

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

TESI DI DOTTORATO

Sede Amministrativa Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Psicologia Generale

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE PSICOLOGICHE
INDIRIZZO PSICOBIOLOGIA
CICLO XXII

IL SONNO UNIEMISFERICO NEL MODELLO ANIMALE DEL PULCINO DOMESTICO (*Gallus gallus*) COME ASPETTO DEL SONNO LOCALE

Direttore della Scuola : Ch.ma Prof.ssa Clara Casco
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Bisazza
Supervisore : Ch.mo Prof. Gian Gastone Mascetti

Dottorando: Cristian Nelini

RIASSUNTO DELLA TESI (Scuola di Dottorato in Scienze Psicologiche, Indirizzo Psicobiologia, XXII ciclo)

TITOLO: Il sonno uniemisferico nel modello animale del pulcino domestico (*Gallus gallus*) come aspetto del sonno locale.

Dottorando: Cristian Nelini

Una delle principali caratteristiche del pulcino domestico (*Gallus gallus*) è la presenza di una marcata lateralizzazione delle funzioni cerebrali. Sono stati condotti numerosi esperimenti volti ad indagare la specializzazione emisferica nel pulcino. Complessivamente si considera l'emisfero destro principalmente coinvolto in comportamenti di attacco, copulazione, risposta alle novità e abilità spaziali, mentre l'emisfero sinistro risulta essere principalmente dominante per quanto riguarda la categorizzazione degli stimoli, e l'apprendimento in compiti di discriminazione visiva (Vallortigara, 1994). A livello anatomico la lateralizzazione delle funzioni cerebrali è favorita in questo animale dalla quasi completa decussazione delle vie visive a livello del chiasma ottico, dalla posizione laterale degli occhi e dalla presenza di movimenti oculari indipendenti (Rogers e Andrew, 2002; Vallortigara, 1994). Un'altra peculiare caratteristica del pulcino è la presenza, oltre al normale sonno biemisferico, di un particolare stato comportamentale ed elettrofisiologico definito sonno uniemisferico. Durante il sonno uniemisferico un emisfero cerebrale mostra il tracciato elettroencefalografico (EEG) tipico del sonno a onde lente (*Slow Wave Sleep* - SWS) mentre l'altro emisfero presenta il quadro EEG della veglia (Ball e coll., 1985; Rattenborg e coll., 2000a; 2000b). A livello comportamentale la chiusura di un occhio durante gli episodi di sonno uniemisferico si associa all'asimmetria interemisferica del tracciato EEG, ciò significa che l'occhio controlaterale all'emisfero che sta dormendo resta chiuso, mentre l'occhio controlaterale all'emisfero sveglio è aperto (Ball e coll., 1985). Questo fenomeno è principalmente diffuso negli uccelli ed è stato osservato anche in diverse specie di mammiferi marini e in alcune specie di rettili (Rattenborg e coll., 2000a). Basandosi sulle considerazioni descritte precedentemente, la chiusura degli occhi viene utilizzata come misura indiretta dello stato di veglia o di sonno dei due emisferi (Rattenborg e coll., 2000). Una prima spiegazione del fenomeno del sonno monoculare/uniemisferico (Mo-Un) sembra associare quest'ultimo: nei mammiferi marini, alla respirazione volontaria; mentre negli uccelli a funzioni di vigilanza antipredatoria (Rattenborg e coll., 2000b).

Lesley Rogers nel 1995 ha descritto come durante la prima settimana di vita dei pulcini si osservi una chiara preferenza per il sonno Mo-Un destro (sonno nell'emisfero sinistro) mentre durante la seconda settimana una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro. Questo quadro di lateralizzazione del sonno sembra essere associato comportamentale e cognitivamente ad un maggior coinvolgimento dell'emisfero sinistro durante la prima settimana nell'esaminare le caratteristiche ambientali a livello generale e nel processo di consolidamento dell'oggetto d'*imprinting*; mentre ad un maggior coinvolgimento dell'emisfero destro nell'analisi dei dettagli dello stimolo e delle caratteristiche topografico/spaziali dell'ambiente durante la seconda settimana (Rogers, 1995; 2002). Inoltre, diversi studi condotti nei nostri laboratori, hanno descritto come il Mo-Un possa essere modulato dalla stimolazione luminosa *in ovo* (Bobbo e coll., 2002), dalle condizioni di allevamento (Mascetti e coll., 1999, Bobbo e coll., 2006a) e dalle attività svolte dall'animale durante la veglia: ricerca e apprendimento di discriminazione visiva (Mascetti e coll., 2007), consolidamento della traccia mestica relativa all'oggetto d'*imprinting* (Bobbo e

coll., 2006b), apprendimento di evitamento passivo (Bobbo e coll., 2007). I risultati ottenuti hanno permesso di descrivere una relazione diretta tra sonno uniemisferico e lateralizzazione delle funzioni cerebrali nel pulcino.

Recentemente, Tononi e Cirelli (2006) basandosi sull'ormai consolidata teoria proposta da Borbely nel 1982 relativamente ai due processi regolatori del sonno - il processo circadiano e il processo omeostatico - hanno avanzato un'ipotesi volta a delucidare i possibili meccanismi sinaptici alla base di tali processi. Secondo gli autori una delle principali funzioni del sonno sarebbe quella di operare un *downscaling* dei pesi sinaptici nella corteccia cerebrale. I numerosi risultati proposti da Tononi e Cirelli (2003; 2006) mostrano come i processi di apprendimento, di potenziamento a lungo termine (LTP) e di plasticità neuronale portino ad un aumento delle forze delle connessioni sinaptiche intracorticali in particolari *network* neuronali durante la veglia. Questo aumento delle forze di connessione sinaptica, raggiungerebbe un massimo verso sera e sarebbe alla base di una ri-organizzazione sinaptica durante il SWS. Tale riorganizzazione consisterebbe appunto in un attivo *downscaling* sinaptico volto ad ottimizzare nuovamente il funzionamento cerebrale per il successivo periodo di veglia. I meccanismi di *downscaling* quindi, sarebbero strettamente connessi al SWS e più precisamente a quella che viene definita *Slow Wave Activity* (SWA) nella banda di potenza tra 0.75 Hz e 4 Hz. Huber e collaboratori (2004) grazie a registrazioni EEG ad alta densità (hd-EEG) hanno potuto osservare come il SWS e la SWA non si distribuiscano uniformemente sullo scalpo durante il sonno, ma si rilevino in corrispondenza di quelle regioni che sono state maggiormente attivate durante la veglia. Queste nuove osservazioni e le successive evidenze scientifiche (Buchmann e coll., 2009; Ringli e coll., 2009) sulla distribuzione topografica cerebrale del SWS, hanno permesso di avanzare l'ipotesi che il SWS possa essere un fenomeno locale del funzionamento cerebrale, direttamente collegato al *downscaling* sinaptico a sua volta connesso alle attività svolte dal soggetto durante la veglia. Evidenze di sonno locale sono state anche riportate in studi condotti su bambini e adolescenti e sembrano essere legate a processi di maturazione cerebrale e cognitiva (Huber, 2008; Kurth e coll., 2009; Ringli e coll., 2008). Anche nei ratti è stato possibile osservare un aumento della SWA nelle regioni cerebrali principalmente stimolate durante la veglia sia quando la stimolazione consisteva in compiti di apprendimento che a seguito di stimolazione passiva prodotta dal taglio delle vibrisse (Vyazovskiy e coll., 2000; Vyazovskiy e Tobler, 2008).

Alla luce di quanto fin'ora illustrato l'ipotesi avanzata in questo lavoro è che il sonno Mo-Un (SWS) possa essere una forma di sonno locale presente in un organismo con un assetto cognitivo molto semplice e filogeneticamente lontano dall'uomo. Allo scopo di validare questa ipotesi, sono stati utilizzati alcuni dei più solidi paradigmi scientifici per lo studio del sonno e della lateralizzazione cerebrale.

Effetti della deprivazione di sonno sul quadro di sonno Mo-Un

I primi due esperimenti di seguito descritti, hanno utilizzato il paradigma sperimentale della deprivazione di sonno, che è una procedura ampiamente utilizzata per studiare le funzioni del sonno stesso. In un primo lavoro (Bobbo e coll., 2008) sono stati indagati gli effetti della deprivazione di sonno su pulcini di sesso femminile all'undicesimo giorno di vita. Durante la seconda settimana di vita è noto che i pulcini mostrano normalmente una netta preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (emisfero destro) (Bobbo e coll., 2002). La deprivazione di sonno aveva la durata di 8 ore e consisteva nel costringere gli animali a camminare su un

tapis roulant mosso da un motore elettrico ad una velocità di 0.06 m/s. Il disegno sperimentale prevedeva tre gruppi: un primo gruppo di controllo (N=8, N-DEP1) restava nelle gabbie di stabulazione/osservazione del sonno (dove gli animali venivano stabulati dopo la schiusa e che fungevano anche da gabbie di osservazione), un secondo gruppo di controllo (N=8, N-DEP2) veniva inserito per 8 ore nel *tapis roulant* spento e infine un terzo gruppo sperimentale (N=8, DEP-8H) veniva sottoposto a 8 ore di privazione di sonno all'interno del *tapis roulant* acceso. Subito dopo il periodo di privazione di sonno, veniva osservato per 6 ore consecutive il sonno a livello comportamentale, registrando il numero e la durata degli episodi di sonno binoculare/biemisferico e Mo-Un e distinguendo tra sonno Mo-Un destro (sonno emisfero sinistro) e sonno Mo-Un sinistro (sonno emisfero destro). Dall'analisi dei dati è emerso come i pulcini deprivati di sonno, durante la successiva fase di recupero, dormivano significativamente di più rispetto ai pulcini non deprivati (Fig. 1) e come gli episodi di sonno dei pulcini deprivati avessero una durata media significativamente più lunga rispetto ai controlli (Fig.2) (non sono stati inseriti nelle analisi i pulcini del gruppo N-DEP2 in quanto non mostravano differenze significative rispetto ai pulcini del gruppo N-DEP-1). I risultati sul sonno binoculare possono essere interpretati come un probabile effetto di *rebound* dovuto alla necessità di ottenere un miglior recupero di sonno dopo la privazione.

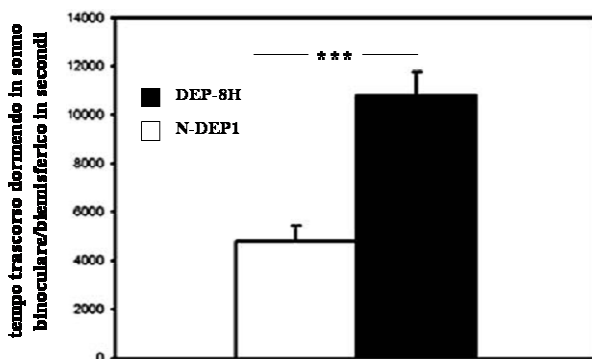


Fig. 1

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

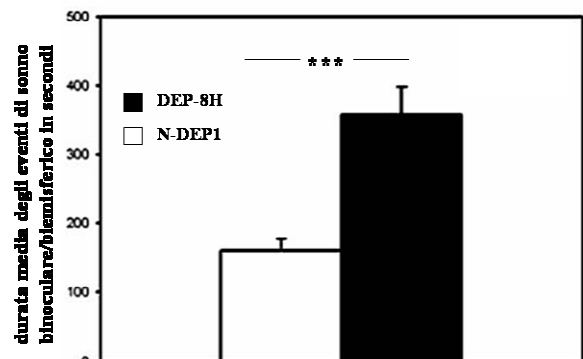


Fig. 2

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Per quanto riguarda il sonno monoculare (Fig.3) l'effetto principale osservato riguardava una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio-sinistro (sonno emisfero destro) durante gli episodi di sonno Mo-Un nei pulcini di controllo N-DEP1 (in linea con i dati in letteratura).

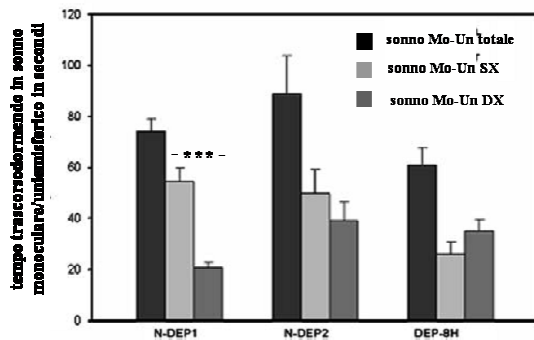


Fig. 3

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$

Come sottolineato precedentemente i pulcini all'undicesimo giorno di vita mostrano una preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro (Bobbo e coll., 2002), preferenza che è stata osservata anche nei controlli N-DEP1, ma che svaniva nei pulcini sottoposti a deprivazione. Non è stata osservata nel gruppo DEP-8H alcuna preferenza significativa per il sonno Mo-Un destro o sinistro. Questo risultato, assieme ai dati ottenuti sul sonno binoculare, potrebbe essere interpretato come una necessità da parte di entrambi gli emisferi di recuperare il sonno perso durante la deprivazione a prescindere dalla iniziale lateralizzazione del sonno osservata nei controlli, che è noto essere associata allo sviluppo cognitivo di questo animale.

In un secondo esperimento di deprivazione di sonno (Bobbo e coll., 2009) sono stati indagati gli effetti della deprivazione di sonno di diversa durata (4 e 8 ore), a differenti giorni di sviluppo dell'animale. Sono stati utilizzati 48 pulcini di sesso femminile al quinto (N=24) e all'ottavo (N=24) giorno di vita. Per ciascun giorno, sono stati costituiti tre gruppi: un gruppo di controllo che restava nelle gabbie di stabulazione/osservazione del sonno (N=8, N-SD), un altro gruppo che subiva 4 ore di deprivazione di sonno all'interno del *tapis roulant* (N=8, SD-4H) e un ultimo gruppo che subiva 8 ore di deprivazione (N=8, SD-8H). Anche in questo caso veniva registrato il sonno a livello comportamentale. Dall'analisi dei dati è emerso che anche i pulcini al quinto e all'ottavo giorno deprivati di sonno sia per 4 che per 8 ore, durante la successiva fase di recupero dormivano di più rispetto ai controlli e mostravano eventi di durata media superiore (Fig.4 e Fig.5).

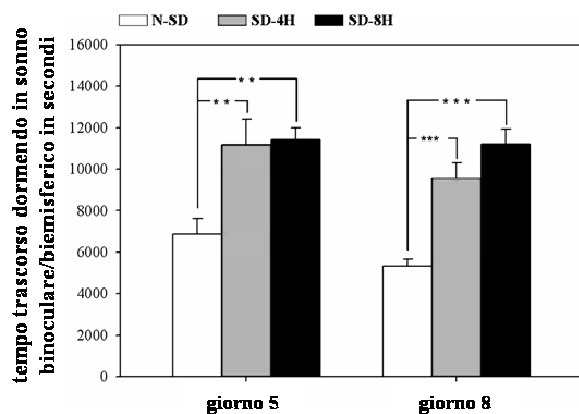


Fig. 4

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

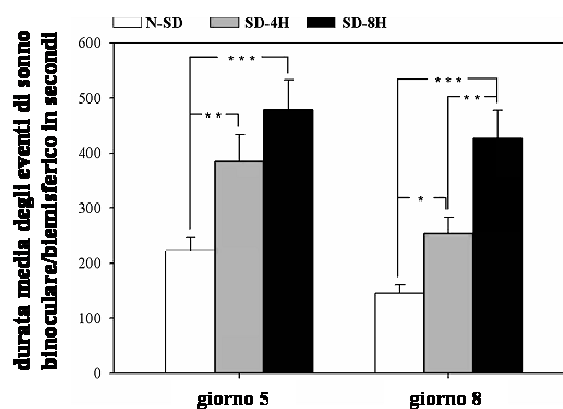


Fig. 5

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno monoculare sono state condotte analisi statistiche sui tempi in secondi (Mo-Un totale, Mo-Un sinistro e Mo-Un destro) e sui tempi monoculari in percentuale trasformati utilizzando un indice di lateralità $\{[(\text{Mo-Un sinistro} - \text{Mo-Un destro}) / (\text{Mo-Un sinistro} + \text{Mo-Un destro})] * 100\}$. Relativamente al tempo trascorso in sonno Mo-Un in secondi non state osservate modificazioni della quantità di sonno Mo-Un totale (Mo-Un sinistro e Mo-Un destro) dopo 4 ore di deprivazione al quinto giorno, mentre, sempre al quinto giorno, è stata osservata una diminuzione di sonno Mo-Un totale dopo 8 ore di deprivazione. I pulcini all'ottavo giorno mostravano invece un effetto inverso; è stata infatti osservata una maggior quantità di sonno Mo-Un nei pulcini sottoposti a 4 ore di deprivazione rispetto ai pulcini sottoposti a 8 ore di deprivazione. Questo risultato potrebbe essere dovuto ad un effetto del nuovo ambiente nel quale il pulcino è stato inserito (*tapis roulant*); è noto infatti che a partire dall'inizio della seconda settimana di vita il pulcino si dedica all'osservazione e categorizzazione degli stimoli ambientali ed è più reattivo alle nuove stimolazioni che gli vengono presentate (Vallortigara, 1992; Freire e Rogers, 2007). L'analisi effettuata sul tempo trascorso dormendo calcolato in indice di lateralità ha fornito un chiaro quadro della lateralizzazione del sonno dopo la deprivazione (Fig. 6). I pulcini di controllo al quinto giorno N-SD mostravano una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio destro (sonno emisfero sinistro) mentre i pulcini N-SD all'ottavo giorno mostravano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro. Questi risultati sono concordi con la letteratura di riferimento. Per quanto riguarda gli animali dei gruppi sottoposti a deprivazione di sonno, né al quinto né all'ottavo giorno per i pulcini dei gruppi SD-4H e SD-8H è stata osservata una preferenza significativa per il sonno Mo-Un destro o sinistro.

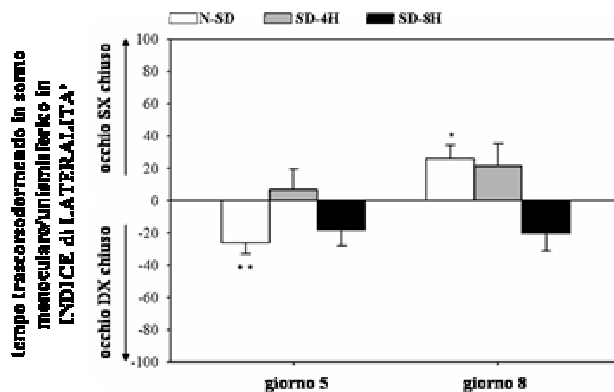


Fig. 6

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In conclusione, i risultati ottenuti in questo esperimento hanno mostrato lo stesso quadro di lateralizzazione del sonno osservato nel precedente esperimento di deprivazione: una maggior quantità di sonno binoculare e nessuna preferenza per il SWS in un emisfero piuttosto che nell'altro a seguito di deprivazione. Questi risultati potrebbero indicare, anche in questo caso la necessità di un recupero del sonno perso per entrambi gli emisferi a prescindere dalle tappe di sviluppo cognitivo (associate ad un preciso quadro di lateralizzazione del sonno).

Effetti della deprivazione monoculare sul quadro di sonno Mo-Un

In un successivo esperimento sono stati indagati gli effetti della deprivazione monoculare sul quadro di sonno del pulcino (Bobbo e coll., In preparazione). La procedura sperimentale della deprivazione monoculare (DM) è solitamente utilizzata per indagare la plasticità del sistema visivo durante il periodo critico dello sviluppo delle vie visive e consiste nella chiusura selettiva di un occhio. Dalla letteratura è noto come il periodo critico per quanto riguarda le vie visive del pulcino, dura fino al terzo giorno dopo la schiusa (Deng e Rogers, 1998). Nel pulcino, a seguito di DM condotta durante il periodo critico, si rovescia la lateralizzazione della risposta in compiti di attacco e copulazione (Rogers, 1990). Gli effetti della DM sul sonno sono stati indagati in pulcini di sesso femminile. Lo studio è stato condotto su 72 pulcini di sesso femminile testati al secondo giorno di vita le cui uova erano state incubate al buio ($n=48$) o alla luce ($n=24$) nei nostri laboratori, al fine di controllare le condizioni di incubazione. È stato osservato infatti che la stimolazione luminosa *in ovo* durante gli ultimi giorni di incubazione influenza la lateralizzazione delle vie visive e modula la direzione del sonno Mo-Un (Bobbo e coll., 2002). Sulla base della considerazione che, anche durante il primo giorno di vita, la stimolazione luminosa può influenzare la lateralizzazione delle vie visive, un gruppo di pulcini è stato allevato alla luce, mentre un altro gruppo è stato allevato al buio. Subito dopo la schiusa, sono stati allevati alla luce i pulcini provenienti da uova incubate alla luce (luce-luce) e metà dei pulcini provenienti da uova incubate al buio (buio-luce), mentre i restanti pulcini le cui uova erano state incubate al buio, sono stati allevati al buio (buio-buio). La procedura di DM aveva una durata di 12 ore, dalla mezzanotte del primo giorno di vita fino a mezzogiorno del secondo giorno di vita, e consisteva nell'occlusione selettiva di un occhio mediante un cappuccio di stoffa nera fissato con una pellicola adesiva. Per ognuna delle condizioni di incubazione e di allevamento

descritte, ad un gruppo di pulcini è stato privato l'occhio destro (DX), ad un altro gruppo l'occhio sinistro (SX) e un terzo gruppo non veniva sottoposto ad alcuna procedura di DM (CONTROLLI). Successivamente alla DM è stato osservato il sonno a livello comportamentale per 6 ore consecutive. Inoltre, durante la DM e nelle successive sei ore di osservazione del sonno, abbiamo deciso di indagare l'attività motoria dell'animale, utilizzando una apposita apparecchiatura, la *activity cage*. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la DM non ha avuto alcun effetto sul tempo trascorso in sonno binoculare, mentre il sonno Mo-Un è stato profondamente influenzato (Fig.7). Come dimostrato da studi condotti precedentemente (Bobbo e coll. 2002), la stimolazione asimmetrica *in ovo* influenza il quadro di lateralizzazione del sonno. I pulcini del gruppo di controllo, le cui uova erano state incubate al buio, mostrano una chiara preferenza per la chiusura dell'occhio destro (sonno emisfero sinistro), mentre i pulcini le cui uova erano state incubate alla luce mostrano una preferenza per la chiusura dell'occhio sinistro (sonno emisfero destro)(Fig.8).

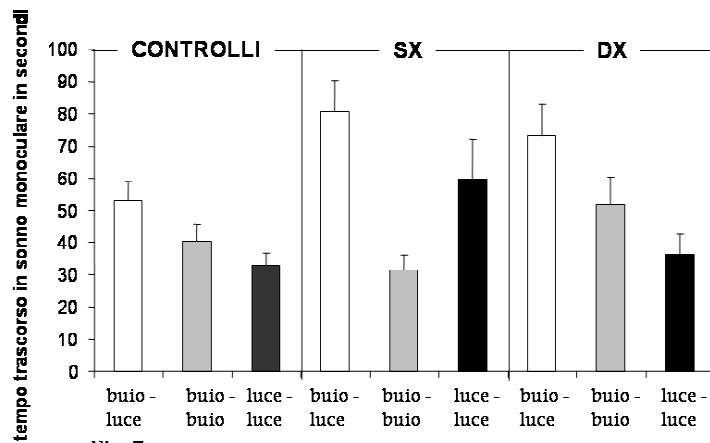


Fig. 7

* = p

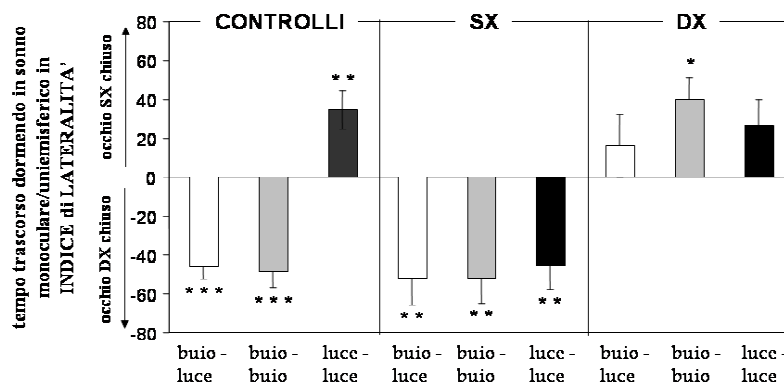


Fig. 8

* = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

I pulcini SX, a cui è stato privato l'occhio sinistro, mostrano, a prescindere dalle condizioni di incubazione e di allevamento, una marcata preferenza per la chiusura dell'occhio destro (sonno emisfero sinistro) durante gli episodi di sonno Mo-Un. I pulcini DX, a cui è stato privato l'occhio destro, sembrano essere influenzati in modo differente dalla DM in base alle diverse condizioni di incubazione e allevamento: solo i pulcini buio-buio (cioè pulcini le cui uova sono state incubate al buio e che anche al primo giorno di vita sono stati allevati al buio) mostrano una chiara preferenza per la chiusura dell'occhio sinistro durante il sonno monoculare, mentre gli altri due gruppi non mostrano alcuna preferenza. E' plausibile supporre che l'emisfero controlaterale all'occhio privato dorma durante la DM e, quindi, al termine della DM l'altro emisfero (quello ipsilaterale all'occhio privato) necessiti di un maggior recupero di sonno a causa di un aumento dell'attività compiuta da tale emisfero durante la veglia. Ulteriori studi che stiamo pianificando e che prevedono la registrazione del tracciato EEG, potranno aiutarci a capire cosa accade all'emisfero "deprivato". Un'altra ipotesi che può essere avanzata è che, malgrado la stimolazione luminosa *in ovo* moduli la direzione della lateralizzazione del sonno, così come abbiamo dimostrato nei pulcini del gruppo di controllo, la DM possa avere un effetto più forte rispetto a ciò che accade durante l'incubazione. Un ulteriore aspetto emerso è che l'emisfero sinistro dei pulcini che hanno ricevuto luce o durante l'incubazione o durante il primo giorno di vita, possa essere meno sensibile alla DM in quanto le vie e le aree visive sono già state maggiormente "lateralizzate" verso sinistra. Nell'interpretare i dati deve essere tenuto in considerazione il ruolo che l'occhio destro riveste nell'analisi e nel processo d'*imprinting* che è considerato una forma di memoria di riconoscimento precoce che si sviluppa nelle specie nidifughe in seguito all'esposizione ad uno stimolo saliente in assenza di rinforzo. Il periodo critico per il processo d'*imprinting* si chiude nei primi giorni di vita, è quindi plausibile ritenere che la DM possa aver interferito con il processo d'*imprinting* stesso. Sappiamo che pulcini allevati in isolamento sociale e quindi non imprantati mostrano comportamenti solitamente indotti da situazioni stressanti (frequenti *distress call* e movimenti non finalizzati). A questo proposito l'attività motoria del pulcino rappresenta un indice indiretto del possibile effetto della DM sul consolidamento dell'oggetto d'*imprinting*. Le analisi condotte hanno mostrato come i pulcini a cui è stato privato l'occhio destro mostrino un generale significativo incremento dell'attività motoria rispetto ai pulcini del gruppo di controllo, e i pulcini buio-buio presentino un'attività motoria significativamente più alta rispetto agli altri due gruppi (Fig.9). Questo effetto potrebbe essere interpretato alla luce del fatto che la condizione buio-buio estende il periodo critico per il processo d'*imprinting* al secondo giorno di vita e di conseguenza i pulcini di questo gruppo, non avendo ancora elaborato il processo d'*imprinting*, mostrerebbero più attività motoria associata ad una situazione di *distress*.

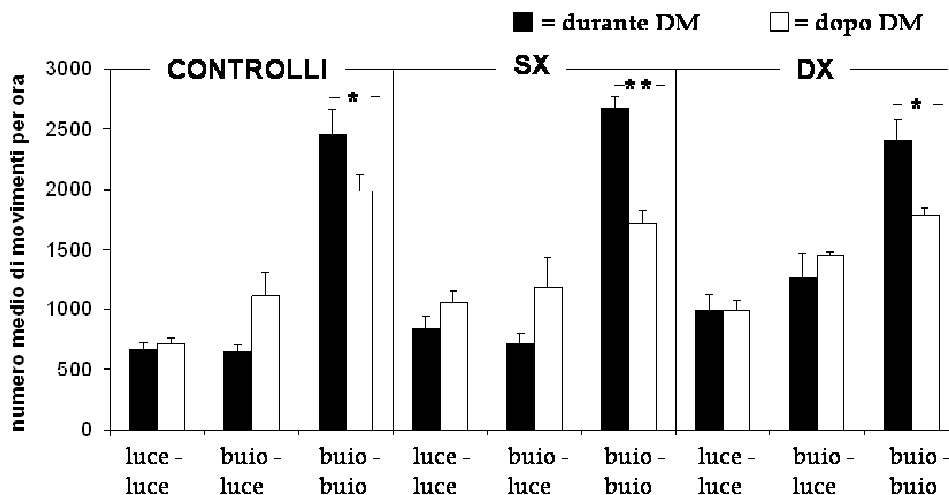


Fig. 9

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Anche i risultati di questo esperimento sembrano a favore dell'ipotesi che vede il sonno Mo-Un come un aspetto dinamico del sonno, che può essere modulato dalla stimolazione *in ovo*, dalla modificazione delle condizioni ambientali di allevamento e a seguito della DM alla quale l'animale è stato sottoposto.

Apprendimento spaziale e sonno Mo-Un

Numerose evidenze scientifiche, sia sull'uomo che sull'animale, sottolineano il possibile ruolo del sonno nei processi di consolidamento della traccia mestica, nello specifico il ruolo del sonno ad onde lente (SWS) nella banda di potenza tra 0,75 – 4,5 Hz (SWA) (Stickgold, 2005). E' noto da diversi studi che, nel pulcini, l'emisfero destro è principalmente dominante nel controllo del comportamento e dell'apprendimento spaziale. Di conseguenza l'obbiettivo di questo esperimento è stato quello di indagare il quadro di sonno Mo-Un a seguito dell'apprendimento di un compito di tipo spaziale durante il quale gli animali potevano affidarsi solamente ad indizi di tipo geometrico/topografico (Nelini e coll., In preparazione). Il paradigma sperimentale utilizzato per la fase d'apprendimento è stato il paradigma dei moduli geometrici e nello specifico il paradigma dell'arena rettangolare, che permette di valutare le abilità di ri-orientamento di un animale basate esclusivamente su indizi geometrico/topografici (Vallortigara e coll., 1990; 2004). In un primo esperimento sono stati utilizzati 12 pulcini di sesso femminile all'ottavo giorno di vita incubati al buio ed allevati con oggetto d'*imprinting*. Gli animali dopo la schiusa, sono stati divisi in due gruppi, un gruppo sperimentale (N=6, Gruppo Sperimentale) è stato sottoposto ad un addestramento all'interno dell'arena durante il quale, basandosi solamente su indizi spaziali, gli animali dovevano imparare a discriminare l'angolo corretto nel quale si trovava il cibo (addestramento con apprendimento spaziale). All'undicesimo giorno, gli animali sono stati sottoposti al *test* per verificarne l'apprendimento (criterio di apprendimento fissato all'80%

di scelte corrette). Un gruppo di pulcini di controllo (N=6, Gruppo Controllo) è stato invece sottoposto alla medesima procedura sperimentale, ma all'interno dell'arena poteva trovare il cibo in qualsiasi dei quattro angoli e quindi non era sottoposto ad un processo di apprendimento (addestramento senza apprendimento spaziale). Subito dopo l'addestramento e il test è stato osservato a livello comportamentale il sonno per 3 ore consecutive. Per quanto riguarda l'apprendimento, i risultati ottenuti, mostrano come solo i pulcini del Gruppo Sperimentale avevano appreso il compito (Fig. 10) mentre i pulcini del Gruppo di Controllo sceglievano l'angolo dove cercare il cibo in modo casuale.

Curva d'Apprendimento

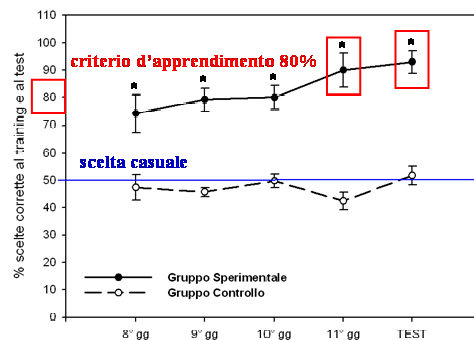


Fig. 10

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Per quanto riguarda i dati relativi al sonno, si osserva come il Gruppo Sperimentale mostrava un aumento significativo di sonno binoculare complessivo rispetto al Gruppo Controllo e anche un aumento complessivo significativo di sonno Mo-Un sinistro (chiusura dell'occhio sinistro – sonno nell'emisfero destro) (Fig.11 e Fig. 12).

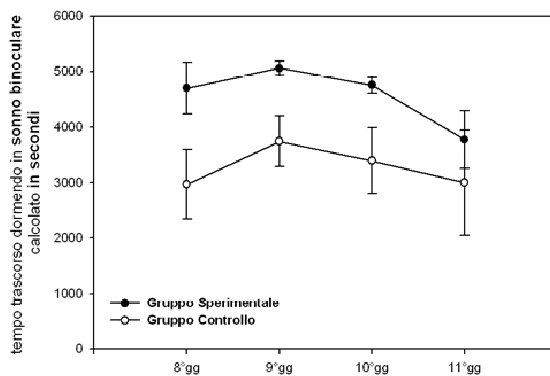


Fig. 11

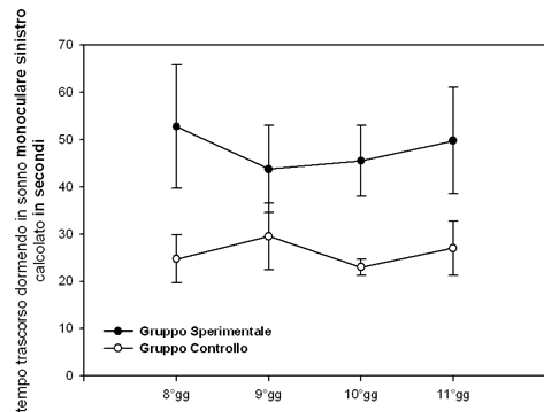


Fig. 12

I risultati relativi all'indice di lateralità hanno permesso di osservare come i pulcini del Gruppo Sperimentale mostravano una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio sinistro e quindi una preferenza per il sonno uniemisferico destro già a partire dal primo

giorno di addestramento, mentre non è stato osservato un chiaro quadro di lateralizzazione del sonno nei pulcini del Gruppo Controllo (Fig. 13).

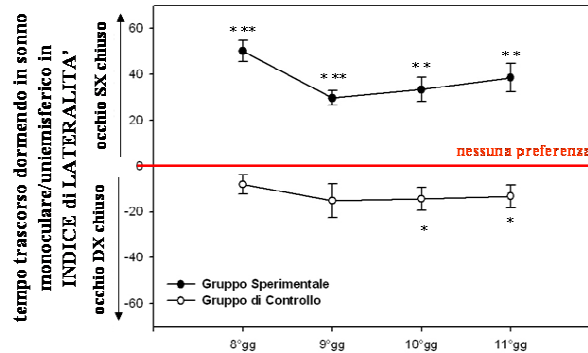


Fig. 13

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Occlusione monoculare, apprendimento spaziale e sonno Mo-Un

Alla luce dei risultati ottenuti nel precedente studio, è stato condotto un ulteriore esperimento per osservare la relazione tra sonno uniemisferico e apprendimento spaziale. Anche in questo esperimento è stato utilizzato il medesimo paradigma sperimentale di apprendimento. Sono stati impiegati 12 pulcini di sesso femminile all'ottavo giorno di vita incubati al buio e allevati con oggetto d'*imprinting*. La procedura sperimentale adottata era la stessa dell'esperimento prima descritto ma veniva utilizzata sola la procedura relativa all'addestramento con apprendimento spaziale in condizioni di visione monoculare. Sono stati formati due gruppi di animali: il gruppo Dep-Dx (N=6) subiva l'occlusione selettiva dell'occhio destro (cfr. esperimento DM) durante il compito di apprendimento spaziale, il gruppo Dep-Sx (N=6) subiva l'occlusione selettiva dell'occhio sinistro durante l'apprendimento. L'ipotesi sperimentale considerava la possibilità che a seguito dell'occlusione selettiva di un occhio il solo emisfero controlaterale all'occhio aperto avrebbe svolto il compito di apprendimento e quindi si sarebbe potuto osservare un diverso quadro di sonno Mo-Un nei due gruppi. I risultati relativi all'apprendimento (Fig.14) mostrano come solo i pulcini del gruppo Dep-Dx, che utilizzano l'emisfero destro durante l'addestramento, avevano appreso il compito. I risultati hanno confermato le evidenze presenti in letteratura che vogliono l'emisfero destro principalmente coinvolto in compiti di apprendimento spaziale.

I risultati relativi al sonno in indice di lateralità hanno evidenziato una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio sinistro (sonno emisfero destro) nel gruppo Dep-Dx e una preferenza per la chiusura dell'occhio destro (sonno emisfero sinistro) nel gruppo Dep-Sx (Fig. 15). Questi dati sembrano associare il lavoro compiuto dai due emisferi al sonno nell'emisfero corrispondente anche in assenza di apprendimento. Dalle analisi condotte sul tempo trascorso in sonno Mo-Un calcolato in secondi è emerso però che i pulcini del gruppo Dep-Dx mostravano una quantità significativamente maggiore di sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) rispetto ai pulcini del gruppo Dep-Sx (Fig 16).

Curva d'apprendimento

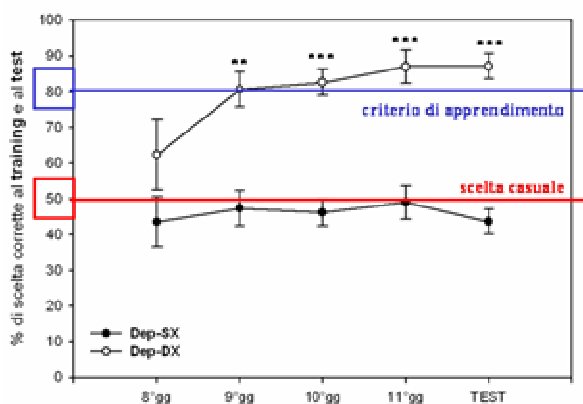


Fig. 14

• - $p < 0,05$; •• - $p < 0,01$; ••• - $p < 0,001$

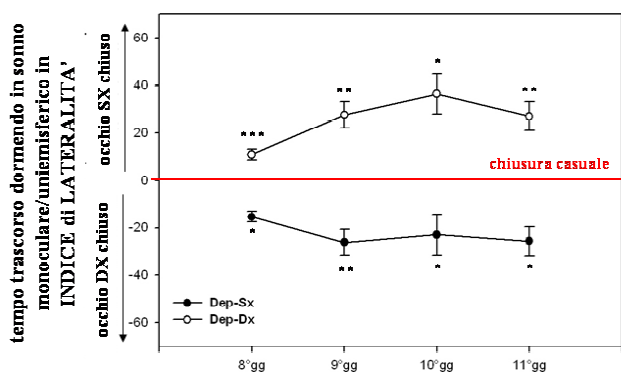


Fig. 15

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

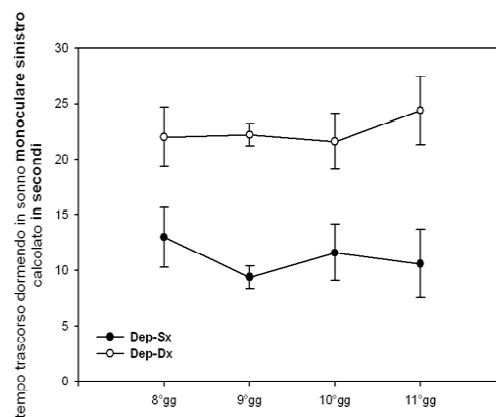


Fig. 16

I risultati di questo esperimento hanno quindi evidenziato in prima istanza come la preferenza per il sonno Mo-Un destro o sinistro si associ ad un processo uso/dipendente dei due emisferi a prescindere dal compito di apprendimento. Dalle analisi dei risultati sul sonno Mo-Un sinistro è stato possibile inoltre osservare un aumento significativo di sonno Mo-Un sinistro (emisfero destro) nei pulcini del gruppo Dep-Dx, che avevano utilizzato l'emisfero dominante per i compiti di apprendimento spaziale (emisfero destro), rispetto ai pulcini del gruppo Dep-Sx. Nel complesso i risultati sembrano nuovamente dare credito all'ipotesi di un coinvolgimento del sonno nei processi di apprendimento e nello specifico dei processi di apprendimento spaziale. Il sonno sembra poter essere modulato sia dal semplice coinvolgimento emisferico in assenza di processi di apprendimento, ma anche dai processi di apprendimento stesso che aumentano la quantità relativa di sonno Mo-Un nell'emisfero che è dominante per il compito. E' stato pianificato e iniziato un ulteriore esperimento con la stessa metodologia e lo stesso disegno sperimentale del lavoro appena descritto, ma durante

il quale gli animale venivano sottoposti al paradigma sperimentale senza apprendimento, allo scopo di osservare la sola influenza dell'ambiente e del compito in assenza di apprendimento sul sonno Mo-Un associato ai due emisferi cerebrali. I risultati di questo nuovo lavoro permetteranno di chiarire ancora meglio come si strutturi il quadro del sonno Mo-Un a seguito del compito di apprendimento spaziale svolto dagli animali con l'occlusione selettiva di un occhio.

Conclusioni

In conclusione gli esperimenti sopra descritti, portano ulteriori evidenze relative ad una stretta connessione tra il sonno uniemisferico e la lateralizzazione delle funzioni cerebrali nel pulcino, e permettono inoltre di sostenere l'ipotesi che il sonno uniemisferico sia un aspetto del sonno locale. I risultati riportati evidenziano come nel pulcino sia presente un quadro di sonno uniemisferico predeterminato e parallelo allo sviluppo delle funzioni cognitive in questa specie, ma anche, come lo stesso sonno uniemisferico possa essere modulato dalla stimolazione luminosa *in ovo*, dalla deprivazione monoculare e da compiti di apprendimento ai quali l'animale è sottoposto. E' possibile inoltre avanzare l'ipotesi che il sonno uniemisferico come aspetto del sonno locale segua un andamento gerarchico dettato dalle priorità alle quali l'animale è sottoposto. Nell'esperimento in cui è stata utilizzata la DM emerge infatti chiaramente come il quadro di sonno uniemisferico sia influenzato in modo differente nei vari gruppi a seconda delle stimolazioni ambientali (incubazione luce o buio e allevamento luce o buio) ma anche dipendentemente dalla stato di sviluppo cognitivo al quale gli animali si trovano (avvenuto consolidamento o non consolidamento dell'oggetto d'*imprinting*). Allo stesso modo si può osservare un effetto simile della deprivazione di sonno sul quadro di sonno uniemisferico nei diversi giorni di sviluppo dell'animale. Questo effetto sembra indicare una preferenza per il recupero di sonno nei due emisferi che si sostituisce alla necessità di SWS in uno o nell'altro emisfero osservata normalmente durante le tappe di sviluppo cognitivo del pulcino (sonno monoculare sinistro al quinto giorno e sonno monoculare destro all'ottavo e all'undicesimo giorno di vita). Anche gli esperimenti relativi all'apprendimento spaziale sembrano sottolineare le caratteristiche locali del sonno uniemisferico e sembrano inoltre confermare l'ipotesi di un'organizzazione gerarchica associata ad un ruolo uso/dipendente del sonno uniemisferico che contemporaneamente viene però chiaramente modulata dal compito di apprendimento spaziale al quale gli animali sono stati sottoposti.

SUMMARY OF THE THESIS (PhD School in Psychological Sciences, Psychobiology, XXII Cycle)

TITLE: The unihemispheric sleep in the chick (*Gallus gallus*) animal model as an aspect of local sleep

PhD student: Cristian Nelini

One of the most evident features of the common chicken (*Gallus gallus*) is the strong lateralization of cerebral functions. Many experiments have been conducted attempting to investigate the hemispheric specialization in the chick. It is generally considered that the right hemisphere is implicated in behaviors such as attack, copulation, novelty stimulus answers and spatial abilities; whilst the left hemisphere is dominant in stimuli categorization and learning in visual discrimination tasks. At the anatomical level the lateralization of the cerebral functions in chicken is favored by the almost complete visual pathways decussating at the optic chiasm as well as the lateral position of the eyes and the presence of independent ocular movements. Another peculiar feature in chicken is the presence, beside the normal bihemispheric sleep, of a particular (behaviorally and electrophysiologically) state defined as unihemispheric sleep. During unihemispheric sleep a cerebral hemisphere shows a typical EEG of slow wave sleep (SWS), whilst the other hemisphere shows a wake EEG. At a behavioral level the closure of one eye during episodes of unihemispheric sleep is associated with an intrahemispherical EEG asymmetry. This means that the contralateral eye to the sleeping hemisphere eye stays closed, whilst the contralateral eye to awake hemisphere is open (Ball et al., 1985). This phenomenon is diffused in birds but has also been observed in several species of marine mammals and in some reptiles (Rattenborg et al., 2000a). On the basis of the previously described conditions, the closure of the eye is used as indirect measure of wake/sleep state of the two hemispheres (Rattenborg et al., 2000). A first explanation of the monocular unihemispheric (Mo-Un) sleep phenomena seems to associate it to voluntary respiration in marine mammals, whilst in birds the phenomenon is associated to anti predatory vigilance (Rattenborg et al., 2000b).

In 1995 Lesley Rogers has described how during the first week of life the chick shows a clear preference for right Mo-Un sleep (sleep in the left hemisphere); the preference shifts to left Mo-Un sleep in the second week. This lateralization pattern seems to be, behaviorally and cognitively, associated to a major involvement of the left hemisphere during the first week of environmental investigations at a general level and the consolidation of the imprinting object; whilst a major involvement of the right hemisphere in the analysis of the stimulus details and the topographical/spatial features of the environment in the second week (Rogers, 1995; 2002). Moreover, many studies completed in our laboratories have described how the Mo-Un could be modulated by light stimulation *in ovo* (Bobbo et al., 2002), by breeding conditions (Mascetti et al., 1999, Bobbo et al., 2006a) and by activities taken on by the chicks during wake state: research and learning of a visual discrimination task (Mascetti et al., 2007), consolidation of the memory trace relative to the imprinting object (Bobbo et al., 2006b), passive avoid learning (Bobbo et al., 2007). The obtained results have allowed describing a direct relationship between unihemispheric sleep and lateralization of cerebral functions in the chick.

Recently Tononi and Cirelli (2006), basing themselves on the consolidated theory proposed by Borbely in 1982 on the two regulatory sleep processes - circadian and homeostatic processes - have advanced an hypothesis dedicated to clarify the possible synaptic

mechanisms at the basis of such processes. According to the authors, one of the principal sleep functions is the downscaling of the synapses in the cerebral cortex. The several results presented by Tononi and Cirelli (2003; 2006) show how the learning processes, the long term potentiation (LTP) and neuronal plasticity tend to increase the strength of the synaptic intracortical connections, particularly the neural network of the wake-state. The increase of the strength of synaptic connection seems to reach its maximum in the evening, and also seems to be at the basis of a synaptic re-organization during SWS. This re-organization could consist in an active synaptic downscaling in order to re-optimize the cerebral functioning for the next wake state. Therefore the mechanisms of downscaling are strictly connected to SWS and more precisely to what is defined as Slow Wave Activity (SWA) in the 0.75 – 4 Hz band. Using high density EEG Huber et al. (2004) have observed how SWS and SWA do not distribute uniformly on the scalp during sleep, but are revealed in correspondence of those regions that are mostly activated during wake. Those recent observations and the following scientific evidences (Buchmann et al., 2009; Ringli et al., 2009) on topographical distribution of SWS have permitted to advance the hypothesis that SWS could be a local phenomena in the cerebral functioning, directly connected to synaptic downscaling as well as connected to the activities that the subject carried out during wake. Evidences of local sleep have also been reported in studies conducted on children and teenagers and seem to be tied to processes of cerebral and cognitive development. Also in rats it was possible to observe an increase in SWA. This is seen in the cerebral region mainly stimulated during wake and also when the stimulation consisted in learning tasks and passive stimulation caused by the vibrissae cutting.

Considering all those facts, the hypothesis advanced in this project is that Mo-Un Sleep (SWS) could be a form of local sleep present in organisms with simplified cognitive pattern and phylogenetically far from human beings. To the purpose of validating this hypothesis, some of the most solid scientific paradigms for the study of sleep and for the cerebral lateralization have been used.

Effects of sleep deprivation on the Mo-Un sleep pattern

The first two experiments have applied the experimental paradigm of sleep deprivation, which is a widely used procedure to study the sleep functions. In a first study (Bobbo et al., 2008) the effects of sleep deprivation have been investigated on female chicks 11 day after hatching. During the second week of sleep it is known that chicks show normally a preference for left Mo-Un sleep (right hemisphere) (Bobbo et al., 2002). The sleep deprivation lasted 8 hours and consisted in forcing the animals to walk on a *tapis roulant* moved by an electrical engine at a velocity of 0.06 m/s. The experimental design consisted of three groups: the first control group (N=8, N-DEP1) stayed in the sleep observation cages (where the animals were kept after hatching and were also used as observation cages), the second control group chicks (N=8, N-DEP2) were put on the turned off *tapis roulant*, and the chicks of third group (N=8, DEP-8H) were subjected to 8 hours of sleep deprivation on a running *tapis roulant*. Right after the sleep deprivation period, sleep was observed for behavior 6 hours long. The number and the length of binocular/bihemispheric and Mo-Un sleep episodes was registered and separately counted for right and left Mo-Un. From the data analysis it came out that sleep deprived chicks, during the following recovery phase, were sleeping significantly more than the non-deprived chicks (Fig.1) and that the sleep episodes of deprived chick had a significantly longer mean length compared with the controls (Fig.2).

The group N-DEP2 was not inserted in the analysis because it was not showing any significant difference to the N-DEP1 group. The results on binocular sleep could be interpreted as a probable rebound effect due to the need of obtaining a better recovery of sleep after deprivation.

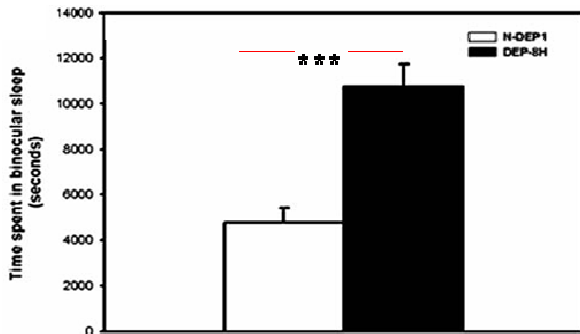


Fig. 1 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

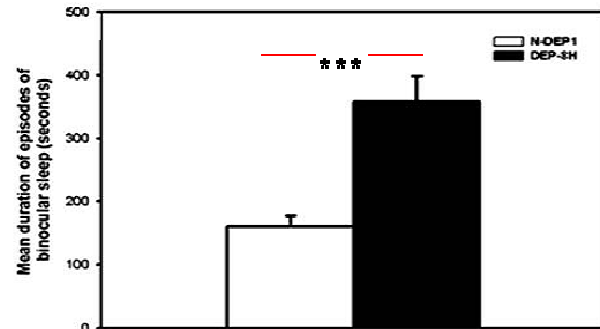


Fig. 2 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Regarding monocular sleep (Fig.3) the major effect observed consisted in significant preference for the closure of the left eye (right hemisphere sleep) during the episodes of Mo-Un sleep in the control N-DEP1 chicks. Those results correspond to the literature data.

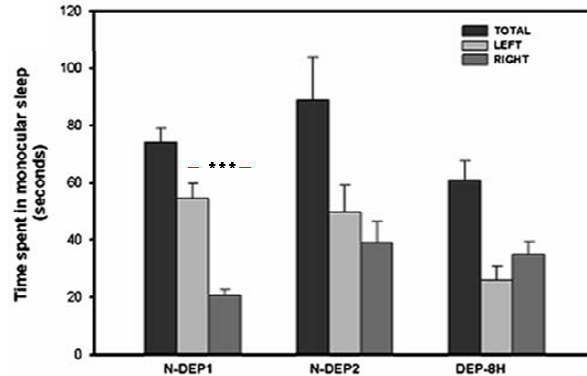


Fig. 3 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

As previously underlined the chicks at the 11th day of life show a significant preference for Mo-Un left sleep (Bobbo et al., 2002). This preference has also been observed in the N-DEP1 control chicks, but it disappeared in the deprived chicks. In the group DEP-8H no significant preference has been observed for the right or left Mo-Un sleep. This result, together with the data obtained from binocular sleep, could be interpreted as a need from both hemispheres to catch up the lost sleep of deprivation irrespective of initial sleep lateralization observed in the controls, which is known being associated to the cognitive development of the animal.

In a second experiment of sleep deprivation (Bobbo et al., 2009) the effects of sleep deprivation of different length have been investigated (4 and 8 hours) at different days of

development. 48 female chicks have been used at the fifth (N=24) and at the eighth (N=24) day of life.

Three under-groups were created for each day: a first control group stayed in the sleep observation cages (N=8, N-SD), a second group was submitted to 4 hours of sleep deprivation inside the *tapis roulant* (N=8, SD-4H), and the last group had 8 hours of sleep deprivation (N=8, SD-8H). Also in this case sleep was recorded at the behavioral level. From the data analysis it resulted that the chicks at the fifth and the eighth day, deprived for either 4 or 8 hours, slept more than the controls in the following recovery phase and showed events of longer mean length (Fig.4 and Fig.5).

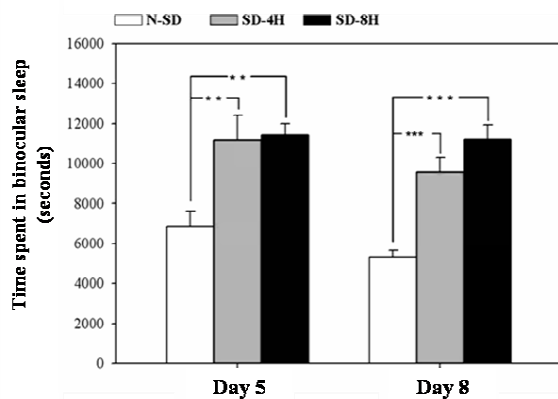


Fig. 4

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

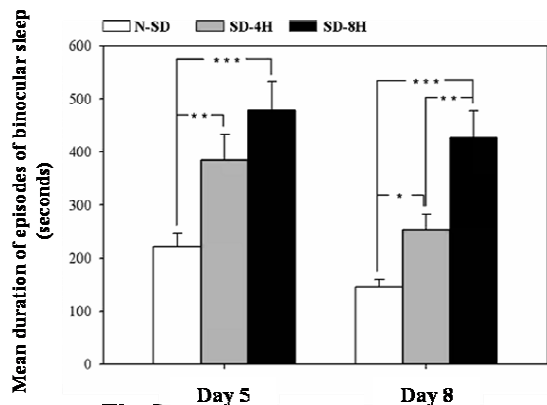
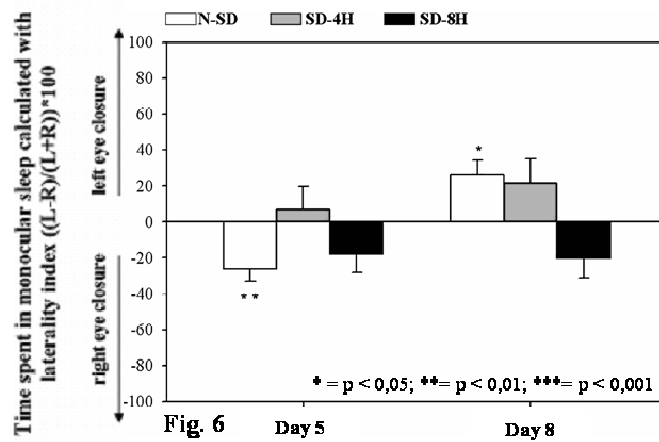


Fig. 5

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Statistical analysis were carried out on time spent in monocular sleep in seconds (total Mo-Un, left Mo-Un and right Mo-Un), and on the percentage of Mo-Un sleep calculated using a laterality index $\{[(\text{Mo-Un left} - \text{Mo-Un right}) / (\text{Mo-Un left} + \text{Mo-Un right})] * 100\}$. Relative to the time spent in Mo-Un sleep (in seconds), no differences have been found on the quantity of total Mo-Un sleep (Mo-Un left and Mo-Un right) after 4 hours of sleep deprivation at the fifth day, whilst, again at the fifth day, a decreasing amount of total Mo-Un sleep after 8 hours of deprivation was observed. At the eighth day the chicks showed a reversed effect: an increased quantity of Mo-Un sleep was observed in the 4 hours deprived chicks compared to the 8 hours deprived chicks. This result could be caused by the novel environment to which the chick was exposed (*tapis roulant*). In fact it is known that from the second week of life the chick is dedicated to the observation and categorization of environmental stimuli and is more reactive to the novel stimuli (Vallortigara, 1992; Freire and Rogers, 2007). The analysis executed on the time spent sleeping with the lateralization index gave a clear idea of lateralization of sleep after deprivation (Fig.6). At the fifth day the N-SD control chicks showed a significant preference for the right eye closure (left hemisphere sleep) whilst the N-SD chicks at the eighth day showed a preference for left Mo-Un sleep. These results are in concordance with the reference literature. Regarding the sleep deprived animals, neither at the fifth nor at the eighth day, both for the SD-4H and SD-8H, a significant preference has been observed for the right or left Mo-Un sleep.



As a conclusion, the results obtained in this experiment have shown the same lateralization pattern of sleep observed in the previous sleep deprivation experiment: a higher amount of binocular sleep and no preference for lateralized SWS after deprivation. Those results could point out that also in this case the need for recovery of lost sleep for both hemispheres is irrespective of the stage of cognitive development (associated to a determinate pattern of sleep lateralization).

Effects of monocular deprivation on the Mo-Un sleep pattern

A subsequent experiment has investigated the effects of monocular deprivation on the sleep pattern of chick (Bobbo et al., In preparation). The experimental procedure of monocular deprivation (MD) is usually used to investigate the plasticity of visual system during the critical period of visual ways and consist in the closure of one eye. It is known from literature that the critical period in the visual pathways of chick lasts up to the third day after hatching (Deng and Rogers, 1998). After a MD is run during the critical period of the chick, the lateralization of attack and copulation (Rogers, 1990) is reversed. The MD effects have been investigated in female chick. The study has been conducted on 72 female chicks tested at the second day of life. To test for incubation conditions, 48 eggs were dark incubated and 24 eggs were light incubated. It has been observed that light stimulation *in ovo* during the last days of incubation influences the lateralization of the visual ways and modulates the direction of Mo-Un sleep (Bobbo et al., 2002). On the basis of the consideration that also the first day of life the light stimulation can influence the visual pathway lateralization, a group of chick has been bred in light, whilst the other was bred in total darkness. Right after hatching, the light-incubated chick (light-light) and half of the dark incubated chicks (dark-light) were bred in the light. The other chicks were bred in the darkness (dark-dark). The MD procedure lasted 12 hours, from midnight of the first day of life to the midday of the second day of life, and consisted in selective occlusion of one eye with a black material hood fixed with adhesive tape. For every of the incubation and breeding conditions described, to a

chick group was deprived the right eye (DX), to the other group the left eye (SX) and to the third none of the eyes was deprived (control). After the MD procedure, behavioral sleep was observed for 6 consecutive hours. Moreover, during MD procedure and the subsequent six hours of sleep observation, we decided to investigate the motor activity, using the proper activity cages. The results obtained have highlighted the fact that MD does not influence the binocular sleep time, whilst Mo-Un sleep is deeply affected (Fig.7). How previously demonstrated (Bobbo et al. 2002), the asymmetrical *in ovo* stimulation influences the sleep lateralization pattern. The chick of the control group, whose eggs where dark incubated, showed a clear preference for the right eye closure (left hemisphere sleep), whilst the chick from the light incubated eggs showed a preference for the left eye closure (right hemisphere sleep) (Fig.8).

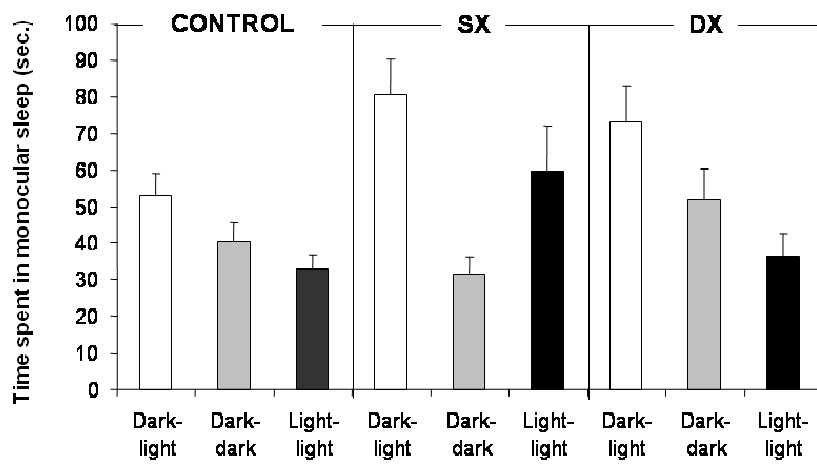


Fig. 7

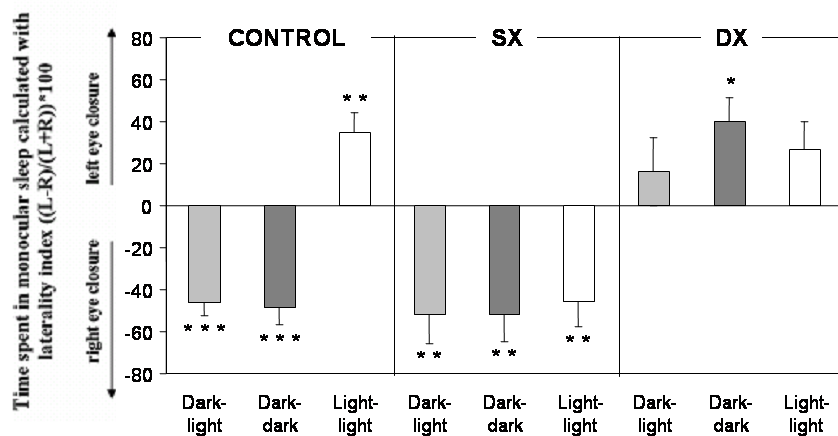


Fig. 8

* = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

The SX chicks, who were left eye deprived, irrespective of incubation conditions show a strong preference for the right eye closure (left hemisphere sleep) during episodes of Mo-Un sleep.

The DX chicks, which were right eye deprived, seem to be influenced from MD in a different way, depending on the incubation and breeding conditions. Only the dark-dark chicks show a marked preference for left eye closure during monocular sleep, whilst the other two groups did not show any preference.

It is plausible to suppose that the contralateral to the deprived eye hemisphere sleeps during MD and therefore, at the end of MD the other, ipsilateral hemisphere needs a higher amount of sleep caused by the increased activity of the hemisphere during wake. Further studies that include EEG recording that could help understand what happens in the deprived hemisphere are planned.

Another hypothesis that can be advanced is that, in spite of the fact that light stimulation *in ovo* modulates the sleep lateralization as we have shown in the control chicks, the MD has a stronger effect compared to what happens during incubation.

Another aspect that has emerged is that the left hemisphere of chick that received light (either during incubation or during their first day of life) seems to be less sensitive to MD since visual pathways and areas are higher lateralized toward left.

For the interpretation of the data it has to be taken in account the role that the right eye plays in the analysis and in the process of imprinting that is considered a form of memory of precocious identification that develops in the nidifugous species after the exposition of salient stimuli in absence of reinforcement. The critical period for the imprinting lasts only the first days of life. It is therefore plausible to retain that MD could interfere with imprinting. We know that chick bred in social isolation (without imprinting) show a behavior that is normally induced by a stress situation (frequent distress calls and non-finalized movements). To this end the motor activity of chick represent an indirect index of the possible MD effect on consolidation of the imprinting object. From the graph (Fig.9) it should be clear that the chick that were right eye deprived show totally a significant increment of motor activity compared to the control chick. The dark-dark chicks present a higher motor activity compared to the other two groups.

This effect could be interpreted under the light of the fact that the dark-dark condition extends its critical period for imprinting to the second day of life and as a consequence the chicks, who don't have yet elaborated the imprinting process, could show more motor activity associated to a distress situation.

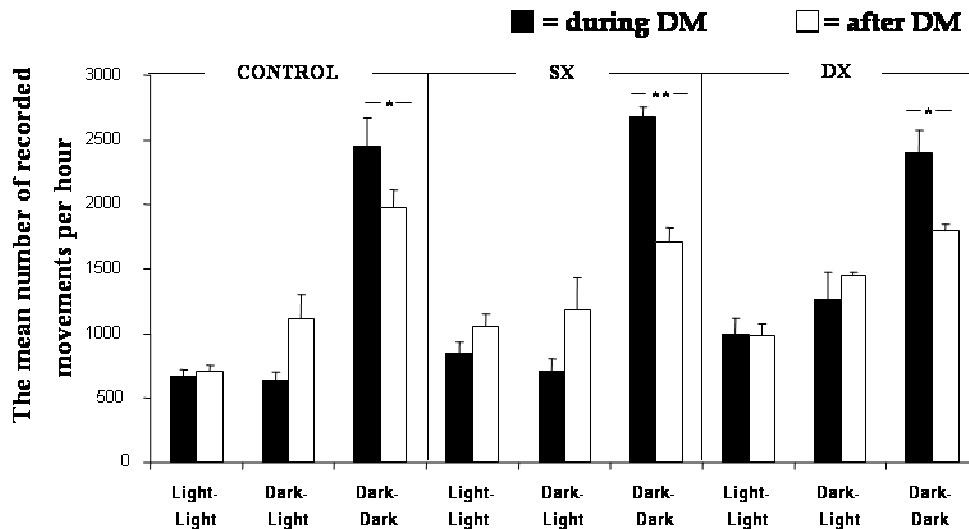


Fig. 9

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Also the results of this experiment seem in favor of the hypothesis that accounts the Mo-Un sleep as a dynamic aspect of sleep, that can be modulated by the *in ovo* modulation, by environmental modification of the breeding conditions and also following MD.

Spatial learning and Mo-Un sleep

Numerous scientific proofs on man and on animal, underlie the possible role of sleep for consolidation of the memory trace, more specifically the role of SWS between 0,75 and 4,5 Hz (SWA) (Stickgold, 2005). It is well known that the right hemisphere is mainly dominant in the control of behavior and spatial learning.

As a consequence the aim of this experiment is to investigating the pattern of Mo-Un sleep following the learning of a spatial task during which the animals could rely only on geometrical and topographical clues (Nelini et al., In preparation).

The experimental paradigm used for the learning phase was the paradigm of the geometric module (rectangular arena). This allows the valuation of the re-orienting abilities based exclusively on geometrical and topographical clues (Vallortigara et al., 1990; 2004). In a first experiment 12 female chicks at their eighth day of life were used. They were dark incubated and bred with the imprinting object. After their hatching the animals were divided in two groups. An experimental group (N=6) was subjected to a training in the arena. The animals had to learn to discriminate the correct angle where food was present using only with spatial clues (training with spatial learning).

At the 11th day, the animals were subjected to a test whose aim was to verify the learning (the criterion for learning was set at 80% of correct choices). A group of chicks (N=6, control group) was submitted to the same experimental procedure, but inside the arena the food was present at every angle so they were not under a learning process (training without spatial learning). Right after the training and the test sleep has been observed at the

behavioral level for three hours. The learning results show that only the experimental group chicks learned the task (Fig.10).

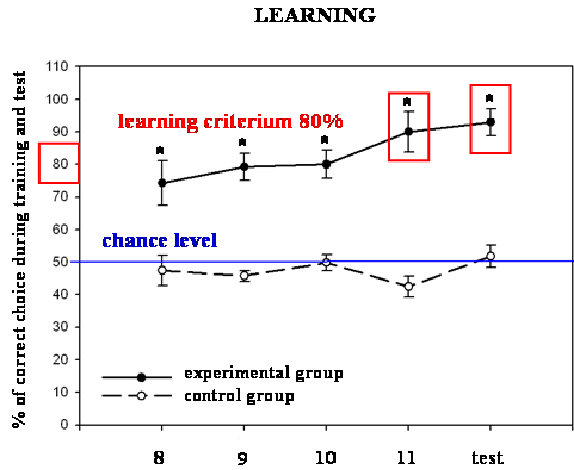


Fig. 10

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Regarding the sleep data, we observe how the experimental group showed a significant increase of total bihemispheric sleep compared to the control group and also a significant increase of left Mo-Un sleep (left eye closure – right hemisphere sleep) (Fig.11 and Fig.12).

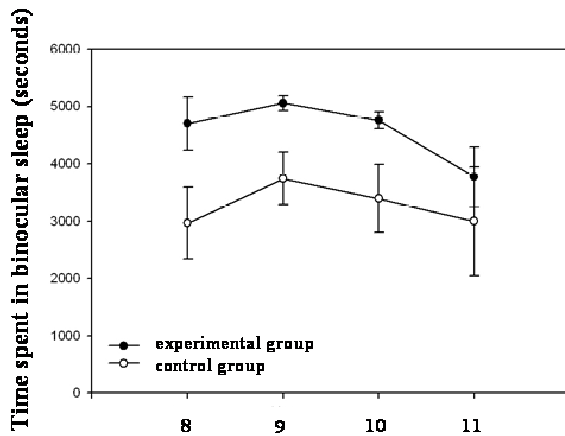


Fig. 11

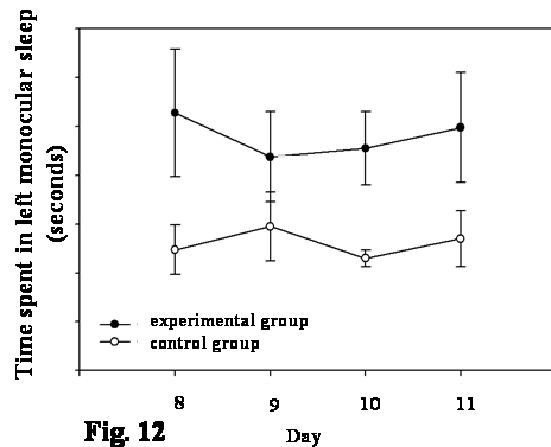


Fig. 12

The results relative to lateralization index have permitted to show how the chick of the experimental group had a significant preference for the left eye closure and therefore a preference for right unihemispheric sleep already after the first day of training, whilst no lateralization pattern has been found in sleep of the control group chicks (Fig.13).

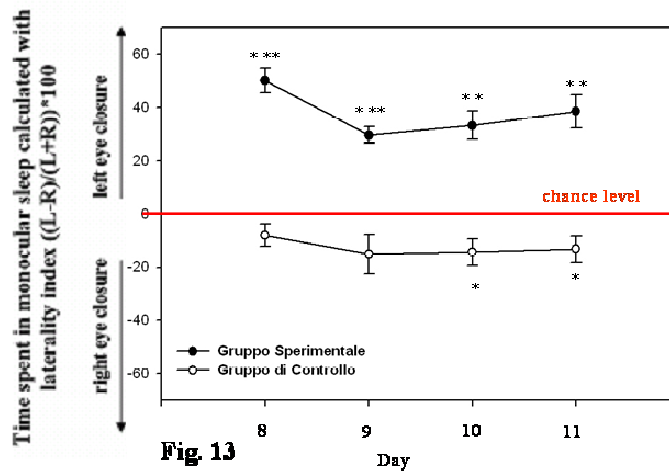


Fig. 13
 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Monocular occlusion, spatial learning and Mo-Un sleep

On the basis of the results of the previous study, another experiment was conducted to observe the relationship between unihemispheric sleep and spatial learning. The same experimental learning paradigm was used. 12 female dark incubated chicks at their eighth day of life were bred with the imprinting object. The adopted experimental procedure was the same as the previous experiment but the procedure relative to the spatial learning training with only one eye was used. The group Dep-Dx (N=6) was submitted to selective occlusion of right eye (see MD experiment) while learning of the spatial task, the other groups Dep-Sx (N=6) was submitted to selective occlusion of the left eye during learning. The experimental hypothesis considered the possibility that after selective occlusion of one eye only the contralateral to the open eye hemisphere would have carried out the learning task and therefore it would have been possible to observe a different sleep Mo-Un pattern in the two groups. The results relative to the learning (Fig. 14) show that only the Dep-Dx chicks (the chicks that were using the right hemisphere during training) had learned the task.

The results have confirmed the findings in the literature that reported the right hemisphere as mainly involved in spatial learning tasks. The results of the lateralization index have highlighted a significant preference for the left eye closure (right hemisphere sleep) in the Dep-Dx group and a preference for the right eye closure (left hemisphere sleep) in the Dep-Sx group (Fig.15). Those data seem to associate the work carried out by the two hemispheres at the sleep in the corresponding hemisphere also in the absence of learning. However, with the analysis on the time spent in Mo-Un sleep in seconds it has resulted that the chick of the Dep-Dx group showed a significant higher amount of left Mo-Un sleep (sleep in the right hemisphere) compared to the Dep-Sx chick (Fig.16).

LEARNING

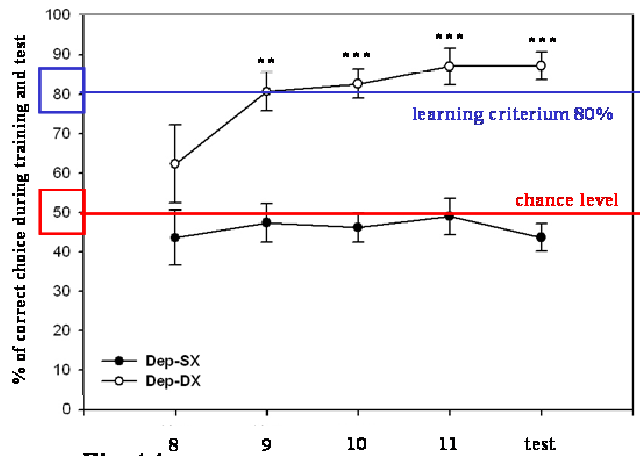


Fig. 14

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

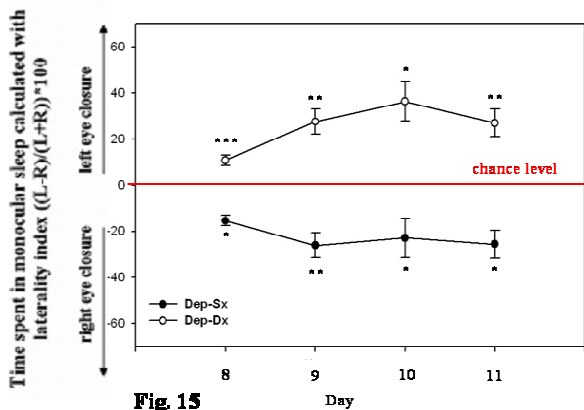


Fig. 15

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

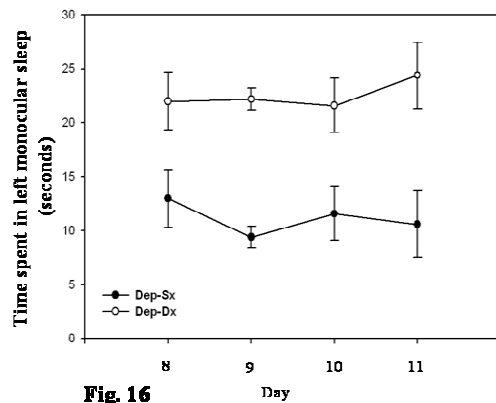


Fig. 16

The results of this experiment have therefore highlighted in first instance how the preference for right or lateralized Mo-Un sleep is associated to the use or dependent of the two hemispheres, irrespective of learning task. From the observation of the results on left Mo-Un sleep it was possible to note how there also was a significant increase in lateralized Mo-Un sleep in the chicks of Dep-Dx group that had used the dominant hemisphere for the spatial learning task (right hemisphere), compared to the Dep-Sx chicks group. As a whole the results seem to give credit to the hypothesis of involvement of sleep in the learning processes and more in detail in the processes of spatial learning. Sleep seems to be modulated by the hemispheric involvement in the absence of learning processes and also by the learning process that increase the amount of Mo-Un sleep in the hemisphere that is dominant for the task.

Another experiment with the same methodology and the same experimental design has been planned. In this case the animals will be submitted to the experimental paradigm without learning. The aim is to observe the solely influence of environment on Mo-Un sleep associated to the two cerebral hemispheres. The results of this project will permit us to better clarify the Mo-Un sleep pattern after a spatial learning task with selective eye closure.

Conclusions

As a conclusion, the experiments described above add evidence for a tight connection between unihemispheric sleep and lateralization of the cerebral functions in the chick. Those results also permit to support the hypothesis that unihemispheric sleep is an aspect of local sleep. These data also highlight the presence of a unihemispheric sleep pattern in chick that is predetermined and parallel to the development of cognitive functions in this species. Moreover, the unihemispheric sleep can be modulated by light stimulation *in ovo*, by monocular deprivation and by the learning task to which the animal is subjected. It is also possible to advance the hypothesis that unihemispheric sleep as an aspect of local sleep follows a hierarchical trend dictated by the priorities to which the animal is submitted. From the experiment in which MD was analyzed it clearly appears how the unihemispheric sleep pattern is influenced in different ways in the various groups depending on the environmental stimulation (light or dark incubation, light or dark breeding), but also in a depending from the developmental stage in which the animals are (presence or absence of imprinting object consolidation). Likewise, a similar effect of sleep deprivation is observable on the unihemispheric sleep pattern in the different days of animal development. This effect seems to indicate a preference for the sleep recovery in the two hemispheres that substitutes the need of SWS in one or the other hemisphere normally observed during the stages of the cognitive development in chicks (lateralized monocular sleep at the fifth day and right Mo-Un sleep at the eighth and 11th day of life).

Also the experiments relative to spatial learning seem to underline the local features of unihemispheric sleep and also appear to confirm the hypothesis of a hierarchical organization associated to role use/dependent of unihemispheric sleep that at the same time is modulated from the spatial learning task to which the animals are submitted.

Riferimenti bibliografici - References

- Ball, N. J., Shaffery, J. P., Opp, M. R., Carter, R. L., Amlaner, C. J. (1985). "Asynchronous eye-closure of birds". *Sleep Research* 14, pp. 87.
- Bobbo, D., Galvani, F., Mascetti, G.G., Vallortigara, G. (2002). "Light exposure of the chick embryo influences monocular sleep". *Behavioural Brain Research* 134, pp. 447-466.
- Bobbo, D., Vallortigara, G., Mascetti, G.G. (2006a). "Effects of social interaction on monocular-unihemispheric sleep in male and female domestic chicks". *Biological Psychology* 73, pp. 213-219.
- Bobbo, D., Vallortigara, G., Mascetti, G.G. (2006b). "The effects of early post-hatching changes of imprinting object on the pattern of monocular/unihemispheric sleep of domestic chicks". *Behavioural Brain Research* 170, pp. 23-28.

- Bobbo,D., Mascetti,G.G., Fonda,F., Vallortigara,G. (2007). “Monocular sleep following passive avoidance learning in chicks”. *Behavioural Brain Research*, 178(2), pp. 305-312.
- Bobbo,D., Nelini,C., Mascetti,G.G. (2008). “Binocular and monocular/unihemispheric sleep in the domestic chick (*Gallus gallus*) after a moderate sleep deprivation”. *Experimental Brain Research*, 185(3), pp. 421-427.
- Bobbo, D., Nelini, C., Mascetti, G.G. (2009). “Effects of sleep deprivation on sleep in 5th and 8th-day hatching domestic chicks (*Gallus gallus*)”. *Behaviour*; pp. 146,1253-1267.
- Bobbo, D., Quercia, A., Nelini, C. e Mascetti,G.G. “The effect of monocular deprivation on sleep in light and dark incubated domestic chick (*Gallus gallus*)”. In preparazione.
- Borbely, AA. (1982). “A two process model of sleep regulation”. *Human Neurobiology*, 1,pp.195–204.
- Buchmann, A, Kurth, S, Ringli, M, Jenni, O.G., Huber, R. (2009). “Slow wave sleep and local grey matter volumes”. *Neuropsychobiology*, 59, pp. 257.
- Deng, C., Rogers, L. J. (1998). “Bilaterally projecting neurones in the two visual pathways in the chick”. *Brain Research* 794, pp. 281-290.
- Freire, R., Rogers, L.J. (2007). “Experience during a period of right hemisphere dominance alters attention to spatial information in the domestic chick”. *Animal Behaviour*, 74, pp. 413-418.
- Huber, R., Ghilardi, M. F., Massimini, M., Tononi, G. (2004). “Local sleep and learning”. *Nature*, 430, pp. 78-81.
- Huber, R. (2008). “High-density sleep EEG recordings during adolescence”. *Journal of Sleep Research*, 17, pp. 53.
- Kurth, S, Ringli, M., Geiger, A., Jenni, O.G., Huber, R. (2009) “Sleep dependent performance improvement in children”. *Neuropsychobiology*, 59(4), pp. 261.
- Mascetti, G. G., Rugger, M., Vallortigara, G. (1999). “Visual lateralization and monocular sleep in the domestic chick”. *Cognitive Brain Research* 7, pp. 451-463.
- Mascetti,G.G., Rugger,M., Vallortigara,G., Bobbo,D. (2007). “Monocular-unihemispheric sleep and visual discrimination learning in the domestic chick”. *Experimental Brain Research*, 176(1), pp. 70-84.
- Nelini, C., Bobbo, D., Mascetti, G.G. “Local sleep: a spatial learning task enhances sleep in the right hemisphere of domestic chicks (*Gallus gallus*)”. In preparazione.
- Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J., Lima, S. L. (2000a). “Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep”. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, pp. 817-842.
- Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. & Lima, S. L. (2000b). “Unihemispheric Slow-wave sleep and predator detection in the pigeon (*Columba liva*)”. *Sleep (Suppl. 1)* 23, pp. 43-44.
- Ringli, M., Kurth, S., Jenni, O.G., Tononi, G., Huber, R. (2008). “High-density sleep EEG recordings in children and adolescents”. *Journal of Sleep Research*, 17, pp. 130.
- Ringli, M., Kurth, S., Geiger, A., Jenni, O.G., Huber, R. (2009). “Local increase of sleep SWA after visuomotor learning in children”. *Neuropsychobiology*, 59, pp.260.
- Rogers, L.J. (1990). “Light input and the reversal of functional lateralization in the chicken brain”. *Behaviour Brain Research*, 38, pp. 211-221.
- Rogers, L. J. (1995). “The development of brain and behaviour in the chicken”. Cab International.
- Rogers, L. J. & Andrew, R. J. (2002). “Comparative Vertebrate Lateralization”, Cambridge University Press.
- Stickgold, R. (2005). “Sleep-dependent memory consolidation”. *Nature* 437, pp. 1272-1278.

- Tononi, G., Cirelli, C. (2003). "Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis". *Brain Research Bulletin* 62, pp. 143-150.
- Tononi, G., Cirelli, C. (2006). "Sleep function and synaptic homeostasis". *Sleep Medicine Review* 10, pp. 49-62.
- Vallortigara, G. (1992). "Right hemisphere advantage for social recognition in the chicks". *Neuropsychologia* 30, pp.761-768.
- Vallortigara, G. (1994). "L'evoluzione della lateralizzazione cerebrale", Cleup Editrice, Padova.
- Vallortigara, G., Zanforlin, M. & Pasti, G. (1990). "Geometric modules in animal spatial representations : A test with chicks (*Gallus gallus*)". *Journal of Comparative Psychology* 104, pp. 248-254.
- Vallortigara, G., Pagni, P., Sovrano, V.A. (2004). "Separate geometric and non-geometric modules for spatial reorientation: evidence from a lopsided animal brain". *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16, pp.390-400.
- Vyazovskiy, V., Borbély, A.A., Tobler, I. (2000). "Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat". *Journal of Sleep Research*, 9, pp. 367-371.
- Vyazovskiy, V.V., Tobler, I. (2008). "Handedness leads to interhemispheric EEG asymmetry during sleep in the rat". *Journal of Neurophysiology*, 99, pp. 969-975.

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
I - IL SONNO	pag. 7
1.1 Il sonno e le sue caratteristiche	pag. 7
1.1.1 Gli esordi della ricerca sul sonno	pag. 7
1.1.2 Sviluppo della ricerca e principali tracciati elettroencefalografici	pag. 9
1.1.3 Caratterizzazione del sonno: aspetti comportamentali e misure elettrofisiologiche	pag. 10
1.1.4 Gli stadi del sonno	pag. 11
1.2 Strutture neurali e correlati biochimici del sonno	pag. 14
1.2.1 I principali centri nervosi del sonno	pag. 14
1.2.2 Correlati biochimici del sonno	pag. 15
1.2.3 I ritmi circadiani e il ciclo sonno-veglia.....	pag. 16
1.3 Le possibili funzioni del sonno	pag. 18
1.3.1 Ipotesi adattive e ipotesi ristorative	pag. 18
1.3.2 Sonno e funzioni cognitive: i rapporti tra sonno e memoria	pag. 20
1.3.3 Sonno rilascio ormonale e sistema immunitario.....	pag. 22
II – IL SONNO NEI MAMMIFERI E NEGLI UCCELLI	pag. 25
2.1 Il sonno e la sua possibile evoluzione filogenetica	pag. 25
2.1.1 Studi sul sonno e ipotesi di sviluppo filogenetico	pag. 25
2.2 Il sonno nei mammiferi	pag. 29
2.2.1 Lo studio trasversale del sonno tra le varie specie di mammiferi: livelli di analisi e variabili specie-specifiche.....	pag. 29
2.2.2 Studi correlativi tra il sonno e le variabili costituzionali e comportamentali nei mammiferi.....	pag. 30
2.2.3 Il sonno nei mammiferi marini	pag. 33

2.3 Il sonno negli uccelli	pag. 38
2.3.1 Correlati elettrofisiologici e aspetti comportamentali	pag. 38
2.3.2 Ritmo sonno veglia negli uccelli	pag. 41
III – LATERALIZZAZIONE CEREBRALE NEL PULCINO	pag. 43
3.1 La lateralizzazione cerebrale: sviluppo del concetto e studi sul pulcino	pag. 43
3.1.1 Le prime evidenze della lateralizzazione cerebrale e lo sviluppo dell’interesse scientifico	pag. 43
3.1.2 La lateralizzazione cerebrale nel pulcino	pag. 46
3.1.3 Un importante aspetto della lateralizzazione cerebrale nel pulcino: il processo d’ <i>imprinting</i>	pag. 49
3.2 Il pulcino come modello animale	pag. 52
3.2.1 Vantaggi anatomici e funzionali nell’utilizzo del pulcino di pollo domestico in laboratorio.....	pag. 52
3.2.2 Le vie visive del pulcino	pag. 54
3.2.3 Differenze di genere	pag. 57
IV – IL SONNO UNIEMISFERICO: CARATTERIZZAZIONE E RELAZIONE CON LA LATERALIZZAZIONE CEREBRALE	pag. 59
4.1 Il sonno uniemisferico	pag. 59
4.1.1 Definizione	pag. 59
4.1.2 Filogenesi del sonno uniemisferico	pag. 61
4.1.3 Indici elettrofisiologici del sonno uniemisferico	pag. 62
4.1.4 Neurofisiologia del sonno uniemisferico	pag. 64
4.1.5 Funzione del sonno uniemisferico negli uccelli.....	pag. 65
4.1.6 Posture assunte dal pulcino durante il sonno uniemisferico	pag. 66
4.2 Il sonno uniemisferico come aspetto della lateralizzazione cerebrale	pag. 69
4.2.1 Condizioni d’allevamento e sonno uniemisferico	pag. 69

4.2.2 Fattori ambientali e sonno uniemisferico	pag. 70
--	---------

**V – IL SONNO UNIEMISFERICO COME POSSIBILE ASPETTO LOCALE
DEL SONNO**

5.1 Il concetto di sonno locale

5.1.1 Una recente ipotesi sulla funzione del sonno	pag. 73
--	---------

5.1.2 Il concetto di sonno locale nell'uomo	pag. 75
---	---------

5.1.3 Studi sugli aspetti regionali del sonno nel ratto	pag. 78
---	---------

5.2 Studi comportamentali sul pulcino: il sonno uniemisferico

come aspetto del sonno locale

5.2.1 Introduzione allo studio comportamentale del sonno uniemisferico come aspetto del sonno locale	pag. 81
---	---------

5.2.2 Sonno uniemisferico e stimolazione luminosa <i>in ovo</i>	pag. 83
---	---------

5.2.3 Sonno uniemisferico a seguito di allevamento con <i>imprinting</i> o isolamento sociale in pulcini maschi	pag. 84
--	---------

5.2.4 Sonno uniemisferico a seguito del cambiamento delle caratteristiche dell'oggetto d' <i>imprinting</i> al secondo giorno di vita.....	pag. 85
---	---------

5.2.5 Sonno uniemisferico ed interazione sociale	pag. 86
--	---------

5.2.6 Sonno uniemisferico e apprendimento di evitamento passivo (<i>Passive Avoidance Learning</i> – PAL)	pag. 88
---	---------

5.2.7 Sonno uniemisferico e apprendimento di discriminazione visiva	pag. 89
--	---------

**VI – IL SONNO UNIEMISFERICO: EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE DI
SONNO**

6.1 Introduzione.....

6.1.1 Il paradigma sperimentale di privazione di sonno	pag. 91
--	---------

6.1.2 Studi sull'uomo e sui mammiferi	pag. 92
---	---------

6.1.3 Studi di privazione di sonno nel modello animale	
--	--

del pulcino domestico	pag. 97
6.2 Ricerca sperimentale	pag. 106
6.2.1 Ipotesi e obiettivi	pag. 100
6.3 Effetti della deprivazione di sonno nel pulcino	
all'undicesimo giorno di vita.....	pag. 102
6.3.1 Soggetti	pag. 102
6.3.2 Apparato sperimentale	pag. 102
6.3.3 Procedura	pag. 106
6.3.4 Metodi di analisi	pag. 107
6.3.5 Risultati e discussione	pag. 108
6.4 Effetti della deprivazione di sonno nel pulcino al quinto	
e all'ottavo giorno di vita.....	pag. 120
6.4.1 Soggetti	pag. 120
6.4.2 Apparato e procedura sperimentale	pag. 120
6.4.3 Metodi di analisi	pag. 122
6.4.4 Risultati e discussione	pag. 122
VII – IL SONNO UNIEMISFERICO: EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE	
MONOCULARE SELETTIVA IN PULCINI INCUBATI ALLA LUCE O AL	
BUIO	pag. 135
7.1 Introduzione	pag. 135
7.1.1 La deprivazione monoculare visiva come paradigma	
di ricerca per lo studio del sonno uniemisferico	pag. 135
7.2 Ricerca sperimentale	pag. 138
7.2.1 Ipotesi e obiettivi	pag. 138
7.2.2 Soggetti e apparato sperimentale	pag. 138
7.2.3 Procedura	pag. 141
7.2.4 Metodi di analisi	pag. 144
7.2.5 Risultati e discussione	pag. 145

VIII – SONNO UNIEMISFERICO E APPRENDIMENTO SPAZIALE NEL PULCINO	pag. 157
8.1 Introduzione	pag. 157
8.1.1 Apprendimento spaziale e sonno: evidenze nel pulcino.....	pag. 157
8.2 Ricerca sperimentale	pag. 160
8.2.1 Ipotesi e obiettivi	pag. 160
8.2.2 Soggetti	pag. 161
8.2.3 Apparato sperimentale	pag. 162
8.2.4 Procedura	pag. 164
8.2.5 Metodi di analisi	pag. 170
8.2.6 Risultati e discussione	pag. 172
IX – CONCLUSIONI	pag. 191
Bibliografia	pag. 195

Introduzione

L'evoluzione del Sistema Nervoso è costellata da soluzioni adattive capaci di far fronte in modo efficiente ed efficace alla costante pressione della selezione naturale, costituita sia da istanze ambientali che dalle peculiari necessità anatomico-morfologiche delle diverse specie.

L'encefalo dei vertebrati, a livello macroscopico, è costituito da due strutture principali - gli emisferi cerebrali - posti a sinistra e a destra della linea mediana del corpo. I due emisferi, nonostante appaiano simili l'uno all'altro, presentano sostanziali differenze funzionali, strutturali e neurochimiche; tali asimmetrie sembrano essere presenti in quasi tutti i vertebrati. Proprio per questo motivo, l'approccio comparativo allo studio della lateralizzazione cerebrale, acquista una posizione fondamentale in quanto garantisce la possibilità di utilizzare modelli animali per condurre esperimenti scientifici con metodologie complesse che altrimenti non potrebbero essere compiute sull'uomo. Inoltre, l'utilizzo di modelli animali permette di compiere studi funzionali e strutturali accurati, volti anche ad indagare la filogenesi dell'evoluzione di particolari fenomeni.

Il sonno e la veglia sono generalmente sempre stati considerati due fenomeni in conflitto ed escludentesi, in realtà diverse specie di animali, tra cui alcuni mammiferi marini e gli uccelli, sfruttano per conciliare questi due fenomeni un particolare stato comportamentale ed elettrofisiologico durante il quale un emisfero dorme mentre l'altro resta sveglio. Questo stato è definito sonno uniemisferico perché asincrono e svolto indipendentemente e alternativamente dai due emisferi.

Il sonno uniemisferico, oggetto di studio di questo lavoro, è stato registrato ed osservato anche nel pulcino domestico il quale, grazie alle sue numerose

caratteristiche anatomico-funzionali, può risultare un ottimo modello animale per lo studio comportamentale e neurobiologico delle funzioni del sonno.

Recenti evidenze descritte da Mascetti e Bobbo hanno associato il sonno uniemisferico agli aspetti della lateralizzazione cerebrale del pulcino. Gli studi condotti hanno evidenziato come il quadro di sonno uniemisferico sembra correlare ed essere associato con l'emisfero specializzato per il controllo del comportamento messo in atto durante il periodo di veglia. Il sonno uniemisferico, assieme al sonno biemisferico, sembrerebbe ricoprire un ruolo nei processi cerebrali di recupero ed in particolare proprio in quei processi che interessano selettivamente uno o l'altro emisfero. Nello specifico è stato osservato, da un punto di vista comportamentale, come l'emisfero maggiormente coinvolto durante la veglia mostri un incremento di sonno totale rispetto all'emisfero non dominante.

In letteratura sono molti i lavori che riportano risultati relativi ad un possibile coinvolgimento del sonno nei processi di consolidamento della traccia mnestica, ma risulta a tutt'oggi poco chiaro quali siano gli stadi del sonno effettivamente coinvolti nei processi di consolidamento e quali siano i magazzini mnestici che principalmente risentano degli effetti del sonno. I meccanismi neurali alla base di questa ipotesi sono stati indagati sia nell'uomo che in diversi modelli animali utilizzando metodiche neurofisiologiche, neurochimiche e comportamentali. Recentemente Tononi e Cirelli, hanno ipotizzato che una delle possibili funzioni del sonno fosse quella di operare un *downscaling* dei pesi sinaptici formati durante la veglia nella corteccia cerebrale. Nello specifico, i risultati proposti dagli autori mostrano come i processi di apprendimento, di potenziamento a lungo termine e di plasticità neuronale portino ad un aumento della forza delle connessioni sinaptiche intracorticali in particolari *network* neuronali maggiormente attivati durante la

veglia. Questo aumento dei pesi sinaptici intracorticali, raggiungerebbe un massimo verso sera e sarebbe alla base di una ri-organizzazione sinaptica durante il sonno. Tale riorganizzazione consisterebbe in un attivo *downscaling* sinaptico volto ad ottimizzare nuovamente il funzionamento cerebrale per il successivo periodo di veglia. Questi meccanismi di *downscaling* sembrerebbero esprimersi durante il sonno ad onde lente. Huber e collaboratori inoltre hanno descritto come il sonno ad onde lente non si distribuisca uniformemente sul cervello durante il periodo di sonno, ma si rilevi principalmente in corrispondenza di quelle regioni maggiormente attivate durante la veglia. Queste osservazioni sulla distribuzione topografica cerebrale del sonno ad onde lente, hanno permesso di avanzare l'ipotesi che il sonno possa essere un fenomeno locale associato al funzionamento cerebrale avvenuto durante la veglia e direttamente collegato al *downscaling* sinaptico. Il "sonno locale", così come è stato definito, è stato osservato anche da Tobler e Vyazovskiy nei ratti sottoposti a particolari compiti cognitivi e comportamentali durante la veglia.

Alla luce di quanto fin'ora illustrato l'ipotesi avanzata in questo lavoro è che il sonno uniemisferico, che nel pulcino è costituito solamente da sonno ad onde lente, possa essere una forma di "sonno locale" presente in un organismo con un assetto cognitivo molto semplice e filogeneticamente lontano dall'uomo. Allo scopo di validare questa ipotesi, nel mio lavoro sono stati utilizzati alcuni dei più solidi paradigmi scientifici per lo studio comportamentale del sonno e della lateralizzazione cerebrale.

Nei primi due esperimenti che verranno descritti in questa tesi gli animali sono stati sottoposti al paradigma sperimentale di deprivazione di sonno che è una metodica ampiamente utilizzata per studiare le funzioni del sonno. Gli animali in un primo esperimento sono stati sottoposti a deprivazione di sonno della

durata di otto ore alla seconda settimana di vita, che corrisponde ad una particolare tappa di sviluppo cognitivo e di lateralizzazione cerebrale, mentre in un secondo esperimento sono stati formati quattro gruppi di animali che sono stati sottoposti a deprivazione di sonno per quattro o otto ore alla prima o alla seconda settimana di vita, al fine di indagare gli effetti di una differente quantità di deprivazione di sonno sul quadro di sonno uniemisferico e biemisferico del pulcino in diversi momenti dello sviluppo cognitivo.

In un successivo esperimento gli animali sono stati sottoposti al paradigma sperimentale della deprivazione monoculare, una procedura usata per indagare la plasticità del sistema visivo durante il periodo critico, mediante la chiusura selettiva di un occhio. Gli animali sono stati deprivati al secondo giorno di vita dopo essere stati sottoposti a differenti condizioni di incubazione e di allevamento (buio o luce). La deprivazione monoculare ha permesso, grazie anche alle peculiari caratteristiche anatomiche del pulcino, di modulare gli *input* visivi in entrata nei due emisferi e di osservare i cambiamenti del quadro di sonno uniemisferico e biemisferico del pulcino a seguito di questa modulazione.

Gli ultimi due esperimenti che verranno descritti hanno avuto lo scopo di indagare l'ipotesi ampiamente discussa in letteratura scientifica del possibile coinvolgimento del sonno ad onde lente nei processi di consolidamento della traccia mnestica spaziale. Nel primo esperimento i pulcini sono stati sottoposti durante la seconda settimana di vita, ad un compito di apprendimento spaziale. A tale scopo è stato utilizzato un paradigma per il ri-orientamento spaziale che permette di ristabilire la posizione di un organismo in uno spazio familiare, dopo che è stato disorientato, utilizzando unicamente indizi geometrici e topografici. Tale paradigma sperimentale è definito "modulo geometrico" ed è impenetrabile a qualsiasi altra informazione che non sia di tipo topografico-

geometrico. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo è stato sottoposto all'addestramento con apprendimento spaziale ed un gruppo è stato sottoposto alla medesima procedura di addestramento ma senza apprendimento spaziale. Successivamente entrambi i gruppi di pulcini sono stati testati per l'avvenuto apprendimento. E' noto come in questo animale, l'emisfero destro sia dominante per quanto riguarda il controllo e la gestione dei compiti di tipo spaziale; da questo presupposto è stato ipotizzato che a seguito del compito spaziale potesse essere osservata una modificazione del quadro di sonno uniemisferico in favore dell'emisfero che aveva gestito il compito di apprendimento al quale l'animale era stato sottoposto. Nell'ultimo esperimento che verrà presentato in questo lavoro è stato utilizzato nuovamente il paradigma del "modulo geometrico" ma, in questo caso, gli animali sono stati sottoposti all'addestramento con apprendimento spaziale in visione monoculare destra o sinistra a seconda della condizione sperimentale. In questo modo è stato possibile costringere i pulcini a compiere il compito esclusivamente con l'emisfero controlaterale all'occhio aperto ed è stato quindi possibile osservare da un punto di vista comportamentale quali fossero le modificazioni del sonno uniemisferico nell'emisfero costretto a svolgere il compito.

Alla luce dei risultati degli esperimenti sopra elencati, che saranno descritti dettagliatamente in seguito, sembra possibile ipotizzare che il sonno uniemisferico nel pulcino sia un aspetto del "sonno locale" recentemente osservato nell'uomo. A proposito, tale modello animale, con le sue interessanti peculiarità funzionali ed anatomiche, potrebbe divenire un ottimo campo di studio nell'ambito della ricerca volta ad indagare le funzioni del sonno non solo da un punto di vista comportamentale ma anche fisiologico e neurochimico.

Capitolo I

IL SONNO

1.1 IL SONNO E LE SUE CARATTERISTICHE

1.1.1 Gli esordi della ricerca sul sonno

Sono da sempre numerosi i tentativi d'interpretare e di spiegare il fenomeno del sonno, ma è solo alla fine del diciannovesimo secolo che il pensiero scientifico volge la sua attenzione allo studio di questo fenomeno in modo metodico e con un approccio rigoroso.

Una delle possibili ragioni di questo ritardo è stata sicuramente la difficoltà nel trovare una metodica scientifica adeguata (Casagrande e De Gennaro, 1998) per studiare un fenomeno così complesso ed articolato come il sonno. E', infatti, solo agli inizi del ventesimo secolo che alcune teorie della funzionalità del sonno hanno iniziato ad acquistare una valenza scientifica grazie allo sviluppo e alla diffusione dell'elettrofisiologia, che ha permesso di misurare i segnali bioelettrici provenienti dal cuore (elettrocardiogramma o ECG), dai muscoli (elettromiogramma o EMG) e dal cervello (elettroencefalogramma o EEG) (Penisi e Sarlo, 1998).

Nel 1915, Pavlov definì il sonno come un fenomeno di inibizione interna che, dalle singole zone del cervello, si estendeva progressivamente a tutta la corteccia cerebrale sino ad arrivare alle strutture sottocorticali. La concezione di Pavlov, che trovava sostegno anche da osservazioni condotte su animali e su pazienti con lesioni corticali, era essenzialmente passiva, in quanto considerata come causa dell'inibizione neuronale (Casagrande e De Gennaro, 1998). Anche Kleitman, nel 1929, attribuì l'inizio del sonno ad un

meccanismo passivo successivo al declino della stimolazione sensoriale, ritenendo che proprio la stimolazione sensoriale fosse responsabile del mantenimento della veglia (Casagrande e De Gennaro, 1998).

Nel 1935 Bremer produsse una conferma sperimentale delle ipotesi passive. In un lavoro condotto sui gatti vennero praticate sezioni trasversali complete nella zona alta del tronco cerebrale a livello dei collicoli anteriori (erano risparmiate soltanto la via ottica e quella olfattiva), in modo da lasciare le strutture nervose proencefaliche e diencefaliche isolate dalla maggior parte delle stimolazioni sensoriali. Nel suo preparato, definito *cerveau isolè*, Bremer poté osservare che l'attività elettrica cerebrale mostrava onde a bassa frequenza ed alto voltaggio e la presenza di fusi del sonno tipici di uno stato di sonno. Questo stato di sonno risultava irreversibile. In un secondo preparato, chiamato *encephale isolè*, Bremer praticò una resezione trasversale nella parte bassa del tronco encefalico, tra il bulbo e il midollo spinale, in modo che le strutture nervose proencefaliche e diencefaliche conservassero tutte le afferenze sensoriali. In questo caso l'attività elettrica cerebrale registrata negli animali era costituita dalla presenza di un normale ciclo sonno-veglia (Pinel, 2000).

Moruzzi e Magoun nel 1949, nell'ambito di studi sul sistema motorio, osservarono come la stimolazione della Formazione Reticolare (un complesso sistema di cellule e fibre nel tronco encefalico), nel momento in cui veniva stimolata in soggetti addormentati, produceva desincronizzazione EEG e di conseguenza la veglia.

Fu all'inizio degli anni cinquanta che venne proposta, a seguito di nuove evidenze scientifiche, l'ipotesi che il sonno fosse non un fenomeno passivo associato ad una ipostimolazione sensoriale, ma un fenomeno di tipo attivo e con determinati e specifici meccanismi neurali di attivazione e disattivazione.

Hess nel 1954 fu il pioniere dell'*ipotesi attiva* e dimostrò che la stimolazione a bassa frequenza del talamo mediale, tra i tratti di *Vicq D'Azur* e di *Meynert*, provocava nel gatto uno stato di sonnolenza, seguito da uno stato comportamentale di sonno praticamente identico al sonno spontaneo.

Studi EEG successivi confermarono definitivamente la presenza a livello del talamo, nella zona della lamina midollare, di un centro di attivazione del sonno. Questi nuovi risultati resero le *ipotesi passive* da quel momento insostenibili.

1.1.2 Sviluppo della ricerca e principali tracciati elettroencefalografici

Le prime registrazioni EEG risalgono agli studi di Caton del 1887, il quale registrava potenziali evocati in ratti e conigli. L'applicazione EEG all'essere umano, invece, è stata introdotta da Berger nel 1929, che è considerato a tutt'oggi il pioniere del metodo elettroencefalografico. Fu Berger ad identificare particolari onde nel tracciato EEG: le onde alfa e le onde beta. Le onde elettroencefalografiche registrate dagli elettrodi sullo scalpo, sono le unità costitutive dei ritmi encefalici e sono prodotte dalle unità funzionali del cervello: i neuroni e i dendriti (Penisi e Sarlo 1998).

I ritmi prodotti dal substrato cerebrale sono categorizzati in base agli intervalli di frequenza entro i quali variano. I principali ritmi descritti e normalmente individuati nel tracciato EEG sono (Kandel e Schwartz, 2000; Birbaumer, 1996):

- il *ritmo beta* (frequenza 13-30 Hz, ampiezza $> 50 \mu\text{V}$): è considerato il ritmo della veglia; è registrato nelle aree anteriori, principalmente nelle zone rolandiche. Può scomparire durante il movimento o alla rappresentazione mentale del movimento stesso;

- il *ritmo alfa* (frequenza 8-13 Hz, ampiezza 50-100 μ V): è il tracciato della veglia rilassata ad occhi chiusi, rilevabile nelle aree occipito-parietali. Questo ritmo sparisce all'apertura degli occhi (*blocco del ritmo alfa*);
- il *ritmo theta* (frequenza tra 4 e 7 Hz, ampiezza 100 μ V): è il ritmo del sonno sincronizzato non particolarmente profondo, è registrato principalmente nelle regioni temporali;
- il *ritmo delta* (frequenza tra 0.5 e 4 Hz, ampiezza $> 100 \mu$ V): è rilevabile nel sonno sincronizzato profondo e permette di definire l'attività elettrica come attività ad onde lente o SWA (*slow wave activity*).

1.1.3 Caratterizzazione del sonno: aspetti comportamentali e misure elettrofisiologiche

Dal punto di vista comportamentale, sono diverse le caratteristiche osservate durante il sonno: Flanigan (1973) definisce la postura stereotipata dei soggetti, Bruce-Durie (1981) associa il luogo specifico per il riposo e la sua organizzazione circadiana; Tobler (1984) sottolinea la funzione regolatrice attiva dopo periodi di privazione o di sazietà di sonno e, solo recentemente, Kanavau (1997) aggiunge alle particolarità di questo stato la chiusura degli occhi.

Bear e collaboratori (2002) definiscono il sonno come uno stato prontamente reversibile di ridotta reattività agli stimoli ambientali e ridotta interazione con l'ambiente stesso.

A livello elettrofisiologico, l'EEG è indubbiamente il metodo d'eccellenza per indagare il sonno. L'attività EEG, caratterizzata durante il sonno da onde lente e di alto voltaggio, con periodi di onde rapide a basso voltaggio, è stata registrata in modo metodico per la prima volta alla fine degli anni trenta. Nel 1953, Aserinsky e Kleitman, utilizzando l'EOG (elettrooculogramma),

scoprono che nei periodi di sonno in cui l'EEG si presenta in forma desincronizzata con onde rapide e a bassa frequenza, sotto le palpebre chiuse, gli occhi compiono dei rapidi movimenti rotatori (rapid eye movements o REM). Circa un decennio dopo, nel 1962, Berger e Oswald utilizzarono anche l'EMG (elettromiogramma) per caratterizzare il sonno. Essi descrivono, nello stesso periodo in cui compaiono i rapidi movimenti oculari, la perdita dell'attività elettrica della muscolatura del collo. L'EEG, l'EOG, e l'EMG divennero quindi le tre misure psicofisiologiche principali per indagare il sonno e per caratterizzarlo e permisero di individuare diversi stadi (Pinel, 2000).

1.1.4 Gli stadi del sonno

Il sonno sincronizzato ad onde lente (*slow wave sleep* o SWS) chiamato anche sonno ortodosso o sonno NREM (Non Rapid Eye Movements), si manifesta con un progressivo aumento della sincronizzazione delle onde cerebrali e un rallentamento del tracciato EEG, ridotto tono muscolare antigravitario, miosi oculare e assenza quasi completa di movimenti oculari (Parmeggiani e Morrison, 1990). Durante il sonno NREM la temperatura e il consumo di energia sono diminuiti, l'SNA (Sistema Nervoso Autonomo) incrementa l'attività parasimpatica, la respirazione e il funzionamento renale rallentano, mentre i processi digestivi aumentano e anche i processi mentali sono al minimo (Bear e coll., 2002).

Osservando l' EEG dell'intero periodo di sonno NREM si rileva che, nel momento in cui il soggetto chiude gli occhi, il tipico tracciato della veglia attiva con presenza principale di onde beta viene pian piano sostituito da onde alfa. Successivamente si possono distinguere quattro stadi con proprietà elettroencefalografiche differenti (Kandel e Schwartz, 1994):

- *stadio 1*: è considerato la condizione caratteristica dell'addormentamento. L'EEG è simile a quello della veglia rilassata (presenza di onde alfa), ma più lento. Progressivamente il tracciato subisce una graduale diminuzione della frequenza e un aumento del voltaggio; i movimenti oculari della veglia sono sostituiti da movimenti più lenti.

- *stadio 2*: l'EEG continua ad aumentare in ampiezza e a diminuire in frequenza (onde di 3-6 Hz). Si osserva inoltre la presenza di due onde caratteristiche: il *complesso K* (una singola ampia onda negativa seguita da una singola ampia onda positiva) e i *fusi del sonno* (gruppi intermittenti di onde di 12-14 Hz di frequenza).

- *stadio 3*: in questo stadio l'attività elettrica si fa sempre più sincronizzata, il tracciato EEG è più ampio e lento in frequenza e si inizia ad osservare la presenza di onde delta tipiche del sonno profondo.

- *stadio 4*: è la condizione del sonno profondo. Nel tracciato EEG si riscontra una massiccia presenza di onde delta (circa 50% del tracciato); l'individuo appare rilassato e i muscoli assiali diminuiscono di tono.

Questi quattro stadi, che costituiscono il 75% del sonno totale, sono soggetti ad un andamento ciclico. Il soggetto, dopo essere entrato nello *stadio 1*, percorre in successione anche lo *stadio 2, 3 e 4*. Raggiunto lo *stadio 4* il processo riparte a ritroso tornando allo *stadio 1*, e così via per diverse volte durante la notte.

Nel primo *stadio 1*, quello iniziale, non vi è alcuna attività elettromiografica od elettrooculomotoria di rilievo. Al contrario, dopo il primo ciclo di sonno e poco prima dell'inizio dei successivi *stadi 1*, il sonno cambia aspetto: la muscolatura assiale perde il suo tono (atonia muscolare) e viene registrata attività REM che si sovrappone ai movimenti oculari oscillanti (Dement e Kleitman, 1957). Questo tipo di sonno che costituisce circa il 25% del sonno

totale è definito sonno REM, o desincronizzato, o paradosso. Le caratteristiche distintive di questo stadio di sonno sono (Pinel, 2000):

- il tracciato EEG mostra onde di elevata frequenza e bassa ampiezza;
- in molte strutture cerebrali il consumo d'ossigeno, il flusso sanguigno e l'attività elettrica aumentano e raggiungono i livelli osservati durante lo stato di veglia;
- alcune attività del SNA come la pressione arteriosa, il polso e la respirazione, sono incrementate;
- spesso si osservano contrazioni improvvise della muscolatura distale ed un certo grado di erezione clitoridea o peniena.

Le fasi del sonno ad onde lente e del sonno desincronizzato, come detto precedentemente, si alternano ciclicamente durante il periodo di sonno.

1.2 STRUTTURE NEURALI E CORRELATI BIOCHIMICI DEL SONNO

1.2.1 I principali centri nervosi del sonno

Fu il neurofisiologo italiano Moruzzi a descrivere la neurobiologia del tronco encefalico, partendo dall'osservazione che compromissioni di questa zona determinavano sonno o coma. Egli osservò che la lesione delle strutture che stanno nella parte mediana del tronco cerebrale provoca stati simili al sonno NREM, mentre la stimolazione elettrica del tegmento mediale all'interno della Formazione Reticolare (FR) causa la desincronizzazione del tracciato EEG con un andamento simile a quello della veglia. La FR situata nel tronco encefalico venne in seguito a queste evidenze definita *sistema reticolare ascendente attivante* (Bear e coll., 2002).

La FR che si trova nella parte ventromediale del tronco encefalico si estende dal bulbo al mesencefalo e comunica con le zone corticali tramite vie ascendenti (*sistema reticolare ascendente*, ARAS), mentre è collegata con il midollo spinale tramite vie discendenti (*sistema reticolare discendente* DRAS). Furono proprio le ricerche sul *sistema reticolare ascendente attivante* che permisero di definire il sonno come un fenomeno attivo e associato all'inibizione di questo sistema da parte di aree che si trovano nella zona sottocorticale: l'area ipotalamica e l'area pontina-bulbare (Birbaumer, 1996).

Jouvet e Galzigna (1996) descrissero puntualmente le aree della FR e la loro specificità funzionale: la FR Mesencefalica e Rostropontina compiono un'azione desincronizzante sull'EEG, mentre la FR Caudopontina e Bulbare compiono un'azione sincronizzante sul tracciato EEG.

Le aree deputate all'induzione e al mantenimento del sonno desincronizzato-REM, sono strutture troncoencefaliche, fra cui il *nucleus reticularis pontinis*

oralis e altre regioni reticolari del tegmento pontino (gigantocellulare, magnocellulare, parvocellulare) (Berlucchi, 2000). Sembra che ognuna di queste aree sia deputata a gestire singole componenti del sonno desincronizzato (Siegel, 1983; Vertes, 1983). La coordinazione dell'attività delle aree della FR caudale è invece regolata da *network* neuronali, che si trovano nella parte colinergica pontina della FR.

Il *locus coeruleus* e i *nuclei dorsali del rafe* sono invece due zone che si trovano nella FR caudale e sembrano avere il compito di inibire il sonno REM, i loro neuroni sono attivi durante il sonno sincronizzato e inattivi durante il sonno REM (Lydic e coll., 1983).

Neuroni che risultano importanti per il mantenimento della veglia sono i neuroni istaminergici ipotalamici del nucleo *tuberomammillare* che proiettano a quasi tutto il sistema nervoso centrale (Mascetti, 2009).

1.2.2 Correlati biochimici del sonno

I così detti *sistemi di neurotrasmettitori modulatori diffusi* comprendono la maggior parte dei neuroni deputati al controllo sia dello stato di sonno che dello stato di veglia. I *neuroni modulatori noradrenergici* e *serotoninergici* sono attivi durante la veglia attivando e mantenendo questo stato, mentre i *neuroni modulatori acetilcolinergici* sono coinvolti sia nel mantenimento della veglia che nell'incremento degli eventi elettrici associati al sonno REM. I *sistemi modulatori diffusi ascendenti* gestiscono anche l'andamento ritmico delle scariche talamiche e di conseguenza sono coinvolti nella produzione delle scariche elettriche prodotte dalle popolazioni neuronali registrate successivamente dall'EEG sulla corteccia cerebrale. Anche i *sistemi modulatori diffusi discendenti* sono implicati nel sonno, soprattutto per quanto riguarda l'inibizione dell'attività dei motoneuroni.

Durante il periodo di sonno sincronizzato (*stadio 1, 2, 3 e 4*), si osserva una generale diminuzione della frequenza di scarica dei *sistemi modulatori diffusi* che utilizzano noradrenalina (NA) e serotonina (5-idrossi-triptamina o 5-HT) mentre alcuni neuroni colinergici (che utilizzano acetilcolina o ACh) del proencefalo basale, nonostante sembrino maggiormente coinvolti nella gestione dello stato di veglia, aumentano la scarica con l'inizio del sonno NREM. Il controllo del sonno REM è gestito da *sistemi modulatori diffusi* che si trovano a livello del tronco encefalico e nello specifico nel ponte. La frequenza di scarica dei due fondamentali sistemi del tronco encefalico superiore, il *locus coeruleus* e i *nuclei del rafe*, diminuisce fino quasi a cessare con l'inizio del sonno paradosso, contemporaneamente, si registra un aumento di scarica dei neuroni acetilcolinergici del ponte. Sembra proprio che siano i neuroni colinergici ad indurre il sonno paradosso e che sia l'azione dell'ACh a determinare, durante il sonno REM, attività talamiche e corticali molto simili a quello della veglia (Bear e coll., 2002).

1.2.3 I ritmi circadiani e il ciclo sonno-veglia

Il ciclo sonno-veglia, è normalmente sincronizzato al ciclo luce-buio o giorno-notte e può essere modificato da numerosi indicatori ambientali. Come osservato negli esperimenti di Aschoff e Wever alla verso la metà del ventesimo secolo, il ciclo sonno veglia in assenza del periodo luce-buio e di altri indicatori ambientali sembra stabilizzarsi nell'uomo intorno alle 25-26 ore circa, tuttavia, dopo alcune settimane questo ciclo si dilata fino a 30-36 ore (Bobbo, 2009) per poi iniziare ad essere costante e persistente. Questi dati hanno fatto pensare ad un possibile meccanismi endogeno di temporizzazione del ciclo sonno-veglia (Pinel, 2000).

Le ricerche volte a determinare le strutture deputate alla gestione di questo *orologio circadiano* endogeno hanno portato all'identificazione nell'ipotalamo anteriore dei nuclei soprachiasmatici o NSC come strutture deputate alla gestione del ciclo sonno-veglia. A queste strutture arrivano gli stimoli luminosi portati dai tratti retino-ipotalamici che si distaccano dal chiasma ottico e che sopprimono il rilascio di *melatonina*, un ormone serotonino-simile prodotto dall'epifisi e con funzione ipnoinducente. Recentemente è stato scoperto che un ruolo fondamentale, per quanto riguarda l'informazione luminosa che dagli occhi arriva ai NSC, è ricoperto da alcune cellule gangliari della retina che rilasciano *melanopsina*, una proteina coinvolta nel riconoscimento della luce (Bobbo, 2009). I NSC sono inoltre coinvolti nella gestione della secrezione di ormoni surrenalici e controllano di riflesso pressoché tutti i tipi di ritmi circadiani, compreso il ciclo sonno-veglia (Rusak e Zucker, 1979; Rosenzweig e coll., 2001). Oltre all'*orologio circadiano* endogeno costituito dai NSC, altri fattori intervengono nella regolazione dei ritmi circadiani: i “*datatori di tempo*” o “*Zeitgeber*”. Si tratta di svariati elementi, tra i quali: il ritmo luce-buio, che può subire modificazioni e alterazioni e di conseguenza influenzare i NSC, ma i fattori ambientali e istanze sociali. E' da tener presente che molte attività fisiologiche e comportamentali sono distinte in cicli di base attività-riposo (BRAC = *Basic Rest Activity Cycle*) inferiori alle 24 ore (ciclo ultradiano), alcune di queste attività sono: la temperatura corporea, l'alimentazione, la pressione arteriosa e la percezione del dolore nonché funzioni cognitive quali memoria, attenzione e calcolo mentale (Stegagno e coll., 1996).

1.3 LE POSSIBILI FUNZIONI DEL SONNO

1.3.1 Ipotesi adattive e ipotesi ristorative

A tutt'oggi sono numerose le branche della ricerca scientifica che indagano le funzioni del sonno. Le ricerche vagliano in modo capillare il coinvolgimento del sonno in processi metabolici e di rilascio ormonale, in processi biochimici e di sintesi genetica, in processi comportamentali e cognitivi. A livello più generale il sonno è stato considerato essere associato a meccanismi principalmente di tipo adattivo da un lato e ristorativi dall'altro.

I sostenitori delle ipotesi dell'*adattamento* considerano il sonno come un prodotto dell'interazione tra individuo e ambiente e attribuiscono al sonno la funzione principale di allontanare l'organismo dalle pressioni ambientali negative (predazione, temperature rigide, pericoli ambientali, ecc.) (Bear e coll., 2002). Questa ipotesi vede il sonno come un comportamento vantaggioso ai fini della sopravvivenza, favorito dalla pressione evolutiva ed associato ai rapporti specie-specifici predatore-preda (Bobbo, 2009). Questo meccanismo adattivo nell'uomo e in molte altre specie viventi avrebbe luogo durante la notte, in quanto l'organismo non avrebbe sufficienti risorse adattive per far fronte ai pericoli causati dall'oscurità. In altre specie di animali il sonno avverrebbe durante il giorno, in quanto il loro organismo avrebbe sviluppato soluzioni adattive migliori per la sopravvivenza al buio.

I sostenitori delle ipotesi *riсторative*, considerano come funzione principale del sonno quella del recupero e del riposo successivo all'attività di veglia. Horne (1988) attribuisce al sonno la funzione di apportare sufficiente ristoro all'organismo per permettere all'individuo di affrontare le attività della veglia, mentre Mancina (1993) sottolinea come, dopo periodi di sforzo aumenti la necessità di dormire. Tononi e Cirelli (2003; 2006) in una recentissima teoria,

attribuiscono al sonno, e nello specifico al sonno ad onde lente, un particolare meccanismo di recupero associato al *downscaling* delle sinapsi. All'interno di questo filone di pensiero possiamo annoverare anche l'ipotesi che vede il sonno come un'attività che consente all'organismo di risparmiare energia. Questo meccanismo sembra essere evidente soprattutto per i piccoli mammiferi che impiegano la maggior parte della veglia nella ricerca di cibo (Hobson, 1989). Le implicazioni che il sonno ha con le attività termoregolative sono più volte state osservate in laboratorio già nello scorso decennio (McGynti e Szimusiak, 1990; Berger e Philips, 1995). Gulia e collaboratori (2005) descrivono come nei ratti, a seconda della temperatura ambientale, i recettori centrali del calore possono causare modificazioni della quantità di sonno. Dewasmes e collaboratori (2003) hanno dimostrato come nel ratto il SWS sia correlato con la produzione di un particolare tessuto adiposo utile per contrastare la dispersione del calore. Un altro studio (Minet-Ringuet e coll., 2005) sottolinea la relazione esistente tra la quantità e la qualità di sonno e i processi metabolici che gestiscono la massa corporea grassa periferica nel ratto. Alla luce delle numerose evidenze scientifiche, suffragate dalla correlazione positiva nella scala filogenetica tra lunghezza del sonno e tasso metabolico (che vedremo nel capitolo successivo) sembra essere presente uno stretto legame tra sonno e meccanismi termoregolativi nella maggior parte dei mammiferi studiati (McGinty e Szymusiak, 2003).

Borbely (1982) ha proposto una delle ipotesi più brillanti e puntuali, chiamata "teoria dei due processi", al fine di spiegare la funzionalità del sonno. Quest'ipotesi sembra permettere di integrare sia la teoria del recupero che la teoria adattiva. Il *processo omeostatico* o *processo S* svolgerebbe funzioni omeostatiche e regolerebbe le fasi del sonno attraverso fattori umorali, nervosi, genetici e psicologici. Questo processo dipenderebbe direttamente

dalla veglia e dalle attività svolte durante questo periodo, la pressione del sonno aumenterebbe durante la veglia per poi diminuire durante la successiva fase di sonno fino a scomparire nel momento del risveglio. Il secondo processo, definito *processo circadiano* o *processo C*, modulerebbe la soglia del risveglio in base al ritmo luce-buio e agli altri possibili ritmi ai quali l'organismo sarebbe sottoposto. In quest'ottica, quando il *processo S* diminuisce e raggiunge il livello del *processo C*, il sonno termina. Quest'ipotesi sembra quindi poter comprendere e spiegare la pressione al sonno prodotta dalle attività svolte durante la veglia e la pressione al sonno causata dall'alternanza circadiana dei periodi di luce-buio, possibilmente associati a livello adattivo alla diminuzione della pressione ambientale negativa.

1.3.2 Sonno e funzioni cognitive: i rapporti tra sonno e memoria

Risultati provenienti dalle neuroscienze cognitive sottolineano il possibile ruolo attivo del sonno nei processi di consolidamento *off-line* della traccia mnestica. Sono numerose le evidenze presenti in letteratura scientifica che sembrano associare il sonno ai processi di consolidamento della memoria. Roffwarg e collaboratori già nel 1975 hanno evidenziato come durante il sonno REM la produzione di acido ribonucleico (RNA) fosse aumentata. L'RNA ha tra le sue funzioni anche quella di sintetizzare le proteine di membrana neuronale, in particolare le proteine facenti parte dei siti recettoriali dell'N-metil-D-asparato della membrana neuronale (NMDA). È noto come proprio i siti recettoriali dell'NMDA sono notevolmente presenti nei circuiti cerebrali adibiti al consolidamento della memoria a lungo termine. Rottenberg (1992) ha descritto come nei ratti, a seguito di sessioni di apprendimento, si osserva un aumento del sonno REM mentre Stone e collaboratori (1992), a

seguito di somministrazione nei ratti di una sostanza chimica antagonista dei recettori NMDA (coinvolti nei meccanismi plasticità neuronale), hanno osservato che sia il sonno NREM che il sonno REM aumentavano dopo la somministrazione. Karni e collaboratori (1994), mentre addestravano alcuni soggetti a compiti di discriminazione di orientamento di linee, hanno osservato che la prestazione al compito migliorava notevolmente la mattina successiva, dopo una notte di sonno; sottoposero allora i soggetti a deprivazione selettiva di SWS o di sonno REM. I soggetti deprivati di sonno NREM mantenevano inalterati i loro margini di miglioramento, mentre quelli che subivano una deprivazione selettiva di sonno REM non miglioravano le loro prestazioni. Karni e collaboratori (1994) ipotizzarono che il sonno REM fosse quindi coinvolto nel processo di consolidamento di tale compito (Bear e coll., 2002). Kim e collaboratori (2005) hanno studiato l'attività dell'area CA1 (coinvolta nel potenziamento a lungo termine della memoria) nell'ippocampo dei ratti. I risultati del loro lavoro mostrano come la funzionalità di quest'area si riduca se gli animali vengono sottoposti a deprivazione di sonno REM. Hobson (1989) propone un'ipotesi secondo la quale il processo di apprendimento delle informazioni accumulate durante la veglia è possibile grazie all'aumento del numero di sinapsi di particolari cellule cerebrali (chiamate *hot spot*), deputate all'elaborazione di tali informazioni. L'incremento delle sinapsi delle *hot spot*, sarebbe incrementato dalla continua riattivazione dei medesimi circuiti durante il sonno REM. Bennington (2000), inoltre, sottolinea che una funzione del sonno REM sarebbe quella di rimuovere gli elementi non più necessari dalla memoria. Molte evidenze sono state portate anche relativamente al coinvolgimento del sonno NREM e, nello specifico, dell'attività ad onde lente nei processi di apprendimento. Nel ratto è stato osservato come la riattivazione *post-training* in compiti di tipo spaziale delle cellule ippocampali definite

“*place cells*” (cellule di posizione) durante il sonno NREM sia coinvolta nel consolidamento della traccia mnestica relativa al compito stesso (Sutherland e McNaughton, 2000). Nell’uomo la codifica di informazioni spaziali in compiti di apprendimento di percorso coinvolge substrati neuroanatomici simili a quelli delineati nel ratto (Brugess e coll., 2002) e nello specifico i lobi temporali mediali bilateralmente e durante il NREM è stata osservata una riattivazione di queste strutture ippocampali che sembra migliorare la prestazione al compito il giorno successivo (Peigneux e coll., 2004; Ferrara e coll., 2006). Recentemente, Tononi e Cirelli (2006) hanno avanzato un’ipotesi volta a delucidare i possibili meccanismi sinaptici alla base di tali processi. Secondo gli autori una delle principali funzioni del sonno sarebbe quella di operare un *downscaling* dei pesi sinaptici nella corteccia cerebrale. I numerosi risultati proposti da Tononi e Cirelli (2003; 2006) mostrano come i processi di apprendimento, di potenziamento a lungo termine (LTP) e di plasticità neuronale portino ad un aumento delle forza delle connessioni sinaptiche intracorticali in particolari *network* neuronali durante la veglia e come questa forza di connessione sinaptica diminuisca durante il sonno a onde lente per riportare il sistema ad uno stato ottimale.

L’idea che il sonno in qualche modo sia promotore di processi di consolidamento della memoria è assolutamente affascinante ma, benchè siano molti i dati in letteratura, risulta poco chiaro quale sia il tipo di memoria effettivamente riceve benefici dal sonno e anche quale stadio del sonno sia coinvolto in questi processi.

1.3.3 Sonno, rilascio ormonale e sistema immunitario

Kreuger e collaboratori (1999), sostengono che il sonno permetta l’accumulo di neurotrasmettitori e di altre sostanze (il glicogeno, per esempio) che verranno utilizzate poi durante tutto il periodo della veglia. Questo

spiegherebbe perché, dopo un breve periodo di sonno, lo stato d'allerta e le capacità cognitive sembrano migliorare. Adam e Oswal (1977) dimostrano che durante il SWS, si presenta un aumento dei processi anabolici di sintesi proteica, mitosi e crescita tessutale. Pressman e Orr (1997) sostengono che il sonno sia l'unica condizione fisiologica durante la quale il corpo possa rilasciare l'ormone della crescita (GH), promuovendo, in questo modo, la crescita dei tessuti dell'intero organismo. Anche il sistema immunitario sembra essere in relazione con il sonno. Alcuni autori hanno osservato come durante il sonno vi siano delle modificazioni della funzione immunitaria. Durante il sonno sembrerebbe esserci un aumento della concentrazione plasmatica dell'interleuchina 1 (IL-1) e dell'interleuchina 2 (IL-2), mentre diminuisce l'attività dei Linfociti T killer e dei Linfociti B. Studi condotti utilizzando il paradigma sperimentale della deprivazione di sonno hanno però dato risultati contrastanti relativamente alla concentrazione sia delle IL-1 e IL-2 che dei linfociti. Questo dato poco chiaro sembrerebbe essere associato al fatto che la deprivazione di sonno sia di per sé un fatto stressante e quindi gli effetti sul sistema immunitario potrebbero essere mediati dallo stress stesso e non dalla perdita del sonno (Mascetti, 1997; Mascetti, 2009).

Capitolo II

IL SONNO NEI MAMMIFERI E NEGLI UCCELLI

2.1 IL SONNO E LA SUA POSSIBILE EVOLUZIONE FILOGENETICA

2.1.1 Studi sul sonno e ipotesi di sviluppo filogenetico

La maggior parte delle specie appartenenti al regno animale divide la propria vita in due fondamentali stati: l'attività e il riposo. Questi stati rispondono a esigenze differenti legate alla sopravvivenza e si manifestano con peculiarità differenti: cicli circadiani, dove il riposo viene distribuito in una particolare parte della giornata (durante il giorno o durante la notte) oppure cicli stagionali, come ad esempio il periodo del letargo. Proprio grazie alla quasi totale onnipresenza del fenomeno sonno è stato possibile effettuare confronti, sia sul piano comportamentale che sul piano elettrofisiologico, tra una vasta varietà di mammiferi, uccelli, rettili e anfibi. Tali indagini hanno fornito interessanti dati riguardo all'origine e all'evoluzione del sonno (Campbell e Tobler, 1984).

Così come alcune caratteristiche comportamentali del sonno sono specie-specifiche, anche le caratteristiche qualitative degli indici elettrofisiologici assumono forme assai diverse tra le varie specie. Nei vertebrati possiamo distinguere tre tipi di sonno:

- sonno comportamentale: l'animale è in uno stato di inattività e assume una posizione stereotipata; gli indici fisiologici tendono ad abbassarsi d'intensità e l'elettroencefalogramma (EEG) è simile a quello della veglia, ma sia la frequenza che l'ampiezza si riducono;

- sonno ad onde lente: l'animale è addormentato, alivello elettroencefalografico si osserva la presenza dei fusi del sonno (raffiche fasiche d'onde ad andamento crescente e decrescente della durata di 1-2 sec). I muscoli sono parzialmente rilassati, la soglia di risveglio è inversamente proporzionale alla frequenza dell'onda. Nell'uomo sono stati identificati quattro stadi d'onde lente (cfr. Capitolo I).

- sonno REM (*Rapid Eyes Movements*): come illustrato nel capitolo precedente deve il suo nome agli studiosi Dement e Kleitman (1957) che registrarono movimenti oculari rapidi, associati ad onde a basso voltaggio e alta frequenza simili a quelle della veglia. E' stato anche definito "sonno paradosso" proprio per la presenza di un EEG di veglia in un corpo pressoché addormentato. In questo stadio si registra una completa atonia muscolare, tranne che per i muscoli respiratori, per quelli deputati al movimento oculare e per quelli che controllano gli ossicini dell'orecchio medio.

Allyson e collaboratori (1968; 1972) per primi analizzarono il sonno dell'echidna (*Tachyglossus acculeatus*), un mammifero primitivo monotremo¹. Questo mammifero presenta lunghi periodi di SWS, ma non presenta il sonno REM. Le prime ipotesi che questo studio produsse, affermavano che la comparsa del sonno REM potesse essere posteriore al sonno ad onde lente il quale aveva origini più antiche. Di recente è arrivata la dimostrazione che il sonno REM è presente anche nell'echidna (Berger e Phillips, 1995; Nicol e coll., 2000) e in un altro mammifero monotremo: l'ornitorinco (*Ornitorryncus antinus*) (Siegel e coll., 1999). Il sonno REM ed il sonno ad onde lente sono stati riscontrati inoltre negli antichi mammiferi marsupiali² (come ad esempio

¹ I monotremi sono mammiferi primitivi che depongono uova.

² I marsupiali sono mammiferi che nascono ad uno stadio di sviluppo molto precoce e passano un periodo del loro sviluppo all'esterno del corpo della madre, in un marsupio.

nell'opossum) e, come ormai noto, nei più recenti mammiferi placentati³, dei quali fa parte anche l'essere umano.

Una considerazione a parte riguarda i mammiferi marini, in quanto l'ambiente marino impone strategie di adattamento del tutto particolari a esseri che sono legati all'ossigeno nella sua forma gassosa. Il delfino dell'Amazzonia (*Inia geoffrensis*), un tipo di mammifero marino, non presenta il quadro caratteristico del sonno REM; questo probabilmente è dovuto al fatto che i delfini per respirare devono continuamente emergere in superficie in quanto dotati di polmoni e non di branchie, di conseguenza l'immobilizzazione motoria tipica del sonno paradossale potrebbe essere particolarmente dannosa. Il sonno ad onde lente nel delfino è conservato, grazie alla possibilità di questi animali di dormire con un singolo emisfero mentre l'altro rimane sveglio: questo particolare tipo di sonno è stato definito sonno uniemisferico. Durante il sonno uniemisferico gli emisferi cerebrali non funzionano in modo identico ma l'attività elettrica che si registra nei due emisferi rispecchia due stati altamente antagonisti: la veglia ed il sonno. Questa abilità di regolare gli stati d'attivazione dei due emisferi, e quindi anche la funzionalità di ciascun emisfero, permette la possibilità di dormire e contemporaneamente di interagire e muoversi nell'ambiente (Mukhametov, 1984).

Negli uccelli sono presenti sia il sonno desincronizzato sia il sonno ad onde lente e nella maggior parte delle specie, è stato registrato il sonno uniemisferico di cui già accennato nel paragrafo precedente e che verrà ampiamente trattato in seguito (Goodman e Schein, 1974).

Grazie alle evidenze osservate, il sonno REM e il sonno NREM sono stati considerati essere entrambi molto antichi e presenti in un progenitore comune agli uccelli e ai mammiferi (Nicolau e coll., 2000). A supporto di questa tesi,

³ I placentati sono mammiferi che completano il loro sviluppo embrionale all'interno del corpo della madre.

Young (1981) sostiene che, all'interno del *subphylum* dei vertebrati, la classe dei mammiferi che discende dall'ordine dei *therapsida* e le classi degli uccelli e dei rettili che discendono dall'ordine dei *theodontia*, abbiano entrambe come antenati comuni gli appartenenti all'ordine dei *cotylosauria*.

Una tesi interessante è stata avanzata grazie agli studi sui rettili di Walker e Berger (1980), i quali sostengono che nei rettili sia presente il sonno REM, ma assente il sonno NREM perché quest'ultimo si sarebbe evoluto parallelamente alla caratteristica del sangue caldo (omotermia), e quindi alla necessità di regolare il metabolismo corporeo conservare energia. Hartse e Rechtschaffen nel 1980 hanno in parte confutato questa ipotesi, registrando nelle punte delle zone libiche dei rettili un tracciato EEG simile a quello del sonno ad onde lente.

2.2 IL SONNO NEI MAMMIFERI

2.2.1 Lo studio trasversale del sonno tra le varie specie di mammiferi: livelli d'indagine e variabili specie-specifiche

Nei mammiferi non umani, gli indici elettrofisiologici e gli stadi del sonno, sono pressoché simili a quelli dell'uomo (stato di veglia, sonno REM, sonno SWS), con alcune differenze specie-specifiche. L'University of Michigan Museum of Zoology (2007), ha dichiarato che sono state catalogate più di circa 4.260 specie di mammiferi ma la maggior parte degli studi sul sonno condotti su mammiferi hanno preso in considerazione principalmente quelle specie definite domestiche tra cui: topi, ratti, cani, gatti e primati non umani e i dati raccolti scientifici raccolti sulle varie specie rappresentano non più del 3 % del totale delle specie. La difficoltà nell'utilizzare una medesima tecnica di indagine per lo studio di specie spesso molto diverse, ha condotto all'individuazione di un approccio allo studio del sonno a livello longitudinale che tenga in considerazione diversi livelli d'analisi sia sul piano comportamentale che elettrofisiologico.

Horne, nel 1993, all'interno della sua trattazione sul sonno, distingue a livello concettuale due diversi tipi di sonno nei mammiferi: il sonno nucleare, che sembrerebbe essere irrinunciabile e il sonno opzionale, che invece potrebbe essere ridotto senza procurare particolari disagi. Nello specifico:

- il sonno nucleare; sarebbe costituito essenzialmente da SWS e solo in parte dal sonno REM. Secondo Horne non è possibile rinunciare a questo tipo di sonno in quanto, anche se non è stato ancora rigorosamente dimostrato, sembra che il *sonno nucleare* sia importante per la reintegrazione cerebrale;
- il sonno opzionale; si osserverebbe in quei mammiferi che dormendo in luoghi sicuri hanno una quantità supplementare di sonno. Il *sonno opzionale*

occupa le ore improduttive della giornata e consente agli animali di risparmiare energia.

Ruckebush nel 1977 ha definito “*sonno di lusso*” quella quantità di sonno in eccedenza osservata negli animali d’allevamento che hanno la possibilità di riposare nella stalla piuttosto che all’esterno (Horne, 1993).

I dati quantitativi e qualitativi raccolti per lo studio del sonno nei mammiferi riguardano la durata complessiva e la qualità del sonno REM e NREM, e vengono principalmente confrontati con altre variabili registrate, suddivisibili in:

- variabili costituzionali: che comprendono peso corporeo, metabolismo, peso cerebrale, durata della vita, ecc;
- variabili riguardanti la sicurezza del sonno: che comprendono i differenti rischi che l’animale può correre durante il sonno, il luogo dove l’animale dorme, ecc.

Gli studi correlativi tra queste variabili specie-specifiche e la quantità e la qualità del sonno REM e NREM hanno permesso di fare maggiore chiarezza sulle teorie proposte e principalmente accettate per quanto riguarda la funzionalità del sonno.

2.2.2 Studi correlativi tra il sonno e le variabili costituzionali e comportamentali nei mammiferi

I primi studi correlativi iniziano con il lavoro di Zepelin e Rechtschaffen (1974). Gli autori hanno analizzato 53 specie di mammiferi, appartenenti a 12 ordini e 33 famiglie differenti, utilizzando come misure del sonno la quantità di sonno totale, il sonno REM, il sonno NREM, la percentuale di sonno REM e la distanza temporale mostrata tra due episodi di sonno REM. I dati raccolti sono stati confrontati con alcune variabili costituzionali: la durata della vita, il

metabolismo e il peso cerebrale. L'analisi dei dati ha mostrato i seguenti risultati:

- correlazione positiva tra durata complessiva del sonno e metabolismo. Più piccole sono le dimensioni dell'animale, maggiore è il periodo di sonno totale;

- correlazione negativa tra durata totale del sonno e la durata della vita. Maggiore è la quantità totale del sonno, minore è la lunghezza della vita.

Analisi successive hanno però avanzato l'ipotesi che sia la durata del sonno che la durata della vita potrebbero dipendere in modo svincolato dal metabolismo;

- correlazione negativa tra peso cerebrale e durata totale del sonno, cioè maggior peso cerebrale, minore durata di sonno;

- correlazione positiva tra peso cerebrale e durata singola dell'episodio di sonno, quindi maggiore peso cerebrale, maggiore durata dell'episodio di sonno;

- le correlazioni analizzate tra sonno totale e sonno REM hanno mostrato che, con l'aumentare della quantità di sonno totale, aumenta anche il sonno REM.

In tutte le precedenti osservazioni sembra che la variabile metabolismo giochi un ruolo rilevante nella distribuzione del sonno REM e NREM, ma soprattutto sul totale del tempo speso dormendo.

Allison e Cicchetti (1976), hanno analizzato 39 specie di mammiferi e hanno utilizzato come misure del sonno la quantità di sonno REM e la quantità di sonno NREM. I dati raccolti sono stati confrontati sia con variabili costituzionali (peso corporeo, peso cerebrale, durata della vita), che con variabili riguardanti la sicurezza percepita durante il sonno (probabilità per ogni specie di essere vittima di predatori, sicurezza del luogo in cui l'animale dorme, pericolo globale dato dalla somma delle due precedenti). Di seguito i principali risultati emersi:

- le dimensioni corporee influenzano maggiormente il sonno NREM piuttosto che il sonno REM e a maggiori dimensioni corporee, corrispondono minori quantità sia di REM che di NREM;
- l'aumento del pericolo globale percepito influenza più il sonno REM piuttosto che il sonno NREM. All'aumentare del pericolo però diminuiscono entrambe le quantità di sonno.

Anche in quest'ultimo studio sembra confermata la relazione tra durata del sonno e metabolismo e, di conseguenza, risparmio energetico, ma viene anche indagata un'ulteriore dimensione che riguarda la sicurezza dell'ambiente nel quale viene attuato il sonno. Come risulta evidente questa variabile deve essere assolutamente controllata per compiere studi scientifici in ambito ecologico in modo puntuale e rigoroso.

Meddis nel 1983 ha compiuto un ulteriore studio su 65 specie differenti di mammiferi. In questa lavoro oltre ad avere utilizzato la maggior parte delle variabili citate precedentemente, ha inserito:

- la stima della grandezza cerebrale definita "encefalizzazione";
- il tipo di alimentazione adottata dall'animale: erbivoro o carnivoro;
- la maturità cerebrale alla nascita.

Se dall'analisi tra sonno totale e peso corporeo vengono esclusi gli erbivori, la correlazione dimostrata negli studi precedenti scompare. Per quanto riguarda il sonno REM, questo sembra essere correlato negativamente con la maturità cerebrale alla nascita: maggiore è quest'ultima minore è la quantità di sonno REM. Infine, quando sono state combinate le variabili maturità cerebrale e ciclo di sonno REM-NREM, la correlazione positiva con il ciclo del sonno REM e NREM raggiunge livelli altissimi (Horne, 1993).

Vista la possibile trasversalità inter-specie delle implicazioni tra sonno e metabolismo, Siegel (2003), propone una spiegazione del perché il sonno sia

particolarmente coinvolto nei processi anabolici e catabolici. Il metabolismo, essendo un processo che genera radicali liberi e quindi contribuisce alla morte cellulare, ha bisogno di essere controbilanciato; per questo motivo, secondo Siegel, il sonno NREM assolverebbe alla funzione di ridurre il metabolismo e quindi la temperatura corporea e di conseguenza il dispendio energetico.

La storia evolutiva che può essere desunta dai dati proposti fino a questo momento suggerisce che il sonno dei mammiferi si sia in qualche modo sviluppato di pari passo con lo sviluppo dell'endotermia così come uno sviluppo simile può essere osservato negli uccelli. Non di meno i dati relativi agli studi correlativi con la variabile massa corporea hanno evidenziato come organismi con massa corporea minore abbiano un maggior dispendio di energia e in parallelo mostrino una minor quantità di sonno. Sembra essere evidente anche la correlazione negativa tra sonno REM e maturazione cerebrale; questo dato ha spinto i ricercatori ad ipotizzare una stretta relazione tra meccanismi di sviluppo cerebrale e sonno paradossale. Risulta ad oggi invece poco chiara e difficilmente spiegabile la forte correlazione positiva tra peso cerebrale e lunghezza del ciclo sonno REM-NREM.

2.2.3 Il sonno nei mammiferi marini

Alcuni mammiferi che risultano essere particolarmente evoluti dal punto di vista cerebrale, come le balene e i delfini appartenenti alla specie dei *Cetacei*, benchè necessitino di rimanere vigili e attivi per salire regolarmente in superficie a respirare, in quanto muniti di polmoni e non di branchie, mostrano periodi di sonno nonostante questa attività possa essere per loro pericolosa per la vita.

Il delfino dell'Indo (*Platanista indi*) studiato da Pilleri nel 1979 è un esempio di come i mammiferi marini abbiano sviluppato strategie comportamentali per conservare il sonno. Questo animale vive nelle acque fangose del fiume Indo, per questo motivo ha perso l'uso degli occhi ma si orienta nel suo ambiente utilizzando un sistema ecogoniometrico (abilità di orientamento basata sulla produzione e successiva ricezione di ultrasuoni). Anche se gli autori non disposero di registrazioni EGG, osservarono chiaramente come questi animali nuotavano continuamente emettendo suoni e ultrasuoni intercorsi da brevi pause di 40-60 secondi. Tali pause sono state associate a brevi periodi di inattività simile al sonno e definite “*microsonni*”; la loro somma nell'arco delle ventiquattro ore è di sette ore, un tempo paragonabile alle ore di sonno di molti mammiferi.

I mammiferi marini, come descritto precedentemente, hanno sviluppato un comportamento adattivo che risulta essere un compromesso tra la necessità di rimanere svegli e la necessità di dormire; questo particolare stato è noto con il nome di “sonno uniemisferico” (*Unihemispheric Slow Wave Sleep* o sonno monoculare uniemisferico Mo-Un) durante il quale un emisfero mostra un'attività EEG tipica della veglia, mentre l'altro emisfero mostra un tracciato EEG caratteristico del sonno a onde lente (Mukhametov, 1984).

La prima osservazione comportamentale dell'esistenza del sonno uniemisferico nei delfini (*Tursiops truncatus*) è dovuta a Lilly (1964), che osservò come questi animali non chiudessero mai contemporaneamente gli occhi, ma alternassero la chiusura di uno o dell'altro occhio; questo comportamento fu attribuito al fatto che l'animale, per far fronte alle pressioni ambientali, non si riposasse mai con entrambi gli emisferi contemporaneamente al fine di mantenere un controllo attivo sulla propria respirazione.

Da un punto di vista elettroencefalografico, la prima registrazione del sonno uniemisferico è stata effettuata da Shurley e coll. (1969), in una balena pilota (*Globicephala scammoni*) di sesso femminile di quattro anni. L'attività elettrica registrata venne distinta in tre stadi:

- veglia attiva: 54 % del tempo sulle 24 ore,
- stato di allerta inattivo: 26% del tempo sulle 24 ore,
- sonno comportamentale: 22% del tempo sulle 24 ore.

In questo lavoro venne identificato il sonno REM (associato ad una marcata atonia muscolare) che si presenta una sola volta nel corso della notte, a distanza di circa 60 minuti dall'addormentamento ed ha una durata di circa 6 minuti. Uno dei dati più interessanti osservati durante le registrazioni notturne, sono stati osservati movimenti oculari indipendenti e i quadri EGG asimmetrici e asincroni fra i due emisferi.

Mukhametov (1984; 1987) ha studiato il sonno nel delfino detto “*dal naso a bottiglia*” (*Turpiops truncatus*), della focena (*Phocoena phocoena*) e del delfino dell'Amazzonia (*Inia geoffrensis*). Questi animali sono stati studiati in cattività in situazioni sperimentali. I risultati mostrano che essi dormono con un emisfero cerebrale alla volta, mentre l'altro rimane sveglio. Mukhametov e collaboratori (1992) hanno descritto due tipi di sonno in questi animali:

- il primo caratterizzato da attività *delta* di elevata ampiezza, identico allo stadio 4 di sonno dell'uomo;
- il secondo da attività *delta* di ampiezza minore, *theta* e con *fusi di sonno* che corrisponde ad una fase intermedia tra lo stadio 2 e 3 dell'uomo.

Occasionalmente questo tipo di sonno può essere presente in entrambi gli emisferi, ma il sonno del primo tipo con attività delta ad elevata ampiezza è stato riscontrato solo alternativamente in uno dei due emisferi.

In questi animali inoltre non è presente il sonno REM, in quanto questo tipo di sonno è associato alla paralisi generalizzata della muscolatura che impedirebbe il movimento e di conseguenza la risalita in superficie per la respirazione.

Mukhametov ha condotto studi anche su altri mammiferi marini come i Pinnipedi e i Sirenidi (Mukhametov, 1985). I Pinnipedi si dividono in: *Otariidae* e *Phocidae*. Le *Otariidae* comprendono quattro specie: *Callorhinus ursinus*, *Arctocephalus pusillus*, *Eumetopias iubatus*, *Otari bryonia*. Le prime due sono foche che vivono nei mari del nord, mentre le altre si riferiscono a leoni marini che abitano le acque di entrambi i poli. Tutte le specie presentano sonno Mo-Un. In *Callorhinus ursinus*, sono stati identificati i tre stati di attivazione descritti per il *Tursiops truncatus*, con la differenza che questa specie presenta anche sonno REM. Sono stati sottoposte ad osservazione comportamentale e a misurazioni elettrofisiologiche 12 foche di entrambi i sessi, di età compresa fra due mesi e 22 anni. I soggetti sono stati osservati in due condizioni sperimentali: a terra o in acqua, in quanto questi mammiferi vivono in entrambe le condizioni.

Questi pinnipedi trascorrono il 67.7% di 24 ore sveglio, il 23.3% in sonno ad onde lente ed il rimanente 7% in sonno REM. Il comportamento di riposo di queste foche offre varie possibilità, possono infatti dormire bilateralmente sia in fase REM che in fase ad onde lente, o dormire unilateralmente nel solo sonno a onde lente. La quantità di sonno uniemisferico aumenta passando da quando l'animale è a terra a quando l'animale si trova a dormire in acqua (Mukhametov, 1988). Il comportamento lateralizzato cresce con l'età, mentre la durata del sonno REM, come in molti mammiferi terrestri, diminuisce.

Osservazioni comportamentali condotte su *Arctocephalus pusillis* hanno identificato un'unica postura assunta durante il sonno Mo-Un nell'acqua, gli

animali galleggiano sulla schiena, con tre delle quattro pinne fuori dell'acqua mentre una delle due pinne anteriori, controlaterale all'emisfero sveglio, continua a pinnare. Le narici sono tenute costantemente fuori dell'acqua, permettendo il sonno e la respirazione (Lyamin e Chetyrbok, 1992). Quando però il soggetto entra in fase REM la pinna cessa la sua attività e la testa, narici comprese, si immerge completamente. Questo dato collima con il fatto che le foche spendono più tempo in sonno REM quando sono a terra (Lyamin e coll., 1996).

Episodi di desincronizzazione interemisferici durante il sonno sono stati registrati anche in *Eumetopias jubatus* e *Otari baronia* due specie di leoni marini. Anche questi animali nuotano costantemente durante il sonno, ciò permette loro di emergere per respirare e come i delfini non presentano sonno REM (Lyamin, 1994).

Nella famiglia delle *Phocidae*, contrariamente alla famiglia degli *Otariidae*, in tre specie su quattro (*Phoca caspia*, *Pagophilus groenlandicus* e *Mirunga angustirostris*) non è stato registrato sonno uniemisferico (Mukhametov, 1984; Lyamin e coll., 1993; Castellini e coll., 1994, Milsom e coll., 1996). Questi animali mostrano tracciati EEG sia ad onde lente che REM e ciò avviene sia quando si trovano sulla terra ferma che quando si trovano in mare. Il loro riposo è caratterizzato da completa immobilità e quando necessitano di respirare sono costretti a svegliarsi. L'ultima specie oggetto di studio è stata *Halichoerus grypus*, ma in questo caso sono stati raccolti insufficienti dati elettroencefalografici.

2.3 IL SONNO NEGLI UCCELLI

2.3.1 Correlati elettrofisiologici e aspetti comportamentali

Osservazioni ecologiche mostrano che a livello comportamentale gli uccelli adulti, durante il sonno, si posizionano immobili con gli occhi chiusi, spesso sopra sostegni, rami o pertiche, sistemando la testa sotto un'ala (Rogers, 1995).

Il quadro EEG di sonno negli uccelli è simile a quello dei mammiferi (Rogers, 1995). Le principali differenze si riscontrano sempre da un punto di vista comportamentale nella postura e nella posizione della testa, probabilmente a causa della differente attivazione e funzionalità dei muscoli del collo in queste specie. Le registrazioni dei tracciati EEG su molte specie tra le quali, polli, piccioni, gufi, aquile e falchi; hanno portato alla suddivisione del *continuum* veglia-sonno negli uccelli in differenti stati: (Goodman e Schein, 1974):

- stato di veglia: durante la veglia attiva, i comportamenti che si possono osservare attraverso le diverse specie sono molti e molto variabili. Il tracciato EEG rilevato nel piccione da diversi elettrodi, sulla superficie cerebrale, mostra onde predominanti di alta frequenza (circa 10 HZ) e bassa ampiezza (inferiori a 75 μ V), salvo alcune differenze emerse tra le varie specie osservate. Il tracciato EMG registrato nei muscoli del collo, mostra durante la veglia, alti livelli tonici con tipiche elevazioni fasiche quando subentra il movimento. L'attività registrata dall'EOG è praticamente sempre presente, anche quando le palpebre sono chiuse e sono assenti movimenti dei bulbi oculari. L'unica eccezione riguardo ai movimenti oculari durante la veglia proviene dal gufo, nel quale sono quasi completamente inesistenti. Il ritmo cardiaco è, in media, più elevato di quello registrato durante il sonno. La

temperatura cerebrale e il ritmo respiratorio sono altrettanto elevati e irregolari.

- stato di sonnolenza o ipotonico: da un punto di vista comportamentale, questo stato è caratterizzato da una postura rilassata, la testa può essere abbassata, i *blink* sono lenti. L'EEG del piccione presenta principalmente onde ad alta frequenza e basso voltaggio, intervallato da episodi con onde di bassa frequenza e alto voltaggio. Nel pollo sembra, invece, che le onde predominanti siano a bassa frequenza (6-12 Hz e 3-4 Hz) e alto voltaggio (200-300 μ V). Probabilmente queste differenze per quanto riguarda la presenza di SWS potrebbero essere dovute alla difficoltà nel definire lo stato di sonnolenza. I movimenti oculari e il tono muscolare del collo sono ridotti, ma non molto dissimili da quelli della veglia. Battito cardiaco, ritmo respiratorio e temperatura cerebrale diminuiscono rispetto alla veglia.

- stato di sonno NREM: l'inizio di questo stadio di sonno è diverso in base alle varie specie: i falconiformi e i polli, sono completamente immobili, con gli occhi chiusi e la testa abbassata che lentamente può essere posizionata sotto un'ala. I pulcini di pollo, possono dormire in svariate posizioni (Rogers, 1995). Nei gufi, la postura è simile agli altri uccelli, ma possono appoggiare una o tutte due le zampe, la testa è leggermente abbassata, ma gli occhi sono aperti e si chiudono solamente poco prima dell'inizio del sonno REM. Il piccione è altrettanto immobile su una o entrambe le zampe, il collo è ritirato verso il corpo, la testa è appoggiata sul rigonfiamento del corpo, gli occhi sono o continuamente chiusi o anche aperti con le palpebre che ritmano lentamente. Le registrazioni EEG durante il sonno NREM, sono simili in tutte le specie, predominano onde di bassa frequenza (1-4 Hz) e alto voltaggio (100-300 μ V). Solo nei falchi e nelle aquile, non c'è la presenza costante di onde lente. Le onde lente registrate sono di circa 3-4 Hz, ma durano pochi secondi e hanno

un'elevata ampiezza, circa 45 μ V. I movimenti oculari, in generale, sono assenti, ma a volte possono presentarsi apertura e chiusura degli occhi. L'EMG mostra decremento del tono muscolare e del battito cardiaco, il ritmo respiratorio e la temperatura cerebrale sono notevolmente ridotte rispetto alla veglia.

- stato di sonno REM: questo stato dura generalmente solo alcuni secondi e si succede varie volte durante tutto l'arco del sonno. Nel corso del sonno REM il corpo è completamente immobile e gli occhi sono chiusi. La testa è ancora più bassa di quanto è stato osservato durante il sonno NREM e spesso appoggiata a terra. Gli occhi possono essere aperti per brevissimi istanti e seguono l'abbassarsi della testa. Solo il gufo durante l'inizio del sonno REM non presenta movimenti della testa. Le registrazioni EEG passano da un quadro di sonno ad onde lente, ad un quadro di sonno composto da onde desincronizzate di alta frequenza e bassa ampiezza, simili a quelle della veglia. Nei falchi e nelle aquile, il passaggio da sonno REM a sonno NREM non è così netto, a causa della bassa ampiezza delle onde del SWS. In tutte le specie, eccetto nel gufo, le registrazioni EOG mostrano movimenti oculari congiunti o disgiunti, dovuti all'indipendenza anatomica dei due occhi negli uccelli. L'EMG mostra, in tutte le specie, una diminuita attività dei muscoli del collo, rispetto al sonno NREM. Solo nei falconiformi e nei polli, l'EMG evidenzia una completa inattività. Anche in questo caso i gufi, al contrario, non mostrano perdita del tono muscolare nel collo. Il ritmo cardiaco è aumentato e solo nei polli diminuisce. Il ritmo respiratorio è aumentato ma molto variabile, mentre la temperatura cerebrale non mostra variazioni.

Gli uccelli delle varie specie, tendono ad avere una soglia di attivazione piuttosto bassa durante tutti gli stati, sia durante la veglia che durante il sonno. Nel sonno NREM, la soglia di attivazione è più alta che nella veglia, mentre

nel sonno REM la soglia di attivazione raggiunge i livelli più elevati. Queste evidenze potrebbero far considerare il sonno REM come uno stato di sonno profondo o quantomeno più profondo del SWS.

2.3.2 Ritmo sonno veglia negli uccelli

Gli uccelli dormono, nell'arco delle 24 ore, con una media che va dal 59,5% del gufo al 40-50% nel piccione. Il sonno REM ricopre circa il 3-12% del sonno totale nel piccione; il 5.1% del sonno totale nel gufo, il 7-10% del sonno totale nei falchi e nelle aquile, e il 7.3% di sonno totale nei polli (Goodman e Schein, 1974).

Gli studi più puntuali e metodici sono stati condotti sul piccione, questo animale mostra una veglia di circa 10.9 minuti; un periodo di sonno NREM di 1.2 minuti e di sonno REM, 11 secondi. Il sonno REM si presenta con una frequenza media di 216 episodi in 24h, un episodio ogni 1.1 minuti circa..

Un'interessante osservazione è che, il sonno REM, non è sempre stato osservato successivamente ad episodi di SWS.

Capitolo III

LATERALIZZAZIONE CEREBRALE NEL PULCINO

3.1 LA LATERALIZZAZIONE CEREBRALE: SVILUPPO DEL CONCETTO E STUDI SUL PULCINO

3.1.1 Le prime evidenze della lateralizzazione cerebrale e lo sviluppo dell'interesse scientifico

Fu alla fine del diciannovesimo secolo che Marc Dax dimostrò nell'essere umano l'associazione tra una lesione focale nell'emisfero sinistro e alcuni disturbi legati al linguaggio. Queste evidenze vennero poi chiarite dal neurologo francese Paul Broca che identificò, nel piede della terza circonvoluzione frontale dell'emisfero sinistro, il substrato biologico-funzionale della produzione verbale (Pinel, 2000). Queste scoperte contribuirono, assieme ad altri lavori prodotti in quel periodo, ad alimentare una visione localizzazionista del cervello fino a quel momento visto essenzialmente come equipotenziale tra le sue diverse aree e in un'ottica di una funzionalità generale.

L'asimmetria non solo funzionale, ma anche anatomica del cervello fu in seguito ampiamente studiata e documentata. Geschwind e Levitsky (1968), dimostrarono come a livello anatomico ci fosse una maggior estensione del *planum* temporale dell'emisfero sinistro rispetto a quello destro e come l'area frontale dell'emisfero destro avesse un volume maggiore. Venne quindi a consolidarsi il concetto di "dominanza emisferica" (Denes e Pizzamiglio, 1996) che gettava le sue fondamenta su alcuni concetti fondamentali tra cui: gli emisferi cerebrali dell'uomo e degli animali venivano considerati, anche se

non uguali, equivalenti da un punto di vista anatomico; gli emisferi dell'uomo erano considerati, a differenza di quelli degli altri animali, non equivalenti da un punto di vista funzionale; le funzioni di senso e di moto erano considerate essere distribuite equamente su entrambi gli emisferi, per questo motivo ciascuno di essi controllerebbe la metà controlaterale del corpo. L'emisfero sinistro, inoltre, almeno per quanto riguarda i destrimani, svolgerebbe tutte le funzioni cognitive e prassiche di ordine superiore e sarebbe perciò considerato l'emisfero dominante; nei mancini sembrerebbe che l'organizzazione corticale delle funzioni superiori sia esattamente speculare a quella osservata nei destrimani.

Questi presupposti vennero però messi in dubbio e sconfessati dalla frenetica ricerca che si era ormai sviluppata attorno al concetto di "dominanza emisferica" e, verso la fine degli anni '60, questo concetto cedette il primato ad una concettualizzazione più evoluta e più aderente alle nuove scoperte: la "specializzazione emisferica" (Ladavas e Berti, 1995).

L'idea di "specializzazione emisferica" considera ancora l'equivalenza dei due emisferi per quanto riguarda le funzioni motorie e sensoriali, ma ciascun emisfero viene coinvolto in misura diversa, in relazione al tipo di funzione corticale superiore considerata. Così, per esempio, nell'uomo l'emisfero sinistro sembrerebbe principalmente deputato a svolgere funzioni linguistiche mentre il destro maggiormente coinvolto nello svolgimento di compiti visuo-spaziali.

Numerose evidenze di asimmetrie strutturali negli animali risalgono al 1892 quando Cunningham osservò come l'angolo formato dalla scissura silviana fosse più acuto nell'emisfero destro sia nello scimpanzé che nell'orango e nel babbuino. Sono state rilevate numerose asimmetrie anatomiche sia riguardanti le aree cerebrali posteriori che le aree anteriori in primati non umani. Gli studi

condotti sugli altri mammiferi sono altrettanto rilevanti anche se meno numerosi rispetto a quelli condotti sui primati e mostrano chiaramente nette asimmetrie anatomiche. In quelli che vengono definiti i principali animali utilizzati per la ricerca (topi, ratti, conigli e gatti) è stato riportato un maggior peso e una maggior grandezza dell'emisfero sinistro rispetto al destro. Nel ratto, che è la specie più studiata in laboratorio, sono stati individuate altre numerosissime asimmetrie anatomiche (Vallortigara, 1994).

Verso la fine degli anni '70 venne rivoluzionata l'idea che la specializzazione emisferica, da un punto di vista funzionale, fosse unicamente una prerogativa umana grazie a evidenze provenienti da una serie di esperimenti su svariate specie di vertebrati non umani.

Sono state riscontrate asimmetrie funzionali associate a svariate funzioni cognitive tra le quali: asimmetrie motorie, comunicative, percettive, mnestiche, emotive e motivazionali (Vallortigara, 1994). A livello di popolazione, sembra che i ratti preferiscano ruotare in direzione destrorsa e che questo comportamento sia scollegato dalla preferenza nell'uso dell'arto. I delfini mostrano di preferire il senso antiorario per quanto riguarda la direzione di nuotata (Ridgway, 1986), ciò potrebbe essere associato ad un più alto livello di attivazione dell'emisfero destro. Questo è osservabile anche nell'uomo che a seguito di lesione destra tende in situazioni ambigue a svoltare verso destra. L'emisfero sinistro sembra svolgere un ruolo cruciale nella discriminazione delle vocalizzazioni specie-specifiche nei macachi giapponesi. Nel ratto è stato documentato come l'orecchio destro sia dominante nella discriminazione di sequenze di toni sonori. E' stato anche mostrato come a livello percettivo gli scimpanzé siano più veloci e accurati in test di giudizi di differenza e uguaglianza tra le linee se gli stimoli vengono inviati prima all'emisfero destro. Denenberg (1981), riportò come l'emisfero

destro dei ratti fosse implicato principalmente nei comportamenti emotivi ed aggressivi mentre lo era meno l'emisfero di sinistra. Evidenze di lateralizzazione funzionale sono state riscontrate anche in vertebrati inferiori, il rospo (*Bufo bufo*) e il pesce teleosteo (*Girardinus falcatus*), (Vallortigara e Bisazza, 1997). Tra i primi ad osservare asimmetrie funzionali negli uccelli è da ricordare Nottebohm che, nel 1979 e poi nel 1990 (Nottebohm, 1979), dimostrò come nei canarini e nei fringuelli, l'emisfero sinistro fosse principalmente specializzato per l'emissione del canto: la resezione del nervo ipoglosso di sinistra causava in questi uccelli la perdita completa del canto, mentre ciò non avveniva con la resezione del nervo ipoglosso di destra.

Il compito di discriminazione visiva *pebble floor task* utilizzato da Rogers e Anson nel 1979, permise di osservare come anche nel pulcino di pollo domestico (*Gallus gallus*) vi erano chiare asimmetrie cerebrali. Grazie a questo studio e a molti altri risultati pubblicati in letteratura scientifica che verranno descritti in seguito, il pulcino domestico è divenuto a pieno titolo un ottimo modello animale per lo studio comparato della lateralizzazione delle funzioni cerebrali.

3.1.2 La lateralizzazione cerebrale nel pulcino

Come accennato nel paragrafo precedente, i primi dati sulla presenza di asimmetrie funzionali nel pulcino sono stati riportati da Rogers e Anson (1979), utilizzando un particolare compito di discriminazione visiva e un'iniezione intracerebrale di cicloesamide¹. Il compito definito *pebble floor task* consisteva in:

¹ La cicloesamide è una sostanza che iniettata a livello intracranico distrugge le strutture cerebrali interessate, producendo l'inattività del sistema colpito.

- una prima prova (*training*) durante la quale gli animali dovevano imparare a discriminare, attraverso la beccata, tra granelli di cibo e sassolini più o meno della stessa grandezza;

- una seconda prova, con la stessa procedura della precedente ma durante la quale i pulcini venivano divisi in quattro gruppi: un gruppo riceveva un'iniezione intracerebrale unilaterale sinistra di cicloesamide, un altro gruppo un'iniezione unilaterale nell'emisfero destro, un terzo gruppo un'iniezione bilaterale e un ultimo gruppo non riceveva alcun tipo d'iniezione. I soggetti di quest'ultimo gruppo e quelli a cui era stato anestetizzato il solo emisfero destro mostravano di essere capaci di discriminare durante la prova tra cibo e sassolini, mentre quelli trattati bilateralmente o nel solo emisfero sinistro, mantenevano una frequenza di beccata al cibo o ai sassolini assolutamente casuale.

Utilizzando lo stesso compito di discriminazione visiva, Mench e Andrew (1986) occlusero agli animali alternativamente l'occhio destro o l'occhio sinistro, senza praticare alcuna iniezione intracerebrale. Anche in condizioni di visione monoculare, i pulcini riuscivano a discriminare tra sassolini e cibo con l'occhio sinistro quindi utilizzando il solo emisfero destro, mentre non erano in grado di svolgere il compito quando utilizzavano il solo occhio destro (emisfero sinistro). Anche in questo caso risultò chiaro come l'emisfero destro di questo animale fosse specializzato per i compiti di discriminazione visiva.

Altri studi condotti sempre sul pulcino hanno dimostrato come anche i comportamenti aggressivi e copulatori siano lateralizzati. Rogers (1986), utilizzando ancora la cicloesamide iniettata nell'emisfero sinistro, ha mostrato come vi fosse un aumento di risposte di attacco e copulazione pari a quelle rilevate dopo la somministrazione di 25 mg di testosterone. Lo stesso risultato è stato ottenuto utilizzando il metodo dell'occlusione selettiva di un occhio in

animali precedentemente trattati con iniezione di testosterone. I soggetti a cui era stato occluso l'occhio destro mostravano un aumento nelle risposte di copulazione e di attacco, rispetto ai soggetti con occlusione selettiva dell'occhio sinistro e a quelli in visione binoculare normale (Rogers e coll., 1985).

Rashid e Andrew, nel 1989, dimostrarono il ruolo dell'emisfero destro del pulcino in compiti di tipo spaziale: se i pulcini venivano addestrati a trovare cibo sotto della segatura, basandosi su indizi spaziali, la prestazione migliorava se ad essere utilizzato era il solo occhio sinistro (emisfero destro), piuttosto che il solo occhio destro (emisfero sinistro). Questa dominanza dell'emisfero destro sembra, in qualche modo, dipendere anche dall'età di sviluppo: in pulcini testati all'ottavo giorno di vita, la prestazione migliore si ottiene quando il pulcino utilizza il solo occhio destro (emisfero sinistro).

Utilizzando il *test del corridoio*, che consiste essenzialmente in un test di scelta spontanea, Vallortigara ed Andrew (1991) hanno messo in evidenza il ruolo predominante dell'emisfero destro anche nel riconoscimento di conspecifici familiari.

Numerose altre ricerche hanno permesso di osservare nel dettaglio la lateralizzazione funzionale del cervello del pulcino.

Riassumendo i risultati ottenuti da questi lavori, l'emisfero sinistro condurrebbe un'analisi sugli stimoli percepiti categorizzandoli in base alla presenza di caratteristiche comuni, dettagli e proprietà idiosincratiche già immagazzinate in precedenza. Nello specifico, l'emisfero sinistro è considerato essere principalmente reclutato per quanto riguarda compiti di:

- apprendimento visivo discriminativo,
- categorizzazione degli stimoli in base ad indizi invariati,
- utilizzo di indizi oggettuali invece che spaziali.

L'emisfero destro analizzerebbe le caratteristiche uniche degli stimoli e categorizzerebbe in base a proprietà invarianti dello stimolo, inoltre sarebbe in grado di creare ulteriori categorie all'interno delle classi ed è stato descritto essere principalmente coinvolto in compiti di:

- riconoscimento di conspecifici familiari,
- elaborazione di informazioni topografico-spaziali,
- attivazione e gestione di comportamenti emozionali,
- risposta agli stimoli nuovi.

(Vallortigara e Andrew, 1991; Vallortigara, 1992a; 1994; 2000).

3.1.3 Un importante aspetto della lateralizzazione cerebrale nel pulcino: il processo d'*imprinting*

Gli uccelli appartenenti alle specie nidifughe precoci, subito dopo la schiusa, sviluppano un particolare comportamento di approccio e inseguimento nei confronti della madre definito *imprinting*. Questo comportamento non viene stimolato soltanto dalla chiocciola, ma da una varietà di oggetti, soprattutto quando quest'ultimi sono in movimento ed hanno caratteristiche percettive salienti e vistose. L'*imprinting*, quindi, può essere considerato una sorta di memoria di riconoscimento precoce che si sviluppa a seguito della sola esposizione allo stimolo saliente, in assenza di alcun tipo di rinforzo (Vallortigara, 1994). Proprio per questo motivo, oltre ad essere un fenomeno che riveste particolare interesse per studiare le basi biologiche della memoria, l'*imprinting* permette di indagare anche quella che è la specializzazione emisferica nel pulcino.

Horn e collaboratori (1985) hanno studiato le modificazioni neurofisiologiche alla base dell'*imprinting*, individuando, come principale struttura coinvolta in tale processo, una piccola regione della parte anteriore del telencefalo, definita

iperstriato ventrale mediale intermedio (*Intermediate Medial Hyperstriatum Ventrale* o IMHV). I primi studi condotti miravano ad osservare come vi fossero delle modificazioni strutturali nell'IMHV: a poche ore di distanza dall'*imprinting*, nell'IMHV di sinistra aumentava la densità post-sinaptica, cosa che non si verificava nell'IMHV di destra, ed è stato anche osservato un aumento netto di più del 50% dei recettori NMDA nell'IMHV sinistro, che come abbiamo illustrato precedentemente sono coinvolti nel potenziamento a lungo termine. Seguendo i primi risultati ottenuti da McCabe e collaboratori (1982), che mostravano come lesioni bilaterali dell'IMHV prevenivano il verificarsi dell'*imprinting*, Horn e collaboratori (?) osservarono a seguito di esperimenti di lesione sequenziale, che l'IMHV di sinistra (detto sistema S) agiva come primo sito di immagazzinamento a lungo termine della memoria; mentre l'IMHV di destra (detto sistema S') svolgeva un ruolo di magazzino temporaneo, permettendo il trasferimento delle informazioni all'esterno dell'IMHV, nel sistema definito S', che per altro non è ancora stato identificato anatomicamente ma sarebbe esterno agli IMHV. I risultati di ulteriori esperimenti, attribuiscono al sistema S' la capacità di sostenere la ritenzione del ricordo dell'oggetto di *imprinting* dopo circa due-tre ore dall'esposizione (Cipolla-Neto e coll., 1982). Sembrerebbe per altro, che in assenza dell'IMHV di sinistra, le sue funzioni vengano svolte dall'IMHV di destra, e che questo sia il motivo per cui, in animali lesionati prima di essere esposti allo stimolo, non sia possibile il normale trasferimento delle informazioni dall'IMHV di destra al sistema S' (Vallortigara, 1994) (**Fig. 1**).

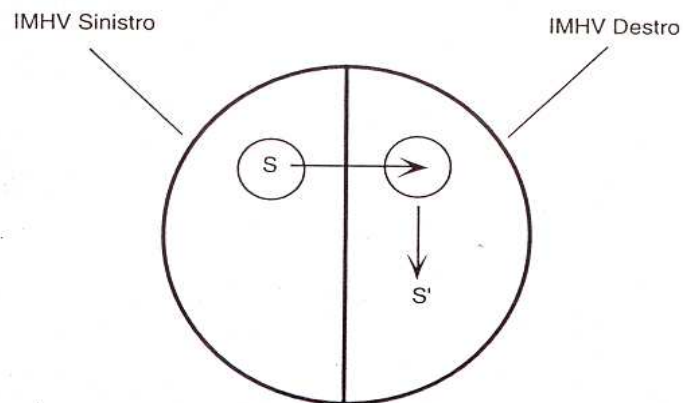


Fig. 1 Rappresentazione schematica de modello di Horn (Vallortigara, 1994).

Alla luce delle considerazioni appena descritte, nel prossimo capitolo, ma anche per tutto il resto di questa tesi, sarà possibile osservare quanto il processo di *imprinting* sia strettamente connesso alle tappe di sviluppo cognitivo in questo animale. Non di meno alcuni studi condotti nei nostri laboratori, che saranno illustrati in seguito, hanno permesso di osservare una stretta relazione tra sonno uniemisferico nel pulcino e processi di consolidamento della traccia mestica relativa all'oggetto d'*imprinting*.

3.2 IL PULCINO COME MODELLO ANIMALE

3.2.1 Vantaggi anatomici e funzionali nell'utilizzo del pulcino di pollo domestico in laboratorio

Il pulcino domestico è un modello animale che presenta numerosi vantaggi per quelle che sono le necessità di studio dei processi cognitivi in laboratorio, in un'ottica comparata e per lo studio dell'ontogenesi del comportamento.

Il pulcino appartiene alle specie definite precoci e già dopo la schiusa è pressoché autonomo per quanto riguarda lo svolgimento dei comportamenti necessari alla sua sopravvivenza. Il suo sistema nervoso è quasi completamente sviluppato al momento della schiusa, inoltre, il pulcino attraversa una serie di tappe discrete di sviluppo cognitivo, emotivo e motorio nell'arco della prima settimana. Le abilità di questo animale risultano quindi fin da subito praticamente identiche a quelle dell'animale adulto. Proprio grazie a questo sviluppo precoce le modificazioni comportamentali, cognitive ed emotive possono essere studiate con test comportamentali e successivamente correlate con i dati relativi alla maturazione cerebrale (Vallortigara, 1994; 2000).

Vi sono inoltre numerosi vantaggi pratici nell'utilizzo di questo modello animale: la buona conoscenza della sua anatomia e fisiologia, la facilità di reperimento, il basso costo sia di acquisto che di mantenimento, la possibilità di controllarne l'ambiente sia prima che dopo la schiusa e la facilità di trattamento farmacologico e chirurgico (Andrew, 1991; Vallortigara, 1994).

Infine, le caratteristiche proprie di questo animale, come ad esempio la quasi completa decussazione delle vie visive al chiasma ottico, la possibilità di compiere movimenti oculari indipendenti e la presenza del sonno uniemisferico (Rogers, 1995), lo rendono un ottimo modello sperimentale sia

per lo studio della lateralizzazione cerebrale (Vallortigara, 2000) che per le ricerche nel campo del sonno uniemisferico (Mascetti e coll., 1999; Bobbo e coll., 2002).

Anatomicamente, a livello globale, è da tener presente che i pulcini e gli uccelli in generale, non presentano nella regione più esterna del telencefalo la caratteristica struttura laminata tipica del cervello dei mammiferi, ma la loro neocorteccia è costituita da aggregati neuronali e non da strati (Karten, 1969). La struttura generale dell'encefalo è simile quindi a quella degli altri vertebrati, possono essere individuati chiaramente il cervelletto, il tetto ottico e gli emisferi cerebrali (Fig. 2).

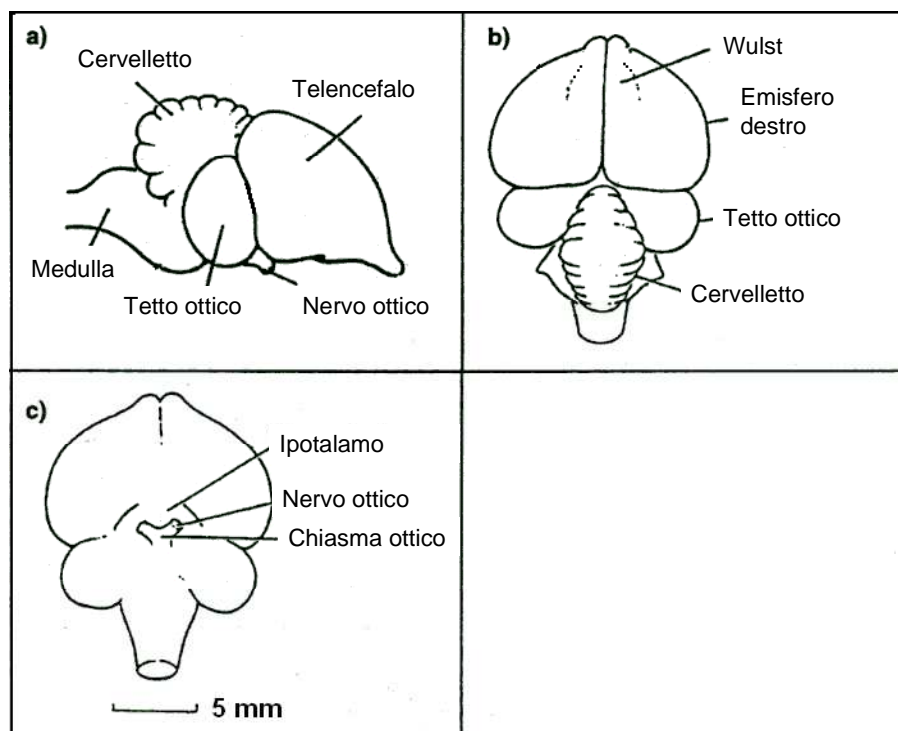


Fig.2 Cervello di pulcino di due giorni: a) visione laterale; b) visione dall'alto; c) visione da sotto (Horne, 1985)

Anche se la struttura macroscopica superficiale è simile a quella dei mammiferi, la struttura interna e più profonda è differente. Nel cervello di un pulcino la materia grigia e la materia bianca non sono così nettamente distinguibili come nei mammiferi, gli emisferi cerebrali sono costituiti da placche stratificate composte da aggregati di cellule variabili sia per dimensione che per disposizione. I tre strati più superficiali nella parte anteriore di ciascun emisfero formano un rilievo vicino alla zona mediana chiamato *Wulst* (iperstriato dorsale, ventrale, accessorio e intercalato), sono presenti inoltre tre strutture distinte definite neostriatum, ecostriatum e archistriatum, inoltre, si possono osservare accumuli cellulari nelle aree ippocampali e paraippocampali che possono essere considerate omologhe a quelle dei mammiferi (Vallortigara, 2000).

3.2.2 Le vie visive del pulcino

Il periodo di incubazione “*in ovo*” ha la durata di 21 giorni (tre settimane) ma le vie visive sono già pressoché completamente formate al 18° giorno d’incubazione; a questo giorno di sviluppo embrionale si differenziano i fotorecettori della retina ed è proprio in questo momento che si può registrare sensibilità agli stimoli visivi (Rogers, 1995).

Negli uccelli, il sistema visivo è caratterizzato dalla quasi completa decussazione delle vie visive a livello del chiasma ottico e a livello anatomico possono essere distinte due vie visive separate: la via talamo-fugale e quella tetto-fugale (simili alle vie visive genicolo-striata e collicolo-striata presenti nei mammiferi). Nella via talamo-fugale, il nucleo genicolato dorsale (GLd) del talamo riceve afferenze dalla retina controlaterale e invia proiezioni al *Wulst* visivo sia controlaterale che ipsilaterale, attraverso fasci di fibre nervose mielinizzate. Le proiezioni controlaterali si incrociano a livello della

decussazione dorsale sopraottica (SODd). Le proiezioni che partano dal GLd di sinistra e raggiungono il Wulst destro, sono quantitativamente maggiori rispetto alle proiezioni che vanno dal GLd di destra verso il Wulst sinistro. Il Wulst visivo del telencefalo è una struttura, come illustrato in precedenza, multistriata, nella quale si possono riconoscere, passando progressivamente dalle zone dorsali a quelle ventrali, quattro strati differenti: l'iperstriato accessorio, il nucleo intercalato dell'iperstriato accessorio, l'iperstriato intercalato superiore e l'iperstriato dorsale (Deng e Rogers, 1998).

Nella via tetto-fugale, i neuroni del tetto ottico (TeO) ricevono afferenze dalla retina controlaterale e, mediante fibre mielinizzate, inviano due differenti tipi di proiezioni. Al primo tipo appartengono proiezioni sia ipsilaterali che controlaterali; quelle ipsilaterali proiettano al nucleo talamico denominato *nucleus rotundus* (Rt) mentre quelle controlaterali hanno neuroni detti di tipo b che generano delle collaterali non mielinizzate che si incrociano a livello della decussazione ventrale sopraottica (SODv) e raggiungono gli Rt controlaterali. Al secondo tipo appartengono proiezioni, anch'esse non mielinizzate e generate nel TeO da neuroni definiti di tipo c, che sono esclusivamente controlaterali e proiettano quindi al Rt controlaterale. Per ultimo, i *nuclei rotundi* del talamo, proiettano all'*ectostriatum* ipsilaterale del telencefalo (Fig. 3) (Deng e Rogers, 1998; Rogers e Andrew, 2002).

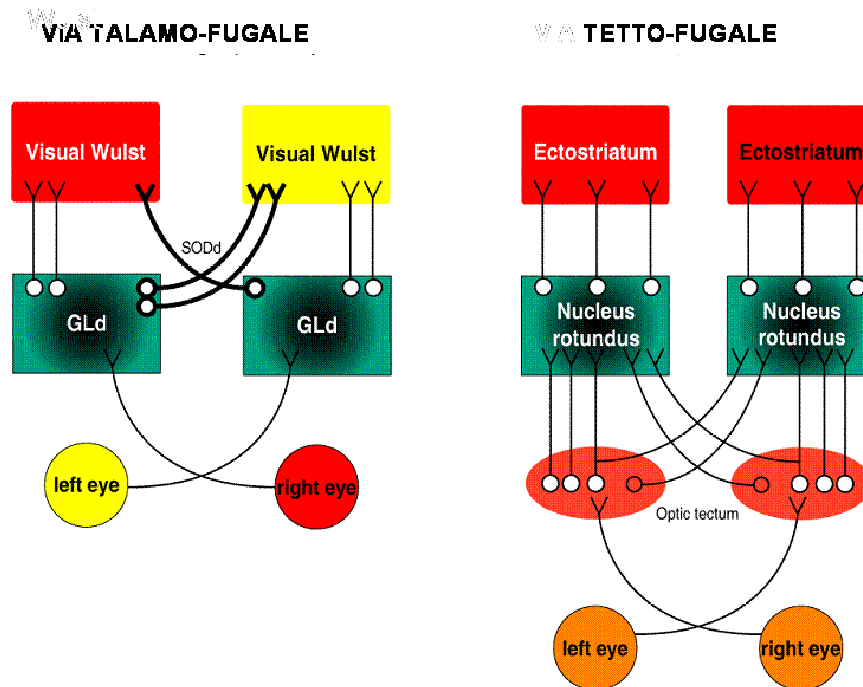


Fig. 3 Il sistema visivo del pulcino: la via talamo-fugale e la via tetto-fugale (figura modificata da Rogers e Andrew, 2002).

Un'ulteriore caratteristica del sistema visivo dei pulcini è la presenza di movimenti oculari indipendenti, caratteristica che permette a ciascun occhio di esplorare in modo indipendente l'ambiente circostante. E' noto, inoltre, che nel momento in cui le unità binoculari cessano di funzionare come tali, come ad esempio durante gli episodi di sonno monoculare, risultano servite dalla sola via controlaterale (Vallortigara, 1994).

L'organizzazione anatomica descritta permette una relativa indipendenza di elaborazione da parte dei due emisferi, o per lo meno una quasi completa indipendenza relativa agli stimoli visivi in ingresso. Durante il sonno uniemisferico, questa indipendenza permette di rilevare, da parte di un solo emisfero, gli stimoli visivi provenienti dall'ambiente esterno, senza interferire

con il sonno dell'emisfero opposto. Rogers (1995) ha chiaramente illustrato che l'analisi delle informazioni provenienti dall'occhio aperto è svolta solo dall'emisfero controlaterale a quest'ultimo.

3.2.3 Differenze di genere

Le principali differenze di genere tra i pulcini sono essenzialmente riscontrabili in tre aspetti: asimmetrie emisferiche, attività esplorativa e grado di motivazione sociale (Vallortigara, 1994).

Asimmetrie emisferiche si riscontrano con una maggior frequenza nei maschi rispetto che nelle femmine. Questo sembra essere dovuto al fatto che nelle femmine ci sia la possibilità, da parte dell'emisfero che risulta non essere dominante per un comportamento, di controllare in qualche misura quel dato comportamento anche nel caso in cui l'emisfero dominante sia isolato come negli esperimenti di chiusura unilaterale di un occhio (Vallortigara e Andrew, 1994). Le femmine sembrerebbero essere anche più sensibili dei maschi nella risposta a variazioni minime dello stimolo, probabilmente a causa di un miglior accoppiamento interemisferico o di una maggiore abilità nel sostenere l'uno o l'altro emisfero nel controllo del comportamento, in contrasto con la tendenza dei maschi a coinvolgere nel controllo ambedue gli emisferi (Vallortigara e Andrew, 1991).

Differenze sessuali sono state messe in evidenza anche in relazione all'attività esplorativa. I maschi mostrano una maggiore propensione all'attività esplorativa rispetto alle femmine. È stato descritto che essi tendono ad allontanarsi dalla chioccia per lunghi periodi, soprattutto nei primi giorni di vita. Questo comportamento sembra essere anche associato a differenze nella lateralizzazione cerebrale associata a questo specifico comportamento; i maschi che utilizzano il solo occhio sinistro sono molto più interessati delle

femmine che utilizzano il medesimo occhio ai cambiamenti spaziali degli oggetti (Andrew, 1983; Andrew e Brennan, 1983). Inoltre, anche se entrambi i sessi evidenzino un vantaggio dell'occhio sinistro nei test di orientamento topografico (Rashid e Andrew, 1989), le femmine prediligono utilizzare indizi locali mentre i maschi prediligono utilizzare indizi topografici relativi all'ambiente.

L'ultimo aspetto riguarda differenze di genere nella motivazione sociale. Sia in laboratorio che in condizioni quasi ecologiche, è emerso che i comportamenti di attaccamento sociale e di ricerca sociale sono maggiormente accentuati nelle femmine che non nei maschi (Andrew, 1983). Questo aspetto è stato messo in relazione da Vallortigara (1992b) all'organizzazione sociale tipica proprio di questa specie, in cui i maschi sembra controllino un ampio territorio dove vive il gruppo delle femmine, con un conseguente sviluppo di comportamenti aggressivi ed esplorativi da parte dei maschi associato ad un comportamento più di stampo affiliativo nelle femmine (Vallortigara, 1992b).

Capitolo IV

IL SONNO UNIEMISFERICO: CARATTERIZZAZIONE E RELAZIONE CON LA LATERALIZZAZIONE CEREBRALE

4.1 IL SONNO UNIEMISFERICO

4.1.1 Definizione

Il sonno uniemisferico (*Unihemispheric Slow Wave Sleep* o Mo-Un) è un particolare stato comportamentale ed elettrofisiologico durante il quale un emisfero presenta un'attività EEG tipica della veglia mentre l'altro emisfero mostra un'attività EEG caratteristica del sonno ad onde lente (Ball e coll., 1988). Il sonno Mo-Un è un fenomeno che sta al confine tra gli studi sul sonno e le sue funzioni e gli studi sulla lateralizzazione cerebrale, in quanto durante il sonno Mo-Un l'organizzazione funzionale dei due emisferi non è bilanciata, ciò significa che il cervello funziona in modo contrapposto, da una parte (un emisfero) dormendo e dall'altra (l'altro emisfero) restando sveglio. Questo fenomeno è diffuso principalmente tra gli uccelli, ma è stato identificato anche in diverse specie di mammiferi marini e in alcuni rettili (Rattenborg e coll., 2000a). Il sonno uniemisferico sembra permettere nei mammiferi marini la respirazione, mentre negli uccelli, a livello ecologico, sembra avere funzioni di vigilanza antipredatoria (Rattenborg e coll., 1999a). Studi condotti nei nostri laboratori, inoltre, mostrano una chiara associazione tra il sonno Mo-Un e la lateralizzazione delle funzioni cerebrali nel pulcino (Mascetti e coll., 1999; 2004).

Spooner per primo, nel 1964, dimostrò l'associazione tra chiusura unilaterale di un occhio e sonno uniemisferico nei pulcini (*Gallus gallus domesticus*) e

successive registrazioni EEG, compiute durante i periodi in cui l'animale chiudeva un solo occhio, mostravano chiaramente un quadro interemisferico asimmetrico; l'emisfero controlaterale all'occhio aperto evidenziava il quadro EEG della veglia, mentre nell'emisfero controlaterale all'occhio chiuso si registrava un EEG del sonno ad onde lente (Rattenborg e coll., 2000a). Anche in altri galliformi è stato registrato un quadro di sonno Mo-Un durante la chiusura di un occhio (Peters e coll., 1965). In studi condotti da Ookawa su polli adulti, pulcini (Ookawa e Takagi, 1968) e quaglie giapponesi (*Coturnix coturnix japonica*) (Ookawa e Kadono, 1968), è stata confermata l'associazione tra sonno Mo-Un e chiusura unilaterale degli occhi.

Ball e collaboratori (1988) esaminarono 56 specie di uccelli appartenenti a 18 ordini, registrarono l'EEG degli animali con elettrodi impiantati chirurgicamente in entrambi gli emisferi e monitorarono la chiusura degli occhi con telecamere a circuito chiuso. Il quadro di sonno uniemisferico, associato alla chiusura dell'occhio controlaterale, venne descritto in 29 specie di uccelli, appartenenti a 13 ordini: *Podicipediformes*, *Ciconiiformes*, *Gruiformes*, *Sphenisciformes*, *Falconiformes*, *Anseriformes*, *Galliformes*, *Charadriiformes*, *Stringiformes*, *Coraciiformes*, *Columbiformes*, *Psittaciformes* e *Passeriformes*. Non è stato tuttavia osservato sonno Mo-Un e chiusura unilaterale degli occhi in 27 specie appartenenti ad altri 5 ordini: *Cuculiformes*, *Apodiformes*, *Tinamiformes*, *Rheiformes*, *Casuariiformes*. Inoltre, le registrazioni del tasso metabolico effettuate durante la veglia, il sonno e il sonno Mo-Un mostrarono come durante il sonno Mo-Un il tasso metabolico registrato raggiungesse una posizione intermedia rispetto a quello registrato durante la veglia e il sonno.

Berger e Phillips (1995), in un altro studio sul metabolismo, evidenziarono come la temperatura cerebrale, considerata appunto un indice metabolico,

fosse asimmetrica nei due emisferi cerebrali durante il sonno Mo-Un e in particolare più elevata nell'emisfero che presentava un quadro EEG di veglia.

4.1.2 Filogenesi del sonno uniemisferico

I comuni antenati dei mammiferi e degli uccelli sono i rettili, dai quali nel corso dell'evoluzione si sono differenziate le classi di animali superiori. Probabilmente proprio per questo motivo la fase del sonno definita REM, che è anche considerata una delle più evolute, è presente principalmente in quegli esseri viventi, tra cui i mammiferi, che hanno una storia evolutiva più lunga. Sembra che possa essere quindi probabile che la facoltà di "lateralizzare il sonno" discenda da rettili che in qualche modo abbiano conservato, in quanto dava un vantaggio evolutivo, questa facoltà. Evidenze che danno credito a questa ipotesi provengono da studi condotti sui rettili, sono stati osservati episodi di sonno Mo-Un in rettili appartenenti agli ordini: *Crocodylia*, *Chelonia*, a cui appartengono le tartarughe (Flanigan, 1973), e *Squamata* a cui invece appartengono le lucertole (Mathews e Amlaner, 1998).

Una prima spiegazione proveniente da queste osservazioni considera che l'*habitat* nel quale gli animali hanno vissuto, sia stato fondamentale come fattore evolutivo per quanto riguarda il sonno e nello specifico per il sonno Mo-Un. Questa ipotesi trae credito da alcune osservazioni: una prima osservazione considera che due degli ordini di rettili descritti in precedenza sono anfibi che vivono anche in ambienti acquatici e che discendono dai pesci, in secondo luogo è stato osservato che in animali con un alto tasso di encefalizzazione quali i delfini, che vivono altrettanto in un ambiente acquatico, è presente il sonno Mo-Un, e infine che sia nei rettili che nei delfini è pressoché assente il sonno REM. Detto questo è possibile ipotizzare che il sonno Mo-Un sia stato conservato, a discapito del sonno a livello evolutivo, in

quanto permette di mantenere i benefici del sonno REM che è associato a completa atonia muscolare, anche in un ambiente ostile a questo tipo di comportamento.

Un'altra possibile spiegazione è quella avanzata da Kavanau (1994) relativamente alla "stabilizzazione dinamica" secondo cui il REM e l'atonia muscolare ad esso associata possa permettere una sorta di "provare a vuoto" determinati circuiti neuronali, soprattutto motori, senza interferire con il sonno, ma i mammiferi marini, essendo sempre in movimento potrebbero aver sostituito al sonno REM il sonno uniemisferico, fenomeno più adattivo nell'ambiente in cui vivono.

4.1.3 Indici elettrofisiologici del sonno uniemisferico

Rattenborg e collaboratori (1999c), utilizzando una procedura matematica che permette l'analisi digitale del periodo di ampiezza delle frequenze registrate dall'EEG ("*digital period amplitude analysis*" o PAA), hanno descritto l'associazione tra sonno Mo-Un e chiusura unilaterale degli occhi. Lo studio è stato condotto sui germani reali (*Anas platyrhynchos*) e ha evidenziato che nell'emisfero controlaterale all'occhio chiuso la frequenza delle onde dell'EEG è più bassa (1-6 Hz) rispetto all'emisfero controlaterale all'occhio aperto. Lo stato registrato nell'emisfero controlaterale all'occhio aperto è sovrapponibile - a livello elettrofisiologico - ad uno stadio intermedio tra veglia e sonno in grado di rilevare prontamente, tramite l'occhio aperto, gli stimoli esterni (Rattenborg e coll., 1999c). La chiusura di entrambi gli occhi è invece associata al sonno SWS o al sonno REM in entrambi gli emisferi.

Il sonno REM non è stato invece registrato durante gli episodi di sonno Mo-Un, benché in rari casi sia stato registrato un quadro di sonno REM in un emisfero e un quadro di SWS nell'altro (Rattenborg e coll., 2000a).

L'impiego di una procedura oggettiva come la PAA, ha permesso a Rattenborg e collaboratori (2000b) di dimostrare la presenza della relazione tra sonno uniemisferico e chiusura dell'occhio controlaterale all'emisfero che dorme anche nel piccione (*Columba livia*), risultato che, sugli stessi animali, non era stato ottenuto precedentemente da Tobler e Borbely (1988).

Nei nostri laboratori è stato possibile registrare il tracciato EEG del pulcino di pollo domestico durante gli episodi di sonno Mo-Un e la medesima associazione con la chiusura dell'occhio (Bobbo e coll., 2002) (**Fig. 4**).

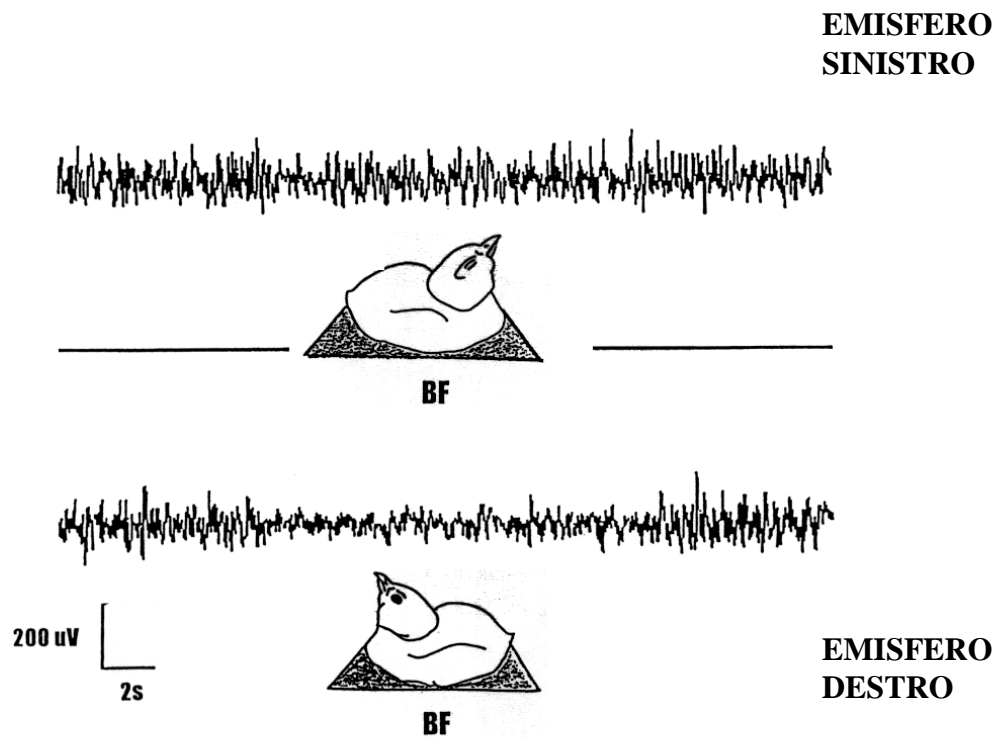


Fig. 4: Episodio di sonno Mo-Un. La figura rappresenta un episodio di sonno monoculare destro: nell'emisfero sinistro, controlaterale all'occhio chiuso, si registra un tracciato EEG tipico del sonno Mo-Un; mentre nell'emisfero destro si osserva il tracciato EEG della veglia (figura tratta da Bobbo e coll., 2002).

4.1.4 Neurofisiologia del sonno uniemisferico

Spooner ha proposto due possibili meccanismi neurofisiologici alla base del sonno Mo-Un. In primo luogo, la completa decussazione delle vie visive e la possibilità di compiere movimenti oculari indipendenti potrebbero essere alla base di un collegamento diretto tra stimolazione visiva e sonno uniemisferico. In secondo luogo, potrebbe essere presente un meccanismo endogeno associato alla quasi completa divisione della parte anteriore della Formazione Reticolare, determinata dal terzo ventricolo, e di conseguenza la presenza di un meccanismo di attivazione-disattivazione separato (Rattenborg e coll., 2000a).

Studi condotti su animali con particolari menomazioni anatomiche, mantenuti in ambienti isolati da stimolazioni esterne, come polli ciechi da entrambi gli occhi (Ookawa, 1971) o da un solo occhio (Tarao e Ookawa, 1969), mantenuti in un ambiente completamente buio (Ball e coll., 1988), come pulcini (Mascetti e coll., 1999, 2004; Bobbo e coll., 2002; Rogers, 1995) e anatre (Rattenborg e coll., 1999b) mantenute in assenza di stimolazioni ambientali, sembrano avere validato la possibile presenza di un meccanismo interno associato alla regolazione del sonno Mo-Un.

Per altro, malgrado alcuni autori (Peters e coll., 1965) abbiano sottolineato come l'inizio del sonno Mo-Un sia associato a stimolazioni unilaterali, la peculiare conformazione anatomica delle vie visive degli uccelli, non sembra sufficiente, da sola, a spiegare la fisiologia del sonno Mo-Un (Rattenborg e coll., 2000a).

Gli studi svolti sulla funzione della *melatonina*, una sostanza rilasciata dalla ghiandola pineale durante il periodo di buio nei mammiferi e negli uccelli, potrebbero evidenziare un ruolo importante di quest'ultima nei processi che regolano il sonno uniemisferico. Nel piccione, la luce costante sembra

sopprimere da un lato i ritmi circadiani del sonno, dall'altro il rilascio di *melatonina* (Berger e Phillips, 1994). Iniezioni che riportano, durante periodi di luce costante, la *melatonina* ad un livello fisiologico, ristabiliscono normali periodi di sonno (Mintz e coll., 1998; Phillips e Berger, 1992). Anche se la *melatonina* sembra essere un fattore inducente il sonno, sono stati comunque registrati episodi di sonno uniemisferico durante i periodi di buio. Ciò potrebbe dimostrare la presenza, negli uccelli, di meccanismi a livello endogeno che inibiscono il rilascio di *melatonina* anche durante i periodi di buio e che potrebbero essere coinvolti nella generazione del sonno Mo-Un (Rattenborg e coll., 2000a).

E' stata notevolmente indagata anche la funzionalità del corpo calloso nelle diverse specie che presentano sonno Mo-Un. I delfini, che hanno una massa cerebrale di dimensioni circa cinque volte superiore a quella dell'uomo, hanno tuttavia un corpo calloso di dimensioni pressoché uguali (Ridgway, 1986). Negli uccelli, il corpo calloso è praticamente assente e gli emisferi cerebrali sono in comunicazione tra loro solo grazie a delle ridotte commessure intremisferiche "secondarie" (Cuénod, 1974). Anche se la minore presenza di commessure cerebrali, potrebbe essere un motivo facilitante la comparsa di sonno Mo-Un, studi lesionali associati alla completa resezione del corpo calloso, hanno rilevato un quadro di sonno invariabilmente biemisferico (Montplaisir e coll., 1990). Per questo motivo le commessure cerebrali, salvo influire sulla generale sincronizzazione del tracciato EEG, sembrano essere marginalmente coinvolte nella produzione del sonno Mo-Un (Rattenborg e coll., 2000a)

4.1.5 Funzione del sonno uniemisferico negli uccelli

Una delle possibili ipotesi relativamente alla funzionalità del sonno Mo-Un considera che quest'ultimo, a livello ecologico, abbia funzioni di vigilanza antipredatoria. Il sonno Mo-Un permetterebbe di monitorare l'ambiente e di rilevare la possibile presenza di predatori e allo stesso tempo di beneficiare del sonno. Rattenborg e collaboratori (1999b) hanno condotto uno studio in cui è emerso come la quantità di sonno Mo-Un correli con il rischio di predazione percepito dall'animale. Il sonno monoculare sembra aumentare con l'incremento del rischio percepito, mentre sembra diminuire con l'abbassarsi del livello di pericolosità della situazione. In questo esperimento, è stato monitorato lo stato degli occhi (aperti o chiusi) e del tracciato EEG di 16 germani reali (*Anas platyrhynchos*), suddivisi in quattro gruppi e disposti in fila uno accanto all'altro. I risultati hanno mostrato che gli animali posizionati all'estremità della fila, che percepivano un rischio maggiore di essere predati, aumentavano la percentuale di sonno Mo-Un, pari al 150% rispetto a quella osservata negli animali che si trovavano al centro della fila. Inoltre è stato osservato che l'occhio aperto, durante gli episodi di sonno Mo-Un era quello direzionato all'esterno del gruppo.

4.1.6 Posture assunte dal pulcino durante il sonno uniemisferico

Durante il sonno, gli uccelli assumono diverse posizioni caratteristiche (Amlaner e Ball, 1983). Nello specifico, le posizioni assunte dai pulcini durante il sonno sono state descritte da Mascetti e collaboratori (1999), che hanno evidenziato quattro posture tipiche che sono rappresentate in **Fig. 5**:

- *Standing Sleep (SS)*: il pulcino dorme in piedi e il becco può toccare il suolo. Questa posizione è molto frequente durante i primi 2 o 3 giorni di vita;

- *Bill Forward* (**BF**): il pulcino è accovacciato sul pavimento, la testa è protesa in avanti e il becco è parallelo al suolo senza tuttavia toccarlo;

- *Bill On the Ground* (**BOG**): il pulcino è accovacciato sul pavimento, la testa inclinata in avanti e il becco appoggiato al suolo;

- *Head On the Ground* (**HOG**): il pulcino è accovacciato sul pavimento, il collo allungato in avanti e appoggiato al suolo, anche la testa e il becco sono appoggiati al suolo. La testa può essere parallela al suolo o piegata su un lato. Sembra ci siano delle associazioni tra la postura assunta dall'animale durante il sonno e il sonno Mo-Un (Mascetti e coll., 1999; 2004). Il sonno Mo-Un è stato principalmente osservato, ma non esclusivamente, nelle posizioni BF e BOG. In queste posizioni, infatti, il tono della muscolatura del collo è più alto che nelle altre e di conseguenza la soglia di attivazione più bassa, ciò potrebbe essere anche a favore dell'ipotesi di vigilanza antipredatoria attribuita al sonno Mo-Un. Episodi di sonno Mo-Un sono stati anche registrati nelle altre posizioni, anche se con minore frequenza. Il sonno binoculare si presenta invece in ognuna delle posizioni descritte, anche se la posizione SS viene assunta dai pulcini esclusivamente durante i primi giorni di vita (Mascetti e coll., 1999; 2004).

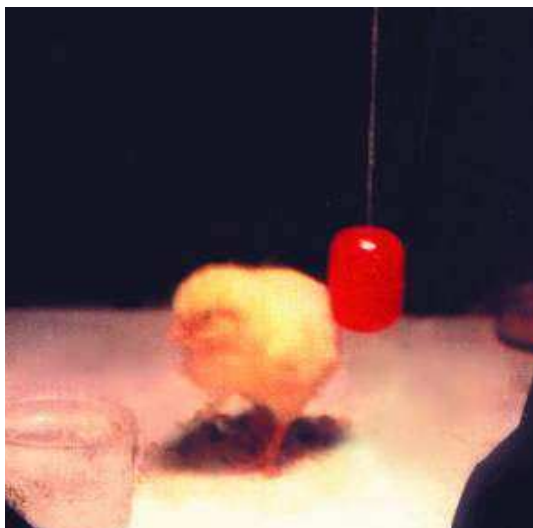


Fig. 5a: posizione SS

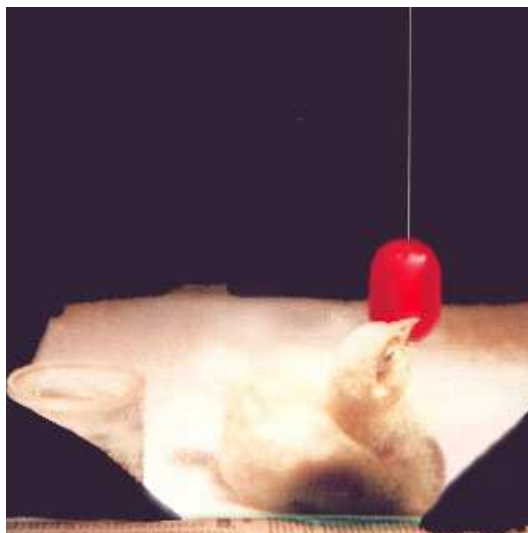


Fig 5b: posizione BF



Fig.5c: posizione BOG

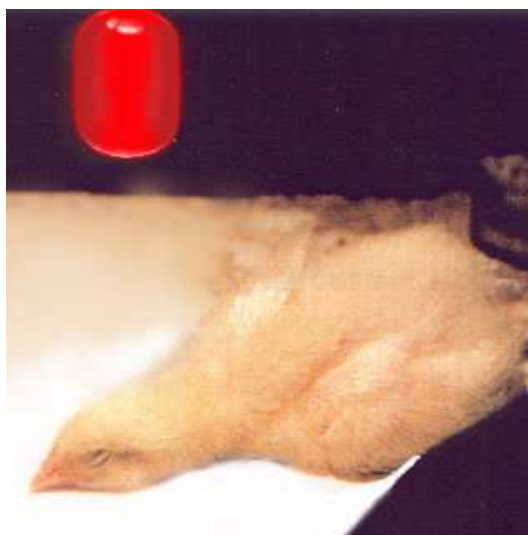


Fig. 5d: posizione HOG

4.2 IL SONNO UNIEMISFERICO COME ASPETTO DELLA LATERALIZZAZIONE CEREBRALE

4.2.1 Condizioni d'allevamento e sonno uniemisferico

Lo studio della possibile relazione esistente tra sonno uniemisferico e lateralizzazione cerebrale nel pulcino sembra essere un ottimo campo di ricerca per lo studio delle funzioni del sonno. La registrazione delle eventuali modificazioni del sonno osservabili nell'emisfero che gestisce particolari compiti cognitivi durante la veglia, può indubbiamente fornire dati significativi riguardo alla relazione tra sonno e funzioni cognitive.

Gli studi comportamentali sul sonno uniemisferico, hanno utilizzato la chiusura degli occhi come misura indiretta dello stato di veglia o di sonno dei due emisferi, basandosi sulle considerazioni descritte precedentemente (Rattenborg e coll., 2000a, 2000b).

Rogers e Chaffey (1994) hanno osservato il sonno di un gruppo di pulcini maschi tra il 1° e il 17° giorno di vita. Gli autori hanno evidenziato che il tempo speso per dormire decresce con l'aumentare dell'età e proporzionalmente decresce maggiormente il sonno binoculare rispetto al sonno monoculare. Sembra, per altro, che alla seconda settimana di vita sia presente una preferenza nella chiusura dell'occhio sinistro. Sono stati analizzati anche le *transizioni* da veglia a sonno uniemisferico e da sonno biemisferico a sonno uniemisferico (o *transizioni*). Le *transizioni* da veglia a Mo-Un, durante la seconda settimana, non presentano variazioni di rilievo tra la frequenza di chiusura dell'occhio sinistro e quella dell'occhio destro. Le *transizioni* da sonno biemisferico a sonno uniemisferico, registrate sempre durante la seconda settimana, sembrano presentare invece una frequenza maggiore per quanto riguarda l'apertura dell'occhio destro. Come afferma

Rogers (1995), la maggior frequenza di apertura dell'occhio destro potrebbe essere collegata con la peculiare funzionalità dell'emisfero sinistro nell'esaminare le caratteristiche ambientali a livello generale, al contrario dell'emisfero destro più coinvolto nell'analisi dei dettagli (Vallortigara e Andrew, 1991).

4.2.2 Fattori ambientali e sonno uniemisferico

Come risulta evidente dagli esperimenti appena descritti che hanno indagato la relazione tra il sonno Mo-Un e le condizioni di allevamento, il sonno del pulcino può essere influenzato da numerosi fattori ambientali.

Il pulcino, durante l'incubazione, è disposto nell'uovo in modo tale che la testa appoggia sul resto del corpo dalla parte sinistra; la parte destra è invece posizionata verso il guscio, quindi l'occhio destro può ricevere stimolazioni luminose provenienti dall'ambiente esterno. La stimolazione luminosa *in ovo*, indotta dal 19° giorno in poi, quando cioè il sistema visivo ha raggiunto un sufficiente livello di sviluppo, può influenzare le asimmetrie funzionali del pulcino (Vallortigara, 1994).

Bobbo e collaboratori (2002) hanno studiato le caratteristiche del sonno uniemisferico e biemisferico in seguito a stimolazione luminosa *in ovo*, in pulcini maschi e femmine, allevati in condizione di isolamento sociale o con oggetto d'*imprinting*, durante i primi 12 giorni di vita. Il quadro di sonno uniemisferico, risulta significativamente diverso tra i pulcini schiusi da uova incubate al buio e quelli schiusi da uova incubate alla luce. Per quanto riguarda i pulcini provenienti da uova incubate alla luce e allevati con l'*imprinting*, i risultati evidenziano una chiusura preferenziale dell'occhio sinistro durante i primi due giorni dopo la schiusa, mentre i pulcini provenienti da uova incubate al buio mostrano la chiusura preferenziale dell'occhio destro.

L'effetto è più persistente nei pulcini di sesso femminile. La maggior frequenza di apertura dell'occhio destro nei soggetti incubati alla luce, potrebbe essere l'effetto di un' aumentata sensibilità e reattività della via visiva *occhio destro - emisfero sinistro* a seguito della stimolazione luminosa embrionale. Per quanto riguarda i soggetti allevati senza oggetto *d'imprinting*, i dati sono di difficile interpretazione, probabilmente a causa del fatto che questa condizione non rappresenta una situazione normale per questo animale, e che quindi quest'ultimo manifesta un tipico comportamento 'stressato', caratterizzato da numerosi *distress call*, che potrebbero avere influenzato il quadro di sonno a tal punto da mascherare gli effetti della stimolazione luminosa *in ovo*. Per concludere, i dati osservati nel precedente esperimento sembrerebbero proporre una certa predeterminazione, probabilmente dettata dalle tappe di sviluppo (Rogers, 1995), per quanto riguarda la direzione del sonno monoculare. Questa predeterminazione, però, non esclude che le possibili stimolazioni provenienti dall'esterno possano modulare il successivo quadro di sonno uniemisferico.

Capitolo V

IL SONNO UNIEMISFERICO COME POSSIBILE ASPETTO LOCALE DEL SONNO

5.1 IL CONCETO DI SONNO LOCALE

5.1.1 Una recente ipotesi sulla funzione del sonno

Tononi e Cirelli (2006), basandosi sull'ormai consolidata teoria proposta da Borbely nel 1982 relativamente ai due processi regolatori del sonno, il processo circadiano e il processo omeostatico (Fig.6), hanno avanzato un'ipotesi volta a delucidare i possibili meccanismi sinaptici alla base della funzione del sonno, strettamente legata al processo circadiano e a quello omeostatico. Secondo gli autori, una delle principali funzioni del sonno sarebbe quella di operare un *downscaling* dei pesi sinaptici a livello della corteccia cerebrale. Per *downscaling* sinaptico si intende una diminuzione della forza di connessione sinaptica tra i neuroni che appartengono a particolari reti associative formatesi durante la veglia. I solidi argomenti proposti da Tononi e Cirelli (2003; 2006) sia in ambito anatomico che fisiologico, mostrano come i processi di apprendimento, di potenziamento a lungo termine (*Long Time Potentiation* - LTP) e di plasticità neuronale, portino ad un aumento della forza delle connessioni sinaptiche intracorticali durante il periodo di veglia. Nel concreto, le attività svolte dal soggetto durante la giornata si tradurrebbero in attività neuronale associata a meccanismi di apprendimento e di plasticità. Questo aumento della forza di connessione sinaptica, raggiungerebbe un massimo verso sera e sarebbe alla base di una successiva ri-organizzazione delle connessioni sinaptiche durante

la fase di SWS del periodo di sonno. Tale riorganizzazione consisterebbe appunto in un attivo *downscaling* sinaptico volto ad ottimizzare nuovamente il funzionamento sinaptico cerebrale per il successivo periodo di veglia. I meccanismi associati a questo processo, quindi, sarebbero strettamente connessi al SWS e più precisamente a quella che viene definita *Slow Wave Activity* (SWA) nella banda di potenza tra 0.75 Hz e 4 Hz (Fig. 7).

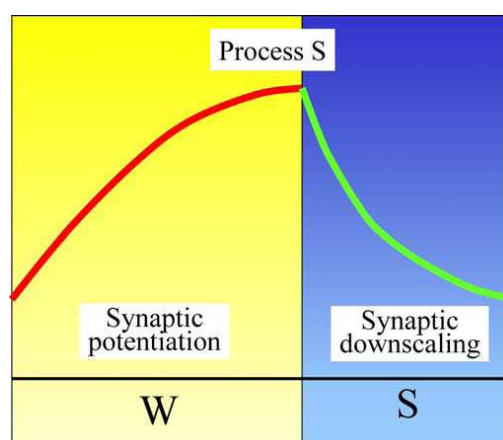


Fig. 6: Immagine rappresentante il processi omeostatico e circadiano della teoria dei due processi di Borbely del 1982 (Tononi e Cirelli, 2006).

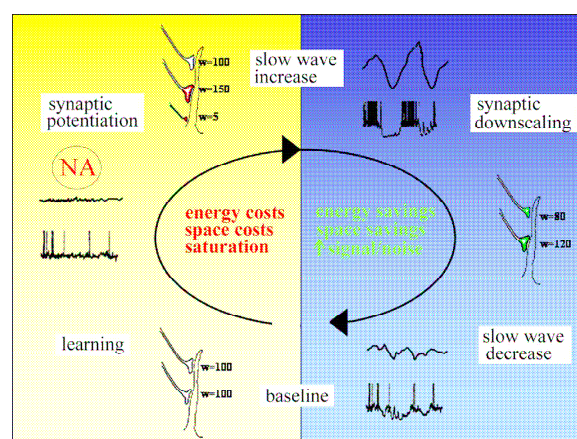


Fig. 7: Immagine raffigurante il processo di *downscaling* sinaptico (Tononi e Cirelli, 2006).

Nell'ottica di questa ipotesi gli autori avanzano l'idea che il sonno sia indispensabile e sia il costo che deve essere pagato al fine di mantenere e gestire processi di plasticità, di apprendimento e di LTP. Lo scopo di questo processo associato al sonno è di mantenere una regolazione omeostatica del peso delle connessioni sinaptiche dei neuroni durante la veglia.

5.1.2 Il concetto di sonno locale nell'uomo

I meccanismi di *downscaling* illustrati nel paragrafo precedente sarebbero quindi strettamente connessi al SWS e più precisamente a quella che viene definita *Slow Wave Activity* (SWA) nella banda di potenza tra 0.75 Hz e 4 Hz.. Il sonno è da sempre stato studiato come fenomeno globale, cioè che interessa l'intero cervello, ma grazie alle nuove ipotesi emerse dal lavoro del gruppo di Tononi e Cirelli, è stato possibile avanzare una nuova idea supportata da dati sperimentali evidenti. Huber e collaboratori (2004) hanno condotto un esperimento in cui hanno sottoposto alcuni soggetti ad un compito di apprendimento (che verrà descritto in seguito) e successivamente hanno registrato il tracciato EEG durante il sonno utilizzando un gruppo di elettrodi ad alta densità (*high density-EEG* o *hd-EEG*); sono stati utilizzati 256 elettrodi disposti sullo scalpo. In questo modo è stato possibile osservare, a seguito dell'analisi spettrale del sonno nella banda di frequenza della SWA, che il SWS non si distribuisce uniformemente sullo scalpo, ma si rilevi maggiore quantità di SWA in corrispondenza di quelle regioni corticali che sono state maggiormente attivate durante il compito svolto in veglia.

Il compito al quale i soggetti sono stati sottoposti consisteva nel dover raggiungere, utilizzando il puntatore che appariva sul *monitor* di un computer e che veniva mosso da un particolare *mouse*, dei cerchi disposti intorno al punto di fissazione/partenza anch'essi sul *monitor* i quali si illuminavano in

sequenza. L'angolo direzionale connesso al movimento del *mouse* veniva modificato automaticamente in modo randomizzato ed il soggetto doveva adattare il proprio movimento per raggiungere correttamente i cerchi illuminati; l'angolo veniva cambiato di 15, 30, 45 e 60 gradi durante l'intero compito (Fig. 8). L'apprendimento veniva osservato analizzando alcune variabili specifiche: la velocità del movimento e le modificazione dell'angolo che il soggetto sceglieva. In sostanza, l'avvenuto apprendimento consisteva nel fatto che al re-test i soggetti sottoposti alla procedura sperimentale di apprendimento mostrassero meno errori dei soggetti non sottoposti ad apprendimento ed un movimento più efficace rispetto ai controlli.

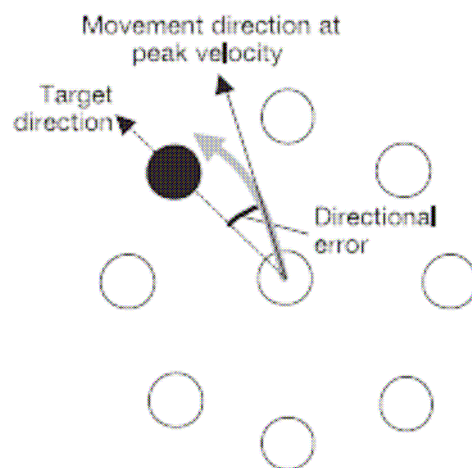


Fig. 8: Rappresentazione del compito che dovevano svolgere i soggetti nell'esperimento di Huber (Huber e coll., 2004).

Successivamente veniva registrato il hd-EEG durante il sonno sia dei soggetti sperimentali che di controllo e veniva *mappata* la presenza della SWA sullo scalpo. In precedenza erano state individuate, utilizzando metodiche di

indagine funzionale, le aree implicate nello svolgimento del compito sopra descritto. I risultati hanno mostrato chiaramente come le aree cerebrali associate al compito che i soggetti avevano imparato mostravano nel gruppo sperimentale, durante il sonno, una significativa presenza maggiore di SWA rispetto alle altre aree e ai soggetti appartenenti al gruppo di controllo (Fig. 9).

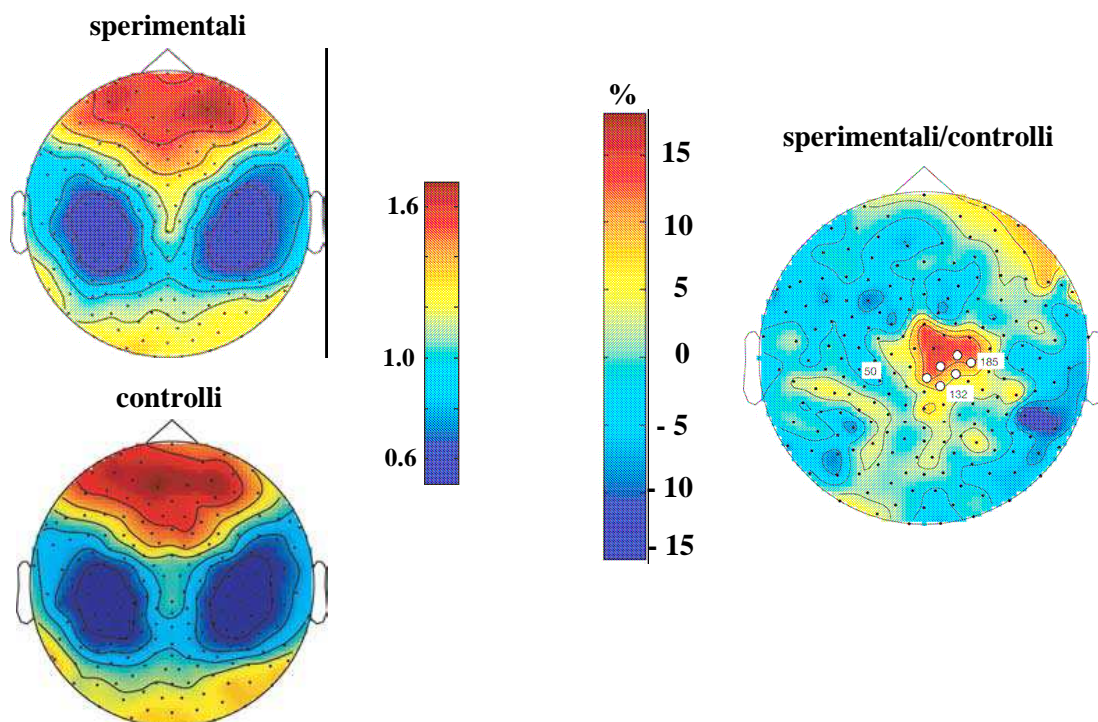


Fig 9: Illustrazione grafica dei risultati dell'analisi del segnale EEG ad alta densità della SWA durante il SWS in soggetti sottoposti ad uno specifico compito di apprendimento e nei controlli (Huber e coll., 2004).

Queste nuove solide osservazioni e le successive evidenze scientifiche sulla presenza di una distribuzione topografica del sonno e nello specifico del SWS (Buchmann e coll., 2009; Ringli e coll., 2009), hanno permesso di avanzare l'ipotesi che il SWS possa essere un fenomeno locale del funzionamento

cerebrale direttamente collegato al *downscaling* sinaptico a sua volta connesso alle attività svolte dal soggetto durante la veglia. Evidenze di *sonno locale* sono state anche riportate in studi condotti su bambini e adolescenti e sembrano essere legati a processi di maturazione cerebrale e cognitiva (Huber, 2008; Kurth e coll., 2009; Ringli e coll., 2008). Nello specifico sembra che la SWA durante il SWS si distribuisca in modo diverso in relazione alle fasi di sviluppo cerebrale del bambino e dell'adolescente passando da una maggior presenza nelle aree parieto-occipitali e temporali in bambini tra i 4-6 anni e spostandosi successivamente ad una maggior presenza di SWA nelle aree fronto-temporali e parietali al termine dell'adolescenza.

5.1.3 Studi sugli aspetti regionali del sonno nel ratto

Anche nei mammiferi non umani è stato possibile osservare un aumento della SWA nelle regioni cerebrali principalmente stimulate durante la veglia, sia a seguito di compiti di apprendimento che di stimolazione passiva. Vyazovskiy, Borbely e Tobler (2000) hanno condotto uno studio per valutare i possibili aspetti regionali del sonno nei ratti. L'esperimento consisteva nel taglio unilaterale delle vibrisse, che è un apparato sensoriale tattile utilizzato dai ratti per indagare l'ambiente circostante. Le vibrisse hanno una ampia rappresentazione nella corteccia somatosensoriale primaria del ratto e le vibrisse di sinistra inviano informazioni all'area somatosensoriale controlaterale durante il comportamento esplorativo dell'animale. Gli autori hanno osservato come il taglio delle vibrisse di sinistra (unilaterale) diminuisse in modo consistente l'attivazione sensoriale delle aree corticali controlaterali. Il protocollo sperimentale prevedeva che gli animali fossero mantenuti svegli per 6 ore in un ambiente ricco di stimolazioni sensoriali e successivamente lasciati liberi di dormire normalmente. Durante le successive

6 ore di sonno è stato registrato il tracciato EEG intracorticale dei ratti. L'analisi del tracciato EEG durante il SWS e l'analisi spettrale della SWA nella banda di frequenza tra 0,75 e 6 Hz ha permesso di osservare come fosse presente un marcato aumento della SWA nelle aree della corteccia somatosensoriale sinistra alle vibrissae intatte (di destra) (Fig. 10).

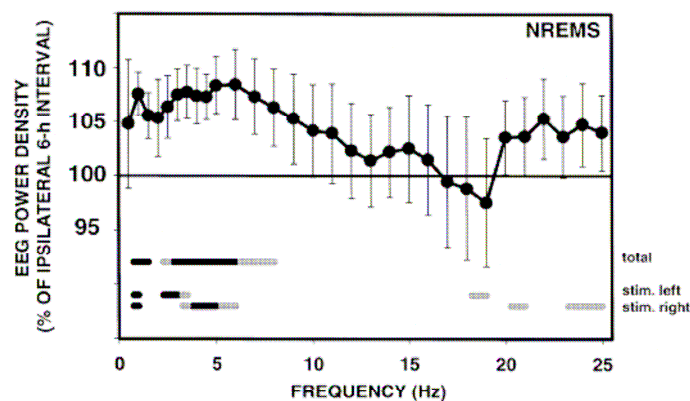


Fig. 10: Densità di potenza del tracciato EEG durante il SWS nell'emisfero controlaterale alle vibrissae intatte espresso in percentuale di potenza relativo all'emisfero ipsilaterale. Le linee sotto l'ascissa indicano i *bins* che differiscono significativamente tra i due emisferi (Vyazovskiy e coll., 2000).

In un recente lavoro Vyazovskiy e Tobler (2008), hanno indagato la relazione tra preferenza manuale e sonno nel ratto. Gli autori hanno messo a punto un apparato che permetteva agli animali di recuperare del cibo attraverso una fessura nella gabbia utilizzando la zampa sinistra o la zampa destra, in base alla dominanza manuale espressa dagli animali. Gli animali erano stati precedentemente suddivisi utilizzando il medesimo apparato in animali con preferenza manuale sinistra o destra (i soggetti che non hanno mostrato una chiara preferenza manuale sono stati utilizzati). L'EEG è stato registrato bilateralmente sia nella corteccia frontale che in quella occipitale. L'EEG di

veglia registrato nelle aree frontali durante il compito ha mostrato un aumento di SWA nell'emisfero controlaterale alla zampa utilizzata per svolgere il compito. Successivamente al compito, è stato registrato il tracciato EEG per 3 ore consecutive di sonno, la SWA durante il SWS nella banda di frequenza tra 0,75 e 4 Hz risultava essere significativamente incrementata nell'emisfero controlaterale alla zampa usata dall'animale per recuperare il cibo, anche in questo caso solamente nelle aree frontali (Fig. 11).

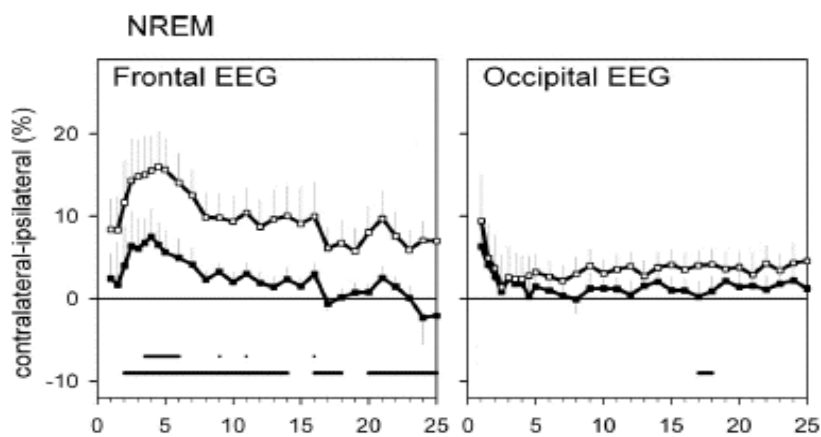


Fig. 11: Densità di potenza del tracciato EEG durante il SWS dell'emisfero controlaterale alla zampa utilizzata per raggiungere il cibo, espresso come percentuale di potenza nell'emisfero ipsilaterale. La linea chiara indica la sessione in cui gli animali potevano mangiare liberamente, mentre la linea scura la sessione in cui gli animali erano sottoposti al compito sperimentale. Le linee sotto l'ascissa indicano i bins in cui è significativa la differenza tra i due emisferi.

Da quest'ultimo esperimento sembra essere evidente anche nel ratto l'aspetto locale e topografico del sonno associato al compito e alle attività della veglia, in relazione ad un compito motorio

5.2 STUDI COMPORTAMENTALI SUL PULCINO: IL SONNO UNIEMISFERICO COME ASPETTO DEL SONNO LOCALE

5.2.1 Introduzione allo studio comportamentale del sonno uniemisferico come esempio del sonno locale.

Lo studio comportamentale del sonno uniemisferico è fondato sull'assunto che la chiusura/apertura di un occhio sia associata con l'asimmetria interemisferica dell'attività EEG (Rattenborg e coll., 2000a). Nello specifico, nel momento in cui il pulcino si trova in una situazione di ipoattività e la sua posizione corporea è quella dello stato di sonno, se si osserva la chiusura unilaterale di un occhio significa che l'emisfero controlaterale sta dormendo (EEG di SWS) mentre l'altro emisfero connesso con l'occhio aperto è sveglio (EEG di veglia). La chiusura/apertura degli occhi è considerata come misura una indiretta dello stato di veglia o di sonno dei due emisferi.

Il primo studio condotto nei nostri laboratori da Mascetti e collaboratori (1999) sul sonno uniemisferico del pulcino domestico (*Gallus gallus*), ha dimostrato che le condizioni di allevamento alle quali sono mantenuti gli animali cioè, con *imprinting* o in isolamento sociale, influenzano il *pattern* di sonno monoculare/uniemisferico e binoculare dei pulcini di sesso femminile durante la prima e seconda settimane di vita. Il sonno binoculare tende a diminuire mentre il sonno Mo-Un ad aumentare con l'età nelle due condizioni di allevamento. Nei pulcini allevati con l'oggetto d'*imprinting*, durante la prima settimana, il sonno Mo-Un sia destro che sinistro, avviene con la stessa frequenza fatta eccezione per il giorno 5 dopo la schiusa durante il quale si registra un' predominanza per il sonno Mo-Un destro (chiusura dell'occhio destro). Durante la seconda settimana dopo la schiusa, il quadro di sonno Mo-Un è simile nelle due condizioni. Ancora per quanto riguarda la prima

settimana, i pulcini allevati con oggetto d'*imprinting* hanno relativamente più sonno Mo-Un destro rispetto ai pulcini allevati senza oggetto d'*imprinting*, effetto che potrebbe essere associato al processo di consolidamento della memoria d'*imprinting* nell'emisfero sinistro.

Quando il colore dell'oggetto d'*imprinting* viene cambiato al giorno 8, si verifica uno spostamento della quantità di sonno a favore del sonno Mo-Un destro. Lo stesso all'ottavo giorno è stato osservato quando l'oggetto d'*imprinting* viene rimosso. Questi due effetti sembrerebbero essere connessi alla dominanza dell'emisfero destro nei compiti di risposta alle novità ambientali (Vallortigara, 2000); il pulcino apre più spesso l'occhio sinistro negli episodi di sonno Mo-Un.

Successivamente sono stati numerosi gli esperimenti utilizzando il pulcino volti ad indagare, da un punto di vista comportamentale, gli effetti sul sonno Mo-Un di compiti di varia natura svolti dall'animale durante la veglia. In seguito verranno descritti più nel dettaglio gli esperimenti condotti nei nostri laboratori, ma è necessario sottolineare alcuni punti di forza che permettono al sonno Mo-Un di essere utile per lo studio delle funzioni del sonno. Il sonno Mo-Un sembra infatti essere la manifestazione del sonno locale in un organismo filogeneticamente lontano dall'uomo e con un assetto cognitivo molto più semplice. Il sonno Mo-Un infatti è costituito solo da SWS, ciò significa che, mentre durante il sonno biemisferico può essere registrato un tracciato EEG di SWS (NREM) oppure di sonno REM, durante il sonno Mo-Un nell'emisfero controlaterale all'occhio chiuso, si registra un tracciato EEG tipico di SWS (Bobbo e coll., 2002). I cambiamenti del quadro comportamentale associati al sonno Mo-Un sono connessi all'attività che l'animale ha svolto durante la veglia. Il sonno Mo-Un (indipendentemente se destro o sinistro) ricopre una percentuale piuttosto bassa sul totale di sonno

mostrato dall'animale (2-4 % circa), ma in quanto è un comportamento mantenuto dalla maggior parte degli uccelli e, come già discusso, da diversi mammiferi marini, può essere senza dubbio essere sostenuta la sua importanza evolutiva ed adattativa.

5.2.2 Sonno uniemisferico e stimolazione luminosa *in ovo*

Bobbo e collaboratori (2002) hanno indagato gli effetti dell'esposizione delle uova alla luce (stimolazione luminosa *in ovo*) durante gli ultimi tre giorni di incubazione sul quadro di sonno Mo-Un e biemisferico. Sono stati utilizzati sia pulcini maschi che femmine, allevati in condizione di isolamento sociale o con oggetto d'*imprinting*, durante i primi 12 giorni di vita.

Durante gli ultimi giorni di incubazione, l'embrione di pulcino è posizionato nell'uovo in modo tale che l'occhio sinistro è coperto dal corpo mentre il destro viene stimolato dalla luce che entra attraverso il guscio dell'uovo. Nei primi due giorni dopo la schiusa, i pulcini provenienti da uova incubate alla luce ed allevati con l'oggetto d'*imprinting*, sembrano mostrare più sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) mentre i pulcini provenienti da uova incubate al buio mostrano più sonno Mo-Un destro (aprono l'occhio sinistro durante gli episodi di sonno Mo-Un). Nei pulcini allevati senza l'oggetto d'*imprinting*, l'effetto dell'incubazione con stimolazione luminosa si estende alle prime 2 settimane dopo la schiusa ma solo nei pulcini di sesso femminile. Per quanto riguarda i pulcini incubati al buio è stato osservato più sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini incubati alla luce. Nei maschi, l'effetto dell'incubazione è simile a quello dei pulcini allevati con oggetto d'*imprinting*. Per concludere la stimolazione luminosa asimmetrica *in ovo* può modulare ma non determinare la direzione dell'apertura/chiusura degli occhi durante il sonno Mo-Un dopo la schiusa; infatti apparentemente, la

modulazione dipende anche dallo stato emotivo e motivazionale dell'animale associato al processo di consolidamento dell'oggetto d'*imprinting*.

5.2.3. Sonno Mo-Un in pulcini di sesso maschile allevati con oggetto d'*imprinting* o in isolamento sociale.

Date le note differenze sessuali presenti in questa specie animale, in particolare il fatto che i pulcini di sesso femminile presentano una maggiore asimmetria comportamentale rispetto ai maschi, Mascetti e collaboratori (2004) hanno condotto uno studio sul sonno Mo-Un dei pulcini di sesso maschile allevati con l'oggetto d'*imprinting* (Pulcini-I) ed in isolamento sociale (senza oggetto d'*imprinting*) (Pulcini-NI). I risultati hanno evidenziato come il tempo trascorso dormendo in sonno binoculare diminuisca gradualmente con l'aumentare dell'età nei due gruppi di pulcini mentre il numero di episodi di sonno binoculare, diminuisca con l'aumentare dell'età nei Pulcini-NI ma, non nei Pulcini-I. Il quadro di sonno Mo-Un, durante la prima settimana dopo la schiusa, nei due gruppi di pulcini, non mostra alcuna preferenza da parte degli animali per il sonno Mo-Un destro o sinistro. Durante la seconda settimana di vita invece, i Pulcini-I mostrano una tendenza verso una maggior quantità di sonno Mo-Un sinistro con un picco al giorno 10 mentre i Pulcini-NI mostrano una tendenza alla chiusura dell'occhio destro, sonno Mo-Un destro, con un picco al giorno 9 e al giorno 11. In un altro gruppo di pulcini di sesso maschile, il cambio del colore dell'oggetto d'*imprinting* al giorno 8, causa uno spostamento della lateralizzazione del sonno in favore del sonno Mo-Un destro. Al contrario, la rimozione dell'oggetto d'*imprinting* al giorno 8 sembra non causare alcun effetto sul quadro di sonno Mo-Un.

5.2.4 Sonno Mo-Un a seguito del cambiamento delle caratteristiche dell'oggetto d'*imprinting* al secondo giorno di vita.

Gli effetti dovuti al cambiamento delle caratteristiche dell'oggetto d'*imprinting* (pallina rossa) o la sua rimozione, sono stati indagati nei pulcini maschi e nelle femmine, al secondo giorno di vita, quando appunto il processo d'*imprinting* è ancora in via di consolidamento (Bobbo e coll., 2006a). In questo lavoro i pulcini sono stati allevati con l'oggetto d'*imprinting* durante il primo giorno dopo la schiusa; al secondo giorno l'oggetto d'*imprinting* è stato rimosso o sono state cambiate le sue caratteristiche percettive (colore). I risultati ottenuti mostrano come al primo giorno, il tempo trascorso dormendo in sonno binoculare sia uguale nei pulcini maschi e femmine, mentre il numero di episodi è inferiore nelle femmine rispetto ai maschi. Inoltre, relativamente al quadro di sonno Mo-Un, non è stata osservata alcuna preferenza significativa per il sonno Mo-Un destro o sinistro. Per quanto riguarda il secondo giorno, i pulcini a cui è stato rimosso l'oggetto d'*imprinting*, mostrano una diminuzione del tempo e del numero di episodi trascorsi dormendo in sonno binoculare rispetto ai pulcini di controllo (allevati con oggetto d'*imprinting*) e ai pulcini a cui sono state modificate le caratteristiche percettive dell'oggetto d'*imprinting*. Relativamente al sonno Mo-Un, i pulcini (maschi e femmine) a cui è stato o rimosso o modificato l'oggetto d'*imprinting*, mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un destro, mentre i pulcini di controllo non mostrano alcuna preferenza. I risultati sembrano mostrare come la rimozione o il cambio dell'oggetto d'*imprinting*, riduca il sonno binoculare e possa in qualche modo causare un *imprinting* secondario (Bolhuis, 1991), coinvolgendo ancora l'emisfero sinistro. L'aumento del sonno Mo-Un destro, potrebbe essere quindi associato al consolidamento in memoria dell'*imprinting* secondario nell'emisfero sinistro.

Tale processo si assocerebbe, a seguito della condizione stressante subite dal pulcino (rimozione o modifica dell'oggetto d'*imprinting*) ad un aumento dell'apertura dell'occhio sinistro associata alla dominanza dell'emisfero destro nei meccanismi di monitoraggio ambientale. È noto infatti che l'emisfero destro è dominante per quanto riguarda l'analisi e la risposta alle novità (Rashid e Andrew, 1989; Vallortigara e Andrew, 1991).

La rimozione dell'oggetto d'*imprinting* al secondo giorno di vita sembrerebbe avere gli stessi effetti della medesima rimozione, già indagata in precedenza, condotta all'ottavo giorno (Mascetti e coll., 1999; 2004); mentre il cambiamento delle caratteristiche dell'oggetto d'*imprinting* sembrerebbe produrre effetti più evidenti al secondo giorno rispetto all'ottavo. Con il passare dei giorni i comportamenti dell'animale si spostano in direzione del monitoraggio e dell'esplorazione ambientale e non più solo in favore dell'interazione con l'*imprinting*. A tale proposito è noto come a livello ecologico, durante la seconda settimana di vita, i pulcini tendono ad allontanarsi dalla chioccia per esplorare l'ambiente (Andrew, 1991).

5.2.5 Sonno Mo-Un ed interazione sociale

In un successivo studio Bobbo e collaboratori (2006b) hanno indagato gli effetti dell'interazione sociale sul quadro di sonno Mo-Un, in pulcini maschi e femmine durante le prime due settimane di vita. L'ipotesi alla base di questo lavoro è stata che il processo d'*imprinting* verso un conspecifico (un altro pulcino presente nella gabbia) potrebbe essere accompagnato da un più intenso coinvolgimento emotivo oppure da un più elevato livello attentivo o di attivazione rispetto all'*imprinting* artificiale (pallina rossa).

Durante la prima settimana dopo la schiusa, i pulcini sono stati allevati in coppia. All'inizio della seconda settimana in metà dei pulcini il conspecifico

veniva mantenuto (CO-chicks) mentre, nell'altra metà il conspecifico veniva rimosso (NCO-chicks). I risultati hanno evidenziato come durante la prima settimana i pulcini di sesso femminile mostrino una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro mentre i maschi non mostrano alcuna preferenza. Durante la seconda settimana, i CO-chicks di entrambi i sessi mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un destro. Le femmine NCO-chicks non mostrano nessuna preferenza per il sonno Mo-Un destro o sinistro mentre i maschi NCO-chicks mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro. In base al ruolo che ha la lateralizzazione cerebrale negli uccelli, la preferenza per il sonno Mo-Un destro o sinistro potrebbe essere associata alla maggior attivazione o dell'emisfero sinistro o di quello destro osservata durante la veglia (Andrew e Brennan, 1985). L'apertura dell'occhio durante il sonno, potrebbe essere connessa o alla maggior attivazione avvenuta durante la veglia oppure associata ai meccanismi di monitoraggio ambientale. Le differenze sessuali emerse in questo studio, potrebbero dipendere dal fatto che i pulcini di sesso femminile sembrano avere una più marcata tendenza affiliativa ed una motivazione sociale maggiore rispetto ai pulcini maschi (Vallortigara, 2000). La presenza del conspecifico potrebbe aver causato nelle femmine un maggiore attaccamento sociale e quindi un alto livello di attivazione emozionale (associata normalmente anche all'oggetto d'*imprinting*). I pulcini maschi mostrano invece un più modesto grado di motivazione sociale (Vallortigara, 1994; Vallortigara, 1992b) e non evidenziano alcuna preferenza per il sonno Mo-Un destro o sinistro: il sonno Mo-Un risulta bilanciato tra i due emisferi.

Questi dati sembrano concordare con i dati presenti in letteratura secondo i quali, durante la seconda settimana di vita, i pulcini inizierebbero ad esplorare maggiormente l'ambiente e si allontanerebbero progressivamente dalla

chioccia (Andrew, 1991). La preferenza dei pulcini maschi per il sonno Mo-Un sinistro, potrebbe essere invece associata a due aspetti comportamentali che vedono l'emisfero destro dominante (Vallortigara, 2000): la risposta alla novità dovuta alla rimozione del con specifico, e l'analisi delle caratteristiche topografiche associate al comportamento esplorativo.

5.2.6 Sonno uniemisferico e apprendimento di esitamento passivo (*Passive Avoidance Learning* (PAL))

Il neurobiologo Art Cherkov negli anni settanta mise a punto un metodo di apprendimento rapido, costituito da una sola prova, che consentiva di studiare i processi di consolidamento della memoria nei pulcini. La procedura del PAL consiste nel presentare al pulcino una perlina di colore rosso, posta all'estremità di un'asticciola di metallo. Questo stimolo provoca rapidamente nell'animale la risposta di beccata. In seguito, la perlina viene intinta in una sostanza sgradevole al gusto e all'olfatto, il metilantranilato (MeA) che fa scatenare nel pulcino una serie di comportamenti di disgusto. In una sola prova il pulcino memorizza le caratteristiche visive della pallina e sopprime la risposta di beccata verso questo stimolo. L'apprendimento viene detto *passivo* perché l'animale deve imparare ad evitare di fornire la risposta di beccata (Vallortigara, 2000).

In seguito ad una prova di *passive avoidance learning* (PAL), si riscontrano numerosi cambiamenti metabolici, morfologici e neurofisiologici a livello del nucleo IMHV ed in una parte del complesso paleostriato, il *lobo paraolfattorio* (LPO), strutture molto importanti per il consolidamento della traccia mestica. Il sonno Mo-Un a seguito di PAL è stato studiato in tre gruppi di pulcini (Bobbo e coll., 2007a). Ad un gruppo di animali (Gruppo Sperimentale) è stata presentata la perlina imbevuta nel metilantranilato. Ad un secondo gruppo

(Gruppo Controllo 1) è stata presentata la perlina imbevuta solo in acqua e ad un terzo gruppo (Gruppo Controllo 2) non è stata presentata alcuna perlina.

I risultati mostrano come il tempo trascorso dormendo in sonno binoculare ed il numero di episodi di sonno binoculare erano inferiori nel gruppo sperimentale rispetto ai gruppi di controllo. Per quanto riguarda il sonno Mo-Un, il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un è risultato maggiore nel Gruppo Sperimentale e progressivamente inferiore passando dal Gruppo Controllo 1 al Gruppo Controllo 2. Nello specifico, il Gruppo Sperimentale trascorre più tempo in sonno monoculare sinistro rispetto agli altri due gruppi, in particolare se confrontato con il Gruppo Controllo 2. Relativamente al sonno monoculare destro, il Gruppo Sperimentale mostra un tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro significativamente maggiore rispetto a gruppi di controllo. Per concludere i pulcini di tutti i gruppi mostravano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro mentre non è stata osservata alcuna modificazione del quadro di lateralizzazione del sonno Mo-Un associata all'apprendimento. I risultati sembrano confermare la funzione di monitoraggio ambientale già associata al sonno Mo-Un.

5.2.7 Sonno uniemisferico ed apprendimento di discriminazione visiva.

Mascetti e collaboratori (2007) hanno indagato il quadro di sonno Mo-Un cioè, a seguito dell'apprendimento di tre tipi di compito visivo. Un primo gruppo di pulcini di sesso femminile è stato sottoposto ad un compito di discriminazione di colore (verde/rosso); un secondo gruppo ad un compito di apprendimento spaziale con il colore come indizio presente ma irrilevante ed un terzo gruppo di pulcini ad un compito di apprendimento spaziale puro (senza altro indizio che la posizione spaziale destra/sinistra). I risultati ottenuti dall'indagine del quadro di sonno dopo apprendimento, mostrano come i

pulcini del primo e secondo gruppo trascorrono più tempo dormendo in sonno Mo-Un destro (chiusura dell'occhio destro/sonno uniemisferico sinistro, dominanza emisferica sinistra). I pulcini del terzo gruppo invece mostrarono di trascorrere più tempo in sonno Mo-Un sinistro (chiusura dell'occhio sinistro/sonno uniemisferico destro, dominanza emisferica destra).

I pulcini dei gruppi di controllo, non dovevano apprendere i compiti, ma stati comunque sottoposti allo stesso numero di prove degli sperimentali. I controlli del primo e del secondo gruppo mostrarono più sonno Mo-Un sinistro, mentre i controlli del terzo gruppo non mostrarono alcuna preferenza per la chiusura dell'occhio destro o sinistro durante il sonno Mo-Un. Alla luce di tali risultati stata avanzata l'ipotesi che il quadro di sonno Mo-Un sarebbe associato ai processi di recupero funzionale e consolidamento della traccia mestica che dovrebbero avvenire durante il successivo sonno Mo-Un nell'emisfero dominante per il compito al quale l'animale è stato sottoposto.

Capitolo VI

IL SONNO UNIEMISFERICO: EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE DI SONNO

6.1 INTRODUZIONE

6.1.1 Il paradigma sperimentale di privazione di sonno

Il paradigma sperimentale di privazione di sonno è da tempo riconosciuto come una delle principali metodiche che permettono di indagare le funzioni del sonno. Questo paradigma fa parte di quelli che vengono definiti *paradigmi dell'estirpazione*, in quanto consistono nell'eliminare, estirpare un organo o una funzione corporea o psicologica al fine di osservarne in modo indiretto la funzione. Il paradigma di privazione di sonno è una variante comportamentale dei paradigmi di estirpazione, applicato allo studio del sonno e delle sue funzioni.

Secondo Ferrara (1998) possiamo suddividere le metodiche di privazione di sonno in tre categorie:

- *Deprivazione Totale di Sonno (DTS)*: consiste nel privare di sonno i soggetti in modo continuo ed indifferenziato. In questa condizione i soggetti devono restare completamente svegli per tutto il tempo richiesto dall'esperimento;
- *Deprivazione Parziale di Sonno (DPS)*: consiste nella riduzione della durata complessiva del sonno, anche in questo caso in modo indifferenziato, senza cioè distinguere tra i vari stadi del sonno;
- *Deprivazione Selettiva di Sonno (DSS)*: consiste nell'applicare una metodologia, per ovvie ragioni, accoppiata all'EEG che permetta di privare

selettivamente il soggetto degli stadi di sonno che interessa eliminare, quindi stadio 1 o 2 o 3 o 4 o REM.

6.1.2 Studi sull'uomo e sui mammiferi

La prima applicazione sperimentale sull'uomo degna di nota, del paradigma di deprivazione di sonno, risale agli studi condotti nel 1886 da Patrick e Gilbert. In questo esperimento due soggetti di sesso maschile di 24 e 27 anni, vennero sottoposti ad una deprivazione totale di sonno per 90 ore consecutive. Durante la deprivazione i soggetti non riferirono nessun tipo di malessere particolare. I ricercatori hanno osservato una massiccia presenza di microsogni², ed entrambi i soggetti ebbero problemi nel restare svegli, mostravano un picco di massima sonnolenza alle 5 del mattino. Vennero osservati problemi in tutti i test cognitivi somministrati, principalmente nei compiti di addizione, riconoscimento di lettere e nei tempi di reazione. A livello corporeo, si verificò una diminuzione della temperatura corporea di 0.2-0.4 C°. Il risultato più interessante riguardò il recupero di sonno al termine della deprivazione. La notte successiva all'esperimento, i soggetti recuperarono rispettivamente il 16% e il 35% circa del sonno totale perso. Principalmente, il sonno recuperato apparteneva agli stadi 3 e 4 (Horne, 1993).

In seguito a queste prime evidenze, sono stati prodotti molti altri studi, che utilizzavano il paradigma di deprivazione di sonno.

Kleitman (1963) descrisse come la sonnolenza fosse presente trasversalmente in tutti i soggetti osservati e sottoposti a deprivazione di sonno, quest'ultima si presentava principalmente durante le prime ore del mattino, (Pinel, 2000). Anche alla luce di questi risultati molti autori hanno cercato di evidenziare i possibili effetti fisiologici causati della deprivazione di sonno, ma vi sono

² I microsogni sono brevi periodi (2 o 3 secondi) durante i quali le palpebre si abbassano e i soggetti diventano meno reattivi alla stimolazione esterna, benché possano restare seduti o in piedi.

scarse prove a favore del fatto che la deprivazione di sonno, anche se prolungata, possa produrre qualsiasi tipo di marcata alterazione fisiologica (Palomba e Stegagno, 2004). Il sonno sembra infatti essere indispensabile per il cervello, ma non necessariamente per l'organismo (Horne, 1993).

Per quanto riguarda la compromissione cognitiva prodotta dalla deprivazione di sonno, bisogna compiere un'essenziale distinzione tra compiti cognitivi complessi e compiti cognitivi passivi. I primi sembrano essere svolti senza particolari difficoltà dai soggetti deprivati, mentre per quanto riguarda i compiti cognitivi passivi, è sufficiente una deprivazione di sonno di poche ore per compromettere lo svolgimento del compito probabilmente a causa dell'incapacità da parte dei soggetti di far fronte alla sonnolenza. Siegel (2003) afferma che riduzioni della durata di sonno, anche se piccole, producono nell'uomo un progressivo incremento della sonnolenza durante la veglia, in quanto il cervello si sforza di riparare al debito di sonno. Le funzioni mnestiche sembrano essere quelle principalmente compromesse dalla deprivazione di sonno. Nei soggetti deprivati la memoria di lavoro, testata durante il periodo di deprivazione, evidenzia notevoli difficoltà (Horne, 1993). Sembra inoltre che la prima notte di sonno sia indispensabile per l'apprendimento dei compiti svolti (Maquet, 2000) anche se è ancora poco chiaro quale o quali stadi di sonno siano principalmente coinvolti. Il SWS e, più precisamente gli stadi 3 e 4, sembrano i primi ad essere recuperati dopo un periodo di deprivazione totale. A questo dato ha da sempre portato credito alle teorie ristorative del sonno. La deprivazione selettiva del sonno REM causa un altrettanto recupero di quest'ultimo nelle notti successive. Questa separazione relativa al recupero tra REM e non-REM suggerisce che i meccanismi che controllano il sonno REM e il sonno NREM siano separati e le loro funzioni differenti (Pinel, 2000), sembra inoltre che il cervello umano possa adattarsi a

dormire fino ad un minimo di 4 ore per notte senza che ciò determini disturbi dello stato di allerta o delle funzioni cognitive in generale (Belenky e coll., 2003).

La privazione di sonno è per definizione una condizione stressante ma, se l'uomo sembra sopportarla bene, non è la stessa cosa per gli animali. Le tecniche utilizzate per privare gli animali di sonno, sconvolgono completamente le loro abitudini di vita e sono per gli animali stessi incomprensibili. Inoltre, per ovvie ragioni, è impossibile comunicare con gli animali per rassicurarli e facilitare il loro rilassamento o sollevarli dalle eventuali frustrazioni. Quindi, sebbene sia possibile provocare negli animali deprivazioni di sonno di durata notevolmente maggiore che nell'uomo, è opportuno tenere sempre in considerazione che i dati ottenuti risentono notevolmente degli stress aggiuntivi (Horne, 1993).

Per quanto riguarda i mammiferi non umani, nel 1984 Manacéine propose il primo interessante studio di deprivazione di sonno condotto su animali e più precisamente su cuccioli di cane. I cuccioli venivano tenuti svegli per circa 4-6 giorni facendoli camminare o manipolandoli. Al termine dell'esperimento vennero riscontrati: un aumento di 4 C° della temperatura corporea, la diminuzione del numero di globuli rossi e, in sede autoptica, la presenza di numerose piccole emorragie a livello cerebrale; il limite di questi studi fu l'assenza di gruppi di controllo. Kleitman nel 1963 introdusse i gruppi di controllo nelle sue ricerche di deprivazione di sonno. Nel suo esperimento i cuccioli vennero tenuti svegli per 2-7 giorni facendoli camminare e giocare, ma tendenzialmente dopo il 4° giorno, la maggior parte degli animali perdeva interesse per l'ambiente circostante e smetteva di bere e mangiare regolarmente. Al termine dell'esperimento, vennero confrontati alcuni parametri fisiologici dei soggetti deprivati di sonno con quelli dei soggetti

appartenenti al gruppo di controllo. Sorprendentemente non furono trovate differenze significative se non riguardanti la quantità di globuli rossi, che sembrava essere minore nei cuccioli deprivati di sonno. L'esame autoptico del cervello rilevò anomalie identiche per entrambi i gruppi. Altri ricercatori, vollero tentare di determinare la quantità minima di sonno affinché i ratti utilizzati nei loro laboratori potessero sopravvivere. Basandosi sulla considerazione che la durata media degli episodi di sonno nei ratti in condizioni normali era di circa 12 ore condussero degli studi per osservare quale fosse la quantità minima di deprivazione che permettesse ai ratti di sopravvivere, vennero costituiti diversi gruppi e l'esperimento continuò per diverse settimane. I risultati mostrarono che in media i ratti resistevano alla deprivazione totale di sonno per 4-12 giorni prima di morire, ma il dato più interessante è stato che i ratti che dormivano solo 4 ore al giorno, potevano continuare in quella condizioni indefinitamente. In un secondo esperimento vennero, confrontati un gruppo di ratti a cui era consentito dormire solo per 4 ore e un gruppo di ratti di controllo, cioè senza restrizione di sonno. Vennero successivamente registrate le capacità di apprendimento e la velocità di crescita di questi animali ma non vennero riscontrate differenze. Per quanto riguarda invece la velocità di crescita, i ratti che dormivano solo 4 ore, già dopo i primi giorni di deprivazione, mostravano un diminuito accrescimento della massa corporea, al contrario i soggetti di controllo che crescevano regolarmente.

La deprivazione di sonno in questi primi studi consisteva essenzialmente nel far svolgere agli animali delle attività forzate per l'intero periodo di deprivazione, ma successivamente gli studi sulla deprivazione di sonno utilizzarono metodi più avanzati e generalmente accoppiati con registrazioni EEG (Horne, 1993).

Rechtschaffen e collaboratori (1983), sottoposero gruppi di ratti a due tipi di privazione: privazione totale di sonno e privazione di sonno REM. Utilizzarono un apparato costituito da una piattaforma rotante circolare, messa in posizione orizzontale e circondata da acqua. La piattaforma era divisa a metà da una barriera verticale che permetteva di mantenere, da una parte un animale in stato di privazione di sonno e dall'altra un animale di controllo. Quando l'animale in stato di privazione si addormentava, la piattaforma girava facendolo cadere in acqua e risvegliandolo. Anche l'animale di controllo cadeva in acqua quando la piattaforma girava, ma questo non combaciava necessariamente con il periodo in cui il soggetto stava dormendo. L'EEG di entrambi gli animali era continuamente registrato per mezzo di un computer (Pinel, 2000). Durante la DTS, gli animali di controllo persero circa il 25% del loro sonno contro il 92% del gruppo sperimentale. I soggetti del gruppo sperimentale morirono dopo 21 giorni circa di DTS. In entrambi i gruppi, controllo e sperimentale, sembrava che gli animali consumassero maggiori quantità di cibo, ma contemporaneamente perdessero peso. Questo effetto potrebbe essere un meccanismo compensativo dovuto ad un aumento del metabolismo e ad un maggiore dispendio energetico (circa 2.5 volte il livello basale) durante la DTS. Un altro interessante risultato mostrò che la temperatura corporea dei soggetti appartenenti al gruppo sperimentale, diminuiva sensibilmente durante gli ultimi giorni di privazione, forse a causa di una compromissione dei meccanismi termoregolatori. In generale, dopo circa 7-8 giorni di privazione, le condizioni fisiche dei ratti del gruppo sperimentale erano notevolmente peggiorate. Durante gli esperimenti di privazione di sonno REM, la piattaforma ruotava solo quando i soggetti del gruppo sperimentale mostravano i tracciati EEG e EMG tipici del sonno paradossale. Nei soggetti sperimentali venne osservata la perdita del 99% del

sonno REM, contro solo il 4% nei soggetti di controllo. Gli effetti rilevati mostrarono che anche la deprivazione costante di sonno REM, portava i soggetti alla morte, ma era necessario il doppio del tempo rispetto ai soggetti sottoposti a DTS: circa 37 giorni. Anche in questo caso i soggetti aumentavano l'assunzione di cibo e in generale gli effetti della deprivazione di sonno REM furono simili a quelli della DTS. Rechtschaffen e collaboratori (1983) conclusero che il sonno serve al mantenimento dell'omeostasi dei tessuti corporei e cerebrali e che, la deprivazioni a lungo termine di sonno, conduce a seri disturbi fisiologici ed eventualmente alla morte.

Recentemente, in uno studio sui ratti, è stato osservato che l'aumento del tasso metabolico e la perdita di peso a seguito di privazione di sonno REM possano essere correlati con l'età dei soggetti. Questo fatto implicherebbe un coinvolgimento del sonno REM in meccanismi di crescita corporea durante lo sviluppo.

Numerosi sono anche gli studi condotti utilizzando il paradigma di deprivazione di sonno, allo scopo di valutare una possibile implicazione di quest'ultimo nei meccanismi di consolidamento della memoria. Questo argomento verrà però trattato e chiarito più avanti.

6.1.3 Studi di deprivazione di sonno nel modello animale del pollo domestico

L'unico esperimento di deprivazione di sonno che possiamo annoverare nell'ambito delle ricerche sul sonno uniemisferico nel modello animale del pollo domestico (*Gallus gallus*), è quello condotto recentemente da Boerema e collaboratori (2003). In questo lavoro gli autori hanno voluto investigare il quadro di sonno uniemisferico e biemisferico dopo deprivazione prolungata di sonno. Secondo gli autori, nel momento in cui gli animali si fossero trovati in

condizioni di bisogno di sonno dovuto a deprivazione avrebbero potuto sacrificare la funzione di vigilanza antipredatoria assicurata dal sonno uniemisferico (Rattenborg e coll., 1999a) al fine di potersi dedicare ad un recupero migliore sulla base dell'ipotesi che la deprivazione di sonno produrrebbe un elevato bisogno di quest'ultimo (Tobler, 1984; Borbely, 1982). Sono state utilizzate 7 femmine di pollo domestico, appartenenti al ceppo *White Leghorn* di età compresa tra 20 e 22 settimane. Il ciclo luce-buio era prodotto artificialmente e caratterizzato da 6 ore di buio, 2 ore di oscurità e 14 ore di luce. Il periodo di oscurità è stato mantenuto in quanto secondo gli autori è in questa condizione che il sonno monoculare si mostra con maggior frequenza. Durante l'esperimento gli animali erano inseriti, due alla volta, nelle gabbie di osservazione con acqua e cibo disponibile *ad libitum*.

La procedura di privazione di sonno aveva la durata di 14 ore, iniziava in corrispondenza del periodo di luce e consisteva nella presentazione di stimoli visivi o uditivi non appena gli animali mostravano segni di addormentamento. Nelle gabbie veniva osservato un solo pollo, mentre l'altro fungeva da conspecifico, al fine di ridurre lo stress dovuto all'isolamento sociale. Immediatamente dopo la deprivazione attraverso una telecamera veniva osservato comportamentalmente il sonno. Le variabili registrate e analizzate consistevano nella durata e nel numero di episodi di sonno binoculare e monoculare senza distinzione tra monoculare sinistro o destro. I risultati sembravano confermare le ipotesi degli autori secondo cui il sonno Mo-Un diminuiva in favore del sonno biemisferico.

Alcuni aspetti metodologici poco pertinenti a quella che è la ricerca sul modello animale del pulcino domestico emergono chiaramente in questo lavoro: gli animali sono stati testati a 20-22 settimane dopo la schiusa, benché i dati più consistenti sul sonno Mo-Un provengano da studi effettuati su

pulcini che non superavano le 2 settimane di vita (Rogers, 1995; Mascetti e coll., 1999, 2004; Bobbo e coll., 2002). Questa scelta non solo non permette un confronto con i risultati già presenti in letteratura, ma allontana una possibile indagine delle tappe di sviluppo e delle asimmetrie cerebrali descritte in questo animale, che è noto si attestano nelle prime due settimane in quanto asimmetrie emisferiche in senso stretto (Vallortigara, 1994). Un altro punto poco chiaro è la scelta di utilizzare dati precedentemente registrati sullo stesso animale come controllo. Non si conosce infatti l'andamento del sonno di polli adulti tra la ventesima e la ventiduesima settimana di vita, ma è stato ampiamente descritto che pulcini nelle prime due settimane di vita modificano il quadro di sonno giorno dopo giorno, e questo potrebbe accadere anche all'età considerata in questo studio. Per concludere la tecnica di deprivazione utilizzata potrebbe non essere pienamente efficace in quanto, a seguito della presentazione di continui stimoli visivi ed uditivi, il soggetto potrebbe mostrare un fenomeno di abitazione, tale per cui gli stimoli stessi non assolverebbero più alla loro funzione di elementi disturbanti. Ci potrebbe essere anche un fenomeno di analisi e apprendimento diretto verso gli stimoli visivi e uditivi presentati che coinvolgerebbe principalmente un emisfero piuttosto che l'altro e avrebbe delle ripercussioni sul quadro di sonno successivamente mostrato dai soggetti.

6.2 RICERCA SPERIMENTALE

6.2.1 Ipotesi e obiettivi

In questo lavoro viene proposta una differente e ulteriore applicazione del paradigma di deprivazione di sonno, adattato al modello animale del pulcino di pollo domestico (*Gallus gallus*), che in qualche modo cerca di ovviare ai punti deboli precedentemente avanzate sull'esperimento di Boerema e collaboratori (2003).

L'obiettivo principale è di indagare i possibili cambiamenti qualitativi e quantitativi del quadro di sonno uniemisferico e biemisferico successivo a deprivazione di sonno e registrare eventuali modificazioni nella direzione della lateralizzazione del sonno. A tale proposito, dal momento che è noto dalla letteratura relativa al sonno Mo-Un che il quadro di sonno sia uniemisferico che biemisferico si modifica dipendentemente dall'età di sviluppo dell'animale e dalle tappe evolutive che il pulcino sta vivendo, sono stati condotti due esperimenti uno con pulcini di 11 giorni d'età (Bobbo e coll., 2008) e un altro con pulcini di 5 e di 8 giorni (Bobbo e coll., 2009). Sappiamo che con il trascorrere dell'età il tempo trascorso dormendo in sonno binoculare diminuirebbe inoltre, è stato più volte descritto come pulcini all'undicesimo e all'ottavo giorno di vita mostrino una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) associata all'esplorazione comportamentale che avviene durante la seconda settimana di vita. Mentre è altrettanto noto come al quinto giorno di vita gli animali mostrino una lateralizzazione del sonno in direzione del sonno uniemisferico sinistro (sonno Mo-Un destro) associata all'elaborazione degli stimoli oggettuali basata su categorie che avviene durante la prima settimana di vita.

L'ipotesi di partenza quindi è che successivamente alla deprivazione totale di sonno il quadro di sonno sia biemisferico che uniemisferico potrebbe essere influenzato a livello quantitativo, mostrando un aumento o una diminuzione della quantità totale di sonno Mo-Un (destra o sinistra) o di sonno biemisferico. Altrettanto potrebbero essere osservate modificazioni di tipo qualitativo che potrebbero interessare principalmente o il quadro di sonno uniemisferico oppure quello biemisferico. La direzione della lateralizzazione del sonno potrebbe quindi cambiare rispetto all'assetto già conosciuto.

Un ulteriore obiettivo è stato quello di validare la metodica di deprivazione utilizzata, che consiste nel costringere l'animale ad un'attività forzata, camminare, utilizzando un *tapis roulant* costruito appositamente per questo modello animale.

In ultima analisi, questi esperimenti permetteranno di portare ulteriori dati a favore della ipotesi avanzata in questa tesi che considera il sonno uniemisferico nel pulcino domestico come possibile espressione del sonno locale.

6.3 EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE DI SONNO NEL PULCINO ALL'UNDICESIMO GIORNO DI VITA

6.3.1 Soggetti

Sono stati utilizzati 24 pulcini di pollo domestico (*Gallus gallus*) di sesso femminile all'undicesimo giorno di vita appartenenti al ceppo *Hybro*. Le uova provenivano dall'incubatoio commerciale "Agricola Berica" di Montegalda, Vicenza, Italia. Le uova sono state incubate al buio nei nostri laboratori in un incubatrice automatica 79/100 MG 100H FIEM snc (45x58x43 cm). La temperatura (37,7°) e l'umidità (circa 50-60 %) erano mantenute costanti. Sono stati utilizzati pulcini di sesso femminile all'undicesimo giorno di vita in quanto mostrano un quadro di sonno consistente e uno stabile comportamento alimentare. Inoltre, a quest'età, i pulcini mostrano una chiara preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (sonno emisfero destro), una massa corporea e abilità locomotorie sufficienti per essere sottoposti a deprivazione di sonno. Per ultimo, le uova sono state incubate al buio al fine di evitare che la stimolazione luminosa potesse alterare alcuni aspetti della lateralizzazione cerebrale (Rogers, 1995) e del quadro di sonno uniemisferico (Bobbo e coll., 2002).

6.3.2 Apparato sperimentale

La deprivazione di sonno avveniva costringendo gli animali ad un'attività forzata, camminare, all'interno di un *tapis roulant* appositamente costruito. Tale procedura è stata scelta in quanto "il camminare" rappresenta un'attività naturale per il pulcino e di conseguenza non particolarmente stressante. Inoltre, un esperimento pilota, condotto in precedenza aveva mostrato come altri tipi di deprivazioni, quali una delicata manipolazione o la presentazione

di stimoli visivi e uditivi, causassero abitazione nell'animale e non servissero allo scopo. Il *tapis roulant* (Fig. 12 e 13), di dimensioni 45×24×27cm, era mosso da un motore elettrico ad una velocità di 0.06 m/s. Sopra la cinghia motrice del *tapis roulant* era posizionata una struttura in crilex. Quest'ultima è stata divisa in due compartimenti, della dimensione 17.5×15.5×27 ciascuno, nei quali venivano posti i pulcini. La superficie interna dei due compartimenti era rivestita da un tessuto semitrasparente che fungeva da schermo unidirezionale. All'interno di entrambe le celle erano sistemati due recipienti di colore neutro (bianco), contenenti cibo ed acqua. Inoltre in ciascun compartimento, è stato mantenuto l'oggetto d'*imprinting* (un ovale di plastica rosso di dimensioni 4×3×3 cm) al fine di ridurre lo stress derivante dall'isolamento sociale e dalla rimozione di tale oggetto (Mascetti e coll., 1999; 2004).

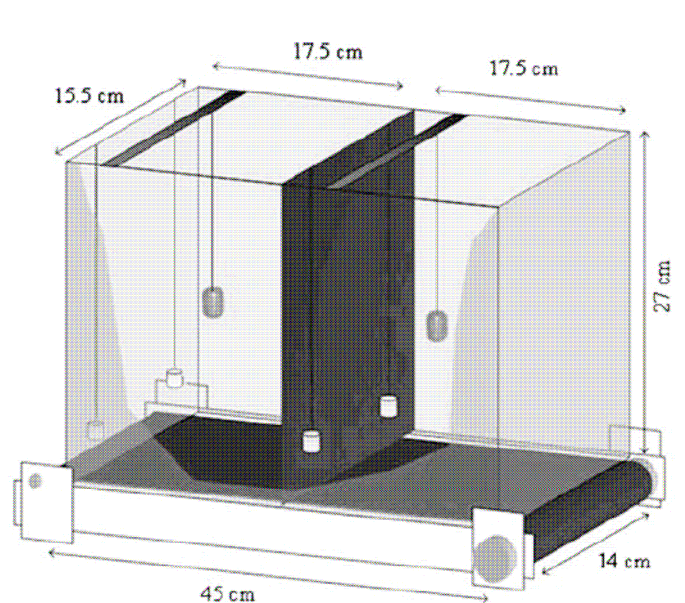


Fig. 12: Rappresentazione schematica del *tapis roulant* utilizzato per la deprivazione di sonno (Bobbo e coll., 2008).



Fig. 13: Immagini fotografiche dei pulcini durante una sessione di deprivazione di sonno.

L'apparato utilizzato per la stabulazione, l'allevamento e l'osservazione del sonno (Fig. 14 e 15) era costituito da due gabbie di vetro con base quadrata e di dimensioni 40x40x30 cm, rivestite internamente da tessuto semitrasparente che fungeva da schermo unidirezionale. In ciascuna gabbia erano posizionati due recipienti di vetro trasparente di circa 5 cm di diametro, contenenti uno acqua e l'altro cibo. L'acqua e il cibo erano forniti ai soggetti durante tutto il corso dell'osservazione. Le gabbie erano mantenute ad un regime di luce continuo, illuminate ognuna con una lampadina da 60 Watt posta in posizione centrale ad un'altezza di circa 30 cm dal fondo della gabbia. L'oggetto d'*imprinting* era costituito da un ovale di plastica di colore rosso e dimensioni 4x3x3 cm sospeso, mediante un filo, al centro della gabbia.

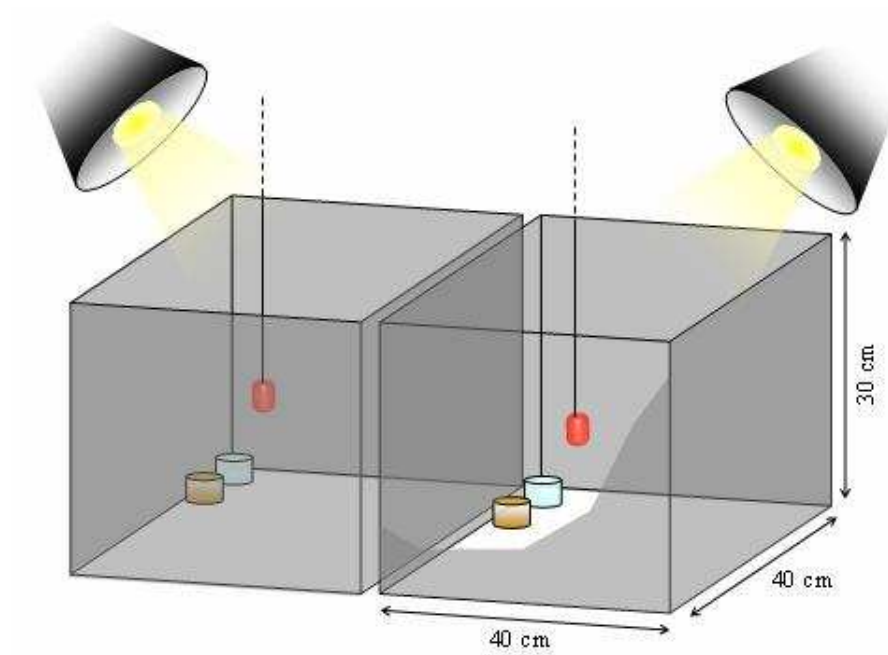


Fig. 14: Rappresentazione schematica dell'apparato per l'allevamento e l'osservazione del sonno

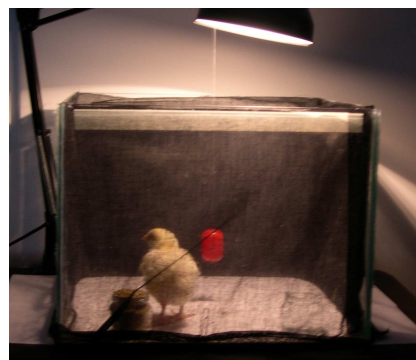
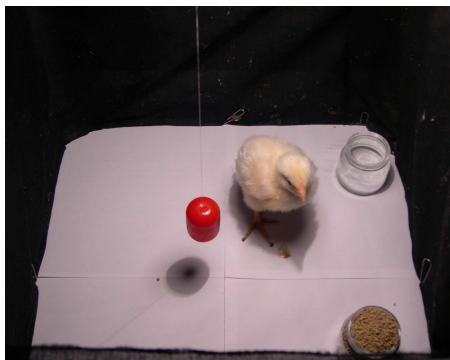


Fig. 15: Foto dei pulcini durante l'osservazione del sonno

6.3.3 Procedura

Subito dopo la schiusa i pulcini venivano stabulati singolarmente nelle gabbie di osservazione e stabulazione (Fig. 14 e 15) del sonno con acqua e cibo *ad libitum*. All'undicesimo giorno dopo la schiusa alcuni animali venivano sottoposti alla procedura di deprivazione di sonno che consisteva nel costringere i pulcini a camminare all'interno del *tapis roulant*. Un primo gruppo di pulcini ($n = 8$) era sottoposto a otto ore di deprivazione di sonno (DEP-8H). Durante la sessione di deprivazione (dalle 8:00 a.m. alle 4:00 p.m.) venivano utilizzati due animali e posizionati ciascuno in un settore del *tapis roulant*, entrambi erano deprivati per la stessa quantità di sonno. Terminato il compito di deprivazione, i pulcini venivano rimessi nelle gabbie d'osservazione dove, per 6 ore consecutive, venivano registrati i quadri di sonno di ciascun animale (dalle 4:00 p.m. alle 10:00 p.m.). Un secondo gruppo di animali (N-DEP1, $n = 8$) fungeva da gruppo di controllo. I pulcini erano mantenuti nelle gabbie allevamento e osservazione per tutta la durata della deprivazione (dalle 8:00 a.m. alle 4:00 p.m.) alla quale era sottoposto il gruppo DEP-8H, agli animali era concesso di dormire liberamente. Anche per questo gruppo l'osservazione del sonno aveva la durata di 6 ore consecutive (dalle 4:00 p.m. alle 10:00 p.m.). E' stato inoltre deciso di costituire un secondo gruppo di controllo (N-DEP2, $n = 8$) formato da animali che venivano inseriti nel *tapis roulant* per il medesimo periodo e allo stesso orario del gruppo DEP-8H, ma ai quali era permesso di dormire liberamente in quanto l'apparato di deprivazione veniva mantenuto spento. Successivamente veniva registrato il quadro di sonno per 6 ore anche per questo gruppo di pulcini (dalle 4:00 p.m. alle 10:00 p.m.) (Fig. 16). Grazie agli animali del gruppo N-DEP2 era possibile svolgere un controllo più attendibile sui possibili effetti che l'interazione con un nuovo ambiente avrebbe prodotto sul sonno.

ripetute con i tre gruppi (N-DEP1, N-DEP2 e DEP-8H) come fattori tra i soggetti (*between-subject*) e gli episodi di sonno Mo-Un destro o sinistro come fattore entro i soggetti (*within-subject*). Le medie eventualmente riportate sono fornite di deviazione standard (*standard deviations* –SD). Prima di compiere le analisi statistiche è stata verificata la normalità della distribuzione dei dati e l'omogeneità della varianza.

6.3.5 Risultati e discussione

Tempo totale trascorso dormendo

Dal momento che il confronto tra i pulcini dei gruppi di controllo N-DEP1 e N-DEP2 non è risultato significativo ($t_{(14)}= 1.118, p=.283$), è stato utilizzato solo il gruppo N-DEP1 come gruppo di controllo per le successive analisi. Durante il sonno successivo alla deprivazione, il gruppo di pulcini DEP-8H mostrano una maggior quantità di tempo trascorso dormendo in sonno totale (sonno Bin e sonno Mo-Un) rispetto ai pulcini del gruppo di controllo N-DEP1 ($t_{(14)}= 5.168, p<.001$).

Sonno binoculare

Per quanto riguarda il tempo totale trascorso dormendo in sonno Bin e la durata media degli episodi di sonno Bin, il confronto tra i gruppi N-DEP1 e N-DEP2 è risultato non significativo (rispettivamente: $t_{(14)}= 1.112, p=.285$, $t_{(14)}= 1.998, p=.066$). Anche in questo caso è stato deciso di utilizzare per le successive analisi solo il gruppo di controllo N-DEP1.

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Bin (calcolato in secondi) è rappresentato in Fig. 17. Durante il periodo di sonno successivo alla

deprivazione i pulcini del gruppo DEP-8H dormono significativamente di più in sonno Bin rispetto ai pulcini del gruppo N-DEP1 ($t_{(14)}= 5.182, p<.001$).

La durata media degli episodi di sonno Bin (calcolato in secondi) è rappresentata in Fig. 18. Durante il periodo di sonno successivo alla deprivazione i pulcini del gruppo DEP-8H mostrano una durata media degli episodi di sonno Bin significativamente maggiore rispetto ai pulcini del gruppo N-DEP1 ($t_{(14)}= 4.607, p<.001$).

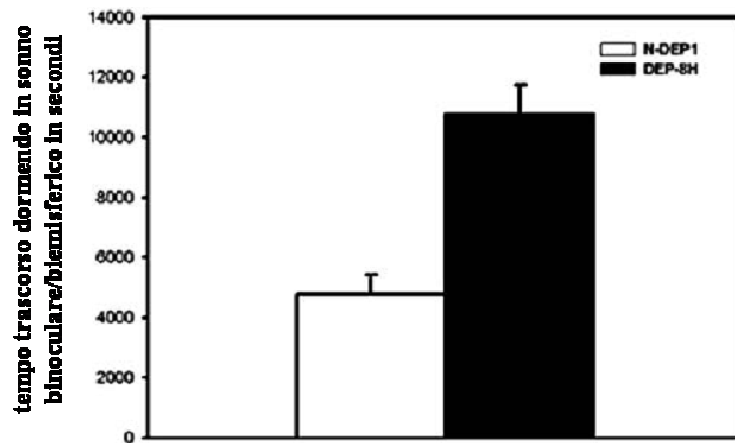


Fig. 17: Rappresentazione grafica del tempo trascorso dormendo in sonno binoculare in secondi.

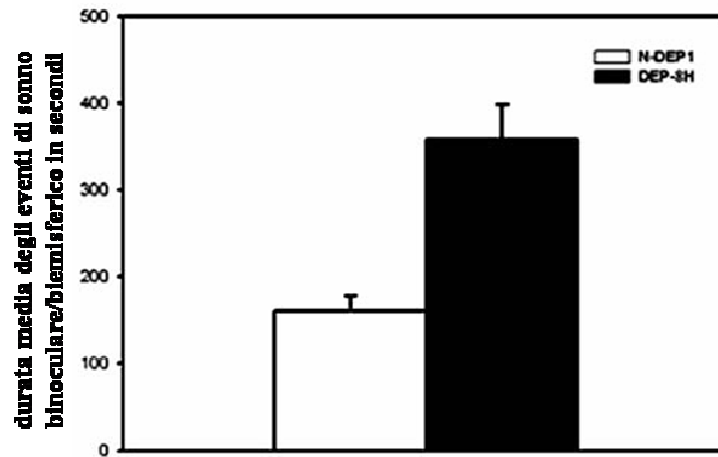


Fig. 18: Rappresentazione grafica della durata media degli episodi di sonno binoculare in secondi.

Sonno monoculare

Il numero di episodi di sonno Mo-Un (destra, sinistra e totale) è rappresentato in Fig. 19. Dall'analisi separata condotta sul numero di episodi di sonno Mo-Un sinistro e destro è emerso che il gruppo N-DEP1 mostra un numero significativamente maggiore di episodi trascorsi in sonno Mo-Un sinistro (paired t test, $t_{(7)} = 5.518$, $p = .001$), mentre il gruppo di pulcini DEP-8H mostrano un maggior numero di eventi in sonno Mo-Un destro ($t_{(7)} = 2.639$, $p = .033$). Nessuna differenza significativa è stata osservata nei pulcini del gruppo N-DEP2 ($t_{(7)} = 1.062$, $p = .323$). L'ANOVA mostra una differenza significativa tra i gruppi DEP-8H, N-DEP1 e N-DEP2 per quanto riguarda il numero di eventi in sonno Mo-Un sinistro ($F_{(2,21)} = 7.777$, $p = .003$). L'analisi post-hoc ha evidenziato che il gruppo di pulcini DEP-8H mostra un numero significativamente minore di eventi in sonno Mo-Un sinistro rispetto al gruppo N-DEP1 ($p = .001$). Nessuna differenza significativa è stata osservata per quanto riguarda gli episodi in sonno Mo-Un destro ($F_{(2,21)} = 2.844$, $p = .081$). L'ANOVA a misure ripetute con i tre gruppi (N-DEP1, N-DEP2 e DEP-8H)

come fattori tra i soggetti (*between-subject*) e gli episodi di sonno Mo-Un destro o sinistro come fattore entro i soggetti (*within-subject*), ha mostrato che i tre gruppi hanno un numero simile di episodi ($F_{(2,21)}=1.435, p=.216$). I pulcini compiono un numero maggiore di episodi in sonno Mo-Un sinistro rispetto che in sonno Mo-Un destro ($F_{(1,21)}=5.252, p=.032$) e il fattore di interazione tra i gruppi e il sonno Mo-Un sinistro o destro è risultato significativo ($F_{(2,21)}=13.485, p>.001$). Questo risultato è dato dalla preferenza significativa di episodi in sonno Mo-Un sinistro in entrambi i gruppi di controllo mentre i pulcini del gruppo DEP-8H mostrano una preferenza significativa per gli episodi di sonno Mo-Un destro.

Il confronto tra il gruppo di pulcini N-DEP1 e DEP-8H, mostra come il gruppo DEP-8H compia un numero maggiore di episodi in sonno Mo-Un destro (t test, $t_{(14)}= 3.381, p=.004$), mentre i pulcini del gruppo N-DEP1 mostrano un maggior numero di episodi di sonno Mo-Un sinistro ($t_{(14)}= 5.300, p>.001$). Per quanto riguarda gli eventi di sonno monoculare non è stata osservata nessuna altra differenza significativa.

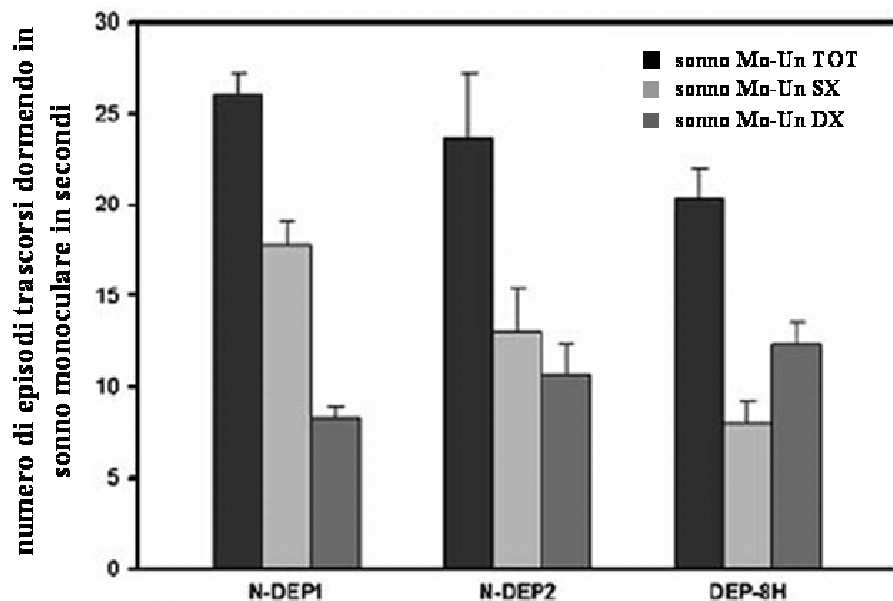


Fig. 19: Rappresentazione grafica del numero di episodi trascorsi dormendo in sonno monoculare in secondi.

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un (destro e sinistro) non è significativamente differente tra il gruppo di pulcini N-DEP1 e N-DEP2 ($t_{(14)} = .931$, $p = .368$). Per questa ragione solo il gruppo di controllo N-DEP1 è stato utilizzato per le successive analisi. I pulcini del gruppo DEP-8H e N-DEP1 trascorrono una quantità simile di tempo dormendo in sonno Mo-Un ($t_{(14)} = 1.572$, $p = .138$).

Le analisi separate condotte sul tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro e sinistro (Fig. 20), mostrano come il gruppo di pulcini N-DEP1 trascorrono più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto che in sonno Mo-Un destro (paired t-test, $t_{(7)} = 5.626$, $p = .001$). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i gruppi di pulcini N-DEP2 e DEP-8H. L'ANOVA mostra una differenza significativa tra il gruppo DEP-8H, N-DEP1 e N-DEP2 per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro

($F_{(2,21)}=3.593$, $p=.045$). L'analisi post-hoc mostra come il gruppo di pulcini DEP-8H trascorrono una quantità significativamente minore di tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto sia ai pulcini del gruppo N-DEP1 e N-DEP2 (rispettivamente $p=.008$, $p=.002$). Risultati simili sono stati osservati relativamente al tempo trascorso in sonno Mo-Un destro ($F_{(2,21)}=5.017$, $p=.017$). L'analisi post-hoc mostra come il gruppo di pulcini N-DEP1 trascorre una quantità di tempo significativamente minore in sonno Mo-Un destro rispetto al gruppo N-DEP2 ($p=.019$).

Per quanto riguarda il tempo trascorso in sonno Mo-Un sinistro o destro, l'ANOVA a misure ripetute con i tre gruppi (N-DEP1, N-DEP2 e DEP-8H) come fattori tra i soggetti (*between-subject*) e il tempo trascorso in sonno Mo-Un sinistro o destro come fattore entro i soggetti (*within-subject*) non ha rilevato alcun effetto significativo del gruppo ($F_{(2,21)}=1.948$, $p=.167$), mentre mostra come i pulcini trascorrono una maggior quantità di tempo in sonno Mo-Un sinistro piuttosto che in sonno Mo-Un destro ($F_{(1,21)}=8.923$, $p=.007$) e anche l'interazione tra i gruppi e il sonno Mo-Un destro o sinistro è risultata significativa ($F_{(2,21)}=9.974$, $p=.001$).

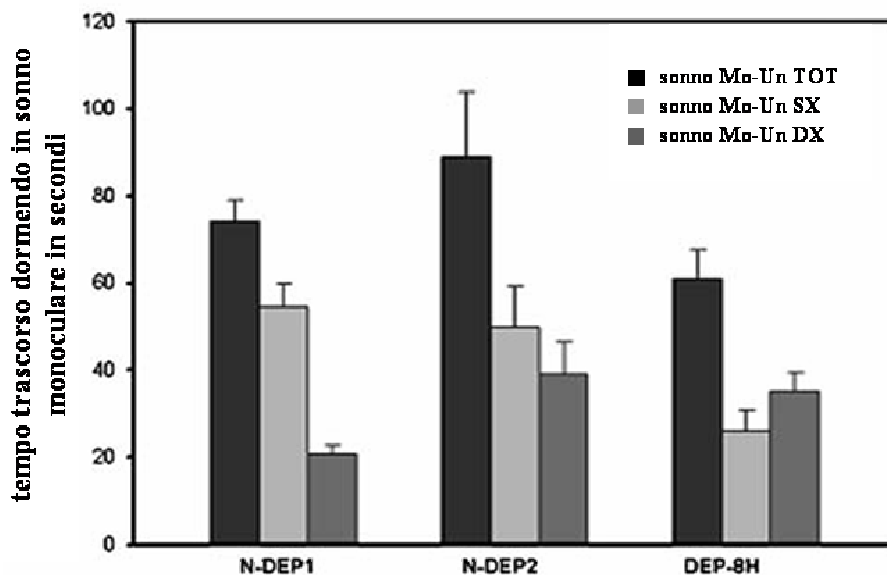


Fig. 20: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare in secondi.

Discussione

I risultati di questo studio mostrano come la deprivazione di sonno abbia effetti sia sul quadro di sonno Bin che sul quadro di sonno Mo-Un. Dopo 8 ore di deprivazione di sonno, i pulcini sottoposti a deprivazione, trascorrono più tempo dormendo rispetto ai pulcini del gruppo di controllo. Nello specifico, i pulcini deprivati trascorrono significativamente maggior tempo in sonno Bin e i loro episodi sono più lunghi rispetto ai pulcini non deprivati, mentre sia i pulcini dei gruppi di controllo che i pulcini deprivati di sonno mostrano di trascorrere una medesima quantità di sonno Mo-Un. Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro o sinistro separatamente, i pulcini deprivati mostrano più sonno Mo-Un destro rispetto ai pulcini del gruppo N-DEP1, mentre i pulcini di controllo mostrano di trascorrere più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini deprivati. Non è stata invece

osservata alcuna preferenza per il sonno Mo-Un sinistro e destro nei pulcini sottoposti a deprivazione di sonno. Mentre nei pulcini del gruppo N-DEP1 si osserva una preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro, in accordo con la letteratura di riferimento (Bobbo e coll. 2002; Mascetti e coll. 1999). I pulcini del gruppo di controllo che rimanevano 8 ore nel *tapis roulant* spento mostrano una medesima quantità di sonno Mo-Un rispetto al gruppo di controllo. Anche le analisi relative al numero di episodi in sonno Mo-Un mostrano una maggior quantità di episodi di sonno Mo-Un sinistro nel gruppo di pulcini di controllo (Bobbo e coll. 2002; Mascetti e coll. 1999). Questa preferenza si osserva anche quando il gruppo di controllo viene confrontato con i pulcini appartenenti al gruppo deprivato. Sempre relativamente agli episodi di sonno Mo-Un, si osserva come il quadro opposto quando viene considerato il sonno Mo-Un destro.

Il quadro di sonno dei pulcini deprivati osservato durante il periodo di recupero potrebbe essere l'effetto della deprivazione di per sé, ma non possono essere tralasciati i possibili effetti causati dalla condizione stressante o comunque dall'attività forzata ai quali gli animali sono stati sottoposti. A tale proposito, Rechtschaffen e collaboratori (1983) affermano che nei ratti deprivati di sonno utilizzando la metodica della locomozione forzata, il successivo periodo di recupero di sonno non sembra essere influenzato dalla metodica di deprivazione locomotoria; o lo è in ugual misura di quando venga usata la più classica metodica di deprivazione del disco in acqua o della manipolazione. Nel presente lavoro sono state prese in considerazione tutte le possibili fonti di stress: i pulcini sono stati allevati con oggetto d'*imprinting* (Bobbo e coll. 2002; Mascetti e coll. 1999) e l'acqua e il cibo sono stati forniti *ad libitum* anche durante le sessioni di deprivazione. Inoltre durante il periodo di deprivazione, i pulcini non emettevano quelli che sono definiti *distress call*,

tipicamente associati a situazioni stressanti per gli animali come per esempio: la rimozione dell'oggetto d'*imprinting*, un improvviso cambiamento dell'ambiente circostante o quando il rischio di predazione aumenta (Gruss e Braun 1997). La presenza e la quantità dei *distress call* è stata utilizzata come indicatore per quello che viene definito stress negativo, successivo a isolamento sociale o a manipolazione, ed è stato correlato all'aumento dell'acido 5-idrossindolacetico (un metabolita della serotonina) che è un indicatore fisiologico di stress (Gruss e Braun 1997).

Ci sono pochi studi riguardanti la deprivazione di sonno negli uccelli. Nei piccioni (*Columbia livia*) Tobler e Borbely (1988) hanno descritto un aumento di sonno REM e di attività EOG (elettro-oculogramma) mentre non è stata osservata alcuna modificazione per quanto riguarda il SWS e la SWA. Inoltre gli autori non hanno registrato alcun episodio di sonno Mo-Un ne durante il periodo precedente a deprivazione di sonno ne durante il periodo successivo. Rattenborg (2000a) ha evidenziato come che alcune tipologie di sonno come il sonno Mo-Un e il sonno Bin ma non il sonno REM, potrebbero essere compatibili con il comportamento del volo negli uccelli. Nel tordo di Swainson (*Catharus ustulatus*), Fuchs e collaboratori (2006) hanno dimostrato come durante il sonno giornaliero questi animali abbiano numerosi episodi di sonno e principalmente di sonno Mo-Un. Questi periodi di sonno diurno sembrerebbero permettere agli uccelli migratori di recuperare il sonno perso durante i periodi di volo notturno e, proprio il sonno Mo-Un, permetterebbe di recuperare questo sonno mantenendo inalterate le funzioni di vigilanza antipredatoria (Fuchs et al. 2006). Attualmente, come già descritto nei paragrafi introduttivi di questo studio, è presente in letteratura solo un esperimento di deprivazione di sonno nel pollo, quello di Boerema e collaboratori del 2003.

Le differenze osservate tra i risultati ottenuti da Boerema e collaboratrici (2003) e i risultati mostrati in precedenza, ottenuti nel presente studio, possono essere dovuti: all'età di sviluppo degli animali (pulcini all'undicesimo giorno di vita vs animali adulti); alla durata della deprivazione di sonno (8 ore vs 14 ore) e nella metodica di deprivazione utilizzata (locomozione forzata vs stimoli uditivi e visivi). Un ruolo cruciale è probabilmente ricoperto dal quadro di sonno Mo-Un associato alle tappe di sviluppo dell'animale che, a sua volta, dipende dallo sviluppo della lateralizzazione cerebrale nel pulcino (Bobbo e coll. 2002; Mascetti e coll. 1999; Rogers 1995). Inoltre, allo stesso modo, anche nel pulcino, come mostrano i dati ottenuti sul sonno a seguito di deprivazione di sonno in altri animali e nell'uomo (Borbely e coll. 1984; Tobler e Scherschlicht 1990; Rechtschaffen e coll. 1999), il gruppo deprivato di sonno mostra un *rebound* di tempo trascorso dormendo in sonno Bin e una durata media degli episodi maggiore. In altre parole i pulcini deprivati mostrano una maggior lunghezza degli episodi di sonno Bin e una diminuzione della frammentarietà del sonno che, presumibilmente permetterebbero un recupero migliore e più intenso.

Al contrario invece, rispetto a quello che è stato osservato da Boerema e collaboratori (2003), in questo lavoro non è stata descritta alcuna differenza nel tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un tra i pulcini deprivati e quelli di controllo. Un effetto statisticamente significativo è stato osservato solo per quanto riguarda il tempo o gli eventi di sonno considerati separatamente cioè quando è stato considerato o il sonno Mo-Un destro o il sonno Mo-Un sinistro. Come già descritto in precedenti esperimenti condotti nei nostri laboratori (Bobbo e coll. 2002; Mascetti e coll. 1999), all'undicesimo giorno dopo la schiusa, pulcini di sesso femminile allevati con oggetto d'*imprinting*, mostrano una preferenza significativa per il sonno Mo-

Un sinistro (sonno nell'emisfero destro). Questa lateralizzazione del sonno sembrerebbe essere associata alla dominanza dell'emisfero destro rispetto ai compiti svolti dall'animale durante la veglia. E' infatti noto come uno specifico quadro di dominanza emisferica sembri essere associato a particolari comportamenti svolti dal pulcino durante la veglia in particolari momenti evolutivi (Andrew 2002).

Al contrario i pulcini del gruppo deprivato, non mostrano alcuna lateralizzazione del sonno. Una possibile spiegazione potrebbe essere che la deprivazione di sonno avrebbe un effetto sull'emisfero destro riducendo il numero degli episodi ed il tempo speso dormendo con l'occhio sinistro chiuso permettendo un ugual recupero in entrambi gli emisferi. Per quanto riguarda gli eventi di sonno Mo-Un i pulcini sottoposti a deprivazione mostrano una preferenza per chiusura dell'occhio destro, questo significa che l'occhio sinistro compirebbe meno eventi di chiusura durante il sonno di recupero. La spiegazione di questo dato sembra essere fornita dal fatto che ci sia un maggior coinvolgimento dell'emisfero destro nelle attività di monitoraggio ambientale. Sono stati pubblicati a questo proposito lavori che dimostrerebbero come nel pulcino (Rogers, 2000) il campo visivo di sinistra sia più reattivo e veloce nel riconoscere la presenza di un predatore.

I pulcini deprivati di sonno e quelli che sono rimasti per 8 ore nel *tapis roulant* spento, sono stati sottoposti alla medesima procedura ma il secondo gruppo non è stato sottoposto a locomozione forzata. Questi due gruppi mostrano risultati simili per quanto riguarda il sonno Mo-Un. Sembrerebbe possibile che il risultato più significativo prodotto dalla deprivazione di sonno sul successivo periodo di recupero possa essere principalmente legato al sonno Bin piuttosto che al sonno Mo-Un il quale costituisce circa 1-2 % del tempo totale di sonno osservato nel pulcino. Anche se il sonno Mo-Un ricopre una

porzione piuttosto bassa del sonno di questo animale, quest'ultimo potrebbe avere un ruolo nell'omeostasi del sonno stesso; numerosi altri comportamenti osservati negli animali hanno una bassa frequenza ma hanno una cruciale importanza da un punto di vista biologico ed evolutivo (Lima e coll. 2005; Franklin e Lima 2001). A tale proposito va anche ricordato come i tordi di Swainson (*Catharus ustulatus*) durante le migrazioni mostrano brevi periodi di sonno Mo-Un (media 8 ± 2.9 sec.) che potrebbero essere sufficienti per recuperare sonno a livello uniemisferico durante la migrazione (Fuchs et al. 2006). Per concludere, la chiusura unilaterale degli occhi o di destra o di sinistra durante il sonno non avviene assolutamente in modo casuale in termini di popolazione, ma dipende strettamente dal quadro di lateralizzazione cerebrale (Mascetti e coll. 1999, 2004). Per questo motivo, durante il sonno ma anche durante il periodo di privazione di sonno o a seguito di cambiamenti ambientali potrebbe essere adattivo avere almeno un occhio (e un emisfero) dedicati a monitorare periodicamente l'ambiente per osservare il verificarsi o meno di possibili eventi cruciali per la sopravvivenza. Questi risultati sembrano quindi essere in linea con l'idea di Rattenborg e collaboratori (2000a) secondo cui l'emisfero sveglio può efficientemente e prontamente rispondere alle necessità presentate dall'ambiente, e i risultati mostrati permettono anche di descrivere il sonno uniemisferico come un aspetto del sonno locale modificato e modificabile dalla privazione di sonno.

- Bobbo, D., Nelini, C. e Mascetti G.G. (2008) "Binocular and monocular/unihemispheric sleep in the domestic chick (*Gallus gallus*) after a moderate sleep deprivation". *Exp Brain Res*, 185, 421-427 -

6.4 EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE DI SONNO NEL PULCINO AL QUINTO E ALL’OTTAVO GIORNO DI VITA

6.4.1 Soggetti

In questo secondo lavoro sono stati utilizzati 48 pulcini di pollo domestico (*Gallus gallus*) appartenenti al ceppo *Hybro* di sesso femminile al quinto (n=24) e all’ottavo (n=24) giorno di vita. Anche in questo caso le uova provenivano dall’incubatoio commerciale “Agricola Berica” di Montegalda, Vicenza, Italia. Le condizioni di incubazione e di allevamento sono le medesime descritte nel precedente esperimento. Sono stati utilizzati pulcini di sesso femminile al quinto e all’ottavo giorno di vita in quanto è stato osservato che questi animali mostrano un quadro di sonno consistente e uno stabile comportamento alimentare. E’ noto inoltre che al quinto giorno i pulcini mostrano una chiara preferenza per il sonno Mo-Un destro (sonno nell’emisfero sinistro), mentre all’ottavo giorno mostrano una chiara preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (sonno nell’emisfero destro). Gli animali sono stati incubati al buio al fine di evitare che la stimolazione luminosa *in ovo* potesse alterare alcuni aspetti della lateralizzazione cerebrale (Rogers, 1995) e del quadro di sonno uniemisferico (Bobbo e coll., 2002).

6.4.2 Apparato e procedura sperimentale

La privazione di sonno anche in questo caso consisteva nel far svolgere agli animali un attività forzata, camminare, utilizzando un *tapis roulant*. Tutti gli animali utilizzati in questo esperimento durante la fase di privazione di sonno sono stati costantemente monitorati da uno sperimentatore per garantire l’efficacia della procedura L’apparato sperimentale utilizzato è il medesimo

illustrato nel precedente esperimento (Bobbo e coll., 2008) sia per quanto riguarda la procedura di deprivazione che durante l'osservazione del sonno.

I pulcini sono stati testati al quinto giorno e all'ottavo giorno di vita e per ciascun giorno sono stati costituiti due gruppi sperimentali: 8 pulcini sono stati privati di sonno per 4 ore (SD-4H) e 8 pulcini sono stati privati di sonno per 8 ore (SD-8H). In ciascuna sessione di deprivazione sono stati utilizzati contemporaneamente due animali che venivano posizionati ciascuno in uno dei due compartimenti dell'apparato (Fig. 12 e 13) e privati per il medesimo periodo di tempo: i gruppi SD-4H dalle 12:00 a.m. alle 4:00 p.m. mentre i gruppi SD-8H dalle 8:00 a.m. alle 4:00 p.m. Al termine del periodo di deprivazione di sonno è stato osservato il quadro di sonno degli animali sperimentali nelle gabbie di osservazione (Fig. 14 e 15) per 6 ore consecutive dalle 4:00 p.m. alle 10:00 p.m. I pulcini dei due gruppi di controllo, uno per ciascuno dei due giorni presi in considerazione, venivano lasciati nelle gabbie di allevamento e osservazione (N-SD) durante l'intero periodo di deprivazione di sonno al quale erano sottoposti i pulcini dei gruppi sperimentali. Anche l'osservazione di sonno dei gruppi N-SD iniziava allo stesso orario in cui venivano condotte le osservazioni del sonno dei gruppi sperimentali e aveva la durata di 6 ore (Fig. 21).

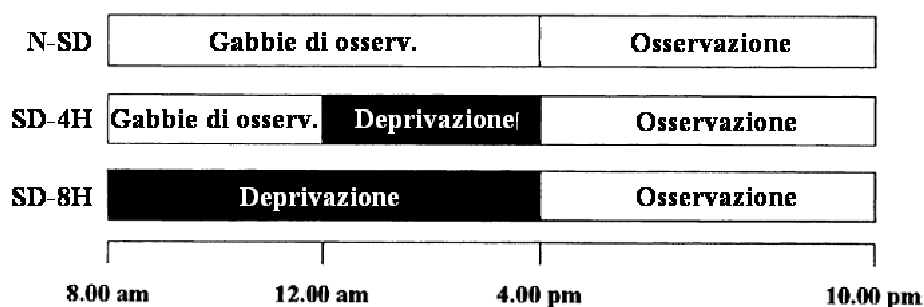


Fig. 21: Rappresentazione schematica della procedura utilizzata nell'esperimento sia per il quinto che per l'ottavo giorno (Bobbo e coll., 2009).

Il quadro di sonno Bin e Mo-Un è stato osservato direttamente dallo sperimentatore. Le variabili dipendenti registrate sono state il numero e la durata degli episodi di sonno Bin e Mo-Un distinguendo tra sonno Mo-Un destro e sinistro.

6.4.3 Metodi di analisi

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro e destro è stato calcolato un indice di lateralità con la formula: $\{[(\text{sonno Mo-Un sinistro}) - (\text{sonno Mo-Un destro}) / (\text{sonno Mo-Un sinistro}) + (\text{sonno Mo-Un destro})] \times 100\}$. Sia l'indice di lateralità che il tempo trascorso dormendo in sonno Bin e Mo-Un, calcolato in secondi, sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA), dopo aver controllato per la normalità della distribuzione e per l'omogeneità della varianza. Il gruppo di appartenenza (N-SD, SD-4H e SD-8H) e il giorno di sviluppo (quinto o ottavo) sono stati considerati come fattori tra i soggetti (*between-subject*). Inoltre, sono stati condotti dei test t di *Student* per il confronto tra medie.

6.4.4 Risultati e discussione

Tempo totale trascorso dormendo

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno totale (sonno Bin e sonno Mo-Un), l'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo per il fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 25.959, p < .001$), mentre il fattore giorno ($F_{(1,42)} = 3.018, p = .090$) e l'interazione tra gruppo e giorno ($F_{(2,42)} = 0.550, p = .581$) non sono risultati significativi.

L'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato come i gruppi di pulcini SD-4H e SD-8H dormono significativamente di più rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD

(rispettivamente $p < .001$ e $p < .001$). L'analisi separata condotta per ciascun giorno ha mostrato un effetto significativo del fattore gruppo sia al giorno 5 che al giorno 8 (rispettivamente $F_{(2,21)} = 7.941, p = .003$ e $F_{(2,21)} = 24.876, p < .001$). L'analisi post-hoc (LSD) ha evidenziato come i gruppi di pulcini SD-4H e SD-8H trascorrono più tempo dormendo rispetto ai gruppi di pulcini di controllo N-SD (rispettivamente: giorno 5 - $p = .003, p < .001$; giorno 8 - $p = .002, p < .001$).

Sonno binoculare

Il tempo totale speso dormendo in sonno Bin è rappresentato in Fig. 22. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 25.967, p < .001$), mentre il fattore giorno ($F_{(1,42)} = 3.072, p = .087$) e l'interazione tra gruppo e giorno non sono risultati significativi ($F_{(2,42)} = 0.532, p = .591$). L'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato come i gruppi SD-4H e SD-8H trascorrono significativamente più tempo in sonno Bin rispetto ai gruppi di controllo N-SD (rispettivamente $p < .001$ e $p < .001$). Le analisi separate per ciascun giorno mostrano un effetto significativo del fattore gruppo al giorno 5 e al giorno 8 (rispettivamente $F_{(2,21)} = 7.996, p = .003$; $F_{(2,21)} = 24.834, p < .001$). Le analisi post-hoc (LSD) mostrano che i pulcini dei gruppi N-SD dormono significativamente di meno in sonno Bin rispetto ai pulcini sia dei gruppi SD-4H (rispettivamente: giorno 5 - $p = .003$; giorno 8 - $p < .001$) che dei gruppi SD-8H (rispettivamente: giorno 5 - $p = .002$; giorno 8 - $p < .001$).

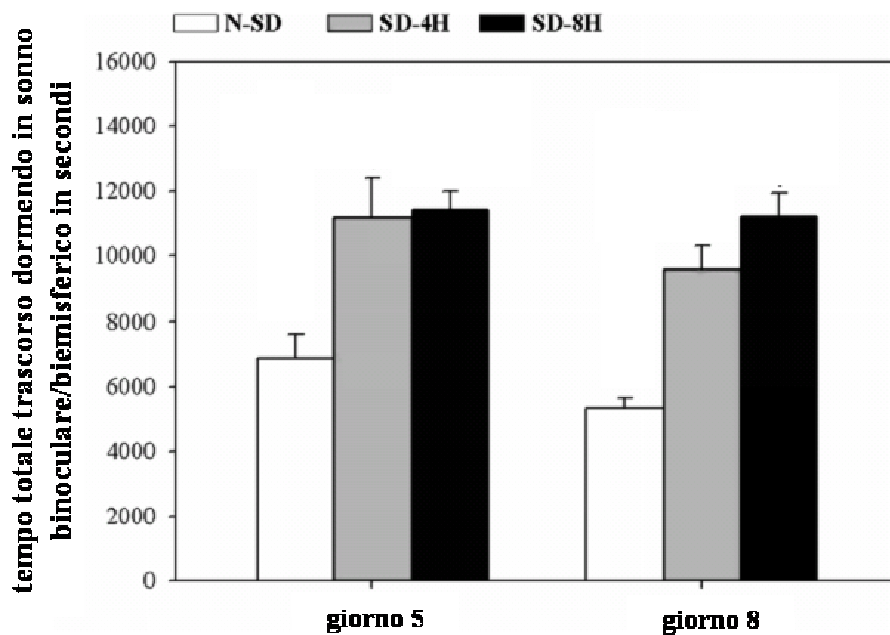


Fig. 22: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno binoculare in secondi (Bobbo e coll., 2009).

La durata media degli eventi di sonno Bin e rappresentata in Fig. 23. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 22.350, p < .001$) e del fattore giorno ($F_{(2,42)} = 6.998, p = .011$), mentre non è emersa alcuna significatività per il fattore di interazione gruppo e giorno ($F_{(2,42)} = 0.514, p = .062$). L'analisi post-hoc (LSD) ha evidenziato come i pulcini dei gruppi SD-8H mostrano episodi di sonno Bin significativamente più lunghi rispetto ai pulcini dei gruppi SD-4H ($p = .002$) e N-SD ($p < .001$); i gruppi SD-4H mostrano episodi significativamente più lunghi dei pulcini dei gruppi N-SD ($p = .002$).

I pulcini al quinto giorno del gruppo N-SD mostrano episodi significativamente più lunghi rispetto a quelli del giorno ottavo ($t_{(14)} = 2.815, p = .014$). Inoltre al quinto giorno i pulcini deprivati per quattro ore SD-4H trascorrono episodi più lunghi in sonno Bin rispetto ai pulcini dell'ottavo

giorno ($t_{(14)} = 2.305$, $p = .037$). Non sono invece emerse differenze significative per quanto riguarda i gruppi SD-8H tra il quinto e l'ottavo giorno ($t_{(14)} = 0.688$, $p = .503$).

L'ANOVA condotta separatamente per ciascun giorno ha mostrato un effetto significativo del gruppo sia al quinto che all'ottavo giorno (rispettivamente $F_{(2,21)} = 8.423$, $p = .002$; $F_{(2,21)} = 16.300$, $p < .001$). Al quinto giorno, l'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato come i pulcini dei gruppi SD-4H e SD-8H mostrano episodi di sonno Bin più lunghi rispetto ai pulcini del gruppo N-SD (rispettivamente $p = .017$ e $p < .001$). All'ottavo giorno, i pulcini del gruppo SD-8H mostrano eventi significativamente più lunghi rispetto sia al gruppo N-SD ($p < .001$) che al gruppo SD-4H ($p = .002$) e i pulcini del gruppo SD-4H mostrano episodi significativamente più lunghi dei pulcini del gruppo N-SD ($p = .040$).

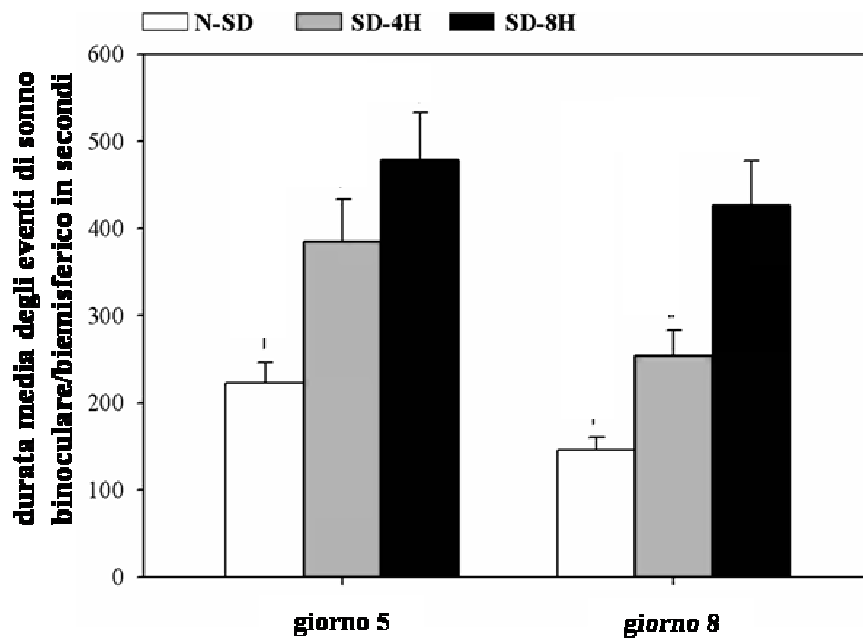


Fig. 23: Rappresentazione grafica della durata media degli episodi di sonno binoculare in secondi (Bobbo e coll., 2009).

Sonno monoculare

Il tempo trascorso in sonno Mo-Un (sinistro, destro e totale) è rappresentato in Fig 24. per i pulcini del quinto giorno e in Fig. 25 per i pulcini dell'ottavo giorno. L'ANOVA sul tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un evidenzia un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 9.222, p < .001$) e del fattore d'interazione gruppo e giorno ($F_{(2,42)} = 4.005, p = .026$), mentre il fattore giorno non è risultato significativo ($F_{(1,42)} = 2.030, p = .162$). L'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato come i pulcini dei gruppi SD-8H dormono significativamente di meno in sonno Mo-Un sia rispetto ai pulcini dei gruppi SD-4H ($p < .001$) che rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD ($p = .013$). L'analisi separata per ciascun giorno mostrano un effetto significativo del fattore gruppo al giorno 5 e al giorno 8 (rispettivamente $F_{(2,21)} = 5.118, p = .015$; $F_{(2,21)} = 9.731, p = .001$). Al quinto giorno, l'analisi post-hoc (LSD) mostra che i pulcini del gruppo SD-8H trascorrono significativamente meno tempo dormendo in sonno Mo-Un rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD ($p = .007$) e SD-4H chicks ($p = .022$). Al giorno ottavo, I pulcini del gruppo SD-4H mostrano una quantità significativamente maggiore di tempo trascorsa in sonno Mo-Un rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD ($p = .001$) e SD-8H ($p = .001$).

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro, l'ANOVA ha mostrato un effetto significativo del fattore d'interazione ($F_{(2,42)} = 5.583, p = .007$), mentre sia il fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 0.745, p = .481$) che il fattore giorno ($F_{(1,42)} = 0.379, p = .542$) non sono risultati significativi. Le analisi condotte separatamente per ciascun giorno mostrano un effetto significativo del fattore gruppo al quinto giorno ($F_{(2,21)} = 4.242, p = .028$), ma non all'ottavo ($F_{(2,21)}=1.785, ns$). L'analisi post-hoc (LSD) al quinto giorno,

mostra come i pulcini del gruppo SD-8H dormano significativamente di meno rispetto ai pulcini del gruppo N-SD in sonno Mo-Un destro ($p = .009$).

Per quanto concerne il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro, l'ANOVA mostra un effetto significativo dei fattori gruppo ($F_{(2,42)} = 11.707$, $p < .001$) e giorno ($F_{(1,42)} = 6.229$, $p < .017$), mentre il fattore d'interazione non è risultato significativo ($F_{(2,42)} = 0.585$, $p = .561$). L'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato come il gruppo SD-8H trascorre meno tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto al gruppo SD-4H ($p < .001$) e N-SD ($p = .023$) e che i pulcini dei gruppi SD-4H dormono significativamente di meno in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD ($p = .017$). L'analisi separata condotta per ciascun giorno, mostra un effetto significativo del fattore gruppo al giorno 5 e al giorno 8 (rispettivamente $F_{(2,21)} = 3.667$, $p = .043$; $F_{(2,21)} = 8.807$, $p = .002$). Al quinto giorno l'analisi post-hoc (LSD) mostra come i pulcini del gruppo SD-8H trascorrono significativamente meno tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini del gruppo SD-4H ($p = .014$). All'ottavo giorno, l'analisi post-hoc (LSD), mostra che i pulcini del gruppo SD-4H dormono significativamente di più in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini dei gruppi N-SD ($p = .024$) e SD-8H ($p < .001$). Il test t di *Student* per campioni appaiati mostra come i pulcini N-SD al quinto giorno trascorrono significativamente più tempo in sonno Mo-Un destro piuttosto che sinistro ($t_{(7)} = 3.577$, $p = .009$), mentre all'ottavo giorno i pulcini di controllo N-SD mostrano una preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro piuttosto che per il sonno Mo-Un destro ($t_{(7)} = 2.470$, $p = .043$). I pulcini dei gruppi sperimentali invece non evidenziano alcuna preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro o destro.

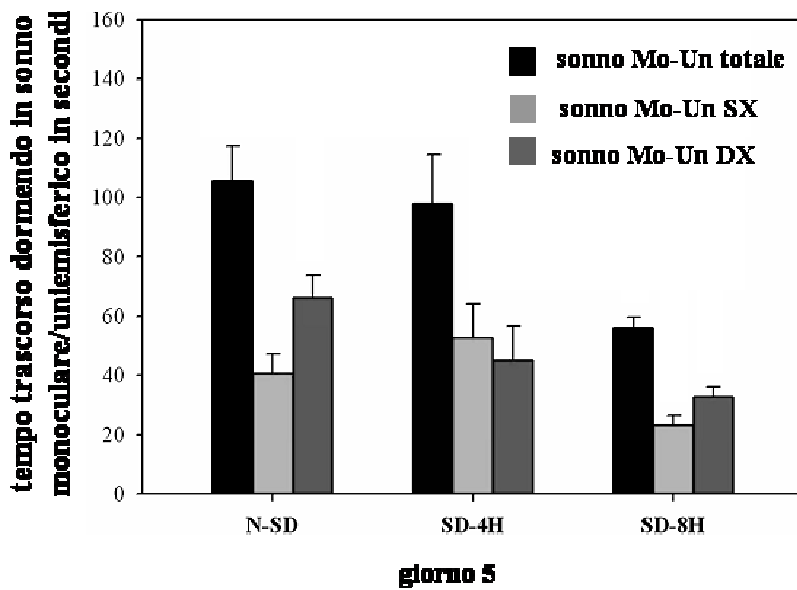


Fig. 24: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare totale, sinistro e destro in secondi relativamente al quinto giorno (Bobbo e coll., 2009).

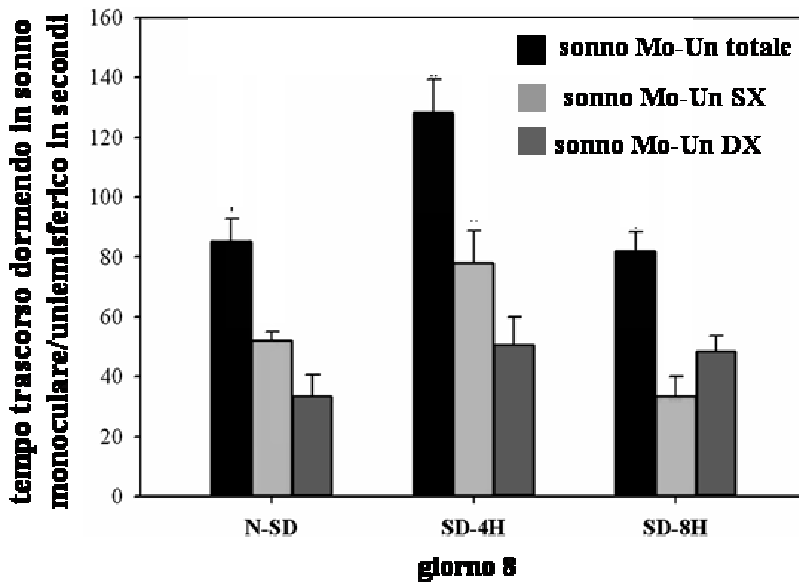


Fig. 25: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare totale, sinistro e destro in secondi relativamente all'ottavo giorno (Bobbo e coll., 2009).

Indice di lateralità relativo al sonno monoculare-uniemisferico

La percentuale media del tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un calcolato utilizzando l'indice di lateralità è rappresentato in Fig. 26. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,42)} = 4.801, p = .013$), del fattore giorno ($F_{(1,42)} = 6.045, p = .018$) e del fattore d'interazione gruppo per giorno ($F_{(2,42)} = 3.345, p = .045$). L'analisi post-hoc (LSD) ha mostrato una differenza significativa tra il gruppo SD-4H e SD-8H ($p = .006$). Le analisi condotte separatamente per ciascun giorno non ha evidenziato alcun effetto al quinto giorno, mentre è stato osservato un effetto significativo del gruppo all'ottavo giorno ($F_{(2,21)} = 5.135, p = .015$). All'ottavo giorno l'analisi post-hoc (LSD) mostra come ci sia una differenza significativa tra i pulcini del gruppo SD-8H e i pulcini del gruppo N-SD ($p = .009$) e del gruppo SD-4H ($p = .016$). Il test t di *Student* per singolo campione ha evidenziato una preferenza significativa per il sonno Mo-Un destro, rispetto allo 0% considerata una preferenza casuale, per i pulcini del gruppo N-SD al quinto giorno ($t_{(7)} = 3.836, p = .006$) e una preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro per i pulcini del gruppo N-SD all'ottavo giorno ($t_{(7)} = 3.059, p = .018$). I pulcini sottoposti a privazione di sonno non mostrano alcuna preferenza né al quinto giorno né all'ottavo giorno.

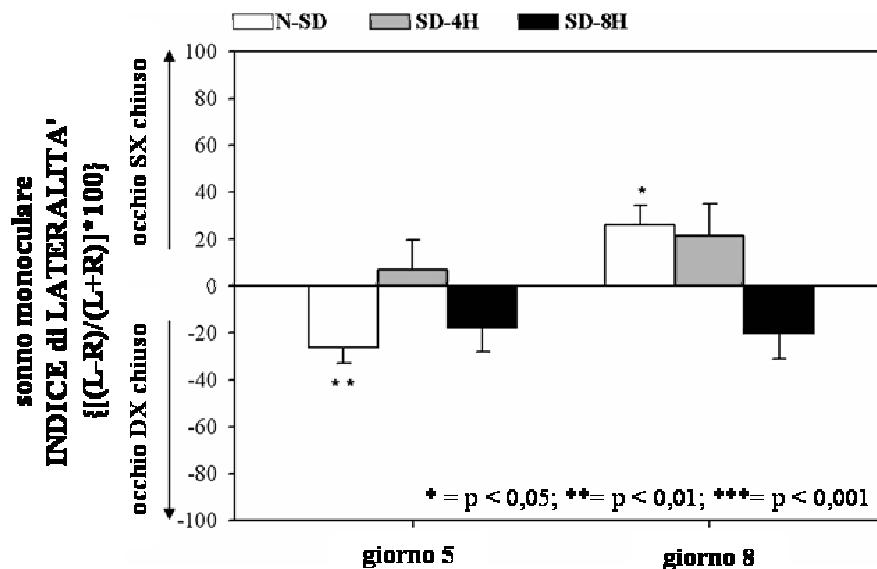


Fig. 24: Rappresentazione grafica della percentuale media di sonno monolare calcolata in indice di lateralità. L sta per chiusura dell'occhio sinistro (*left eye closed*) e R per chiusura dell'occhio destro (*right eye closed*) (Bobbo e coll., 2009).

Discussione

-Tempo totale trascorso dormendo e sonno binoculare –

Anche in questo secondo esperimento, come era prevedibile dai risultati ottenuti dal precedente, è stato osservato un *rebound* di sonno totale durante le 6 ore successive al periodo di deprivazione sia dopo 4 che dopo 8 ore di deprivazione di sonno e sia al quinto e all'ottavo giorno, così come è già stato osservato in alcuni mammiferi e nell'uomo (Borbely e coll., 1984; Horne, 1988; Everson e coll., 1989; Rechtschaffen e coll., 1999). Durante il periodo di recupero, sia al quinto che all'ottavo giorno, gli animali deprivati di sonno trascorrono più tempo dormendo in sonno totale e in sonno Bin rispetto ai pulcini dei gruppi di controllo, ed inoltre, la durata media degli episodi di sonno Bin risulta essere più lunga nei pulcini sottoposti a deprivazione. Questo risultato, osservato anche nell'esperimento precedente, sembra nuovamente

suggerire che i pulcini spendano più tempo dormendo in modo meno frammentato (con meno risvegli) al fine di favorire un possibile miglior recupero. Le analisi condotte utilizzando videoregistrazioni acquisite nei nostri laboratori relativamente al quadro sonno-veglia del pulcino, hanno mostrato come al quinto giorno di vita gli animali trascorrono dormendo, sia in sonno Bin che Mo-Un, approssimativamente 12 ore, mentre all'ottavo giorno circa 10 ore. Durante le 4 ore considerate in questo esperimento, cioè dalle 8:00 a.m. e le 12:00 a.m. I pulcini solitamente dormono circa 110 minuti al quinto giorno di vita e circa 93 minuti all'ottavo giorno. Per quanto riguarda invece il periodo di 8 ore che va dalle 8:00 a.m. alle 4:00 p.m. I pulcini al quinto giorno dormono circa 235 minuti mentre all'ottavo circa 210 minuti (Nelini et al., 2006). La differenza osservata tra il giorno 5 e il giorno 8 relativamente alla durata media degli eventi di sonno Bin, sembra essere principalmente connessa alla differenza nella quantità di sonno trascorso dormendo durante nei due giorni considerati: con i pulcini che dormono meno all'ottavo giorno rispetto che al quinto.

Anche in questo lavoro non sono stati osservati *distress call* già trattati in precedenza.

- Tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un –

Al quinto giorno di vita 4 ore di deprivazione di sonno non influenzava il quadro di sonno Mo-Un mentre 8 ore di deprivazione causano una diminuzione del tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un rispetto ai pulcini di controllo e a quelli deprivati per 4 ore. Questo dato sembra in accordo con i dati proposti da Boerema e collaboratori (2003), che riportano una diminuzione di sonno Mo-Un dopo 14 ore di deprivazione di sonno. Gli autori avevano associato questo decremento nel sonno Mo-Un ad un aumento di sonno Bin (Boerema et al., 2003). Anche in questo studio è stato osservato

un quadro simile, con un aumento di sonno Bin, nei pulcini del quinto giorno sottoposti a 8 ore di deprivazione di sonno. I pulcini deprivati di sonno all'ottavo giorno mostrano effetti diversi rispetto ai pulcini del quinto giorno. A quest'età a seguito di deprivazione di sonno si osserva: nei pulcini sottoposti a 4 ore di deprivazione di sonno più tempo trascorso in sonno Mo-Un rispetto ai controlli e ai pulcini deprivati per 8 ore, mentre la deprivazione di 8 ore sembra non causare un aumento di sonno Mo-Un. Questi risultati possono essere interpretati considerando che all'inizio della seconda settimana di vita (ottavo giorno) hanno inizio notevoli modificazioni nel comportamento dei pulcini in quanto questi ultimi iniziano ad esplorare l'ambiente circostante e sono più coinvolti in attività come categorizzare stimoli nuovi (Rashid e Andrew, 1989; Vallortigara, 1992b; Freire e Rogers, 2007). Inoltre questi animali mostrano normalmente sia meno sonno totale che sonno Mo-Un se confrontati con pulcini alla prima settimana di vita (Nelini et al., 2006). L'aumento di sonno Mo-Un dopo 4ore di deprivazione potrebbe essere causato, dalle categorizzazione dell novità associate al nuovo ambiente in cui i pulcini sono inseriti (il *tapis roulant*) piuttosto che causa della deprivazione di per sé. Inoltre il periodo trascorso nel *tapis roulant* potrebbe causare un aumento della percezione di predazione e di conseguenza un aumento di sonno Mo-Un. Il sonno Mo-Un infatti è stato associato a funzioni di vigilanza anti-predatoria (Rattenborg e coll., 1999b; 2000a). Gli effetti causati dal nuovo ambiente sembrano essere supportati dallo studio di deprivazione di sonno precedentemente illustrato e condotto su pulcini di 11 giorni di età (Bobbo e coll., 2008) dove il gruppo di pulcini di controllo, che restavano 4 ore nel *tapis roulant* spento, benché in modo non significativo, mostravano una tendenza ad un aumento di sonno Mo-Un rispetto ai pulcini deprivati per 8 ore e al gruppo di controllo. In conclusione il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un

totale diminuisce successivamente a 8 ore di deprivazione solo in pulcini al quinto giorno di vita ma non in pulcini all'ottavo giorno.

- Sonno Mo-Un destro e sonno Mo-Un sinistro -

I pulcini dei gruppi sottoposti a deprivazione di sonno, indipendentemente se per 4 o per 8 ore, sia al giorno 5 che al giorno 8 non mostrano alcuna preferenza per la chiusura di un occhio piuttosto che dell'altro durante gli episodi di sonno Mo-Un. Al quinto giorno, i pulcini non deprivati mostrano invece una preferenza per la chiusura dell'occhio destro (sonno Mo-Un destro – emisfero sinistro) mentre all'ottavo giorno i pulcini non deprivati di sonno mostrano una lateralizzazione del sonno in favore del sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro). Questi risultati confermano e sono in linea con i dati presenti in letteratura (Mascetti e coll., 1999; Bobbo e coll., 2002). Durante la prima settimana di vita i pulcini mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un destro (sonno nell'emisfero sinistro) che sembra essere associata al consolidamento della traccia mestica dell'oggetto d'*imprinting* che è noto avvenire principalmente nell'emisfero sinistro. Al contrario, durante la seconda settimana i pulcini mostrano una chiara preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) che sembra essere associato ai processi di apprendimento e di consolidamento della traccia mestica spaziale e associata a categorizzazione topografica dell'ambiente circostante che appunto avverrebbe nell'emisfero destro (Mascetti et al., 1999).

Riguardo al sonno Mo-Un destro o sinistro dopo 8 ore di deprivazione al quinto giorno, si osserva una significativa riduzione del tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro, mentre si osserva il quadro opposto all'ottavo giorno. In altre parole l'assenza di un chiaro quadro di lateralizzazione del sonno dopo deprivazione potrebbe essere attribuita ad una diminuzione del sonno Mo-Un nell'emisfero che, nei pulcini di controllo,

mostra maggior quantità di sonno Mo-Un (Mascetti e coll., 1999; Bobbo e coll., 2002). Di conseguenza, se il sonno Mo-Un permette un temporaneo controllo delle novità ambientali durante il sonno e/o permette di espletare la funzione di vigilanza anti-predatoria (Mascetti e coll., 1999; Rattenborg e coll., 2000a), questi comportamenti durante il sonno di recupero post-deprivazione potrebbero essere equamente distribuiti tra i due emisferi. Alla luce dei dati ottenuti in questo lavoro e nel precedente di deprivazione di sonno (descritto nel paragrafo precedente), può essere avanzata l'ipotesi che il sonno Mo-Un rappresenti una strategia plastica e dinamica che risponde selettivamente ad un'ampia gamma di condizioni alle quali il pulcino è sottoposto. I risultati ottenuti, assieme ai dati esposti nei paragrafi introduttivi di questa tesi, permetterebbero di considerare il sonno Mo-Un come un aspetto del sonno locale così come descritto in precedenza. Ulteriori esperimenti, che verranno descritti nei capitoli successivi, saranno utili al fine di confermare questa ipotesi.

- Bobbo, D., Nelini, C. e Mascetti G. G. (2009) "Effects of sleep deprivation on sleep in 5- and 8-day post-hatching domestic chicks". *Behaviour*, 146, 1253-1267 -

Capitolo VII

IL SONNO UNIEMISFERICO: EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE MONOCULARE SELETTIVA IN PULCINI INCUBATI ALLA LUCE O AL BUIO

7.1 INTRODUZIONE

7.1.1 La deprivazione monoculare visiva come paradigma di ricerca per lo studio del sonno uniemisferico

Come già descritto nei capitoli precedenti, nel pulcino il quadro di sonno Mo-Un dipende dalle tappe di sviluppo cognitivo. Nelle prime due settimane di vita il quadro di sonno Mo-Un si modifica in modo dinamico e il sonno Mo-Un si sposta in uno o nell'altro emisfero in accordo con il comportamento messo in atto dall'animale durante la veglia e strettamente legato alla dominanza emisferica di quel preciso momento di sviluppo (Mascetti e coll., 1999). Il sonno uniemisferico sembra quindi essere in stretta relazione con la lateralizzazione delle funzioni cerebrali del pulcino (Rattenborg et al., 2000). Bobbo e collaboratori (2002) hanno condotto un esperimento, illustrato brevemente nel "Capitolo V", in cui è stato chiaramente descritto come la stimolazione luminosa durante gli ultimi giorni di sviluppo embrionale del pulcino influenzi il quadro della successiva laterizzazione cerebrale e di conseguenza anche il quadro di sonno Mo-Un. L'embrione di pulcino all'interno dell'uovo è orientato in modo tale che l'occhio destro risulta essere rivolto verso il guscio e può essere stimolato dalla luce proveniente dall'esterno, mentre, l'occhio sinistro, è posizionato in direzione del corpo e per questo motivo non viene stimolato dalla luce. Rogers (1995) ha descritto

come i pulcini nati da uova incubate alla luce mostrino una superiorità per della via visiva occhio sinistro – emisfero destro in compiti di copulazione e attacco e una superiorità per della via visiva occhio destro – emisfero sinistro in compiti di discriminazione visiva. Nei pulcini incubati al buio la lateralizzazione precedentemente osservata risulta essere invece assente. L'esposizione del solo occhio sinistro alla luce durante il periodo embrionale rovescia la lateralizzazione nei compiti di discriminazione visiva, attacco e copulazione, di conseguenza la stimolazione luminosa durante gli ultimi giorni di incubazione influenza anche il quadro di sonno Mo-Un dei pulcini dopo la schiusa. Nel lavoro di Bobbo e collaboratori (2002) è stato descritto come durante i primi due giorni dopo la schiusa, i pulcini provenienti da uova incubate alla luce mostrino una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) mentre pulcini provenienti da uova incubate al buio, mostrino una chiara preferenza per la chiusura dell'occhio destro durante gli episodi di sonno Mo-Un (sonno nell'emisfero sinistro). Nel pulcino, il periodo sensibile agli effetti della stimolazione luminosa sulla lateralizzazione delle funzioni cerebrali inizia dopo il diciassettesimo giorno d'incubazione e se la stimolazione luminosa monoculare è fornita prima della schiusa causa il termine del periodo sensibile, mentre se gli animali vengono incubati al buio il periodo sensibile si estende fino ai primi momenti dopo la schiusa. A tale proposito Rogers (1991) ha dimostrato che la direzione della lateralizzazione dei comportamenti di attacco e copulazione si rovescia se gli animali vengono incubati al buio e subiscono la deprivazione monoculare (DM), nello specifico la deprivazione dell'occhio destro durante il primo o secondo giorno dopo la schiusa. Nei piccioni Manns e Gunturkun (1999) hanno dimostrato come la DM dopo la schiusa influenzi la direzione del comportamento e le asimmetrie del sistema visivo.

Nei gatti, è stato osservato come durante il periodo critico dello sviluppo del sistema visivo, la DM, che consiste appunto nella deprivazione selettiva della visione di un occhio, produca un rapido rimodellamento della corteccia visiva e una modificazione morfologica dei circuiti talamo-corticali (Hubel e Wiesel, 1970); è noto infatti che brevi periodi di deprivazione monoculare riducono sia la potenza della risposta neuronale dell' area della corteccia visiva connessa all'occhio deprivato e si riducono anche le aree corticali innervate dalle proiezioni afferenti provenienti da questo occhio. Frank e collaboratori (2001) nel gatto hanno descritto come il sonno, durante il periodo critico dello sviluppo del sistema visivo, produca un incremento degli effetti negativi connessi alla risposta visiva causati dalla deprivazione monoculare, e hanno avanzato l'idea che il sonno stesso favorisca la plasticità corticale durante lo sviluppo.

7.2 RICERCA SPERIMENTALE

7.2.1 Ipotesi e obiettivi

Lo scopo di questo esperimento è studiare gli effetti della deprivazione monoculare sul quadro di sonno Bin e Mo-Un nel pulcino a seguito di incubazione alla luce o al buio. La deprivazione monoculare è stata condotta a cavallo tra il primo e il secondo giorno dopo la schiusa. A tale proposito è noto, ed è già stato ampiamente descritto nei capitoli precedenti, che il processo d'*imprinting* e il consolidamento della memoria d'*imprinting* avvengono durante i primi giorni dopo la schiusa (Rogers e Andrew, 2002); è quindi possibile ipotizzare un effetto della DM anche sul consolidamento del processo d'*imprinting*, sia nei pulcini incubati al buio che in quelli incubati alla luce. Per questo motivo è stata indagata l'attività locomotoria dei pulcini durante le sessioni di DM e anche durante il successivo periodo. I risultati relativi a questa seconda parte dell'esperimento potrebbero essere utili in quanto misura indiretta dello stato emotivo degli animali e del possibile stress associato al consolidamento o meno dell'oggetto d'*imprinting*. Questi dati potrebbero essere utili per interpretare i risultati ottenuti sul sonno, in quanto come già descritto nei capitoli precedenti il processi mnestici legati al consolidamento dell'*imprinting* nell'emisfero sinistro hanno un influenza diretta sul sonno Mo-Un del pulcino.

7.2.2 Soggetti e apparato sperimentale

- Prima parte -

Relativamente alla prima parte di questo lavoro sono stati utilizzati 72 pulcini di pollo domestico (*Gallus gallus*) di sesso femminile appartenenti al ceppo *Hybro*, nei quali sono stati indagati gli effetti della deprivazione monoculare

sul quadro di sonno Bin e Mo-Un. Le uova utilizzate provenivano dall'incubatoio commerciale "Agricola Berica" di Montegalda, Vicenza, Italia. Anche in questo esperimento, le uova sono state incubate al buio nei nostri laboratori in un incubatrice automatica 79/100 MG 100H FIEM snc (45x58x43 cm). La temperatura (37,7°) e l'umidità (circa 50-60 %) erano mantenute costanti. Un gruppo di pulcini (n=48) proveniva da uova incubate al buio, mentre un altro gruppo di animali (n=24) proveniva da uova incubate alla luce. Al diciottesimo giorno d'incubazione le uova di quest'ultimo gruppo sono state esposte alla luce utilizzando una lampada ad incandescenza, di potenza 25 W, circa 250 Lux, inserita all'interno dell'incubatrice. L'apparato utilizzato per la stabulazione e l'osservazione del sonno è il medesimo descritto negli esperimenti precedenti (cfr. Capitolo VI) e rappresentato il Fig. 14 e 15. Come in precedenza, l'oggetto d'*imprinting* era costituito da un ovale di plastica, di colore rosso e dimensioni 4x3x3 cm sospeso, mediante un filo, al centro della gabbia.

- Seconda parte -

Nella seconda parte di questo lavoro sono stati utilizzati 40 pulcini di sesso femminile (ceppo *Hybro*), al fine di indagare gli effetti della deprivazione monoculare sull'attività locomotoria, in quanto, come descritto in precedenza, l'attività locomotoria potrebbe essere una misura indiretta dello stato emotivo dell'animale e risultare utile per comprendere i risultati sul sonno. Un gruppo di pulcini (n=28) proveniva da uova incubate al buio, mentre un altro gruppo di pulcini (n=12) proveniva da uova incubate alla luce (utilizzando la stessa metodica illustrata precedentemente). La registrazione dell'attività motoria spontanea dei pulcini e la variazione della quantità di attività locomotoria durante sia il periodo in cui gli animali erano sottoposti a DM che durante il

periodo successivo di sonno è stato indagato utilizzando un particolare apparato la “*activity recording cage*”, una gabbia in plastica di dimensioni 54×50×37 cm (Ugo Basile S.r.l., Cat. No. 7420/7445) (Fig. 25). La “*activity recording cage*” permette, tramite una serie di fotocellule ad infrarossi (IR) posizionate nella parte bassa di due delle pareti opposte della gabbia, di riconoscere il movimento prodotto dall’animale che causa l’interruzione degli IR.

Quattro contenitori trasparenti erano stati posizionati nei quattro angoli e riempiti di acqua. Il cibo è stato distribuito uniformemente sul fondo della gabbia in modo da non influenzare l’attività locomotoria degli animali. L’oggetto d’*imprinting* era posizionato, sospeso, nel centro della gabbia.

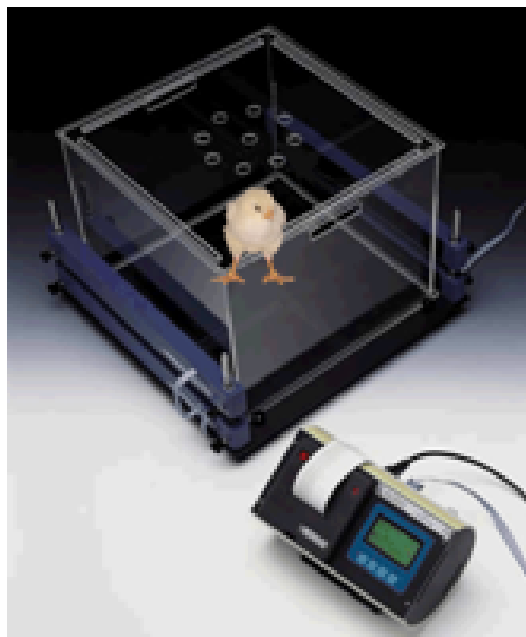


Fig. 25: Immagine della “*activity recording cage*”, la gabbia utilizzata per l’analisi dell’attività locomotoria dei pulcini.

7.2.3 Procedura

- Prima parte -

Subito dopo la schiusa, 24 pulcini provenienti da uova incubate alla luce (pulcini Light-Light) e 12 pulcini provenienti da uova incubate al buio (pulcini Dark-Light) sono stati stabulati singolarmente nelle gabbie di stabulazione-osservazione. E' stato inoltre formato un ulteriore gruppo di 12 pulcini (pulcini Dark-Dark) provenienti da uova incubate al buio e stabulati al buio fino al momento della DM. I pulcini sono stati privati monocolarmente per 12 ore consecutive, dalle 12:00 p.m. alle 12:00 a.m. del secondo giorno dopo la schiusa. Per ciascun gruppo di animali, 8 pulcini non hanno subito alcuna deprivazione (controllo), 8 pulcini sono stati sottoposti a deprivazione monoculare sinistra (chiusura occhio sinistro – SX) e 8 pulcini sono stati sottoposti a deprivazione monocolarmente destra (chiusura occhio destro – DX). Nello specifico le condizioni erano le seguenti: l'occhio destro è stato privato in un gruppo di pulcini (n=8, Light-Light DX; n= 8, Dark-Light DX; n=8, Dark-Dark DX), l'occhio sinistro in un secondo gruppo di animali (n=8, Light-Light SX; n=8, Dark-Light SX; n=8, Dark-Dark SX) e un ultimo gruppo di pulcini (n=8, Light-Light CONTROLLO; n=8, Dark-Light CONTROLLO; n=8, Dark-Dark CONTROLLO) non era stato sottoposto a deprivazione monoculare. In quest'ultimo gruppo quindi la visione binoculare era costantemente mantenuta (Fig. 26).

incubazione luce	allevamento luce	Light-Light-CONTROLLO	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento luce	Dark-Light-CONTROLLO	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento buio	Dark-Dark-CONTROLLO	osservazione	n=8
incubazione luce	allevamento luce	Light-Light-SX	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento luce	Dark-Light-SX	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento buio	Dark-Dark-SX	osservazione	n=8
incubazione luce	allevamento luce	Light-Light-DX	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento luce	Dark-Light-DX	osservazione	n=8
incubazione buio	allevamento buio	Dark-Dark-DX	osservazione	n=8

1° giorno di vita
12.00 p.m.
12.00 a.m.
6.00 p.m.

Fig. 26: Rappresentazione grafica della procedura utilizzata nell'esperienza di deprivazione monoculare.

La DM consisteva nell'applicazione di un cappuccio conico di tessuto nero, fissato con un sottile nastro adesivo, sull'occhio dell'animale, come rappresentato in Fig. 27.

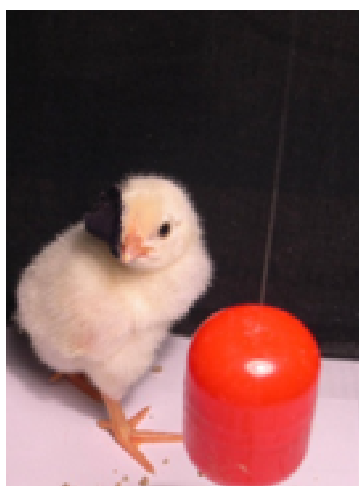


Fig. 27: Immagine di un pulcino durante la procedura di deprivazione monoculare con un cappuccio di stoffa nero applicato sull'occhio sinistro.

L'osservazione del sonno avveniva per 6 ore consecutivamente subito dopo la deprivazione monoculare, dalle ore 12:00 a.m. alle 6:00 p.m. del secondo giorno dopo la schiusa. L'osservazione era condotta direttamente dallo sperimentatore che monitorava 2 pulcini contemporaneamente. Le variabili dipendenti osservate e registrate erano il numero e la durata degli episodi di sonno Bin e Mo-Un distinguendo tra sonno Mo-Un destro (sonno nell'emisfero sinistro) e sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro).

- Seconda parte -

Subito dopo la schiusa, 16 pulcini provenienti da uova incubate al buio sono stati allevati alla luce (pulcini Dark-Light) mentre 12, sempre provenienti da uova incubate al buio, sono stati allevati al buio (pulcini Dark-Dark). I rimanenti 12 pulcini, che provenivano da uova incubate alla luce, sono stati allevati alla luce (pulcini Light-Light). Tutti gli animali sono stati stabulati singolarmente nella "*activity recording cage*" tranne i pulcini del gruppo Dark-Dark i quali restavano nell'incubatrice e venivano stabulati nella "*activity recording cage*" solo al momento in cui iniziava la sessione di DM. Come nella prima parte di questo esperimento, al secondo giorno di vita l'occhio destro è stato deprivato in un gruppo di pulcini (n = 5, Dark-Light DX; n = 4, Dark-Dark DX; n = 4, Light-Light DX), l'occhio sinistro in un secondo gruppo di animali (n = 5, Dark-Light SX; n = 4, Dark-Dark SX; n = 4, Light-Light SX), mentre un ultimo gruppo di pulcini (n = 6, Dark-Light CONTROLLO; n = 4, Dark-Dark CONTROLLO; n = 4, Light-Light CONTROLLO) non era stato sottoposto a deprivazione monoculare.

L'attività motoria è stata registrata per 12 ore durante la DM, dalle ore 12.00 p.m. alle 12:00 a.m. del secondo giorno di vita e per le 6 ore successive alla deprivazione, cioè durante lo stesso periodo in cui è stato registrato il quadro

di sonno nella prima parte di questo lavoro, (dalle ore 12:00 a.m. alle 6:00 p.m. del secondo giorno). Il numero di movimenti effettuati dall'animale sono stati campionati ogni 30 minuti.

7.2.4 Metodi di analisi

- Prima parte -

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Bin, è stato considerato il tempo totale e il numero degli episodi trascorsi dormendo. Per quanto riguarda il sonno Mo-Un, è stato considerato il tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un (Mo-Un destro e Mo-Un sinistro) e il numero e la durata degli episodi di sonno Mo-Un destro e di sonno Mo-Un sinistro separatamente. Per le analisi relative al tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro e destro è stato calcolato anche un indice di lateralità in percentuale con la formula: $\{[(\text{sonno Mo-Un sinistro}) - (\text{sonno Mo-Un destro}) / (\text{sonno Mo-Un sinistro}) + (\text{sonno Mo-Un destro})] \times 100\}$.

Sia l'indice di lateralità che il tempo trascorso dormendo in sonno Bin e Mo-Un, calcolati in secondi, sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA a misure ripetute), dopo aver controllato per la normalità della distribuzione e per l'omogeneità della varianza. Il gruppo di appartenenza (CONTROLLO – DX - SX) e le condizioni di incubazione allevamento (Light-Light - Dark-Light – Dark-Dark) sono stati considerati come fattori tra i soggetti (*between-subjects*). Sono stati calcolati anche contrasti semplici e complessi.

Le medie eventualmente riportate sono fornite di deviazione standard (*standard deviations* –SD). Inoltre, sono stati condotti dei test t di *Student* per il confronto tra medie.

- Seconda parte -

Il numero medio di movimenti compiuti dai pulcini per ora è stato analizzato utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA a misure ripetute) dopo aver controllato per la normalità della distribuzione e per l'omogeneità della varianza. Il gruppo di appartenenza (CONTROLLO, DX e SX) e la condizione sperimentale (Dark-Light, Dark-Dark e Light-Light) sono stati considerati come fattori tra i soggetti (*between-subjects*), mentre la sessione sperimentale (DM e 6 ore successive) è stata considerata come fattore entro i soggetti (*within-subjects*).

7.2.5 Risultati e discussione

- Prima parte -

Sonno binoculare

Per quanto riguarda il numero degli episodi in sonno Bin, l'ANOVA ha mostrato un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(2,71)} = 3.352$, $p = .041$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra come i pulcini dei gruppi Dark-Light mostrino un maggior numero di episodi di sonno Bin rispetto ai pulcini dei gruppi Dark-dark ($p = .033$). Non sono stati osservati altri effetti significativi relativamente al numero di episodi in sonno Bin (gruppo $F_{(2,71)} = 0.681$, *ns*; interazione gruppo e condizione $F_{(4,71)} = 0.848$, *ns*). Per quanto riguarda le analisi condotte sul tempo totale trascorso dormendo in sonno Bin non è stato osservato alcun effetto significativo (gruppo $F_{(2,71)} = 1.080$, *ns*; condizione $F_{(2,71)} = 1.301$, *ns*; interazione gruppo e condizione $F_{(4,71)} = 0.313$, *ns*).

Sonno monoculare

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un (Mo-Un destro e Mo-Un sinistro) è rappresentato in Fig. 28. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(2,71)} = 11.542, p < .001$) e del fattore d'interazione condizione e gruppo ($F_{(4,71)} = 2.662, p = .041$). Non sono stati osservati altri effetti significativi (gruppo $F_{(2,71)} = 3.094, p = .052, ns$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra una differenza significativa tra i pulcini dei gruppi Dark-Light e Dark-Dark ($p < .001$) e tra i pulcini dei gruppi Dark-Light e Light-Light ($p < .001$). L'analisi del contrasto semplice all'interno del gruppo Dark-Dark mostra come i pulcini del gruppo DX trascorrono più tempo in sonno Mo-Un rispetto ai pulcini del gruppo SX ($t_{(21)} = 2.290, p = .032$), mentre l'analisi del contrasto complesso per quanto riguarda il gruppo di pulcini Dark-Light mostra una differenza significativa tra i gruppi di controllo e i deprivati (pulcini dei gruppi DX e SX assieme). Per il gruppo Light-Light non è emersa alcuna significatività.

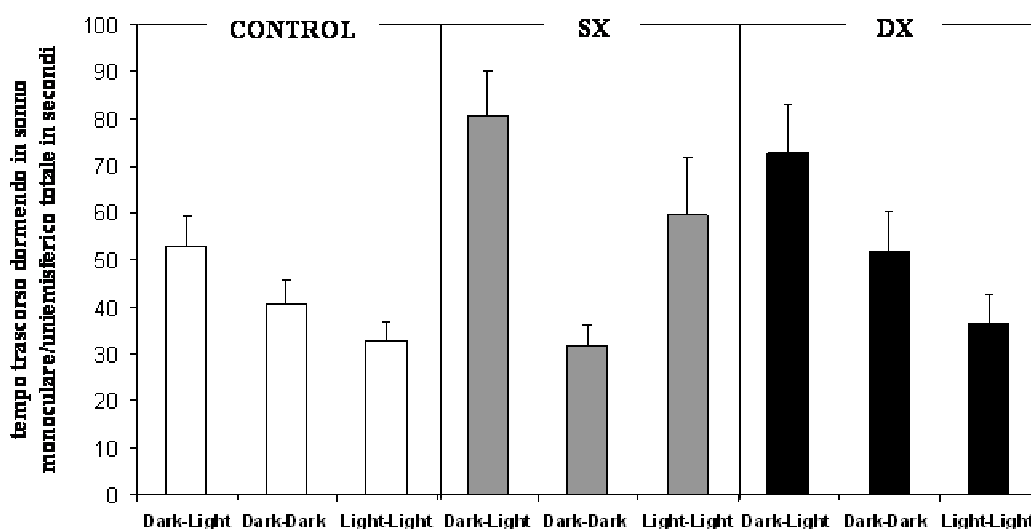


Fig. 28: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare/uniemisferico totale in secondi

Il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro è rappresentato in Fig. 29. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,71)} = 19.320, p < .001$) e del fattore d'interazione gruppo e condizione ($F_{(4,71)} = 3.691, p = .010$). Non è stato evidenziato alcun altro fattore significativo (condizione $F_{(2,71)} = 1.931, ns$; incubazione $F_{(1,71)} = 2.595, ns$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra come i pulcini dei gruppi deprivati destri (DX) trascorrono significativamente più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini dei gruppi deprivati sinistri SX ($p < .001$) e rispetto ai pulcini di controllo ($p < .001$). Il contrasto semplice condotto sia sul gruppo Dark-Dark che sul gruppo Dark-Light mostra come i pulcini dei gruppi DX trascorrono più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini dei gruppi SX (rispettivamente $t_{(8,208)} = 4.231, p = .003$; $t_{(12,983)} = 2.521, p = .026$). Il contrasto complesso condotto sia per il gruppo di pulcini Dark-Dark che per il gruppo di pulcini Dark-Light mostra come i controlli siano significativamente diversi rispetto ai pulcini deprivati ($t_{(14,329)} = 2.683, p = .018$; $t_{(18,829)} = 3.234, p = .004$). Non sono stati osservati effetti significativi per quanto riguarda i pulcini del gruppo Light-Light.

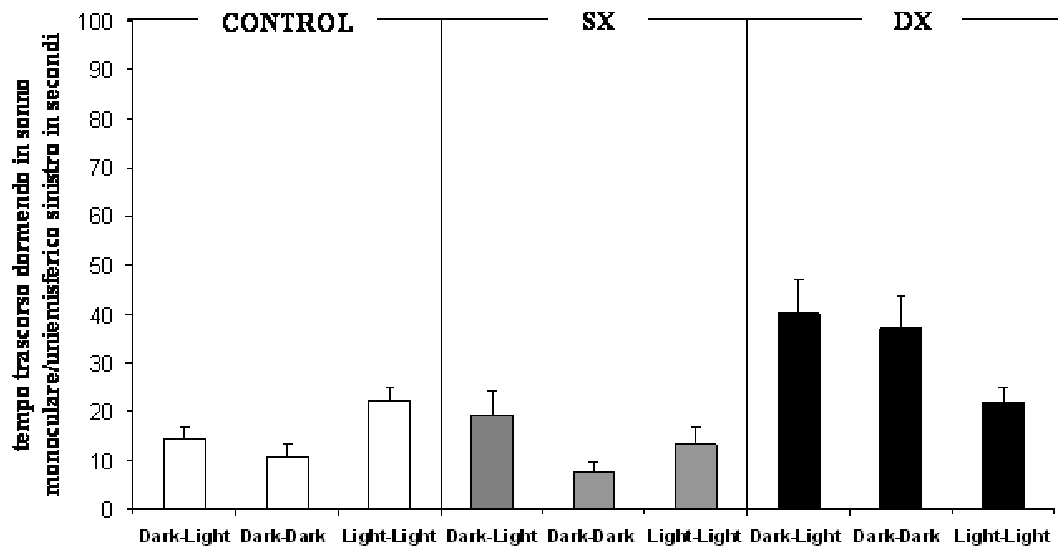


Fig. 29: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare/uniemisferico sinistro in secondi

Il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro è rappresentato in Fig. 30. L'ANOVA evidenzia un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,71)} = 10.576$, $p < .001$), condizione ($F_{(2,71)} = 10.432$, $p < .001$) e del fattore d'interazione gruppo e condizione ($F_{(4,71)} = 2.465$, $p = .035$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra come i pulcini del gruppo deprivato di sinistra trascorrono significativamente più tempo in sonno Mo-Un destro rispetto ai pulcini deprivati destri ($p = .001$) e dei pulcini di controllo ($p = .004$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra una differenza significativa tra i Dark-Light e Dark-Dark ($p < .001$) e tra i pulcini dei gruppi Dark-Light and Light-Light ($p = .001$). Il contrasto complesso condotto sui pulcini del gruppo Dark-Dark mostra come i pulcini di controllo siano significativamente diversi rispetto ai pulcini deprivati ($t_{(21)} = 2.357$, $p = .028$). Il contrasto semplice condotto sul gruppo Dark-Light mostra come i pulcini del gruppo SX trascorrono più tempo in sonno Mo-Un destro rispetto ai pulcini del gruppo

DX ($t_{(21)} = 2.925, p = .008$). Il contrasto complesso condotto sui pulcini Light-Light mostra come i pulcini di controllo siano significativamente diversi rispetto ai pulcini deprivati ($t_{(21)} = 2.798, p = .017$), mentre il contrasto semplice mostra come i pulcini SX trascorrono più tempo in sonno Mo-Un destro rispetto ai pulcini DX ($t_{(21)} = 2.308, p = .046$).

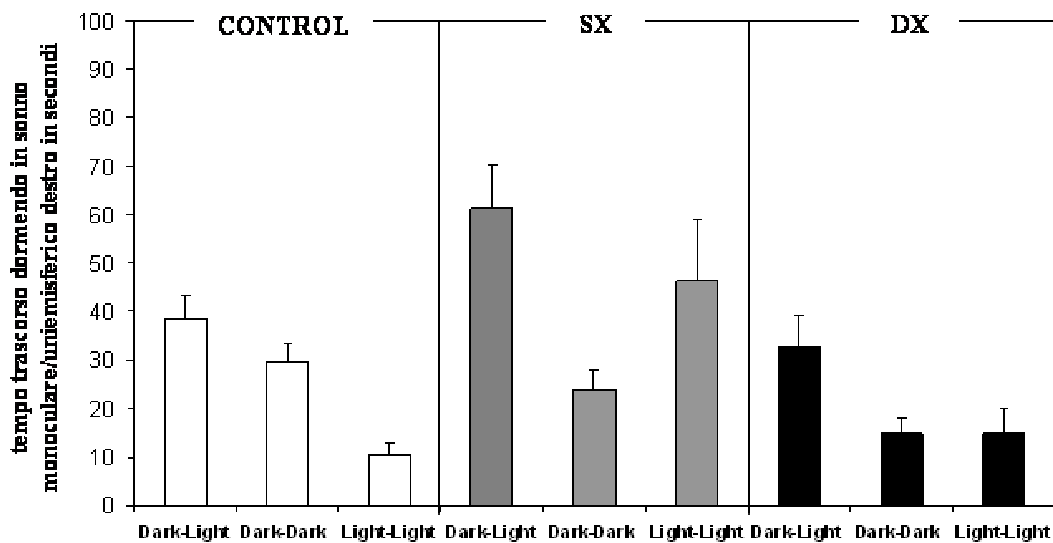


Fig. 30: Rappresentazione grafica del tempo trascorso in sonno monoculare/uniemisferico destro in secondi

La percentuale di sonno Mo-Un calcolata utilizzando l'indice di lateralità è rappresentata in Fig. 31. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,71)} = 32.795, p = <.001$), condizione ($F_{(2,71)} = 6.255, p = .003$) e del fattore d'interazione gruppo e condizione ($F_{(4,71)} = 5.483, p = .001$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra una differenza significativa tra i gruppi SX e DX ($p < .001$), tra i gruppi SX e controllo ($p = .008$) e tra i gruppi controllo e DX ($p < .001$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) mostra una differenza significativa tra i gruppi Light-light e i gruppi Dark-Dark ($p <$

.004) e Dark-Light ($p = .028$). Il contrasto semplice condotto sul gruppo Dark-Dark mostra una differenza significativa tra i pulcini DX e i pulcini SX ($t_{(21)} = 6.007$, $p < .001$), mentre il contrasto complesso mostra una differenza significativa tra i controlli e i pulcini deprivati ($t_{(21)} = 3.198$, $p = .004$). Il contrasto semplice sul gruppo Dark-Light mostra una differenza significativa tra i pulcini DX deprivati destri e i pulcini SX deprivati sinistri ($t_{(21)} = 3.791$, $p = .001$). Il contrasto semplice sul gruppo Light-Light mostra una differenza significativa tra i pulcini DX e i pulcini SX ($t_{(21)} = 4.315$, $p = .006$), mentre il contrasto complesso evidenzia una differenza significativa tra i pulcini di controllo e i pulcini deprivati ($t_{(21)} = 4.315$, $p = .001$).

Il test t di *Student* per singolo campione con il valore 0% come chiusura casuale di un occhio piuttosto che dell'altro durante gli episodi di sonno Mo-Un mostra una preferenza significativa per il sonno Mo-Un destro (sonno nell'emisfero sinistro) per i pulcini dei gruppi Dark-Dark controllo ($t_{(7)} = 6.126$, $p < .001$), Dark-Light controllo ($t_{(7)} = 7.976$, $p < .001$), Dark-Dark SX ($t_{(7)} = 4.173$, $p = .004$), Dark-Light SX ($t_{(7)} = 3.756$, $p = .007$) e Light-Light SX ($t_{(7)} = 3.848$, $p = .006$). I pulcini Light-Light controllo ($t_{(7)} = 3.564$, $P = .009$) e Dark-Dark DX ($t_{(7)} = 3.458$, $P = .011$) mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro. I pulcini dei gruppi Dark-Light DX ($t_{(7)} = 1.006$, *ns*) e Light-Light DX ($t_{(7)} = 1.948$, *ns*) non mostrano invece alcuna preferenza significativa per la chiusura di un occhio piuttosto che dell'altro durante gli episodi di sonno Mo-Un.

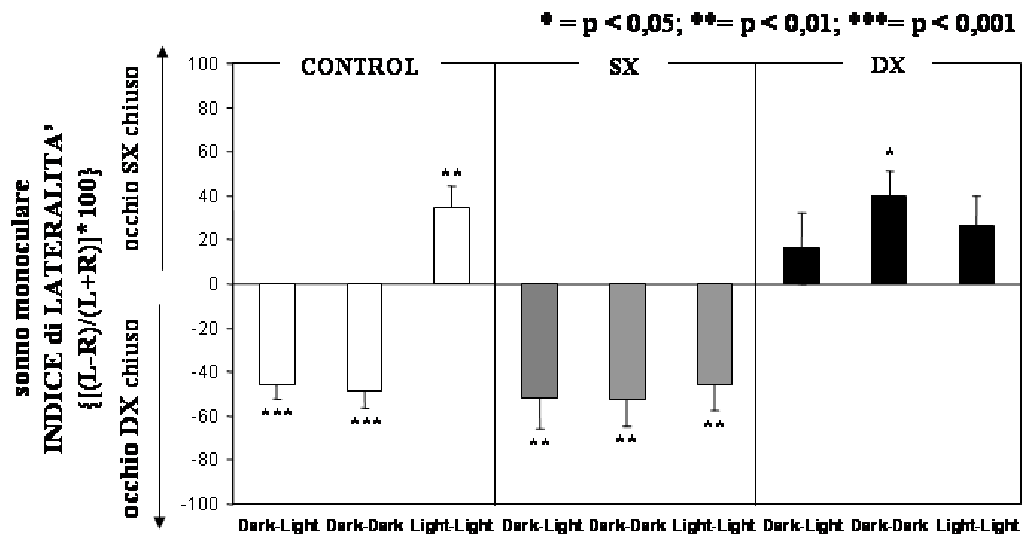


Fig. 31: Rappresentazione grafica della percentuale media di sonno monocale calcolata in indice di lateralità. L sta per chiusura dell'occhio sinistro (*left eye closed*) e R per chiusura dell'occhio destro (*right eye closed*).

- Seconda parte -

Attività locomotoria

Il numero medio di movimenti per ora durante la DM (12 ore) e per le 6 ore successive è rappresentato in Fig. 32. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore gruppo ($F_{(2,40)} = 4.645$, $p = .017$), del fattore condizione ($F_{(2,40)} = 203.732$, $p < .001$), del fattore d'interazione gruppo e condizione ($F_{(4,40)} = 3.613$, $p = .016$) e del fattore d'interazione sessione e condizione ($F_{(2,40)} = 27,323$, $p < .001$). L'analisi post-hoc (HSD Turkey) ha mostrato come il gruppo DX mostra un maggior numero di movimenti per ora rispetto ai pulcini di controllo ($p = .002$) e come il gruppo di pulcini Dark-Dark mostra più movimenti per ora rispetto ai pulcini del gruppo Dark-Light ($p < .001$) e Light-Light ($p < .001$).

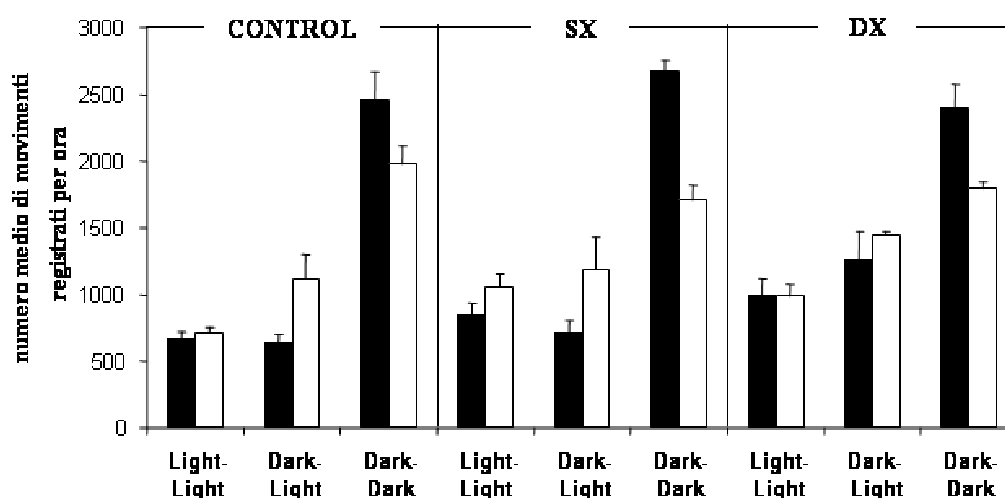


Fig. 32: Rappresentazione grafica del numero medio di movimenti per ora.

Discussione

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la DM non abbia alcun effetto sul tempo trascorso in sonno binoculare, mentre influenzi profondamente il quadro di sonno monoculare.

Per quanto riguarda il tempo trascorso in sonno monoculare totale è emerso che i pulcini del gruppo Dark-Light trascorrono più tempo in sonno monoculare rispetto ai pulcini del gruppo Dark-Dark e del gruppo Light-Light. Questo dato evidenzia come l'effetto della DM dipende e sia in qualche modo modulato dalle condizioni di incubazione e di allevamento alle quali gli animali sono stati sottoposti. Per i pulcini del gruppo Dark-Dark si osserva una differenza significativa tra i pulcini a cui è stato privato l'occhio sinistro (SX) e i pulcini a cui è stato privato l'occhio destro (DX); i pulcini DX infatti trascorrono più tempo in sonno monoculare rispetto ai pulcini SX.

I risultati ottenuti dalle analisi condotte sui tempi monoculari in secondi in questo esperimento sono indubbiamente complicati da interpretare per diverse ragioni che verranno illustrate nel corso di questa discussione, ma risultano più

chiari i dati relativi alla lateralizzazione del sonno. Il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un calcolato in indice di lateralità dimostra come i pulcini di controllo mantengano la lateralizzazione del sonno già descritta in letteratura da Bobbo e collaboratori (2002), infatti la stimolazione luminosa asimmetrica *in ovo* influenza il quadro di lateralizzazione del sonno. I pulcini del gruppo di controllo, le cui uova sono state incubate al buio, mostrano una chiara preferenza per la chiusura dell'occhio destro (sonno nell'emisfero sinistro), mentre i pulcini le cui uova sono state incubate alla luce mostrano una preferenza per la chiusura dell'occhio sinistro (sonno nell'emisfero destro). Sembra che il risultato ottenuto a seguito della stimolazione luminosa *in ovo* sia dovuto al fatto che gli animali lasciando aperto più spesso e per una maggior quantità di tempo l'occhio destro, cioè quello che aveva ricevuto la luce durante l'incubazione, in altre parole sembra almeno a quest'età che si sia sviluppata una via preferenziale occhio destro emisfero sinistro successiva alla stimolazione luminosa (Bobbo e coll., 2002).

Un altro dato interessante è come i pulcini SX, a cui è stato privato l'occhio sinistro, mostrino, a prescindere dalle condizioni di incubazione e di allevamento al primo giorno, una marcata preferenza per la chiusura dell'occhio destro durante gli episodi di sonno monoculare, mentre i pulcini DX, sembrano essere influenzati in modo differente dalla DM in base alle diverse condizioni di incubazione e allevamento. Solo i pulcini Dark-Dark mostrano una chiara preferenza per la chiusura dell'occhio sinistro durante il sonno monoculare, mentre gli altri due gruppi non mostrano alcuna preferenza significativa per la chiusura dell'uno o dell'altro occhio. Questi risultati, e principalmente quelli relativi ai pulcini del gruppo DX, potrebbero essere dovuti non solo dalla DM in sé, ma al processo d'*imprinting*, e nello specifico,

alla codifica e al consolidamento della traccia mestica dell'oggetto d'*imprinting* stesso che dovrebbe avvenire nell'emisfero di sinistra.

Osservando i dati relativi all'attività locomotoria, è emerso che i pulcini DX mostrano un significativo incremento dell'attività motoria rispetto ai pulcini del gruppo di controllo e che anche i del gruppo pulcini Dark-Dark presentano un'attività motoria significativamente più alta rispetto agli altri due gruppi. Questo effetto potrebbe essere interpretato alla luce del fatto che i pulcini del gruppo Dark-Dark l'incubazione al buio estende il periodo critico relativo alla codifica dell'oggetto d'*imprinting* al secondo giorno di vita. Per quanto riguarda la condizione dei pulcini DX i risultati relativi al movimento potrebbero essere dovuti ad un mancato consolidamento delle memorie d'*imprinting* dovuto all'esclusione dell'emisfero di sinistra e di conseguenza i pulcini esprimerebbero un maggior comportamento esplorativo legato ad una condizione stressante.

Questi risultati tuttavia non permettono di trarre delle conclusioni esaustive sulla possibile interferenza della DM sul processo d'*imprinting*, o meglio sul modo in cui la DM interferisca con tale processo, a questo proposito sono state condotte delle videoregistrazioni dall'alto per monitorare la posizione spaziale all'interno della gabbia assunta dall'animale rispetto all'oggetto d'*imprinting*, in quanto l'approccio a tale oggetto potrebbe fornire dati più esaustivi relativamente alle dinamiche che la DM produce sulla categorizzazione dell'oggetto d'*imprinting*.

Benchè il quadro sia ancora poco chiaro, dai risultati emerge che la stimolazione luminosa asimmetrica in ovo modula il sonno Mo-Un, come precedentemente dimostrato (Bobbo e coll.; 2002) e che la DM influenza il sonno Mo-Un: i pulcini SX mostrano, indipendentemente dalle condizioni di incubazione e allevamento, una preferenza per la chiusura dell'occhio destro,

cioè l'occhio non deprivato. E' plausibile quindi supporre che qualcosa accada all'emisfero deprivato. Un'ipotesi è che l'emisfero deprivato dorma e che quindi al termine della DM l'altro emisfero necessiti di dormire di più al fine di ottenere un recupero. Ulteriori studi, che stiamo pianificando prevedono la registrazione del tracciato EEG, al fine di delucidare quale sia l'attività, per lo meno elettrica, presente nell'emisfero "deprivato". Un'altra ipotesi può essere che nonostante la stimolazione luminosa *in ovo* moduli la direzione della lateralizzazione del sonno, come è stato osservato nei pulcini di controllo, la DM dopo la schiusa abbia un effetto più forte rispetto a quello che accade durante l'incubazione e possa nuovamente ribaltare il quadro Mo-Un.

Per quanto riguarda la DM dell'occhio destro sembra che gli effetti siano diversi a seconda delle condizioni di incubazione e allevamento al primo giorno. Solo i pulcini Dark-Dark infatti mostrando una preferenza per la chiusura dell'occhio sinistro. Gli altri due gruppi non mostrano alcuna preferenza. L'emisfero sinistro dei pulcini che hanno ricevuto luce o durante l'incubazione o durante il primo giorno di vita, potrebbe quindi essere meno sensibile alla DM perché le vie visive e le aree corticali ad esse associate potrebbero esse già state lateralizzate a sinistra, oppure considerando il ruolo che l'occhio destro, quindi la via visiva occhio destro – emisfero sinistro, riveste nell'analisi e nel processo dell'oggetto d'*imprinting* è possibile che la DM impedisca il consolidamento dell'oggetto d'*imprinting* e di conseguenza causi le modificazioni osservate relativamente al quadro di sonno Mo-Un.

Per concludere, anche se le ipotesi interpretative sono molte e il lavoro sopra descritto necessita di ulteriori indagini e di ulteriori esperimenti, è da osservare come il sonno Mo-Un abbia, soprattutto alla luce di questi risultati, una caratteristica di dinamicità e una distribuzione asimmetrica tra gli emisferi, non solo dipendentemente dalle attività svolte durante la veglia, ma anche dalle

necessità e dalle istanze prodotte dalle condizioni di incubazione o di allevamento. Anche se questi risultati, presi parzialmente, erano già stati in qualche modo illustrati da esperimenti precedentemente condotti nei nostri laboratori, in questo lavoro è stato possibile unire diverse condizioni (incubazione, allevamento, *imprinting* e deprivazione monoculare) sperimentali ed è stato possibile osservare come la distribuzione del sonno Mo-Un tra gli emisferi probabilmente segua le necessità prodotte dalle istanze alle quali l'animale è sottoposto, ma con una "gerarchia" ancora poco chiara. Tuttavia anche in questo esperimento sono emerse chiaramente da un punto di vista comportamentale gli aspetti locali del sonno Mo-Un che verranno trattati in rapporto all'apprendimento spaziale nel successivo capitolo.

- Bobbo, D., Quesrca, A., Nelini, C. e Mascetti G. G. "The effect of monocular deprivation on sleep in light and dark incubated domestic chick". In preparazione -

Capitolo VIII

SONNO UNIEMISFERICO E APPRENDIMENTO SPAZIALE NEL PULCINO

8.1 INTRODUZIONE

8.1.1 Apprendimento spaziale e sonno: evidenze nel pulcino

Come è stato ampiamente descritto in precedenza, nelle parti introduttive di questa tesi, il sonno è stato associato a meccanismi di conservazione energetica (Berger e Phillips, 1995), di termoregolazione (McGinty, 1990), detossificazione cerebrale e di recupero a livello tissutale (Adam e Oswald, 1977), è inoltre noto come le attività svolte durante la veglia influenzano sia il quadro che i meccanismi omeostatici di regolazione del sonno (Horne and Walmsley, 1976; Horne and Minard, 1985). Numerosi dati provenienti dalle neuroscienze cognitive, sottolineano il possibile ruolo svolto dal sonno nei processi di consolidamento *off-line* della traccia mestica (Maquet, 2001; Stickgold, 2005). I dati presenti in letteratura provengono sia da ricerche condotte su soggetti umani (Huber e coll., 2004; Stickgold, 2005) che su modelli animali (Frank e coll., 2001; Craig e McDonald, 2008; Dave e Margoliash, 2000; Jackson e coll., 2008) e attribuiscono un ruolo attivo al sonno nei processi di consolidamento della memoria. Per altro sono molte le questioni di ordine teorico che i risultati finora ottenuti lasciano aperte. In primo luogo, sappiamo, grazie allo sviluppo delle moderne tecniche elettrofisiologiche e psicofisiologiche, che il sonno si articola in differenti stadi (sonno desincronizzato o REM e sonno ad onde lente o SWS) ciascuno dei quali con peculiari caratteristiche fisiologiche e gestito da strutture

anatomiche differenti (Kandel e Schwartz, 2000). In secondo luogo le evidenze provenienti dalle scienze cognitive e dalla neuropsicologia suggeriscono un modello multicomponenziale della memoria e suddividono il magazzino mnestico in sottocomponenti di tipo qualitativo/categoriale (memoria dichiarativa e non dichiarativa) e di tipo quantitativo/temporale (memoria a breve termine, memoria a lungo termine e memoria di lavoro) (McGaugh, 2000; Stickgold, 2005). Non è stato chiarito il ruolo che il sonno REM o il sonno SWS potrebbero avere sui diversi tipi di memoria. Nel ratto, diversi studi sembrano sottolineare come le aree cerebrali ippocampali coinvolte durante la veglia in compiti spaziali (O'Keef, 1978) si riattivino durante il sonno SWS (Skaggs, McNaughton, 1996; Shen e coll., 1998; Stickgold e Walker, 2005). Questi risultati hanno permesso di ipotizzare che la riattivazione *off-line* a livello delle strutture corticali ippocampali durante il sonno SWS possa svolgere un ruolo nel consolidamento delle informazioni spaziali codificate durante la veglia e in transito dal magazzino a breve termine ippocampale al magazzino a lungo termine della neocorteccia (Sutherland e McNaughton, 2000). Nell'uomo i meccanismi coinvolti nella codifica e acquisizione delle informazioni spaziali risultano essere simili a quelle descritte nel ratto (Burgess e coll., 2002) e non di meno è stata osservata una stretta relazione tra riattivazione corticale delle strutture coinvolte nei processi di apprendimento spaziale e sonno (Stickgold e Walker, 2005). Come descritto nel Capitolo V, recentemente in diversi studi è stato sottolineato come il sonno abbia aspetti regionali e locali (*local sleep*) e la sua distribuzione sullo scalpo sembrerebbe strettamente dipendente dall'attivazione di specifiche aree cerebrali durante la veglia (Kattler e coll., 1994; Huber e coll., 2004). Quando una parte del cervello viene coinvolta in processi di apprendimento, questa parte mostrerebbe più SWS durante il

successivo periodo di sonno rispetto ad altre aree cerebrali non coinvolte nel compito. E' stato ampiamente descritto in questa tesi, come il pulcino domestico, grazie alle sue numerose peculiari caratteristiche anatomico-fisiologiche, risulti essere un ottimo modello animale per lo studio, a livello comportamentale, dei rapporti tra sonno e memoria. Mascetti e collaboratori nel (2007) hanno indagato il quadro di sonno Mo-Un dei pulcini successivo ad un compito di apprendimento spaziale che consisteva nel far imparare all'animale a discriminare la posizione, destra o sinistra, di una scatola contenente del cibo. In questo esperimento i pulcini del gruppo sperimentale imparavano il compito e mostravano una lateralizzazione del sonno in favore del sonno Mo-Un sinistro (sonno nell'emisfero destro) che sembrava essere associata ad un maggior coinvolgimento dell'emisfero destro nei compiti di apprendimento relativi al compito ai quali gli animali erano sottoposti. I pulcini di controllo, i quali non mostravano di aver appreso il compito, non mostravano alcuna preferenza per il sonno Mo-Un sinistro o Mo-Un destro. Per quanto riguarda i risultati relativi ai controlli sono state date due principali interpretazioni: 1) l'assenza di una maggior attività dell'emisfero destro emisferica durante il compito è stata associata ad un assenza di apprendimento; 2) l'assenza di una dominanza emisferica è stata considerata una conseguenza di un basso livello di stimolazione visiva (le scatole da discriminare erano uguali ed entrambe bianche) e di un altrettanto basso livello di motivazione (era fornito un rinforzo *random* destra/sinistra del 50%). Per attribuire ai dati ottenuti, che sembrano mostrare una maggior quantità di sonno nell'emisfero destro, coinvolto nel processo di apprendimento, è necessario risolvere l'ambiguità interpretativa che emerge osservando i risultati relativi ai pulcini di controllo.

8.2 RICERCA SPERIMENTALE

8.2.1 Ipotesi e obiettivi

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare le modificazioni del quadro di sonno Bin e Mo-Un in seguito alla somministrazione all'animale di un compito di apprendimento spaziale e, al fine di chiarire l'ambiguità osservata in un precedente esperimento su sonno e apprendimento spaziale condotto nei nostri laboratori (Masetti e coll., 2007), è stato utilizzato un paradigma nel quale sia i pulcini sperimentali che quelli di controllo sono stati sottoposti allo stesso tipo e quantità di stimolazione visiva e allo stesso livello di motivazione nello svolgimento del compito. Il paradigma sperimentale utilizzato è stato il paradigma dei "moduli geometrici". Questo paradigma è stato utilizzato in diverse specie animali e nell'uomo per valutare il ri-orientamento dei soggetti basato esclusivamente su indizi topografici (Cheng, 1986; Vallortigara e coll., 1990; Hermer e Spelke, 1994;1996).

Vallortigara (1994; 2000) hanno descritto come pulcini addestrati a trovare cibo in un determinato angolo di un arena di forma rettangolare in assenza di indizi oggettuali, fossero capaci di apprendere la posizione dell'angolo che era stato rinforzato durante l'esperimento. I risultati mostrano come i pulcini non sceglieranno a caso durante la successiva fase di *test* ma concentrano la ricerca del cibo nella posizione precedentemente appresa, dimostrando di aver codificato in maniera adeguata gli indizi spaziali. Se nel pulcino il sonno SWS ricopre un ruolo nel consolidamento della traccia mnestica, l'emisfero di destra, che sappiamo in questo animale principalmente deputato alla codifica delle caratteristiche topografiche dell'ambiente, dovremmo osservare un incremento della durata di sonno Un-Mo sinistro (sonno nell'emisfero destro).

E' stato condotto anche un successivo esperimento durante il quale i pulcini sono stati sottoposti alle stesse condizioni sperimentali e al medesimo paradigma, descritto brevemente sopra ed illustrato più dettagliatamente in seguito, ma eseguivano il compito in visione monoculare. Un gruppo di pulcini in visione monoculare sinistra e l'altro gruppo in visione monoculare destra. Quest'ultimo esperimento è stato condotto allo scopo di osservare se l'emisfero sinistro, non dominante e solitamente non coinvolto in compiti spaziali, potesse farsi carico del compito spaziale al quale l'animale veniva sottoposto e di conseguenza durante il successivo periodo di sonno si modificasse il quadro di sonno Mo-Un in favore dell'emisfero sinistro.

8.2.2 Soggetti

- Primo esperimento -

Sono stati utilizzati 12 pulcini di pollo domestico (*Gallus gallus*) di sesso femminile all'ottavo giorno di vita, appartenenti al ceppo *Hybro*. Sono stati utilizzati pulcini all'ottavo giorno di vita in quanto mostrano un *pattern* di sonno consistente e uno stabile comportamento alimentare. Inoltre, a quest'età il processo di consolidamento dell'oggetto d'imprinting è terminato e gli animali mostrano una massa corporea e un'attività motoria consona all'esperimento di apprendimento spaziale al quale saranno sottoposti.

Le uova da cui schiudevano gli animali provenivano dall'incubatoio commerciale "Agricola Berica" di Montegalda, Vicenza, Italia. Le uova sono state incubate al buio nei nostri laboratori in un incubatrice automatica 79/100 MG 100H FIEM snc (45x58x43 cm). La temperatura (37,7°) e l'umidità (circa 50-60 %) erano mantenute costanti. Per ultimo, le uova sono state incubate al buio al fine di evitare che la stimolazione luminosa potesse alterare alcuni

aspetti della lateralizzazione cerebrale (Rogers, 1995) e del quadro di sonno uniemisferico (Bobbo e coll., 2002).

- Secondo esperimento –

Anche in questo caso sono stati utilizzati 12 pulcini di pollo domestico (*Gallus gallus*) di sesso femminile all'ottavo giorno di vita, appartenenti al ceppo *Hybro*. Le condizioni di incubazione e di allevamento erano le medesime di quelle descritte sopra.

8.2.3 Apparato sperimentale

-Primo esperimento -

Le gabbie di stabulazione e osservazione è già stato ampiamente descritto nel Capitolo VI (Fig. 14 e 15).

L'apparato utilizzato per l'addestramento spaziale è rappresentato in Fig. 33 e consiste in un'arena di forma rettangolare con pareti di legno bianche e pavimento di plastica bianca opaca. Le dimensioni erano le seguenti: il lato lungo misurava 120 cm, il lato corto 60 cm mentre l'altezza era di 40 cm. Contenitori di vetro trasparente (diametro 5 cm, altezza 6 cm) erano posizionati nei quattro angoli dell'arena e riempiti di cibo. Tutti i contenitori avevano incollata sull'apertura una sottile rete di plastica nera. Nella condizione sperimentale di apprendimento, solo un contenitore aveva anche un piccolo buco di 2 cm di diametro nella rete, al fine di rendere il cibo accessibile. Nella condizione di controllo ("non apprendimento") tutti e quattro i contenitori avevano un buco nella rete in modo che il cibo fosse accessibile in qualsiasi contenitore. La parte alta dell'arena era coperta da un telo nero che fungeva da schermo monodirezionale. L'arena era illuminata dall'alto da tre lampade ad incandescenza (di 25 W ciascuna) che rendevano

l'ambiente interno omogeneamente illuminato. L'arena utilizzata per la fase di test (durante la quale era verificato l'avvenuto apprendimento) era la medesima descritta sopra, ma tutti i vasetti erano coperti dalla rete di plastica rendendo il cibo inaccessibile.

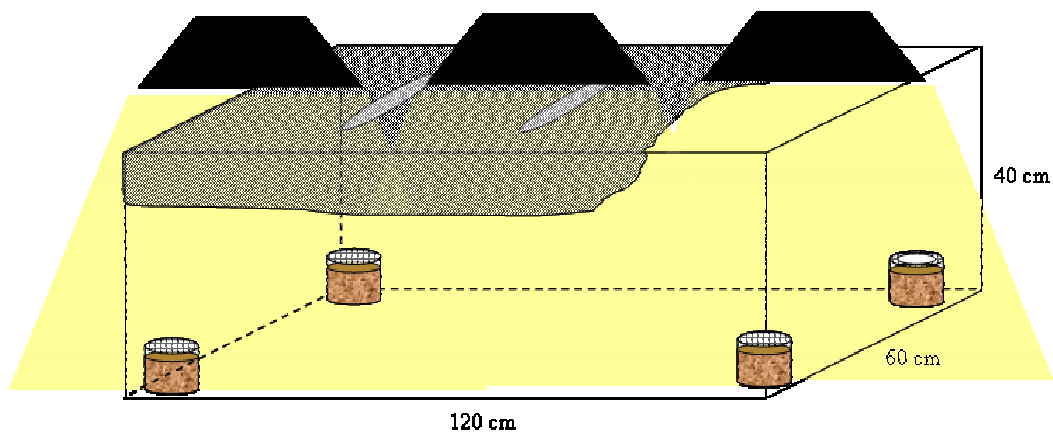


Fig. 33: Rappresentazione grafica dell'arena utilizzata durante l'esperimento. Dipendentemente dalla condizione sperimentale (apprendimento, non-apprendimento e test), nei quattro angoli venivano disposti contenitori in cui il cibo poteva o non poteva essere accessibile.

- Secondo esperimento -

Nel secondo esperimento gli apparati utilizzati erano gli stessi descritti nel paragrafo precedente, fatto salvo che i vasetti all'interno dell'arena durante l'addestramento erano tutti chiusi dalla rete tranne uno, in quanto non era contemplata la condizione di "non apprendimento". La procedura sarà illustrata più dettagliatamente nel prossimo paragrafo.

8.2.4 Procedura

- Primo esperimento -

Subito dopo la schiusa i pulcini venivano stabulati singolarmente nelle gabbie di stabulazione, allevamento e osservazione, dove rimanevano fino all'ottavo giorno di vita. Il settimo giorno dopo la schiusa, tutti i pulcini, indipendentemente dalla condizione di appartenenza, venivano inseriti singolarmente per 30-40 minuti nell'arena sperimentale, all'interno della quale potevano muoversi liberamente per esplorare l'ambiente e ricercare cibo, il quale era accessibile in ciascuno dei quattro angoli. Subito dopo i pulcini venivano riportati nelle gabbie di stabulazione dove erano deprivati di cibo per 13 ore consecutive al fine di indurre negli animali una motivazione sufficiente a svolgere il compito di apprendimento spaziale. Le sessioni di addestramento avvenivano subito dopo la deprivazione di cibo al giorno 8, 9 e 10 dopo la schiusa. La sessione di addestramento consisteva in tre blocchi da 10 prove ciascuno, i 3 blocchi di prove erano separati uno dall'altro da 3 minuti di intervallo. Una prova durava al massimo 2 minuti. L'animale attendeva l'inizio della prova in una scatola di cartone che veniva poco prima dell'inizio mossa in modo circolare sul suo asse al fine di disorientare l'animale. Lo sperimentatore inseriva l'animale nell'arena prelevandolo dalla scatola di cartone con una mano e con l'altra coprendogli gli occhi per tutta la durata del passaggio dalla scatola all'arena. L'animale una volta inserito nell'arena veniva posizionato al centro dell'apparato ma con una posizione casuale rispetto al proprio asse corporeo. Durante un intervallo tra una prova e l'altra, il pulcino veniva rimesso nella scatola di cartone e disorientato nuovamente per 5-10 secondi, al fine di evitare che potesse usare indizi non di tipo topografico durante la prova successiva. Inoltre veniva costantemente monitorato il pavimento dell'arena e nel caso fossero presenti detriti di cibo o di escrementi,

immediatamente pulito. Sei pulcini (gruppo sperimentale, Exp-Group) venivano addestrati singolarmente nell'arena di "apprendimento spaziale" nella quale era presente un solo contenitore, posizionato nell'angolo A (Fig. 34-A), con un foro nella parte superiore, dove era presente la rete. Questo di conseguenza risultava essere l'unico contenitore in cui era accessibile il cibo, negli altri angoli i contenitori non permettevano di raggiungere il cibo. Una prova terminava o quando il pulcino trovava il cibo nel contenitore nell'angolo A o quando falliva e raggiungeva e cercava cibo in uno dei rimanenti 3 contenitori (in cui il cibo non era accessibile). Sei pulcini (gruppo di controllo, Cont-Group) fungevano da controllo e venivano addestrati nelle medesime condizioni ma nell'arena di "non-apprendimento spaziale". L'apparato consisteva nella medesima arena utilizzata in precedenza ma all'interno della quale i pulcini potevano trovare il cibo accessibile in tutti i contenitori (in quanto tutti erano provvisti di un buco nella rete che li ricopriva) posti nei quattro angoli (Fig. 34-B). In questo caso la prova durava fino al momento in cui gli animali non trovavano il cibo in un angolo.

Veniva registrato il primo angolo che gli animali sceglievano e avvicinavano in modo deciso. L'avvicinamento considerato da registrare consisteva nell'avvicinamento e osservazione ravvicinata del contenitore solitamente accompagnato da pigolii brevi e di bassa intensità. Nella condizione di "apprendimento spaziale" dipendentemente dalla forma dell'arena potevano essere individuate due posizioni: 1) l'angolo "corretto" che includeva sia l'angolo rinforzato ma anche il suo omologo geometrico l'angolo C (angoli A e C, Fig. 34) (il lato lungo dell'arena era alla sinistra del corpo dell'animale); una prova corretta quindi era registrata sia quando il pulcino si avvicinava o all'angolo A o all'angolo C. 2) l'angolo "sbagliato" includeva gli altri due angoli (angoli B e D, Fig. 34) (il lato lungo dell'arena era alla sinistra del

corpo dell'animale), quando gli animali si avvicinavano a questi angoli la prova veniva registrata come sbagliata. La scelta di rinforzare solo uno dei due angoli corretti è stata fatta sia per avere la sicurezza che i due angoli fossero percettivamente identici per i pulcini che per avere la sicurezza che l'arena stessa fosse perfettamente simmetrica. Il criterio per passare alla fase di test veniva raggiunto quando gli animali riuscivano a scegliere l'angolo corretto in 24 o più prove delle 30 alle quali erano sottoposti (80% di scelte corrette). Gli animali che, sottoposti all'addestramento spaziale, non raggiungevano il criterio in nessuno dei giorni di addestramento venivano esclusi dall'esperimento (circa 25% del totale).

Al giorno undicesimo, entrambi i gruppi di pulcini venivano prima sottoposti a 20 prove di addestramento (dipendentemente dalla loro condizione sperimentale) e subito dopo al test per l'apprendimento costituito da 2 blocchi da sette prove ciascuno. Durante il test, i pulcini venivano inseriti nell'arena "test" che era la medesima delle condizioni precedenti ma nella quale tutti i contenitori erano coperti dalla rete di plastica e in nessuno era accessibile il cibo (Fig. 34-C), il test era quindi condotto in estinzione in quanto veniva osservato il comportamento degli animali dei due gruppi in assenza del rinforzo (cibo). Il criterio di apprendimento veniva considerato raggiunto quando i pulcini sperimentali sceglievano correttamente l'angolo A o C in almeno l'80% delle prove del test. I pulcini di controllo erano sottoposti alle medesime prove di test.

Al termine di ciascuna sessione di addestramento o di test, i pulcini venivano rimessi nelle loro gabbie di stabulazione e osservazione e ("Capitolo VI", Fig. 14 e 15) e il sonno veniva osservato direttamente dallo sperimentatore per 3 ore consecutive da un punto di vista comportamentale. Anche in questo caso

venivano registrati il numero e la durata degli episodi di sonno Bin e Mo-Un distinguendo tra sonno Mo-Un sinistro e Mo-Un destro.

- Secondo esperimento -

Subito dopo la schiusa anche in questo caso i pulcini venivano stabulati singolarmente nelle gabbie di stabulazione, allevamento e osservazione, dove rimanevano fino all'ottavo giorno di vita. Il settimo giorno dopo la schiusa, tutti i pulcini, indipendentemente dalla condizione di appartenenza, venivano inseriti singolarmente per 30-40 minuti nell'arena sperimentale, all'interno della quale potevano muoversi liberamente per esplorare l'ambiente e ricercare cibo, il quale era accessibile in ciascuno dei quattro angoli. Subito dopo i pulcini venivano riportati nelle gabbie di stabulazione dove erano deprivati di cibo per 13 ore consecutive al fine di indurre negli animali una motivazione sufficiente a svolgere il compito di apprendimento spaziale. Le sessioni di addestramento avvenivano subito dopo la deprivazione di cibo al giorno 8, 9 e 10 dopo la schiusa. Un'ora prima della sessione di addestramento, lo sperimentatore occludeva un occhio al pulcino utilizzando la medesima procedura descritta nel "Capitolo VII" relativamente alla deprivazione monoculare: un cappuccio di tessuto nero di forma conica applicato con un sottile strato di nastro adesivo (Fig. 27). Dipendentemente dal gruppo sperimentale di appartenenza veniva occluso l'occhio sinistro o l'occhio destro. Tale occlusione anticipata di un'ora rispetto all'inizio delle sessioni di addestramento risultava necessaria per far abituare l'animale alla benda utilizzata per l'occlusione. La sessione di addestramento consisteva in tre blocchi da 10 prove ciascuno, i 3 blocchi di prove erano separati uno dall'altro da 3 minuti di intervallo. Una prova durava al massimo 2 minuti. L'animale attendeva l'inizio della prova in una scatola di cartone che veniva

poco prima dell'inizio mosso in modo circolare sul suo asse al fine di disorientare l'animale. Lo sperimentatore inseriva l'animale nell'arena prelevandolo dalla scatola di cartone con una mano e con l'altra coprendogli gli occhi per tutta la durata del passaggio dalla scatola all'arena. L'animale una volta inserito nell'arena veniva posizionato al centro dell'apparato ma con una posizione casuale rispetto al proprio asse corporeo. Durante un intervallo tra una prova e l'altra, il pulcino veniva rimesso nella scatola di cartone e disorientato nuovamente per 5-10 secondi, al fine di evitare che potesse usare indizi non di tipo topografico durante la prova successiva. Inoltre veniva costantemente monitorato il pavimento dell'arena e nel caso fossero presenti detriti di cibo o di escrementi, immediatamente pulito. Sei pulcini (gruppo Dep-Dx) subivano l'occlusione selettiva dell'occhio destro e 6 subivano l'occlusione selettiva dell'occhio sinistro (Dep-Sx). Tutti gli animali venivano addestrati singolarmente nell'arena di "apprendimento spaziale" nella quale era presente un solo contenitore, posizionato nell'angolo A (Fig. 34-A), con un foro nella parte superiore, dove era presente la rete. Questo di conseguenza risultava essere l'unico contenitore in cui era accessibile il cibo, negli altri angoli i contenitori non permettevano di raggiungere il cibo. Una prova terminava o quando il pulcino trovava il cibo nel contenitore nell'angolo A o quando falliva e raggiungeva e cercava cibo in uno dei rimanenti 3 contenitori (in cui il cibo non era accessibile).

Veniva registrato il primo angolo che gli animali sceglievano e si avvicinavano in modo deciso. L'approccio considerato da registrare consisteva nell'avvicinamento e osservazione ravvicinata del contenitore solitamente accompagnato da pigolii brevi e di bassa intensità. Nella condizione di "apprendimento spaziale" dipendentemente dalla forma dell'arena potevano essere individuate due posizioni: 1) l'angolo "corretto" che includeva sia

l'angolo rinforzato ma anche il suo omologo geometrico l'angolo C (angoli A e C, Fig. 34) (il lato lungo dell'arena era alla sinistra del corpo dell'animale); una prova corretta quindi era registrata sia quando il pulcino si avvicinava o all'angolo A o all'angolo C. 2) l'angolo "sbagliato" includeva gli altri due angoli (angoli B e D, Fig. 34) (il lato lungo dell'arena era alla sinistra del corpo dell'animale), quando gli animali si avvicinavano a questi angoli la prova veniva registrata come sbagliata. La scelta di rinforzare solo uno dei due angoli corretti era basata sulle medesime considerazioni descritte in precedenza. Il criterio per passare alla fase di test, anche in questo caso, veniva raggiunto quando gli animali riuscivano a scegliere l'angolo corretto in 24 o più prove delle 30 alle quali erano sottoposti (80% di scelte corrette).

Al giorno undicesimo, entrambi i gruppi di pulcini venivano prima sottoposti a 20 prove di addestramento (dipendentemente dalla loro condizione sperimentale) e subito dopo al test per l'apprendimento costituito da 2 blocchi da sette prove ciascuno. Durante il test, i pulcini venivano inseriti nell'arena "test" che era la medesima delle condizioni precedenti ma nella quale tutti i contenitori erano coperti dalla rete di plastica e in nessuno era accessibile il cibo (Fig. 34-C), il test era quindi condotto in estinzione in quanto veniva osservato il comportamento degli animali dei due gruppi in assenza del rinforzo (cibo). Il criterio di apprendimento veniva considerato raggiunto quando i pulcini sperimentali sceglievano correttamente l'angolo A o C in almeno l'80% delle prove del test. I pulcini di controllo erano sottoposti alle medesime prove di test.

Al termine di ciascuna sessione di addestramento o di test, i pulcini venivano rimessi nelle loro gabbie di stabulazione e osservazione e ("Capitolo VI", Fig. 14 e 15) e il sonno veniva osservato direttamente dallo sperimentatore per 3 ore consecutive da un punto di vista comportamentale. Anche in questo caso

venivano registrati il numero e la durata degli episodi di sonno Bin e Mo-Un distinguendo tra sonno Mo-Un sinistro e Mo-Un destro.

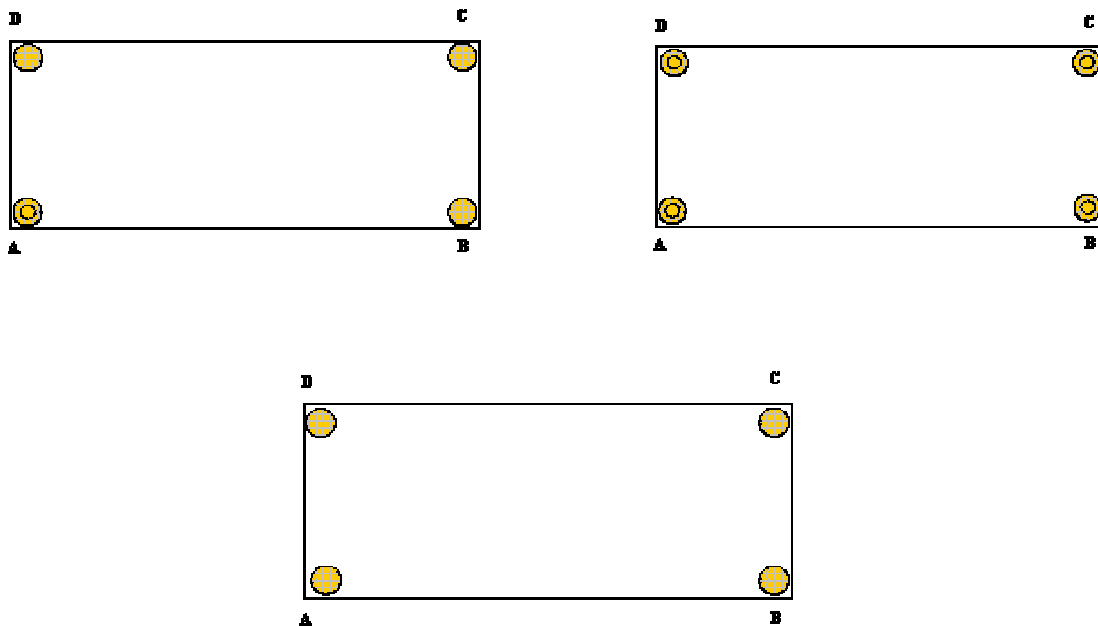


Fig. 34: Rappresentazione grafiche delle arene utilizzate durante l’esperimento. **A:** arena utilizzata per la sessione “apprendimento spaziale”. **B:** arena utilizzata per la sessione “non-apprendimento spaziale”. **C:** arena utilizzata per la sessione “test”.

8.2.5 Metodi di analisi

Per entrambi gli esperimenti, per quanto riguarda l’apprendimento, è stata calcolata la media della percentuale di scelta corretta (angolo A o C) durante le prove sul totale delle prove effettuate dai pulcini. I dati sono stati analizzati tramite l’analisi della varianza (ANOVA a misure ripetute) dopo aver controllato per la normalità della distribuzione e per l’omogeneità della varianza. Sono state condotte delle ANOVA a misure ripetute con la

condizione (Exp-Group e Cont-Group o Dep-Dx e Dep-Sx) come fattore tra i soggetti (*between-subjects*) e la sessione (addestramento giorno “8”, “9”, “10”, “11”, e “test” giorno 11) come fattore entro i soggetti (*within-subjects*). Inoltre sono stati condotti sia per il gruppo Exp-Group che per il gruppo Cont-Group analisi t di *Student* per singolo campione sulle medie delle percentuali ottenute, al fine di osservare se la scelta dei soggetti si discostasse significativamente dalla scelta casuale (50%).

Per l’analisi del sonno totale, il sonno Bin, il sonno Mo-Un totale e il sonno Mo-Un destro o sinistro calcolati in secondi, sono state utilizzate analisi della varianza (ANOVA a misure ripetute) con la condizione (Exp-Group e Cont-Group) come fattore tra i soggetti (*between-subjects*) e il giorno (giorno “8”, “9”, “10”, “11”) come fattore entro i soggetti (*within-subjects*).

Inoltre, Per le analisi relative al tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro e destro è stato calcolato anche un indice di lateralità con la formula: $\{[(\text{sonno Mo-Un sinistro}) - (\text{sonno Mo-Un destro}) / (\text{sonno Mo-Un sinistro}) + (\text{sonno Mo-Un destro})] \times 100\}$.

L’indice di lateralità è stato analizzato utilizzando analisi della varianza (ANOVA a misure ripetute) con la condizione (Exp-Group e Cont-Group) come fattore tra i soggetti (*between-subjects*) e il giorno (giorno “8”, “9”, “10”, “11”) come fattore entro i soggetti (*within-subjects*).

La preferenza significativa per il sonno Mo-Un sinistro o Mo-Un destro durante gli episodi di sonno Mo-Un è stata analizzata con analisi delle medie t di *Student* per singoli campioni con il valore 0% come valore casuale di chiusura degli occhi.

8.2.6 Risultati

- Primo esperimento -

Apprendimento

I risultati relativi all'apprendimento sono rappresentati in Fig. 35. Rappresentano la media della percentuale di scelta corretta (prima scelta), sul totale delle scelte effettuate dai pulcini relativamente alle due posizioni definite all'interno dell'arena (angolo "corretto": angoli A o C; e angolo "sbagliato": angoli B o D) durante i tre giorni di addestramento, il breve addestramento prima del test e il test. L'ANOVA mostra un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 144,623, p < .001$), del fattore sessione ($F_{(4,40)} = 6,745, p < .001$) e del fattore di interazione condizione e sezione ($F_{(4,40)} = 3,955, p = .008$). I dati mostrano un sistematico aumento di comportamenti di ricerca presso gli angoli A e C (angolo "corretto") dei pulcini sperimentali (Exp-Group) e invece nessun aumento nella ricerca del cibo negli angoli A e C nei pulcini di controllo. I test t di *Student* per singoli campioni calcolati per ciascun gruppo in ciascuna sessione hanno mostrato una scelta non casuale verso l'angolo corretto solo nei pulcini del gruppo sperimentale (sottoposti ad addestramento con apprendimento) (addestramento giorno 8, $t_{(5)} = 3,180, p = .025$; addestramento 9, $t_{(5)} = 4,722, p = .005$; addestramento giorno 10, $t_{(5)} = 8,675, p < .001$; addestramento giorno 11, $t_{(5)} = 7,980, p < .001$) e durante il test (test giorno 11, $t_{(5)} = 15,539, p < .001$). Inoltre i pulcini del gruppo Exp-Group raggiungevano il criterio di apprendimento (80% di scelte corrette) al giorno 11 di addestramento e lo mantenevano durante il test.

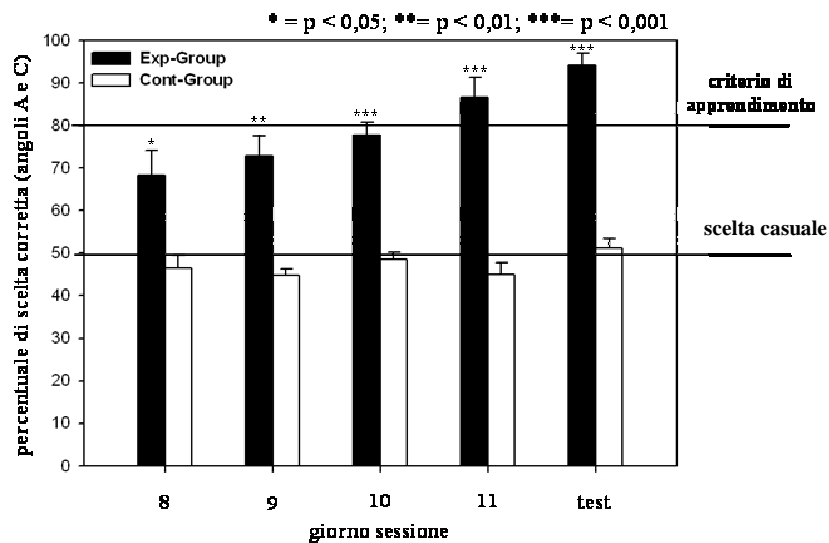


Fig. 35: Rappresentazione grafica delle percentuali di scelta corretta durante l'addestramento e il test (angolo A o C).

Sonno totale

Relativamente al sonno totale, l'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 7,206, p = .023$). I pulcini del gruppo Exp-Group trascorrono più tempo dormendo rispetto ai pulcini del gruppo Cont-Group.

Sonno binoculare

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Bin calcolato in secondi è rappresentato in Fig. 36. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 7,273, p = .022$). I pulcini del gruppo Exp-Group mostrano di trascorrere significativamente più tempo in sonno Bin rispetto ai pulcini del gruppo Cont-Group. La durata media degli eventi di sonno Bin calcolato in secondi è rappresentato in Fig. 37. L'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 5,319, p = .044$); i pulcini

del gruppo Exp-Group mostrano una durata media degli episodi di sonno Bin maggiore rispetto ai pulcini del gruppo Cont-Group.

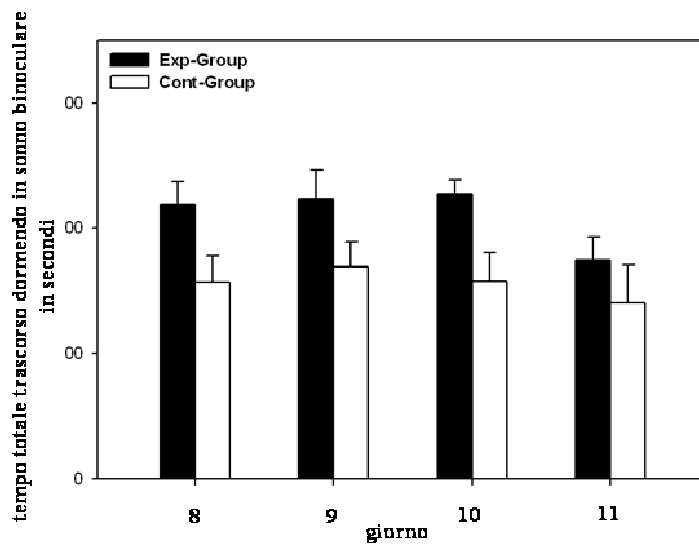


Fig. 36: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno binoculare in secondi.

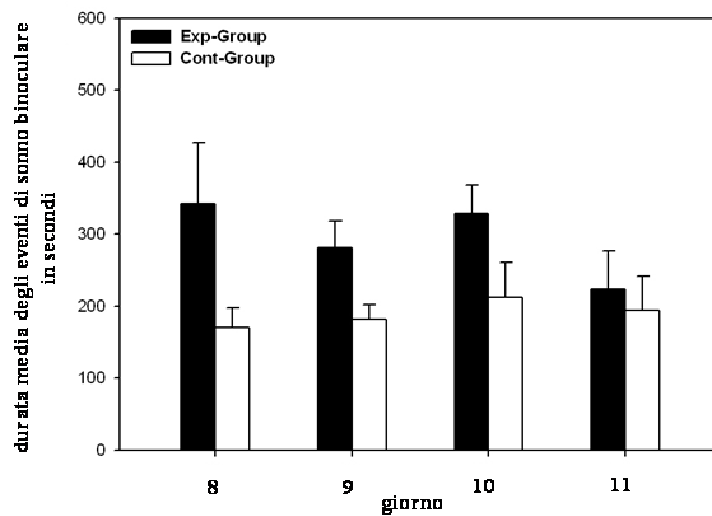


Fig. 37: Rappresentazione grafica della durata media degli eventi di sonno binoculare in secondi.

Sonno monoculare

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un calcolato in secondi è rappresentato in Fig. 38. L'ANOVA non rivela alcun effetto significativo.

L'ANOVA non rivela alcun effetto significativo anche per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro. Non ci sono differenze significative tra il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro nei pulcini del gruppo Exp-Group e in quelli del gruppo Cont-Group (Fig. 39).

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro l'ANOVA evidenzia un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)}=6,715$, $p = .027$). I pulcini del gruppo Exp-Group trascorrono più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini del gruppo Cont-Group (Fig. 40).

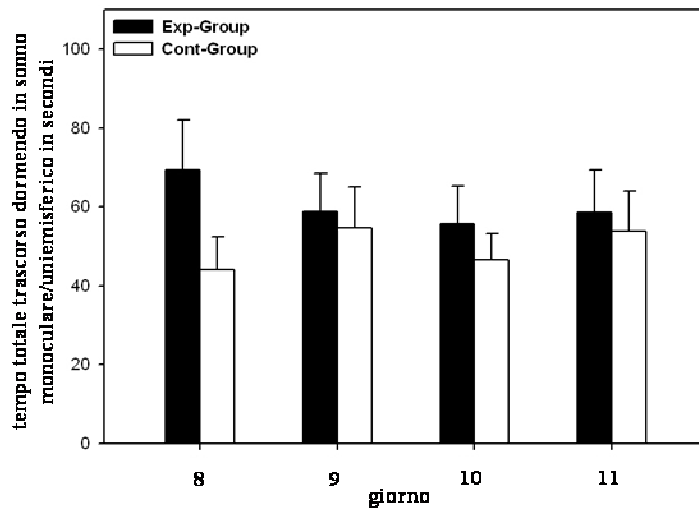


Fig. 38: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monoculare in secondi.

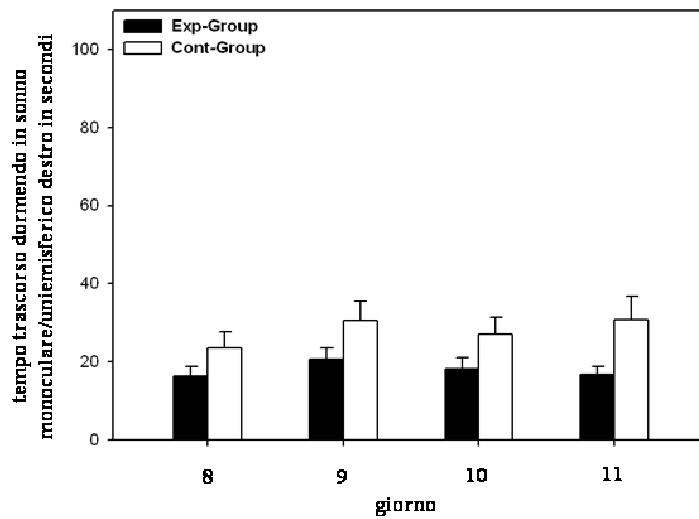


Fig. 39: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monoculare destro in secondi.

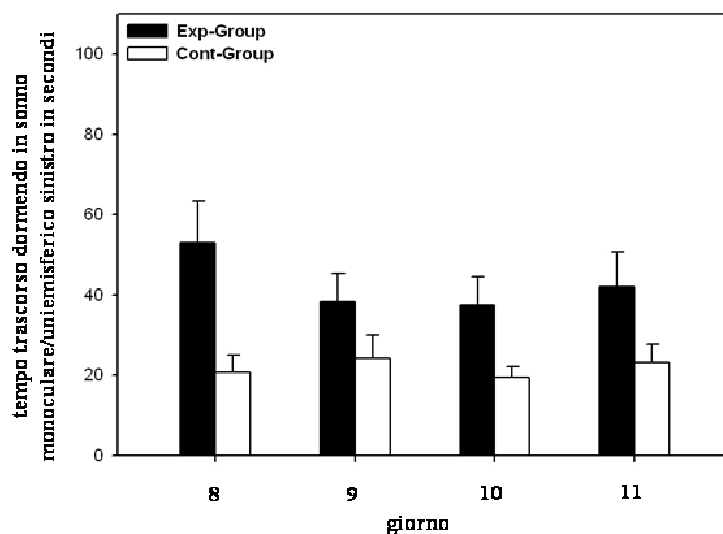


Fig. 40: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monoculare sinistro in secondi.

Sonno monoculare indice di lateralità

Il tempo trascorso dormendo in sonno monoculare in indice di lateralità è rappresentato in Fig. 41. L'ANOVA evidenzia un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 125,343, p < .001$) e del fattore giorno ($F_{(3,30)} = 3,135, p = .04$). I pulcini del gruppo Exp-Group mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro mentre I pulcini di controllo mostrano il quadro opposto. Questo effetto è consistente durante sia le sessioni di addestramento che durante la sessione di test. I pulcini del gruppo sperimentale (Exp-Group) mostrano una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio sinistro durante gli episodi di sonno Mo-Un sia dopo le sessioni di addestramento (giorno 8, $t_{(5)} = 10,705, p < .001$; giorno 9, $t_{(5)} = 9,279, p < .001$; giorno 10, $t_{(5)} = 6,293, p = .001$) sia dopo il test ($t_{(5)} = 6,194, p = .002$). I pulcini del gruppo di controllo (Cont-Group) invece non mostrano un chiaro quadro di lateralizzazione del sonno. Si osserva una preferenza significativa per il sonno

Mo-Un destro solo al giorno 10 di addestramento ($t_{(5)} = -2,913, p = .033$) and e dopo la sessione di test ($t_{(5)} = -2,643, p = .046$).

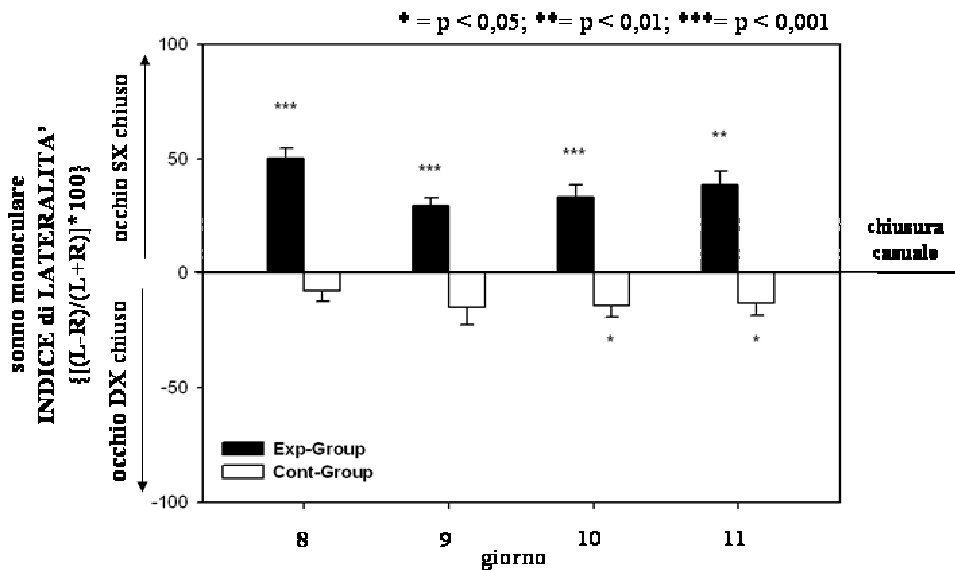


Fig. 41: Rappresentazione grafica della percentuale media di sonno monocolare calcolata in indice di lateralità. L sta per chiusura dell’occhio sinistro (*left eye closed*) e R per chiusura dell’occhio destro (*right eye closed*).

- Secondo Esperimento -

Apprendimento

I risultati relativi all’apprendimento sono rappresentati in Fig. 42. Anche in questo caso rappresentano la media della percentuale di scelta corretta (prima scelta), sul totale delle scelte effettuate dai pulcini relativamente alle due posizioni definite all’interno dell’arena (angolo “corretto”: angoli A o C; e angolo “sbagliato”: angoli B o D) durante i tre giorni di addestramento, il breve addestramento prima del test e il test. L’ANOVA mostra un effetto

significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 71,359, p < .001$), del fattore sessione ($F_{(4,40)} = 3,413, p < .020$) e ma non del fattore di interazione condizione e sezione ($F_{(4,40)} = 4,452, p = ns$). I dati mostrano un sistematico aumento di comportamenti di ricerca presso gli angoli A e C (angolo “corretto”) dei pulcini del gruppo Dep-Dx e invece, anche in questo caso nessun aumento nella ricerca del cibo negli angoli A e C nei pulcini di Dep-Sx. I test t di *Student* per singoli campioni calcolati per ciascun gruppo in ciascuna sessione hanno mostrato una scelta non casuale verso l’angolo corretto solo nei pulcini del gruppo Dep-Dx (sottoposti ad addestramento con occlusione dell’occhio destro) (addestramento giorno 8, $t_{(5)} = 1,709, p = ns$; addestramento 9, $t_{(5)} = 7,427, p = .002$; addestramento giorno 10, $t_{(5)} = 8,226, p = .001$; addestramento giorno 11, $t_{(5)} = 6,345, p = .003$) e durante il test (test giorno 11, $t_{(5)} = 26,245, p < .001$). Inoltre i pulcini del gruppo Dep-Dx raggiungevano il criterio di apprendimento (80% di scelte corrette) al giorno 11 di addestramento e lo mantenevano durante il test.

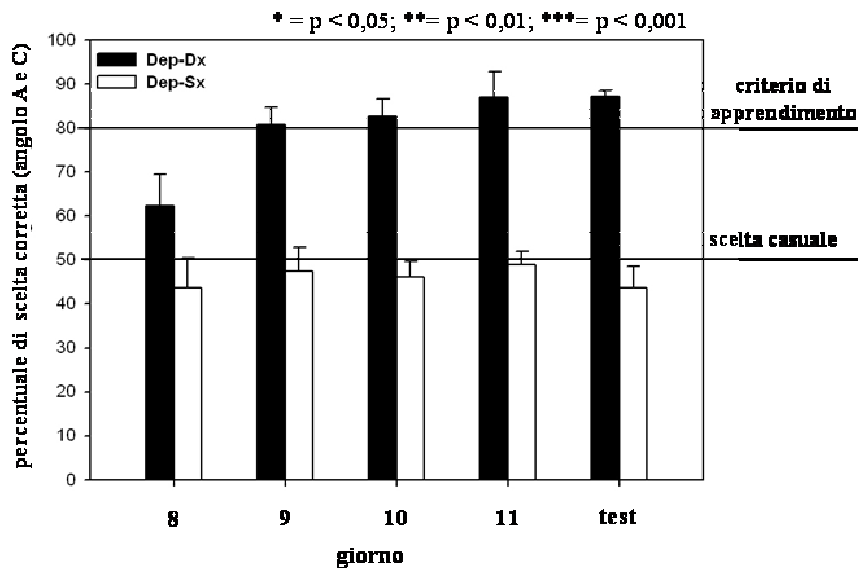


Fig. 42: Rappresentazione grafica delle percentuali di scelta corretta durante l'addestramento e il test (angolo A o C).

Sonno totale

Relativamente al sonno totale, l'ANOVA non ha evidenziato alcun effetto significativo I pulcini del gruppo Dep-SX e i pulcini del gruppo Dep-Dx trascorrono indicativamente il medesimo tempo dormendo in sonno totale (Bin e Mo-Un).

Sonno binoculare

Relativamente al tempo trascorso dormendo in sonno Bin, l'ANOVA non ha evidenziato alcun effetto significativo (Fig. 43). I pulcini del gruppo Dep-SX e i pulcini del gruppo Dep-Dx non mostrano alcuna differenza significativa per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Bin.

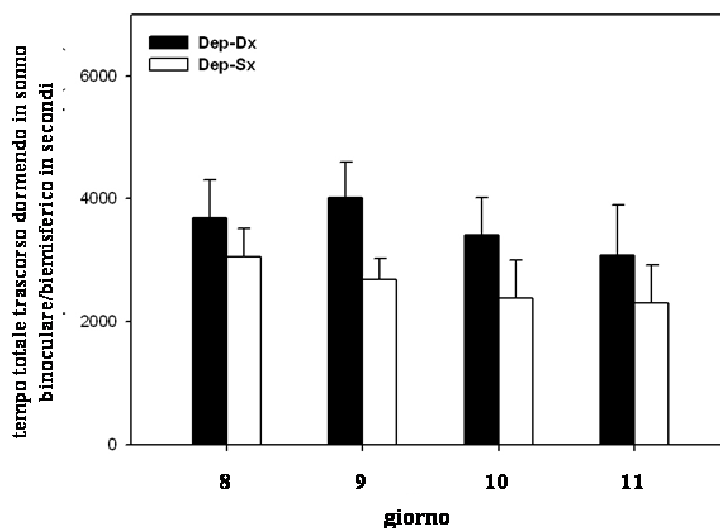


Fig. 43: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno binoculare in secondi.

Sonno monoculare

Il tempo totale trascorso dormendo in sonno Mo-Un calcolato in secondi è rappresentato in Fig. 44. L'ANOVA non rivela alcun effetto significativo.

L'ANOVA non rivela alcun effetto significativo anche per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro. Non si osservano infatti differenze significative tra il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un destro nei pulcini del gruppo Dep-Dx e in quelli del gruppo Dep-Sx (Fig. 45).

Per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro l'ANOVA evidenzia un effetto significativo del fattore condizione ($F_{(1,10)}=22,445, p = .001$). I pulcini del gruppo Dep-Dx trascorrono più tempo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini del gruppo Dep-Sx (Fig. 46).

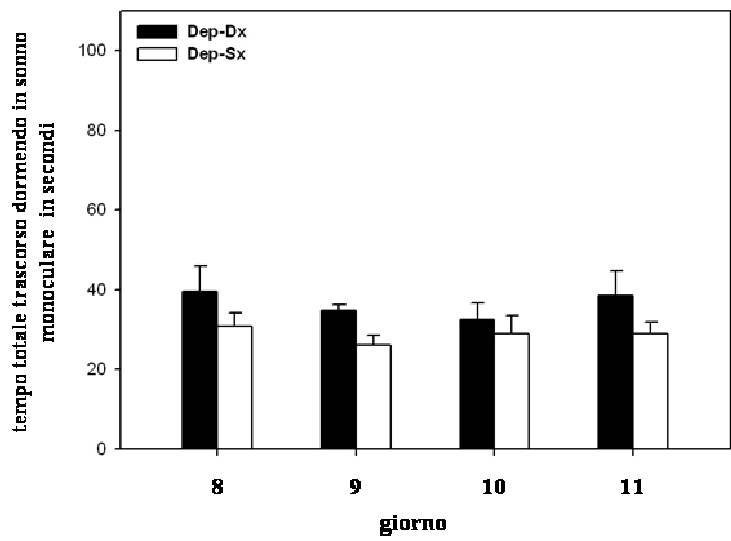


Fig. 44: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monocolare in secondi.

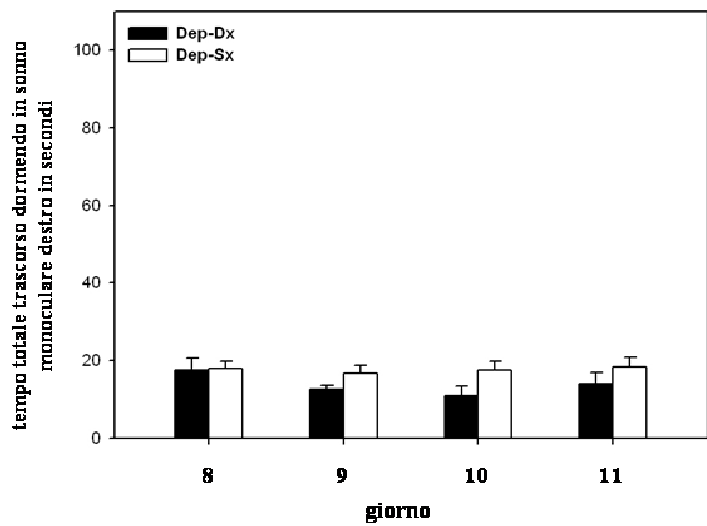


Fig. 45: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monocolare destro in secondi.

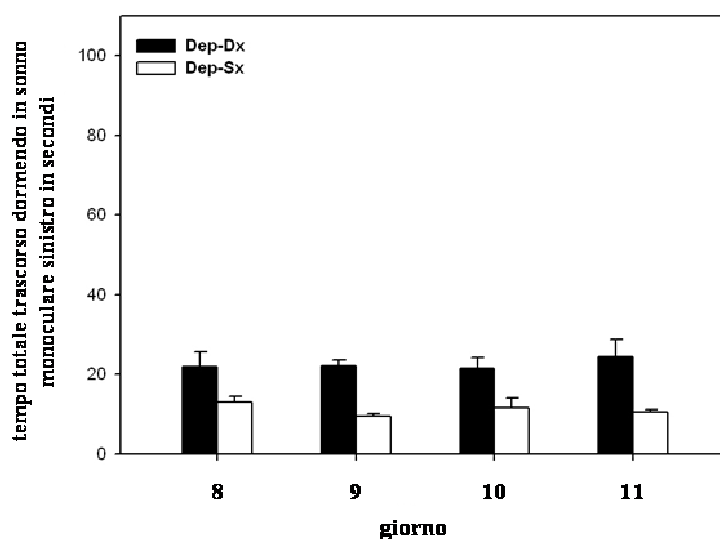


Fig. 46: Rappresentazione grafica del tempo totale trascorso dormendo in sonno monoculare sinistro in secondi.

Sonno monoculare indice di lateralità

Il tempo trascorso dormendo in sonno monoculare in indice di lateralità è rappresentato in Fig. 47. L'ANOVA evidenzia un effetto significativo solo del fattore condizione ($F_{(1,10)} = 226,102, p < .001$). I pulcini del gruppo Dep-Dx mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro mentre i pulcini del gruppo Dep-Sx mostrano il quadro opposto. Questo effetto è consistente durante sia le sessioni di addestramento che durante la sessione di test. I pulcini del gruppo Dep-Dx mostrano una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio sinistro durante gli episodi di sonno Mo-Un sia dopo le sessioni di addestramento (giorno 8, $t_{(5)} = 4,082, p = .015$; giorno 9, $t_{(5)} = 4.982, p = .008$; giorno 10, $t_{(5)} = 3,388, p = .028$) sia dopo il test ($t_{(5)} = 3,536, p = .024$). I pulcini del gruppo Dep-Sx invece mostrano un quadro di lateralizzazione opposto: sia dopo le sessioni di addestramento (giorno 8, $t_{(5)} =$

-8,926, $p = .001$; giorno 9, $t_{(5)} = 4,969$, $p = .008$; giorno 10, $t_{(5)} = -4,146$, $p = .014$) sia dopo il test ($t_{(5)} = -6,782$, $p = .002$).

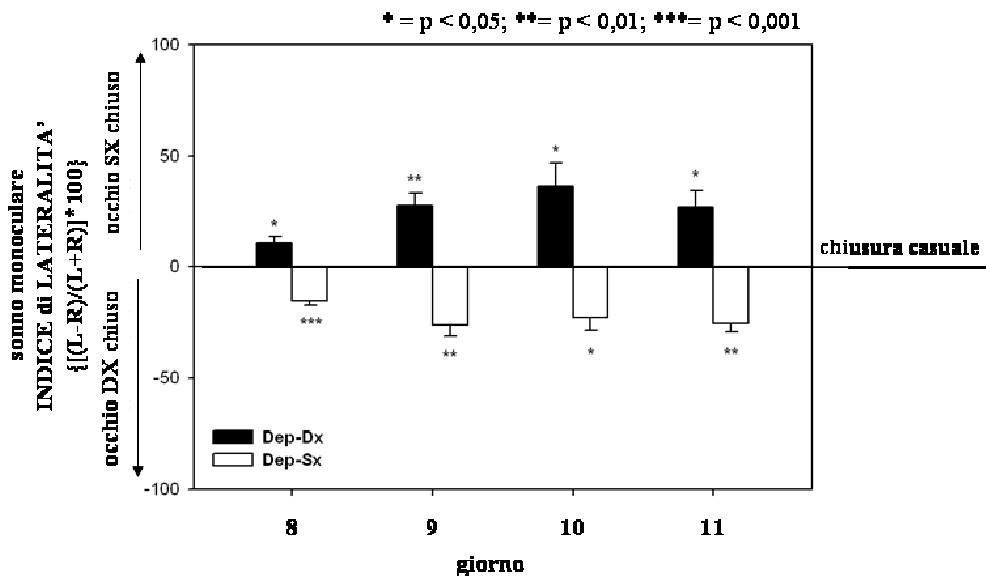


Fig. 47: Rappresentazione grafica della percentuale media di sonno monolare calcolata in indice di lateralità. L sta per chiusura dell'occhio sinistro (*left eye closed*) e R per chiusura dell'occhio destro (*right eye closed*).

Discussione

Per quanto riguarda il primo esperimento i pulcini del gruppo Exp-Group mostrano di trascorrere una significativa maggior quantità di tempo dormendo sia in sonno totale che in sonno Bin rispetto ai pulcini del gruppo Control-Group, questo risultato è in accordo con le recenti evidenze secondo cui le attività svolte durante la veglia (in questo caso apprendimento *vs* non apprendimento), influenzano la successiva durata di sonno, il quadro generale del sonno e l'omeostasi del sonno stesso (Horne e Walmsley, 1976; Horne e

Minard, 1985). Nel secondo esperimento invece i pulcini del gruppo Dep-Dx e del gruppo Dep-Sx non mostrano differenze significative per quanto riguarda il tempo trascorso dormendo in sonno total o in sonno Bin. Questo dato è in linea con i risultati ottenuti in precedenza e con i dati in letteratura, in quanto benchè i pulcini del gruppo Dep-Sx non abbiano appreso il compito, l'emisfero di sinistra è stato comunque coinvolto durante le prove, in quanto unico emisfero "attivo", di conseguenza potrebbe essere plausibile riscontrare differenze nella quantità totale di sonno e nel tempo trascorso in sonno Bin.

Nel primo esperimento, i pulcini del gruppo Exp-Group mostrano inoltre un progressivo aumento delle *performance* spaziali che sono seguite da una significativa preferenza per il sonno Mo-Un sinistro per quanto riguarda la lateralizzazione del sonno e un significativo aumento di tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini di controllo. In qualche modo lo stesso quadro di lateralizzazione del sonno si osserva nel secondo esperimento: i pulcini che usano l'emisfero destro per svolgere il compito (Dep-Dx) mostrano anch'essi un progressivo aumento delle *performance* spaziali che sono seguite da una significativa preferenza per il sonno Mo-Un sinistro per quanto riguarda la lateralizzazione del sonno e un significativo aumento di tempo trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro rispetto ai pulcini Dep-Sx. Questi dati sono in linea con gli studi precedenti, (Mascetti e coll., 2007) che mostrano una preferenza per il sonno Mo-Un sinistro dopo apprendimento spaziale discriminativo di posizione destra/sinistra. Negli ultimi due esperimenti proposti inoltre, quando la posizione spaziale è il principale e unico indizio fornito agli animali, si osserva un chiara lateralizzazione del sonno in favore del sonno Mo-Un sinistro (sonno emisfero destro), che suggerisce un maggior coinvolgimento durante le prove dell'emisfero destro. Ma questo effetto è chiaro principalmente nel primo

esperimento, mentre nel secondo si osserva una lateralizzazione del sonno in favore del sonno Mo-Un destro nei pulcini Dep-Sx anche in assenza di apprendimento. Questo dato è facilmente interpretabile se consideriamo il fatto che comunque l'emisfero sinistro (sonno Mo-Un destro) durante l'addestramento svolge un lavoro ed è stimolato e di conseguenza gli animali di questo gruppo (Dep-Sx) sembrerebbero mostrare una preferenza significativa per la chiusura dell'occhio destro durante gli episodi di sonno Mo-un. L discriminante, anche in questo secondo lavoro resta nel fatto che complessivamente i pulcini del gruppo Dep-Dx mostrano più sonno nell'emisfero destro (sonno Mo-Un sinistro) rispetto ai pulcini del gruppo Dep-Sx, cosa che non avviene all'inverso per quanto riguarda il sonno Mo-Un destro (sonno nell'emisfero sinistro). Questo risultato permette di avanzare nuovamente l'ipotesi di una associazione tra apprendimento e sonno Mo-Un sinistro nei pulcini Dep-Dx.

E' noto come l'emisfero destro sia principalmente coinvolto in compiti spaziale (Rashid e Andrew, 1989; Rogers e Anson, 1979; Vallortigara, 2000; Vallortigara e Andrew, 1991; Vallortigara e Rogers, 2005). Nello specifico, Vallortigara (2000) hanno osservato un asimmetria in condizioni di visione binoculare di stimoli simultanei in un compito di apprendimento discriminativi. Durante una prova in cui l'animale doveva distinguere la posizione spaziale destra/sinistra, il criterio di apprendimento veniva raggiunto più velocemente quando lo stimolo negativo veniva posizionato alla destra dell'animale rispetto a quando veniva presentato a sinistra.

Relativamente al primo esperimento i risultati ottenuti in questo studio, mostrano che la quantità di sonno trascorso dormendo in sonno Mo-Un sinistro sia maggiore al giorno 8 rispetto che ai giorni successivi. Al giorno 8 gli animali sono stati sottoposti per la prima volta al paradigma di apprendimento

spaziale che prevedeva appunto che i pulcini apprendessero il corretto criterio spaziale per raggiungere il cibo. Anche se è stata osservata una maggior quantità di sonno Mo-Un sinistro in questo primo giorno di apprendimento i risultati relativi all'apprendimento mostrano che gli animali compiono la scelta corretta dell'angolo dove trovare cibo il 70% delle volte (sotto il criterio di apprendimento), ma il coinvolgimento dell'emisfero destro all'ottavo giorno sembra essere altrettanto intenso che nei giorni successivi, quando invece il criterio di apprendimento viene raggiunto. Probabilmente durante il giorno 9, 10 e 11 l'attivazione dell'emisfero destro diminuisce in quanto gli animali hanno già appreso il criterio spaziale da utilizzare per raggiungere il cibo.

Relativamente ai pulcini del gruppo di controllo del primo esperimento non è stato osservato un chiaro quadro di lateralizzazione del sonno in quanto non è avvenuto apprendimento (i dati relativi all'apprendimento mostrano che la scelta dell'angolo è casuale) e di conseguenza non si osserva una specifica dominanza di un emisfero durante il compito al quale gli animali sono stati sottoposti. Inoltre, le significatività trovate al giorno 10 e 11 possono essere in linea con i risultati del secondo esperimento che sembrerebbero attribuire al sonno Mo-Un anche una modificazione della propria lateralizzazione di tipo "uso dipendente", i pulcini di controllo infatti non essendo sottoposti all'istanza di dover cercare cibo si potrebbero dedicare alla categorizzazione dei pochi e simmetrici indizi oggettuali presenti nell'arena. Questa ipotesi è supportata dal fatto che in questi esperimenti il livello di stimolazione visiva e il livello di motivazione ai quali gli animali sono stati sottoposti sono esattamente i medesimi per tutti gli animali e quindi la presenza o assenza di lateralizzazione dovrebbe essere strettamente associata alla sola dominanza emisferica espressa durante i compiti.

Una domanda che emerge dall'osservazione dei risultati ottenuti in questo lavoro su sonno e apprendimento spaziale e nei precedenti è: qual'è il ruolo e la funzione del sonno Mo-Un? Sembra essere ormai chiaro che il sonno abbia un qualche ruolo nel consolidamento della memoria (Ambrosini e coll., 1988; Smith e Butler, 1982; Winson, 1993; Smith, 1995; Graves e coll., 2001) e potrebbe essere avanzata l'idea che il quadro di sonno Mo-Un sinistro dei pulcini del gruppo Exp-Chicks e del gruppo Dep-Dx sia associato al consolidamento della traccia mestica spaziale gestita dall'emisfero destro durante il successivo periodo di sonno Mo-Un (SWS). Una relazione tra apprendimento e quadro di sonno Mo-Un per quanto riguarda il consolidamento della memoria d'*imprinting* è stata riportata anche in precedenza da Mascetti e collaboratori (1999) e descritta nel "Capitolo V".

Una possibile funzione biologica del sonno Mo-Un consisterebbe nella possibilità da parte dell'animale, grazie al sonno Mo-Un, di monitorare periodicamente l'ambiente e controllare il livello di rischio predatorio (Rattenborg e coll., 1999c) o monitorare la possibile presenza di conspecifici (Mascetti e coll., 1999; Bobbo e coll., 2006b): durante gli episodi di sonno Mo-Un i pulcini aprendo un occhio attivano l'emisfero controlaterale (Bobbo e coll., 2002), di conseguenza il quadro di apertura e chiusura degli occhi durante il sonno Mo-Un può essere determinato anche dal maggiore coinvolgimento di uno o dell'altro emisfero nei compiti sopra descritti. In altre parole, al fine di monitorare periodicamente l'ambiente, gli animali del gruppo Exp-Group potrebbero aver aperto con maggior frequenza l'occhio associato all'emisfero che non ha compiuto il compito di apprendimento e che quindi necessita di un minor recupero. Questa possibilità sembra però poco plausibile se si osservano i dati relativi al secondo esperimento.

Come detto anche in precedenza numerosi studi hanno evidenziato che il sonno ha aspetti regionali e locali associati alle attività svolte durante la veglia (Kattler e coll.1994; Vyazovskiy e coll., 2000; Oleksenko e coll., 1992; Huber e coll. 2004), questi studi hanno permesso di definire il concetto di “sonno locale”. Questo lavoro potrebbe suggerire che il sonno Mo-Un che consiste solo in sonno SWS possa essere identificato come un aspetto locale del sonno in questo animale, associato a meccanismi di potenziamento a lungo termine e di plasticità neuronale. Basandosi su questa ipotesi la lateralizzazione del sonno mostrata dai pulcini del gruppo Exp-Group e del gruppo Dep-Dx potrebbe riflettere il differente coinvolgimento dei due emisferi nel compito di apprendimento spaziale, così come descritto in letteratura, e il coinvolgimento dell'emisfero destro nei compiti di apprendimento che si associa ad una successiva maggiore necessità e di conseguenza quantità di SWS in questo emisfero.

- Nelini, C., Bobbo, D. e Mascetti G. G. “Local sleep: a spatial learning task enhances sleep in the right hemisphere of domestic chicks (*Gallus gallus*)”. In preparazione -

Capitolo IX

CONCLUSIONI

Il sonno uniemisferico, ampiamente trattato in questa tesi, risulta essere un argomento di indubbio interesse per coloro che si occupano dello studio del sonno.

In primo luogo la possibilità mostrata da alcuni rettili, da numerosi mammiferi marini e dalla maggior parte degli uccelli di dormire in modo asincrono con i due emisferi cerebrali, conferma come per pressoché per tutti gli organismi viventi il sonno sia un fenomeno psico-fisiologico indispensabile e in qualche modo imprescindibile. Il sonno sembra essere fondamentale a tal punto da aver spinto alcuni organismi viventi a sviluppare meccanismi, come il sonno uniemisferico, che hanno permesso di conservare questo comportamento anche in condizioni ambientali nelle quali dormire risulta inequivocabilmente pericoloso per la sopravvivenza. In secondo luogo, grazie allo sviluppo della tecniche di indagine del sonno e alla scoperta di una multicomponenzialità di quest'ultimo, è stato possibile delineare una distribuzione disomogenea del sonno a livello cerebrale. Questa distribuzione disomogenea, che sembra essere strettamente associata alle attività svolte dal soggetto durante la veglia, ha permesso di avanzare l'ipotesi sempre più solida che il sonno abbia aspetti locali fortemente coinvolti nei processi di apprendimento e di plasticità neuronale. Il concetto di "sonno locale" e la stretta relazione che questo sembra avere con le funzioni cognitive di tipo mnestico in un'ottica di omeostasi cerebrale, vanno comunque di pari passo con le numerose altre evidenze che mostrano l'importanza del sonno in molti altri meccanismi fisiologici: il controllo termico, la sintesi proteica e la funzionalità immunitaria.

Proprio alla luce di queste considerazioni è indispensabile essere estremamente cauti nell'attribuire al sonno una funzionalità esclusiva a vantaggio solamente di alcuni meccanismi.

Questo lavoro ha preso in esame il sonno uniemisferico nel pulcino alla luce delle recenti ipotesi di una distribuzione locale del sonno. In questo animale il sonno uniemisferico è facilmente indagabile da un punto di vista comportamentale. Nei nostri laboratori sono stati ottenuti evidenti risultati che hanno dimostrato come il sonno uniemisferico abbia uno stretto legame con la lateralizzazione delle funzioni cerebrali del pulcino. Proprio per questo motivo il sonno uniemisferico sembrerebbe poter essere considerato una forma di sonno locale in un organismo con un assetto cognitivo molto più semplice rispetto all'uomo. I dati proposti in questa tesi, benchè a causa della complessità della tematica, risultino essere in qualche caso di difficile interpretazione, mostrano chiaramente come il sonno uniemisferico si distribuisca in modo disomogeneo tra gli emisferi cerebrali. Altrettanto chiaramente emerge inoltre come questa distribuzione non sia per niente casuale ma segua istanze intimamente dettate dalle attività svolte dall'animale durante la veglia. Non solo, sembra essere anche evidente come la distribuzione cerebrale del sonno non sia determinata solo dalle attività in veglia del pulcino, ma abbia un altrettanto stretta relazione con lo sviluppo anatomico, fisiologico e anche emotivo e sociale dell'animale. Questa distribuzione in qualche modo segue una gerarchia dinamica basata sulle necessità principali dell'animale mostrate in una determinata tappa dello sviluppo.

Tutte queste osservazioni permettono di considerare il pulcino come un ottimo modello animale per lo studio del sonno locale non solo da un punto di vista comportamentale, ma anche anatomico e fisiologico. La possibilità di dormire con un solo emisfero per volta potrebbe infatti essere associata ad una

separazione anatomico-fisiologica dei sistemi neurochimici favorenti e inibenti la veglia o il sonno stesso. Anche la ricerca elettroencefalografica, ad oggi molto complessa nel pulcino per le sue peculiari caratteristiche anatomiche e morfologiche espresse nelle prime fasi di sviluppo, potrebbe in qualche modo beneficiare un modello animale facilmente gestibile in laboratorio che mostra contemporaneamente due fenomeni che normalmente si escludono a vicenda.

Per concludere, la futura ricerca che è stata pianificata nei nostri laboratori punta a raggiungere alcuni fondamentali obiettivi:

- rafforzare i risultati fin ora ottenuti al fine di confermare il rapporto osservato tra sonno uniemisferico e apprendimento spaziale;
- programmare e attuare ulteriori esperimenti che permettano di far luce sulla possibile distribuzione “gerarchica” del sonno locale/uniemisferico associata alle numerose istanze precedentemente illustrate nel pulcino;
- sviluppare e validare una tecnica di registrazione elettroencefalografica adeguata e stabile che permetta di indagare i correlati elettrofisiologici del sonno uniemisferico nel pulcino associandoli ai dati comportamentali fin ora ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

Adam, K. e Oswald, I. (1977) "Sleep is for Tissue Restoration". *J Royal Col Physic* 11(4), 376-386.

Allison, T. e Goff, W. R. (1968) "Sleep in primitive mammals, the spiny anteater". *Psichophysiology* 5, 200-201.

Allison, T., Van Twiver e Goff, W. R. (1972) "Electrophysiological studies of echidna *Tachyglossus aculeatus*". *Arch Ital Biol* 110, 145-184.

Allison, T. and Cicchetti, D. V. (1976) "Mammals: ecological and constitutional correlates". *Science*, 194, 732-734.

Ambrosini, M.V., Sadile, A.G., Gironi Carnevale, U.A., Mattiaccio, M. e Giuditta, A. (1988) "The sequential hypothesis on sleep function .I. Evidence that the structure of sleep depends on nature of previous waking experience". *Physiol Behav* 143, 325-337.

Amlaner, C. J. e Ball, N. J. (1983) "A synthesis of sleep in wild birds". *Behaviour*, 87, 85-119.

Andrew, R. J. (1983) "Lateralization of emotional and cognitive functions in higher vertebrates, with special reference to domestic chick". In: J. P. Evert, R. R. Capranica and D. J. Ingle (Eds) *Advances in vertebrate neuroethology*. Plenum Press, New York.

Andrew, R.J. (2002) "Behavioural development and lateralization". In: Rogers LJ, Andrew RJ (eds) *Comparative vertebrate lateralization*. Cambridge University Press, Cambridge.

Andrew, R. J. e Brennan, A. (1983) "The lateralization of fear behaviour in the male domestic chick: a developmental study". *Anim Behav* 31, 1166-1176.

Andrew, R. J. (1991) "The nature of behavioural lateralization in the chick". In: Andrew, R. J. (Ed.), *Neural and Behavioural Plasticity. The Use of Chicks as a Model*, Oxford University Press, Oxford.

Ball, N. J., Amlaner, J. C., Shaffery, J. P. e Opp, M. R. (1988) "Asynchronous eye-closure and unihemispheric quiet sleep of birds". In: W. P. Koella, F. Obàl, H. Schulz and P. Visser (Eds) *Sleep* 86. Gustav Fischer Verlag, New York.

Bear, M. F., Connors, B. W. e Paradiso, M. A. (2002) "Neuroscienze: esplorando il cervello", Ed. Masson, Milano.

Berger, R., Nicol, S. C., Andersen, N. A. e Phillips, N. H. (1995) "Paradoxical sleep in the echidna". *Sleep Res* 24, 199.

Bateson, P. P. G. (1964) "Effect of similarity between rearing and testing conditions on chicks' following and avoidance responses". *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 57, 100-103.

Belenky, G., Wesensten, N. J., Thorne, D. R., Thomas, M. L., Sing, H. C., Redmond, D. P., Russo, M. B. e Balkin, T. J. (2003) "Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study". *J Sleep Res*, 12, 1-12.

Bennington, J. H. (2000) "Sleep Homeostasis and the Function of Sleep". *Sleep* 23 (7), 959-966

Berger, R. e Phillips, N. H. (1994) "Constant light supresses sleep and circadian rhythm in pigeons without consequent sleep rebound in darkness". *Am. J. Physiol.*, 267, R945-952.

Berger, R. e Phillips, N. H. (1995) "Energy conservation and sleep". *Behav. Brain Res.*, 69, 65-63.

Berlucchi, G. (2000) "Le funzioni nervose superiori". In: *Baldissera, F. (Ed.), Fisiologia e Biofisica Medica, Vol.1, Milano, Paletto.*

Birbaumer, N. (1996) "Psicofisiologia clinica", Ed. Imprimerie.

Bobbo, D., Galvani F., Mascetti, G .G. and Vallortigara, G. (2002) "Light exposure of chick embryo influences monocular sleep". *Behav Brain Res*, 134, 447-466.

Bobbo, D., Vallortigara, G. and Mascetti, G. G. (2006a) "The effects of the early post-hatching changes of imprinting on the pattern of monocular/unihemispheric sleep of domestic chicks". *Behav Brain Res*, 170, 23-28.

Bobbo, D., Vallortigara, G. and Mascetti, G. G. (2006b) "Effects of social interaction on monocular/unihemispheric sleep in male and female domestic chicks". *Biol Psychol.*,73, 213-219.

Bobbo, D., Mascetti, G. G., Fonda, F. e Vallortigara, G (2007) "Monocular sleep after passive avoidance learning in chicks". *Behav Brain Res*, 178(2), 305-312.

Bobbo, D., Nelini, C. e Mascetti G.G. (2008) “Binocular and monocular/unihemispheric sleep in the domestic chick (*Gallus gallus*) after a moderate sleep deprivation”. *Exp Brain Res*, 185, 421-427.

Bobbo, D., Nelini, C. e Mascetti G. G. (2009) “Effects of sleep deprivation on sleep in 5- and 8-day post-hatching domestic chicks”. *Behaviour*, 146, 1253-1267.

Boerema, A. S., Riedstra, B. e Strijkstra, A. M. (2003) “Decrease in monocular sleep after sleep deprivation in the domestic chicken”. *Behaviour*, 140, 1415-1420.

Bolhuis, J. J. (1991) “Mechanisms of avian imprinting: a review”. *Biol Rev*, 66, 303-345.

Borbely, A. A. (1982) “A Two Process Model of Sleep Regulation”. *Human Neurobiol*, 1, 195-204.

Borbely, A. A. , Tobler, I. e Hanagasioglu, M. (1984) “Effects of sleep deprivation on sleep and EEG spectra in the rat”. *Behav Brain Res*, 14, 171–182.

Bruce Durie, D. J. (1981). “Sleep in animals”. In: Wheatley, D. (Ed.), “Psychopharmacology of Sleep”, Raven Press, New York.

Burgess, N., Mguire, E. e O’keefe, J. (2002) “The human hippocampus and spatial and episodic memory”. *Neuron*, 35, 625-641.

Buchmann, A., Kurth, S., Ringli, M., Jenni, O.G. e Huber, R. (2009) “Slow wave sleep and local grey matter volumes”. *Neuropsychobiology*, 59, 257.

Campbell, S. S. e Tobler, I. (1984) “Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny”. *Neurosci Behav Rev*, 8, 269-300.

Casagrande, M. e De Gennaro, L. (1998) “Psicofisiologia del sonno”, Milano, Raffaello Cortina Editore.

Castellini, M.A, Milsom, W. K., Berger, R. J., Costa, D. P., Jones, D. R., Castellini, J. M., Rea, L. D., Bharna, S. e Harris, M. (1994) “Patterns of respiration and heart rate during Wakefulness and sleep in elephant seal pups”. *Am. J Physiol*, 266, R863-R869.

Cipolla Nieto, J., Horn, G. e McCabe, B. J. (1982) “Hemispheric asymmetry and imprinting: the effect of sequential lesions of hyperstriatum ventrale”. *Exp Brain Res*, 48, 22-27.

Cheng, K. (1986) “A purely geometric module in the rat’s spatial representation”. *Cognition*, 23, 149-178.

Craig, L. A. e McDonald, R. J. (2008) “Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat”. *Brain Research Bulletin*, 76, 141-151.

Cuénod, M. (1974) “Commissural pathways in interhemispheric transfer of visual information in the pigeon”. In: F. O. Schmitt and F. G. Worden (Eds) *The neurosciences: third study program*. Cambridge. MA: MIT Press.

Dave, A. S. e Margoliash, D. (2000) “Song replay during sleep and computational rules for sensorimotor vocal learning”. *Science*, 290, 812 – 816.

Dement, W. C. e Kleitman, N. (1957) “Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eyes movements, body motility and dreaming”. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 9, 673-690.

Denenberg, V. H. (1981) "Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience". *Behav Brain Sci.*, 4, 1-49.

Denes, G. e Pizzamiglio, L. (1998) "Manuale di Neuropsicologia: normalità e patologia dei processi cognitive". Zanichelli Editore, Bologna.

Deng, C. e Rogers, L. J. (1998) "Bilaterally projecting neurones in the two visual pathways in the chick". *Brain Res*, 794, 281-290.

Dewasmes, G., Loos, N., Delanaud, S., Ramadan, W. e Dewasmes, D. (2003) "Liver Temperature During Sleep". *Sleep: Journal of Sleep and Slepp Disorders Research*, 26 (8), 948-950.

Ferrara, M. (1998) "Metodi e tecniche di deprivazione di sonno". In: M. Casagrande and L. De Gennaro (Eds) *Psicofisiologia del sonno*. Raffaello Cortina Editore, Milano.

Ferrara, M., Iaria, G., De Gennaro, L., Guariglia, C., Curcio, G., Tempesta, D. e Bertini, M. (2006) "The role of sleep in the consolidation of route learning in humans: A behavioural study". *Brain Research Bulletin*, 71, 4-9.

Flanigan, W. F. (1973) "Sleep and wakefulness in iguana reptiles, *Ctenosaura pectinata* e *Iguana iguana*". *Brain Behavior and Evolution*, 8, pp. 401-436.

Fuchs, T., Haney, A., Jechurat, F., Moore, F.R. e Bingman, V.P. (2006) "Daytime naps in night-migrating birds: behavioural adaptation to seasonal sleep deprivation in the Swainson's thrush, *Catharus ustulatus*". *Anim Behav*, 72, 951-958.

Frank, M. G., Issa, N. P. e Stryker, M. P. (2001) "Sleep enhances plasticity in the developing visual cortex". *Neuron*, 30, 275-287.

Franklin, W.E. e Lima, S.L. (2001) “Laterality in avian vigilance: do sparrows have a favourite eye?”. *Anim Behav*, 62, 879–885.

Freire, R. e Rogers, L.J. (2007). “Experience during a period of right hemispheric dominance alters attention to spatial information in the domestic chick”. *Anim. Behav*, 74, 413-418.

Gaston, K. E. e Gaston, M. G. (1984) “Unilateral memory after binocular discrimination training: left hemisphere dominance in the chick?” *Brain Res*, 303, 190-193.

Geschwind, N. e Levitsky, W. (1968) “Human brain: right-left asymmetries in the temporal speech region”. *Science*, 161, 186-187.

Goodman, I. J. e Shein, M. W. (1974) “Birds: brain and behaviour”. Academic Press, New York.

Graves, L., Pack, A. e Abel, T. (2001) “Sleep and memory: a molecular perspective”. *Trends Neurosci*, 24, 237-243.

Gulia, K. K., Mallick, H. N. e Kumar, B. M. (2005) “Ambient temperature related sleep changes in rats neonatally treated with capsaicin”. *Physiol. Behav*, 85 (4), 414-418.

Gruss, M. e Braun, K. (1997) “Distinct activation of monoaminergic pathways in chick brain in relation to auditory imprinting and stressful situations: a microdialysis study”. *Neuroscience*, 76, 891-899.

Hartse, K. M. e Rechtschaffen, A. (1980) "The effect of the amphetamine, nembutal, alpha-metil-tyrosine, and parachlorophenylalanine on sleep-related spike activity of the tortoise, *Geochelone carbonaria*, and on the cat ventral hippocampus spike". *Brain Behav Evolut*, 21, 199-222.

Hermer, L. e Spelke, E. (1996) "Modularity and development: the case of spatial reorientation". *Cognition*, 61, 195-232.

Hess, W. R. (1954) "The diencephalic sleep centre". In: Adrian, E.D., Bremer, F. e Jasper, H.H., *Brain Mechanism and Consciousness*, Blackwell, Oxford.

Hobson, J. (1989) "Sleep". New York, Scientific American Library.

Horne, J. A. (1993) "Perchè dormiamo: le funzioni del sonno negli esseri umani e negli altri mammiferi". Armando Editore, Roma.

Horne, J. A. (1988) "Why we Sleep: The Functions of Sleep in Humans and Other Mammals", Oxford University Press, Oxford.

Horn, G., Bradley, P. e McCabe, B. J. (1985) "Changes in the structure of synapses associated with learning". *J Neurosci.*, 5, 3161-3168.

Horne, J.A. e Walmsley, B. (1976) "Daytime visual load and the effects upon human sleep". *Psychophysiol*, 13, 115-120.

Horne, J.A. e Minard, A. (1985) "Sleep and sleepiness following a behaviourally active day". *Ergonomics*, 28, 567-575.

Hubel, D. H. e Wiesel, T. N. (1970) "The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens". *J Physiol*, 206, 419-436.

Huber, R., Ghilardi, M. F., Massimini, M. e Tononi, G. (2004) "Local sleep and learning". *Nature*, 430, 78-81.

Huber, R. (2008). "High-density sleep EEG recordings during adolescence". *J Sleep Res*, 17, 53.

Jackson, C., McCabe, B. J., Nicol, A. U., Grout, A. S., Brown, M. W. e Horn, G. (2008) "Dynamics effects of of a memory trace: Sleep on consolidation". *Curr Biol*, 18, 393-400.

Johnston, A. N. B. e Rose, S. P. R. (2002) "Memory and lateralized recall". In: L. J. Rogers and R. J. Andrew (Eds) *Comparative Vertebrate Lateralization*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jouvet, M. e Galzigna, L. (1996) "I paradossi della notte", Edizione GB.

Kandel, E. R. e Schwartz, J.H. (2000) "Principi di neuroscienze", Casa Editrice Ambrosiana Milano.

Kanavau, J. L. (1997) "Origin and evolution o sleep: roles of vision and endothermy". *Brain Res Bul*, 42, 245-264.

Karni, A., Tanne, D., Rubenstein, B. S., Askenasy, J. J. M. e Sagi, D. (1994) "Dependence on REM Sleep of Overnight Improvement of a Perceptual Skill". *Science*, 265, 679-82.

Karten, H., J. (1969) "The organization of the avian telencephalon and some speculations on the phylogeny of the amniote telencephalon". *National Academy of Science*, 167, 164-179.

Kattler, H., Dijk, D-J. e Boberly, A. (1994) “Effects of unilateral somatosensory stimulation prior to sleep to the sleep EEG in humans”. *J Sleep Res*, 3, 159-164.

Kim, E. Y., Mahmoud, G. S. e Grover, L. M. (2005) “REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus”. *Neurosci Lett*, 388, 163-167.

Kleitman, N. (1963) “Sleep and Wakefulness (second edition)”. University of Chicago Press, Chicago.

Kreuger, J. M., Obal, F. e Fang, J. (1999) “Why we sleep: a theoretical view of sleep function”. *Sleep Med Rev*, 3 (2), 119-129.

Kurth, S, Ringli, M., Geiger, A., Jenni, O.G. e Huber, R. (2009) “Sleep dependent performance improvement in children”. *Neuropsychobiology*, 59(4), 261.

Ladavas, E. e Berti, A. (1995) “Neuropsicologia”. Il Mulino, Bologna.

Lilly, J. C. (1964) “Animals in aquatic environments: adaptation of mammals to the ocean”. In: D. B. Dill, E. F. Adolph and C. G. Wilber (Eds) *Handbook of physiology: adaption to the environment*. American Physiology Society, Washington D.C.

Lima, S.L., Rattenborg, N.C., Lesku, J.A. e Amlaner, C.J. (2005) “Sleeping under the risk of predation”. *Anim Behav*, 70, 723–736.

Lyamin, O. I. e Chetyrbok, I. S. (1992) “Unilateral EEG activation during sleep in the cape fur seal, *Arctocephalus pusillus*”. *Neurosci Lett*, 43, 263-266.

Lyamin, O. I., Oleksenko, A. I. e Polyakova, I. G. (1993) "Sleep in harp seal (*Pagophilus groenlandica*). Peculiarities of sleeping in pups during the first month of their lifes". *J Sleep Res*, 2, 163-169.

Lyamin, O. I., Oleksenko, A. I., Polyakova, I. G. e Mukhametov, L. M. (1996) "Paradoxical sleep in northern fur seals in water and on land". *J Sleep Res*, 5 (Suppl. 1), 259.

Lyamin, O. I., Mukhametov, L. M., Chetyrbok, I. S. e Vassiliev A. A. (1994) "Sleep and wakefulness in southern sea lion (*Otari byronia*)". *J Sleep Res*, 3 (Suppl. 1), 152.

Lydic, R., McCarley, R. W. e Hobson, J. A. (1983) "The time-course of dorsal raphé discharge, PGO waves, and muscle tone averaged across multiple sleep cycles". *Brain Res*, 274, 365-370.

Mancia, M. (1993) "Neurofisiologia". Raffaello Cortina Editore, Padova.

Manns, M. e Güntürkün, O. (1999) 'Natural' and artificial monocular deprivation effects on thalamic soma sizes in pigeon". *Neuroreport*, 10, 3223.

Maquet, P. (2000) "Sleep on it!". *Nat Neurosci*, 3, 1235-1236.

Maquet, P. (2001) "The role of sleep in learning and memory". *Science*, 294, 1048-1052.

Mascetti, G. G. (1997) "Gli ormoni, i neurotrasmettitori, il sistema immunitario e il comportamento". UPSEL Domeneghini Editore, Padova.

Mascetti, G. G. (2009) "Lezioni di Neurofisiologia". Ed. Cleup, Padova.

Mascetti, G. G., Rugger, M. e Vallortigara, G. (1999) "Visual lateralization and monocular sleep in the domestic chick". *Cogn Brain Res*, 7, 451-463.

Mascetti, G. G., Bobbo, D., Rugger, M. e Vallortigara, G. (2004) "Monocular sleep in male domestic chick". *Behav Brain Res*, 153, 447-452.

Mascetti, G.G., Rugger, M., Vallortigara, G. e Bobbo, D. (2007) "Monocular-unihemispheric sleep and visual discrimination learning in the domestic chick". *Exp Brain Res*, 176, 70-84.

Mathews, G. C. e Amlaner, C. J. (1998) "Arousal thresholds during asynchronous eye closure in western fence lizard (*Scleropus occidentalis*)". *Sleep*, 21 (Suppl.), 33.

McCabe, B. J., Cipolla-Neto, J., Horn G. e Bateson P. P. G. (1982) "Amnesic effects of bilateral lesions in the hyperstriatum ventrale of chick after imprinting". *Exp Brain Res*, 48, 13-21.

McGaugh, J. L. (2000) "Memory: a century of consolidation". *Science*, 287, 248-251.

McGinty, D. e Szymusiak, R. (1990) "Keeping cool: a hypothesis about the mechanism and functions of slow wave sleep". *Trends Neurosci*, 13 (12), 480-487.

McGinty, D. e Szymusiak, R. (2003) "Hypothalamic regulation of sleep and arousal". *Front Biosci*, 8, 1074-1083.

Mench, J. A. e Andrew, R. J. (1986) "Lateralization of a food search task in the domestic chick". *Behav Neural Biol*, 46, 107-114.

Milsom, W., Castellini, M., Harris, M., Castellini, J., Jones, D., Berger, R., Bahrma, S., Rea, L. e Costa, D. (1996) "Effects of hypoxia and hypercapnia on patterns of sleep-associated apnea in elephant seal pups". *Am J Physiol*, 271, R1017-R1024.

Minet Ringuet, J., Even, P. C., Guesdon, B., Tome, D. e de Beaurepaire, R. (2005) "Effects of chronic neuroleptic treatments on nutrient selection, body weight, and body composition in the male rat under dietary self-selection". *Behav Brain Res*, 163 (2), 204-211.

Mintz, E. M., Phillips, N. H. e Berger, R. J. (1998) "Daytime melatonin infusions induce sleep in pigeons without altering subsequent amounts of nocturnal sleep". *Neurosci Lett*, 258, 61-64.

Montplaisir, J., Nielsen, T., Coté, J., Bovin, D. e Lapierre, G. (1990) "Interhemispheric coherence before and after partial callosotomy". *Clin Electroencephl*, 21, 42-47.

Moruzzi, G. e Magoun, H.W. (1949) "Brain stem reticular formation and activation of the EEG". *Electroencephal Clinical Neurophysiol*, 1, 455-473.

Mukhametov, L. M. (1984) "Sleep in marine mammals". *Exp Brain Res*, 8, 227-238.

Mukhametov, L. M. (1987) "Unihemispheric slow-wave sleep in the Amazonian dolphin, *Inia geoffrensis*". *Neurosci Lett.*, 79, 128-132.

Mukahametov, L. M. (1988) "The absence of paradoxical sleep in dolphins". In: W. P. Koella, H. Shultz, F. Obala and P. Visser (Eds) *Sleep '86*. Gustav Fischer Verlag, New York.

Mukhametov, L. M., Lyamin, O. I., Chetyrbok, I. S., Vassilyev, A. A. e Diaz, R. (1992) "Sleep in an Amazonian mantee, *Trichechus inunguis*". *Experientia*, 48, 417-419.

Nelini, C., Bobbo, D. e Mascetti, G.G. (2006) "Monitoraggio del ciclo veglia-sonno (uniemisferico e biemisferico) nel pulcino di pollo domestico (*Gallus gallus*): indagine preliminare ". *Proceedings of the XI Annual Meeting of SIRS (Italian Society of Sleep Research)*, 54-55.

Nicol, S. C., Andersen, N. A., Phillips, N. H. e Berger, R. J. (2000) "The echidna manifests typical characteristics rapid eye movement sleep". *Neurosci Lett*, 283, 49-52.

Nicolau, M. C., Akaârîr, M., Gamundi, A., Gonzàlez, J. e Rial, R. V. (2000) "Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep". *Prog Neurobiol*, 62, 379-406.

Nottebohm, F. (1979) "Origins and mechanism in establishment of cerebral dominance". In: M. S. Gazzaniga (Eds) *Handbook of behavioural Neurobiology*, Vol. 2. Plenum Press, New York.

O'Keefe, J. e Nadel, L. (1978) "The hippocampus as a Cognitive Map". Cambridge: Oxford University Press.

Oleksenko, A. I., Mukhametov, L. M., Polyakov, I. G., Supin, A.Y. e Kovalzon, V. M. (1992) "Unihemispheric sleep deprivation in bottlenose dolphins". *J Sleep Res*, 1, 40-44.

Ookawa, T. (1971) "Electroencephalograms recorded from the telencephalon of the blinded chicken during behavioural sleep and wakefulness". *Poultry Sci*, 50, 731-736.

Ookawa, T. e Kadono, H. (1968) "Electroencephalograms of the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during non-anesthetized periods". *Poultry Sci*, 67, 320-325.

Ookawa, T. e Takagi, K. (1968) "Electroencephalograms of free behavioural chicks at various developmental ages". *Jpn J Physiol*, 18, 87-99.

Palomba, D. e Stegagno, L. (2004) "Psicofisiologia clinica". Carocci, Roma.

Parmeggiani, P. L. e Morrison, A. R. (1990) "Alteration in autonomic functions during sleep". In: Lowey, A. D. e Spyer, K. M. (Eds.), "Central Regulation of Autonomic Functions", Oxford, University Press, New York.

Peigneux, P., Laureys, S., Fuchs, S., Collette, F., Perrin, F., Reggers, J., Phillips, C., Degueldre, C., Del Fiore, G., Aerts, J., Luxen, A. e Maquet, P. (2004) "Are Spatial Memories Strengthened in the Human Hippocampus during Slow Wave Sleep?". *Neuron*, 44, 535-545.

Penisi, P. e Sarlo, M. (1998) "Indici elettrofisiologici in Psicologia", Padova, CLEUP Editrice.

Peters, J., Vonderhae, A. e Schmid, D. (1965) "Onset of cerebral electrical activity associated with behavioural sleep and attention in the developing chick". *J Exp Zool*, 160, 255-262.

Phillips, N. H. e Berger, R. J. (1992) "Melatonin infusions restore sleep suppressed by continuous bright light in pigeons". *Neurosci Lett*, 145, 217-220.

Pinel, J. P. J. (2000) "Psicobiologia". Prentice Hall International, Società editrice il Mulino, Bologna.

Pressman, M. R. e Orr, W. C. (1997) "Understanding Sleep: The Evaluation and Treatment of Sleep Disorders", Washington, DC: American Psychological Association.

Rashid, N. e Andrew, R. J. (1989) "Right hemisphere advantages for topographical orientation in the domestic chick". *Neuropsychologia*, 27, 937-948

Rattenborg, N. C., Lima, S. L. e Amlaner, C. J. (1999a) "Facultative control of avian unihemispheric sleep under the risk of predation". *Behav Brain Rev*, 105, 163-172.

Rattenborg, N. C., Lima, S. L. e Amlaner, C. J. (1999b) "Half-awake to the risk of predation". *Nature*, 397, 397-398.

Rattenborg, N. C., Lima, S. L. e Amlaner, C. J. (1999c) "Period amplitude analysis of avian unihemispheric quiet sleep". *Sleep*, 22, S 73.

Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. e Lima, S. L. (2000a) "Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep". *Neurosci. Biobehav R.*, 24, 817-842.

Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. and Lima, S. L. (2000b) "Unihemispheric Slow-wave sleep and predator detection in the pigeon (*Columba livia*)". *Sleep*, 23, 43-44.

Rechtschaffen, A., Gilliland, M. A., Bergman, B. M. e Winterer, J. B. (1983) "Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats". *Science*, 221, 182-184.

Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Gilliland, M.A. e Bauer, K. (1999) "Effects of method, duration and sleep stage on rebounds from sleep deprivation". *Sleep*, 22, 11-31

Ridgway, S. H. (1986) "Physiological observation on dolphin brains". In: R. J. Schusterman, J. A. Thomas and F. G. Wood (Eds) *Dolphin cognition and behavior: a comparative approach*. Hillsdale, N. J.: Lawrence Erlbaum Associates.

Ridgway, S. H., Harrison, R. J. e Joyce, P. L. (1975) "Sleep and cardiac rhythm in gray seal". *Science*, 197, 553-555.

Ringli, M., Kurth, S., Jenni, O.G., Tononi, G. e Huber, R. (2008) "High-density sleep EEG recordings in children and adolescents". *J Sleep Res*, 17, 130.

Ringli, M., Kurth, S., Geiger, A., Jenni, O.G. e Huber, R. (2009) "Local increase of sleep SWA after visuomotor learning in children". *Neuropsychobiology*, 59, 260.

Roffwarg, H., Herman, J. e Lamstein, S. (1975) "The Middle Ear Muscles: Predictability of Their Phasic Activity in REM Sleep from Dream Recall". *Sleep Res*, 4, 165.

Rogers, L. J. (1986) "Lateralization of learning in chicks". *Adv Stud Behav*, 16, 147-189.

Rogers, L. J. (1995) "The development of brain and behaviour in the chicken". Wallingford: Cab International.

Rogers LJ (2000) “Evolution of hemispheric specialisation: advantages and disadvantages”. *Brain Lang*, 73, 236–253.

Rogers, L. J. e Andrew, R. J. (2002) “Comparative Vertebrate Lateralization”. Cambridge University Press, Cambridge.

Rogers, L. J. e Anson, J. M. (1979) “Lateralization of function in the chicken forebrain”. *Pharmacol Biochem Behav*, 10, 679-686.

Rogers, L. J. e Chaffey, G. (1994) “Lateralised patterns of sleep activity in the developing chick brain”. *Proc Aus Neurosci Soc*, 5, 95.

Rogers, L. J., Zappia, J. V. e Bullock, S. P. (1985) “Testosterone and eye-brain asymmetry for copulation in chickens”. *Experientia*, 41, 1447-1449.

Rosenzweig, M. R., Leiman, A. L. e Breedlove, S.M. (2001) “*Psicologia Biologica* (seconda Edizione)”, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.

Rottenberg, V. S. (1992) “Sleep and memory 1: the influence of different sleep stages on memory”. *Neurosci Behav Rev*, 16, 497-502.

Rusak, B e Zucker, I (1979) “Neural regulation of circadian rhythms”. *Psychol Rev*, 59, pp. 449-526.

Shurley, J. T., Serafetinides, E. A., Brooks, R. E., Elsner, R. e Kenney, D. W. (1969) “Sleep in cetaceans: I. The pilot whale, *Globicephala scammoni*”. *Psychophysiology*, 6, 230.

Shen, J. M., Kudrimoti, H. S., McNaughton, B. L. e Barnes, C. A. (1998) "Reactivation of neuronal ensembles in hippocampal dentate gyrus during sleep after spatial experience". *J Sleep Res*, 7, 6-16.

Skaggs, W. E. e McNaughton, B. L. (1996) "Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience". *Science*, 271, 1870 – 1873.

Siegel, J. M. (1983) "A behavioral approach to the analysis of reticular formation unit activity". In: Robinson, T. E., "Behavioral approaches to research", New York, Oxford University Press.

Siegel, J. M. (2003) "Perché dormiamo". *Le Scienze*, 424, 52-57.

Siegel, J. M., Manger, P. R., Nienhuis, R., Fahringer, H. M. e Pettigrew, J. D. (1999) "Sleep in the platypus". *Neuroscience*, 91, 391-400.

Smith, C. (1995) "Sleep states and memory processes". *Behav Brain Res*, 69, 137-145.

Smith C. and Butler S. (1982) "Paradoxical sleep at selective times following training is necessary for learning". *Physiol Behav* 29, 469-473.

Stegagno, L., Angrilli, A., Costa, M. e Palomba, D. (1996) "Deficit cognitivi e ipotensione arteriosa: un'indagine cronopsicofisiologica". *Giornale Italiano di Psicologia*, 23(5), 837-859.

Stickgold, R. (2005) "Sleep-dependent memory consolidation". *Nature*, 437, 1272-1278.

Stickgold, R. e Walker, M. P. (2005) “Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep?”. *Neurosciences*, 28, 408-415.

Stone, W. S., Wenk, G. L., Stone, S. M. e Gold, P. E. (1992) “Glucose attenuation of paradoxical sleep deficits in old rats”. *Behav Neural Biol*, 57, 79-86.

Sutherland, G. R. e McNaughton, B. (2000) “Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles”. *Current Neurobiol*, 10, 180-186.

Tarao, M. e Ookawa, T.(1969) “On the electroencephalogram in the unilateral optic enucleated chick”. *Poultry Sci*, 48, 1516-1517.

Tobler, I. (1984) “Evolution of sleep processes: a phylogenetic approach”. *Experimental Brain Research (Suppl.)*, 8, 207-226.

Tobler, I. e Scherschlicht, R. (1990) “Sleep and EEG slow-wave activity in the domestic cat: effect of sleep deprivation”. *Behav Brain Res*, 37, 109–118.

Tobler, I. e Borbély, A. A. (1998) “Sleep and EEG spectra in the pigeon (*Columba livia*) under baseline conditions and after sleep deprivation”. *J Comp Physiol A*, 163, 729-738.

Tononi, G. e Cirelli, C. (2003) “Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis”. *Brain Res Bull* 62, 143-150.

Tononi, G. e Cirelli, C. (2006) “Sleep function and synaptic homeostasis”. *Sleep Med Rev* 10, 49-62.

Vallortigara, G. (1992a) “Affiliation and aggression as related to gender in domestic chicks (*Gallus gallus*)”. *J Comp Psychol*, 106, 53-57.

Vallortigara, G. (1992b) "Right hemisphere advantage for social recognition in the chicks". *Neuropsychologia*, 30, 761-768.

Vallortigara, G. (1994) "L'evoluzione della lateralizzazione cerebrale". Cleup Editrice, Padova.

Vallortigara, G. (2000) "Altre menti". Società editrice il Mulino, Bologna.

Vallortigara, G. (2005) "Cervello di gallina". Ed. Bollati Boringhieri, Torino.

Vallortigara, G. e Andrew, R. J. (1991) "Lateralization of response by chicks to change in a model partner". *Anim Behav*, 41, 187-194.

Vallortigara, G. e Andrew, R.J. (1994) "Differential involvement of right and left hemisphere in individual recognition in the domestic chick". *Behav Processes*, 33, 41-58.

Vallortigara, G. e Bisazza, A. (1997) "L'asimmetria del cervello nei vertebrati. *Le Scienze*, 342, 54-63.

Vallortigara G. e Rogers L.J. (2005) "Survival with an asymmetrical brain: Advantages and disadvantages of cerebral lateralization". *Behav Brain Sci*, 28, 575-589.

Vallortigara, G., Zanforlin, M. e Pasti, G. (1990) "Geometric modules in animal spatial representations : A test with chicks (*Gallus gallus*)". *J Comp Psychol*, 104, 248-254.

Vallortigara, G., Regolin, L., Bortolomiol, G. e Tommasi, L. (1996) “Lateral asymmetries due to preference in eye use during visual discrimination learning in chicks”. *Behav Brain Res*, 74, 135–143.

Vallortigara, G., Cailotto, M. e Zanforlin, M. (1990) “Sex differences in social reinstatement motivation of the domestic chick (*Gallus gallus*) revealed by runway tests with social and nonsocial reinforcement”. *J Comp Psychol*, 104, 361-367.

Vallortigara, G., Regolin, L., Bortolomiol, G. E Tommasi, L. (1996) “Lateral asymmetries due to preference in eye use during visual discrimination learning in chicks“. *Behav Brain Res*, 74, 135-143.

Vertes, R. P. (1984) “Brainstem control of the events of REM sleep”. *Prog Neurobiol*, 22, 241-288.

Vyazovskiy, V., Borbely, A. e Tobler, I. (2000) “Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric asymmetry during subsequent sleep in the rat”. *J Sleep Res*, 9, 367-371.

Vyazovskiy, V.V. e Tobler, I. (2008) “Handedness leads to interhemispheric EEG asymmetry during sleep in the rat”. *J Neurophysiol*, 99, 969-975.

Walker, J. M. e Berger, R. J. (1980) “Sleep as an adaptation for energy conservation functionally related to hibernation and shallow torpor”. *Prog Brain Res*, 53, 255-278.

Winson J. (1993) “The biology and function of rapid eye movement sleep”. *Curr Opin Neurobiol*, 3, 243-248.

Young, J. Z. (1981) “The life of Vertebrates”. Clarendon Press, Oxford.

Zepelin, H. e Rechtschaffen, A. (1974) "Mammalian sleep, longevity, and energy metabolism". *Brain Behav Evolu*, 10, 425-470.