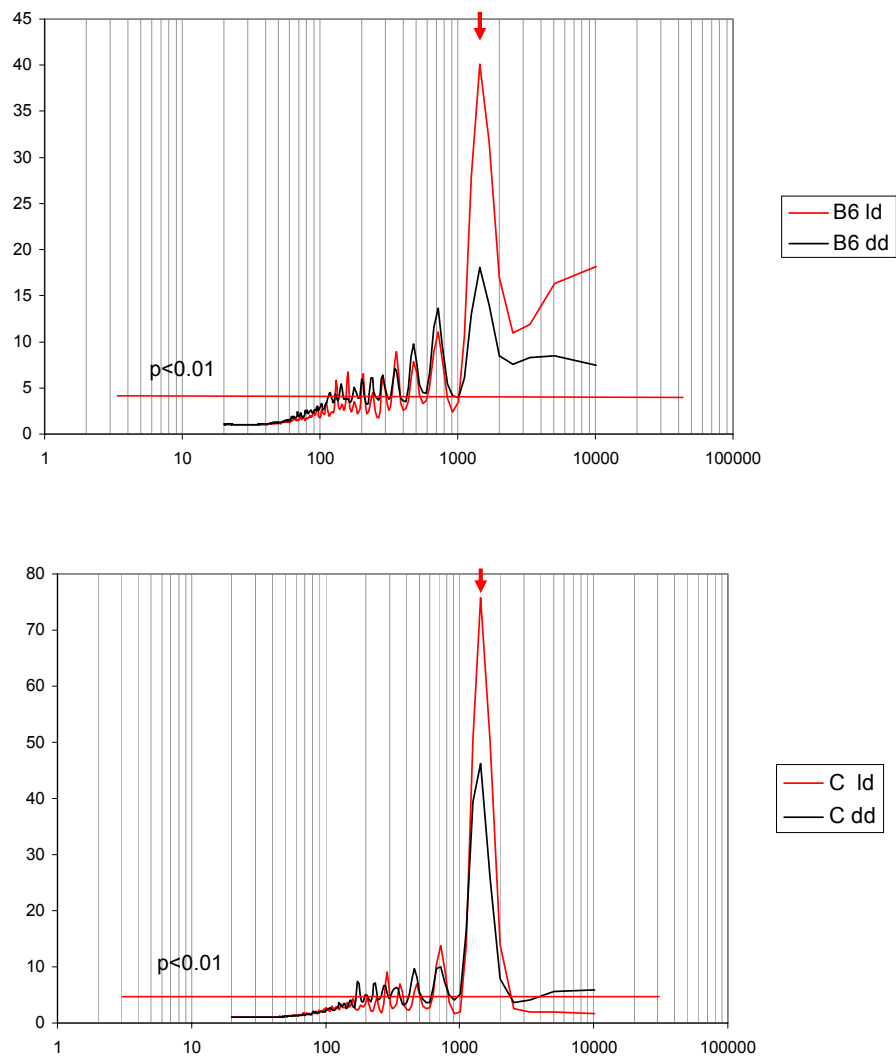


Fig. 2. Power spectra of C57 (up) and BALB (down). Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale

Risultati

Gli spettri medi dei due ceppi evidenziavano un robusto ritmo circadiano di attività e diversi picchi ultradiani. Noi analizzammo i dati al fine di caratterizzare l'attività locomotoria dei C e B6 focalizzandoci in particolare su quattro parametri generali: quantità di movimenti (activity), periodo circadiano (period), ampiezza del ritmo circadiano (amplitude) e ampiezza di differenti bande ultradiane (nel range 12 hr – 1 hr).

Attività locomotoria

Determinammo il livello di attività di ogni animale in termini di numero di segnali contati dal software. La figura 3a mostra la distribuzione di questo tratto in ogni ceppo, in generale i C si mostrarono più attivi dei B6 (Tab. 1). L'ANOVA rivelò un effetto solo per il Ceppo [F (1, 22) = 25.67, $p < 0.001$]

Periodo circadiano

Il periodo medio nei due ceppi era: 24.05 h in LD e 23.88 h in DD per i B6; e 23.98 h in LD e 22.98 h in DD per i C. Vi sono differenze significative sia tra i due ceppi [F (1, 22) = 21.97, $p < 0.001$] che tra i fotoperiodi [F (1, 22) = 25.28, $p < 0.001$]; inoltre l'interazione si mostrava significativa [F (1, 22) = 12.89, $p < 0.001$]. L'analisi post-hoc non evidenziò differenze significative per il ceppo B6 tra LD e DD, mentre nel ceppo C vi erano differenze statisticamente significative tra LD e DD ($p < 0.0001$). Anche il periodo in free-running (DD) si mostrava statisticamente differente nei due ceppi ($p < 0.0001$). (Fig. 3b)

L'ampiezza del ritmo circadiano rifletteva i risultati osservati per i livelli di attività (Fig. 3c). Il ceppo C mostrava un'ampiezza maggiore rispetto al B6 [F (1, 22) = 102.62, $p < 0.001$]; una differenza significativa la osservammo anche per il fotoperiodo [F (1, 22) = 29.33, $p < 0.001$].

Table 1. Principal strain-depend parameter (mean - SD)

	Activity		Tau Circadian		Amplitude Circadian	
C (LD)	136056	42425	23,98	0,06	75,73	13,94
C (DD)	116343	61987	22,98	0,28	46,17	18,21
B6 (LD)	50540	28110	24,05	0,31	40,14	12,91
B6 (DD)	70429	33465	23,88	0,64	18,04	9,53

Ultradiani

Dall'osservazione degli spettri ottenuti mediante DFT era possibile vedere come tutti gli animali mostrassero ritmi ultradiani nell'attività locomotoria. Nelle nostre analisi ci siamo concentrati particolarmente sui periodi: 12 ore, 8 ore e 4 ore (per queste periodicità abbiamo considerato la potenza spettrale massima dei relativi picchi a 720, 480 e 240 minuti - P12, P8, P4 - dell'analisi di Fourier). Mentre per le periodicità inferiori alle 4 ore, vista la difficoltà nell'individuare un periodo preciso di riferimento, abbiamo considerato due bande temporali nelle quali era maggiormente concentrata la presenza di ritmi ultradiani: 100-300 minuti e 300-480 minuti (PP480-300, PP300-100), di cui abbiamo preso in considerazione l'ampiezza media (cioè la potenza spettrale media ponderata delle due bande).

Nelle analisi spettrali tutti gli animali mostravano un picco altamente significativo a 12, 8 e 4 h sia in LD che in DD. Nell'analisi statistica sui valori delle ampiezze non abbiamo osservato nessun effetto, quindi le potenze erano uguali sia fra i ceppi che fra i fotoperiodi.

Benché lo strumento non sia adeguato allo scopo, per mezzo di Wintau è stata calcolata la lunghezza del periodo maggiormente significativo nel range 1-8 ore (τ_{1-8}). Generalmente il periodo in DD era più lungo rispetto alla condizione LD, ma una differenza statisticamente significativa è stata osservata solo per i C. L'ANOVA ha evidenziato una significatività per il fotoperiodo [$F(1, 22)=9.44, p<0.01$], mentre non sono state osservate differenze fra i ceppi.

Un andamento simile lo abbiamo riscontrato anche per la potenza ponderata nel range 480-300 minuti. L'ANOVA ha evidenziato la presenza di un'interazione significativa Ceppo*Fotoperiodo [$F(1, 22)=5.63, p<0.05$], con una differenza significativa fra i due ceppi per la potenza in DD, dove i C mostrano un valore più elevato rispetto ai B6 ($p<0.01$). E nuovamente una differenza fra la condizione LD e DD per i C ($p<0.05$).

Per il range 300-100 minuti, una banda nella quale sono sempre visibili picchi significativi, osservammo un effetto per il ceppo [$F(1, 22)=4.37, p<0.05$] e per il fotoperiodo [$F(1, 22)=11.25, p<0.01$]. In questo caso i B6 mostrarono una differenza significativa fra LD e DD ($p<0.01$) ed una potenza maggiore dei C per la condizione DD ($p<0.05$).

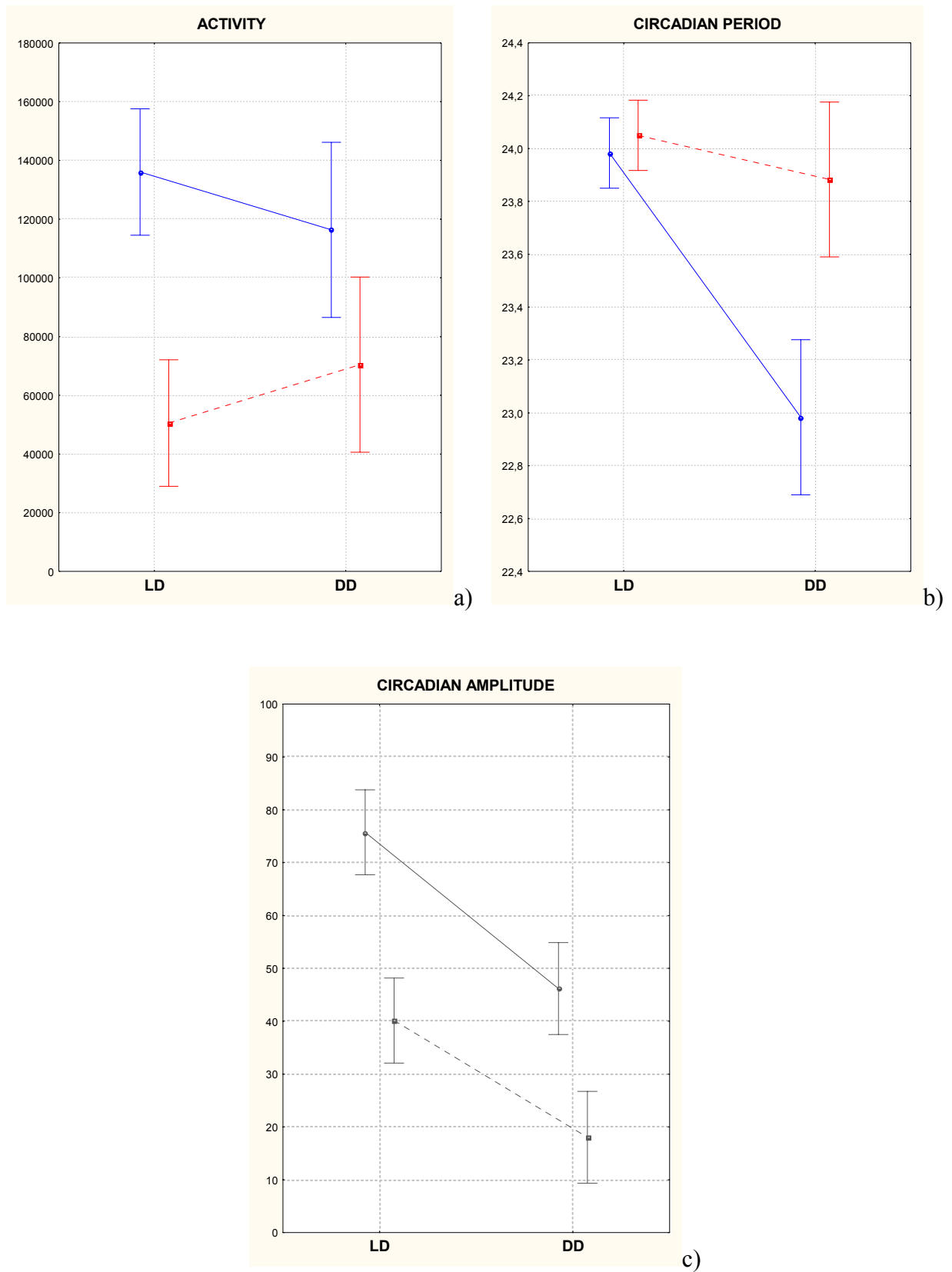


Fig. 3. Distribution of 3 strain-depend parameters; blu-line C, red-line B6.

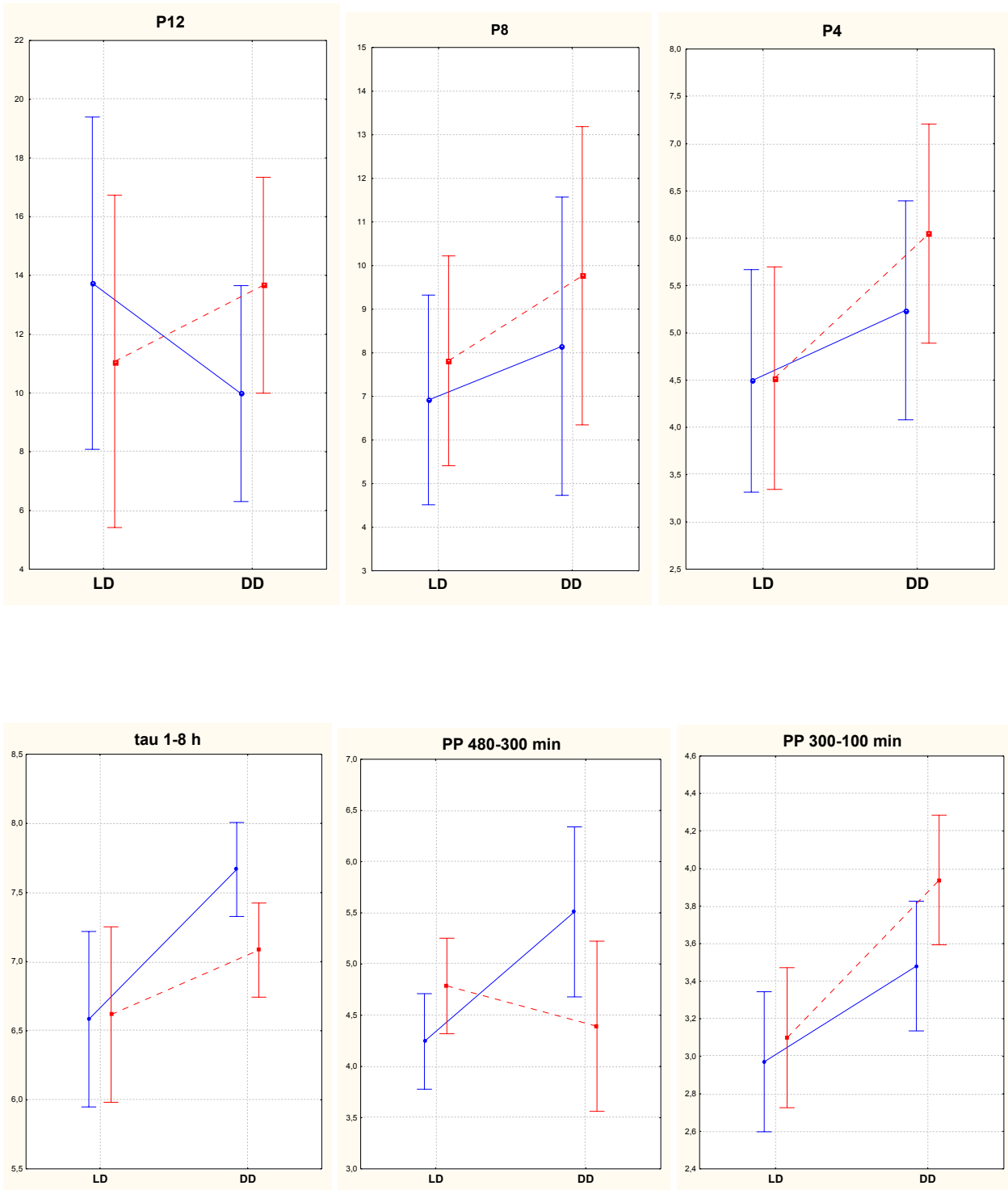


Fig. 4. Ultradian parameters

Discussione

In questo lavoro abbiamo registrato l'attività locomotoria di due ceppi puri di topo B6 e C in due condizioni di illuminazione LD 12:12 e DD. Il nostro obiettivo era quello di caratterizzare esattamente i parametri ultradiani di attività nei C e B6. Dal nostro studio abbiamo potuto osservare la presenza di una struttura composta dell'attività locomotoria con la presenza di differenti ritmi ultradiani.

I due ceppi inbred sono ben conosciuti per le differenze di base genetica in alcuni parametri comportamentali, fra cui la lunghezza del periodo circadiano nell'attività locomotoria, per il quale i due ceppi mostrano valori molto differenti. Inoltre studi precedenti hanno descritto il ceppo C come caratterizzato da un periodo circadiano endogeno più corto e poco stabile, cioè influenzato dalle variazioni delle condizioni ambientali, infatti in condizioni DD il periodo si allontana molto dalle 24 ore. Mentre il ceppo B6 ha un ritmo endogeno più lungo e stabile che è poco influenzato dalle condizioni ambientali esterne, difatti in DD il periodo è molto simile a quello che si osserva in LD. Anche nel nostro studio il ceppo B6 mostra un periodo più lungo e stabile rispetto al C. I nostri dati sono perfettamente in accordo con tutta la letteratura precedente, non possiamo quindi che avvalorare la presenza di una componente genetica alla base di questo tratto (Schwartz and Zimmerman 1990; Mayeda, 1999). Diversa invece è la situazione per quanto riguarda la quantità di attività e l'ampiezza del ritmo circadiano. In letteratura si trovano dati contrastanti per animali appartenenti allo stesso ceppo, provenienti dallo stesso laboratorio e monitorati con medesimi strumenti (Tab.3). I nostri stessi dati sono in disaccordo con alcuni studi ed in accordo con altri studi presentati in letteratura (Tab. 3). Generalmente i nostri dati si trovano in accordo con dati provenienti da strumenti di monitoraggio passivi (Beau, 1991, 1992; (Kopp, 1998; Tang, 2002). Strumenti che noi riteniamo debbano essere tenuti in maggior considerazione per le ragioni spiegate nell'introduzione. Un'ultima annotazione per quanto riguarda l'ampiezza, in entrambi i ceppi la potenza in DD era notevolmente inferiore rispetto a LD.

La corrispondenza dei nostri dati con la letteratura la consideriamo una ulteriore validazione della strumentazione da noi sviluppata, che si va ad aggiungere al lavoro specifico inizialmente approntato (Pasquali, paragrafo 2.2). Inoltre la corrispondenza dei nostri dati con la letteratura sul circadiano ci permette di guardare ai dati sugli ultradiani con una certa tranquillità riguardo alla loro "bontà".

Come riportato nei risultati, l'analisi spettrale ha evidenziato una chiara ritmicità ultradiana con diversi picchi compresi nel range fra 1 e 12 ore sia in LD che in DD, periodicità che superavano abbondantemente il livello di significatività. In generale, benché siano state osservate alcune

differenze, riteniamo di poter affermare almeno sino ad ulteriori replicazioni, che non vi sono differenze ceppo-dipendenti per quanto riguarda i vari parametri della ritmicità ultradiana considerati in questo studio. Nel particolare i periodi a 12 h, 8 h e 4 h mostravano a livello statistico la stessa potenza in entrambi i ceppi ed in entrambe le condizioni. Diversa la situazione per la lunghezza del periodo ultradiano nel range 1-8 h e della potenza ponderata per i range 480-300 e 300-100, dove vi sono delle differenze date dal fotoperiodo e dal ceppo. Diversamente da quanto riportato da Ticher (1995) noi abbiamo osservato la presenza del periodo a 4 ore in tutti gli animali senza una differenza ceppo-dipendente.

Come abbiamo avuto modo di esporre in questo lavoro, i ritmi ultradiani vengono espressi indipendentemente dal fotoperiodo, ed indipendentemente dal circadiano. Benché nella condizione DD risultino più visibili, essi comunque sono espressi anche in LD con ampiezze simili. In effetti in letteratura vengono spesso osservati in condizioni DD o con cicli luce-buio molto diversi e distanti dal LD 12:12, questo probabilmente perché gli algoritmi statistico-matematici riescono ad evidenziarli con maggior facilità quando vi è una diminuzione in ampiezza del circadiano. Riteniamo quindi che possa essere interessante lo studio di tale ritmicità con differenti fotoperiodi.

Table 2. Risultati dei confronti per ceppo e per fotoperiodo

PHOTOPERIOD				STRAIN					
LD			DD		C		B6		
C	>	B6	activity	C	>	B6	LD	=	DD
C	=	B6	tau 24	C	>	B6	LD	>	DD
C	>	B6	P 24	C	>	B6	LD	>	DD
C	=	B6	P 12	C	=	B6	LD	=	DD
C	=	B6	P 8	C	=	B6	LD	=	DD
C	=	B6	P 4	C	=	B6	LD	=	DD
C	=	B6	tau 1-8	C	=	B6	LD	<	DD
C	=	B6	PP 480-300	C	>	B6	LD	<	DD
C	=	B6	PP 300-100	C	<	B6	LD	=	DD
							LD	<	DD

Table 3. Studies on rodents activity patterns show different results.

CIRCADIAN PERIOD				
(tau)	Photoperiod	Device	Lab.	Ref.
C (23.40)	-	-	-	Hans (1967)
C (22.70)	-	-	-	Possidente (1982)
B6 (23.59)	-	-	-	Ebihara et al (1978)
B6 (23,28)	-	-	-	Ebihara (1988)
B6 (23,52)	-	-	-	Abe (1989)
B6 (23.92)	DD	Infrared-beam*	JAX	(Mayeda, 1999)
B6>C (23.73-22.90)	-	-	-	(Possidente, 1988)
B6>C (24.05-23.98)	LD 12:12	Radar	C.R.L.	This study
B6>C (23,77-22,94)	DD	Running-wheel	JAX	(Schwartz, 1990)
B6>C (23.64-22.80)	DD	Running-wheel	JAX	(Shimomura, 2001)
B6>C (23.88-22.98)	DD	Radar	C.R.L.	This study

AMPLITUDE				
	Photoperiod	Device	Lab.	Ref.
C>B6	LD 12:12	Radar	C.R.L.	This study
C>B6	DD	Ir actograph	C.R.L.	(Beau, 1991, 1992)
B6>C	DD	Running-wheel	JAX	(Shimomura, 2001)
C>B6	DD	Radar	C.R.L.	This study

ACTIVITY				
	Photoperiod	Device	Lab.	Ref.
C>B6	LD 12:12	Ir actograph	C.R.L.	(Beau, 1991, 1992)
C>B6	LD 12:12	Infrared-beam [†]	I.C.	(Kopp, 1998)
B6>C	LD 12:12	Infrared-beam*	H.O.	(Rogers, 1999)
B6>C	LD 12:12	Telemetry	JAX	(Toth, 1999)
C>B6	LD 12:12	Infrared-beam*	JAX	(Tang, 2002)
C>B6	LD 12:12	Radar	C.R.L.	This study
B6>C	DD	Running-wheel	JAX	(Shimomura, 2001)
C>B6	DD	Radar	C.R.L.	This study

[†]) Transitions ; *) Line ; n.r. - not report ;

C.R.L. - Charles River Laboratory; JAX - Jackson Laboratory; I.C. - IFFE CREDO (France); H.O. - Harlan-Olac (United Kingdom)

Bibliografia

Aschoff J, Wever R. (1965). Circadian rhythms of finches in light-dark cycles with interposed twilights. *Comp Biochem Physiol.* Dec;16(4):507-14.

Aschoff J (1981). *Handbook of behavioral neurobiology*, vol 4 biological rhythms. New York: Plenum

Beau, J. (1991) Activity rhythms in inbred mice: genetic analysis with recombinant inbred strains *Behavior Genetics*, 21, n°2, 117-129

Beau J. (1992). Activity rhythms in mice. III: Stability and plasticity of rhythm characteristics in experimental and environmental conditions. *Physiol Behav.* Aug;52(2):231-5.

Büttner, D. Wollnik, F. (1984). Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat *Behavior Genetics*, vol.14, n°2, 137-152

Conte, S., D'Olimpio, F. & Renzi, P. (1995a). Uno strumento per la registrazione dell'attività motoria. *Rivista di Psicologia*, LXXX (1), 69-69.

Conte S., Ferlazzo F., Renzi P., (1995b). Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biol. Psych.*, 39: 159-172

Daan, S. & Pittendrigh (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J Comp. Physiol.* 106: 253-266

Daan, S.; Aschoff, J. Short-term rhythms in activity. In: Aschoff, J.; ed. *Handbook of behavioural neurobiology*. vol. 4. *Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, :491– 498; 1981.

Gerkema, M.P., S. Daan, H. Wilbrink, M. W. Hop and F. van der Leest (1993) Phase control of ultradian feeding rhythms in the common vole (*Microtus arvalis*) the roles of light and the circadian system. *J. Biol. Rhythms* 8: 151-171.

Goldowitz, D., Wahlsten, D., and Wimer, R. E. (1992). *Techniques for the Genetic Analysis of Brain and Behavior: Focus on the Mouse*, Elsevier, New York.

- Hofstetter, J. R., Mayeda, A. R., Possidente, B., and Nurnberger, J. I., (1995). Quantitative trait loci (QTL) for circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Behav. Genet.* 25:545-556.
- Honma K, Hiroshige T. (1978a). Simultaneous determination of circadian rhythms of locomotor activity and body temperature in the rat. *Jpn J Physiol.*;28(2):159-69.
- Honma KI, Hiroshige T. (1978b). Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light. *Am J Physiol.* Nov;235(5):R243-9.
- Honma K, Hiroshige T, (1978c). Endogenous ultradian rhythms in rat exposed to prolonged continuous light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 235: R250-R256
- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M. C., Delagrance, P., Guardilola-Lemaitre, B., Misslin, R. 1998. Effects of daylight cycle reversal on locomotor activity in several inbred strains of mice. *Physiology & Behavior*, 63, 577-585.
- Low-Zeddies, S. S., Takahashi, J. S. 2001. Chimera analysis of the clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell*, 105, 25-42.
- Mayeda, A. R., Hofstetter, J. R., Belknap, J. K., and Nurnberger, J. I., (1996). Hypothetical quantitative trait loci (QTL) for circadian period of locomotor activity in CXB recombinant inbred strains of mice. *Behav. Genet.* 26:505-511.
- Mayeda, A. R., Hofstetter, J. R. 1999. A QTL for the genetic variance in free-running period and level of locomotor activity between inbred strains of mice. *Behavior Genetics*, 29, 171-176.
- Pasquali V. & Renzi P. (2005). On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: an application with *Periplaneta americana* *Behavior Research Methods, Instrumentation & Computers*. Vol. 37, N. 2, pp 523-528 .
- Peleg, L., Weigl, Y., Dotan, A. & Ashkenazi I.E. (2001). Inherited variability of locomotor activity rhythms in mice: strain and gender differences. *Chron. Int.*, 18:1181-1182

- Poon AM, Wu BM, Poon PW, Cheung EP, Chan FH, Lam FK. (1997). Effect of cage size on ultradian locomotor rhythms of laboratory mice. *Physiol Behav.* Dec;62(6):1253-8.
- Possidente, B., and Stephan, F. K. (1988). Circadian period in mice: Analysis of genetic and maternal contributions to inbred strain differences. *Behav. Genet.* 18:109-117.
- Rogers, D. C., Jones, D. N. C., Nelson, P. R., Jones, M., Quilter, C. A., Robinson, T. L., Hagan, J. J. 1999. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, 105, 207–217.
- Schwartz, W. J., and Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* 10:3685-3694.
- Sharma, V. K. 2003. Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology international*, 20, 901-919.
- Shimomura, K., Low-Zeddies, S. S., King, D. P., Steeves, T. D. L., Whiteley, A., Kushla, J., Zemenides, P. D., Lin, A., Hotz Vitaterna, M., Churchill, G. A., Takahashi, J. S. 2001. Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Research*, 11, 959-980.
- Sokolove, P.G., and Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72, 131–160.
- Sprott, R. L., and Staats, J. (1979). Behavioral studies using genetically defined mice—A bibliography (July 1976-August 1978). *Behav. Genet.* 9:87-102.
- Tang, X., Orchard, S. M., Sanford, L.D. 2002. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behavioural Brain Research*, 136, 555-569.
- Ticher, A., Ashkenazi, I. E. 1995. Compound structure of rodents activity rhythm. *Physiology & Behavior*, 57, 37-40.

Toth, L. A., Williams, R. W. 1999. A quantitative genetic analysis of locomotor activity in CXB recombinant inbred mice. *Behavior Genetics*, 29, 319-328.

Wollnik F, Dohler KD. (1986). Effects of adult or perinatal hormonal environment on ultradian rhythms in locomotor activity of laboratory LEW/Ztm rats. *Physiol Behav.* 38(2):229-40.

Wollnik F, Gartner K, Buttner D. (1987) Genetic analysis of circadian and ultradian locomotor activity rhythms in laboratory rats. *Behav Genet.* 17(2):167-78.

3.2 Differenze sessuali nei ritmi di attività motoria di topi c57bl/6 e balb/c

[Pharmacologyonline (submitted)]

Introduzione

La corrispondenza tra le ciclicità ambientali di 24 ore e l'espressione di funzioni biologiche ritmiche anch'esse con periodo di 24 ore, ha portato a concludere che il periodo maggiore dell'orologio biologico è il circadiano. I ritmi circadiano sono stati abbondantemente studiati in ambito cronobiologico, mentre una minor attenzione è stata data ai ritmi ultradiani. I ritmi brevi differiscono dal circadiano poiché prima di tutto non corrispondono a nessuna periodicità ambientale, inoltre mostrano un'ampia variabilità. Nonostante ciò, essi mostrano spesso delle oscillazioni precise e ricorrenti in diverse specie, è quindi necessario guardare a loro come ad una importante componente dell'organizzazione temporale del comportamento (Daan & Aschoff, 1981). In ambito cronobiologico le procedure sperimentali prevedono l'utilizzo di animali di sesso maschile. Tale indicazione è dovuta a ragioni correlate al ciclo ormonale femminile che, in base ad osservazioni sperimentali, sembrerebbe influire sull'attività locomotoria. (Green, 1966). Vi sono però dati contrastanti riguardo tale correlazione. Ebihara e Tsuji (1976) non osservarono una significativa influenza dell'estro sui cicli giornalieri di attività di topi monitorati con tamburi rotanti. Diversamente, Wollnik et al. (1985, 1986) osservarono differenze sessuali in ratti per quel che riguarda il pattern di attività ed in particolare dei ritmi di attività motoria. Inoltre osservarono che i maschi mostravano più componenti ultradiane rispetto alle femmine. In un altro studio su topi ed in particolare sui ceppi BALB/c e C57BL/6, Beau (1992) utilizzò animali femmine al fine di studiare il ritmo circadiano di attività. I risultati mostrarono che i parametri di attività si erano mantenuti abbastanza stabili durante tutto l'esperimento, quindi non vi era una modulazione da parte dell'estro sui ritmi di attività. Inoltre osservò la presenza di periodi ultradiani nel range 1-12 h. Lo studio dei ritmi ultradiani è particolarmente difficile, sia per l'identificazione dei ritmi brevi che mostrano una grande variabilità, mediante algoritmi matematici; che per il sistema di monitoraggio che non deve creare effetti di mascheramento, né interagire o influenzare il normale comportamento dell'animale. Ad esempio, uno degli strumenti maggiormente utilizzati, i tamburi rotanti, tendono ad influenzare i pattern di attività dei roditori e devono essere considerati dei sistemi di rilevamento attivi poiché mascherano la struttura endogena dei ritmi espressi dall'animale, soprattutto gli ultradiani (Ticher, 1995). In questo lavoro ribadiamo l'importanza dell'uso di apparecchiature

automatiche nello studio dei ritmi biologici, soprattutto dei ritmi ultradiani, i quali essendo già di per sé dotati di un'alta variabilità, verrebbero ulteriormente influenzati da uno strumento che fosse intrusivo nell'attività da monitorare.

Obiettivo di questo lavoro è verificare la presenza di una differenza sessuale nell'attività locomotoria di due ceppi inbred di topo, caratterizzando al contempo le ritmicità endogene nell'attività locomotoria. A tal fine i dati ottenuti dall' esperimento con topi femmina sono stati comparati con i dati di uno studio precedente (Pasquali, paragrafo 3.1) nel quale erano stati caratterizzati tutti i parametri riguardanti i ritmi di attività locomotoria dei ceppi Balb/c e C57BL/6.

Materiali e metodi

Soggetti

I soggetti utilizzati erano topi inbred del ceppo C57BL/6 (n=4) e del ceppo BALB/c (n=4) provenienti dalla Charles River Lab. (Calco, Como, Italia). I topi avevano 8 settimane all'inizio delle registrazioni e sono stati stabulati singolarmente con cibo ed acqua ad libitum.

Procedura

Tre giorni prima di iniziare le registrazioni, gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbie 369 x 156 x 132(h) mm. Le gabbie furono sistemate sull'apparato di registrazione situato in una stanza acusticamente isolata e climatizzata. Inizialmente fu impostato un fotoperiodo LD 12:12 e l'attività locomotoria degli animali fu registrata per 7 giorni con questo fotoperiodo. Per i successivi 21 giorni, gli animali furono monitorati con fotoperiodo DD. Ai fini delle nostre analisi considerammo solo gli ultimi 7 gg poiché considerammo i primi 14 gg in DD adattamento

Apparato radar per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'apparato utilizzato per il monitoraggio degli animali era un sistema autocostruito, il VIVARD-12 (Pasquali, paragrafo 2.2), una batteria di 12 radar a microonde basati sul principio dell'effetto Doppler che operano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl)(Fig.1). Tutti i radar erano collegati ad personal computer che per mezzo di una scheda di I/O ed un programma scritto in C fungeva da data logger. Il programma permetteva inoltre di impostare diversi parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti). Prima di avviare le registrazioni sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) medesime misurazioni da parte di tutti i radar, c) mantenimento della stabilità

delle regolazioni nel tempo. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato.

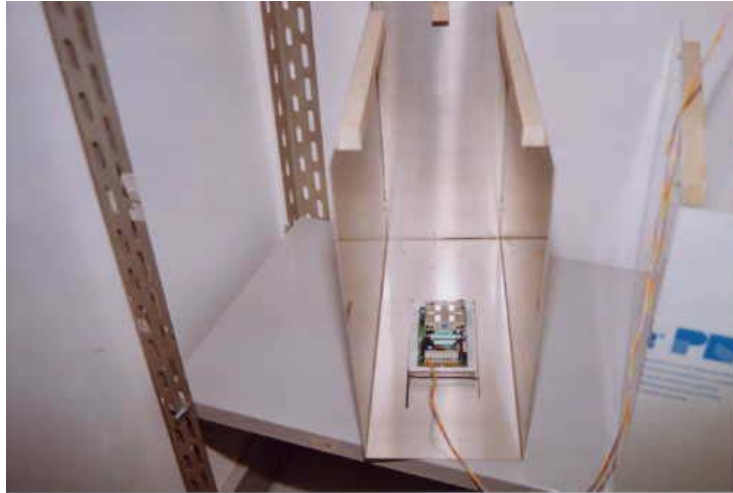


Fig. 1 Uno degli elementi di cui è composto l'apparato

Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state detrendizzate e trattate con un procedimento di media mobile a tre punti. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi della DFT sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2,88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.001$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

L'ampiezza del periodo circadiano e di quelli ultradiani era definita in termini di potenza spettrale dei picchi come presentata dall'analisi spettrale (Low-Zeddies, 2001). Abbiamo considerato diverse misure di potenza spettrale: valore massimo di un singolo picco e media ponderata di un range. I valori massimi sono stati considerati per il periodo a 24 h, 12 h, 8 h e 4h, mentre quelli totali sono stati considerati per il range 480-300 min e 300-100 min.

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a misure ripetute. Quando appropriato abbiamo utilizzato il test post-hoc (Fisher Test). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$.

Risultati

I dati ottenuti dalle registrazioni sulle femmine sono stati confrontati con i dati di un precedente lavoro sui maschi (Pasquali, 2003). Al fine di eseguire i confronti fra i sessi, anche per le femmine abbiamo considerato gli stessi parametri utilizzati per i maschi: attività, periodo circadiano potenza massima del circadiano, potenza massima del 12 ore, potenza massima del 8 ore, potenza massima del 4 ore, periodo ultradiano nel range 1-8 ore, potenza ponderata nella banda 480-300 minuti e potenza ponderata 300-100 minuti. Tutti i confronti sono stati eseguiti mediante ANOVA a misure ripetute in cui ceppo e sesso erano le variabili indipendenti ed i due livelli del fotoperiodo per il parametro considerato di volta in volta, le variabili dipendenti.

Attività locomotoria

Abbiamo osservato delle differenze sessuali circa l'attività motoria, le femmine di entrambi i ceppi mostravano una quantità di attività superiore rispetto ai maschi [$F(1,28)=36.29$, $p<0.0001$]. Differenze significative erano osservabili anche fra i ceppi, con una maggiore attività dei Balb [$F(1,28)=14.82$, $P<0.001$]. Non sono state osservate differenze significative per il fotoperiodo, né per le diverse interazioni.

Ritmo circadiano

La lunghezza del periodo circadiano è stata calcolata su registrazioni di soli 7 giorni, ciò nonostante è stato comunque possibile calcolare il parametro con buona precisione, al fine di eseguire i confronti con i dati sui maschi. Dati che anche in quel caso erano stati calcolati su registrazioni di 7 giorni ma su un numero di soggetti superiore.

Table 1. Lunghezza del periodo circadiano

		MEAN	SD
BALB M		23,98	0,06
BALB F	LD	24,00	0,00
C57 M		24,05	0,31
C57 F		23,95	0,10
BALB M		22,98	0,28
BALB F	DD	23,35	0,19
C57 M		23,88	0,64
C57 F		23,80	0,16

Generalmente è osservabile un periodo circadiano più lungo nei C57 sia in LD che in DD (Tab. 1). Inoltre anche nelle femmine ritroviamo il pattern di stabilità/instabilità osservabile nei maschi: i

C57 mostrano un periodo circadiano invariato fra LD e DD ($t=1.56$, $df=3$, $p=0.21$), diversamente dai Balb che si caratterizzano come instabili ($t=6.78$, $df=3$, $p<0.01$). L'ANOVA ha evidenziato un effetto per il ceppo [$F(1, 28)=13.44$, $p<0.01$] con un periodo generalmente più lungo nei C57, e per il fotoperiodo [$F(1, 28)=22.17$, $p<0.001$] con un periodo più corto in DD. In fine vi era un interazione significativa Ceppo x Fotoperiodo [$F(1,28)=10.19$, $p<0.01$].

L'ampiezza del periodo circadiano ha rivelato un andamento molto simile a quanto osservato nei maschi. In generale le femmine mostrarono un'ampiezza maggiore rispetto ai maschi e non ci sono differenze significative nelle femmine rispetto alla potenza nei due fotoperiodi, diversamente da quanto si osserva per i maschi. L'ANOVA rivela un effetto atteso per il fotoperiodo [$F(1,28)=46.52$, $p<0.001$] con una potenza maggiore in LD, ma anche un effetto per il sesso [$F(1,28)=30.29$, $p<0.001$] con una potenza maggiore per le femmine e per il ceppo dove i Balb mostrano una potenza superiore ai C57 [$F(1, 28)=46.52$, $p<0.001$]. Abbiamo un'interazione significativa per Ceppo x Sesso [$F(1,28)=8.27$, $p<0.01$].

Ritmi ultradiani

Dall'analisi spettrale mediante DFT è stato possibile rilevare la presenza in tutti gli animali di ritmi ultradiani significativi nell'attività locomotoria generale, in particolare a 12 h, 8 h 4 h e sotto le 4 ore dove erano osservabili diversi picchi significativi. Per il range temporale 1-8 ore abbiamo proceduto a diverse analisi: calcolo del periodo maggiormente significativo mediante il software Wintau (v'è specificato che tale software è più indicato per lo studio del periodo ultradiano), e potenza ponderata nelle bande 480-300 minuti e 300-100 minuti, nelle quali sono sempre osservabili periodicità ultradiane.

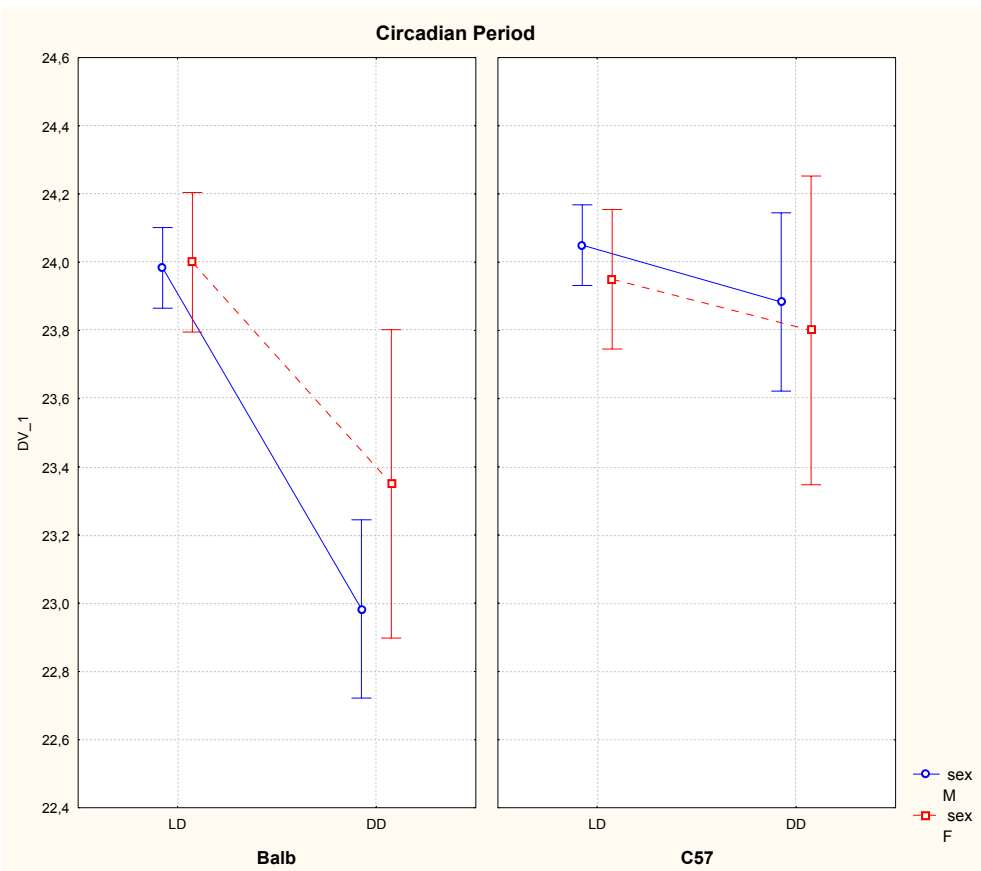
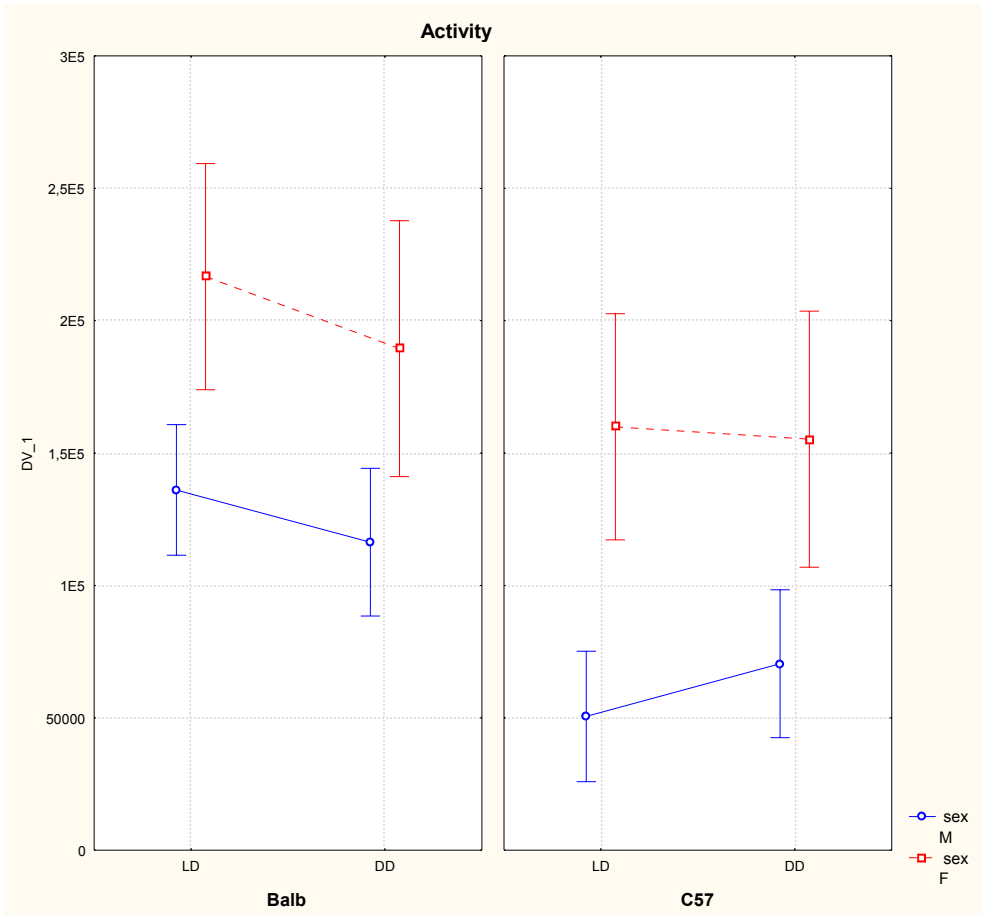
Per i periodi 12, 8 e 4 h abbiamo considerato la potenza spettrale del picco e l'ANOVA generalmente non ha riportato alcun effetto significativo tranne che per il 4 h [$F(1,28)=13.32$, $p<0.01$] dove la potenza in DD è superiore.

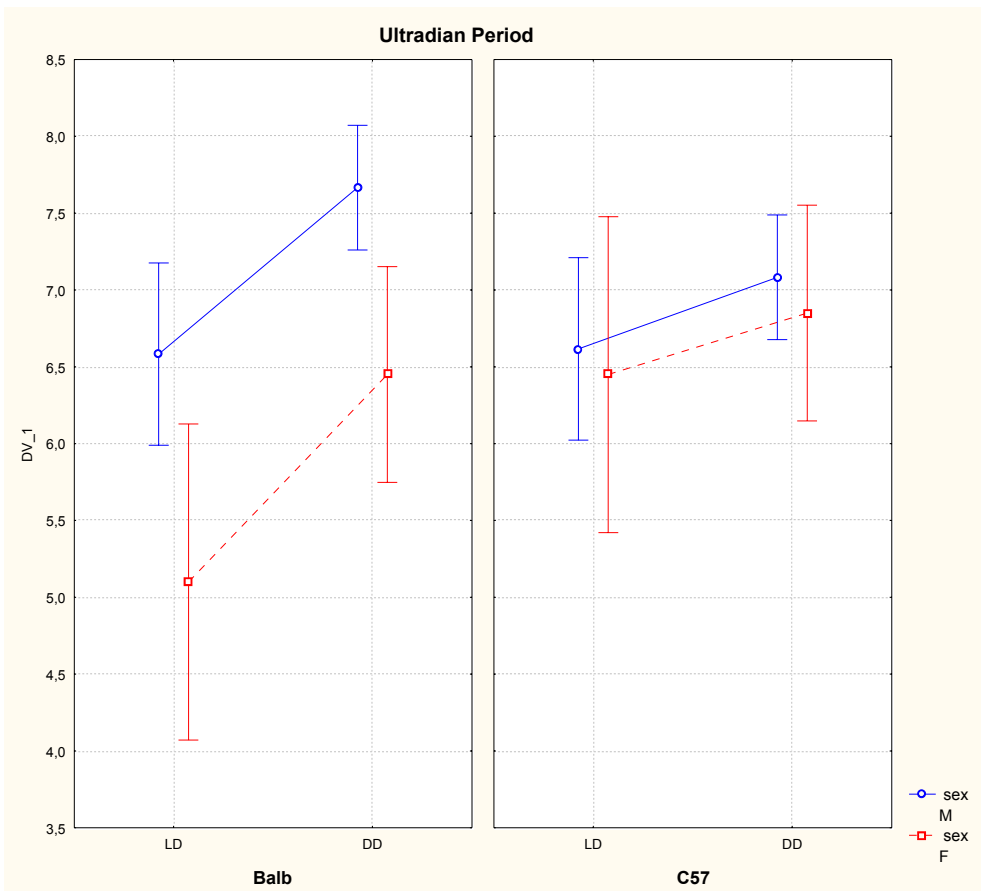
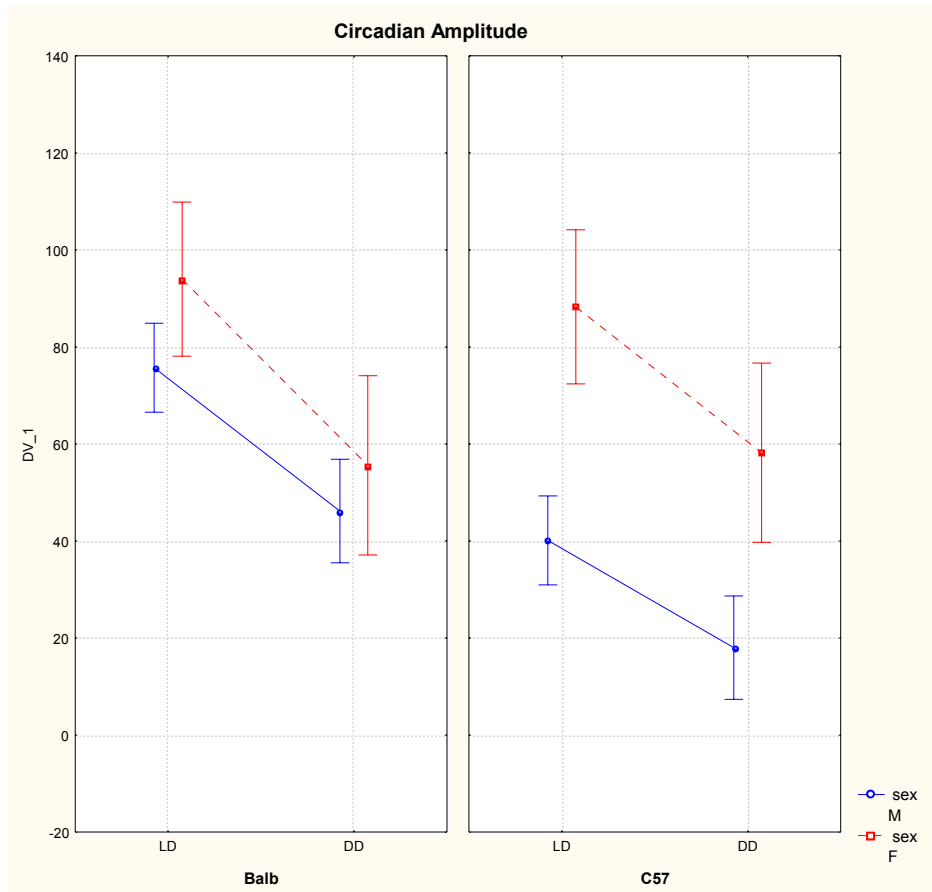
Fondamentalmente l'andamento degli ultimi tre parametri è abbastanza simile, benché siano presenti delle differenze, in alcuni casi anche significative, resta comunque una tendenza simile. Per la lunghezza del periodo nel range 1-8 h c'è da riportare un effetto per il sesso [$F(1, 28)=9.61$, $p<0.01$] con i maschi che mostrano un periodo più lungo, ed un effetto per il fotoperiodo [$F(1, 28)=11.20$, $p<0.01$] con un periodo più lungo in DD.

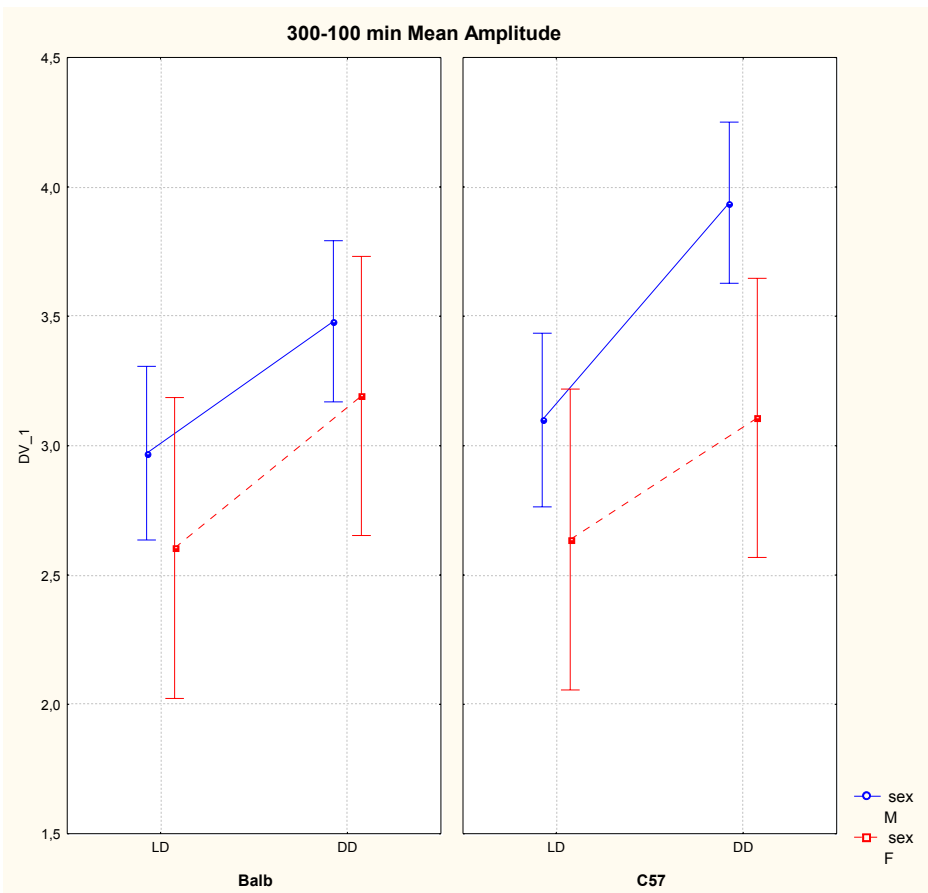
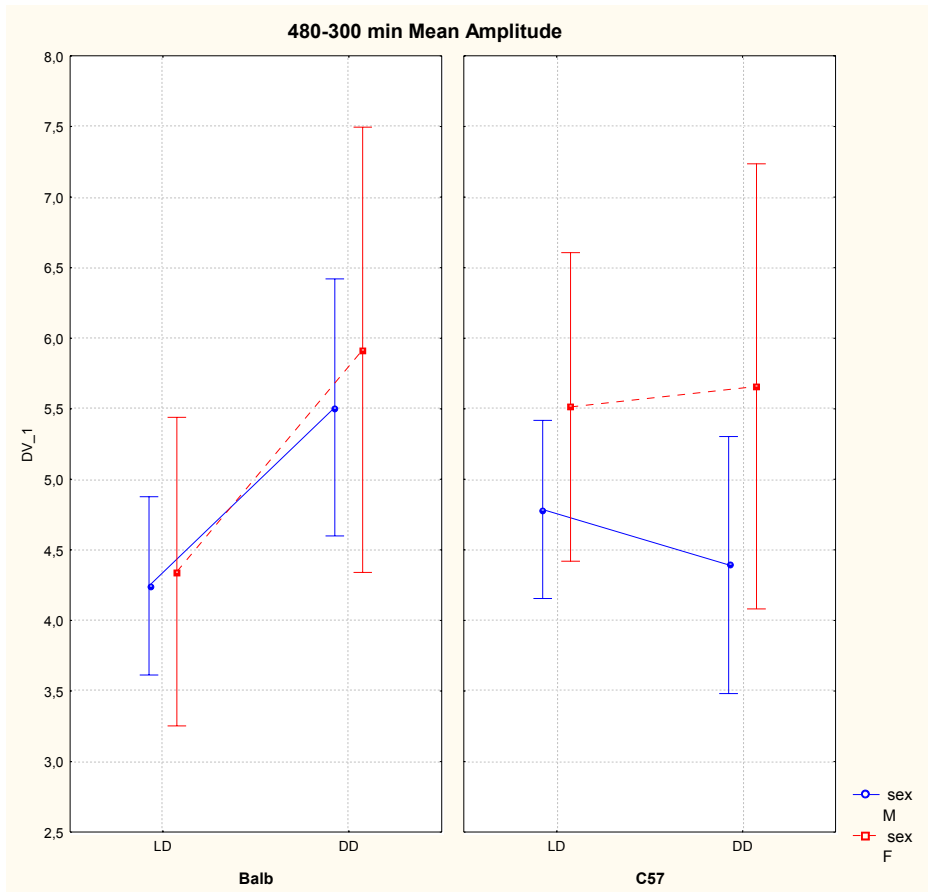
Per le potenze ponderate il dato più significativo è la presenza di un aumento della potenza nella condizione DD, una tendenza all'aumento che osserviamo anche nei maschi. Un effetto che vediamo come tendenza per il pp480-300, ma che troviamo significativo per il pp300-100 [$F(1, 28)=11.08$, $p<0.01$].

Tabella 2. Sommario dei valori medi di tutti i parametri considerati nelle analisi

			LD		DD	
			Mean	SD	Mean	SD
			(x10 ³)	(x10 ³)	(x10 ³)	(x10 ³)
activity	Balb	M	136,06	42,42	116,34	61,99
	C57	M	50,54	28,11	70,43	33,46
	Balb	F	216,66	77,08	189,42	37,78
	C57	F	159,92	28,20	155,24	34,41
tau 24			hr	hr	hr	hr
	Balb	M	23,98	0,06	22,98	0,28
	C57	M	24,05	0,31	23,88	0,64
	Balb	F	24,00	0,00	23,27	0,19
power 24	Balb	M	75,73	13,94	46,17	18,21
	C57	M	40,14	12,91	18,04	9,53
	Balb	F	94,00	22,18	55,61	27,72
	C57	F	88,28	20,73	58,23	26,82
power 12	Balb	M	13,74	11,83	9,98	3,75
	C57	M	11,07	6,21	13,67	7,83
	Balb	F	13,30	8,61	13,64	9,93
	C57	F	7,53	2,60	11,58	5,18
power 8	Balb	M	6,92	5,14	8,15	4,81
	C57	M	7,82	2,43	9,77	6,50
	Balb	F	10,46	5,82	6,67	3,25
	C57	F	7,34	1,92	7,38	4,31
power 4	Balb	M	4,49	1,45	5,24	1,69
	C57	M	4,52	2,37	6,05	2,15
	Balb	F	3,18	1,04	6,08	0,85
	C57	F	3,08	1,29	7,17	5,82
tau 1-8			hr	hr	hr	hr
	Balb	M	6,58	1,27	7,67	0,20
	C57	M	6,62	0,80	7,08	0,78
	Balb	F	5,10	0,60	6,45	0,90
pow. pond. 480-300	Balb	M	4,24	0,81	5,51	1,37
	C57	M	4,79	0,74	4,39	1,41
	Balb	F	2,61	0,13	3,19	0,26
	C57	F	2,64	0,38	3,11	0,28
pow. pond. 300-100	Balb	M	2,97	0,47	3,48	0,62
	C57	M	3,10	0,75	3,94	0,53
	Balb	F	4,35	1,14	5,92	1,40
	C57	F	5,51	2,21	5,66	2,46







Discussione

I dati che riportiamo non mostrano delle differenze nette fra i sessi. Benché in alcuni casi si osservino delle differenze significative, gli effetti evidenziati non sono costanti nei diversi parametri considerati. Il quadro generale che se ne ricava è di una sostanziale similitudine fra i sessi.

L'unica differenza sessuale molto netta emersa da questo lavoro, sia fra i Balb che fra i C57, è la quantità di attività locomotoria. Il livello di attività delle femmine era sempre superiore rispetto ai maschi. Una differenza sessuale per la quantità di attività era già stata riportata per i topi da Broida & Svare (1984) e da Beau (1992); ma il nostro dato è in contrasto con un recente lavoro di Shimomura et al. (2001) che riporta una situazione opposta.

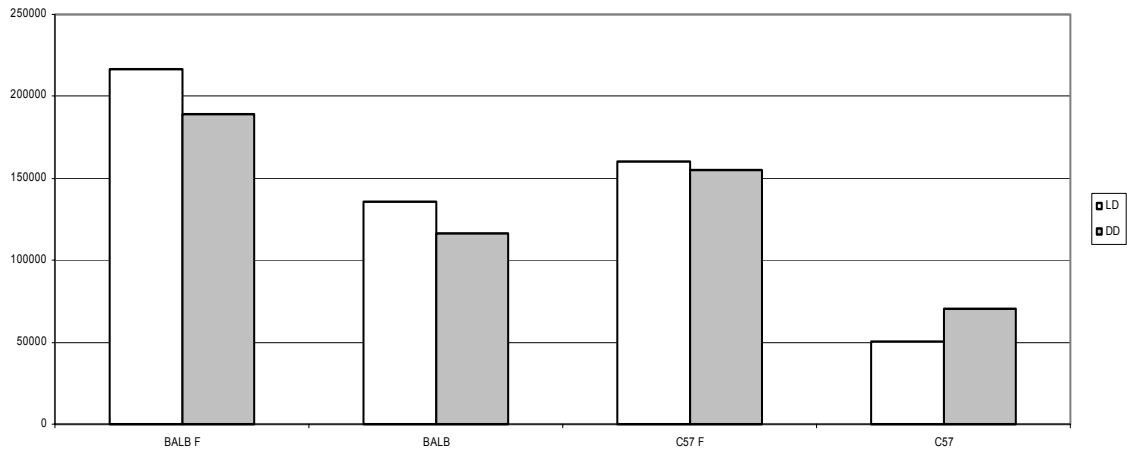
Un dato più volte riportato in letteratura riguardava l'interazione fra sesso e ritmo circadiano di attività locomotoria (Wollnik, 1985, 1986). Uno dei nostri obiettivi quindi era verificare tale interazione, ma dai nostri dati non risultano differenze significative nella lunghezza del periodo circadiano fra i sessi. Inoltre, a maggior supporto della similitudine fra i sessi, anche per le femmine si mantiene quel tipico andamento ceppo-dipendente osservato nei maschi con un periodo che si mantiene stabile al variare del fotoperiodo nei C57, ed una instabilità nei Balb. Và però riportato che nella condizione di free-running (DD) mentre per i maschi si mantengono delle differenze statisticamente significative, la stessa cosa non si osserva per le femmine. Come suggerito in precedenza ciò potrebbe essere dovuto all'esiguo numero di soggetti ed alla maggior variabilità presente. Diversamente da quanto riportato per l'attività, in questo caso i nostri dati sono concordi con il lavoro di (Shimomura et al., 2001) con maschi e femmine che mostrano un periodo simile.

Anche per l'ampiezza del circadiano ritroviamo nelle femmine un andamento del tutto simile a quello dei maschi con delle differenze di potenza certamente correlate alla maggior attività locomotoria generale delle femmine. Differenza che nel caso dei C57 risulta essere significativa.

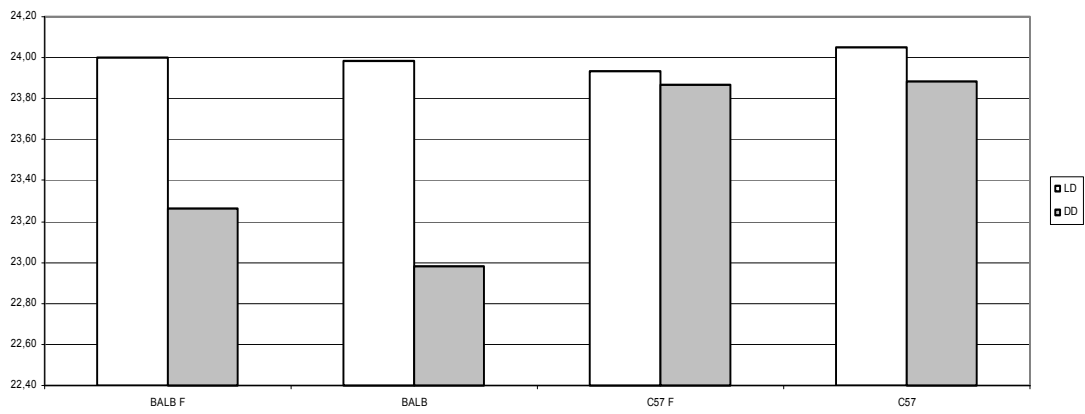
Circa la ritmicità ultradiana possiamo nuovamente affermare che non vi sono differenze macroscopiche tali da considerare le femmine diverse dai maschi. Nuovamente si osserva un andamento abbastanza simile dei parametri e nei relativi valori. Le due differenze significative osservate, periodo ultradiano fra maschi e femmine Balb, e l'ampiezza 300-100 min per i C57 in DD, sono difficilmente interpretabili.

Da questo lavoro abbiamo delle indicazioni abbastanza precise circa l'assenza di differenze sessuali per i parametri considerati fra i Balb ed i C57, fatta eccezione per una netta differenza nell'attività locomotoria.

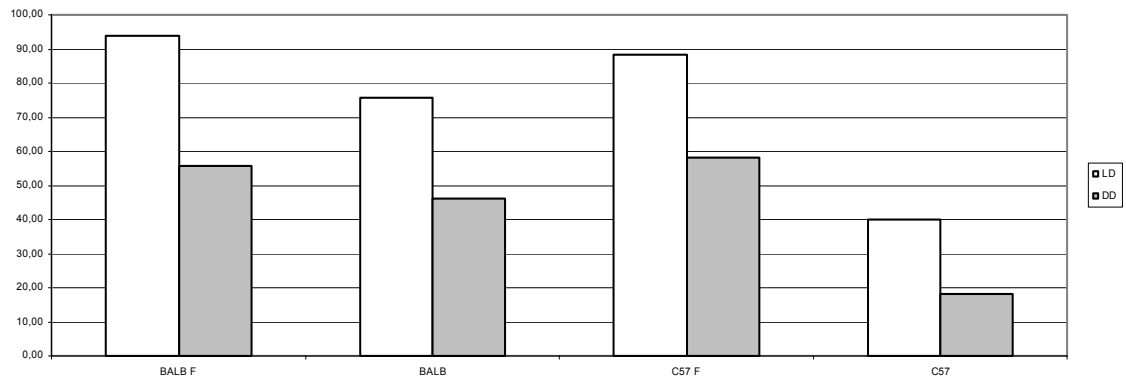
mov



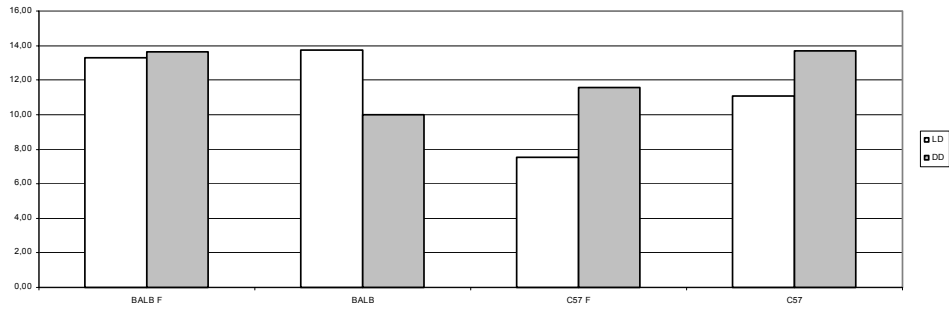
tau24



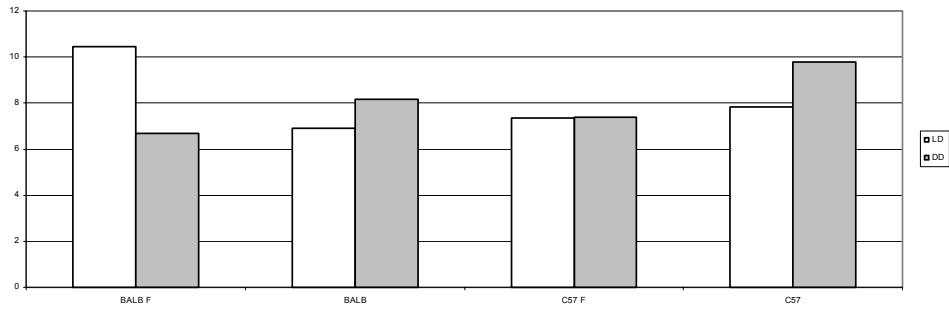
p24



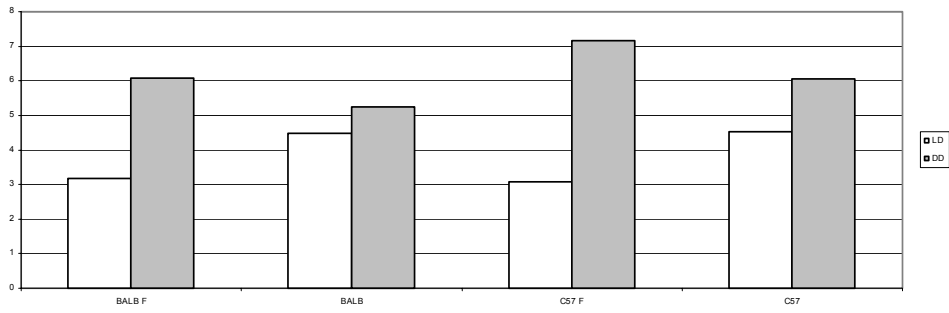
p12



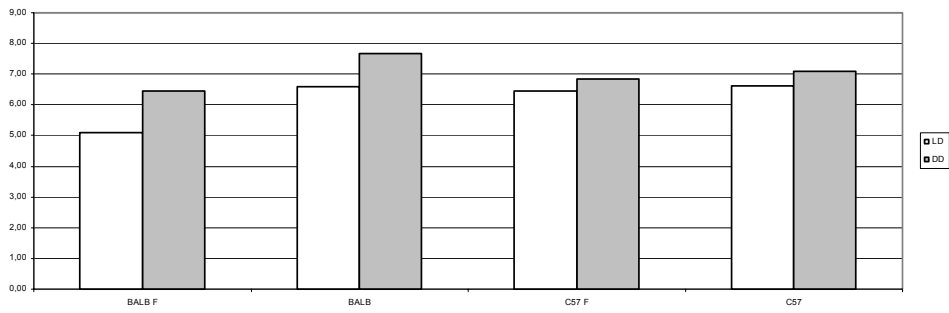
p8



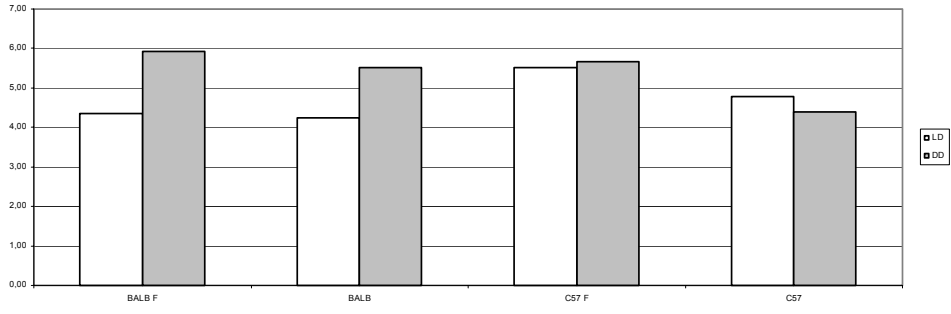
p4



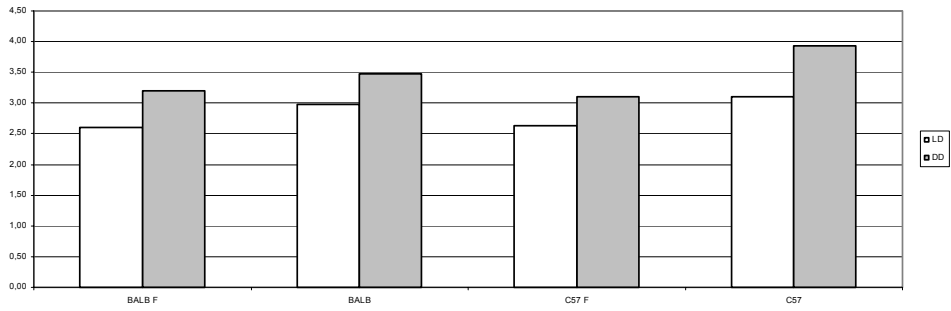
tau 1-8



pp 480-300



pp 300-100



Bibliografia

Beau J. (1992). Activity rhythms in mice. III: Stability and plasticity of rhythm characteristics in experimental and environmental conditions. *Physiol Behav.* Aug;52(2):231-5.

Broida, J and. Svare, B. (1984). Sex Differences in the Activity of Mice: Modulation by Postnatal Gonadal Hormones. *Hormones and Behavior*, 18, 65-78.

Conte S., Ferlazzo F., Renzi P., (1995). Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biol. Psych.*, 39: 159-172

Daan, S.; Aschoff, J. (1981) Short-term rhythms in activity. In: Aschoff, J.; ed. *Handbook of behavioural neurobiology*. vol. 4. *Biological Rhythms*. New York: Plenum Press,:491– 498.

Ebihara, S. & Tsuji, K. (1976). Strain Differences in the Mouse's Wheel-Running Behavior. *Japanese Psychological Research*, 18(1), 20-29.

Green, E.L. *Biology of the laboratory mouse*. New York: McGraw-Hill; 1966.

Low-Zeddies, S. S., Takahashi, J. S. 2001. Chimera analysis of the clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell*, 105, 25-42.

Sherwin, C. M. (1998). Voluntary wheel running: a review and a novel interpretation. *Animal Behaviour*, 56, 11-27.

Shimomura, K. , Low-Zeddies, S. , King, D.P. , Steeves, T.D.L. , Whiteley, A. , Kushla, J. , Zemenides, P.D. , Lin, A. , Vitaterna, M.H. & Churchill, G.A. (2001). Genome-Wide Epistatic Interaction Analysis Reveals Complex Genetic Determinants of Circadian Behavior in Mice. *Genome Research*, 11, 959-980.

Sokolove, P.G., and Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72, 131–160.

Ticher, A. & Ashkenazi (1995). Compound Structure of Rodents Activity Rhythm. *Physiology & Behavior*, 57(1), 37-40.

Wollnik, F (1985). Sex Differences in the Daily Pattern of Locomotor Activity in Laboratory Rats. *Naturwissenschaften*, 72 158-161.

Wollnik, F & Döhler, K. D. (1986). Effects of Adult or Perinatal Hormonal Environment on Ultradian Rhythms in Locomotor Activity of Laboratory LEW/Ztm Rats. *Physiology & Behavior*, 38, 229-240.

3.3 Ritmi ultradiani nell'attività locomotoria di ibridi f1 (balb/c e c57bl/6)

[In preparazione]

Introduzione

Il ritmo circadiano rappresenta un fenotipo che ben si presta all'analisi genetica. Questi ritmi, presenti in moltissimi processi biologici attraverso tutti i taxa e sono di origine endogena. Infatti questi cicli persistono in assenza di sincronizzatori esterni e mostrano un periodo di circa 24 ore. La precisa natura di questi meccanismi in grado di stabilire un punto nel tempo, è tutt'oggi oggetto di studio, ma le loro peculiari caratteristiche: auto-sostenuti, temperatura compensati, in grado di re-sincronizzarsi con segnali ambientali e la persistenza di proprietà formali in diversi organismi; sono riconosciute da tutti. Gli studi sugli orologi biologici ed in particolare sul circadiano, hanno chiaramente dimostrato che la loro prima azione è a livello molecolare. Possiamo quindi parlare di un orologio molecolare a tutti gli effetti.

La complessa natura del comportamento circadiano si riflette nella variabilità fenotipica osservata nei mammiferi e negli insetti; questa è stata descritta particolarmente bene nei topi. Comparando fra loro diversi ceppi puri, sono state dimostrate differenze significative nel comportamento circadiano (Ebihara et al. 1978; Possidente and Hegmann 1982; Schwartz and Zimmerman 1990). Uno dei primi fenotipi considerati è stato la lunghezza del periodo circadiano endogeno, per il quale sono state osservate differenze notevoli fra ceppi appartenenti ai due estremi. Ad esempio, il ceppo BALB/c ha un periodo corto <23 h, mentre il ceppo C57BL/6 ha un periodo vicino alle 24 h. Le differenze fra i ceppi non riguardano solo la lunghezza del periodo ma anche altri aspetti del comportamento circadiano, incluso il trascinarsi rispetto al ciclo luce-buio e l'ampiezza del ritmo. Diversi studi sui ceppi puri di topo hanno indicato una base poligenica per queste caratteristiche del comportamento (Shimomura, 2001; Mayeda, 1999; Toth, 1999).

Se per lo studio della ritmicità circadiana assistiamo ad un'ampia convergenza di gruppi ed ambiti di ricerca, per un'altra classe di ritmi, gli ultradiani, le nostre conoscenze sono molto esigue. I ritmi brevi differiscono dal circadiano in quanto essi non corrispondono a nessuna periodicità ambientale. Ciò nonostante essi mostrano frequentemente oscillazioni molto precise e di notevole ampiezza; andrebbero quindi considerate un importante fattore dell'organizzazione temporale del comportamento (Daan & Aschoff, 1981). In letteratura vi sono diversi studi che hanno riportato la presenza di ritmi ultradiani nell'attività locomotoria di roditori (Honma & Hiroshige, 1978a, 1978b,

1978c; Buttner & Wollnik, 1984; Wollnik & Dohler, 1986; Wollnik et al., 1987; Beau, 1991, 1992; Gerkema et al., 1993; Ticher, 1995; Poon et al., 1997; Peleg et al. 2001).

Precedenti studi da noi condotti su (Pasquali et al 2003, 2004, 2005) su BALB/c e C57BL/6, centrati sulla caratterizzazione della ritmicità ultradiana, avevano evidenziato una sostanziale similitudine fra i due ceppi. Ma sia dai nostri dati che dai dati di Peled et al. (2001) erano osservabili alcune differenze che comunque nel nostro caso, non si erano mostrate statisticamente significative. Altre indicazioni circa una possibile differenza di base genetica fra i due ceppi, venivano da uno studio di Beau (1991), il quale condusse uno studio molto simile al presente ma prendendo in considerazione dei parametri sull'attività locomotoria e sulla ritmicità circadiano ed ultradiana molto differenti. Al fine di chiarire anche queste incongruenze abbiamo sviluppato il presente lavoro che si pone l'obiettivo di investigare la presenza di una possibile base genetica di tale ritmicità verificando l'ereditarietà di tali caratteristiche.

In questo studio si è voluto seguire la stessa metodologia utilizzata per lo studio del circadiano, analizzando il comportamento locomotorio ed in particolare i ritmi ultradiani di attività dei reciproci F1 tra Balb e C57

Materiali e metodi

Soggetti

Gli ibridi F₁ provenivano da due diversi incroci: femmina BALB/c (C) con maschio C57BL/6 (CB6), e femmina C57BL/6 (B6) con maschio BALB/c (B6C). Abbiamo utilizzato 24 topi ibridi, CB n=12 e BC n=12, sia maschi che femmine di 8 settimane ottenuti dalla Charles River Lab. (Calco, Como, Italia). I topi erano stabulati individualmente con cibo ed acqua ad libitum. Gli animali erano in condizioni di fotoperiodo luce:buio 12:12 (LD), con luce accesa dalle 8 alle 20; la temperatura era di 21±1°C ed umidità di 55±5%.

Procedura sperimentale

I topi venivano stabulati individualmente in gabbie di 369 x 156 x 132 h, dopo tre giorni di abitazione venivano avviate le registrazioni. Gli animali vennero registrati per 28 giorni, la prima settimana in LD 12:12 successivamente tre settimane in DD. Per le analisi comportamentali sono stati considerati solo i 7 gg in LD 12:12 e gli ultimi 7 gg in DD (le due settimane centrali erano considerate abitazione quindi escluse). Le registrazioni venivano effettuate in una stanza insonorizzata e climatizzata.

Apparato radar per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'apparato utilizzato per il monitoraggio degli animali era un sistema autocostruito, il VIVARD-12 (Pasquali et al., submitted), una batteria di 12 radar a microonde basati sul principio dell'effetto Doppler che operano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl)(Fig.1). Tutti i radar erano collegati ad personal computer che per mezzo di una scheda di I/O ed un programma scritto in C fungeva da data logger. Il programma permetteva inoltre di impostare diversi parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti). Prima di avviare le registrazioni sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) medesime misurazioni da parte di tutti i radar, c) mantenimento della stabilità delle regolazioni nel tempo. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato.



Fig. 1 Uno degli elementi di cui è composto l'apparato

Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state detrendizzate e trattate con un procedimento di media mobile a tre punti. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi della DFT sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2,88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.001$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

L'ampiezza del periodo circadiano e di quelli ultradiani era definita in termini di potenza spettrale dei picchi come presentata dall'analisi spettrale. Abbiamo considerato diverse misure di potenza spettrale: valore massimo di un singolo picco e media ponderata di un range. I valori massimi sono stati considerati per il periodo a 24 h, 12 h, 8 h e 4h, mentre quelli totali sono stati considerati per il range 480-300 min e 300-100 min.

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a misure ripetute. Quando appropriato abbiamo utilizzato il test post-hoc (Fisher Test). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$.

Risultati

Nell'esposizione dei risultati verrà posta inizialmente l'attenzione al confronto delle due generazioni F1. Inoltre come primo passo in assoluto abbiamo verificato la presenza di differenze sessuali fra gli F1 (i dati non sono mostrati). A tal riguardo un primo dato molto evidente è che non esistono differenze sessuali statisticamente significative fra gli ibridi F1. Ad eccezione dell'attività locomotoria, che come osservato in un precedente lavoro (Pasquali, paragrafo 3.2) vede le femmine molto più attive dei maschi [$F(1, 20)=4.68, p<0.05$]. Nelle successive esposizioni dei risultati quindi non accenneremo più alle differenze sessuali, tale variabile è stata esclusa dall'ANOVA, ad eccezione dell'analisi sull'attività locomotoria.

Successivamente i dati ottenuti dalle registrazioni sugli ibridi sono stati confrontati con i dati di un precedente lavoro sui maschi appartenenti ai ceppi C e B6 (Pasquali, paragrafo 3.1). I confronti fra inbred ed F1 reciproci sono stati eseguiti per i seguenti parametri: attività, periodo circadiano potenza massima del circadiano, potenza massima del 12 ore, potenza massima del 8 ore, potenza massima del 4 ore, periodo ultradiano nel range 1-8 ore, potenza ponderata nella banda 480-300 minuti e potenza ponderata 300-100 minuti. Tutti i confronti sono stati eseguiti mediante ANOVA a misure ripetute in cui il ceppo era la variabile indipendente ed i due livelli del fotoperiodo per il parametro considerato di volta in volta, le variabili dipendenti.

Activity

Circa l'attività motoria, riportiamo che non sono state osservate differenze significative fra le due F1. Diversamente, nel confronto con i ceppi puri, troviamo un effetto per il ceppo [$F(3, 44)=32.26, p<0.0001$], gli ibridi mostrano un pattern di attività ben diverso dai C e B6. Non un pattern intermedio fra i due ceppi puri come ci si potrebbe aspettare, ma un livello di attività più elevato sia in LD che in DD.

Circadiano

Il periodo circadiano fra i due ibridi mostra una differenza significativa fra LD e DD (Fischer test: $p < 0.001$ per i B6C, $p < 0.01$ per i CB6) con un periodo più corto di 24 ore in condizione di free-running (DD). Nel confronto con i ceppi puri gli ibridi sono in questo caso in una posizione intermedia, mostrando sia in LD che in DD un periodo statisticamente differente rispetto ai C ed ai B6. L'ANOVA quindi riporta un effetto per il Ceppo [$F(3, 44)=14.0$, $p < 0.0001$] per il Fotoperiodo [$F(3, 44)=49.9$, $p < 0.0001$] ed una interazione significativa per Ceppo x Fotoperiodo [$F(3, 44)=9.7$, $p < 0.001$]. I risultati sulla potenza circadiano richiama in parte la tendenza vista per l'attività locomotoria. I quattro ceppi sono abbastanza distinti fra loro e come atteso l'ANOVA ci riporta un effetto per il Ceppo [$F(3, 44)= 53.50$, $p < 0.0001$], Fotoperiodo [$F(3, 44)=23.22$, $p < 0.0001$] ed un interazione significativa Ceppo x Fotoperiodo [$F(3, 44)=3.871$, $p < 0.01$]

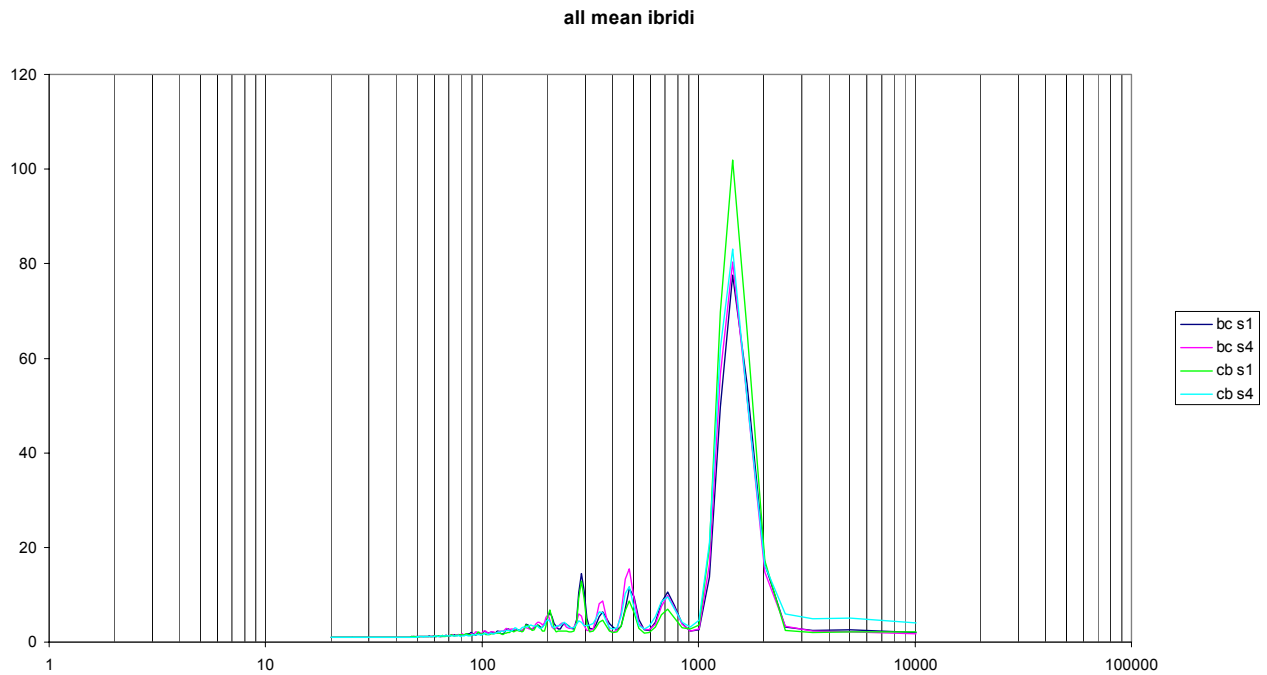
Ultradiani

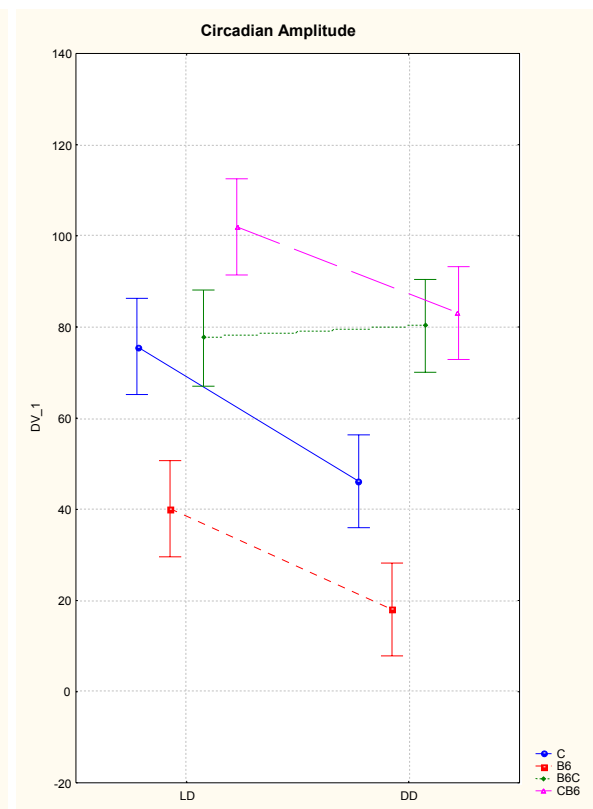
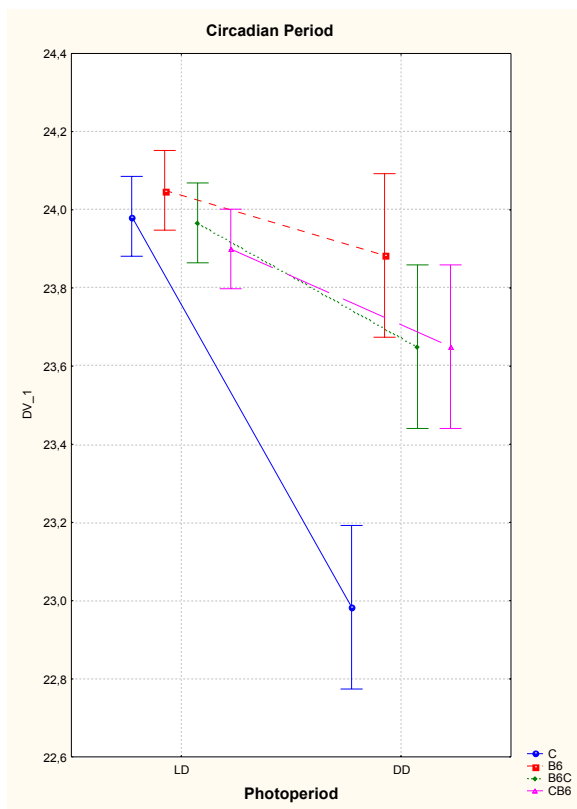
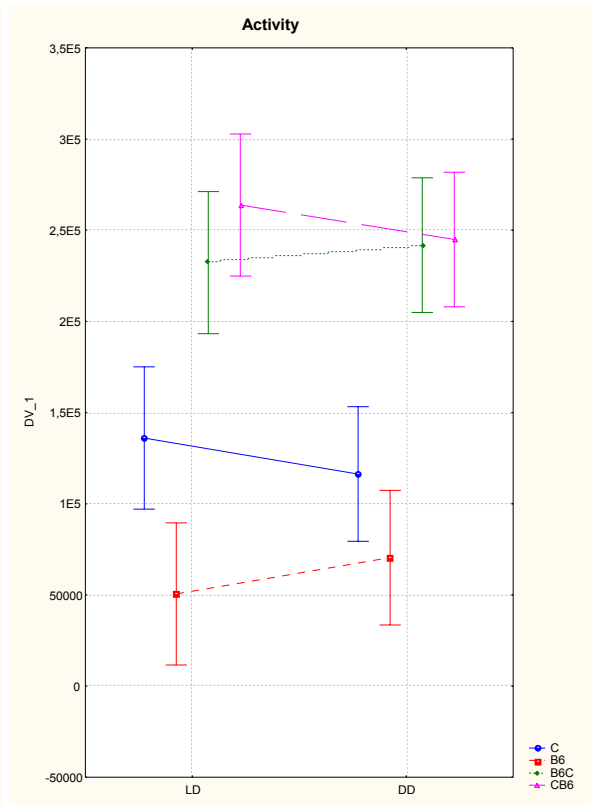
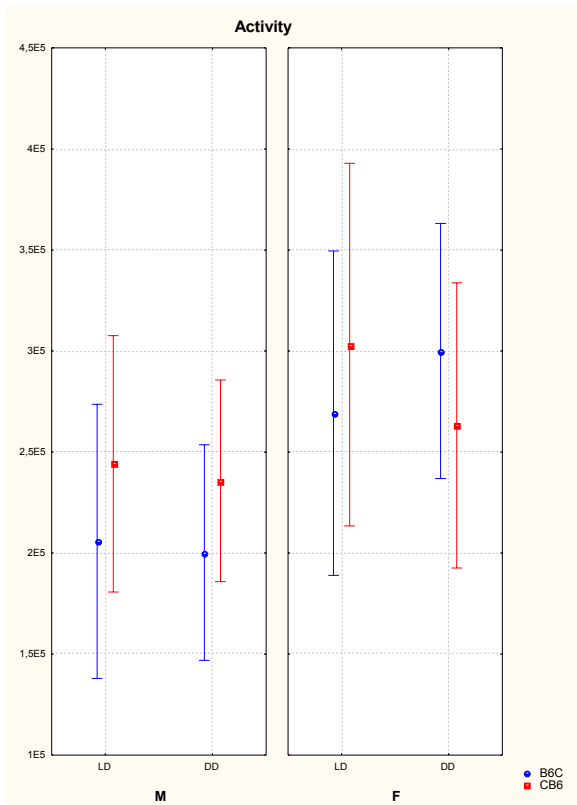
Dalle analisi spettrali sono visibili in ogni animale più periodicità ultradiane, ed anche dagli spettri medi tale situazione è ben evidente.

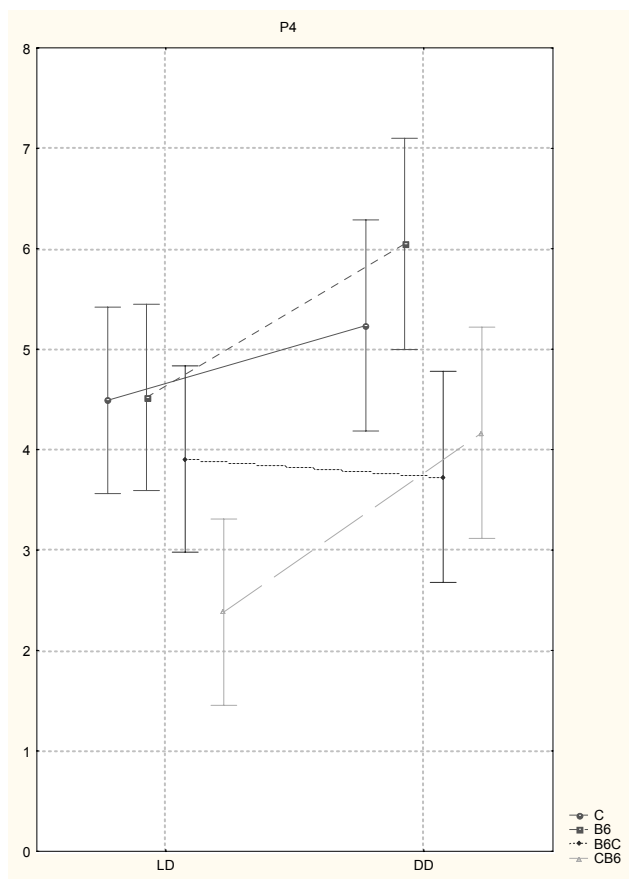
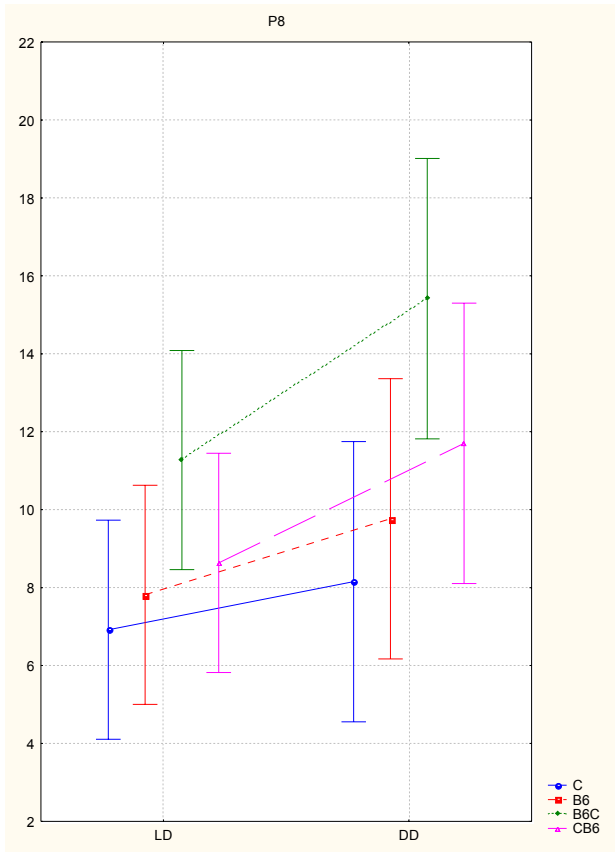
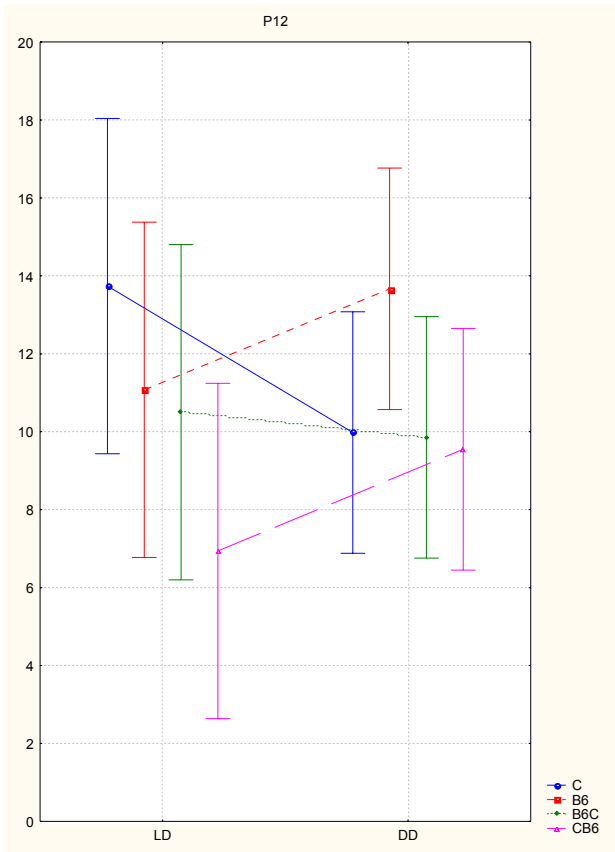
Come spesso osservato in precedenti studi le variazioni delle potenze dei periodi 12h, 8h e 4h non mostrano mai differenze statistiche fra loro. L'ANOVA non ha evidenziato nessun effetto per il p12, mentre per p8 abbiamo osservato un effetto del fotoperiodo [$F(1, 20)=4.78$, $p < 0.05$] ma in DD non vi erano differenze fra i vari ceppi. Anche per il 4 h abbiamo trovato un effetto Ceppo x Fotoperiodo [$F(1, 20)=5.49$, $p < 0.05$]. Nel confronto con le due linee parentali non troviamo nessun effetto per il 12h, mentre per l'8h e per il 4h troviamo effetti per Ceppo [$F(3, 44)=4.59$, $p < 0.001$] e [$F(3, 44)=7.50$, $p < 0.001$], e per Fotoperiodo [$F(3, 44)=5.59$, $p < 0.05$] e [$F(3, 44)=7.36$, $p < 0.01$].

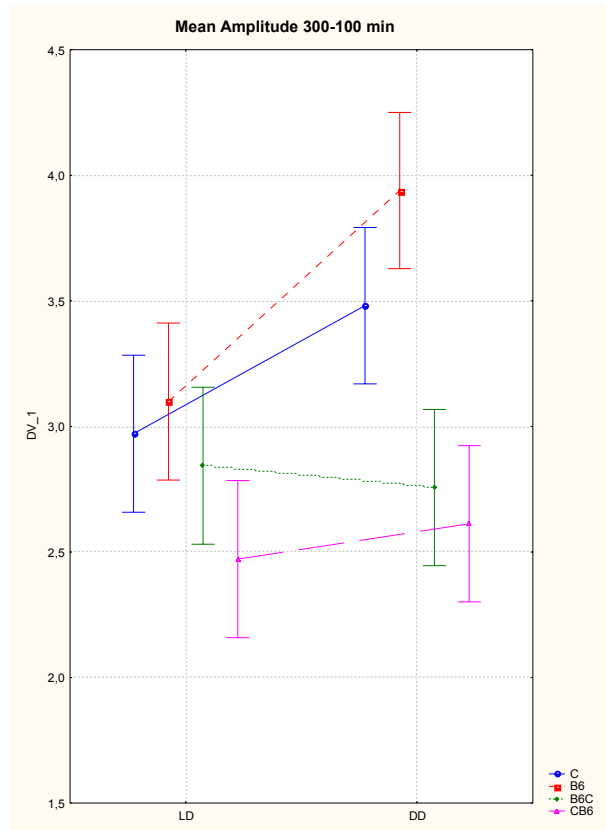
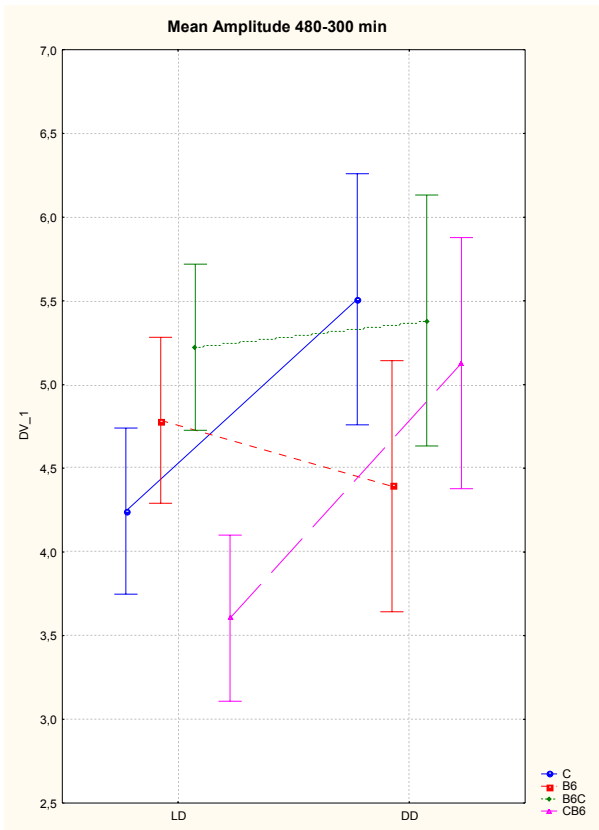
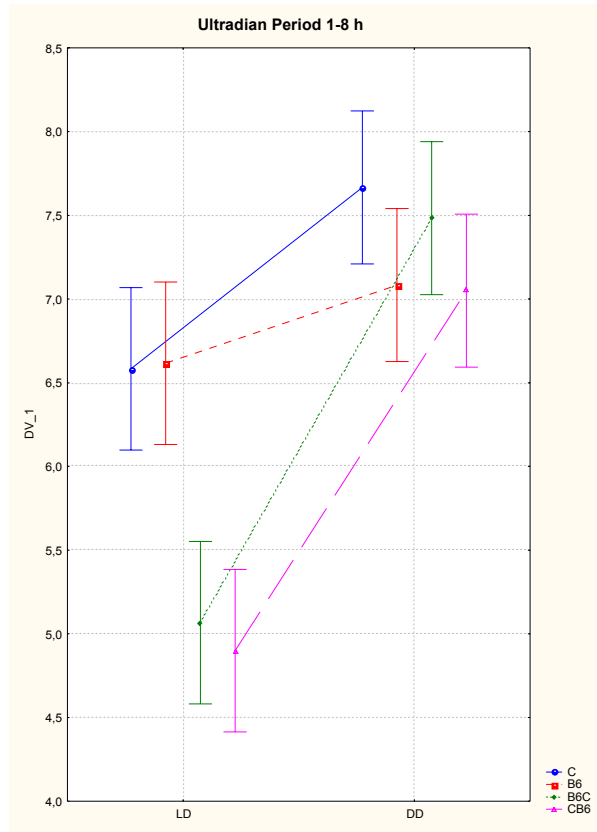
Nel confronto fra i due ibridi il tau1-8h ha evidenziato un effetto per il fotoperiodo [$F(1,20)=102.67$, $p < 0.0001$] dove in DD le differenze osservate si annullano. Per il pp480-300 riportiamo degli effetti per il Ceppo [$F(1,20)=6.43$, $p < 0.05$], per il Fotoperiodo [$F(1,20)=7.78$, $p < 0.01$] e per Ceppo x Fotoperiodo [$F(1,20)=5.28$, $p < 0.05$]. Al contrario per l'ultima banda temporale pp300-100 non abbiamo osservato nessun effetto. Differenti i risultati nel confronto con gli ibridi C e B6, dove troviamo una situazione molto complessa con effetti significativa per Ceppo, [$F(3, 44)=10.86$, $p < 0.001$; $F(3, 44)=3.44$, $p < 0.05$; $F(3, 44)=18.02$, $p < 0.001$] Fotoperiodo [$F(3, 44)=79.72$, $p < 0.001$; $F(3, 44)=7.841$, $p < 0.001$; $F(3, 44)=9.15$, $p < 0.01$] e Ceppo x Fotoperiodo [$F(3, 44)=7.1$, $p < 0.001$; $F(3, 44)=3.95$, $p < 0.01$; $F(3, 44)=3.1$, $p < 0.05$] rispettivamente per tutti e tre i parametri tau1-8, pp480-300 e pp300-100.

Al di là del quadro complessivo dato dai valori dei parametri in entrambi i fotoperiodi, è interessante esaminare da condizione DD poiché è in questo fotoperiodo che è possibile osservare l'endogenicità di un ritmo. Nella condizione DD gli F1 tendono a formare un cluster separato per quanto riguarda activity, P24, P4 e pp300-100. Mentre per altri parametri o mostrano valori simili ai B6 o non vi sono differenze significative.









Discussione

Due recenti lavori hanno comparato l'attività delle linee parentali considerate con gli F1. Tang (Tang, 2002) ha riportato per i CB6 una quantità di attività molto superiore ai C ma simile ai B6 a cui assomigliano; mentre (Shimomura, 2001) osservavano un livello di attività per gli F1 molto superiore ai C e B6. Riportano inoltre una differenza sessuale per gli F1, con le femmine che sono più attive dei maschi. I nostri dati concordano pienamente con i risultati di Shimomura, benché gli animali siano stati monitorati con i tamburi rotanti. Anche Beau (1991) osservò come gli F1 fossero molto più attivi dei ceppi parentali.

Per la lunghezza del periodo circadiano sotto fotoperiodo DD, quindi in presenza di un'espressione endogena del ritmo e non trascinata da sincronizzatori esterni, abbiamo trovato un periodo simile nelle due F1. Dato che trova conferma nel lavoro di (Shimomura, 2001) ma in contrasto con il lavoro di Schwartz e Zimmerman (1990), i quali osservano periodi differenti nelle due F1 con un effetto materno da parte dei C57. In fine, il pattern di attività evidenziato da entrambi gli F1 è simile a quello dei B6 cioè il periodo tende a mantenersi stabile e non mostra la grande variazione osservabile nei C al cambio del fotoperiodo.

Sull'ampiezza del periodo circadiano, confrontando i nostri risultati con gli unici due studi presenti in letteratura, ci troviamo in accordo con Beau (1991) che riporta una situazione uguale alla nostra con gli F1 che mostrano un'ampiezza superiore ai C ed a loro volta superiore ai B6. Diversamente (Shimomura, 2001) riporta ampiezze simili per F1 e B6 che sono molto superiori ai C.

Per i vari parametri sugli ultradiani non abbiamo dati di confronto, ad eccezione del pp300-100, un parametro non del tutto uguale ma comunque simile e sufficiente per un confronto, a quello considerato da Beau (1991).

In generale il quadro che se ne ricava osservando i nostri risultati è alquanto complicato poiché non vi sono degli effetti chiari e costanti. I due F1 non mostrano differenze fra loro per P12, P8, P4, T1-8, pp 480-300 e pp300-100. Nel confronto con i C e B6, osserviamo che gli F1 si mostrano differenti dalle linee parentali per P4 e pp300-100 esprimendo dei valori più bassi, valori che per il pp300-100 trovano conferma nello studio di Beau (1991). Per P12, P8, t1-8 e pp480-300 abbiamo generalmente una tendenza ad avere dei valori medi abbastanza simili.

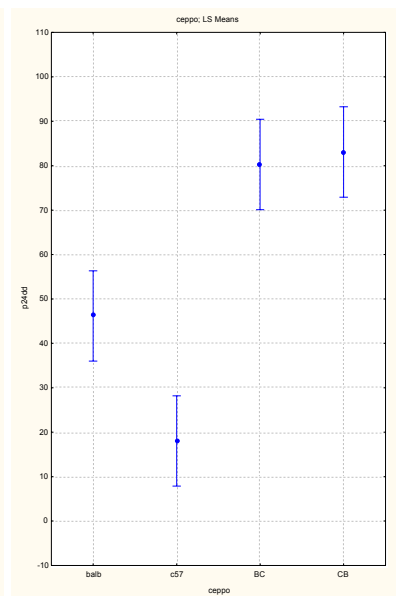
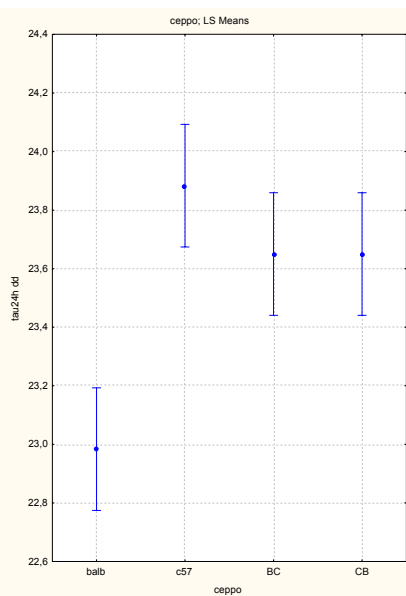
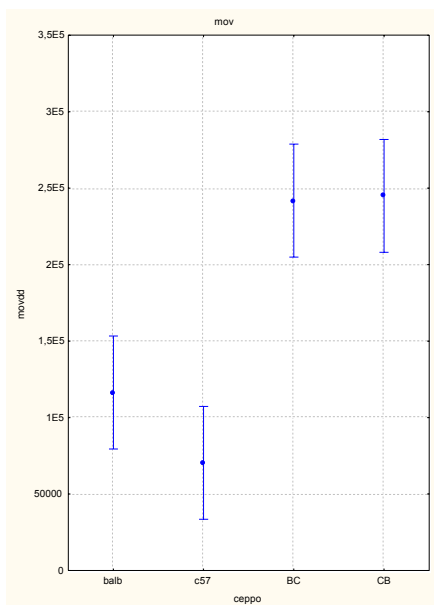
Crediamo di poter affermare che dai nostri risultati non vi siano evidenze di effetti materni sulle reciproche F1. Questo è un punto certamente critico poiché in letteratura si sono diversi autorevoli studi a favore e contro questa ipotesi.

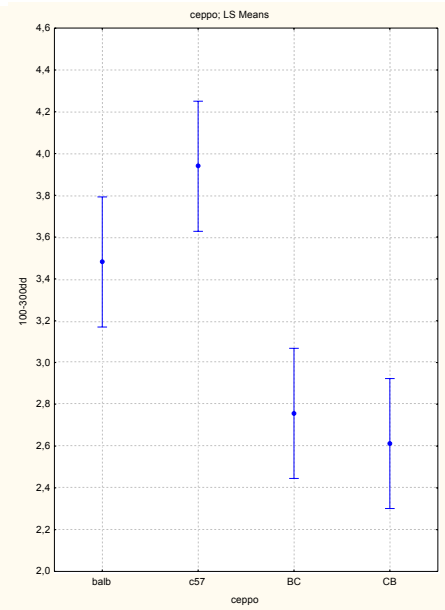
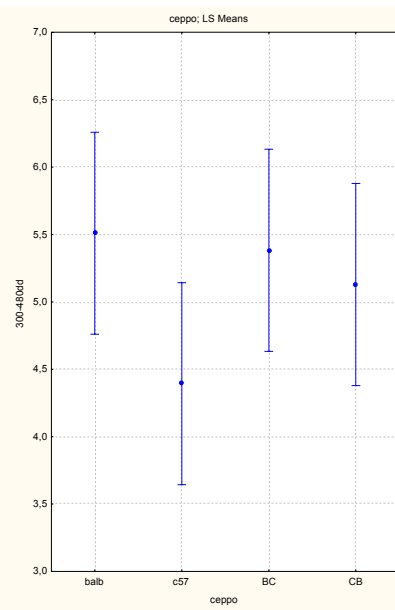
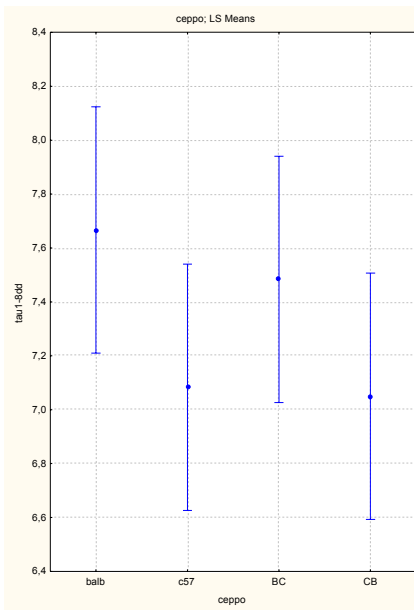
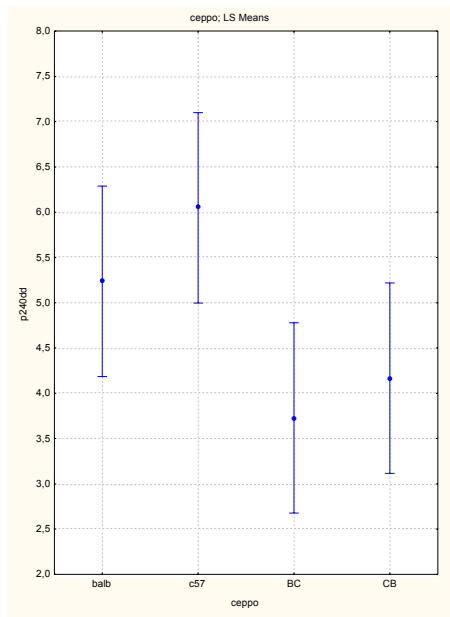
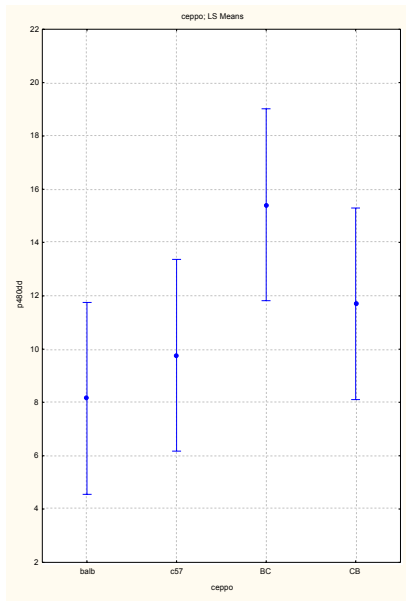
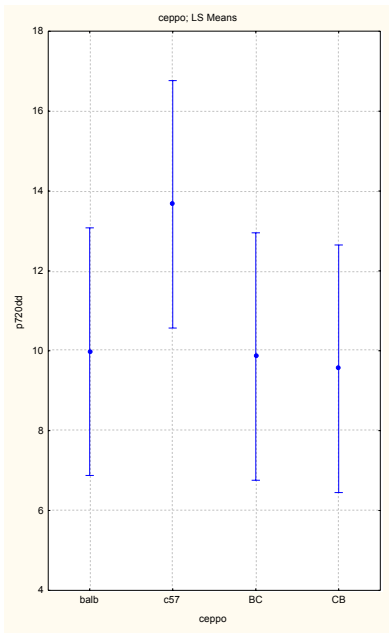
Per quanto concerne l'ereditarietà di alcuni caratteri, escludendo dalla discussione ciò che riguarda il periodo circadiano per il quale vi sono diversi lavori che trattano l'argomento, sembra abbastanza

chiaro che vi siano dei correlati genetici. Se per alcuni parametri sembrano esserci effetti di semi-dominanza (tau1-8 e pp480-300) o dominanza (P12); frequentemente per i vari parametri ultradiani considerati osserviamo effetti di eterosi, ad esempio per Activ, P24, P8, P4 e pp300-100; per i quali è osservabile un'espressione superiore o inferiore rispetto alle linee parentali, ciò farebbe pensare a dei tratti di tipo quantitativo e quindi di origine poligenica. Queste ovviamente sono solo delle supposizioni, poiché da questo studio non è possibile dare delle risposte, certamente questi risultati andrebbero verificati con uno studio di back-crossing

La tabella ed i grafici seguenti riassumono la comparazione fra gli F1 e le due linee parentali C e B6 in condizioni di DD

Activity	F1 > C = B6
Tau 24	B6 = F1 > C
P 24	F1 > C > B6
P 12	F1 = C = B6
P 8	B6C > CB6 = C = B6
P 4	C = B6 > F1
Tau 1-8	F1 = C = B6
PP 480-300	C > B6 = F1
PP 300-100	B6 > C > F1





References

- Beau, J. (1991) Activity rhythms in inbred mice: genetic analysis with recombinant inbred strains *Behavior Genetics*, 21, n°2, 117-129
- Beau J. (1992). Activity rhythms in mice. III: Stability and plasticity of rhythm characteristics in experimental and environmental conditions. *Physiol Behav.* Aug;52(2):231-5.
- Büttner, D. Wollnik, F. (1984). Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat *Behavior Genetics*, vol.14, n°2, 137-152
- Conte S., Ferlazzo F., Renzi P., (1995b). Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biol. Psych.*, 39: 159-172
- Daan, S.; Aschoff, J. (1981). Short-term rhythms in activity. In: Aschoff, J.; ed. *Handbook of behavioural neurobiology*. vol. 4. *Biological Rhythms*. New York: Plenum Press,:491– 498; 1981.
- Ebihara S, Tsuji K, Kondo K. (1978). Strain differences of the mouse's free-running circadian rhythm in continuous darkness. *Physiol Behav.*, 20(6):795-9.
- Gerkema, M.P., S. Daan, H. Wilbrink, M. W. Hop and F. van der Leest (1993) Phase control of ultradian feeding rhythms in the common vole (*Microtus arvalis*) the roles of light and the circadian system. *J. Biol. Rhythms* 8: 151-171.
- Honma K, Hiroshige T. (1978a). Simultaneous determination of circadian rhythms of locomotor activity and body temperature in the rat. *Jpn J Physiol.*;28(2):159-69.
- Honma KI, Hiroshige T. (1978b). Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light. *Am J Physiol.* Nov;235(5):R243-9.
- Honma K, Hiroshige T, (1978c). Endogenous ultradian rhythms in rat exposed to prolonged continuous light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 235: R250-R256

- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M. C., Delagrance, P., Guardilola-Lemaitre, B., Misslin, R. 1998. Effects of daylight cycle reversal on locomotor activity in several inbred strains of mice. *Physiology & Behavior*, **63**, 577-585.
- Low-Zeddies, S. S., Takahashi, J. S. 2001. Chimera analysis of the clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell*, **105**, 25-42.
- Mayeda, A. R., Hofstetter, J. R. 1999. A QTL for the genetic variance in free-running period and level of locomotor activity between inbred strains of mice. *Behavior Genetics*, **29**, 171-176.
- Peleg, L., Weigl, Y., Dotan, A. & Ashkenazi I.E. (2001). Inherited variability of locomotor activity rhythms in mice: strain and gender differences. *Chron. Int.*, 18:1181-1182
- Poon AM, Wu BM, Poon PW, Cheung EP, Chan FH, Lam FK. (1997). Effect of cage size on ultradian locomotor rhythms of laboratory mice. *Physiol Behav.* Dec;62(6):1253-8.
- Possidente B, Hegmann JP. (1982). Gene differences modify Aschoff's rule in mice. *Physiol Behav.*, 28(1):199-200
- Rogers, D. C., Jones, D. N. C., Nelson, P. R., Jones, M., Quilter, C. A., Robinson, T. L., Hagan, J. J. 1999. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, **105**, 207–217.
- Schwartz, W. J., and Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* 10:3685-3694.
- Sharma, V. K. 2003. Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology international*, **20**, 901-919.
- Shimomura, K., Low-Zeddies, S. S., King, D. P., Steeves, T. D. L., Whiteley, A., Kushla, J., Zemenides, P. D., Lin, A., Hotz Vitaterna, M., Churchill, G. A., Takahashi, J. S. 2001. Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Research*, **11**, 959-980.

Tang, X., Orchard, S. M., Sanford, L.D. 2002. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behavioural Brain Research*, **136**, 555-569.

Ticher, A., Ashkenazi, I. E. 1995. Compound structure of rodents activity rhythm. *Physiology & Behavior*, **57**, 37-40.

Toth, L. A., Williams, R. W. 1999. A quantitative genetic analysis of locomotor activity in CXB recombinant inbred mice. *Behavior Genetics*, **29**, 319-328.

Wollnik F, Dohler KD. (1986). Effects of adult or perinatal hormonal environment on ultradian rhythms in locomotor activity of laboratory LEW/Ztm rats. *Physiol Behav.* 38(2):229-40.

Wollnik F, Gartner K, Buttner D. (1987) Genetic analysis of circadian and ultradian locomotor activity rhythms in laboratory rats. *Behav Genet.* 17(2):167-78.

3.4 Ritmi ultradiani temperatura-compensati in topi inbred

[In preparazione]

Introduzione

Molti processi vitali avvengono in modo ritmico. Per la maggior parte delle oscillazioni, i loro periodi dipendono dalle condizioni ambientali, soprattutto l'alternanza luce-buio, ma anche le maree e la temperatura.

I cambiamenti naturali ed artificiali della temperatura ambientale, costituiscono spesso un potente fattore di sincronizzazione, almeno quanto il ciclo luce/buio (Bunning 1967, Bruce 1960, Aschoff 1981); apportano effetti simili a quelle della luce nell'organizzazione circadiana del comportamento in un ampio range di specie.

Gli effetti della temperatura si mostrano potenti quando la relazione di fase con la luce è alterata, in queste condizioni è stato osservato che sia in organismi semplice che in alcuni animali cavernicoli la temperatura diventa lo zeitgeber dominante (Underwood 1990, Liu et al. 1998). Anche gli effetti della Phase Response Curves (PRCs) alla luce e ad impulse di calore sono generalmente simili nelle piante, funghi, cellule, insetti, uccelli e topi (Barrett and Takahashi, 1995; rudy 1999; Rensing and Ruoff, 2002).

La presenza di una sensibilità alla temperatura come sopra dimostrato non significa che debba altresì essere presente una compensazione alla temperatura. Ciò potrebbe essere ancora più vero per gli animali omeotermi come i mammiferi nei quali, diversamente dagli ectodermi, è presente un meccanismo omeostatico per la regolazione della temperatura corporea. Risulta quindi molto difficile studiare gli effetti della temperatura sui ritmi circadiani dei mammiferi. I pochi studi presenti in letteratura si sono concentrati su studi cellulari *in vivo* del nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo (SCN), sede anatomica del master-clock deputato all'organizzazione circadiana nei mammiferi (Rusak and Zucker, 1979; Rosenwasser, 1988).

Vi sono quindi evidenze sperimentali circa la compensazione in temperatura da parte del SCN, sia in mammiferi omeotermi che eterotermi (ruby 1996, 1999), ma anche di polli (Barrett and Takahashi, 1995). Anche se rimane aperto il quesito se si tratti realmente di una "compensazione in temperatura" o di una "protezione dalla temperatura". Per quanto riguarda invece gli organismi pluricellulari (Lloyd & Kippert, 1987; Kippert & Lloyd, 1995; Kippert & Hunt, 2000) ed insetti (Pittendrigh, 1966; Pasquali, 2005), disponiamo di dati certamente più abbondanti circa la presenza di un meccanismo temperatura compensato per le ritmicità ultradiane.

L'esistenza di un meccanismo che compensi il periodo di un ritmo rispetto alle variazioni di temperatura, viene considerata insieme alla persistenza del periodo in condizioni ambientali costanti, una delle prove fondamentali per classificare quel ritmo come endogeno (Pittendrigh 1993). Il grado con il quale una oscillazione biologica è temperatura-compensata può essere stimato misurando il valore del Q10. Questo valore è espresso dal rapporto fra la lunghezza del periodo alla temperatura X e la lunghezza del periodo alla temperatura X+10°C. Una compensazione perfetta sarà indicata da un Q10=1. Il ritmo circadiano è temperature-compensato con un valore generalmente compreso nel range 0.85 - 1.2, mentre molte reazioni biochimiche mostrano un di Q10 uguale a 2-3.

Le problematiche di studio che caratterizzano i ritmi ultradiani, hanno fatto sì che per decenni venissero considerati alla stregua di fenomeni accidentali, o tutto al più, semicomponenti della ritmicità circadiana. L'osservazione della persistenza di ritmi a periodicità ultradiana, in condizioni ambientali costanti, nell'attività locomotoria di insetti (Tomioka et al. 1998, Ruoff 1997), formiche (Renzi e Pasquali 2000), blatte (Pasquali e Renzi 2002), topi (Toth e Williams 1999, Pasquali et al. 2003) e ratti (Wollnik et al. 1987, Ticher e Ashkenazi 1995), costituisce un'indicazione circa l'origine endogena di tali ritmicità comportamentali.

Obiettivo di questo lavoro è indagare nei topi l'esistenza di meccanismi omeostatici nelle ritmicità ultradiane individuate nei precedenti lavori, espressi nella capacità di compensazione del periodo rispetto a variazioni di temperatura. Ipotizzando l'esistenza di una compensazione in temperatura di tali ritmi comportamentali, si intende mirare alla produzione di nuovi dati a favore di un'origine endogena dei ritmi ultradiani.

Materiali e metodi

Soggetti sperimentali

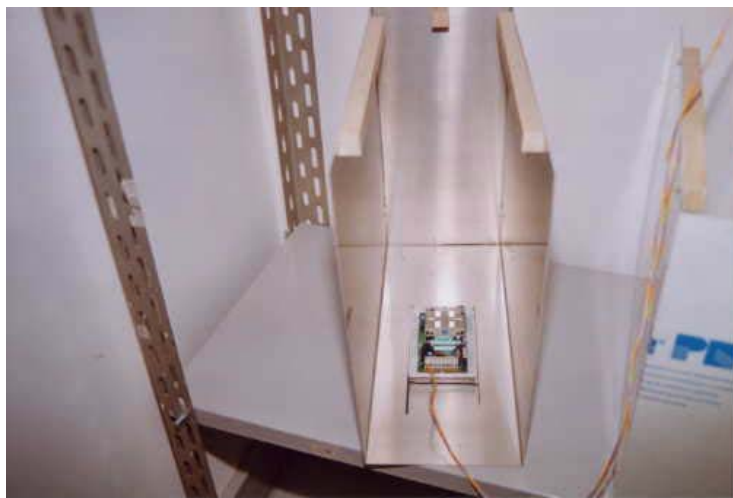
Sono stati utilizzati n=6 Balb/c (C) e n=6 C57BL/6 (B6) (Charles River Lb.) di 8 settimane. Gli animali, divisi per ceppo, sono stati posti nello stabulario con fotoperiodo LD (12:12), temperatura 23°C±1°C e cibo ed acqua ad libitum.

Procedura

Tre giorni dopo il loro arrivo in laboratorio, gli animali hanno iniziato un periodo di adattamento in cui erano stabulati singolarmente con fotoperiodo DD e sempre con acqua e cibo ad libitum. Dopo 21 giorni di adattamento venivano avviate le registrazioni, le quali continuavano per 5 giorni alla temperatura di $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (t_0). Successivamente la temperatura nella stanza sperimentale veniva abbassata a $18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (t_{18}), e veniva dato inizio ad un periodo di adattamento della durata di 15 giorni seguiti da 5 giorni di registrazioni sperimentali. Dopo tale registrazione, la temperatura della stanza veniva portata a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (t_{28}), nuovamente un periodo di adattamento di 15 giorni e successivi 5 giorni di registrazioni.

Apparato radar per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'apparato utilizzato per il monitoraggio degli animali era un sistema autocostruito, il VIVARD-12 (Pasquali et al., submitted), una batteria di 12 radar a microonde basati sul principio dell'effetto Doppler che operano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl)(Fig.1). Tutti i radar erano collegati ad personal computer che per mezzo di una scheda di I/O ed un programma scritto in C fungeva da data logger. Il programma permetteva inoltre di impostare diversi parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti). Prima di avviare le registrazioni sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) medesime misurazioni da parte di tutti i radar, c) mantenimento della stabilità delle regolazioni nel tempo. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato.



Analisi dei dati

Tutte le serie temporali sono state detrendizzate e trattate con un procedimento di media mobile a tre punti. Successivamente le serie così trattate sono state analizzate applicando la trasformata discreta di Fourier (Conte, Ferlazzo & Renzi 1995) per ottenere informazioni nel dominio delle frequenze. Gli output dell'analisi della DFT sono stati in un primo tempo testati col test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto con una distribuzione casuale dei picchi. Per le serie significativamente differenti da una distribuzione casuale (tutte) sono stati successivamente considerati significativi solo i picchi con potenza maggiore di 2,88 deviazioni standard dalla media ($P < 0.01$). Per stimare il periodo circadiano noi abbiamo analizzato i dati con il periodogramma di Sokolove and Bushnell (1978) testando il periodo 20-26 h.

L'ampiezza del periodo circadiano e di quelli ultradiani era definita in termini di potenza spettrale dei picchi come presentata dall'analisi spettrale. Abbiamo considerato diverse misure di potenza spettrale: valore massimo di un singolo picco e media ponderata di un range. I valori massimi sono stati considerati per il periodo a 24 h, 12 h, 8 h e 4h, mentre le potenze ponderate sono state considerate per i range 480-300 min e 300-100 min.

Per la stima della compensazione in temperatura, il coefficiente è stato calcolato mediante il rapporto $Q_{10} = t_{18}/t_{28}$, calcolando il periodo ultradiano nel range 1-8 h ed il circadiano nel range 20-26 h. I dati relativi alle variabili temperatura e ceppo sono stati analizzati mediante ANOVA a misure ripetute. Quando appropriato abbiamo utilizzato il test post-hoc (Fisher Test). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$.

Risultati

Movimenti

Sono stati rilevati effetti significativi del ceppo [$F(1, 10)=18.9, p<0.001$] e della temperatura ($F(2, 20)=13.9, p<0.001$), e la presenza di un'interazione significativa ceppo X temperatura ($F(2, 20)=6.2, p<0.05$). Nella condizione T0 i C si sono mostrati più attivi dei B6, ed hanno mostrato una significativa diminuzione di attività nelle altre due condizioni. Diversamente i B6 non mostrarono nessun cambiamento nella quantità di attività locomotoria.

Circadiano

Benché sia stato osservato un effetto per la temperatura [$F(2, 20)=3.62, P<0.05$], dato unicamente da un aumento del periodo e della varianza in entrambi i ceppi nella condizione T28, il periodo circadiano si mostra comunque temperatura-compensato. Inoltre nella condizione di mantenimento standard degli animali (T0), il ceppo B6 ($23.53 \pm 0.12, \text{mean} \pm \text{SE}$) mostra un periodo superiore al C ($23.97 \pm 0.14, \text{mean} \pm \text{SE}$), benché la differenza non sia statisticamente significativa.

L'ampiezza del periodo circadiano l'abbiamo stimata dalla potenza spettrale dell'analisi di Fourier. Benché non sia stata osservata una differenza statisticamente significativa, i C ($26.2 \pm 2.03, \text{mean} \pm \text{SE}$) hanno mostrato un'ampiezza superiore ai B6 ($21.49 \pm 1.96, \text{mean} \pm \text{SE}$). L'ANOVA ha evidenziato un effetto per la temperatura [$F(2, 20)=5.08, p<0.05$]

		TEMPERATURE			
		18°C	23°C	28°C	Q10
ACTIVITY	balb	78698	116155	78247	
		17921	18714	13704	
	c57	60962	70887	65408	
		5177	13754	11179	
CIRCADIAN PERIOD	balb	23,80	23,53	24,40	0,98
		0,33	0,30	1,42	
	c57	23,77	23,97	24,37	0,98
		0,20	0,34	0,70	
AMPLITUDE CIRCADIAN	balb	23,00	33,05	22,63	1,07
		5,66	10,11	6,02	
	c57	17,41	22,93	24,10	0,75
		6,80	8,33	9,46	
ULTRADIAN	balb	6,83	7,60	7,60	0,90
		0,80	0,49	0,31	
	c57	6,57	6,43	6,77	0,99
		0,76	0,74	0,87	

Ultradiani

Dall'osservazione degli spettri era evidente la presenza di ritmicità ultradiane in entrambi i ceppi, periodi che si sono mantenuti ben oltre la soglia di significatività anche negli spettri medi. Al fine di studiare la compensazione in temperatura, era necessario calcolare la lunghezza dei periodi ultradiani. Compito alquanto difficile per la mancanza di algoritmi matematici in grado di distinguere fra più periodi fra loro vicini e con potenze simili. Per tale scopo abbiamo utilizzato Wintau, che anche se con notevoli problemi può ritornare utile, selezionando il range 1-8 h. Tutti i periodi trovati con Wintau erano verso il limite alto del range, nel quale anche dall'analisi spettrale è possibile osservare la presenza dei periodi corrispondenti C 7.34 ± 0.15 (mean \pm SE) e B6 6.59 ± 0.18 (mean \pm SE)

Per il periodo abbiamo osservato un effetto del ceppo [F (1, 10)=13,97, p<0.01], con un periodo generalmente più lungo nei C piuttosto che nei B6; differenza che risulta maggiore nella condizione T0.

Per le potenze ponderate nei range 480-300 minuti e 300 100 minuti, abbiamo osservato in entrambi un effetto per la temperatura, [F (2, 20)=7,86, p<0,01] per il primo range e [F (2, 20)=3,78, p<0.05) per il secondo. In entrambi i ceppi il decremento riguardava la condizione t28

Compensazione in temperatura

Il ritmo circadiano si è mostrato temperatura-compensato in entrambi i ceppi: 0,97 per i C e 0,97 per i B6. Il Q_{10} calcolato sul periodo degli ultradiani con la formula presentata nella sezione precedente, presenta una media di 0.90 per il ceppo C e 0.99 per il ceppo B6, un valore assolutamente in linea con il circadiano.

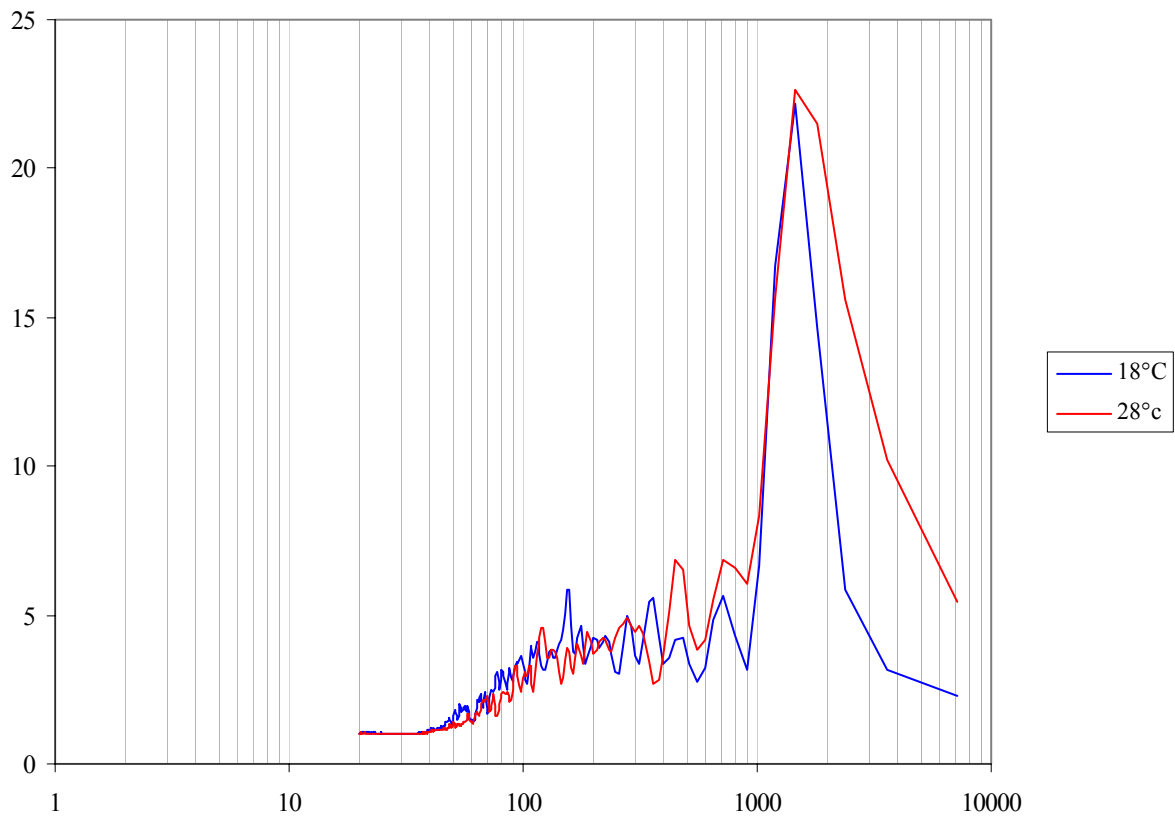


Figura 5: Spettro medio potenza ceppo Balb/c

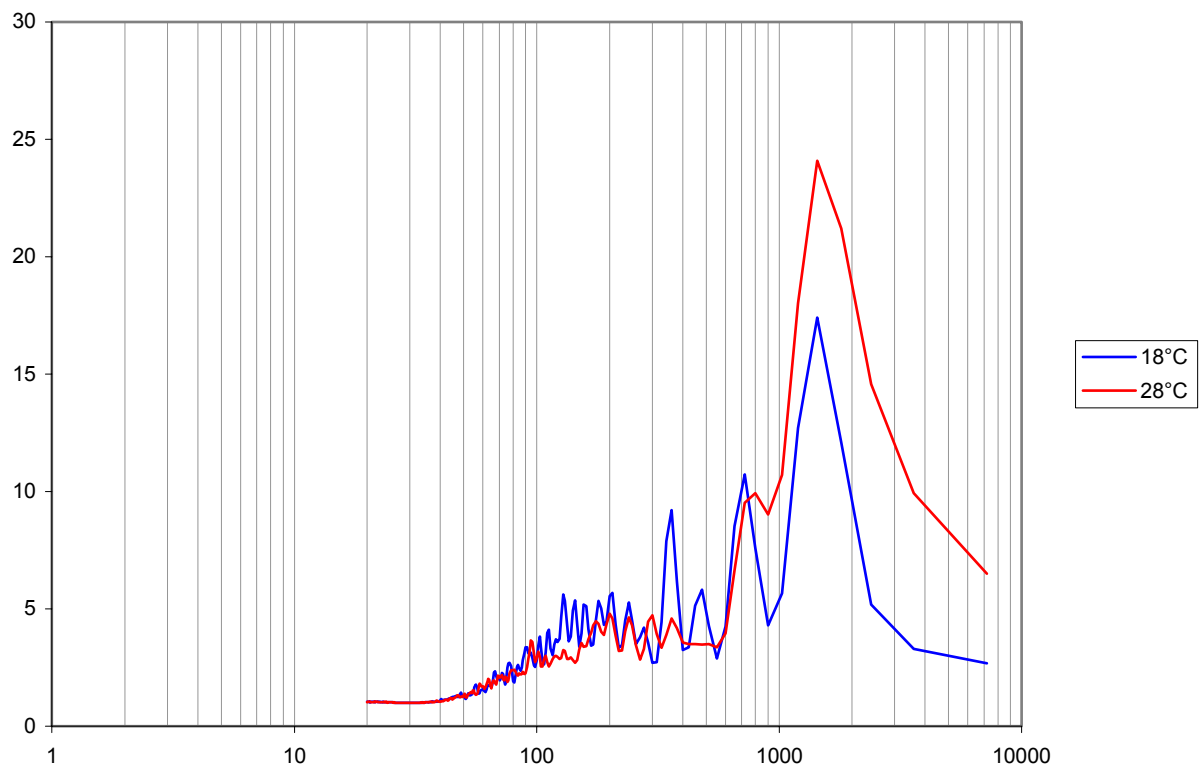
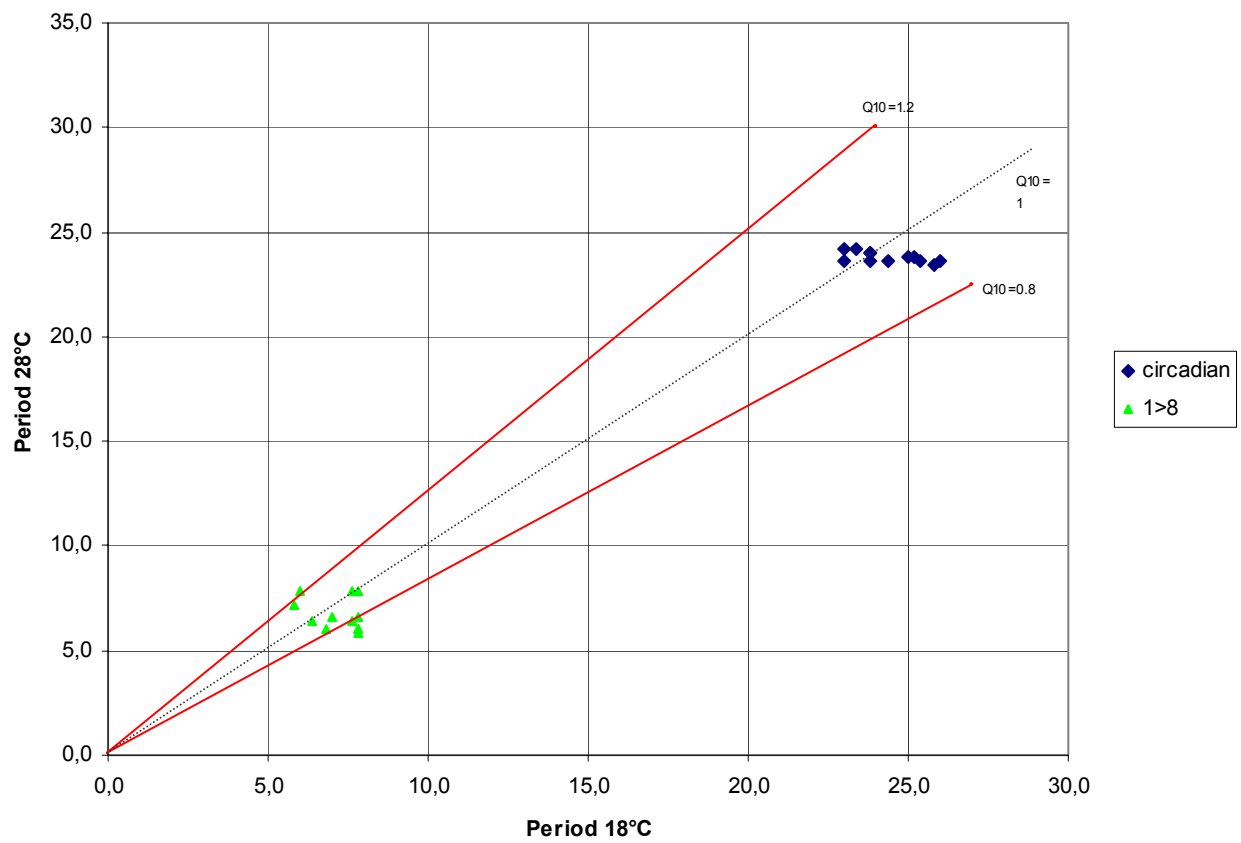
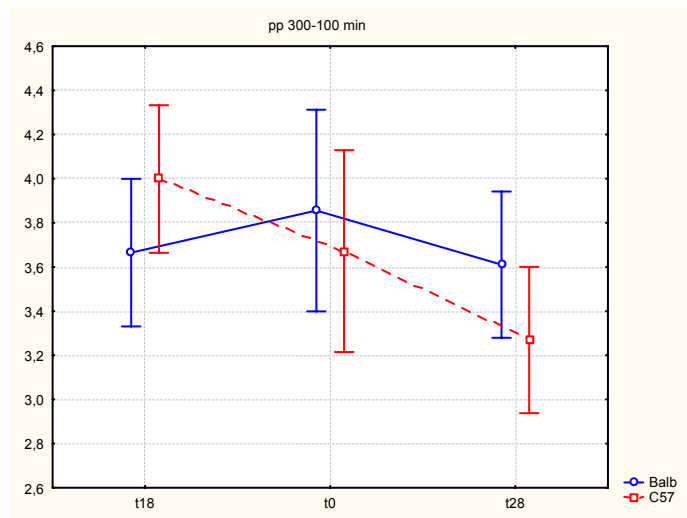
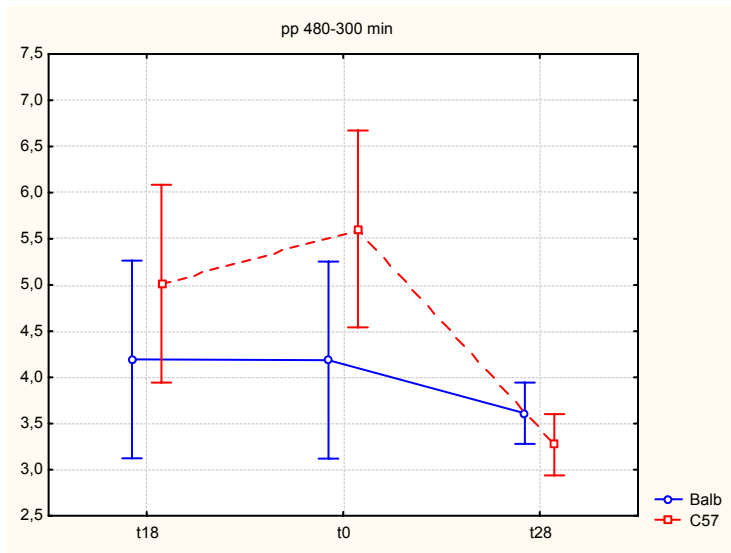
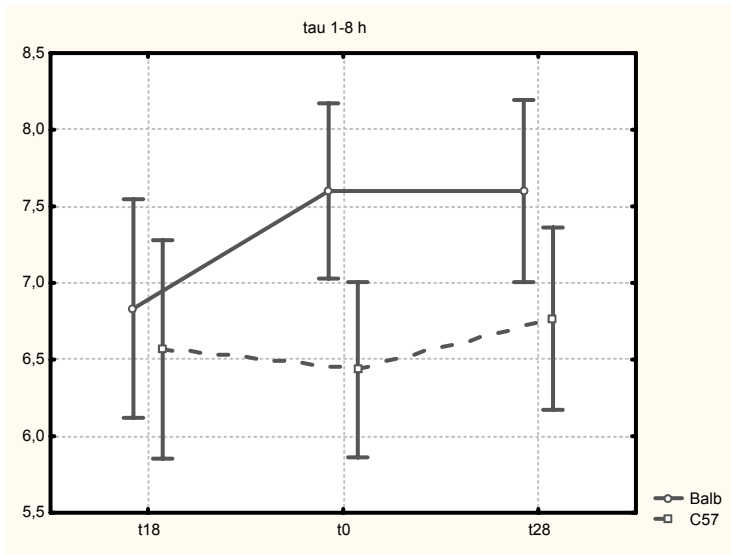


Figura 6: Spettro medio potenza ceppo C57BL/6





Discussione

Questo lavoro ha permesso di evidenziare la presenza di un meccanismo di compensazione in temperatura nei ritmi ultradiani di attività locomotoria dei due ceppi puri. Questo risultato è stato ottenuto su un parametro comportamentale, attualmente il primo sui mammiferi, poiché tutta la bibliografia sull'argomento concerne parametri fisiologici cellulari.

Diversamente da quanto indicato da Ruby et al. (1999) non abbiamo osservato una sensibilità alla temperatura per quanto riguarda l'ampiezza del ritmo circadiano; anche se tale effetto viene riportato per l'ampiezza di ritmicità circadiane cellulari

Nell'introduzione abbiamo ricordato come la costanza del periodo sia in assenza di segnali ambientali, che in presenza di ampie variazioni della temperatura ambientale, siano caratteristiche fondamentali di un ritmo endogeno. La presenza di componenti ultradiane nell'attività locomotoria di roditori è stata ampiamente documentata, come anche la persistenza delle stesse in condizioni costanti DD o LL (Honma e Hiroshige, 1978; Büttner e Wollnik, 1983; Ticher e Ashkenazi, 1995). Anche il dato circa la presenza e la costanza di periodicità ultradiane nel range temporale 100-300 minuti, rilevata in lavori precedenti nelle formiche (Renzi e Pasquali 2000), nelle blatte (Pasquali e Renzi 2002) e nei topi (Pasquali *et al.* 2003), è stato ulteriormente replicato in questo lavoro, sia in condizioni di fotoperiodo costante (DD) ma anche in presenza di variazioni della temperatura. Tali risultati assumono una loro importanza in quanto si configurano come dati a favore dell'endogenicità dei ritmi ultradiani; essi si mostrano costantemente presenti in diverse condizioni di illuminazione, quindi non influenzati dal fotoperiodo e mostrano un periodo temperatura compensato.

In ultimo va menzionato il fatto che tutte le analisi sui parametri del circadiano sono state eseguite su registrazioni di soli 5 gg. Risulta quindi difficile aspettarsi dei valori significativi su solo 5 ripetizioni del ciclo. Nonostante ciò i valori osservati mostrano il tipico trend dei parametri ceppo-dipendenti di questi animali.

Bibliografia

- Bruce, V.G. "Environmental entrainment of circadian rhythms" (1960) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25, p 29-48
- Bunning, E. (1967) "The physiological clock", Springer-verlag, New York inc.
- Büttner, D. Wollnik, F. "Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat" (1984) Behavior Genetics, vol.14, n°2, 137-152
- Francis, C.D Sargent, M.L "Effect of temperature perturbations on circadian conidiation in Neurospora" (1979) Plant Physiology, 64, 1000-1004
- Kippert F., Hunt P. (2000) "Ultradian clocks in eukaryotic microbes: from behavioural observation to functional genomics", BioEssays 22:16-22
- Kippert, F. "The ultradian clocks in eukaryotic microbes: timekeeping devices displaying a homeostasis of the period" in: Ruoff, P. "Temperature compensation of circadian and ultradian rhythms" (1997) Chronobiology international, vol.14, n°5, spec. iss.
- Honma K, Hiroshige T, "Endogenous ultradian rhythms in rat exposed to prolonged continuous light" (1987) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 235: R250-R256
- Pittendrigh, C.S. "On temperature independence in the clock system controlling the emergence time in drosophila" (1954) Proc.N.A.S. vol.40, 1018-1029
- Rensing and Ruoff (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. Chron Int, 19(5):807–864, 2002
- Ticher, A. Ashkenazi, J.E. "Compound structure of rodents activity rhythm" (1995) Physiology and Behavior vol.57, n°1, 37-40
- Tomioka, K. Sakamoto, M. Harui, Y. Matsumoto, N. Matsumoto, A. "Light and temperature cooperate to regulate the circadian locomotor rhythm of wild type and period mutants of Drosophila melanogaster" (1998) Journal of insect physiology, 44, 587-596
- Toth, L.A Williams, R.W "A quantitative genetic analysis of locomotor activity in CXB recombinant inbred mice" (1999) Behavior Genetics, vol.29, n°5, 319-328
- Wollnik, F. Gärtner, K. Büttner, D. "Genetic analysis of circadian and ultradian rhythms in laboratory rats" (1987) Behavior Genetics, vol.17, n°2, 167-178

CAPITOLO 4

Studi su Invertebrati: animali cavernicoli

4.1 Attività locomotoria in grilli cavernicoli del genere *dolichopoda*. Uno studio cronobiologico su popolazioni provenienti da grotte naturali ed artificiali

[Subterranean Biology (2005), 3: 49-55]

Introduzione

Gli insetti cavernicoli rappresentano un eccellente modello per studiare l'evoluzione e l'adattamento alla vita sotterranea, ma anche per lo studio dei ritmi biologici. Ritmi circadiani di attività locomotoria sono stati documentati in pochi insetti ipogei. Attualmente la maggior parte delle conoscenze sulla cronobiologia degli insetti cavernicoli ci viene dagli esperimenti condotti da Lamprecht and Weber (Lamprecht & Weber, 1979, 1983, 1991). Questi autori riportarono la presenza di ritmi circadiani endogeni nell'attività locomotoria di carabidi troglodili: *Duvalius exaratus*, *Laemostenus terricola* and *L. oblongus*. Ma in *D. exaratus* and *L. navaricus* essi trovarono un pattern di attività aperiodica in condizioni di buio continuo. Inoltre essi riportarono la presenza di pattern di attività aperiodici in differenti specie troglobie: *Typhlochoromus stolzi*, *Speonomus diecki*, *Duvalius jureceki*, *D. delphinensis*, *D. balazuci*, *Geotrechus orpheus*, *Aphaenops cerberus*, *A. crypticola* e *A. pluto*. Questi esperimenti furono condotti con differenti fotoperiodi: buio continuo (DD), luce-buio (LD) e luce continua (LL). Pattern aritmici di attività furono anche osservati nei carabidi del genus *Rhadine*, nei millepiedi *Blaniulus lichtensteini* e nelle bathysciine *Speonomus diecki* (see Lamprecht and Weber, 1991).

In un lavoro recente (Koilaraj et al., 2000) sono stati riportati risultati poco chiari su millepiedi cavernicoli *Glyphiulus cavernicolus sulu*, monitorati in LD, DD e LL. Alcuni animali mostravano una ritmicità circadiano nell'attività locomotoria, mentre altri animali mostravano un'attività aritmica.

La prima specie di grilli cavernicoli studiati, *Hadenoeus subterraneus* abbondante in Nord America, rivelò la presenza di ritmi endogeni circadiano nell'attività locomotoria, prevalentemente concentrata nelle ore notturne (Nicholas, 1962; Reichle, 1963; Park and Reichle, 1963; Reichle et al., 1965).

Nel complesso, questi studi mostrarono che l'attività circadiana tende a degenerare in organismi "cave obligate", come indicato dalla comparazione di specie epigee e troglodile con specie troglobie, inoltre i dati mostravano una grande variabilità. Inoltre non sono mai stati riportati dati sui ritmi ultradiani. Riteniamo necessario sviluppare studi sperimentali al fine di comprendere la

transizione di questo tratto attraverso il processo adattativi alla vita cavernicola, in particolare in specie e popolazioni vicine agli animali troglodili.

In Italia, la presenza di grilli cavernicoli del genere *Dolichopoda* è stata riportata per un ampio range di habitat sotterranei, più ampio di *Hadenoeus* del Nord America, poichè include non solo le grotte naturali, ma anche antiche caverne artificiali, come le Tombe Etrusche, gli acquedotti e le cisterne Romane, le cantine, ecc... Popolazioni di più specie appartenenti a questo genus possono essere trovate in entrambi i tipi di grotte, ma le grotte naturali ed artificiali differiscono per diversi parametri ecologici, come risorse trofiche, comunità biotica, ecc..., e gli anni di colonizzazione dell'ambiente. In accordo con l'origine delle grotte, le popolazioni di grilli mostrano differenze in molti tratti del ciclo vitale. Popolazioni provenienti da grotte naturali mostrano la mancanza di stagionalità nei cicli vitali, quali la deposizione di uova durante tutto l'anno e l'assenza della diapausa delle ninfe. Al contrario, le popolazioni provenienti da grotte artificiali mostrano cicli vitali con una forte stagionalità nella riproduzione, nello sviluppo delle ninfe e nell'età della popolazione (Sbordoni, 1980; Di Russo et al., 1994; De Pasquale et al., 1995). Osservazioni preliminari sul campo avevano suggerito all'autore senior (V.S.) un differente pattern di distribuzione spaziale e di attività circadiano tra le popolazioni naturali e artificiali. Questa variabilità nei tratti comportamentali era altresì presente fra popolazioni appartenenti alla stessa, per tali ragioni questi grilli cavernicoli ci sono sembrati un utile modello per studi sperimentali sull'evoluzione di questi tratti comportamentali

Al fine di testare e quantificare le differenze nell'attività locomotoria, noi abbiamo utilizzato un approccio cronobiologico. Noi abbiamo basato le nostre analisi su metodi inferenziali, al fine di ottenere informazioni quantitative su ritmi, ampiezza e fase. Abbiamo costruito un sistema elettronico di monitoraggio al fine di registrare in modo continuo ed automatico l'attività locomotoria generale di grilli cavernicoli stabulati singolarmente.

Materiali e metodi

Soggetti

Abbiamo utilizzato due specie di *Dolichopoda*: *D. baccettii* e *D. geniculata geniculata*. Per entrambe le specie di grilli cavernicoli sono stati raccolti individui provenienti dai due diversi habitat : grotte naturali (N) e grotte artificiali (A). La tabella 1 mostra le caratteristiche delle specie e delle grotte. Tutti gli animali erano sub-adulti il più possibile simili per dimensioni. Gli esemplari,

una volta raccolti venivano trasportati in laboratorio e fatti acclimatare alle condizioni sperimentali. Per ogni specie sono stati analizzati 5 esemplari.

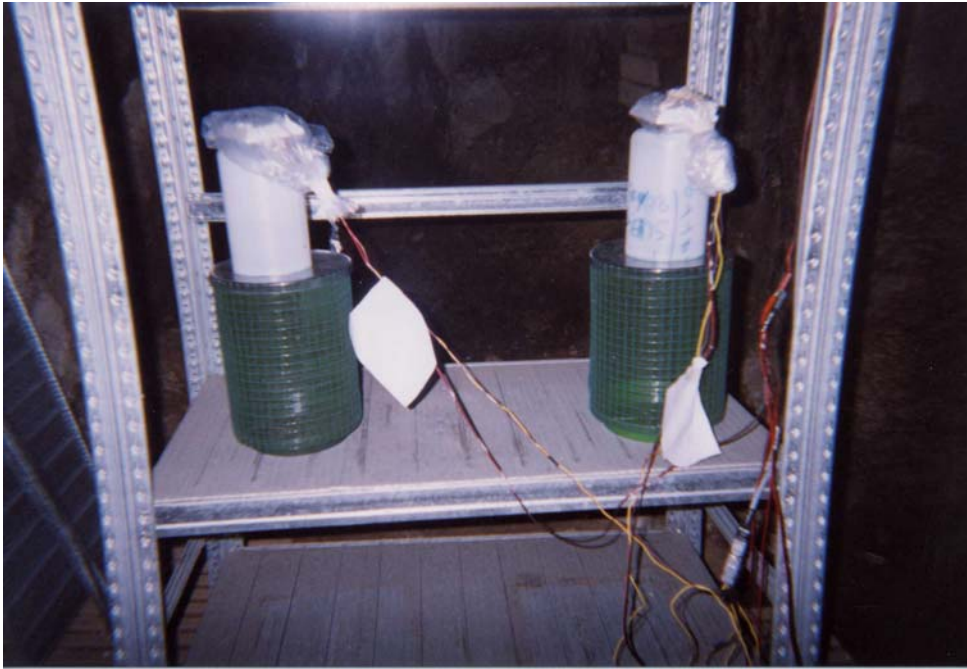
Procedura

Tutti gli animali erano stabulati individualmente in gabbie entomologiche di plastica (30 X 20Ø cm). Gli animali erano sistemati in una grotta artificiale presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma "Tor Vergata", in condizioni di fotoperiodo e temperatura successivamente utilizzate per gli esperimenti: buio continuo (DD), temperatura ed umidità costante $17^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e 85%, cibo ed acqua *ad libitum*. Tutti gli insetti rimanevano per più di 20 giorni in DD prima di iniziare l'esperimento. Dopo questo periodo di adattamento, registravamo l'attività locomotoria per 15 giorni consecutivi per mezzo di un sistema radar. Un computer collegato al radar memorizzava il numero di movimenti per minuto.

Apparato radar per il rilevamento dell'attività locomotoria

L'attività locomotoria dell'animale veniva rilevata automaticamente per mezzo di radar a microonde che sfruttano l'effetto Doppler. I radar erano posizionati a 25 cm sopra la gabbia entomologiche così da essere totalmente nel cono di emissione del radar, ed erano collegati ad un personal computer (Pasquali & Renzi, 2005). I radar a microonde operavano sulla frequenza di 9,9 Ghz (Mw-12, Lince Italia Srl) quindi una lunghezza d'onda di 3 cm. Per rilevare oggetti di dimensioni inferiori alla lunghezza, è necessaria un accurata regolazione dell'apparato. La sensibilità è normalmente controllata da un trimmer con un ristretto range di regolazione (22 Kohm). Noi abbiamo sostituito il componente utilizzando un trimmer da 100 Kohm al fine di ottenere una scaladi regolazione più fine e un maggior controllo della sensibilità del circuito. I radar erano collegati al computer per mezzo di una scheda di I/O digitale (PIO-12, Keithley Instruments). I segnali in ingresso alla scheda venivano derivati dal punto di connessione di un LED che segnala la rilevazione del movimento. Un semplice programma, scritto in linguaggio C, legge in continuazione i canali della scheda di I/O. Tutti i parametri: lunghezza dell'esperimento (minuti o giorni), intervallo di raccolta del singolo dato (secondi o minuti), ecc..., sono facilmente impostabili per mezzo del programma. Il numero di radar supportato del computer è strettamente dipendente dal numero di canali della scheda I/O. Sono stati eseguiti una serie di controlli accurati quali: a) interferenze fra radar adiacenti, b) medesime misurazioni da parte di tutti i radar, c) mantenimento della stabilità delle regolazioni nel tempo. Tutti i radar venivano settati con l'aiuto di un oggetto meccanico dal movimento standardizzato. In fine, ogni gabbia entomologica con il rispettivo radar era posizionata ad 1 mt di distanza dalla successiva.

Fig. 1. Experimental cages with radar above.



Analisi dei dati

Su tutte le serie temporali fu calcolata la media mobile su 3 punti e fu sottratto il trend lineare. Noi usammo due differenti analisi: 1) per ogni soggetto venne eseguita l'analisi spettrale per mezzo della Discrete Fourier Transform (Parzen window). Per ogni spettro fu eseguito il test di Kolmogorov-Smirnov al fine di verificare la possibile origine random dei picchi (white noise). Considerammo significativi solo i picchi superiori a 2.88 SD (Conte et al., 1995). 2) Per stimare il periodo circadiano utilizzammo la procedura del Chi-quadro di Sokolove and Bushnell (1978). Per comparare il periodo circadiano fra le 4 popolazioni utilizzammo l'analisi non parametrica di Kruskal-Wallis con un livello di significatività a 0.05

Risultati

Tutti I grilli carvenicoli mostrarono un chiaro ritmo circadiano $23.98 \text{ h} \pm 0.77 \text{ h}$ (mean \pm SD, n = 20). Table 2 mostra per ogni popolazione il periodo circadiano medio con la corrispondente varianza e il periodo circadiano per ogni animale.

Come prima analisi eseguimmo il Kruskal–Wallis “ANOVA by ranks” sul periodo circadiano delle quattro popolazioni, non osservammo nessuna differenza significativa ($X^2 = 2.85$, $p > 0.05$). Successivamente comparammo la varianza delle popolazioni per mezzo del test F. Figure 2 mostra la comparazione delle medie e della varianza di tutte le popolazioni: noi osservammo per le due popolazioni di *D. baccettii* (A and N) una differenza significativa [$F(4, 4) = 18.61$, $p < 0.01$], così come per la varianza delle due popolazioni di *D. geniculata* (A and) [$F(4, 4) = 34.83$, $p < 0.01$].

Nello stesso modo, la comparazione incrociata mostrò differenze significative per *D. baccettii* (N) vs *D. geniculata* (A) [$F(4, 4) = 20.17$, $p < 0.01$] e per *D. baccettii* (A) vs *D. geniculata* (N) [$F(4, 4) = 32.15$, $p < 0.01$].

Al contrario, non osservammo nessuna significatività nella comparazione delle due popolazioni provenienti da grotta naturale (*D. baccettii* vs *D. geniculata*) [$F(4, 4) = 1.73$, $p > 0.05$] e da grotta artificiale (*D. baccettii* vs *D. geniculata*) [$F(4, 4) = 1.08$, $p > 0.05$].

L’analisi spettrale calcolata per ogni *Dolichopoda* rivelò la presenza di ritmi ultradiani nell’attività locomotoria. DFT mostrò che tutti gli insetti presentavano picchi significativi, con un alta potenza spettrale a 12 h e 8 h (Fig. 3). Noi osservammo altri picchi significativi nel range 100-300 minuti (Fig. 4), in particolare intorno ai 200 minuti. Queste periodicità furono altresì identificate dall’analisi del chi-quadro.

Table 1. Cave and population

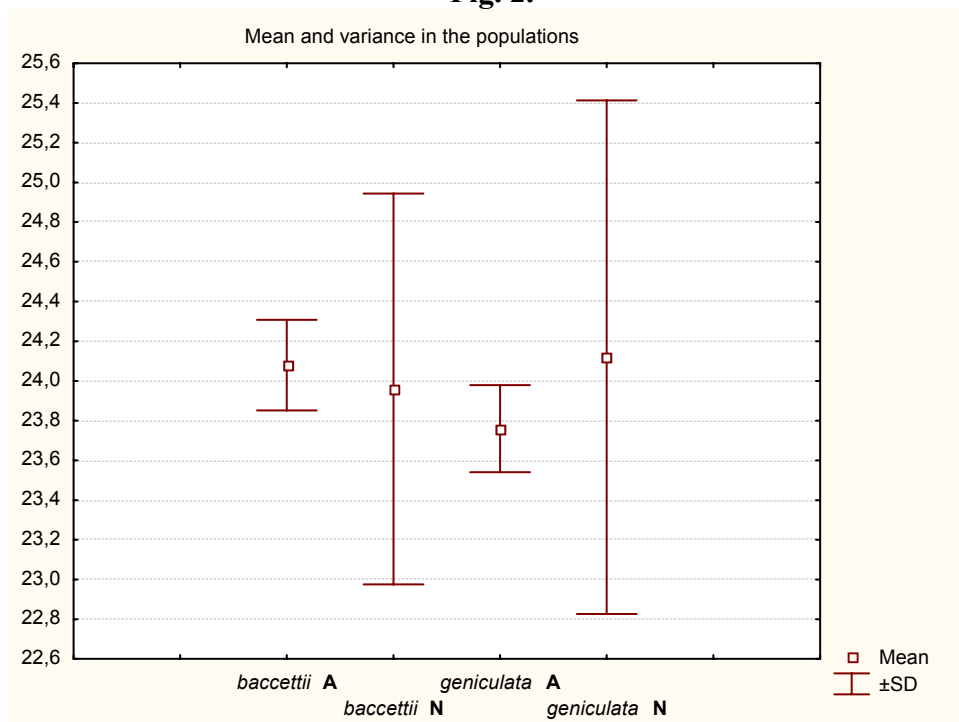
Cave name and location	Cave type *	Temperature C° **	Species
Buca sopra Cimitero Cave, Mt. Argentario, GR	A	14.5	<i>D. baccettii</i>
Punta degli Stretti Cave, Mt. Argentario, GR	N	15.0	<i>D. baccettii</i>
Roman Cistern, Tuscolo, Roma	A	14.0	<i>D. g. geniculata</i>
Pastena Cave, Pastena, FR	N	16.5	<i>D. g. geniculata</i>

* (N) = Natural caves, (A) = Artificial caves. ** Expressed in centuries

Table 2. Endogenous parameters: circadian period in DD for any subject, mean and variance of the populations.

Subject	Period	Mean period of the population
b	24	
c	24	<i>D.baccettii</i> (A)
e	23.8	Mean 24.08
h	24.2	Var 0.05
x	24.4	
B	24	
C	22.4	<i>D.baccettii</i> (N)
D	23.8	Mean 23.96
F	24.8	Var 0.97
L	24.8	
a2	23.4	
b2	23.8	<i>D.g.geniculata</i> (A)
g2	23.8	Mean 23.76
l2	24	Var 0.05
m2	23.8	
A2	26	
E2	24.4	<i>D.g.geniculata</i> (N)
D2	22.4	Mean 24.12
H2	24	Var 1.67
M2	23.8	

Fig. 2.



Discussione

Questo studio è principalmente focalizzato sull'analisi della ritmicità circadiana ed ultradiani nell'attività locomotoria generale, enfatizzando i nuovi dati che certamente meritano nuove investigazioni. Infatti la strumentazione elettronica utilizzata e la metodologia per l'analisi dei dati aprono nuove ed interessanti prospettive negli studi cronobiologici con animali cavernicoli.

I pattern osservati della ritmicità circadiano sono in accordo con i risultati di altri autori (Park and Reichle, 1963; Reichle et al., 1965). Tutti gli esemplari delle popolazioni mostrano in DD un periodo circadiano di circa 24 ore senza nessuna differenza significativa fra entro i soggetti e tra le popolazioni. Inoltre, mentre il periodo medio fra le popolazioni non mostra differenze, la varianza le evidenzia tali differenze. I grilli cavernicoli erano caratterizzati dalla presenza di una differente variabilità nella ritmicità circadiano. Fra le popolazioni di grotta naturale e grotta artificiale la varianza era sempre significativa ($p < 0.01$ in all test), mentre non lo era fra gli esemplari di popolazioni raccolte nello stesso tipo di grotta (natural or artificial) ($p > 0.05$).

Noi ipotizziamo che ciò sia dovuto ad un differente impatto della pressione selettiva. Nelle popolazioni di grotta artificiale un periodo vicino alle 24 ore potrebbe essere mantenuto dalla selezione naturale. Infatti, popolazioni di grilli che colonizzano gli ambienti artificiali dipendono fortemente dalle risorse trofiche esterne alla grotta (De Pasquale et al., 19995), quindi i grilli sono fortemente dipendenti dallo Zeitgeber esterno che ne sincronizza l'attività (Fig. 5), da ciò ne risulta una stretta variabilità nella popolazione. E' abbastanza interessante notare che queste popolazioni mantengono anche una rigorosa stagionalità nel ciclo di vita (Di Russo et al., 1987,1994).

Contrariamente in molte delle popolazioni di grotta naturale la pressione selettiva non ha agito selettivamente su un determinato fenotipo, l'adattamento da lungo termine ha condotto *Dolichopoda* a dipendere totalmente dalle risorse di cibo disponibili nella grotta, come ad esempio il guano di pipistrello ed altro materiale organico (De Pasquale et al., 1995), e quindi era attesa una più ampia variabilità circa la lunghezza era attesa. Il sistema elettronico usato in questo studio, la frequenza di raccolta dei dati e l'analisi spettrale utilizzata, ha permesso di identificare la presenza di ritmi ultradiani. L'analisi spettrale infatti ha dimostrato la presenza di significativi picchi ultradiani nel range 1-8 hr, simili a quelli trovati in blatte e topi (Pasquali et al., 2003; Pasquali & Renzi, 2005).

Fig. 3. Mean power spectra. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

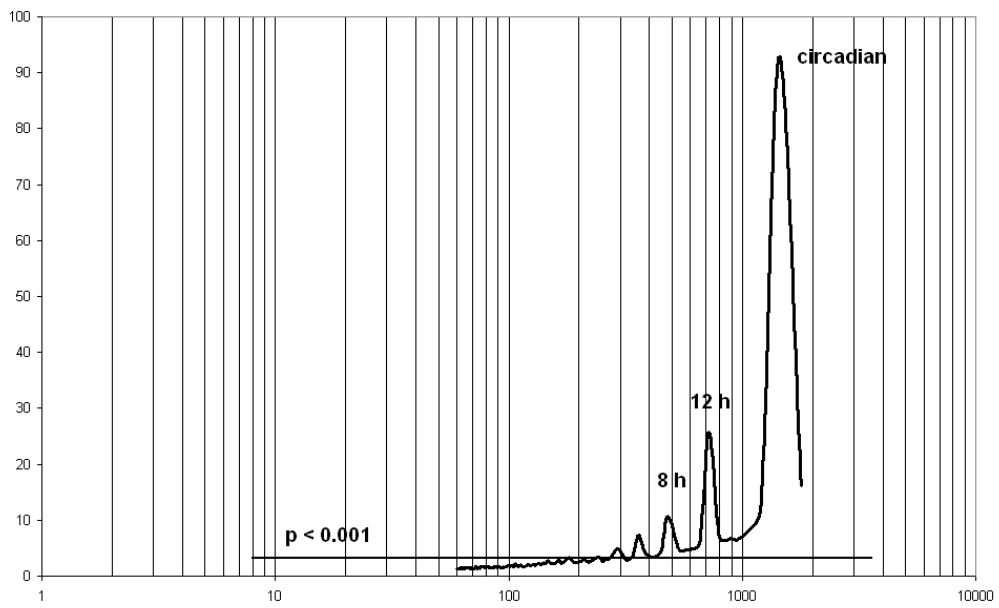


Fig. 4. Spectral analysis of activity rhythms of two cave-crickets. Power values on the y-axis; x-axis is periods (in minutes) in logarithmic scale.

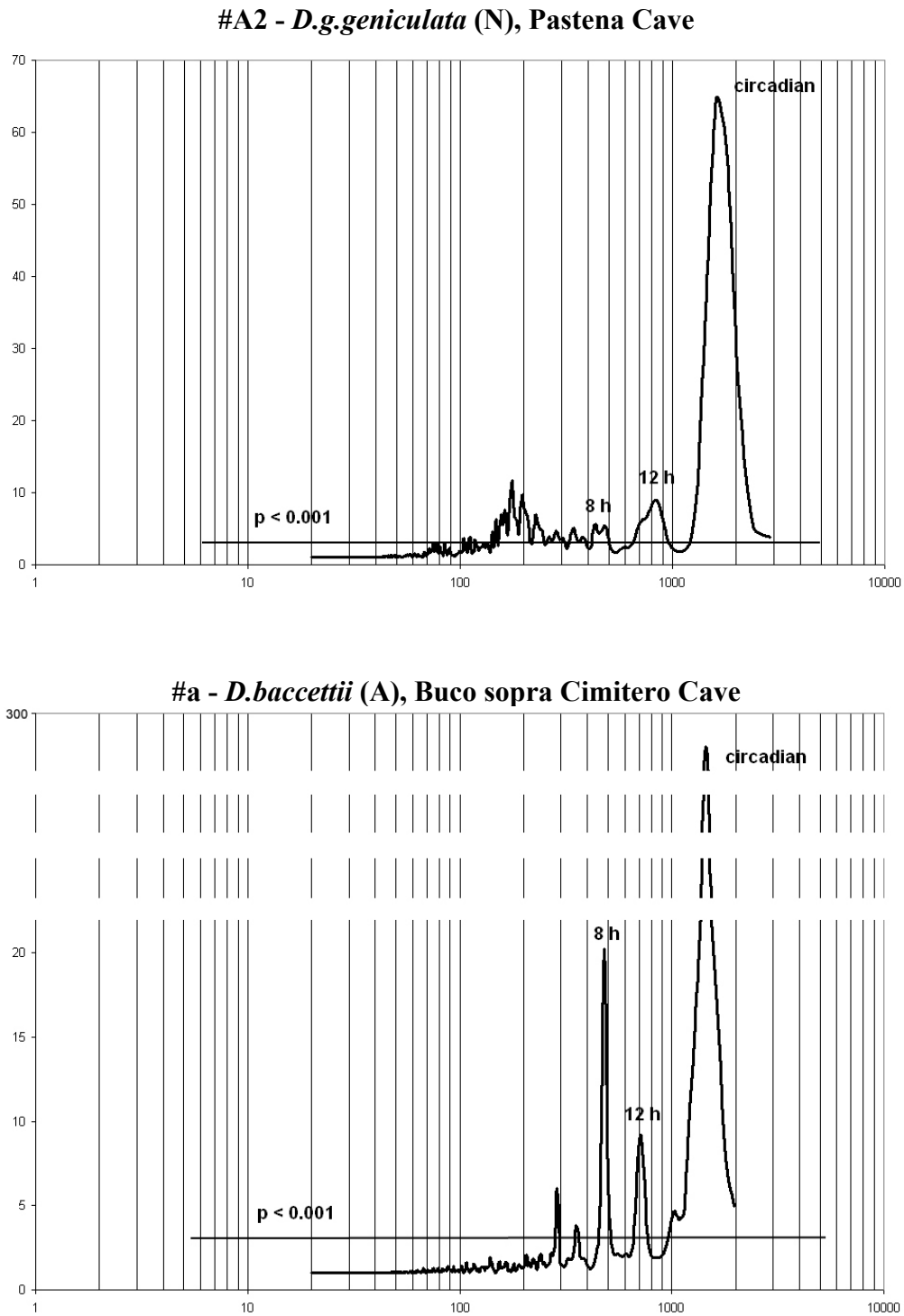
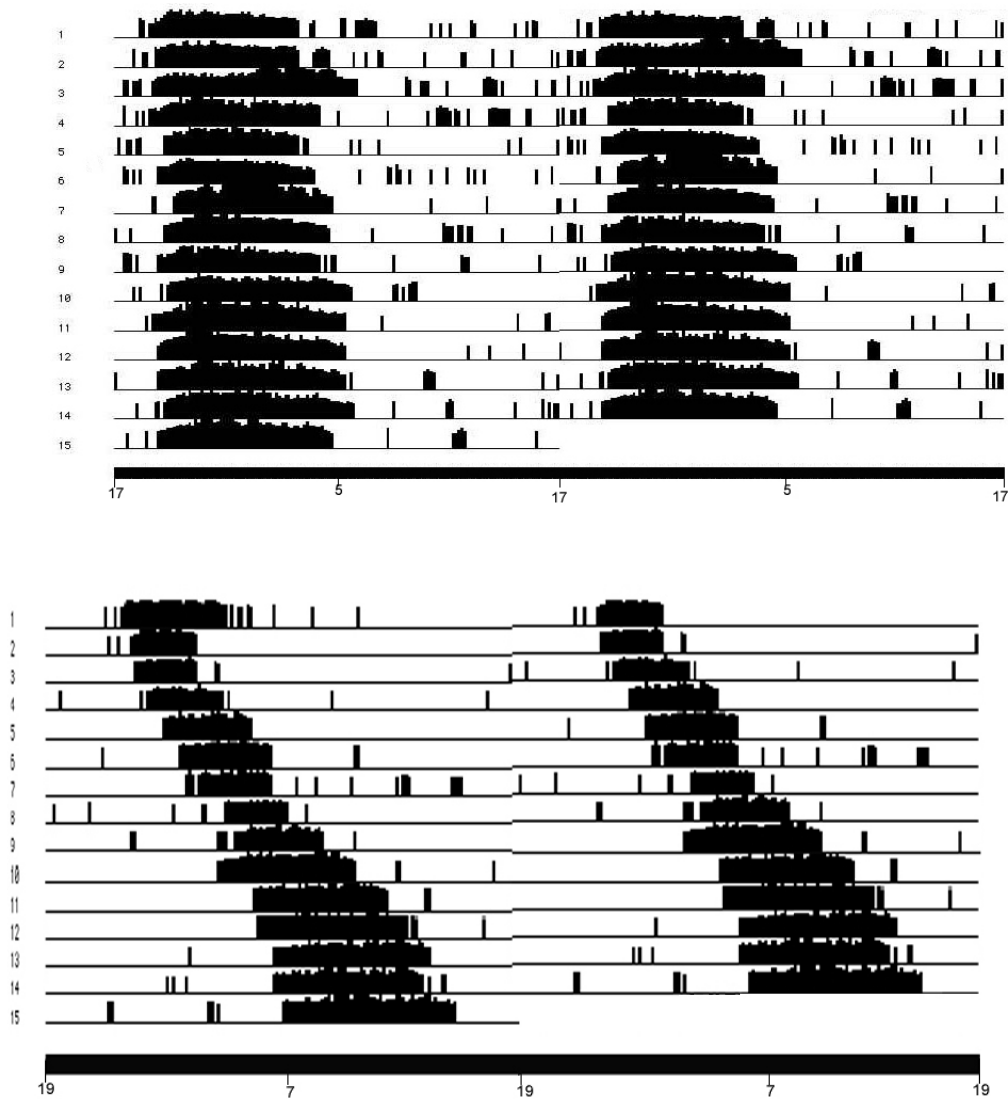


Fig. 5. Double-plotted actograms of the free-running locomotor activity pattern of two cave-cricket recorded with the radar for 15 days under constant darkness (DD) condition. Top: subject #h - *D.baccettii* (A), Buca sopra Cimitero. Bottom: subject #F - *D.baccettii* (N), Punta degli Stretti Cave.



Acknowledgments

We are grateful to Marco Micaloni for the program written in C language that controls the radar devices, Claudio Mecoli and Carmen Silvestri for their contribution. We thank Prof. Fabio Ferlazzo for suggestions to the text. We thank Benjamin Kenward for the english revision.

Note

The used software and the new versions are available freeware. vittorio.pasquali@uniroma1.it

References

- Conte, S., F. Ferlazzo, P. Renzi. 1995. Ultradian rhythms of reaction times in performance in vigilance tasks. *Biological Psychology* 39: 159-172
- De Pasquale, L., D. Cesaroni, C. Di Russo, V. Sbordoni. 1995. Trophic niche, age structure and seasonality in *Dolichopoda* cave crickets. *Ecography* 18: 217-224
- Di Russo, C., A. Vellei, G. Carchini, V. Sbordoni. 1987. Life cycle and age structure of *Dolichopoda* (Orthoptera, Rhabdophoridae) from natural and artificial cave habitats. *Bollettino di Zoologia*. 4: 337-340
- Di Russo, C., G. Carchini, V. Sbordoni. 1994. Life-history variation in *Dolichopoda* cave crickets. In: Danks, H.V. (ed.), *Insect life-cycle polymorphism*. Kluwer, Netherlands, pp. 206-226
- Koilraj, A.J., V.K. Sharma, G. Marimuthu, M.K. Chandrashekar. 2000. Presence of circadian rhythms in the locomotor activity of a cave-dwelling millipede *Glyphiulus cavernicolus sulu* (Cambalidae, Spirostreptida). *Chronobiology International*. 17: 757-765

- Jegla, T.C., T.L.Poulson. 1968. Evidence of circadian rhythms in a cave crayfish. *Journal of Experimental Zoology*. 168: 273-282.
- Lamprecht, G., F. Weber. 1979. The regressive evolution of the circadian system controlling locomotion in cavernicolous animals. *Misc. Papers L.H. Wageningen*, 18: 69-82
- Lamprecht, G., F. Weber. 1983. Activity control in the eyeless carabid beetle *Typhlochoromus stolzi*, an inhabitant of a superficial underground compartment. *Mémoires de Biospéologie*. X: 377-383
- Lamprecht, G., F. Weber. 1991. Spontaneous locomotion behavior in cavernicolous animals: the regression of the endogenous circadian system. Pp. 225–262. In *The Natural History of Biospeleology* (A.I. Camacho, ed.). *Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales*, Madrid.
- Nicholas, G. 1962. Nocturnal migration of *Hadenoecus subterraneus*. *National. Speleological. Society*. 10: 102
- Pasquali, V., V. Carola, M. Migliore, I. Kovacev, P. Renzi. 2003. Ritmi circadiani ed ultradiani di attività locomotoria in ceppi inbred di topo. *Congresso Società Italiana di Neuroscienze*. Pisa, 26-28 settembre.
- Pasquali, V., P. Renzi. 2005. On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: an application with *Periplaneta americana*. *Behavior Research Methods, Instrumentation & Computers* (in press).
- Park, O., D. Reichle. 1963. Observations on the Ecology and Behavior of the cave cricket *Hadenoecus subterraneus* (Scudder). *Bulletin of the Ecological Society of America*. 44: 126-127
- Reichle, D. E..1963. Rhythmic activity in the cricket *Hadenoecus subterraneus*. *Bulletin of the Ecological Society of America*. 44: 98
- Reichle, D.E, J.D. Palmer, O. Park. 1965. Persistent rhythmic locomotor activity in the cave cricket, *Hadenoecus subterraneus*, and its ecological significance. *American midland naturalist*. 74: 57-66

Sbordoni, V. 1980. Strategie adattative negli animali cavernicoli: Uno studio di genetica ed ecologia di popolazione. *Contr. Centro Linceo Interdisc. Acc. Naz. Lincei*. 51: 61-100

Sokolove, P.G., W.N. Bushell. 1978. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*. 72: 131-160.

4.2 Comparazione fra i pattern ritmici di attività locomotoria espresso da tre specie di cavernicoli con un elevato grado di adattamento all'ambiente sotterraneo

Introduzione

Nel presente paragrafo verrà trattato più in dettaglio il confronto fra le diverse specie cavernicole con cui ho lavorato in questi anni. Diversamente da quanto presentato nella pubblicazione per *Thalassia Salentina* (paragrafo 2.1) in cui avevo presentato una semplice comparazione qualitativa, in questo paragrafo si procederà ad una comparazione quantitativa, prendendo in considerazione diversi parametri soprattutto per la ritmicità ultradiana.

Le tre specie in questione sono: due specie troglofile terrestri (grilli cavernicoli del genus *Dolichopoda*) che presentano al loro interno alcune popolazioni con un elevato adattamento all'ambiente cavernicolo; ed una specie acquatica troglobia colonizzante le falde freatiche. Il confronto fra specie appartenenti ad habitat diversi ma che condividono un ambiente fondamentalmente aritmico dal punto di vista delle ciclicità ambientali, può fornire informazioni e spunti di riflessione interessanti.

Materiali e metodi

Per questa comparazione abbiamo utilizzato i dati pubblicati su *Subterranean Biology* (con qualche integrazione) e riguardanti *Dolichopoda geniculata geniculata* (n=7) e *Dolichopoda baccettii* (n=5); ed i pochi dati riguardanti *Spelaeomysis bottazzii* (n=3). Come precedentemente riportati, tutti gli animali sono stati monitorati in condizioni di free-running quindi buio costante (DD) e dopo minimo 15 gg di permanenza in questa condizione. Tutti gli animali avevano cibo (ed acqua) ad libitum, ed erano in condizioni di temperatura (ed umidità) adeguate alla loro specie. Gli animali sono stati monitorati con sistemi automatici specifici per la specie in studio, da un minimo di 4 gg per due individui di *Spelaeomysis* ad oltre 10 gg per tutte le *Dolichopoda*. Tutti i dati sono stati esaminati tramite analisi di Fourier per l'analisi spettrale, e chi-quadro per il calcolo del periodo. I parametri presi in considerazione sono stati: periodo circadiano (τ_{24}), potenza del picco circadiano (P24), del 12 ore (P12), 8 ore (P8) e 4 ore (P4). Inoltre è stato calcolato il periodo

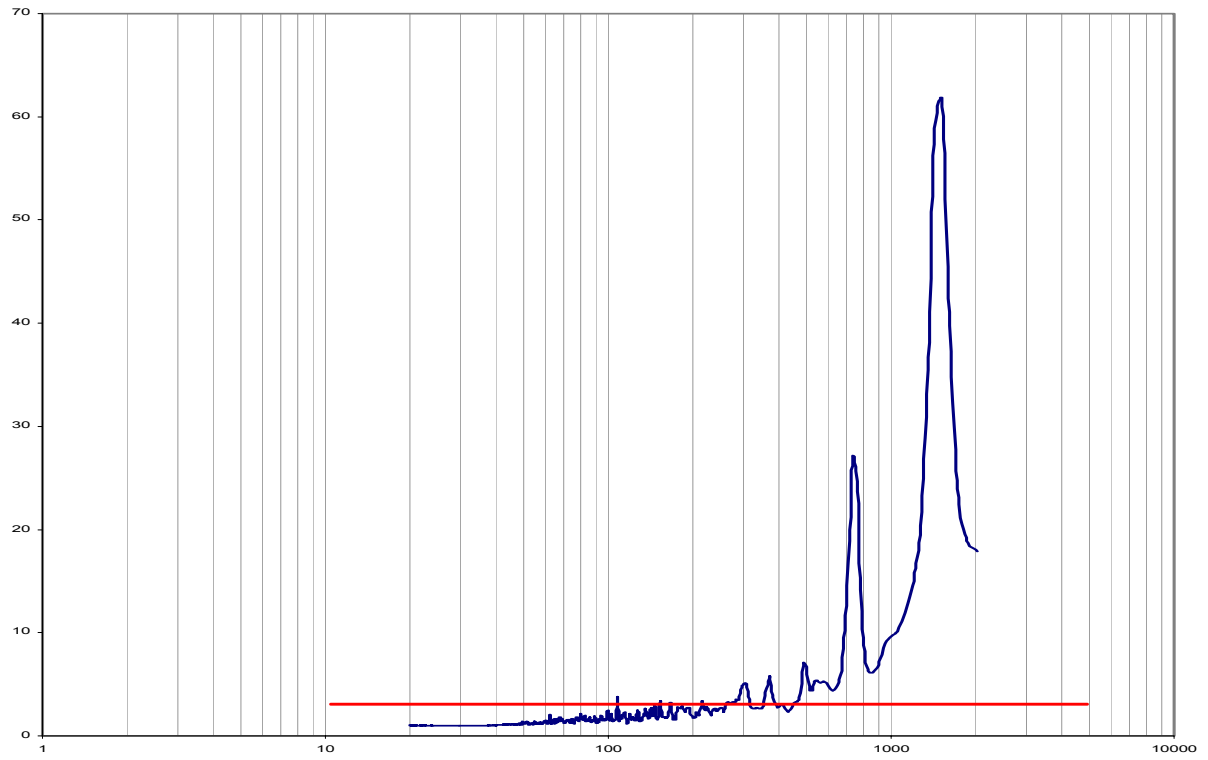
meggiormente significativo nel range 1-8 ore (TAU1-8), la potenza ponderata nel range 480-300 min (pp480-300) e 300-100 min (pp300-100).

Risultati e Conclusioni

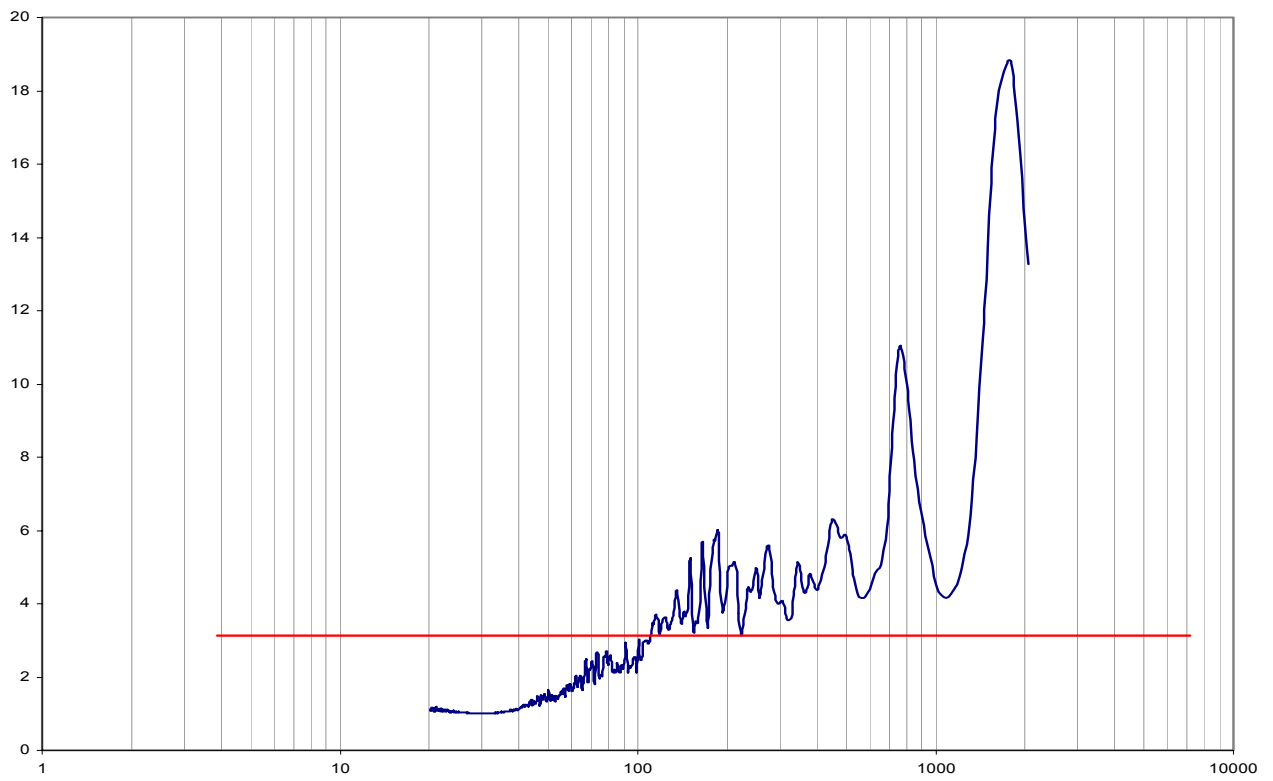
A parte la ritmicità circadiano di cui abbiamo parlato nelle rispettive pubblicazioni, questo breve studio vuole concentrarsi sulle similitudini presenti per la ritmicità ultradiana, in queste specie così diverse. Una differenza ben visibile dall'analisi spettrale, fra i grilli cavernicoli ed i misidacei, è un preponderante ritmo a 12 ore in Dolichopoda; picco che invece non osserviamo negli Spelaeomysis. In questi ultimi infatti nessuno degli individui monitorati mostrava un picco con tale periodicità, neanche il soggetto #1 che rimase in registrazione per oltre 10 gg, diversamente dal #2 e #3 registrati per 4 gg. (questi dati sono visibili nel paragrafo 2.3). Invece in questa specie è ben visibile un picco ad 8 ore. Dall'analisi statistica eseguita mediante ANOVA, osserviamo che le tre specie non mostrano differenze statistiche per nessuno dei parametri presi in considerazione ad eccezione del pp300-100, per il quale D.baccetti mostra una potenza spettrale media molto bassa.

E' interessante osservare come specie così diverse, Dolichopoda terrestre mentre i misidacei acquatici, mostrino delle notevoli similitudini nei ritmi di attività e nelle potenze con cui vengono espressi questi ritmi. Inoltre è bene ricordare che questi animali sono stati monitorati con apparati totalmente differenti e per periodi mediamente molto diversi fra loro. Ciò sta a dimostrare la costanza di questi parametri. Trova quindi una conferma empirica l'affermazione riportata precedentemente e basata unicamente su dati qualitativi

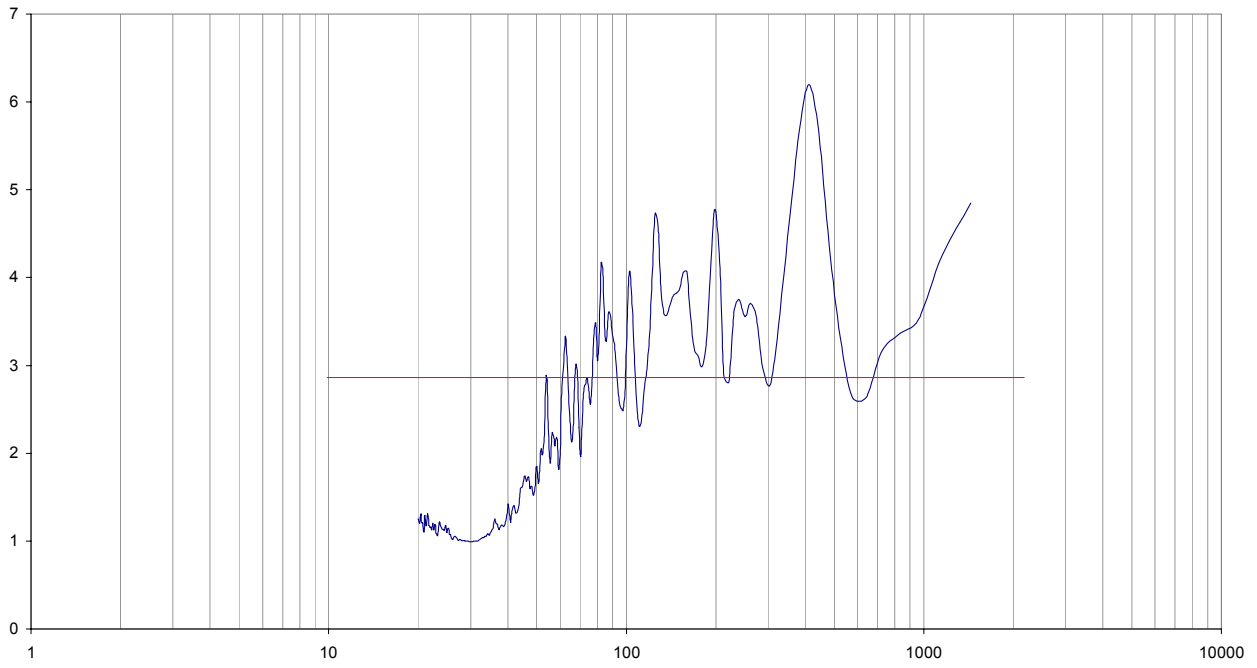
D.baccettii



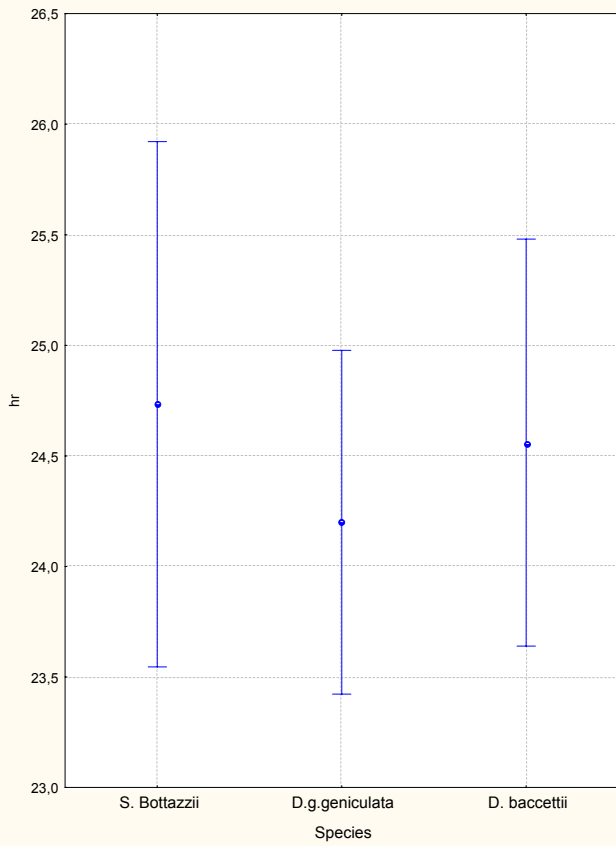
D.geniculata



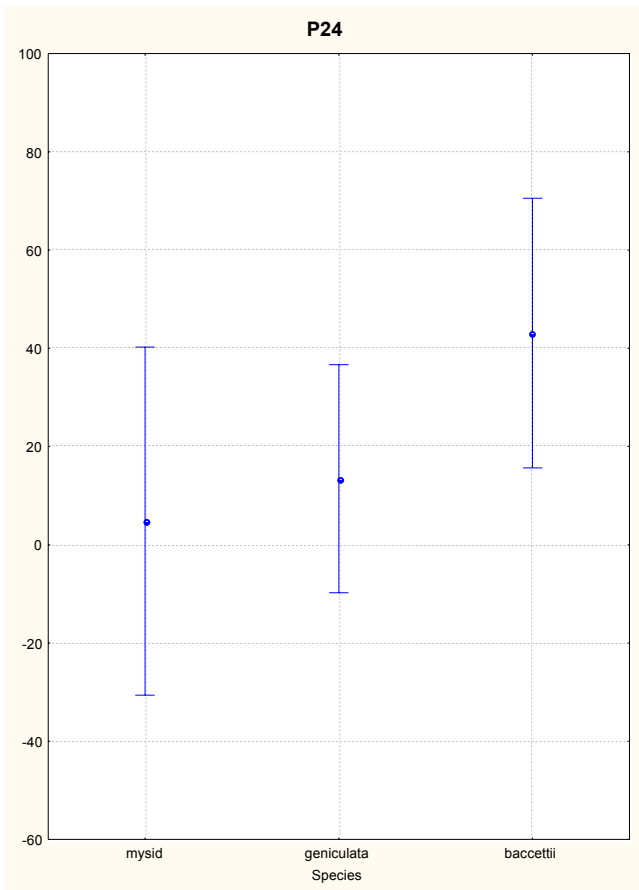
S.bottazzii



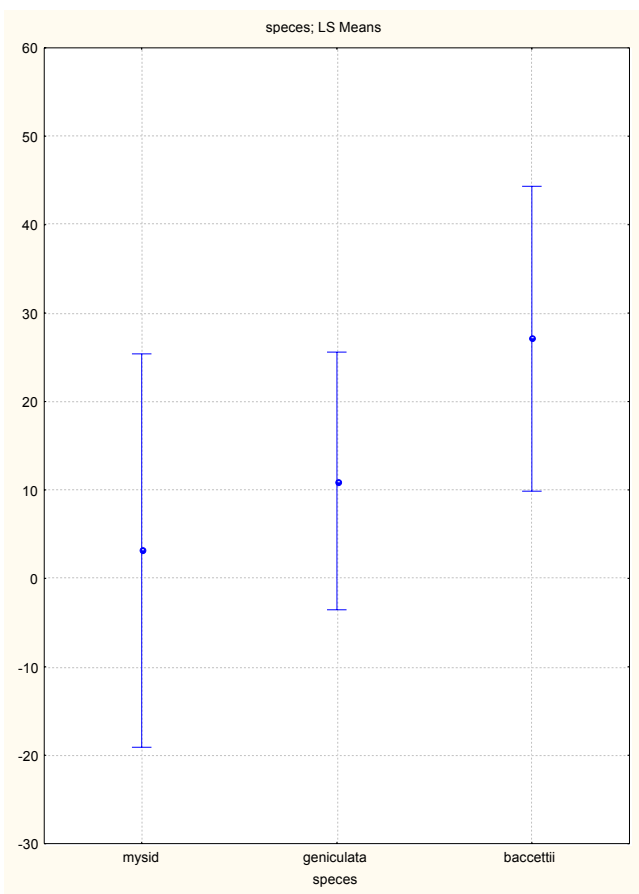
Tau 24



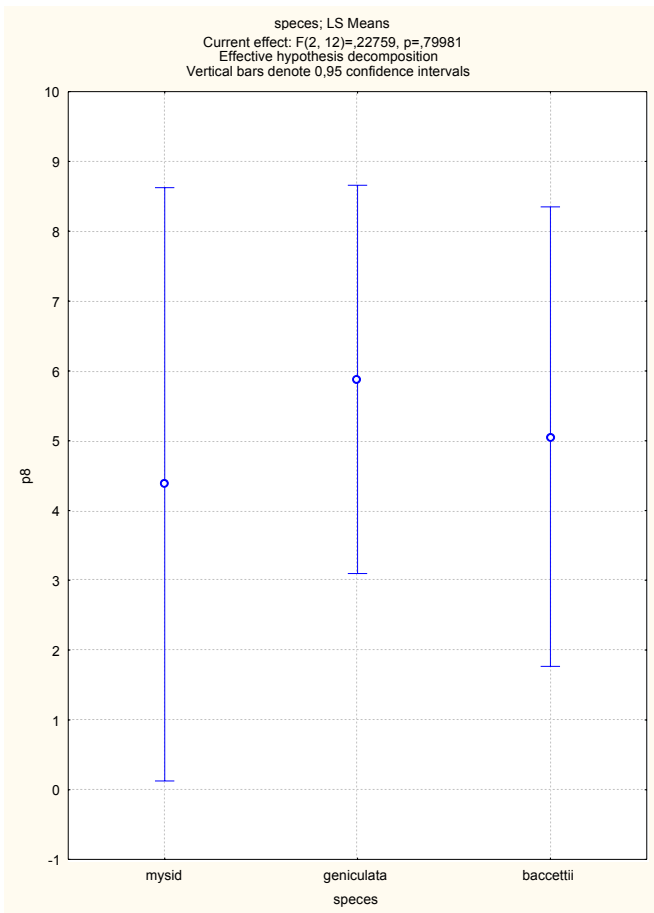
Periodo Circadiano



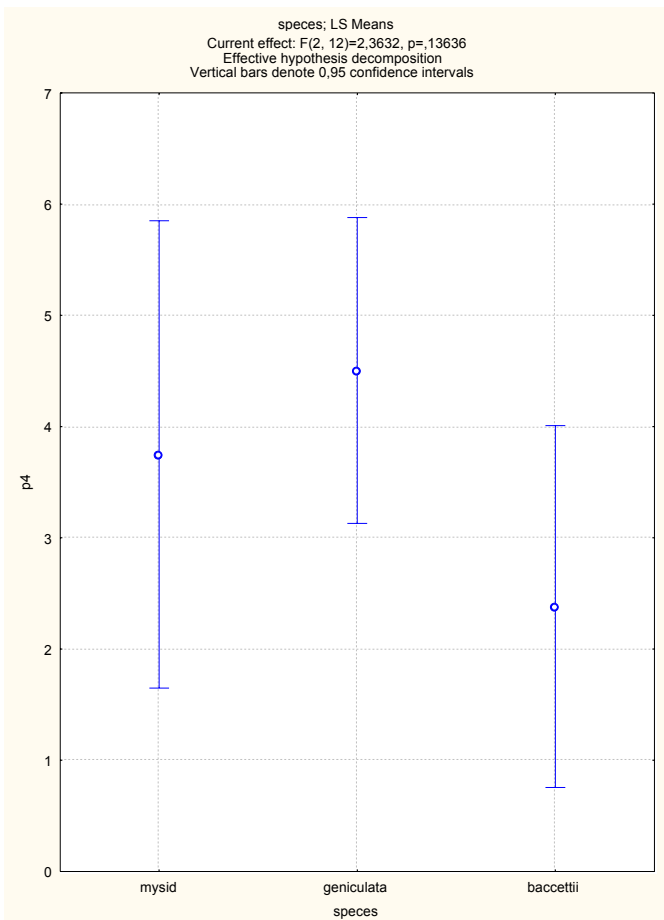
Ampiezza Periodo Circadiano



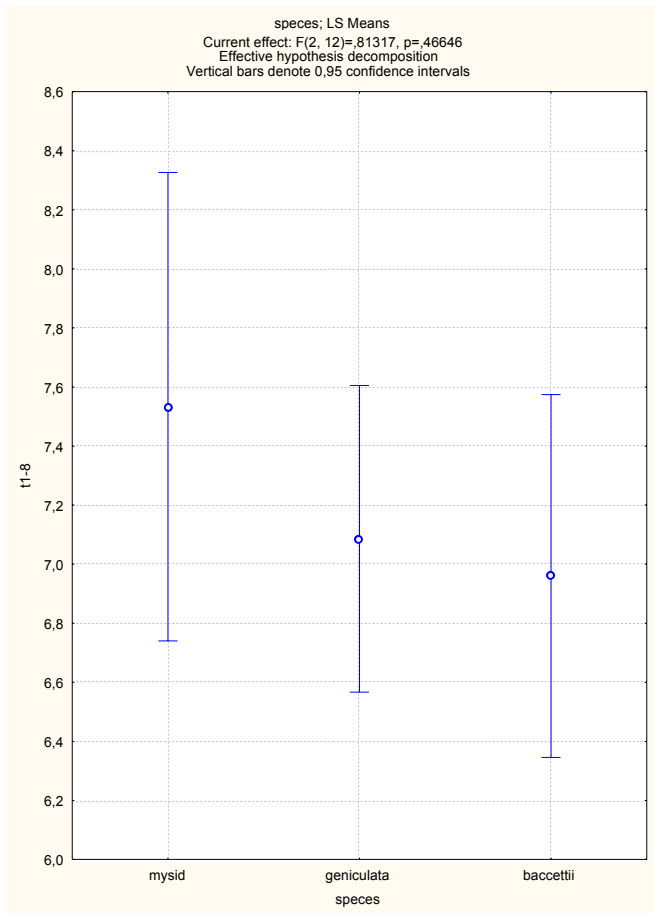
Ampiezza Periodo 12 ore



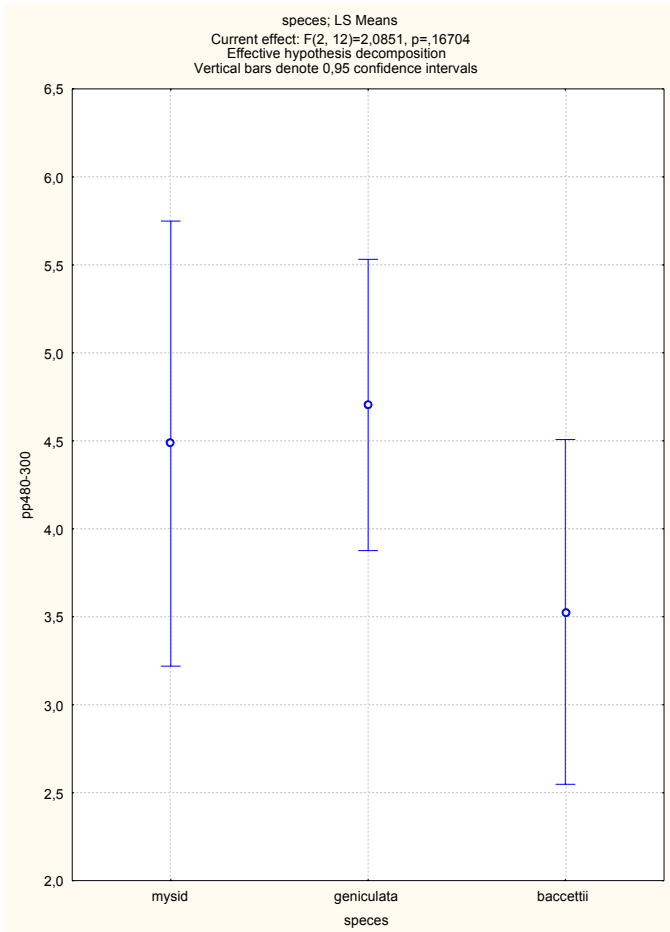
Ampiezza Periodo 8 ore



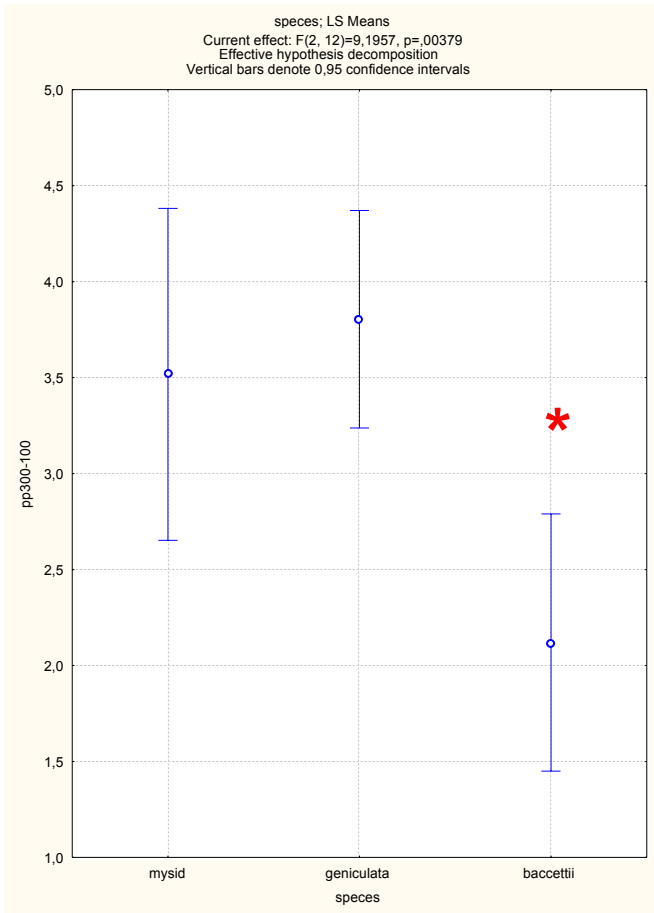
Ampiezza Periodo 4 ore



Periodo fra 1-8 ore



Ampiezza Ponderata 480-300 min



Ampiezza Ponderata 300-100 min

CAPITOLO 5

Conclusioni generali

In contrasto alle ampie conoscenze sul ritmo circadiano, le conoscenze sui ritmi ultradiani sono alquanto limitate. Mentre la definizione di ritmo circadiano implica che esso si è evoluto come adattamento alle periodicità ambientali di 24 ore, la definizione di ritmi ultradiani non ci dà alcuna informazione sull'origine funzionale e sul suo significato. I ritmi ultradiani sono un problema che è sotto gli occhi di tutti i ricercatori che lavorano nell'ambito dei ritmi biologici, un problema a cui ci si riferisce con termini tipo: aritmicità, attività stocastica, ecc.... I ritmi ultradiani sono una classe di fenomeni molto ampia che va dai minuti alle ore, ritmi che si presentano come molto variabili e non stazionari, ma che mostrano avere delle proprietà comuni

Questa tesi forse raccoglie il suggerimento di Aschoff e Gerkema (1995) circa l'importanza di stimolare studi a carattere comparativo, ma anche di accumulare conoscenze sulle caratteristiche formali di questi ritmi al fine di sviluppare modelli che possano permettere di descrivere la dinamica di queste oscillazioni.

Sulla base dei vari studi sviluppati durante i tre anni di Dottorato e dei risultati ottenuti, ritengo di poter elencare una serie di caratteristiche che questi ritmi hanno evidenziato:

- Il ritmo a 24 ore non è l'unica componente ritmica presente nell'attività degli animali, altre componenti con periodicità brevi si sono mostrate altrettanto costanti come il circadiano;
- possiamo certamente dire che queste componenti non dipendono dal circadiano, non ne sono influenzate e si esprimono in modo indipendente;
- non vengono modulati dal fotoperiodo, benché nelle condizioni in cui il fotoperiodo influisce sul circadiano diminuendone l'ampiezza essi diventano più evidenti;
- si sono mostrate temperatura-compensate, non solo negli invertebrati ma anche nei mammiferi;
- hanno mostrato proprietà comuni sia negli invertebrati che nei mammiferi;
- li ritroviamo anche in animali cavernicoli, sia troglodili che fortemente troglodili come i misidacei.

Le caratteristiche elencate fanno ipotizzare un meccanismo indipendente dal circadiano, non delle sue sottocomponenti, un sistema più vicino a dei multi-oscillatori che ad un master-clock.

Sono state proposte alcune ipotesi circa l'origine degli ultradiani, due in particolare, la prima dagli americani Dowse e Ringo i quali ipotizzano delle popolazioni intracellulari di meta-oscillatori che se fortemente accoppiati producono un chiaro e forte ritmo circadiano, quando debolmente accoppiati producono un circadiano blando se invece gli oscillatori vanno fuori fase osserviamo dei ritmi ultradiani. (e ciò potrebbe giustificare il fatto che questi ritmi mostrano caratteristiche tipiche di ritmi prodotti da orologi biologici, infatti secondo questa ipotesi sarebbero prodotti dalle stesse strutture che controllano gli ultradiani, rispondendo quindi a dei criteri precisi, Ma se così fosse non

dovremmo osservarli in condizioni di fotoperiodo normale come invece succede, in cui troviamo. Una seconda ipotesi sostenuta da Ashkenazi riguarda la presenza di componenti ultradiane nella composizione dell'onda circadiano, in questo caso la ritmicità circadiano avrebbe alla base l'interazione di un sistema di oscillatori ultradiani endogeni, ognuno dei quali produrrebbe la sua oscillazione ed insieme genererebbero il 24 ore. In quest'altro caso verrebbe spiegata la presenza delle varie periodicità osservate, ritrovate anche da Ashkenazi, e spiegherebbe nuovamente anche le caratteristiche formali di queste periodicità. In fine bisogna considerare le recenti acquisizioni della ricerca cronobiologia, oggi sappiamo che non esiste un solo orologio biologico circadiano, cellule presenti in diversi tessuti sono in grado di generare un ritmo circadiano. Questi orologi periferici in che rapporto sono con il master clock? Quali funzioni fisiologiche controllano? E se gli ultradiani altro non fossero che delle oscillazioni prodotte dall'interazione dei diversi orologi biologici circadiano? Mi sento nuovamente di dissentire questa volta dall'ipotesi da me proposta, poiché le ritmicità osservate mostrano una certa costanza fra diverse specie ed in diverse condizioni e quando il circadiano è influenzato dalle condizioni sperimentali essi continuano a mantenersi costanti.

Io non ho un ipotesi da proporre, certo ritengo che buona parte delle obiezioni avanzate verso gli ultradiani debbano essere rinviate. Gli ultradiani non sono degli epifenomeni. Gli ultradiani non sono degli artefatti matematici, certo io ho sempre utilizzato lo stesso algoritmo ma già nella mia tesi di laurea avevo presentato dei dati di confronto fra diverse tecniche. Gli ultradiani non vengono generati dalle condizioni sperimentali.

Tali risultati assumono importanza in quanto costituiscono indizi circa l'origine endogena dei ritmi ultradiani. Lo studio dei ritmi ultradiani è ancora in una fase esplorativa, tuttavia la rilevazione di componenti ritmiche costanti in diversi esperimenti, e con diverse specie di animali, costituisce una base per un livello di analisi futuro più analitico. Continuando a mantenere vivo un approccio comparativo fra i diversi phylum, fra specie ipogee ed epigee, marine e terrestri, fra comportamento e fisiologia nel topo ma anche funzioni cognitive negli umani

Qui di seguito presento un ultimissimo confronto, a cui per ora non mi sento di dare grosso risalto ma che mi sembra interessante in quanto potrebbe fornire degli spunti anche critici. Ho eseguito un ANOVA fra tutte le sessioni sperimentali free-running standard di parte degli esperimenti eseguiti. Ovviamente tutti i confronti si dimostrano significativi ma nei vari grafici ho riportato la specie che mostrandosi fortemente differente dalle altre dava l'effetto al confronto (cioè escludendola non osserveremmo differenze significative).

Osservando i confronti fra tutti gli animali, vediamo che l'ampiezza del 12 ore è uguale in tutti gli animali, ad esclusione di *Dolichopoda baccettii*. Anche per l'ampiezza del 8 ore vi è una situazione di omogeneità ad esclusione questa volta degli F1. Ed ancora sul 4 ore ritroviamo una situazione simile ma questa volta a risultare per alcuni confronti differenti sono gli F1 e *D. baccetti*.

Cambia leggermente la situazione per quanto riguarda il tau1-8 dove troviamo generalmente un periodo ultradiano abbastanza simile in tutti gli animali ma dove per alcuni confronti i Balb F, Balb T0 e C57T0 hanno evidenziato valori differenti. Nuovamente per pp480-300 osserviamo una certa omogeneità fra i valori nelle varie specie e condizioni, anche se vi sono alcuni valori sporadici significativi e generalmente per *D.baccettii*. In fine per pp300-100 le grosse differenze da tutto il resto le troviamo negli F1 ed in *D.baccettii*

