



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum: Morfofisiologia e Biotecnologie applicate

**Valutazione di diversi marker temporali in alcune specie di
ruminanti domestici sottoposti a differenti condizioni sperimentali**

Tesi di:

dott. Fulvio Congiu

Tutor:

Ch.mo Prof. Giuseppe Piccione

Cotutor:

Ch.mo Prof. Roberto Refinetti

Abstract

The aim of the study was to investigate some rhythmic markers in three different ruminant species. For this purpose, three different experiments were conducted. The aim of the first experiment was to investigate clock gene expression in *Bos taurus* and the alteration occurring during pathological conditions, through the evaluation of the daily expression pattern of four clock genes (*Per2*, *Cry2*, *Bmall*, *Clock*) in peripheral blood cells. Five healthy cows, five affected by Brucellosis (BR) and five affected by Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease (BVD-MD) were housed in indoor stalls under natural spring conditions, blood samples were collected at 4 h intervals over a 24 h period. Statistical analysis showed rhythmic expression of clock genes mRNAs in healthy cows. Cows affected by BR did not show any rhythmic expression of clock genes mRNAs while in cows affected by BDV mRNA levels of *Bmall*, *Clock* and *Cry2* changed during the day. These findings highlighted that circadian system could be involved in homeostasis alteration and that clock genes could be considerate as regulatory genes or early response genes during inflammation, so their regulation should be evaluated in health research and treatment.

The second experiment of this study was to evaluate the circadian rhythm of melatonin in sheep and in goats and to compare the rhythmicity under the same conditions. Five female Sarda sheep and five female Sarda goats were housed in boxes equipped with an opening window. Animals were kept under a natural photoperiod and in indoor ambient temperature (16–20 °C). Blood samples were collected every 2 h over 48 h period. Results showed a circadian melatonin rhythm with a nocturnal acrophase in both species and a high robustness between rhythm 61.20 ± 7.57 and 83.60 ± 7.26 , denoting a high percentage of stationarity of melatonin circadian rhythm. No significant differences were found on melatonin levels in sheep and goats. Our finding demonstrates the similarity between the two species in the secretion and rhythmicity of melatonin.

The third experimental study evaluates the pattern of plasma melatonin during the trough and the peak of its daily rhythm. Blood samples from 8 ewes were collected every 3 h for a 48-h period. On the third day, blood samples were collected from 10:00 to 13:00 (trough) and from 20:00 to 23:00 (peak) every 20 min. Our results showed a robust daily rhythm of melatonin in both days of monitoring, with nocturnal acrophase. During the trough, a significant decrease was observed starting from the 10:40 with a progressive

decrease about every 40 min. During the peak of the plasma melatonin daily rhythm, an increase was observed starting from the 20:40 with a progressive increase about every 40 min. These data could be taken into consideration to monitor the plasma melatonin variations during the 24 h, and for the administration of melatonin for breeding in ewes.

In conclusion, the circadian rhythms in domestic ruminants appear to be modulated by exogenous factors that not change the normal homeostasis of the organism, for example the photoperiod, and by exogenous *noxae*, for example infectious diseases, that can produce an alteration of the normal expression of clock genes.

Indice

1	INTRODUZIONE	1
1.1	L'orologio circadiano	1
	<i>Classificazione dei ritmi circadiani</i>	2
	<i>Il sistema circadiano</i>	5
	<i>L'orologio circadiano principale</i>	8
	<i>Interazione tra ambiente esterno e orologio circadiano</i>	11
	<i>Orologi circadiani periferici</i>	14
	<i>Coordinazione degli orologi periferici</i>	16
	<i>Vie afferenti ed efferenti del sistema circadiano</i>	19
	<i>Regolazione molecolare</i>	26
	<i>L'orologio circadiano nei mammiferi</i>	33
1.2	Ruolo della melatonina nell'orologio circadiano	35
	<i>Generalità</i>	35
	<i>La melatonina e la regolazione del sistema circadiano</i>	36
1.3	Approccio all'analisi statistica cronobiologica	38
	<i>Analisi cronobiologica descrittiva</i>	39
	<i>Analisi cronobiologica macroscopica</i>	39
	<i>Analisi cronobiologica macroscopica trasversale</i>	40
	<i>Analisi cronobiologica microscopica o metodo del Cosinor</i>	41
	<i>Analisi del Single-Cosinor</i>	43
	<i>Analisi microscopica di più serie di dati</i>	46
	<i>Implicazioni fisiologiche dell'analisi del Cosinor</i>	49
1.4	Ritmicità circadiana e agenti patogeni: Cenni	51
2	SCOPO DELLA TESI	55
3	DISEGNI SPERIMENTALI	57
3.1	Esperimento 1	57
	Materiali e metodi	57
	<i>Campionamento e RT-qPCR</i>	59
	<i>Analisi statistica</i>	64
	<i>Risultati</i>	64
3.2	Esperimento 2	67
	Materiali e metodi	67
	<i>Campionamento e analisi della melatonina</i>	68
	<i>Analisi statistica</i>	70
	<i>Risultati</i>	71
3.3	Esperimento 3	72
	Materiali e metodi	72
	<i>Campionamento e analisi della melatonina</i>	73

	<i>Analisi statistica</i>	74
	<i>Risultati</i>	75
4	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	77
5	BIBLIOGRAFIA	90
6	ABBREVIAZIONI	129

Indice figure

Figura 1: Diagramma schematico che mostra le vie di sincronizzazione dell'orologio periferico nei mammiferi (Stratmann & Schibler 2006)	17
Figura 2: Principali neurotrasmettitori coinvolti nelle afferenze dei nuclei sovrachiasmatici (Refinetti 2006)	20
Figura 3: Azione dei neurotrasmettitori (IGL: foglietto intergenicolato del talamo; NPY: neuropeptide Y; GLU: glutammato; SCN: nuclei sovrachiasmatici; 5-HT: serotonina da Refinetti 2006)	22
Figura 4: Feedback loop positivo e negativo dei dimeri <i>Clock/Bmal</i> e <i>Cry/Per</i> (Mohawk et al., 2012)	28
Figura 5: Interazione del feedback loop CLOCK/Bmal (A) con il metabolismo cellulare (B) (Beal et al., 2016)	30
Figura 6: Analisi macroscopica di un cronogramma (A) e di più serie temporali (B) con successiva detemporalizzazione e cumolazione dei dati. (Cugini, 2006)	40
Figura 7: Analisi macroscopica trasversale di un più cronogrammi campionati in un dato periodo. (Cugini, 2006)	41
Figura 8: Metodo del <i>Cosinor</i> (A), valutazione dei parametri ritmometrici del metodo del <i>Cosinor</i> (B). (Cugini, 2006)	43
Figura 9: Esempio grafico di dato aberrante (outlier) che conferisce "rumore" cioè valori errati che eccedono la terza deviazione standard. (Cugini, 2006)	45
Figura 10: Esempio grafico del metodo del <i>Single-Cosinor</i> . La funzione coseno viene adattata in modo tale che venga minimizzata la varianza ossia risulti minima la somma dei residui elevata al quadrato. (Cugini, 2006)	46
Figura 11: Esempio grafico del metodo del Population <i>Mean-Cosinor</i> (A). L'ellisse all'interno del diagramma circolare rappresenta "l'ellisse di confidenza" e risulterà eccentrica al polo se il ritmo risulterà statisticamente significativo o concentrica al polo se il ritmo risulterà non significativo (B). (Cugini, 2006)	47
Figura 12: Esempio grafico del metodo del <i>Single Group-Cosinor</i> . (Cugini, 2006)	48
Figura 13: Risultati dell'RT-qPCR per i 4 geni clock studiati nel: gruppo bovini sani (a, b), affetti da <i>Brucella abortus</i> (c, d) e affetti da Malattia delle mucose/Diarrea virale bovina (e, f). Le aree grigie rappresentano la scotofase del naturale ritmo luce-buio. Sull'asse dell'ordinate sono riportati i livelli relativi di espressione, sull'asse delle ascisse le ore dei singoli prelievi. I risultati sono come media \pm SEM. (Piccione et al., 2014)	66
Figura 14: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica durante il picco massimo e il picco minimo misurata ad intervalli regolari di 20 minuti. Nota: le lettere da A a K indicano gli orari di prelievo sono state aggiunte per facilitare la lettura delle significatività	76
Figura 15: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica registrata in 48 ore di sperimentazione in pecore e capre di razza sarda (Carcangiu et al., 2014)	83
Figura 16: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica durante il picco massimo e il picco minimo, i prelievi sono stati eseguiti ogni 20 minuti (Carcangiu et al., 2014)	87

Indice tabelle

Tabella 1: Vantaggi dell'analisi di regressione periodica o metodo del <i>Cosinor</i>	49
Tabella 2: Sequenza nucleotidica, Acc n° e direzione dei primer usati nella RT-qPCR	61
Tabella 3: Valori medi \pm deviazione standard (DS) dei parametri ritmometrici espressi nelle loro unità di misura convenzionali.	71
Tabella 4: Mesor, ampiezza, acrofase e robustezza del ritmo circadiano della melatonina plasmatica misurata durante due giorni consecutivi dieci pecore di razza Sarda	75

1 INTRODUZIONE

1.1 L'orologio circadiano

L'ambiente esterno rappresenta un elemento composito in continuo divenire e tutti gli esseri viventi sono in costante rapporto con esso tramite i meccanismi biologici. Tali meccanismi, così come le fluttuazioni dei livelli di diversi ormoni e le attività connesse alle principali funzioni biologiche quali, ad esempio, l'alternanza del ritmo sonno/veglia sono generati da un finissimo sistema di regolazione interna. Il vantaggio biologico derivante da una tale organizzazione è rappresentato dalla capacità di sfruttare il momento ottimale nelle varie condizioni ambientali, ad esempio riposare quando risulta meno pericoloso farlo e pertanto, in molte situazioni, le possibilità di sopravvivenza degli organismi risultano direttamente proporzionali alla capacità di adattamento ai cambiamenti.

Molti dei cambiamenti che interessano l'ambiente esterno avvengono con ritmo ben preciso lungo periodi temporali di durata variabile, con cicli di circa 24 ore come l'alternanza luce/buio o più prolungati nel corso del tempo come, ad esempio, l'alternanza delle stagioni. Nel corso dell'evoluzione gli organismi viventi hanno fatto

fronte a queste variazioni e si sono adattati sviluppando dei sistemi di regolazione dei ritmi biologici. La maggior parte di questi è rappresentata da ritmi *circadiani*, così definiti in quanto presentano una durata di circa 24 ore, e da ritmi *ultradiani* di durata inferiore. In particolare, la coniazione del termine **orologio circadiano** (*circadian clock*) negli anni '60 del secolo scorso si deve allo scienziato Franz Halberg, fondatore della moderna cronobiologia i cui studi hanno gettato le fondamenta per la comprensione delle forze regolanti i fenomeni circadiani negli organismi viventi.

Classificazione dei ritmi circadiani

La principale classificazione dei ritmi circadiani è quella **fisica** da cui, come già accennato, deriva la definizione stessa di “circadiano”. In particolare, secondo tale classificazione è possibile individuare ritmi:

- Ultradiani >20 ore
- Circadiani 24 ± 4 ore
- Infradiani >28 ore, in particolare:
- Circasettani 7 ± 3 giorni
- Circadisettani 14 ± 3 giorni
- Circavigintani 21 ± 3 giorni

- Circatrigintani 30 ± 5 giorni
- Circannuali 12 ± 2 mesi

Altre classificazioni che possono essere tenute in considerazione nello studio dei ritmi circadiani sono:

- Classificazione di **complessità**, tramite la quale i ritmi vengono considerati come espressione di più variabile tra loro collegate. In base a ciò si distinguono ritmi semplici e complessi;
- Classificazione di **consistenza**, considera la misurabilità diretta o indiretta dei ritmi suddividendoli in reali e virtuali;
- Classificazione di **diffusione**, individua ritmi locali e sistemici a seconda della loro diffusione nell'organismo;
- Classificazione di **mobilità**, prende in considerazione ritmi stazionari o propagati a seconda della loro propagazione nello spazio;
- Classificazione di **natura**, cioè in endogeni o esogeni a seconda se legati, rispettivamente, al genoma dell'individuo o all'ambiente esterno;
- Classificazione di **resistenza**, intesa come resistenza alle perturbazioni. Tale classificazione individua pertanto ritmi resistenti e delicati;

- Classificazione di **sussistenza**, considera ritmi permanenti o duraturi e ritmi transitori o temporanei;
- Classificazione **evolutiva (gerontologica o clinospettrometrica)**, valuta i ritmi in funzione dell'età;
- Classificazione **fisiologica**, considera i ritmi in base all'appartenenza alla sfera conservativa (ritmi psichici e fisici) o alla sfera riproduttiva;
- Classificazione **funzionale**, individua quattro tipi di ritmo (α, β, γ e δ) suddivisi, a loro volta, in due sottotipi a seconda che si sviluppino in sincronizzazione o in free-running;
- Classificazione **gerarchica**, in base al rapporto di dipendenza suddivide i ritmi in ritmi guida e in ritmi guidati;
- Classificazione **identificativa**, considera i ritmi marker in riferimento a procedure diagnostiche o di tipo interventistico-terapeutico;
- Classificazione **morfologica**, considera ritmi puntuali o discontinui, espressione di un fenomeno che si ripete, circoscritto ed intervallato da una pausa, e ritmi continui o analogici, che si ripetono con funzioni oscillanti di varia tipologia;

- Classificazione **ontogenetica**, in base al processo di maturazione del ritmo in riferimento alla nascita dell'individuo. Tali tipo di classificazione prende in considerazione ritmi immaturi o maturi;
- Classificazione **organizzativa**, a seconda della loro rilevabilità a livello cellulare. Si individuano quindi ritmi funzionali e organici, a loro volta distinti in molecolari, cellulari, tissutali etc.;
- Classificazione **qualitativa**, analizza il periodo di incidenza del picco massima e considera ritmi diurni, notturni, mattutini, serotini, giornalieri etc.;
- Classificazione **teleologica**, in base al ruolo che i ritmi assumono nell'economia della materia vivente identifica ritmi essenziali e non essenziali.

Il sistema circadiano

Storicamente le prime esperienze scientifiche suggestive della presenza di un meccanismo di regolazione interno all'organismo strettamente connesso ai cambiamenti ambientali furono quelle effettuate nel 1727 da Jean Jacques d'Ortus De Marian sulla *Mimosa pudica*, una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle

Mimosaceae le cui foglie hanno mostrato una capacità di reazione agli stimoli tattili e alle variazioni di luminosità circadiane dettate dall'alternanza giorno/notte (De Mairan, 1729).

In anni più recenti, ulteriori studi hanno messo in luce la presenza di una sorta di segna passi (*peacemaker*) interno, un vero e proprio orologio biologico deputato alla regolazione dei ritmi circadiani, anche in organismi procarioti quali i Cianobatteri (Kondo & Ishiura, 2000). Negli organismi superiori il cuore di questo meccanismo di adattamento e di regolazione dei fenomeni circadiani è rappresentato dall'**ipotalamo**, in particolare dai **nuclei sovrachiasmatici** (strutture pari: destra e sinistra) (Buijs et al. 2003). Le funzioni di tale struttura anatomica nei mammiferi risultano già sviluppate a livello fetale (Weinert 2005). I principali fattori esterni regolanti l'attività dei nuclei sovrachiasmatici sono rappresentati dal comportamento alimentare e dall'alternanza luce/buio anche se numerosi altri elementi quali, ad esempio, l'attività fisica, le interazioni sociali e gli assi endocrini contribuiscono a regolare e a sincronizzare l'attività dell'orologio circadiano (Buijs et al. 2003).

Nel sistema circadiano è possibile individuare tre precisi elementi: un *oscillatore endogeno*, uno *zeitgeber* e i *ritmi* generati dal

sistema stesso. Tra questi l'elemento cardine è rappresentato dall'oscillatore endogeno. Esso si autoregola riuscendo a mantenere gli impulsi ritmici anche in assenza di stimoli esterni diretti e i ritmi così generatisi presentano solitamente un periodo (τ) di 23-25 ore. Quando un orologio circadiano è totalmente distaccato dall'ambiente esterno viene definito "free running" e si caratterizza per l'acquisizione di un suo preciso ritmo.

Il secondo elemento del sistema circadiano è rappresentato dallo *zeitgeber*. Tale termine di derivazione tedesca significa letteralmente "donatore di tempo" ed è rappresentato da uno stimolo esterno, ad esempio la luce, che sincronizza l'orologio circadiano con l'ambiente esterno. Tale processo è noto come "entrainment".

Infine, a completare il complesso sistema che è stato appena, brevemente, descritto troviamo i ritmi che esso stesso genera nelle 24 ore. Questi ritmi, come già accennato, sono fondamentali per gli organismi viventi e, in particolare per quelli superiori, permeandone tutta la vita, dai fenomeni fisiologici a quelli comportamentali (Foster & Lucas, 1999). Alla base dei suddetti fenomeni troviamo sempre dei processi biochimici i quali, come è noto, sono fortemente influenzati dalla temperatura nella misura in cui all'aumento di questa

corrisponde un aumento della velocità di reazione (Pittendrigh, 1954). Il sistema circadiano con i suoi ritmi ha dimostrato di poter, entro certi limiti, compensare le variazioni di temperatura mostrando minime fluttuazioni in risposta ad esse. Tale capacità è indipendente dalle caratteristiche di termoregolazione degli organismi ed è stata riscontrata in omeotermi, ectotermi e poichilotermi (Kaushnik et al., 2007; Takeuchi, 2007). Inoltre, negli omeotermi, si è potuto notare una reazione di sovra-compensazione in risposta alle basse temperature (Dibner, 2009).

L'orologio circadiano principale

Sebbene inizialmente si pensasse che i ritmi circadiani rappresentassero una capacità generale di misurazione del tempo intrinseca all'intero organismo vivente, già agli albori della cronobiologia moderna, intorno al 1960, Colin Pittendrigh, considerato con Halberg uno dei padri della disciplina, ipotizzò la presenza di un ben distinto oscillatore endogeno sensibile alle variazioni di luminosità, di fatto l'orologio interno dell'organismo (Pittendrigh, 1960).

A partire da questa ipotesi, gli studiosi iniziarono a ricercare una ben precisa struttura anatomica che fungesse un orologio interno

principale, regolatore e sincronizzatore di tutti i ritmi. Le ricerche vennero concentrate su varie strutture in modelli sperimentali e non, in particolare: occhio, cervello ed epifisi in *Zebrafish*, neuroni laterali (LNvs) in *Drosophila* (Helfrich-Förster et al., 2007) mentre nei mammiferi furono particolarmente indagati cervello ed occhio.

In particolare, nei mammiferi lesioni indotte in modelli murini hanno permesso di mettere in luce una struttura, pari, ipotalamica, posta al di sopra del chiasma ottico e nota, come già accennato, come i **nuclei sovrachiasmatici**. Nei soggetti sperimentali, le lesioni indotte a questo livello hanno portato alla perdita sia dei comportamenti circadiani che della secrezione ritmica dei corticosteroidi (Moore et al., 1972; Stephan & Zucker, 1972). Il trapianto di tessuto proveniente dai nuclei soprachiasmatici di derivazione fetale a livello del terzo ventricolo nei modelli sperimentali ha, invece, portato alla risoluzione delle alterazioni comportamentali. Molti studi in questo senso hanno concentrato l'attenzione su animali mutanti che presentano modificazioni dei ritmi circadiani non indotte sperimentalmente. Il più noto di questi mutanti è il criceto dorato (*Mesocricetus auratus*) con mutazione Tau (*Tau-mutant hamsters*) (Menaker & Refinetti, 1993). Tale mutazione venne identificata per la prima volta nel 1988 negli Stati Uniti presso l'Università dell'Oregon, in particolare nel

laboratorio di Michael Menaker (Ralph & Menaker, 1989) e rappresenta la prima mutazione genetica riguardante in maniera specifica il sistema circadiano nei mammiferi. Apparentemente le caratteristiche morfologiche e fisiologiche di tali criceti sono perfettamente sovrapponibili a quelli dei criceti privi di mutazione, tuttavia la presenza dell'allele mutante riduce notevolmente la durata dei ritmi circadiani. In particolare, i soggetti omozigoti presentano un periodo di 20 ore, inferiore pertanto di 4 ore a quello dei soggetti normali, mentre negli eterozigoti la durata del periodo è di 22 ore. L'osservazione degli actogrammi ha permesso di evidenziare le differenze esistenti tra i diversi fenotipi. Tale alterazione è stata messa in relazione in particolare con l'attività locomotoria, la taglia e la temperatura corporea degli animali (Refinetti, 1996, 2014). Come nei modelli sperimentali murini, anche nei criceti mutanti Tau il trapianto di materiale proveniente dai nuclei soprachiasmatici riesce a ripristinare la funzionalità del sistema circadiano. Al contrario, tale trapianto da mutanti Tau a soggetti sani ha portato all'evidenziazione in questi ultimi di caratteristiche mutanti (Ralph et al., 1990. Sujino et al., 2003).

Ulteriori studi hanno messo in luce come colture cellulari di nucleo sovrachiasmatico mostrino attività metabolica ritmica ed esprimano proteine essenziali per la funzionalità dell'orologio circadiano (Schwartz et al., 1977. Sun et al., 1997. Hastings et al., 1999). Tali colture cellulari hanno, inoltre, la capacità di generare attività elettrica in maniera autonoma secondo un ritmo circadiano (Green et al., 1982. Groos et al., 1982) fino a un periodo di 3 settimane (Bos et al., 1990). Quest'ultima caratteristica è stata evidenziata anche in singoli neuroni provenienti dai nuclei soprachiasmatici (Welsh et al., 1995). Tali evidenze hanno portato a localizzare proprio nei nuclei sovrachiasmatici ipotalamici l'orologio circadiano in quanto struttura in grado di generare in maniera autonoma attività circadiana sia *in vivo* che *in vitro*, fondamentale per la produzione dell'attività ritmica di tutto l'organismo.

Interazione tra ambiente esterno e orologio circadiano

La luce rappresenta uno dei principali stimoli esterni aventi influenza sui sistemi biologici dei mammiferi. In particolare, si è visto che in modelli murini knock out per i fotorecettori l'attività ritmica circadiana viene mantenuta sebbene attenuata (Semo et al., 2003) mentre tale attività risulta presente ma non sincronizzabile in topi privi

di tessuto retinico in seguito a degenerazione naturale o induzione sperimentale. Risulta interessante notare come, proprio a livello retinico, sia stata dimostrata la presenza di fotorecettori non deputati alla formazione dell'immagine (Berson et al., 2002). Tali cellule, individuate negli anfibi, posseggono dei particolari pigmenti visivi privi, come già accennato, della capacità di formare l'immagine (Provencio et al., 1998. Provencio et al., 2000. Gooley et al., 2001. Hatter et al., 2002). Nei mammiferi è stata individuata una particolare proteina con proprietà sovrapponibili a quanto osservato negli anfibi, la **melanopsina**. Essa è stata osservata a livello di particolari cellule ganglionari retiniche fotosensitive (*photosensitive retinal ganglion cells*, **ipRGCs**) (Hattar et al., 2002; Hannibal et al., 2002a) e il suo studio ha contribuito a gettare nuova luce sull'esatta comprensione del funzionamento del *non-images forming system* (NIF), cioè di quel sistema di captazione degli stimoli luminosi non coinvolto nella formazione dell'immagine visiva.

Studi preliminari hanno mostrato come, tramite queste popolazioni cellulari, la luce riesca a guidare i ritmi circadiani anche indipendentemente dall'azione di coni e bastoncelli (Hattar et al., 2003) e, negli ultimi anni, lo studio di tale sistema e delle sue interazioni ha riscosso sempre più interesse a livello scientifico. Come

già accennato, la melanopsina rappresenta il pigmento visivo presente a livello delle ipRGCs ed è possibile che, insieme alla capacità di captare e trasmettere informazioni non visive, coadiuvi l'azione di coni e bastoncelli nella regolazione dei ritmi circadiani. Studi recenti hanno investigato la presenza della melanopsina nello spalace di Ehrenberg (*Spalax ehrenbergi*), un roditore cieco della famiglia degli Spalacidi caratterizzato dalla presenza di occhi rudimentali posti a livello sottocutaneo (Esquiva et al., 2016). Sebbene del tutto cieco (Cernuda-Cernuda et al., 2002), tale roditore riesce a rispondere agli stimoli luminosi e ad adattarsi sia al ciclo solare circadiano che ai cambiamenti stagionali (David-Gray et al., 1998; Nevo et al., 2001). L'occhio degli individui adulti presenta degenerazione a livello dei corpi ciliari, della camera anteriore e delle lenti ma la retina risulta intatta dal punto di vista morfologico sebbene meno organizzata che negli altri mammiferi (Cernuda-Cernuda et al., 2002). Diversi studi di funzionalità visiva hanno accertato l'incapacità di formazione dell'immagine da parte della retina in questo animale (Cooper et al., 1993a) suggerendo una sovrapposibilità tra tali strutture e il *non-images forming system* (NIF), cui si accennava sopra, individuato in occhi dotati di capacità visiva (Cooper et al., 1993b; Hannibal et al., 2002b). Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che le aree

coinvolte nella funzionalità del NIF, come i nuclei sovrachiasmatici, presentano la stessa innervazione di quanto individuato negli animali non ciechi mentre le proiezioni retiniche a livello della corteccia visiva sono ridotte (Bronchti et al., 1991; Cooper et al., 1993b).

Le informazioni luminose captate tramite la melanopsina vengono trasdotte direttamente alla porzione ventrolaterale dei nuclei sovrachiasmatici attraverso il **tratto retinoipotalamico** (Moore et al., 1972).

Si ritiene, infine, che le vie metaboliche eccitatorie glutaminergiche (Castel et al., 1993) e della proteina pituitaria adenilato-ciclastasi dipendente (PACAP) (Hannibal et al., 1997) mediano la trasmissione dei segnali luminosi per l'attivazione di specifici meccanismi di segnale, in particolare quelli inerenti al rilascio di Ca^{2+} , portando ad un rimodellamento della cromatina e all'induzione dei vari componenti dell'orologio circadiano principale (Hirota, 2004).

Orologi circadiani periferici

Sebbene l'esistenza di un orologio centrale influente anche a livello dei tessuti periferici sia stata ampiamente supportata, diverse evidenze suggeriscono come in questi ultimi sia possibile ipotizzare la presenza di ulteriori oscillatori circadiani. Diversi studi, infatti, hanno

individuato le componenti dell'orologio centrale, cioè i geni codificanti le proteine fondamentali per lo sviluppo e l'armonico funzionamento dei ritmi nelle singole cellule, espresse a livello dei nuclei sovrachiasmatici, anche a livello periferico (Balsolobre et al., 1998. Yamazaki et al., 2000. Yagita et al., 2001). In colture cellulari derivanti da svariati tessuti quali: epatico, splenico, renale, tiroideo, muscolare scheletrico e cardiaco è stata riscontrata la capacità di esprimere componenti dell'orologio centrale in maniera ritmica (Yamamoto et al., 2004. Yamzaki et al., 2009. Yoo et al., 2004). In particolare, colture di epatociti hanno dimostrato la capacità di mantenere una ritmicità nel consumo di ossigeno (Langner et al., 1972). Si ritiene, tuttavia, che l'attività di tali oscillatori periferici sia sempre sotto il controllo superiore dell'orologio principale centrale sebbene alcuni tessuti come polmone e fegato abbiano mostrato delle risposte più consistenti rispetto a quanto atteso da un sistema ritenuto in posizione periferico (Yoo et al., 2004), mentre studi svolti su fibroblasti di ratto mantenuti in coltura per diversi anni hanno messo in luce, una volta stimolati, una capacità di oscillazione circadiana perfettamente integra (Balsolobre et al., 1998). Studi simili sono stati altresì effettuati su colture di fibroblasti murini embrionali (NIH-3T3) e su linee cellulari tumorali di osteosarcoma (U2OS) (Akashi et al.,

2000; Brown et al., 2005; Hughes et al., 2009). In vivo, lesioni dei nuclei sovrachiasmatici non determinano una perdita della funzione degli orologi periferici, tuttavia portano ad una desincronizzazione tra i vari tessuti (Yoo et al., 2004; Guo et al., 2006).

In conclusione, è possibile ampliare la definizione di nuclei sovrachiasmatici considerandoli non soltanto un centro avente la doppia funzione di recepire e processare gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno, ma anche come elemento indispensabile per la sincrona coordinazione dell'attività degli orologi circadiani posti nei tessuti periferici.

Coordinazione degli orologi periferici

L'orologio principale riesce a svolgere la sua funzione di sincronizzatore tra i vari orologi periferici sfruttando diversi meccanismi e si ritiene che a fungere da principale *zeitgeber* per gli orologi periferici sia il ritmo **alimentazione/digiuno** dettato dai nuclei sovrachiasmatici (Yamazaki et al., 2000; Stratmann & Schibler, 2006) (fig. 1).

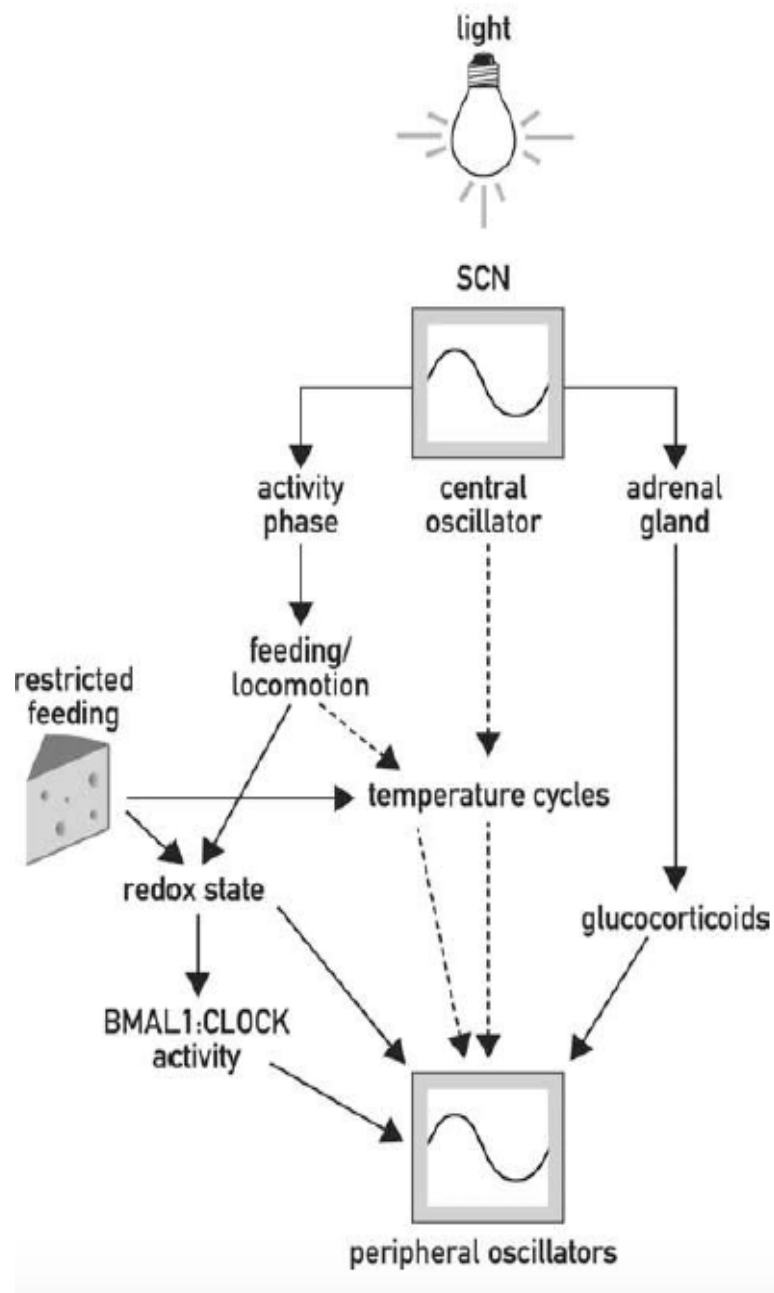


Figura 1: Diagramma schematico che mostra le vie di sincronizzazione dell'orologio periferico nei mammiferi (Stratmann & Schibler 2006)

Risulta interessante notare come il disaccoppiamento forzato tra il comportamento alimentare, solitamente sempre accoppiato all'attività circadiana, e l'orologio circadiano centrale porti ad una

traslazione di fase nell'espressione genetica dei geni che regolano l'attività circadiana, noti come **geni clock** (*clock genes*) (Damiola et al., 2000). Un importante ruolo nella regolazione dell'espressione di *Bmal*, uno dei principali geni clock, viene svolto da alcuni marker metabolici molecolari quali le Sirtuine (SIRT) e il NAD⁺ (Asher et al., 2008, Nakahata et al., 2008). Tutti questi elementi suggeriscono un sistema complesso e sfaccettato in cui i singoli componenti riescono a fronteggiare gli eventuali elementi di disturbo (Debruyne et al., 2007a; Fan et al., 2007; Liu et al., 2008) e nel quale, si ipotizza, numerosi fattori intervengano in differenti stadi della trasduzione dei segnali per coordinare le risposte periferiche.

Tra questi fattori, un fondamentale *zeitgeber* del sistema circadiano oltre all'alternanza alimentazione/digiuno, è rappresentato dalla **temperatura corporea** o, meglio, dalle sue variazioni (Liu et al., 2003. Sehadova et al., 2009). Si pensa, inoltre che essa possa essere uno *zeitgeber* periferico nei mammiferi (Brown et al., 2002).

Un ulteriore elemento da tenere in considerazione è rappresentato dagli **ormoni**. Come è noto, i nuclei sovrasiasmatici regolano la secrezione di svariati ormoni coinvolti in diversi assi ormonali e, pertanto, queste sostanze devono essere tenute in

considerazione come possibile fonte di influssi regolatori (Oster et al., 2006). In particolare, la secrezione dei glucorticoidi appare profondamente connessa al ritmo circadiano. Essi presentano specifici recettori in quasi tutti i tessuti corporei, eccezion fatta proprio per i nuclei sovrachiasmatici (Balsolobre et al., 2000).

Infine, pare che anche il sistema nervoso autonomo sia implicato nella coordinazione degli orologi periferici. Infatti, la denervazione chirurgica del tessuto epatico porta ad una desincronizzazione di questi ultimi.

Vie afferenti ed efferenti del sistema circadiano

Come in precedenza affermato, il sistema circadiano riceve informazioni dall'ambiente esterno tramite stimoli luminosi e non che vengono captati da recettori posti a livello di vari organi, soprattutto occhio per i primi e termocettori cutanei per i secondi. Tali stimoli, tramite le vie afferenti giungono al peacemaker rappresentato dall'orologio principale e agli orologi periferici da cui partiranno le risposte necessarie alla periferia tramite le vie efferenti.

Tra le **vie afferenti** particolare rilevanza assumono quelle rappresentate dal tratto retino-ipotalamico, dal tratto genicolo-ipotalamico e dal rafe ipotalamico. Studi di farmacologia hanno

permesso di far luce sul coinvolgimento di varie sostanze a questo livello. In particolare, l'attenzione degli studiosi si è focalizzata tre neurotrasmettitori, **glutammato**, **neuropeptide Y** e **serotonina**, e su un ormone, la **melatonina** (fig. 2).

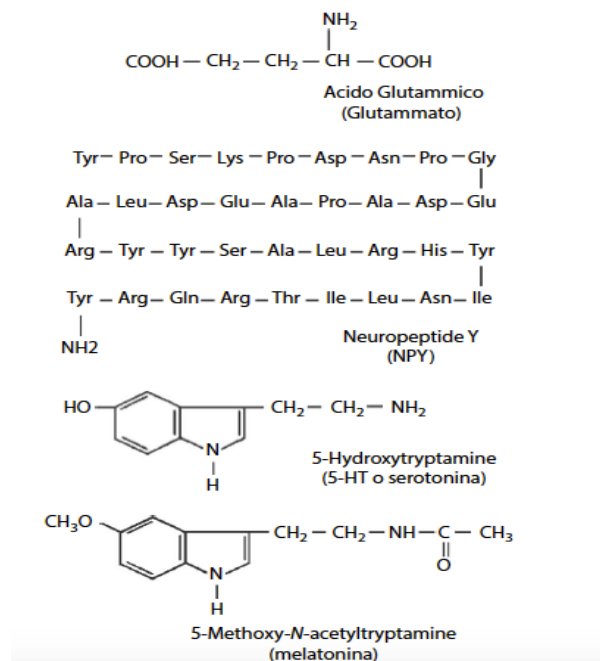


Figura 2: Principali neurotrasmettitori coinvolti nelle afferenze dei nuclei sovrasiasmatici (Refinetti 2006)

Il **glutammato**, amminoacido ad azione eccitatoria, è il principale neurotrasmettitore prodotto dai neuroni del tratto retino-ipotalamico. La stimolazione delle sinapsi glutaminergiche con

glutammato o agonisti glutaminergici causa spostamenti di fase sia a livello della ritmicità dell'attività dei nuclei sovrasiasmatici (Shirakawa & Moore, 1994; Franken et al., 1999; Chen et al., 1999; Yannielli & Harrington, 2001) che a livello dei ritmi comportamentali (Mintz et al., 1999; Mintz et al., 2002; Novak & Alberts, 2002; Gamble et al., 2004). Il **neuropeptide Y** (NPY) è prodotto dai neuroni del tratto genicolo-ipotalamico e può causare spostamenti di fase durante la parte luminosa del giorno (Huhman & Albers, 1994; Biello & Mrosovsky, 1996; Harrington & Schak, 2000; Knoch et al., 2004). Anche la **serotonina** presente a livello del rafe ipotalamico può avere lo stesso effetto sia *in vivo* (Knoch et al., 2004, Edgar et al., 1993, Cutrera et al., 1996; Challet et al., 1998; Horikawa & Shibata, 2004) che *in vitro* (Prosser et al., 1993; Prosser, 2003). Sebbene gli studi condotti sino ad ora abbiano dato risultati parziali e, talvolta, contrastanti (Antle et al., 1998) pare che la via rafe-ipotalamica possa essere considerata un modulatore dell'attività a livello del tratto retino-ipotalamico. Inoltre, gli agonisti serotoninergici hanno mostrato la capacità sia di aumentare (Moriya et al., 1998; Byku & Gannon, 2000) che di attenuare (Challet et al., 2001, Antle et al., 2003) gli spostamenti di fase comportamentali provocati da stimoli

luminosi. Riassumendo l'azione complessiva di questi tre neurotrasmettitori (fig. 3) è possibile fornire un quadro generale del funzionamento del sistema di afferenza del sistema circadiano.

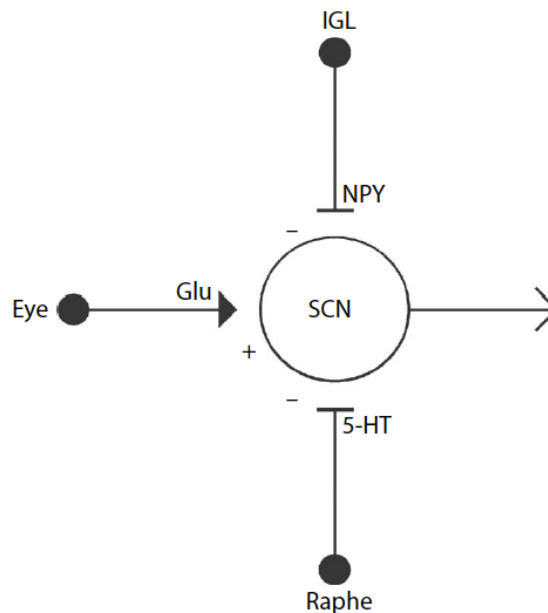


Figura 3: Azione dei neurotrasmettitori (IGL: foglietto intergenicolato del talamo; NPY: neuropeptide Y; GLU: glutammato; SCN: nuclei sovrachiasmatici; 5-HT: serotonina da Refinetti 2006)

In particolare, durante la fase buia del giorno il glutammato rilasciato dal tratto reticolo-ipotalamico determina il ritardo e l'avanzamento di fase dovuto agli stimoli luminosi mentre NPY e serotonina inibiscono gli spostamenti di fase dovuti alla luce. Durante

la fase luminosa del giorno, invece, il glutammato non media alcuno spostamento di fase mentre NPY, e probabilmente anche la serotonina, determinano gli spostamenti di fase dipendenti da stimoli non luminosi. In questa fase della giornata, l'attivazione del tratto retino-ipotalamico causata da stimoli luminosi inibisce lo spostamento di fase non dipendente dalla luce mediato da NPY e serotonina.

L'altro grande componente delle vie afferenti ai nuclei sovrachiasmatici è rappresentato, come già accennato dalla **melatonina**. La sua secrezione è modulata dall'epifisi ed è alla base di molti fenomeni circadiani. La somministrazione di melatonina esogena ha dimostrato di poter svolgere le proprie funzioni anche in assenza dell'epifisi (Warren et al., 1993; Schuhler et al., 2002; Pitrowsky et al., 1999). Il rapporto intercorrente tra melatonina e sistema circadiano presenta tuttora aspetti controversi e verrà affrontato in maniera più specifica in seguito.

Numerose altre sostanze ad azione ormonale e neurotrasmettitori hanno mostrato una ritmicità circadiana, anche se ancora sono poco noti i loro meccanismi d'azione all'interno del sistema circadiano. Tra le prime è possibile citare gli ormoni tiroidei (Schull et al., 1988; Bauer et al., 1992; Duncan & Schull, 1994), gli

ormoni sessuali (Morin et al., 1977; Takahashi et al., 1980; Lumineau et al., 1998), la leptina (Prosser & Bergeron, 2003) e il corticosterone (Sage et al., 2004). Tra i neurotrasmettitori, invece, è possibile ricordare l'acetilcolina (Mijer et al., 1988; Liu & Gillette, 1996) la norepinefrina (Cagampang et al., 1994), la sostanza P (Kim et al., 2001), l'istamina (Cote & Harrington, 1993; Meyer et al., 1998) e l'adenosina (Elliot et al., 2001, Antle et al., 2001).

Una volta elaborate le informazioni trasmesse tramite le vie afferenti, il sistema circadiano invia le risposte agli organi effettori (soprattutto ghiandole, muscoli, cervello) tramite le **vie efferenti**. Queste ultime, come per gli altri sistemi dell'organismo, sono rappresentate da tratti nervosi centrali e periferici e, in minor parte, da sostanze diffuse localmente. Uno studio particolarmente accurato di tali vie è stato condotto sui ratti (Leak et al., 1999; Leak & Moore, 2001) consentendo di affermare come i nuclei sovrasiasmatici proiettino principalmente a livello di talamo, ipotalamo e area settale. In particolare, la porzione dorsomediale proietta in maniera ampia a livello di diverse aree quali nucleo ipotalamico dorsomediale e paraventricolare, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, area preottica e zona mediale sottoparaventricolare. La porzione ventrolaterale dei nuclei sovrasiasmatici, invece, proietta

principalmente a livello delle aree ipotalamiche vicine, soprattutto della zona laterale sottoparaventricolare. Si è inoltre reso evidente come i nuclei sovrachiasmatici proiettino al livello del paraventricolare dell'ipotalamo tramite vie diverse per la branca simpatica e per quella parasimpatica (Buijs et al., 2003). Diverse ricerche hanno indagato le vie efferenti relative alle aree coinvolte nel controllo del ritmo sonno/veglia, in particolare nucleo del *locus coeruleus* e area preottica ventrolaterale. Non sono state evidenziate proiezioni dirette dei nuclei sovrachiasmatici a livello dell'area preottica ventrolaterale (Novak & Nunez, 2000). Tuttavia esiste comunque un legame tra queste due porzioni encefaliche grazie al nucleo ipotalamico dorsomediale che riceve le efferenze dai nuclei sovrachiasmatici e, a loro volta, proiettano a livello dell'area preottica (Deurveilher et al., 2002, Chou et al., 2003). Un rapporto simile è riscontrabile anche con il nucleo del *locus coeruleus* (Aston-Jones et al., 2001). Studi funzionali hanno, inoltre, confermato la comunicazione tra nuclei sovrachiasmatici ed epifisi tramite il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (Perreau -Lenz et al., 2003; Kalsbeek et al., 2000) e messo in luce la correlazione esistente nel funzionamento della porzione dorsomediale e di quella ventrolaterale dei nuclei sovrachiasmatici (Noguchi et al., 2004) lasciando ipotizzare

la presenza di una modulazione da parte della seconda sull'attività della prima. Per quanto concerne, invece, le vie efferenti coinvolte nella regolazione del ritmo della temperatura corporea, le conoscenze sono alquanto lacunose. Si ritiene che l'area preottica sia un centro di controllo per la termoregolazione (Lipton, 1968; Satinoff & Rutstein, 1970; Toth, 1973; Hagan & Heath, 1980), tuttavia la conservazione di risposte termoregolatorie di tipo comportamentale in soggetti con lesioni al livello di tale area (Van Zoeren & Stricker, 1977; Szymusiak et al., 1985) suggerisce la presenza di ulteriori centri di controllo (Refinetti & Carlisle, 1986).

Regolazione molecolare

Le basi molecolari dell'orologio circadiano sono rappresentate, come già accennato, da particolari geni, i *clock genes*, i quali esprimono specifiche proteine. Tutto il sistema è basato prevalentemente su loop di feedback trascrizione-traduzione (*transcription-translation feedback loops*, TTFL) in cui le proteine dai geni clock influiscono direttamente o indirettamente sulla frequenza di espressione dei geni che le codificano. Questa organizzazione, che porta ad una oscillazione di circa 24 ore nell'espressione dei suddetti

geni, è comune a tutti i sistemi circadiani rappresentando un indubbio vantaggio adattativo (Young & Kay, 2001).

L'importanza relativa dei vari componenti dell'orologio circadiano è stata via via messa in luce grazie all'utilizzo di modelli sperimentali con geni *knockout* e di animali mutanti in maniera naturale come il già citato criceto Tau. Sebbene le proteine codificate da tali geni non siano esattamente le stesse tra i vari organismi, la loro organizzazione a livello di TTFL e le loro funzioni sono sovrapponibili. Nei mammiferi, in particolare, troviamo due principali circuiti di espressione: la fig. 4 mostra i loop a feedback dei dimeri *Clock/Bmal* e *Cry/Per*.

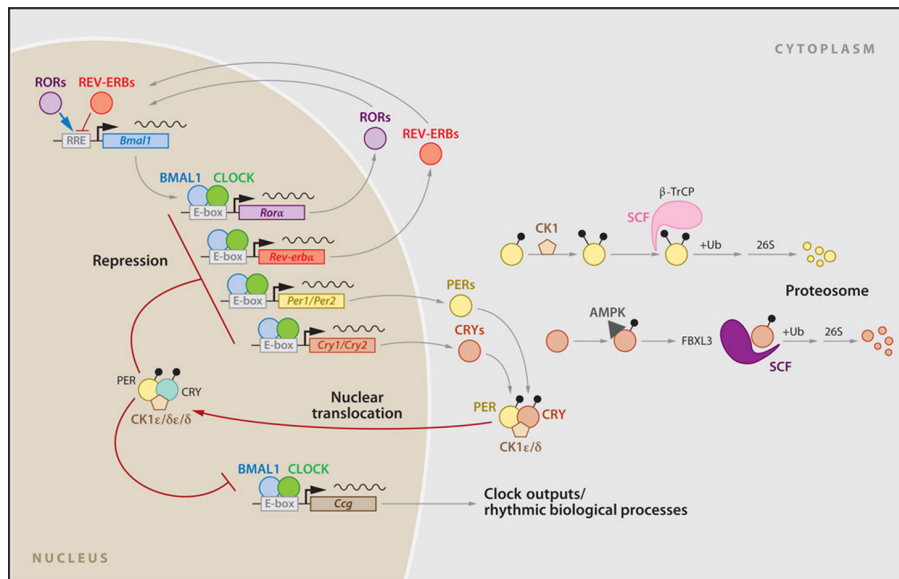


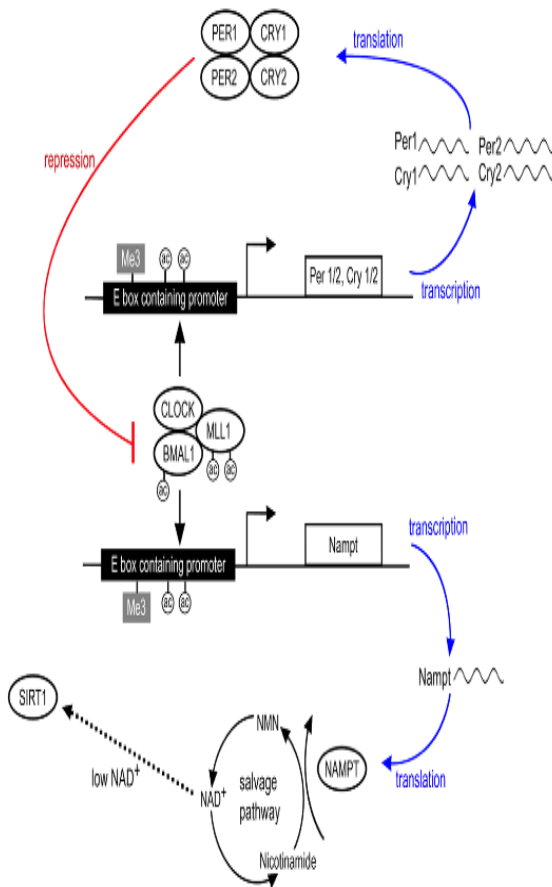
Figura 4: Feedback loop positivo e negativo dei dimeri *Clock/Bmal* e *Cry/Per* (Mohawk et al., 2012)

Nel primo loop, l'eterodimerizzazione a livello citoplasmatico di due proteine elica-ansa-elica (helix-loopo-helix, HLH), **CLOCK** (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput o l'equivalente NPAS nei tessuti neuronali) e **BMAL1** (Brain and Muscle Arnt-Like protein 1) permette la loro penetrazione nel nucleo e il legame con le sequenze promotrici E-box consentendo così l'espressione delle proteine **PER1** e **PER2** (Period1 e Period2) e **CRY1** e **CRY2** (Cryptochrome1 e Cryptochrome2) grazie all'attivazione ritmica dei rispettivi geni. La repressione di tale meccanismo con conseguente chiusura del loop avviene quando l'accumulo di proteine PER e CRY nel citoplasma porta alla formazione di complessi che tornano nuovamente nel nucleo

ad inibire la transattivazione di CLOCK:BMAL1. A questo primo loop si associa un secondo circuito per l'espressione genica di *Bmall*, in quanto, mentre l'espressione di *Clock* è costitutiva, vale a dire che (nei mammiferi) non è ciclica, quella di *Per*, *Cry* e *Bmall* è ciclica. CLOCK:BMAL, infatti promuove la trascrizione di **REV-ERB** (α , β and γ orphan nuclear receptor) e **ROR** (α and β), proteine appartenenti alla famiglia dei recettori nucleari orfani collegati all'acido retinoico. REV-ERB e ROR quindi entrano a far parte integrante del loop come importanti elementi di regolazione. Nello specifico si legano agli elementi di risposta dei recettori orfani collegati all'acido retinoico (*retinoic acid-related orphan receptor response elements*, ROREs) o con i promotori BMAL consentendo, rispettivamente, la repressione o l'avvio della trascrizione dei geni *Bmal* (Guillaumond et al., 2005).

Il meccanismo generale risulta molto complesso e ha importanti ripercussioni a livello del metabolismo cellulare. Infatti, CLOCK e BMAL1 attivano l'espressione ritmica di numerosi geni presenti all'interno della cellula, dettando così la ritmicità di numerose funzioni fisiologiche ed elementi cellulari, come, ad esempio, la ritmicità dell'enzima NAD (fig. 5 a, b).

A: Meccanismo di feedback loop centrale e successiva risposta causato dal dimero CLOCK/Bmal



B: Influenza del feedback loop centrale sul metabolismo cellulare

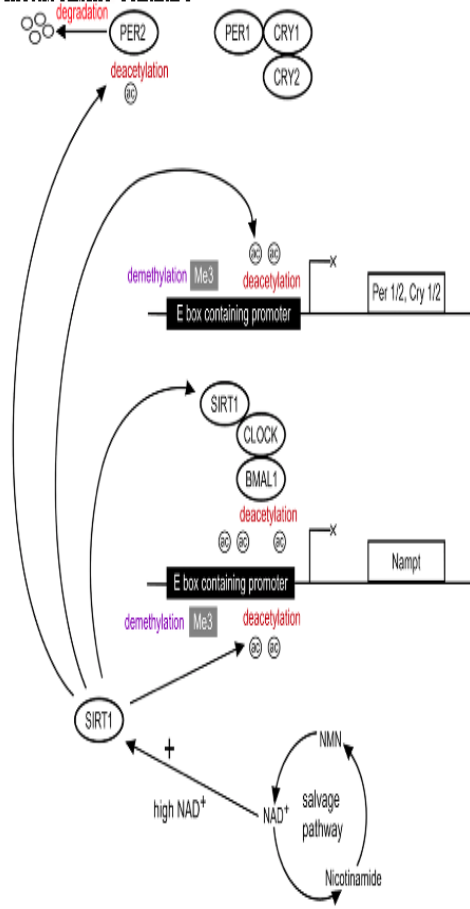


Figura 5: Interazione del feedback loop CLOCK/Bmal (A) con il metabolismo cellulare (B) (Beal et al., 2016)

Tale meccanismo, inoltre, presenta numerose modificazioni periferiche e un alto livello di ridondanza. Esperienze condotte su topi Clock knockout, in particolare, hanno mostrato una significativa assenza di conseguenze della mutazione sul meccanismo generale di espressione genetica o sul comportamento ritmico (Debruyne et al., 2006). È inoltre stato dimostrato come, nei mammiferi, CLOCK e NPAS2 abbiano ruoli sovrapponibili a livello dell'orologio centrale

(Debruyne et al., 2007a) e che pertanto la mancata espressione del singolo gene, in questo caso *Clock*, non abbia dei grossi effetti sebbene questo effetto di compensazione da parte di NPAS2 sia specifico a seconda del tessuto interessato (Debruyne et al., 2007b).

La duplicazione genetica dei meccanismi clock, presente in numerosi organismi, è particolarmente pronunciata nelle specie ittiche (Wang 2008 a, b; 2009).

A parte il meccanismo TTFL, classicamente considerato il cuore dell'orologio circadiano, è necessario ricordare l'importanza della regolazione post-traduzione. Si pensa che le modifiche post-traduzione siano regolate dalla classe proteica delle protein chinasi, in particolare dalla casein chinasi epsilon (CK1 ϵ) delta (CK1 δ) (Lowry et al., 2000, Akashi et al., 2002). Il più volte citato criceto Tau, ad esempio, presenta una specifica mutazione proprio a livello della post-traduzione della CK1 ϵ , necessaria alla fosforilazione di PER (Ralph & Menaker 1988; Lowrey et al., 2000; Meng et al., 2008). Tale proteina è fondamentale anche nel sistema circadiano dello zebrafish (Smadja Storz et al., 2013). Mutazioni a livello di tale proteina portano ad alterazioni anche negli esseri umani (Xu et al., 2005) e in *Drosophila* (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998).

Studi preliminari, inoltre, suggeriscono l'importanza di proteine correlate all'ubiquitina e legate a modificazioni di BMAL1 nell'organizzazione del sistema temporale circadiano (Cardone et al., 2005).

I vari meccanismi post-traduzione, tra cui acetilazione, glicosilazione, metilazione, sono necessari alla regolazione dei meccanismi di turnover delle proteine coinvolte nel ciclo circadiano (Meng et al., 2008), nonché per la loro attività trascrizionale (Kaasik et al., 2013) e localizzazione intracellulare (Lee et al., 2008).

In conclusione, tali meccanismi giocano un ruolo fondamentale per il corretto funzionamento dell'orologio circadiano (Mehra et al., 2009) dimostrando come quest'ultimo e la fisiologia cellulare non possano procedere isolatamente l'uno dall'altra e presentino invece strettissime correlazioni (Reddy & Rey, 2014). A questo proposito, un esempio di tale relazione crociata può essere fornito dalla biosintesi del NAD dove l'orologio influisce sul metabolismo e viceversa (Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009).

L'orologio circadiano nei mammiferi

Come in precedenza affermato, si ritiene che nei mammiferi, in quasi ogni cellula, sia presente un orologio molecolare autonomo che si autoregola. Le uniche eccezioni note sono rappresentate dal timo e dal testicolo. In questi due organi, infatti, l'espressione dei geni clock presenta un ritmo ultradiano di 12 ore (Alvarez et al., 2005). Queste osservazioni lasciano ipotizzare che gli orologi circadiani periferici non siano pienamente funzionanti nei tessuti immaturi o con un alto tasso di cellule non differenziate (Stratmann & Schibler, 2006).

Si ritiene che il contributo di ogni singola componente molecolare sia specifico per ogni tessuto, ipotesi che trova supporto nel diverso pattern di espressione dell'mRNA di CLOCK nei vari tessuti. In particolare, tale espressione risulta oscillante nei tessuti periferici, mentre, come già accennato, risulta costitutiva a livello dei nuclei sovrachiasmatici (Lowry et al., 2004). Una simile diversità di pattern di espressione a seconda del distretto tissutale interessato si è potuta notare anche in REVERB α , β and γ (Sato et al., 2004; Akashi et al., 2005) e ROR α . Quest'ultimo, in particolare, ha mostrato notevoli oscillazioni a livello centrale ed espressione ritmica a livello

periferico mentre ROR γ non ha mostrato espressione a livello centrale (Guillamound et al., 2005).

È comunque universalmente accettata la diversità di ruoli regolatori svolti da parte dei geni clock a seconda del tipo di tessuto interessato. Ciò giustificherebbe anche la varietà di fenotipi che possono originare da una loro mutazione come, ad esempio, in topi knockout per *Bmal1* che mostrano svariate alterazioni quali: perdita della ritmicità circadiana, infertilità, dimagrimento e artropatia progressiva (Rudic et al., 2004; Bunker et al., 2005; Shimba et al., 2005). D'altra parte, si è pure potuto osservare come i geni clock donino un contributo differente alle attività di regolazione a seconda dei tessuti in cui vengono espressi. Ad esempio, la ritmicità di *Per1* a livello epatico viene mantenuta anche in assenza di *Clock*, mentre risulta perduta a livello centrale (Debruyne et al., 2006).

La piena comprensione dei geni clock, pertanto, è possibile solamente tenendo in considerazione anche il loro comportamento in riferimento ai vari tessuti.

1.2 Ruolo della melatonina nell'orologio circadiano

Generalità

La **melatonina** (N-acetil-5-metossitriptamina) è una sostanza ad azione ormonale prodotta principalmente a livello del sistema nervoso centrale, in particolare dai pinealociti dell'**epifisi** (Reiter, 1993) e in minor quantità in distretti corporei periferici quali, ad esempio, tratto intestinale (Bubenik et al., 2002), retina (Zawliska et al., 1991), testicolo (Tijmes et al., 1996), linfociti e cellule cutanee (Carillo-Vico et al., 2004).

La sintesi e la regolazione dei livelli della melatonina hanno un andamento circadiano e in tutte le specie in cui è presente, essa viene prodotta durante la fase buia della giornata (Reiter, 1991). La sua produzione avviene a partire da un amminoacido, il **triptofano**, tramite l'azione dell'enzima arilalkilamina N-acetil transferasi (AA-NAT) del quale sono state individuate diverse isoforme nelle varie specie e la cui attività viene regolata dai neuroni dei nuclei sovrachiasmatici.

L'emivita della melatonina è compresa tra 20 minuti e un'ora e il suo metabolismo prevede principalmente un'idrossilazione, necessaria affinché possa essere escreta (Yu et al., 2004), e una serie

di meccanismi secondari che vedono entrare in gioco enzimi della famiglia dei citocromi posti a livello epatico come CYP1A (Yaleswaram et al., 1999) e CYP1A2 (Skene et al., 2001) ed extra epatico come CYP1B1 (Ma et al., 2005).

La melatonina svolge le proprie funzioni grazie alla presenza di specifici recettori noti come MT1 e MT2, recettori di membrana accoppiati alla proteina G (Dubocovich et al., 2003) e MT3.

La melatonina e la regolazione del sistema circadiano

Da tempo è nota la capacità della melatonina di influire sui ritmi circadiani rappresentando una molecola fondamentale nella regolazione di questi ultimi (Elbaz et al., 2013). I due cicli più noti, a questo proposito, sono quello che si riferisce al ciclo sonno/veglia e quello che regola le fluttuazioni della temperatura corporea. L'andamento dei due cicli, infatti, presenta strette correlazioni e si è visto come essi siano inversamente proporzionali. In particolare, la melatonina ha dimostrato di avere capacità ipotermizzanti (Cagnacci et al., 1992) lasciando ipotizzare la possibilità di gravi ripercussioni sul ciclo della temperatura qualora si dovessero determinare delle alterazioni nei suoi livelli e, viceversa, come la manipolazione di questi ultimi possa avere un'importante applicazione clinica nella

risincronizzazione della temperatura corporea in caso di desincronizzazione.

Nonostante l'importanza della melanina nella regolazione del sonno sia ampiamente riconosciuta, il suo esatto ruolo a questo livello continua ad essere controverso (Fisher et al., 2013). Infatti, sebbene diversi studi ne abbiano mostrato le capacità di promuovere il sonno in primati non umani (Zhdanova et al., 2002) e gatti domestici (Goldstein & Pavel, 1981), altri non sono riusciti a confermare tale dato (Buscemi et al., 2006; Van den Heuvel et al., 2005).

Come più volte affermato, la melatonina può influire a vario livello nella regolazione dell'orologio circadiano (Lockley et al., 2000; Sack et al., 2000) e diverse ipotesi sono state avanzate su come essa agisca su quest'ultimo per indurre il sonno (Arendt, 2003; Scheer & Czeisler, 2005). Il suo ruolo riguardo al fisiologico ritmo sonno/veglia e alle sue alterazioni è stato inoltre studiato anche ai fini di poter offrire una terapia adiuvante in caso di modificazioni acute di tale ritmo quali quelle conseguenti ai fenomeni di jet lag (Dawson et al., 2007).

Tutti questi elementi permettono di riconoscere nella melatonina un messaggero che agisce sull'orologio circadiano

sincronizzando le varie popolazioni cellulari con le risposte provenienti dai nuclei sovrachiasmatici (Reiter et al., 1991).

1.3 Approccio all'analisi statistica cronobiologica

L'approccio statistico matematico all'analisi dei ritmi biologici si discosta in modo sostanziale dalla biostatistica classica in quanto c'è il bisogno di introdurre una variabile obbligata di quarta dimensione: il "Tempo (T)". L'introduzione di tale variabile permette la misura quali quantitativa del dinamismo della materia vivente. La variabile tempo considerato in cronobiologia, però, non rappresenta la classica variabile fisica dello scorrere progressivo ed irreversibile di una unità di misura, ma, similamente al concetto di armonica matematica, una variabile la cui durata si azzera in maniera ripetitiva e più o meno costante, cioè torna allo zero iniziale andando a costituire uno o più gruppi di cicli. L'analisi cronobiologica viene effettuata a partire da serie di dati temporali: "cronogrammi" e si articola su alcune procedure analitiche che prevedono il tempo come variabile indipendente sistematica, ciò implica che il dato campionato deve essere trattato con il corrispettivo dato temporale dando origine così origine a una statistica di serie temporali su vettori bivariati o analisi cronobiostatistica. Come per le normali procedure statistiche anche

nell'analisi dei ritmi biologici possiamo distinguere un'analisi di tipo descrittivo e un'analisi del trend.

Analisi cronobiologica descrittiva

Questo tipo di analisi si basa su due metodi statistici distinti: Analisi nel dominio del tempo e analisi nel dominio delle frequenze. Entrambe si compongono di più metodiche ma le più utilizzate sono: per l'analisi nel dominio del tempo: la macroscopica cumulativa di una o più serie di cronogrammi e la macroscopica trasversale di una o più serie di cronogrammi, per l'analisi nel dominio delle frequenze: Analisi del cosinor, analisi del Single-Cosinor e l'analisi spettrale bivariata.

Analisi cronobiologica macroscopica

Questo tipo di approccio statistico prevede un primo approccio secondo una normale statistica descrittiva da qui il termine macroscopico della metodica. In un secondo momento i dati del cronogramma devono essere "detemporalizzati" (vale a dire che non deve venire più considerato il loro legame nel tempo) e quindi cumulati per ottenere le stime della localizzazione centrale e dispersione e la stima della dispersione e distribuzione (fig. 6).

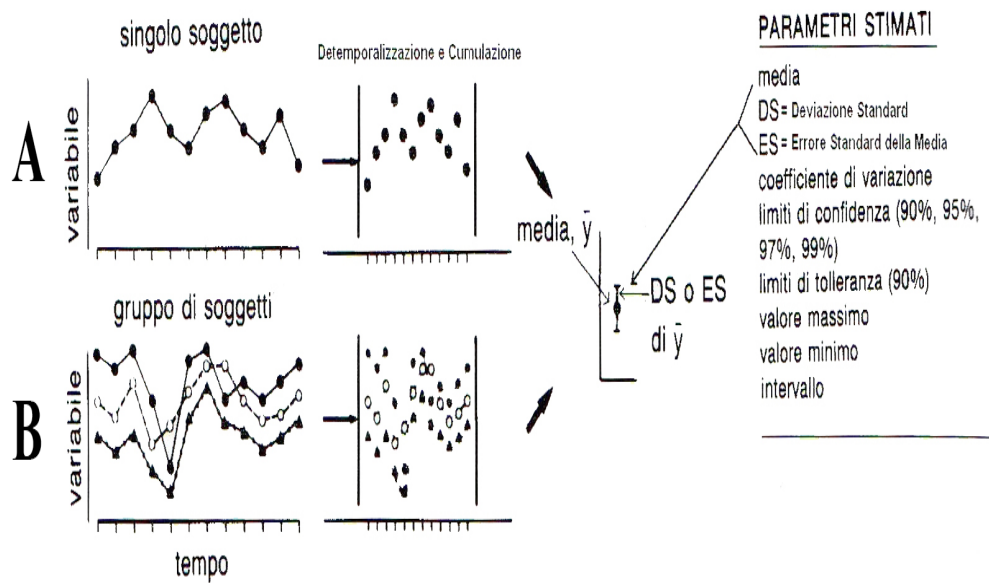


Figura 6: Analisi macroscopica di un cronogramma (A) e di più serie temporali (B) con successiva detemporalizzazione e cumulazione dei dati. (Cugini, 2006)

Analisi cronobiologica macroscopica trasversale

Questo tipo di analisi differisce dalla precedente poiché la serie di dati non viene detemporalizzata ed effettua, quindi, delle valutazioni descrittive a ciascun tempo di campionamento in modo “verticale” vale a dire sulle colonne dei dati delle singole serie (approccio trasversale). La modalità di approccio statistico permette di valutare tramite analisi descrittiva per ogni tempo di campionamento le varie serie temporali ottenendo, in questo modo, stime di localizzazione centrale (medie) e dispersione (deviazione standard) nonché le stime di distribuzioni trasversali (fig. 7). Quest’approccio

risulta particolarmente utile quando da una o più serie temporali si vuole ottenere il **cronogramma medio**.

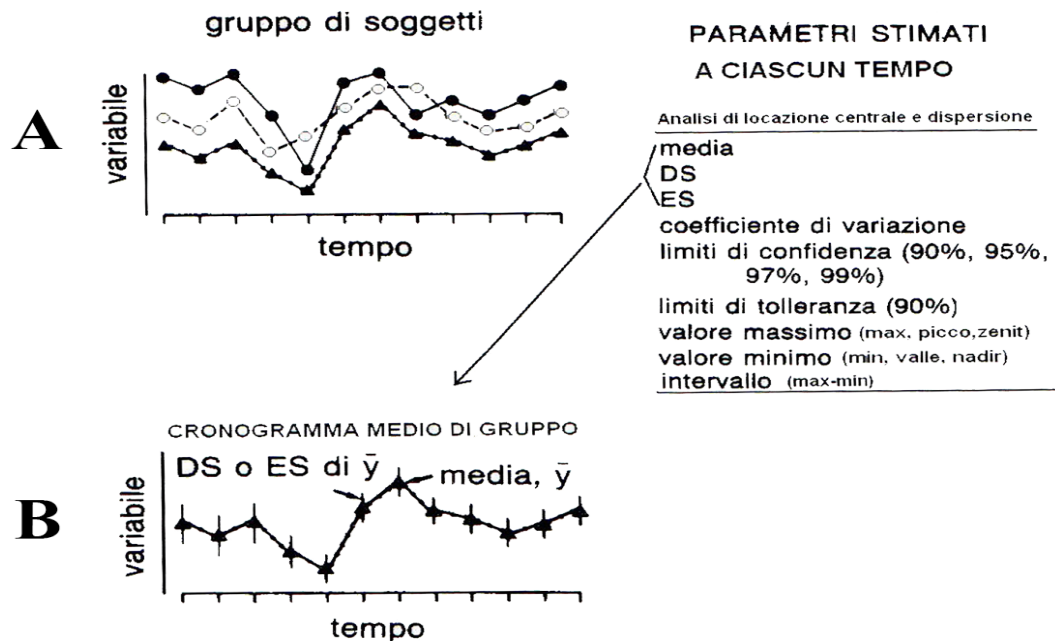


Figura 7: Analisi macroscopica trasversale di un più cronogrammi campionati in un dato periodo. (Cugini, 2006)

Analisi cronobiologica microscopica o metodo del Cosinor

Questo tipo di analisi consiste in una analisi di regressione periodica a periodo noto che consente di valutare l'effettiva presenza di un movimento armonico oscillante quindi di un ritmo avente un determinato periodo e definirne le proprietà attraverso l'utilizzo del *metodo dei minimi quadrati (LSH o least squares method)*. La funzione matematica su cui si basa il metodo è definita:

$$[1] Y_{(t)} = M + A \cos\left(\frac{2\pi}{\tau} t + \Phi\right)$$

Dove M rappresenta il mesor, A l'ampiezza ed infine Φ l'acrofase

la [1] può essere riscritta sostituendo al termine $\frac{2\pi}{\tau}$ il termine ω che rappresenta la frequenza angolare espressa in cicli/periodo ottenendo:

$$[2] Y_{(t)} = M + A \cos(\omega t + \Phi)$$

Attraverso il metodo del *Cosinor* è possibile verificare l'effettiva significatività statistica dell'oscillazione della curva senoide approssimate. Tale significatività viene calcolata attraverso la *F di Fisher*, cioè il rapporto tra la varianza espressa dalla regressione periodica e la varianza dei dati grezzi. Tale rapporto risulterà significativo se la *F* avrà un valore di $P \leq 0.05$ sulla "Tavola della F di Fisher. Quindi in ultima analisi la P rappresenta il livello statistico di rilevamento del ritmo. Con il metodo del *Cosinor* (fig. 8) è possibile, in oltre, quantificare i parametri fondamentali dell'oscillazione ottimale (parametri ritmometrici) rappresentati da: livello medio o mesor (M), entità dell'oscillazione positiva del mesor o ampiezza (A) ed il tempo in cui avviene la massima oscillazione o acrofase (Φ)

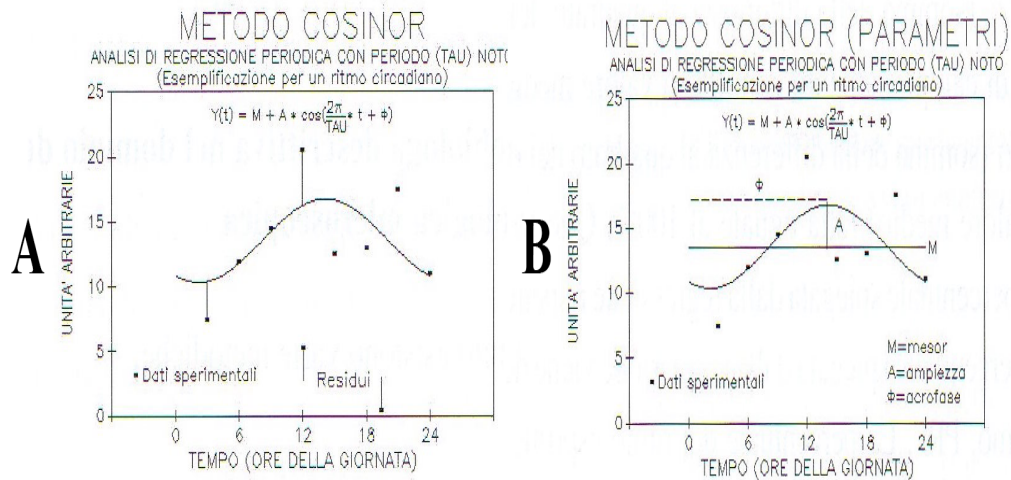


Figura 8: Metodo del *Cosinor* (A), valutazione dei parametri ritmometrici del metodo del *Cosinor* (B). (Cugini, 2006)

L'analisi del *Cosinor* può essere applicata ad una singola serie temporale, nel qual caso prende il nome di analisi del *Single-Cosinor* o a più serie temporali prendendo il nome di analisi cronobiologica microscopica di più serie temporali che si distingue in: Analisi *Population Mean-Cosinor* e Analisi *Single Group-Cosinor*.

Analisi del Single-Cosinor

Questa tipologia di approccio statistico si applica ad una singola serie temporale di un singolo soggetto e permette l'estrapolazione della “curva sinusoidale ottimale o armonica fondamentale o best fitting curve” dalla quale è possibile ricavare i parametri ritmometrici fondamentali. Per ottenere l'armonica fondamentale l'analisi si basa sul “metodo dei minimi quadrati” che consiste nel minimizzare la

somma dei residui elevati al quadrato, rendendoli in questo modo tutti positivi, ed eseguire una somma aritmetica degli stessi. Da un punto di vista statistico minimizzare i residui fa sì che la curva armonica calcolata si accosti quanto più possibile all'armonica sperimentalmente determinata.

La motivazione matematica alla base della determinazione della armonica ottimale si basa sulla facilità di calcolo della varianza su quest'ultima rispetto ai dati grezzi, e quindi, il potere spiegare la stessa varianza dalla regressione rispetto alla varianza totale. La varianza spiegata rispetto alla regressione espressa in percentuale viene definita come "Percentuale del ritmo (PR)" ed esprime la bontà dell'ampiezza oscillatoria approssimata, tanto più si avvicina al 100% tanto più l'oscillazione raggiunge la massima ampiezza. Va precisato che i cronogrammi vanno trattati preliminarmente per individuare la presenza di eventuali dati anomali o "outlier" che potrebbero dare origine al "rumore biologico" che statisticamente può essere definito come "errore di tipo I o α " (fig. 9) La presenza, quindi, di outlier e la loro mancata eliminazione in corso di rielaborazione statistica comporta stime errate del ritmo già a partire dall'analisi macroscopica.

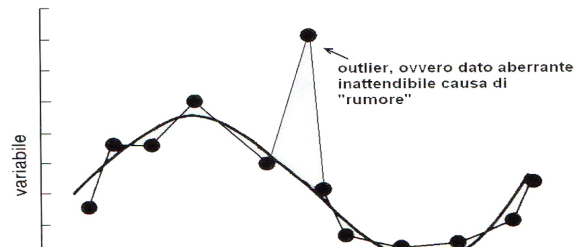


Figura 9: Esempio grafico di dato aberrante (outlier) che conferisce “rumore” cioè valori errati che eccedono la terza deviazione standard. (Cugini, 2006)



Il metodo del *Single-Cosinor* (fig. 10) permette di quantificare i vari parametri del ritmo, cioè: Mesor, Ampiezza e Acrofase.

Mesor e ampiezza vengono misurati nelle unità che identifica la stessa variabile \pm errore standard (ES), mentre l’acrofase viene misurata in gradi sessagesimali ($^{\circ}$) negativi, uguagliando la durata del periodo approssimato \pm ES. Tramite semplice formule inverse è possibile, in oltre, calcolare Acrometro (mesor + ampiezza), Batimetro (mesor - ampiezza) e la Batifase (tempo corrispondente al minimo dell’oscillazione, che si assesta a 180° in più rispetto all’acrofase).

La rappresentazione grafica che si ottiene utilizzando questa metodica è un diagramma cartesiano piano in coordinate rettangolari contro il tempo. Riportato sull’asse delle x . I dati di ampiezza ed

acrofase sono riportati in un diagramma polare che prende il nome di “polargramma”, l’intera circonferenza rappresenta il periodo del ritmo preso in esame con il punto zero corrispondente alla mezzanotte (per i ritmi circadiani), al lunedì (per i ritmi circasettani), al primo giorno del mese (per i ritmi circatigintani) e dal primo giorno del mese al 22 dicembre (nel nostro emisfero, altrimenti al 22 giugno, per i ritmi circannuali).

Analisi microscopica di più serie di dati

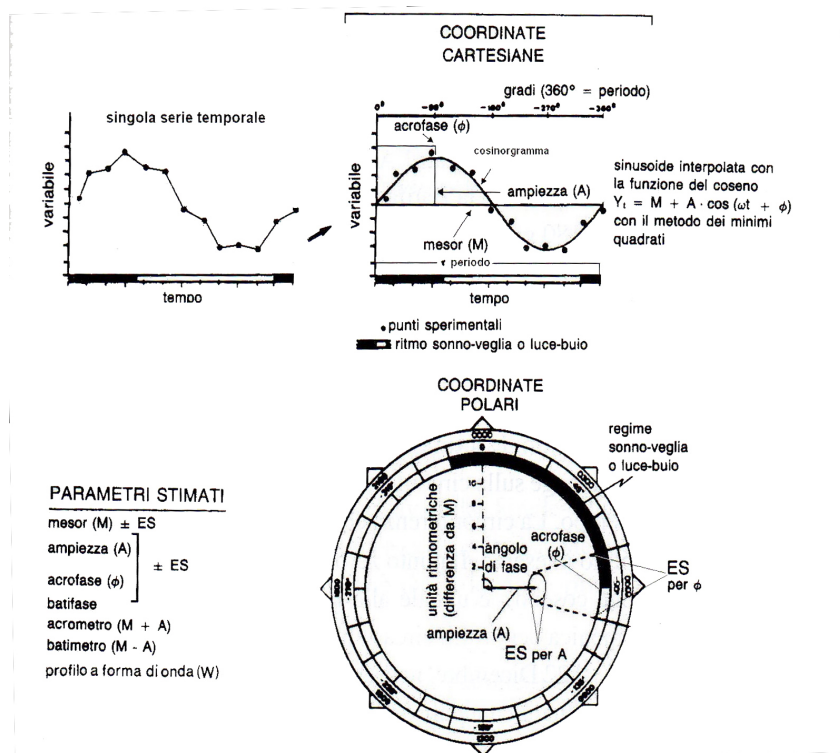


Figura 10: Esempio grafico del metodo del *Single-Cosinor*. La funzione coseno viene adattata in modo tale che venga minimizzata la varianza ossia risulta minima la somma dei residui elevata al quadrato. (Cugini, 2006)

Tale tipo di analisi si divide in due procedure distinte:

Population-Mean Cosinor e *Single Group-Cosinor* (fig. 11, 12).

La prima procedura consiste nel trovare i parametri ritmometrici di un gruppo attraverso la misura della media \pm ES (per il Mesor) o LC95% (per Ampiezza e Acrofase) partendo dai dati ottenuti dal *Single-Cosinor* in almeno tre soggetti di un gruppo.

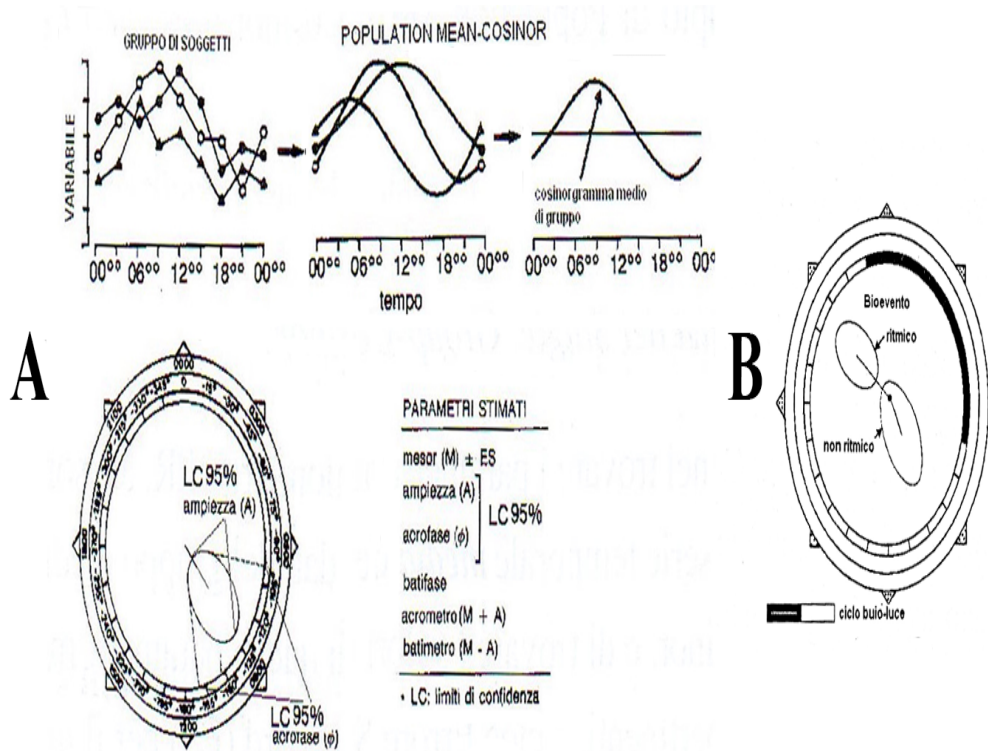


Figura 11: Esempio grafico del metodo del *Population Mean-Cosinor* (A). L'ellisse all'interno del diagramma circolare rappresenta "l'ellisse di confidenza" e risulterà eccentrica al polo se il ritmo risulterà statisticamente significativo o concentrica al polo se il ritmo risulterà non significativo (B). (Cugini, 2006)

Il metodo del *Single Group-Cosinor* (fig. 12) consiste nel trovare i parametri ritmometrici dalla serie temporale *media* dei dati del gruppo mediante l'utilizzo del *Single-Cosinor* e calcolarne i valori medi con i loro limiti di confidenza pertinenti (ES).

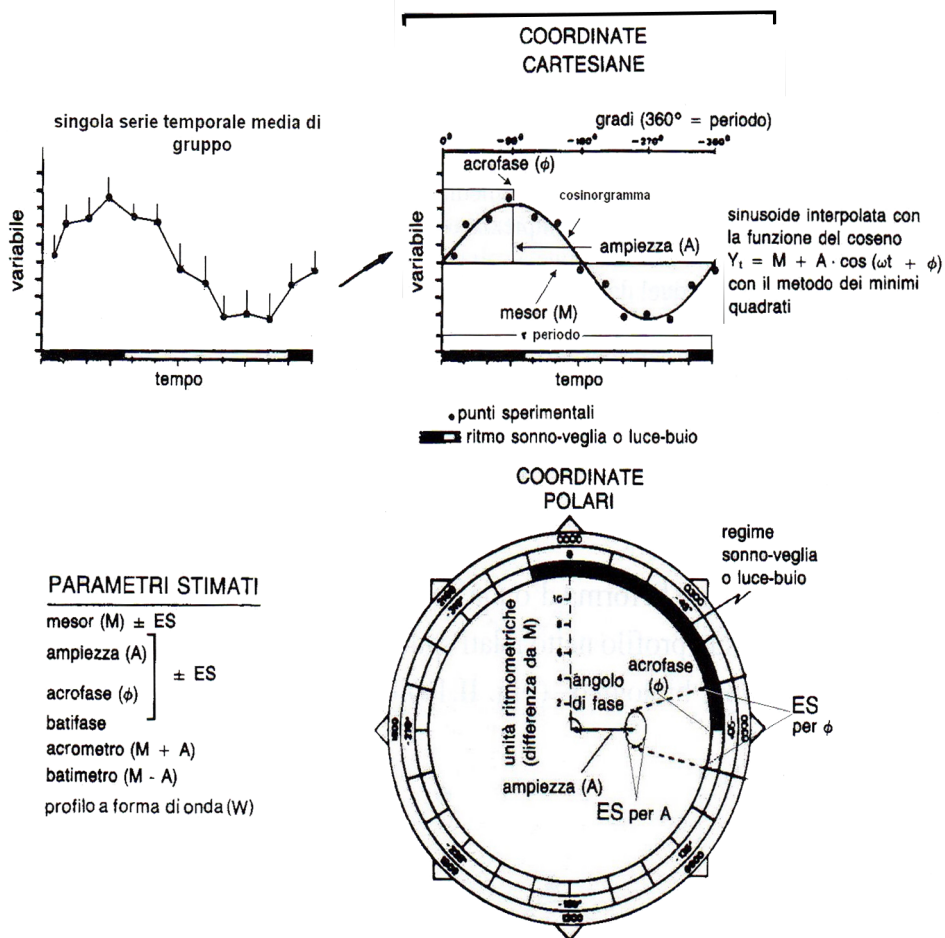


Figura 12: Esempio grafico del metodo del *Single Group-Cosinor*. (Cugini, 2006)

Implicazioni fisiologiche dell'analisi del Cosinor

Alcune delle motivazioni matematiche che consolidano l'utilizzo del metodo del *Cosinor* per l'analisi di cronogrammi sono riportate in tabella 1.

Vantaggi statistici dell'utilizzo del metodo del <i>Cosinor</i>
Analisi numerica non "modello-dipendente"
Eliminazione degli outliers e quindi del rumore biologico
Calcolo dei parametri biometrici mediante componente armonica sistematica
Compattazione delle informazioni a soli tre gradi di libertà (mesor, ampiezza e acrofase)
Relativa indipendenza delle misure dalla densità del campionamento
Relativa indipendenza delle misure dalla equidistanza del campionamento
Statistica comparativa univariata su ciascuno dei tre parametri ritmometrici
Possibilità di applicazione del test di Bingham che fornisce una statistica cumulativa sui tre parametri ritmometrici
Possibilità di applicazione del test di Cugini che fornisce una statistica correlativa tra i tre parametri ritmometrici

Tabella 1: Vantaggi dell'analisi di regressione periodica o metodo del *Cosinor*

In fisiologia l'applicazione del metodo del *Cosinor* dimostra che un fenomeno ritmico, anche non biologico, viene rappresentato da quattro gradi di libertà fondamentali: il periodo (τ) e quindi il suo inverso che è la frequenza ($\frac{1}{\tau}$), il mesor, l'ampiezza e l'angolo di fase. La conoscenza di questi quattro parametri permette di spiegare

importanti attributi fisiologici dei sistemi oscillanti, nello specifico: il periodo e la frequenza chiariscono il concetto che ogni sistema biologico oscillante ricorre in maniera sistematica, ordinata, quantificabile e qualificabile nel tempo, quindi tale sistema viene regolato da una “modulazione di frequenza”. Il mesor segna un livello determinato, caratteristico di ogni cronogramma, intorno a cui avviene l’oscillazione, quindi, riflette una “modulazione tonica”. La dimostrazione che ogni sistema oscillante ha una estensione di fluttuazione intorno al suo livello medio viene fornita dall’ampiezza e riflette una “modulazione di ampiezza”. L’acrofase, infine, dimostra che in ogni ritmo biologico esiste una componente di “timing” dell’oscillazione che riflette una “modulazione fasica”. Questi quattro parametri, valutati nel loro complesso, danno la misura delle regolazioni biofunzionali che avvengono all’interno dell’organismo e sono possibili grazie alla presenza degli **orologi circadiani** che a loro volta vengono regolati a livello biomolecolare da complessi meccanismi genetici che hanno come principali attori i geni clock. La funzione ultima di tutto il sistema di regolazione è adattare i ritmi biologici alle necessità dell’organismo.

1.4 Ritmicità circadiana e agenti patogeni: Cenni

Sebbene l'argomento sia lontano dall'essere sufficientemente indagato, di recente i ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione sulle interconnessioni esistenti tra il funzionamento dell'orologio circadiano e la presenza di agenti patogeni, in particolare batterici e virali, nell'organismo animale.

Da un lato, sempre più spazio viene dato al concetto secondo il quale l'andamento ciclico e i periodici episodi epidemici manifestati da alcune malattie infettive non possano essere spiegati esclusivamente con i cambiamenti climatici, le variazioni di virulenza dei ceppi patogeni e di comportamento dell'ospite (Dowell, 2001) ma che sia necessario tenere in considerazione anche la ritmicità della risposta immunitaria di quest'ultimo. Di recente, infatti, il mondo scientifico ha mostrato rilievi sempre più consistenti in supporto dell'importanza del sistema circadiano, e del suo corretto funzionamento, nella modulazione del sistema immunitario (Early & Curtis, 2016; Man et al., 2016). Ad esempio, è stato osservato come l'attività dei macrofagi posseda una spiccata ritmicità circadiana (Keller et al., 2009) e che il recettore nucleare REV-ERB α medi la regolazione di alcune citochine infiammatorie coinvolte nella risposta

immunitaria (Gibbs et al., 2012). Inoltre, è stata dimostrata la capacità di *Bmall* di regolare la risposta immunitaria innata nei confronti di determinati virus della famiglia *Paramyxoviridae* (Madjumar et al., 2016).

D'altra parte, sempre più ricerche mettono in luce l'effetto delle infezioni sull'alterazione del sistema circadiano e sull'espressione dei geni clock.

Studi condotti su polli hanno mostrato le alterazioni registrate a carico dell'espressione di *Clock* in corso di infezione sperimentale da *Campylobacter jejuni* (Liu et al., 2015) e, in particolare, una spiccata down regulation di essa 20 ore dopo l'inoculo del patogeno.

Per quanto riguarda le malattie ad eziologia virale, studi recentissimi hanno dimostrato che l'infezione da herpes virus e da virus influenzale A risultino potenziate allorquando nell'ospite si verifici una alterazione della ritmicità circadiana in seguito a problemi nella trascrizione di *Bmall* (Edgar et al., 2016). Sempre nella stessa ricerca, inoltre, si porta avanti l'ipotesi che l'orologio interno sia un target per la replicazione virale comune a diverse famiglie di patogeni.

Studi condotti su modelli murini hanno valutato il ruolo della regolazione del sistema circadiano in corso di infezione respiratoria misurando la risposta all'infezione da virus influenzale A in topi *Bmall* knock out e in topi wild type (Sundar et al., 2015). In tale studio è stata messa in luce un aumento degli effetti negativi virali sul primo gruppo. Nei soggetti appartenenti al gruppo *Bmall* knock out, infatti, è stata registrata una diminuzione dei valori di peso corporeo, prima sovrapponibili a quelli del gruppo wild type, a partire da due giorni e fino all'ottavo giorno post infezione. La mortalità, inoltre, al nono giorno post infezione ha raggiunto valori del 100% nel gruppo knock out mentre si è arrestata al 38,5 % nei wild type.

L'effetto delle infezioni virali sul sistema circadiano può, come già accennato per i patogeni di natura batterica, interferire con la normale espressione dei geni clock e si è, inoltre, valutato come virus influenzali possano alterarne fase e ampiezza (Sundar et al., 2015). In particolare, si è registrata una diminuzione dell'espressione ritmica di *Cry2*, *Rev-erb α* e *Ror* a livello del tessuto polmonare e delle alterazioni nell'insorgenza del picco di espressione di *Bmall*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, e *Rev-erbβ* a metà della fase luminosa insieme ad alterazioni di ampiezza dell'espressione genica.

Tutti questi dati supportano l'idea che, non solo i geni clock siano fondamentali per modulare la risposta immunitaria in corso di infezione ma anche che gli agenti infettivi siano direttamente responsabili di disordini del sistema circadiano con alterazioni nell'espressione dei geni che lo regolano.

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di chiarire l'influenza di diversi fattori esogeni ed endogeni sull'organizzazione circadiana in alcune specie di ruminanti domestici e sulle loro basi biomolecolari in modo da poterne valutare il fisiologico andamento e le possibili alterazioni in corso di patologie. In particolare, è stata valutata l'attività dei geni clock fondamentali e l'alterazione della stessa in corso di patologie di tipo batterico e virale nella specie bovina. Inoltre, sono stati valutati e confrontati i livelli plasmatici di melatonina nella pecora e nella capra mantenute in condizioni di fotoperiodo naturale, al fine di poter chiarire l'influenza di una eventuale manipolazione del fotoperiodo sull'andamento ritmico della melatonina.

L'associazione dei tre esperimenti condotti, rispettivamente, nel bovino, nella pecora e nella capra è stata reputata interessante al fine di ottenere una visione complessiva sul funzionamento dei ritmi circadiani e su alcuni dei principali marker ritmici in specie affini ma con caratteristiche peculiari. In particolare, la specie bovina è considerata modello di riferimento per lo studio dell'espressione dei geni clock mentre quella ovi-caprina per la valutazione della

melatonina. Ciò può risultare utile al fine di fornire ulteriori elementi di studio volti all'arricchimento delle attuali conoscenze della cronofisiologia nelle specie domestiche prese in esame.

A tal fine, il disegno sperimentale è stato, pertanto, suddiviso in tre esperimenti distinti:

- **Esperimento 1:** Espressione dei geni clock nel sangue periferico di bovino (*Bos taurus*) e loro disordini dovuti a differenti condizioni sperimentali
- **Esperimento 2:** Analisi del ritmo circadiano della melatonina plasmatica nella capra e confronto con quello della pecora
- **Esperimento 3:** Analisi del picco minimo e massimo del ritmo della melatonina plasmatica nelle pecore.

3 DISEGNI SPERIMENTALI

3.1 Esperimento 1

Materiali e metodi

La prova è stata condotta in Sicilia durante la stagione primaverile (tra marzo e maggio), in diversi allevamenti di bovine di razza Bruna Italiana. Gli animali sono stati sottoposti ad un esame clinico generale, ed inoltre, sono stati selezionati solamente gli animali non gravidi. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a test per rilevare patologie endemiche bovine come: brucellosi, clamidiosi, leptospirosi, febbre Q, neosporidiosi, toxoplasmosi, theileriosi, babesiosi, anaplasmosi, diarrea virale bovina, rinotracheite infettiva bovina, virus respiratorio sinciziale, herpes virus 4 e parainfluenza 3. Dopo i test di screening sono state selezionate quindici ($n=15$) bovine di razza Bruna e successivamente sono stati suddivisi in tre gruppi composti da cinque soggetti per gruppo ($n=5$), secondo i seguenti criteri:

- Primo gruppo ($n=5$) bovini risultati negativi a tutti i test di screening e che non presentavano anamnesi remota di patologie (CT).

- Secondo gruppo ($n=5$) bovini risultati positivi al test per la brucellosi (BR).
- Terzo gruppo ($n=5$) bovini risultati positivi al test per la diarrea virale/malattia delle mucose bovina (BVD-MD).

Per la diagnosi di brucellosi e della diarrea virale/malattia delle mucose si sono effettuati i test ufficiali adottati nell'EU in materia di sanità animale:

- Rosa Bengala test con fissazione del complemento per la ricerca di anticorpi anti *Brucella abortus*. Contestualmente al rosa bengala test è stato effettuato un test di **fluorescenza polarizzata (FPA)** per valutare l'interazione antigene-anticorpo che è servito come controllo
- Per la diagnosi di BVD-MD è stato utilizzato un test **ELISA** indiretto su siero secondo le indicazioni della casa fornitrice dei test (Svanova, Biotech AB)

Tutti i soggetti sono stati mantenuti in condizione di fotoperiodo naturale (alba alle ore 06:30 e tramonto alle ore 19:00). Rilievi termoisgrometrici sono stati costantemente effettuati per tutta la durata dell'indagine e la temperatura ambientale è risultata compresa tra: 16-

21 °C e l'umidità relativa tra il 40 e il 50%. Tutti gli animali venivano alimentati con la seguente razione:

- Fieno composto da triticosecale 40%, orzo 40% e avena 20%
- L'acqua era disponibile *ad libitum*

Campionamento e RT-qPCR

I prelievi di sangue sono stati effettuati tramite l'utilizzo di un catetere venoso centrale posto nella vena giugulare (Terumo 14G ø 2,15 x 64 mm 325 ml/min) e fissato tramite appositi punti di sutura. I prelievi sono stati eseguiti ad intervalli regolari di 4 ore per un periodo di 24 ore totali. Tra un prelievo ed un altro per evitare il rischio di occlusione della cannula venivano effettuati dei lavaggi con soluzione salina 0,9%. Si è preferito non eseguire flush intermittenti con soluzione eparinata per ridurre al minimo le possibili interferenze con le analisi successive e perché il catetere venoso non veniva lasciato in sede per più di 24 ore (Wang et al., 2012). I campioni ematici sono stati raccolti in apposite provette: PAX gene Blood Tube (Qiagen) e conservati ad una temperatura di -80 °C sino alle analisi.

L'RNA totale è stato purificato direttamente dal sangue intero, raccolto sia dai soggetti sani che dai soggetti malati, tramite l'utilizzo di kit specifici e seguendo le indicazioni della casa produttrice (PAX

Gene Blood RNA kit, Quiagen). L'RNA così ottenuto, in accordo con le linee guida della Quiagen, è stato risospeso in 80 µl di tampone di eluizione. La trascrizione inversa è stata effettuata immediatamente tramite l'utilizzo del kit **SuperScript ViloDNA Synthesis Kit** dell'Invitrogen, secondo le seguenti modalità: come primo step si è ottenuto un volume finale di 20 µl di soluzione contenente 3 µl di RNA ed un mix di reagenti composti da **5X Vilo Reaction Mix** (che includevano un numero di esameri random, MgCl₂ e deossinucleoside trifosfato: dNTPs) e da **10X SuperScript Enzyme Mix**. La soluzione così ottenuta è stata portata a 25 °C per 10 minuti ed, in seguito, la trascrizione inversa è stata effettuata mantenendo la soluzione a 42 °C per 1 ora, ottenendo in questo modo il DNA complementare (cDNA) che è stato conservato a -20 °C prima che sia stata effettuata la RT-qPCR. Con l'aiuto del software Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>) sono stati selezionati primer specifici per amplificare i frammenti dei geni clock di *Bos taurus* (*Cry2*: XM_585942, *Per2*: NM_001192317, *Clock*: XM_001254267 e *Bmall*: XM_001251227) che blastassero nelle regioni introniche a monte e a valle di ogni esone del gene, così da poter comprendere nell'analisi di sequenza anche i siti di splicing. I primer sono stati scelti di almeno 18 pb, per assicurare una buona ibridazione, e con un contenuto G-C compreso tra il 30 e l'80 % e

sono state attentamente esaminate, e se possibile evitate, strutture secondarie del template. Si è cercato inoltre di scegliere primer che non fossero complementari fra di loro per impedire un self-annealing. Questa precauzione è estremamente importante all'estremità 3', dove ogni complementarità potrebbe produrre un dimero di primer.

Le sequenze dei primer che sono stati utilizzati nelle reazioni di RT-qPCR sono elencate nella tabella 2.

Sequenza dei nucleotidi e posizione dei primers usati nella RT-qPCR			
<i>Geni</i>	<i>Acc. n°</i>	<i>Direzione</i>	<i>Sequenza (5'→3')</i>
<i>Cry2</i>	XM_585942	F	TTCCTGTGTGGAAGACCTCAGCAA
		R	TCTGCTGCTTCCAGTTTGCCTT
<i>Per2</i>	NM_001192317	F	ACAGAACTGCTCCCGGACTAAGAA
		R	AGGCTTGACACGTTTGGACTTCAG
<i>Clock</i>	XM_003584711	F	TCAAGCCCAGAATGTCTGGAAGCA
		R	TGATCCTTCATCCACACGCTGAGA
<i>Bmall</i>	NM_001191170	F	ATGCAAGGGAAGCTCACAGTCAGA
		R	ACAGCCATCCTCAGCACAGTAAGT
<i>Gapdh</i>	NM_001034034	F	TGTTATATCCTTGCGGAGCTT
		R	AGCACTGCGGGAGAGTAGTAAACT

Tabella 2: Sequenza nucleotidica, Acc n° e direzione dei primer usati nella RT-qPCR

Tutte le reazioni sono state condotte in triplicato secondo la seguente metodica:

Si è adoperato volume finale di 20 μ l, contenenti:

- 2 μ l di cDNA, ottenuto precedentemente
- 1X **Buffer Sybr green** (Fast Sybr green master mix- Applied Biosystem)
- 1 μ M di ciascun primer

Le soluzioni così ottenute sono state processate secondo il seguente profilo termico:

- 95 °C per 10 minuti
- 40 cicli di amplificazione di 30 secondi ciascuno a 95 °C
- 60 °C per 1 minuto

Per ottenere la *curva di fusione* o *melting curve* i cicli sono stati impostati con il seguente schema:

- 95 °C per 15 secondi
- 60 °C per 1 minuto
- 95 °C per 15 secondi

L'efficienza dei primer è stata valutata attraverso la costruzione di curve di standard per ogni singolo gene investigato, in oltre, sono state utilizzate delle curve di dissociazione per confermare la specificità degli ampliconi.

Il livello di espressione genica dei geni clock indagati è stato valutato insieme al ***Gadph***, gene codificante per la famiglia delle proteine *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi* ritenuto gene di riferimento (Robinson et al., 2007). I relativi livelli di ciascun RNA sono stati quantificati con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ o del delta delta CT o metodo del CT comparativo, dove $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ del campione} - \Delta CT \text{ del riferimento}$.

Si è usato questo metodo perché è un modo conveniente per calcolare i livelli di espressione genica relativa tra campioni diversi poiché utilizza direttamente i *cicli soglia* o *threshold cycles* (CTs) generati dal sistema di calcolo della qPCR (Livak & Schmittegen, 2001). Ogni CT usata per il calcolo del delta delta CT è la media risultante da tre ripetizioni della stessa reazione.

Analisi statistica

Il metodo ritmometrico del *Cosinor* è stato utilizzato per valutare l'effettiva ritmicità dei livelli di espressione genica nelle 24 ore.

Per valutare, invece, le variazioni nell'espressione genica dei dati in esame e gli eventuali disordini nel ritmo che le diverse patologie avrebbero potuto causare, i dati ottenuti dalla RT-qPCR, non essendo risultati distribuiti in maniera Gaussiana (test di Kolmogorov-Smirnov $P > 0.05$), sono stati analizzati tramite l'utilizzo di test non parametrici, nello specifico è stato usato il test di Friedman. Dopo aver determinato l'esistenza di differenze tra le medie, è stato eseguito il test di Wilcoxon come *post hoc* in modo da poter determinare differenze di andamento tra i vari geni presi in esame. Sono stati considerati statisticamente significativi solamente i criteri di $P < 0.05$.

Si è usato come software di calcolo **Prism 7.0** (Graph Pad Software, San Diego, CA).

Risultati

Tramite la metodica RT-qPCR è stato possibile ricavare i livelli di mRNA degli elementi **positivi** (*Clock* e *Bmal1*) e **negativi** (*Per2* e

Cry2) dell'orologio molecolare circadiano nel sangue periferico sia nei soggetti sani che in quelli affetti da patologia. L'analisi statistica ritmometrica, nel gruppo non affetto da patologie (CT), ha messo in evidenza la presenza di ritmicità nell'espressione dei geni in esame (*Clock*, *Bmal1*, *Per2* e *Cry2*), in oltre è stato riscontrato il picco massimo di espressione durante la fase di buio, tra le 20:00 e le 24:00 ($P < 0.05$), e il picco minimo di espressione durante la fase di luce ($P < 0.05$) del fotoperiodo in tutti e quattro i geni presi in esame (fig. 13 a,b). I bovini affetti da brucellosi, invece, hanno mostrato una totale perdita della ritmicità dell'mRNA di *Clock*, *Bmal1*, *Per2* e *Cry2* (fig. 13 c,d). Di contro nel gruppo BVD-MD si è verificato uno spostamento del picco positivo di espressione alla fine della notte, e precisamente alle ore 04:00, di *Clock*, *Bmal1* e *Cry2* che, comunque, continuavano a mantenersi ritmici, mentre perdeva ogni ritmicità l'espressione di *Per2* (fig. 13 e, f)

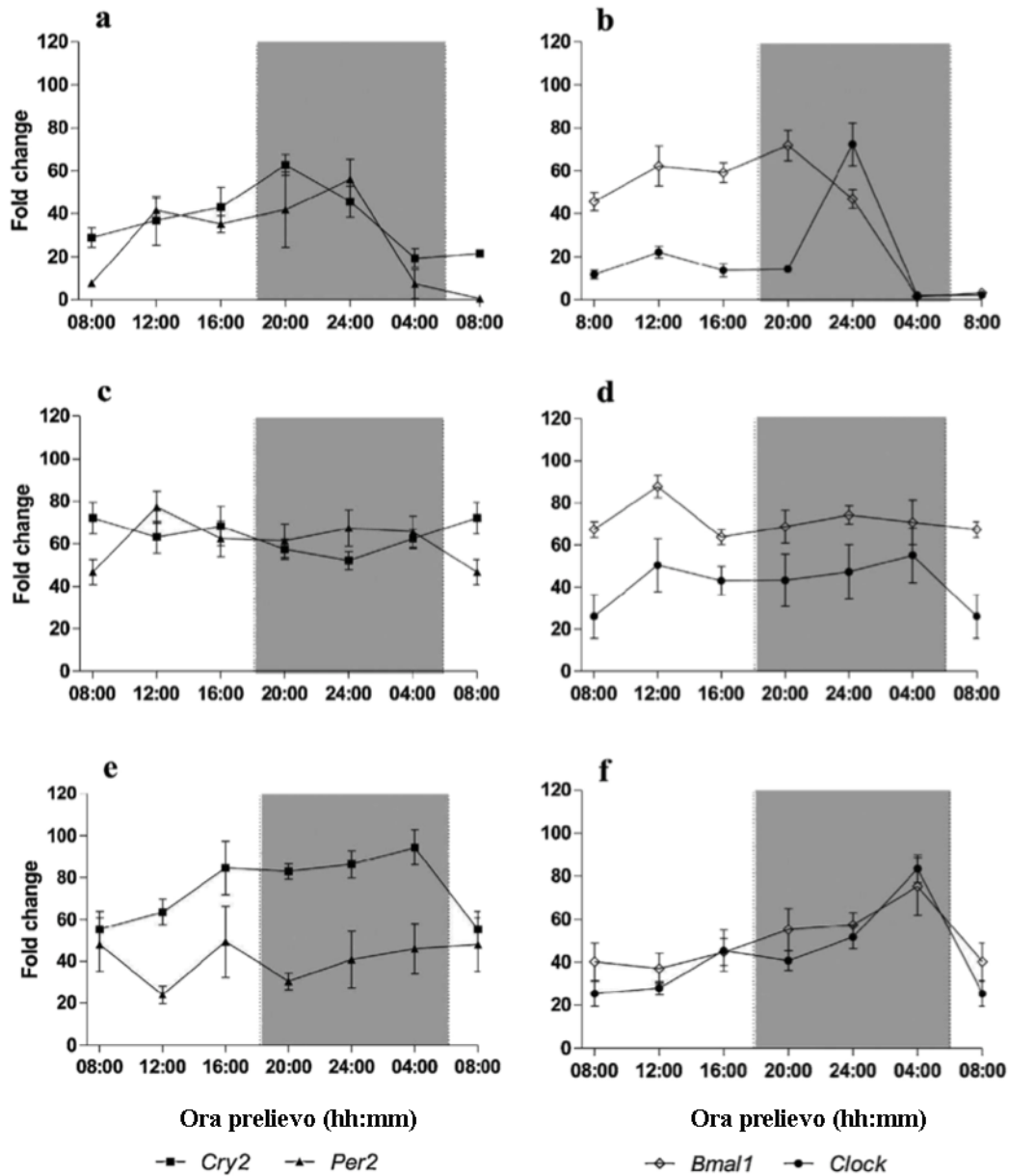


Figura 13: Risultati dell'RT-qPCR per i 4 geni clock studiati nel: gruppo bovini sani (a, b), affetti da *Brucella abortus* (c, d) e affetti da Malattia delle mucose/Diarrea virale bovina (e, f). Le aree grigie rappresentano la scotofase del naturale ritmo luce-buio. Sull'asse dell'ordinate sono riportati i livelli relativi di espressione, sull'asse delle ascisse le ore dei singoli prelievi. I risultati sono come **media** \pm SEM. (Piccione et al., 2014)

3.2 Esperimento 2

Materiali e metodi

Questo esperimento è stato condotto in collaborazione con il dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari. Lo scopo è stato quello di valutare e confrontare i livelli plasmatici di melatonina nella specie caprina e nella specie ovina. Per la prova sono state selezionate cinque pecore e cinque capre di razza Sarda clinicamente sane. Tutti i soggetti sono stati stabulati in box comune e mantenuti in condizioni di fotoperiodo naturale autunnale (alba 07:25 tramonto 19:20). Rilievi termoigrometrici sono stati costantemente effettuati per tutta la durata dell'indagine e la temperatura ambientale è risultata compresa tra: 19°C - 22°C e l'umidità relativa tra il 60% e il 70%.

Tutti gli animali sono stati alimentati con la stessa razione costituita da:

- Fieno di erba medica
- Mix di concentrati contenenti il 23% di avena, il 36% di mais e il 38% di orzo
- L'acqua era disponibile *ad libitum*

Campionamento e analisi della melatonina

I prelievi di sangue sono stati effettuati mediante l'applicazione su ogni soggetto a livello della vena giugulare un catetere venoso centrale (Terumo 18G x 2 ø 1,30 x 51 mm 95 ml/min) tenuto *in situ* tramite appositi punti di sutura (Vicryl, Ethicon, Somerville, New Jersey). I campioni sono stati raccolti ogni 2 ore per 48 ore a partire dalle ore 07:00 del giorno 1 sino alle ore 07:00 del giorno 3. Durante le ore di buio per minimizzare l'interferenza che una fonte luminosa di alta intensità poteva creare, e quindi ridurre al minimo gli errori di campionamento, si è utilizzata come unica fonte luminosa una luce a *dim-red* che emetteva luce inferiore ai 3 lux (< 3 lux, 15 W Safelight lamp filter 1 A, Kodak Spa). Il campione di sangue veniva raccolto in provette eparinizzate (Terumo Corporation, Giappone), centrifugato in campo tramite l'utilizzo di centrifuga da campo (Spectrafuge 6C, Labnet International Inc., New Jersey, USA) a 2500 giri/minuto per 15 minuti. La pervietà dei cateteri è stata assicurata e verificata tramite lavaggi di soluzione salina al 0.9% tra un prelievo e l'altro. Il plasma ottenuto tramite centrifugazione è stato refrigerato ad una temperatura di -20 °C sino al momento delle analisi.

Per la misurazione della melatonina plasmatica si è utilizzata una metodica RIA, o dosaggio radioimmunologico diretto, adattata dalla classica metodica descritta da Fraser et al. nel 1983 e descritta da Carcangiu et al. nel 2005, 2013. Tale metodica prevedeva l'incubazione di 200 µl di campione plasmatico con uno specifico antisiero anti melatonina (antagonista N-acetil-5-metossi triptofano/tireoglobulina bovina Guildhay Antisera Ltd) ad una diluizione finale di 1:6000 e sono state aggiunte tracce di 3 H-melatonina (o-metil-3Hmelatonina, Amersham). La curva standard (Sigma della melatonina) è stata disegnata usando come riferimento il *charcoal-pooled plasma*, che consiste in plasma privato di qualsiasi traccia di melatonina, ricavato da due pecore che sono state mantenute in luce naturale per almeno 4 ore prima che sia stato effettuato il prelievo. Per separare la frazione libera di melatonina da quella legata agli anticorpi si è usata la metodica di estrazione tramite *Dextran-coated charcoal solution*. Questa soluzione permette l'estrazione della parte non legata di melatonina attraverso centrifugazione e precipitazione. Il surnatante è stato analizzato mediante un **contatore a scintillazione**. Le cross-reazioni maggiori degli anticorpi sono state:

- N-acetil triptamina 0.91%

- 6-idrossi melatonina 0.33%
- N-acetil triptofano 0.22%

La sensibilità dell'analisi (90% B1/B0) è stata di 2.5 pg/provetta.

Analisi statistica

Prima di procedere alla rielaborazione dei dati ottenuti tramite la RIA, è stata verificata la normale distribuzione degli stessi tramite l'utilizzo del test di Kolmogorov-Smirnov dal quale è emerso che i dati erano normalmente distribuiti $P < 0.05$.

L'analisi ritmometrica, condotta con il metodo del *Cosinor* (Nelson et al., 1979) è stata effettuata per calcolare tre dei quattro parametri ritmici fondamentali: mesor (livello medio), ampiezza (metà del range dell'oscillazione), acrofase (orario del picco positivo). La robustezza (stazionarietà del ritmo) è stata confutata come quoziente della varianza associata con ritmicità sinusoidale e la varianza totale delle serie temporali (Refinetti, 2004).

Per valutare l'effetto che i singoli tempi di prelievo, i differenti giorni e le specie animali oggetto di studio hanno avuto sui livelli plasmatici di melatonina è stato usato il test dell'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA), sono stati considerati

statisticamente significativi tutti i valori di $P < 0.05$. I dati sono stati analizzati tramite il software statistico **Statistica 7** (StatSoft Inc.).

Risultati

L'analisi ritmometrica ha permesso di evidenziare l'esistenza di un ritmo circadiano a carico dei livelli di melatonina plasmatica sia nel gruppo delle pecore che delle capre. I principali parametri che caratterizzano l'analisi del singolo *Cosinor* riportati in tabella 3.

	Specie	Mesor (pg/ml)	Ampiezza (pg/ml)	Acrofase (hh:mm)	Robustezza (%)
Giorno 1	Pecora	25.32±0.33	6.67±0.97	19:30±35 min	73.28±14.48
	Capra	26.64±0.43	5.63±0.97	19:40±25 min	68.78±19.94
Giorno 2	Pecora	28.58±1.33	7.74±1.36	20:17±45 min	83.60±7.26
	Capra	27.29±1.05	6.52±1.66	20:05±35 min	74.60±13.26

Tabella 3: Valori medi ± deviazione standard (DS) dei parametri ritmometrici espressi nelle loro unità di misura convenzionali.

Inoltre, ai dati ottenuti è stata applicata l'analisi a due vie per misure ripetute ANOVA ha rilevato un effetto statisticamente significativo dei tempi di prelievo in entrambi i giorni di prelievo (giorno 1: $P < 0.0001$ e giorno 2: $P < 0.0001$) ma non ha rilevato alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli di melatonina

plasmatica tra le due specie indagate $P > 0.05$. L'ANOVA applicata ai risultati del *Cosinor* non ha registrato nessuna differenza interspecifica.

3.3 Esperimento 3

Materiali e metodi

Per questa prova sono state selezionate 10 pecore, pluripare di razza Sarda ed in asciutta di quattro anni di età e con un peso corporeo medio pari a 42.3 ± 2.1 Kg. Tutti i soggetti erano clinicamente sani e mantenuti in un box comune, mantenuti sotto fotoperiodo naturale autunnale (alba 07:20 tramonto 17:45). Rilievi termoigrometrici sono stati costantemente effettuati per tutta la durata dell'indagine e la temperatura ambientale è risultata compresa tra: 16°C - 20°C e l'umidità relativa tra il 40% e il 60%.

Tutti gli animali sono stati alimentati con la stessa razione costituita da:

- Fieno di erba medica
- Mix di concentrati contenenti il 23% di avena, il 36% di mais e il 38% di orzo
- L'acqua era disponibile *ad libitum*

Campionamento e analisi della melatonina

I prelievi di sangue sono stati effettuati mediante l'applicazione su ogni soggetto a livello della vena giugulare un catetere venoso centrale (Terumo 18G x 2 ø 1,30 x 51 mm 95 ml/min) tenuto *in situ* tramite appositi punti di sutura il giorno prima l'inizio dello studio. La pervietà del catetere è stata assicurata e verificata tramite lavaggi di soluzione salina al 0.9%. Si è scelto di usare la soluzione salina e non una soluzione eparinata per mantenere pervio il catetere perché il tempo totale di permanenza della cannula non superava le 72 ore e per evitare ogni tipo di interferenza con le analisi successive. I prelievi ematici sono stati effettuati a cadenza regolare di 3 ore per un periodo totale di 48 ore. Per non interferire, e quindi potere avere risultati falsati di melatonina plasmatica, con le ore di buio, i prelievi durante le ore notturne sono stati effettuati con l'ausilio di una luce a *dim-red* che emetteva luce inferiore ai 3 lux (< 3 lux, 15 W Safelight lamp filter 1 A, Kodak Spa). Il protocollo specifico di campionamento prevedeva il primo prelievo alle 00:00 del giorno 1 e l'ultimo alle 00:00 del giorno 3, in oltre dal terzo giorno si sono effettuati prelievi con cadenza di 20 minuti dalle 10:00 alle 13:20 e dalle 20:00 alle 23:20, per essere sicuri di trovarci nell'arco temporale dei picchi

minimo e massimo della melatonina. Il sangue, raccolto in provette eparinate (Vacuette® Blood Collection Tube, Plasma, Na Heparin), è stato centrifugato in campo tramite l'utilizzo di centrifuga da campo (Spectrafuge 6C, Labnet International Inc., New Jersey, USA) a 2500 giri/minuto per 15 minuti. Il plasma ottenuto è stato mantenuto alla temperatura di -25°C sino al momento delle analisi. Per la misurazione della melatonina plasmatica si è utilizzata una metodica RIA, o dosaggio radioimmunologico diretto già descritta nell'esperimento precedente (Carcangiu et al., 2003; 2013).

Analisi statistica

Sui dati ottenuti mediante l'utilizzo del test Kolmogorov-Smirnov è stata valutata la normale distribuzione dei dati, i quali sono risultati normalmente distribuiti con $P < 0.05$.

Come per l'esperimento precedente il calcolo del mesor, ampiezza, acrofase è stato effettuato tramite analisi ritmometrica condotta con il metodo del *Cosinor*.

Inoltre, al fine di valutare l'influenza dell'ora del prelievo sui livelli plasmatici di melatonina ottenuti durante il picco massimo ed il picco minimo è stata applicata l'analisi della varianza ad una via per misure ripetute (ANOVA) con un livello di significatività pari a $2\alpha =$

0.05. Per evidenziare differenze statisticamente significative tra i singoli tempi di prelievo è stato usato come *post hoc* il test di Bonferroni. Il software statistico con cui si sono effettuate le analisi è stato **Statistica 7** (StatSoft Inc.).

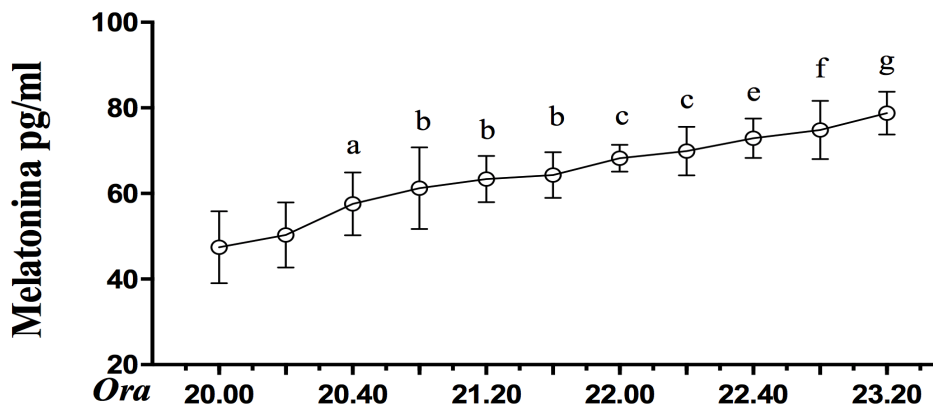
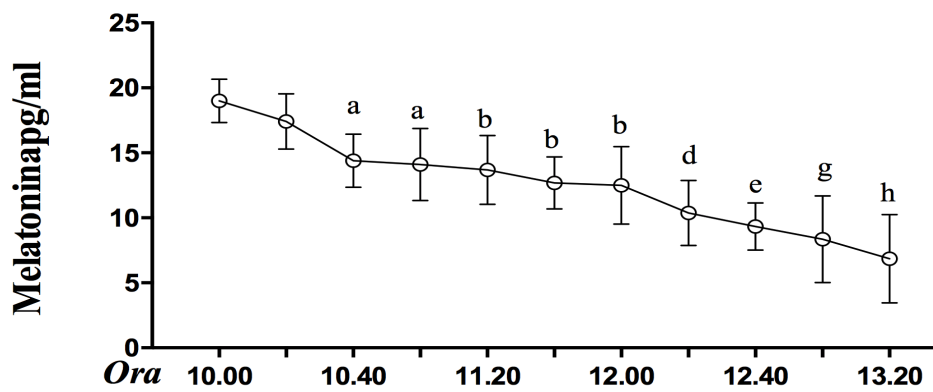
Risultati

L'analisi ritmometrica è stata effettuata mediante l'applicazione del metodo del singolo del *Cosinor* che ha permesso di evidenziare la presenza *ritmo circadiano* con l'acrofase individuata nelle ore di buio. I parametri del ritmo mesor, ampiezza, acrofase, espressi nelle loro unità di misure convenzionali robustezza sono riportati in tabella 4.

	Mesor (pg/ml)	Ampiezza (pg/ml)	Acrofase (hh:mm)	Robustezza (%)
Giorno 1	39.03±0.94	26.36±1.62	23:45±15 min	85.88±4.67
Giorno 2	40.39±0.89	26.90±1.27	23:20±15 min	86.24±5.70

Tabella 4: Mesor, ampiezza, acrofase e robustezza del ritmo circadiano della melatonina plasmatica misurata durante due giorni consecutivi dieci pecore di razza Sarda

L'analisi della varianza ANOVA ha permesso di evidenziare significativo effetto del tempo, inteso come ora del prelievo, durante il picco massimo e il picco minimo della concentrazione plasmatica di melatonina rappresentato graficamente in fig 14.



Punti tempo | A — B — C — D — E — F — G — H — I — J — K — |
Ora prelievo

Significatività:
 a vs A
 b vs A,B
 c vs A,B,C
 d vs A,B,C,D
 e vs A,B,C,D,E
 f vs A,B,C,D,E,F
 g vs A,B,C,D,E,F,G
 h Vs A,B,C,D,E,F,G,H

Figura 14: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica durante il picco massimo e il picco minimo misurata ad intervalli regolari di 20 minuti. Nota: le lettere da A a K indicano gli orari di prelievo sono state aggiunte per facilitare la lettura delle significatività

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Relativamente all'esperimento 1, la valutazione mediante RT-qPCR ha evidenziato, nel gruppo dei cinque bovini sani l'espressione degli mRNA di *Bmall*, *Clock*, *Per2* e *Cry2* e il loro picco di espressione nelle prime ore della fase di buio ed il loro andamento ritmico. E' stato osservato, infatti, che il pattern di espressione dei geni clock nel sangue periferico cambia considerevolmente in rapporto con la specie considerata. Nel cane, in particolare, è stato osservato le cellule mononucleate del sangue esprimono ritmicamente solamente *Per1* e non *Per2*, *Clock*, *Bmall* e *Cry1* (Ohmori et al., 2013). Nell'uomo, invece, le cellule mononucleate del sangue periferico esprimono ritmicamente *Per1* e *Per2* mentre l'espressione del mRNA di *Bmall* e *Cry1* non cambia durante il giorno (Bovin et al. 2003; Kusunagi et al., 2008). Nel ratto si esprime ritmicamente solamente l'mRNA di *Per2* nei leucociti periferici (Oishi et al., 1998). In altre specie di animali domestici, come ad esempio il cavallo, non vi è nessuna differenza statisticamente significativa di espressione giornaliera, se non addirittura nessuna evidenza di espressione, a livello di sangue periferico, dell'mRNA di *Per2*, *Bmall* e *Cry1* (Murphy et al., 2007). Il sangue non è un tessuto omogeneo, e

pertanto si può ipotizzare che l'estrema difficoltà nel determinare la ritmicità di espressione dell'mRNA dei geni clock in esso, possa essere dovuta alla presenza delle numerose popolazioni cellulari presenti a questo livello. È plausibile che, per un effetto di espressione *contrapposta*, vale a dire dell'espressione contemporanea degli elementi positivi e negativi del ritmo, l'espressione di tali geni non risulti sincronizzata con l'orologio periferico. Tale difficoltà di misurazione può essere giustificata anche dalla totale assenza di una espressione *anti-fase* degli elementi a feedback positivo (*Clock* e *Bmal1*) e a feedback negativo (*Cry1* e *Per2*) che di norma si osserva in molti *oscillatori circadiani periferici* (Gachon et al., 2004). Il comportamento "atipico" che è stato riscontrato nel presente lavoro, in accordo con Nebzydosky et al. 2010, può essere legato all'assenza, nella specie bovina, di meccanismi di regolazione degli oscillatori periferici nel tessuto sanguigno, così come in altri tessuti periferici. È interessante notare, inoltre, che nella specie equina a seguito di somministrazioni sperimentali di lipopolissacaridi (LPS), si registri come conseguenza una risposta infiammatoria acuta sistemica e un'induzione dell'espressione dell'mRNA di *Per2* e *Bmal1* a livello periferico manifestante un andamento ritmico (Murphy et al., 2007). Analogamente a quanto rilevato sperimentalmente da Murphy et al

2007, si è voluto indagare l'effettivo impatto che infiammazioni sistemiche possano avere sull'omeostasi interna dell'orologio circadiano nella specie bovina a livello periferico. E' ormai ben noto che, in corso di BVD-MD o di BR, a livello ematico, le **chemiochine** presentano una sovra espressione. Queste risultano rappresentate da un numeroso gruppo di proteine a basso peso molecolare, appartenenti alla famiglia delle **citochine**, caratterizzate da una buona omologia di struttura. La loro funzione principale consiste nell'attivazione e nel reclutamento (**chemiotassi**) dei leucociti nei siti di flogosi. Alcune di esse, però, vengono prodotte anche in assenza di infiammazione o infezione e hanno funzione di regolare l'attività dei leucociti circolanti (Weiner et al., 2012). I dati ottenuti hanno permesso di evidenziare una perdita della ritmicità con alterazione dell'espressione dei geni clock nei soggetti affetti da BR, al contrario, questi elementi non sono stati riscontrati nei soggetti affetti da BVD-MD. In questi ultimi, invece, l'espressione dell'mRNA ha mostrato un cambiamento di *fase* del picco massimo, passando dalle 24:00 alle 04:00. Tali risultati mettono in luce una diversa risposta adattativa dei sincronizzatori periferici, e quindi dell'espressione dei geni clock a livello del sangue, alle due diverse situazioni sperimentali. La perdita della ritmicità dovuta ad infezione da *Brucella abortus* potrebbe dipendere da una

alterazione irreversibile dei meccanismi di regolazione, mentre lo *shift* di fase di *Bmall*, *Clock* e *Cry2*, che si è osservato in corso di BVD-MD, potrebbe essere causato da una alterazione dei meccanismi di *reset* dell'orologio circadiano. Inoltre, dai dati ottenuti è stato possibile evidenziare come, in corso di disordini dell'orologio circadiano, le fluttuazioni temporali di espressione dell'mRNA non siano in alcun modo correlate né regolate dagli *zeitgeber*. L'esatto meccanismo che porta le infiammazioni sistemiche a perturbare l'orologio circadiano e le dinamiche biomolecolare alla base di tali modificazioni non sono del tutto chiare, ma si è ipotizzato, in accordo con studi condotti su modelli murini (Yamamura et al., 2010), che gli LPS prodotti da *Brucella spp.* vadano a bloccare l'espressione dei geni clock attraverso un repentino innalzamento dei livelli ematici di **TNF α** . Di contro, il comportamento di infezioni virali rimane legato strettamente alla famiglia di appartenenza del virus stesso. Nel nostro studio la BVD-MD non ha mostrato la capacità di far perdere ritmicità di espressione, ma lo *shift di fase* osservato potrebbe essere causato dalla capacità intrinseca dei virus appartenenti alla famiglia *Flaviridae* di esprimere una particolare proteina la **Toll-like receptor 9 (TLR9)**. I **Toll-Like Receptors (TLR)** sono una famiglia di recettori espressi da molti tipi cellulari. Fanno parte dei cosiddetti **recettori che**

riconoscono profili molecolari (Pattern Recognition Receptors o PRR), una classe di recettori in grado di riconoscere determinate strutture tipiche di agenti patogeni ed implicati nella difesa dell'organismo, in particolare, nell'immunità innata. Nello specifico il TLR9 appartiene ad una famiglia di recettori presenti nelle membrane intracellulari, come reticolo endoplasmatico ed endosomi. Il suo principale ruolo è il riconoscimento di ligandi formati da acidi nucleici tipici dei virus: RNA a doppia catena riconosciuti dal TLR3, CpG non metilate e DNA a singola o doppia elica dal TLR9, RNA a singola catena per i TLR7 e TLR8. Sebbene l'RNA a singola catena e il DNA a doppia catena siano presenti anche nelle cellule eucariotiche, i Toll-Like Receptors sono in grado di distinguere fra self e non self in base alla posizione di tali molecole: gli acidi nucleici dell'organismo non sono mai presenti negli endosomi se non in casi di cellule danneggiate che possono comunque causare danni al tessuto. Il TLR9 espresso dal virus, pertanto, non sarebbe in grado di interferire profondamente con i sincronizzatori periferici, ma provocherebbe solamente uno spostamento di fase mantenendo intatta la ritmicità (Silver et al., 2011). L'effetto così diversificato che i due microorganismi patogeni provocano a livello di espressione dell'mRNA su sangue periferico, sarebbe, quindi, da imputare alla differente natura (batterica per

Brucella abortus, virale per *BVDV*). In conclusione, la sincronizzazione dell'espressione dei geni clock e i disordini provocati dai differenti agenti patogeni, potrebbero aiutare a chiarire il ruolo svolto dal sistema circadiano periferico nella regolazione dell'omeostasi dell'organismo. Inoltre, l'approfondimento dello studio degli elementi di valutazione della risposta dei geni clock a patogeni esterni, potrebbe fornire utili informazioni per il raggiungimento di una diagnosi precoce e per l'organizzazione di piani di screening in allevamento.

Relativamente agli esperimenti 2 e 3, i risultati ottenuti confermano la presenza di ritmicità circadiana della melatonina plasmatica nelle pecore e nelle capre mantenute in condizioni di fotoperiodo naturale (Carcangiu et al., 2014). È stato possibile osservare un'elevata sintesi di melatonina durante la fase buia del ciclo luce/buio del fotoperiodo naturale raggiungendo valori cinque volte più elevati rispetto alla fase luminosa.

Inoltre non è stata registrata alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli di produzione di melatonina tra le due specie (fig. 15).

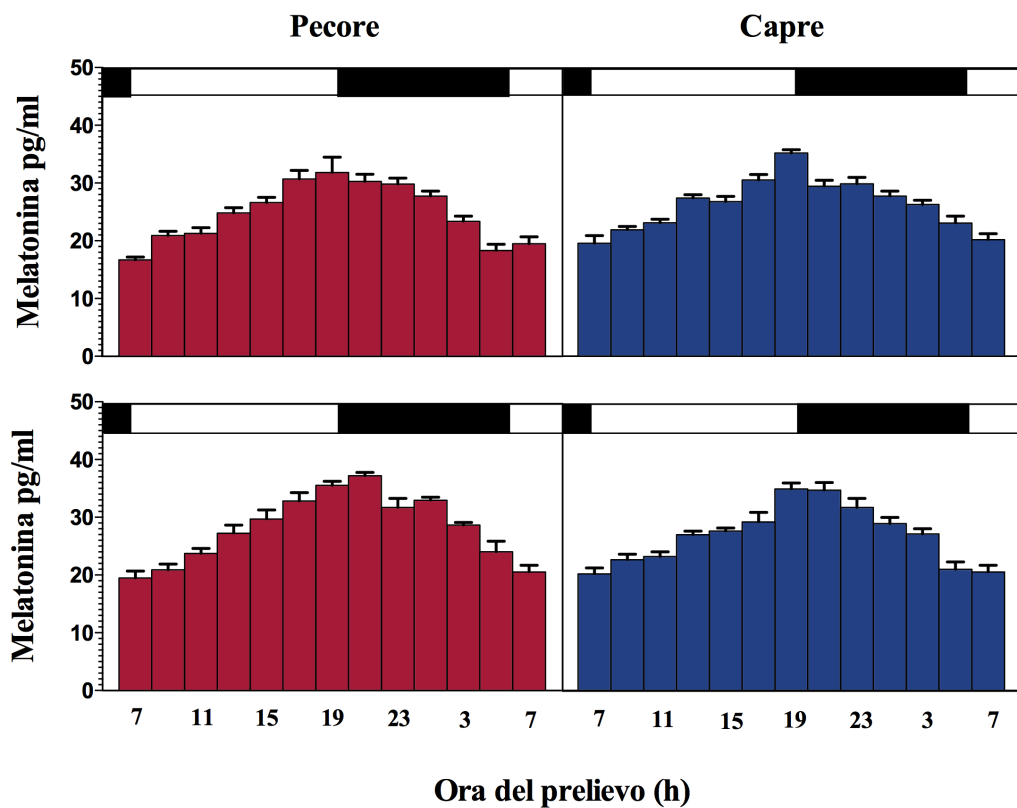


Figura 15: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica registrata in 48 ore di sperimentazione in pecore e capre di razza sarda (Carcangiu et al., 2014)

Durante i due giorni di monitoraggio, la concentrazione della melatonina plasmatica ha mostrato una spiccata ritmicit  con valori bassi durante la fase di luce, pari a circa 13.50 pg/ml, e valori pi  alti durante la fase di buio, pari a circa 73.55 pg/ml (fig. 16).

Nei mammiferi si ritiene che la ritmicit  sia la risultante di due processi tra loro correlati:

- L'inibizione della ghiandola pineale da parte della luce ambientale durante il giorno

- La stimolazione dell'attività della ghiandola pineale da parte dell'orologio circadiano principale durante la notte (Piccione et al., 2013).

L'orologio circadiano è un meccanismo fisiologico di adattamento che si è evoluto in risposta alle macro e micro variazioni dell'ambiente esterno che possono avvenire nell'arco delle 24 ore. Il corretto suo funzionamento permette all'organismo di anticipare questi cambiamenti e di non trarre svantaggio dagli stessi. Si trova in maniera ubiquitaria in tutti gli organismi sensibili alla luce ed è rimasto invariato per migliaia di anni, al punto che le basi biomolecolari sono comuni a tutti gli organismi, dai procarioti all'uomo (Bell-Pedersen et al., 2005).

Grazie alla capacità di interagire con molteplici funzione organiche e comportamentali, l'orologio biologico è stato inserito filogeneticamente come primo step di interfaccia e regolazione tra stimoli esterni, SNC e risposte biologiche. Il principale stimolo esterno che va ad interagire con il sistema circadiano è la luce.

Nei mammiferi la luce è il principale fattore ambientale che stimola la produzione di melatonina da parte della ghiandola pineale. La ghiandola pineale è sottoposta ad una duplice regolazione, esterna

tramite la luce ed interna tramite la melatonina stessa che funge da sincronizzatore endogeno del sistema circadiano, rafforzando e stabilizzando il periodo del pacemaker circadiano a 24 ore (Lewy et al., 1992) tramite l'azione sui recettori presenti al livello del sistema nervoso centrale. Questo sistema di controllo garantisce che il periodo circadiano notturno (notte soggettiva) e l'assenza di luce coincidano. In altre parole, il sistema nervoso centrale riceve informazioni dalla luce per la durata della fotofase e dalla melatonina per la durata della scotofase. In molte specie oggetto di studio, uomo incluso, sono state dimostrate variazioni sia della durata sia della quantità della secrezione della melatonina in rapporto al fotoperiodo (Bartness & Gordon, 1989). Nel *pathway* che porta alla sintesi di melatonina a partire dall'amminoacido **triptofano**, sono coinvolti numerosi fattori ambientali, quali il fotoperiodo, la disponibilità dello stesso triptofano, folati e vitamina B6 e fattori generici. I due enzimi chiave di questa catena biosintetica sono il **Triptofano idrossilasi (TPH)**, che regola la disponibilità di **serotonina**, e la **serotonina N-acetiltransferasi (AANAT2)**, entrambi espressi a livello pineale (Falcon et al., 2003).

È ormai noto come nei vertebrati i livelli di melatonina siano più elevati durante la notte rispetto alle ore diurne e come i cambiamenti nella produzione di melatonina intervengano

nell'insorgenza di disturbi psicofisici comuni, disturbi dell'attività sonno veglia nell'uomo e del pattern attività riposo negli animali causate da disfunzioni del sistema circadiano correlate ad una non corretta secrezione di melatonina. Tutte queste alterazioni prendono il nome di **cronopatologie**. La regolazione della melatonina attraverso la luce è stata ben caratterizzata, e inoltre, è stata messa in luce un'interessante caratteristica del ritmo diurno della melatonina negli esseri umani e negli altri mammiferi. In queste specie, infatti, il picco della melatonina si verifica intorno a metà della notte e in seguito i livelli della stessa iniziano ad abbassarsi ore prima dell'esposizione alla luce del giorno (Bedrosian et al., 2013). Al contrario, studi precedenti condotti su arieti e pecore hanno registrato una rapida secrezione di melatonina endogena dopo l'inizio della fase di buio e un rapido arresto dopo l'alba o l'esposizione alla luce (Todini et al., 2011).

Durante la fase di decrescita dei livelli plasmatici di melatonina una diminuzione statisticamente significativa nella concentrazione della stessa a partire dalle ore 10:40. Tale diminuzione si è protratta in maniera statisticamente significativa ad intervalli di circa 40 minuti. La concentrazione di melatonina plasmatica ha raggiunto i valori più bassi alle 13:20.

Paragonando questo andamento con il ritmo osservato durante i giorni 1 e 2, in cui il valore più basso veniva registrato alle 12:00 e valori simili venivano rilevati alle 09:00 e alle 15:00 (fig. 16),

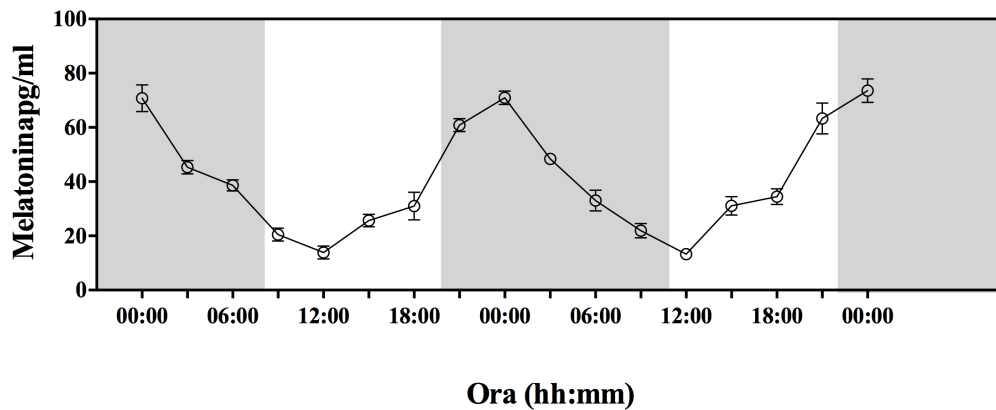


Figura 16: Andamento della secrezione di melatonina plasmatica durante il picco massimo e il picco minimo, i prelievi sono stati eseguiti ogni 20 minuti (Carcangiu et al., 2014)

è possibile ipotizzare un più rapido aumento della concentrazione di melatonina plasmatica dopo le 13:20 in maniera tale da raggiungere il valore di 25.65 pg/ml alle 15:00.

Un andamento inverso è stato osservato durante il picco di secrezione di melatonina plasmatica: un incremento statisticamente significativo è stato osservato a partire dalle 20:40 con un aumento progressivo circa ogni 40 minuti.

Considerando che l'acrofase della concentrazione giornaliera di melatonina plasmatica è stata osservata alle 23:45 nel giorno 1 e alle

23:20 nel giorno 2 e che alle 23:20 del giorno 3 è stato osservato il valore più elevato di concentrazione plasmatica di melatonina (78.75 pg/ml). Subito dopo questa osservazione è iniziata la fase di decremento della stessa concentrazione.

Il meccanismo che regola la diminuzione luce indipendente della melatonina plasmatica nella tarda notte rimane ancora da chiarire. Il sistema di feedback di controllo è un meccanismo per la regolazione ormonale, tuttavia, allo stato attuale, non esistono evidenze che dimostrino meccanismi di tal genere nel controllo della secrezione di melatonina, sebbene sia ben nota la presenza di recettori per la melatonina nella ghiandola pineale di numerose specie (Bedrosian et al., 2013).

La diminuzione di concentrazione di melatonina plasmatica durante la fase discendente del suo ritmo giornaliero è graduale, così come il suo incremento sino al momento del picco, e questo intervallo graduale è di circa 40 minuti. I dati derivanti dalla presente ricerca possono fornire utili informazioni, non solo in riferimento al monitoraggio delle variazioni di melatonina plasmatica durante le 24 ore, ma anche per la somministrazione di melatonina al fine di migliorare le capacità riproduttive nelle pecore. Ed infine non essendo

stata rilevata alcuna differenza nella ritmicità della secrezione di melatonina plasmatica tra pecora e capra, è considerando le grandi affinità anatomiche e fisiologiche presenti tra le suddette specie, è plausibile estendere le medesime considerazioni, effettuate in precedenza per la specie ovina anche a quella caprina. Per tanto possiamo concludere dicendo che i ritmi circadiani nei ruminanti domestici risultano essere modulati da fattori esogeni sia di tipo ambientale, come il fotoperiodo, che non modifica la normale omeostasi dell'organismo, che da *noxae* esogene, come alcune patologie che normalmente non presentano una sintomatologia clinica apparente ma sono in grado di alterare già nelle primissime fasi dell'infezione la normale espressione dei geni clock.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Akashi, M. & Nishida, E. (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes and Development*. 14: 645-649.
2. Akashi, M. & Takumi, T. (2005) The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature Structural Molecular Biology*. 12: 441-448.
3. Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I δ (CKI δ) and CKI ϵ in cultured cells. *Molecular Cell Biology*. 22: 1693-1703.
4. Alvarez, J.D. & Sehgal, A. (2005) The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *Journal of Biological Rhythms*. 20: 111-121.
5. Antle, M.C., Marchant, E.G., Niel, L., Mistlberger, R.E. (1998) Serotonin antagonists do not attenuate activity-induced phase shifts of circadian rhythms in the Syrian hamster. *Brain Research*. 813: 139-149.

6. Antle, M.C., Ogilvie, M.D., Pickard, G.E., Mistlberger, R.E. (2003) Response of the mouse circadian system to serotonin 1A/2/7 agonists in vivo: Surprisingly little. *Journal of Biological Rhythms*. 18: 145-158.
7. Antle, M.C., Steen, N.M., Mistlberger, R.E. (2001) Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *NeuroReport*. 12: 2901-2905.
8. Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C. (2008) SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*. 134:317-28.
9. Aston-Jones, G., Chen, S., Zhu, Y., Oshinsky, M.L. (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nature Neuroscience*. 4: 732-738.
10. Balsalobre, A., Damiola, F. Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 93: 929-937.
11. Balsalobre, A., Marcacc, L., Schibler, U. (2000) Multiple signalling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*. 10: 1291-1294.

12. Bauer, M.S., Soloway, A., Dratman, M.B., Kreider, M. (1992) Effects of hypothyroidism on rat circadian activity and temperature rhythms and their response to light. *Biological Psychiatry*. 32: 411-425.
13. Beal, A.D., Whitmore, D., Moran, D. (2016) Life in a dark biosphere: a review of circadian physiology in “arrhythmic” environments. *Journal of Comparative Physiology B*. 186: 947-968.
14. Bedrosian, T.A., Herring, K.L., Walton, J.C., Fonken, L.K., Weil, Z.M., Nelson, R.J. (2013) Evidence for feedback control of pineal melatonin secretion. *Neuroscience Letters*. 542: 1235-1235.
15. Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J. (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics*. 6: 544-556.
16. Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 295: 1070-1073.

17. Biello, S.M. & Mrosovsky, N. (1996) Phase response curves to neuropeptide Y in wildtype and tau mutant hamsters. *Journal of Biological Rhythms*. 11: 27-34.
18. Boivin, D.B., James, F.O., Wu, A., Cho-Park, P.F., Xiong, H., Sun, Z.S. (2003) Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. 102: 4143-4145.
19. Bos, N.P. & Mirmiran, M. (1990) Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. 511: 158-162.
20. Bronchti, G., Rado, R., Terkel, J., Wollberg, Z. (1991) Retinal projections in the blind mole rat: a WGA-HRP tracing study of a natural degeneration. *Brain research. Developmental brain research*. 58: 159-170.
21. Brown, S.A., Fleury-Olela, F., Nagoshi, E., Hauser, C., Juge, C. (2005) The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biology*. 3: 338.
22. Brown, S.A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U. (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology*. 12: 1574-1583.

23. Buijs, R.M., La Fleur S.E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T.C., Kalsbeek, A., Nagai, K., Nijima, A. (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 464(1): 36-48.
24. Bunker, M.K., Walisser, J.A., Sullivan, R., Manley, P.A., Moran, S.M., Kalscheur, V.L., Colman, R.J., Bradfield, C.A. (2005) Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. *Genesis*. 41: 122-130.
25. Byku, M. & Gannon, R.L. (2000) Effects of the 5HT1A agonist/antagonist BMY 7378 on light-induced phase advances in hamster circadian activity rhythms during aging. *Journal of Biological Rhythms*. 15: 300-305.
26. Cagampang, F.R.A., Okamura, H., Inouye, S.T. (1994) Circadian rhythms of norepinephrine in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters*. 173: 185-188.
27. Cagnacci, A., Elliott, J.A., Yen, S.S. (1992) Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 75(2): 447-452.

28. Cahill, G.M., Hurd, M.W., Batchelor, M.M. (1998) Circadian rhythmicity in the locomotor activity of larval zebrafish. *Neuroreport*. 26; 9(15): 3445-3449.
29. Carcangiu, V., Luridiana, S., Mura, M.C., Parmeggiani, A., Giannetto, C., Congiu, F., Piccione, G. (2014) Melatonin circadian rhythm in three livestock species maintained in the same housed conditions. *Biological Rhythm Research*. 45: 909-914.
30. Carcangiu, V., Vacca, G.M., Parmeggiani, A., Mura, M.C., Bini, P.P. (2005) Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does. *Small Ruminant Research*. 59: 7-13.
31. Carcangiu, V; Mura, M.C, Parmeggiani, A., Piccione, G., Bini, P.P., Cosso, G., Luridiana, S. (2013) Daily rhythm of blood melatonin concentration in sheep of different ages. *Biological Rhythm Research*. 44: 908-915.
32. Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J.J., Sassone-Corsi, P. (2005) Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*. 309: 1390-1394.

33. Castel, M., Belenky, M., Cohen, S., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. 5: 368-381.
34. Cernuda-Cernuda, R., DeGrip, W.J., Cooper, H.M., Nevo, E., Garcia-Fernandez, J.M. (2002) The retina of *Spalax ehrenbergi*. Novel histological features supportive of a modified photosensory role. *Investigative ophthalmology & visual science*. 43: 2374-2383.
35. Challet, E., Scarbrough, K., Penev, P.D., Turek, F.W. (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *Journal of Biological Rhythms*. 13: 410-421.
36. Challet, E., Turek, F.W., Laute, M.A., Van Reeth, O. (2001) Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: Role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Research*. 909: 81-91.

37. Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J., Gillette, M. U. (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide: A pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 13468-13473.
38. Chou, T.C., Scammell, T.E., Gooley, J.J., Gaus, S.E., Saper, C.B., Lu, J. (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *Journal of Neuroscience*. 23: 10691-10702.
39. Ciarleglio, C.M., Ryckman, K.K., Servick, S.V., Hida, A., Robbins, S., Wells, N., Hicks, J., Larson, S.A., Wiedermann, J.P., Carver, K., Hamilton, N., Kidd, K.K., Kidd, J.R., Smith, J.R., Friedlaender, J., McMahon, D.G., Williams, S.M., Summar, M.L., Johnson, C.H. (2008) Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations. *Journal of Biological Rhythms*. 23: 330-340.
40. Cooper, H.M., Herbin, M., Nevo, E. (1993a) Ocular regression conceals adaptive progression of the visual system in a blind subterranean mammal. *Nature*. 361: 156-159.

41. Cooper, H.M., Herbin, M., Nevo, E. (1993b) Visual system of a naturally microphthalmic mammal: the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*. [Review]. *Journal of Comparative Neurology*. 328: 313-350.
42. Cote, N.K. & Harrington, M.E. (1993) Histamine phase shifts the circadian clock in a manner similar to light. *Brain Research*. 613: 149-151.
43. Cugini, P. (2006) Biostatistica cronobiologia caosbiologia nella metodologia medica-metodi chiave. Roma, Italia *Società Editrice Universo*. I ed.
44. Cutrera, R.A., Saboureau, M., Pevet, P. (1996). Phaseshifting effects of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neuroscience Letters*. 210: 1-4.
45. Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*. 14: 2950-2961.

46. David-Gray, Z.K., Janssen, J.W., DeGrip, W.J., Nevo, E., Foster, R.G. (1998) Light detection in a “blind” mammal. *Nature Neuroscience*. 1: 655-656.
47. De Mairan, J. (1729) Observation botanique. *Histoire de l'Academie Royale des Sciences*. 35-36.
48. Debruyne, J.P., Noton, E., Lambert, C.M., Maywood, E.S., Weaver, D.R. Reppert, SM. (2006) A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*. 50: 465-477.
49. Debruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (2007a) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience*. 10: 543-545.
50. Debruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (2007b) Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Current Biology*. 17: R538-R539.
51. Deurveilher, S., Burns, J., Semba, K. (2002) Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: A dual tract-tracing study in rat. *European Journal of Neuroscience*. 16: 1195-1213.

52. Dibner, C., Sage, D., Unser, M., Bauer, C., d'Eysmond, T. (2009) Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO Journal*. 28: 123-134.
53. Dowell, S.F. (2001) Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 7(3): 369-374.
54. Duncan, W.C. & Schull, J. (1994) The interaction of thyroid state, MAOI drug treatment, and light on the level and circadian pattern of wheel-running in rats. *Biological Psychiatry*. 35: 324-334.
55. Early, J.O., Curtis, A.M. (2016) Immunometabolism: Is it under the eye of the clock? *Seminars in Immunology*. 28(5): 478-490.
56. Edgar, D.M., Miller, J.D., Prosser, R.A., Dean, R.R., Dement, W.C. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system. II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *Journal of Biological Rhythms*. 8: 17-31.
57. Elliott, K.J., Weber, E.T., Rea, M.A. (2001) Adenosine A1 receptors regulate the response of the hamster circadian clock to light. *European Journal of Pharmacology*. 414: 45-53.

58. Esquiva, G., Avivi, A., Hannibal, J. (2016) Non-image Forming Light Detection by Melanopsin, Rhodopsin, and Long-Middlewave (L/W) Cone Opsin in the Subterranean Blind Mole Rat, *Spalax Ehrenbergi*: Immunohistochemical Characterization, Distribution, and Connectivity. *Frontiers in Neuroanatomy*. 9: 10-61.
59. Fan, Y., Hida, A., Anderson, D.A., Izumo, M., Johnson, C.H. (2007) Cycling of CRYPTOCHROME proteins is not necessary for circadian-clock function in mammalian fibroblasts. *Current Biology*. 17: 1091-1100.
60. Foster, R.G & Lucas, R.J. (1999) Clocks, criteria and critical genes. *Nature America*. 22: 217-219.
61. Franken, P., Cao, V., Heller, H.C., Miller, J.D. (1999) The glutamate induced phase shift in the SCN slice: A two pulse study. *Brain Research*. 818: 34-40.
62. Fraser, S., Cowen, P., Franklin, M., Franey, C., Arendt, J. (1983) Direct radio-immunoassay for melatonin in plasma. *Clinical Chemistry*. 20: 396-397.
63. Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S.A., Ripperger, J., Schibler, U. (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*. 113: 103-112.

64. Gamble, K.L., Novak, C.M., Albers, H.E. (2004). Neuropeptide Y and N-methyl-d-aspartic acid interact within the suprachiasmatic nuclei to alter circadian phase. *Neuroscience*. 126: 559-565.
65. Gibbs, J.E., Blaikley J., Beesley S., Matthews, L., Simpson, K.D., Boyce, S.H., Farrow, S.N., Else, K.J., Singh, D., Ray, D.W., Loudon, A.S. (2012) The nuclear receptor REV-ERB alpha mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 109: 582-587.
66. Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., Saper, C.B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the Retinohypothalamic tract. *Nature Neuroscience*. 4: 1165.
67. Green, D.J., Gillette, R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat Suprachiasmatic brain slice. *Brain Research*. 245: 198-200.
68. Groos, G., Hendriks, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neuroscience Letters*. 34: 283-288.

69. Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Cell Biology*. 20: 391-403.
70. Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N., Bittman, E.L. (2006) Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *Journal of Neuroscience*. 26: 6406-6412.
71. Hagan, A.A. & Heath, J.E. (1980) Effects of preoptic lesions on thermoregulation in ducks. *Journal of Thermal Biology*. 5: 141-150.
72. Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J. (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *Journal of Neuroscience*. 17: 2637-44.
73. Hannibal, J., Hindersson, P., Nevo, E., Fahrenkrug, J. (2002) The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat. *Spalax*. *Neuroreport*. 13: 1411.

74. Harrington, M.E. & Schak, K.M. (2000) Neuropeptide Y phase advances the in vitro hamster circadian clock during the subjective day with no effect on phase during the subjective night. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 78: 87-92.
75. Hastings, M.H., Field, M.D., Maywood, E.S., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (1999) Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *Journal of Neuroscience*. 19: RC11.
76. Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M. Berson, D.M., Yau, K.W. (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 295: 1065-1070.
77. Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R. H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G., Yau, K.W. (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. 424: 76-81.

78. Helfrich-Förster, C., Yoshii, T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Bachleitner, W. Cusamano, P., Rouyer, F., (2007) The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*. 72: 517-25.
79. Hirota, T. & Fukada, Y. (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological Science*. 21: 359-68.
80. Horikawa, K. & Shibata, S. (2004) Phase-resetting response to (+)8-OH-DPAT, a serotonin 1A/7 receptor agonist, in the mouse in vivo. *Neuroscience Letters*. 368: 130-134.
81. Hughes, M.E., Di Tacchio, L. Hayes, K.R., Vollmers, C., Pulivarthy, S. (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genetics*. 5: e1000442.
82. Huhman, K.L. & Albers, H.E. (1994) Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides*. 15: 1475-1478.

83. Kaasik, K., Kivimäe, S., Allen, J.J., Chalkley, R.J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Ptacek, L.J. (2013) Glucose sensor O-Glc-NAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metabolism*. 17: 291-302.
84. Kalsbeek, A., Garidou, M.L., Palm, I.F., van der Vliet, J., Simonneauz, V., Pevet, P., Buijs, R.M. (2000) Melatonin sees the light: Blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*. 12: 3146-3154.
85. Kaushnik, R., Nawathean, P., Busza, A., Murad, A., Emery, P., Rosbash, M. (2007) PER-TIM interactions with the photoreceptor cryptochrome mediate circadian temperature responses in *Drosophila*. *PLoS Biology*. 5: e146.
86. Keller, M., Mazuch J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D., Volk, H.D., Kramer, A., Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 106: 21407-21412.

87. Kim, D.Y., Kang, H.C., Shin, H.C., Lee, K.J., Yoon, Y.W., Han, H.C., Na, H.S., Hong, S.K., Kim, Y.I. (2001) Substance P plays a critical role in photic resetting of the circadian pacemaker in the rat hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 21: 4026-4031.
88. Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S., Young, M.W. (1998) The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell*. 94: 97-107.
89. Knoch, M.E., Gobes, S.M.H., Pavlovska, I., Su, C., Mistlberger, R.E., Glass, J.D. (2004) Short-term exposure to constant light promotes strong circadian phaseresetting responses to nonphotic stimuli in Syrian hamsters. *European Journal of Neuroscience*. 19: 2779-2790.
90. Kondo, T & Ishiura, M. (2000) The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays*. 22: 10-15.
91. Kusanagi, H., Hida, A., Satoh, K., Echizenya, M., Shimizu, T., Pendergast, J.S., Yamazaki, S., Mishima, K. (2008) Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroscience Research*. 61: 136-142.

92. Laminau, S., Guyomarc'h, C., Boswell, T., Richard, J.P., Leray, D. (1998) Induction of circadian rhythm of feeding activity by testosterone implantations in arrhythmic Japanese quail males. *Journal of Biological Rhythms*. 13: 278-287.
93. Langner, R. & Rensing, L. (1972) Circadian rhythm of oxygen consumption in rat liver suspension culture: changes of pattern. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 27: 1117-1118.
94. Leak, R.K. & Moore, R.Y. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 433: 312-334.
95. Leak, R.K., Card, J.P., Moore, R.Y. (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*. 819: 23-32.
96. Lee, J., Lee, Y., Lee, M.J., Park, E., Kang, S.H., Chung, C.H., Lee, K.H., Kim, K. (2008) Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Molecular and Cellular Biology*. 28: 6056-6065.
97. Lipton, J.M. (1968) Effects of preoptic lesions on heat-escape responding and colonic temperature in the rat. *Physiology and Behavior*. 3: 165-169.

98. Liu, A.C., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Welsh, D.K., Kay, S.A. (2008) Redundant function of REVERB alpha and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genetics*. 4: e1000023.
99. Liu, C. & Gillette, M.U. (1996) Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *Journal of Neuroscience*. 16: 744-751.
100. Liu, X., Liu, L., Zhang, M., Yang, N., Qi, Y., Sun, Y., Li, X. (2015) Messenger RNA expression of chicken CLOCK gene in the response to *Campylobacter jejuni* inoculation. *Poultry Science*. 94(9): 2124-2130.
101. Liu, Y. (2003) Molecular Mechanisms of Entrainment in the *Neurospora* Circadian Clock. *Journal of Biological rhythms*. 18: 195-205.
102. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*. 25: 402-408.

103. Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S. (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Reviews of Genomics Human Genetics*. 5: 407-441.
104. Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R. Menaker, M., Takahashi, J.S. (2000) Positional synthetic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*. 288: 483-492.
105. Lumineau, S., Guyomarc'h, C., Boswell, T., Richard, J.P., Leray, D. (1998) Induction of circadian rhythm of feeding activity by testosterone implantations in arrhythmic Japanese quail males. *Journal of Biological Rhythms*. 13: 278-287.
106. Majumdar, T., Dhar, J., Patel, S., Kondratov, R., Barik, S. (2016). Circadian transcription factor BMAL1 regulates innate immunity against select RNA viruses. *Innate Immunity*. 1.
107. Man, K., Loudon, A., Chawla, A. (2016) Immunity around the clock. *Science*. 354(6315): 999-1003.
108. Mehra, A., Baker, C.L., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2009) Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends in Biochemical Sciences*. 34: 483-490.

109. Meijer, J.H., van der Zee, E., Dietz, M. (1988) The effects of intraventricular carbachol injections on the free-running activity rhythm of the hamster. *Journal of Biological Rhythms*. 3: 333-348.
110. Menaker, M. & Refinetti, R. (1993) The tau mutation in golden hamsters. In Young, M. (Ed.) *Molecular Genetics of Biological Rhythms*. New York: Marcel Dekker, pp. 255-270.
111. Meng, Q.J., Logunova, L., Maywood, E.S., Gallego, M., Lebiecki, J., Brown, T.M., Sládek, M., Semikhodskii, A.S., Glossop, N.R., Piggins, H.D., Chesham, J.E., Bechtold, D.A., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., Virshup, D.M., Boot-Handford, R.P., Hastings, M.H., Loudon, A.S. (2008) Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*. 58: 78-88.
112. Meyer, J.L., Hall, A.C., Harrington, M.E. (1998) Histamine phase shifts the hamster circadian pacemaker via an NMDA dependent mechanism. *Journal of Biological Rhythms*. 13: 288-295.

113. Mintz, E.M., Jasnow, A.M., Gillespie, C.F., Huhman, K.L., Albers, H.E. (2002) GABA interacts with photic signaling in the suprachiasmatic nucleus to regulate circadian phase shifts. *Neuroscience*. 109: 773-778.
114. Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M., Albers, H.E. (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *Journal of Neuroscience*. 19: 5124-5130.
115. Mohawk, J.A., Green, C.B., Takahashi, J.S. (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*. 35: 445-462.
116. Moore, R.Y. & Lenn, N.J. (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 146(1): 1-14.
117. Morin, L.P., Fitzgerald, K.M., Zucker, I. (1977) Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. *Science*. 196: 305-307.

118. Moriya, T., Yoshinobu, Y., Ikeda, M., Akiyama, M., and Shibata, S. (1998) Potentiating action of MKC-242, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, on the entrainment of the circadian activity rhythm in hamsters. *British Journal of Pharmacology*. 125: 1281-1287.
119. Murphy, B., Vick, M.M., Sessions, D.R., Cook, R.F., Fitzgerald, B.P. (2007) Acute systemic inflammation transiently synchronizes dock gene expression in equine peripheral blood. *Brain, Behavior, and Immunity*. 21: 467-476.
120. Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G. Kaluzova, M., Sassone-Corsi, P. (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*. 324: 654- 657.
121. Nakahata., Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J. (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 134: 329-40.
122. Nebzydoski, S.J., Pozzo, S., Nemeo, L., Rankin, M.K., Gressley, T.F. (2010) The effect of dexamethasone on dock gene mRNA levels in bovine neutrophils and lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 138: 183-192.

123. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K., Halberg, F. (1979) Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia*. 6: 305-323.
124. Nevo, E., Ivaniskaya, I., Beiles, A. (2001) Adaptive Radiation of Blind Subterranean Mole Rats: Naming and Revisiting the Four Siblings Species of the *Spalax Ehrenbergi* Superspecies in Israel: *Spalax Gallili* ($2n = 52$), *S. Golani* ($2n = 54$), *S. Carmeli* ($2n = 58$) and *S. Judaei* ($2n = 60$). Leiden, *Netherlands: Backhuys Publisher*.
125. Noguchi, T., Watanabe, K., Ogura, A., Yamaoka, S. (2004) The clock in the dorsal suprachiasmatic nucleus runs faster than that in the ventral. *European Journal of Neuroscience*. 20: 3199-3202.
126. Novak, C.M. & Albers, H.E. (2002) N-methyl-d-aspartate microinjected into the suprachiasmatic nucleus mimics the phase-shifting effects of light in the diurnal Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Research*. 951: 255-263.
127. Novak, C.M. & Nunez, A.A. (2000) A sparse projection from the suprachiasmatic nucleus to the sleep active ventrolateral preoptic area in the rat. *Neuro Report*. 11: 93-96.

128. Ohmori, K., Nishikawa, S., Oku, K., Oida, K., Amagai, Y., Kajiwara, N., Jung, K., Matsuda, A., Tanaka, A., Matsuda, H. (2013) Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the dock gene period1 in canine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Journal*. 196: 402-407.
129. Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., Ishida, N. (1998) Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissue of rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253: 199-203.
130. Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcaková, V., Abraham, D. (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metabolism*. 4: 163-173.
131. Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Wortel, J., van der Vliet, J., van Heijningen, C., Simonneaux, V., P.vet, P., Buijs, R.M. (2003) Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: Inhibitory and stimulatory mechanisms. *European Journal of Neuroscience*. 17: 221-228.

132. Piccione, G., Cannella, V., Monteverde, V., Bertolucci, C., Frigato, E., Congiu, F., Guercio, A. (2014) Circadian gene expression in peripheral blood of *Bos taurus* under different experimental condition. *Journal of Applied Biomedicine*. 12(4): 271-275.
133. Piccione, G., Giannetto, C., Bertolucci, C., Refinetti, R. (2013) Daily rhythmicity of circulating melatonin is not endogenously generated in the horse. *Biological Rhythm Research*. 44: 143-149.
134. Pitrosky, B., Kirsch, R., Malan, A., Mocaer, E., Pevet, P. (1999) Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *American Journal of Physiology*. 277: R812-R828.
135. Pittendrigh, C.S. (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science US*. 40: 1018-1029.
136. Pittendrigh, C.S. (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold spring Harbour Symposium on Quantitative Biology*. 25: 159-184.

137. Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., Young, M.W. (1998) Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*. 94: 83-95.
138. Prosser, R.A. & Bergeron, H.E. (2003) Leptin phase advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neuroscience Letters*. 336: 139-142.
139. Prosser, R.A. (2003) Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Research*. 966: 110-115.
140. Prosser, R.A., Dean, R. R., Edgar, D.M., Heller, H.C., Dement, W. C. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system. I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *Journal of Biological Rhythms*. 8: 1-16.
141. Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D. (1998) Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 95: 340-345.
142. Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, EF, Rollag, MD. (2000) A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*. 20: 600-605.

143. Ralph, M.R. & Menaker, M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 241: 1125-1127.
144. Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247: 975-978.
145. Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., Takahashi, J.S., Imai, S., Bass, J. (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*. 324: 651-654.
146. Reddy, A.B. & Rey, G. (2014) Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*. 83: 165-189.
147. Refinetti R. (2004) Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*. 227: 571-581.
148. Refinetti, R. & Carlisle, H.J. (1986) Effects of lateral hypothalamic lesions on thermoregulation in the rat. *Physiology and Behavior*. 38: 219-228.

149. Refinetti, R. (1996) Ultradian rhythms of body temperature and locomotor activity in wild- type and tau-mutant hamsters. *Animal Biology*. 5: 111-115.
150. Refinetti, R. (2014) Relationship between circadian period and body size in the tau-mutant golden hamster. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 92: 27-33.
151. Robinson, T., Sutherland, I., Sutherland, J. (2007) Validation of candidate bovine reference genes for use with RT-qPCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 115: 160-165.
152. Rudic, R.D., McNamara, P. Curtis, A.M., Boston, R.C., Panda, S., Hogenesch, J.B., Fitzgerald, G.A. (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*. 2: e377.
153. Sack, R.L., Brandes, R.W., Kendall, A.R., Lewy, A.J. (2000) Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *New England Journal of Medicine*. 343: 1070-1077.

154. Sage, D., Ganem, J., Guillaumond, F., Laforge-Anglade, G., François-Bellan, A. M., Bosler, O., Becquet, D. (2004) Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. *Journal of Biological Rhythms*. 19: 144-156.
155. Satinoff, E. & Rutstein, J. (1970) Behavioral thermoregulation in rats with anterior hypothalamic lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 71: 77-82.
156. Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, M.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., Hogenesch, J.B. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 43: 527-537.
157. Schuhler, S., Pitrosky, B., Kirsch, R., Pevet, P. (2002) Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behavioural Brain Research*. 133: 343-350.

158. Schull, J., McEachron, D. L., Adler, N.T., Fiedler, L., Horvitz, J., Noyes, A., Olson, M., Shack, J. (1988) Effects of thyroidectomy, parathyroidectomy and lithium on circadian wheel running in rats. *Physiology and Behavior*. 42: 33-39.
159. Schwartz, W.J. & Gainer, H. (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*. 197: 1089-1091.
160. Sehadova, H., Glaser, F.T., Gentile, C., Simoni, A., Giesecke, A., Albert, J.T., Stanewsky, R. (2009) Temperature Entrainment of *Drosophila*'s Circadian Clock Involves the Gene *nocte* and Signalling from Peripheral Sensory Tissues to the Brain. *Neuron*. 64: 251-266.
161. Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R.J., Foster, R.G. (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary response to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *European Journal of Neuroscience*. 17: 1793-1801.

162. Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T., Tezuka, M. (2005) Brain and muscle Arnt-likeprotein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 102(34): 12071-12076.
163. Shirakawa, T. & Moore, R.Y. (1994) Glutamate shifts the phase of the circadian neuronal firing rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience Letters*. 178: 47-50.
164. Silver, A.C., Arjona, A., Walker, W.E., Fikrig, E. (2011) The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*. 36: 251-261.
165. Smadja Storz, S., Tovin, A., Mracek, P., Alon S., Foulkes, N. S., Gothilf, Y. (2013) Casein kinase 1 δ activity: a key element in the zebrafish circadian timing system. *PLoS One*. 8: e54189.
166. Stephan, F.K. & Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 69: 1583-1586.

167. Stratmann, M. & Schibler, U. (2006) Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *Journal of Biological Rhythms*. 21: 6494-6506.
168. Sujino, M., Masumoto, K.H., Yamaguchi, S., van der Horst, G.T., Okamura, H., Inouye, S.T. (2003) Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioural rhythms of genetically arrhythmic mice. *Current Biology*. 13: 664-668.
169. Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*. 90: 1003-1011.
170. Sundar, I.K., Ahmad, T., Yao, H., Hwang, J.W., Gerloff, J., Lawrence, B.P., Sellix, M.T., Rahman, I. (2015) Influenza A virus-dependent remodeling of pulmonary clock function in a mouse model of COPD. *Scientific Reports*. 29(4): 9927.
171. Szymusiak, R., DeMory, A., Kittrell, E. M. W., Satinoff, E. (1985) Diurnal changes in thermoregulatory behavior in rats with medial preoptic lesions. *American Journal of Physiology*. 249: R219-R227.

172. Takahashi J.S. & Menaker, M. (1980) Interaction of estradiol and progesterone: effects on circadian locomotor rhythm of female golden hamster. *American Journal of Physiology*. 239: R97-R101.
173. Takeuchi, T., Hinohara, T., Kurosawa, G., Uchida, K. (2007) A temperature-compensated model for circadian rhythms that can be entrained by temperature cycles. *Journal of Theoretical Biology*. 246: 195-204.
174. Todini, L., Terzano, G.M., Borghese, A., Debenedetti, A., Malfatti A. (2011) Plasma melatonin in domestic female Mediterranean sheep (Comisana breed) and goats (Maltese and Red Syrian). *Research in Veterinary Science*. 90: 35-39.
175. Toth, D.M. (1973) Temperature regulation and salivation following preoptic lesions in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 82: 480-488.
176. Van Zoeren, J.G. & Stricker, E.M. (1977) Effects of preoptic, lateral hypothalamic, or dopamine-depleting lesions on behavioral thermoregulation in rats exposed to the cold. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 91: 989-999.

177. Wang, R., Luo, O., He, L., Li, J.X., Zhang, M.G. (2012). Preservative-free 0.9% sodium chloride for flushing and locking peripheral intravenous access device: a prospective controlled trial. *Evidence-Based Medicine*. 5(4): 205-208.
178. Wang, H. (2008a) Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *Journal of Molecular Evolution*. 67: 29-40.
179. Wang, H. (2008b) Comparative analysis of teleost fish genomes reveals preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Marine Genomics*. 1: 69-78.
180. Wang, H. (2009) Comparative genomic analysis of teleost fish bmal genes. *Genetica*. 136: 149-161.
181. Warren, W.S., Hodges, D.B., Cassone, V.M. (1993) Pinealectomized rats entrain and phase-shift to melatonin injections in a dose-dependent manner. *Journal of Biological Rhythms*. 8: 233-245.
182. Weiner, C.M., Smirnova, N.P., Webb, B.T., Van Campen, H., Hansen, T.R. (2012) Interferon stimulated genes, CXCR4 and immune cell responses in peripheral blood mononuclear cells infected with bovine viral diarrhea virus. *Research in Veterinary Science*. 93: 1081-1088.

183. Weinert, D. (2005) Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiology International*. 22: 179-205.
184. Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 14: 697-706.
185. Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L.J., Fu, Y.H. (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*. 434: 640-644.
186. Yagita K., Tamanini F., van der Horst G.T., Okamura H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*. 292: 278-81.
187. Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., Takumi, T. 2004 Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*. 5: 18.

188. Yamamura, Y., Yano, I., Kudo, T., Shibata, S. (2010) Time dependent inhibitory effect of lipopolysaccharide injection on *Per1* and *Per2* gene expression in the mouse heart and liver. *Chronobiology International*. 27: 213-232.
189. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 288: 682-85.
190. Yamazaki, S., Yoshikawa, T., Biscoe, E.W., Numano, R., Gallaspy, L.M. (2009) Ontogeny of circadian organization in the rat. *Journal of Rhythms*. 24: 55-63.
191. Yannielli, P. C. & Harrington, M. E. (2001). The neuropeptide Y Y5 receptor mediates the blockade of “photic-like” NMDA-induced phase shifts in the golden hamster. *Journal of Neuroscience*. 21: 5367-5373.
192. Yingbin, F., Hsi-Wen, L., Michael, T.H.D., King-Wai, Y. (2005) Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*. 15(4): 415-422.

193. Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H. (2004) PERIOD2:LUCIFERASE real time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 101: 5339-5346.
194. Young, M.W. & Kay, S.A. (2001) Time zones: A comparative genetics of circadian clock. *Nature Reviews Genetics*. 2: 704.

6 ABBREVIAZIONI

$\frac{1}{T}$, <i>frequenza</i>	IGL, <i>foglietto intergenicolato del talamo</i>
5-HT, <i>serotonina</i>	LNvs, <i>neuroni laterali</i>
A, <i>ampiezza</i>	LSH, <i>metodo dei minimi quadrati</i>
AA-NAT, <i>Arilalkilamina N-acetil transferasi</i>	M, <i>mesor</i>
AANAT2, <i>serotonina N-acetiltransferasi</i>	MESOR, <i>midline statistic of rhythm</i>
ANOVA, <i>analisi della varianza</i>	mRNA, <i>RNA messaggero</i>
Bmal 1, <i>brain and muscle arnt-like protein 1</i>	NAD, <i>nicotinammide adenina dinucleotide</i>
BR, <i>brucellosi</i>	NAD ⁺ , <i>forma ossidata della nicotinammide adenina dinucleotide</i>
BVD-MD, <i>diarea virale bovina-malattia delle mucose</i>	NIF, <i>sistema non formante immagine</i>
cDNA, <i>DNA complementare</i>	NIH-3T3, <i>fibroblasti murini embrionali</i>
CK1 δ , <i>caseina chinasi δ</i>	NPY, <i>neuropeptide Y</i>
CK1 ϵ , <i>caseina chinasi ϵ</i>	PACAP, <i>proteina pituitaria adenilato-ciclasti dipendente</i>
Cock, <i>circadian locomotor output cycles kaput</i>	PCR, <i>polymerase chain reaction</i>
CpG, <i>citosina-fosfato-guanina</i>	Per 1, <i>Period 1</i>
Cry 1, <i>criptocromo 1</i>	Per 2, <i>Period 2</i>
Cry 2, <i>criptocromo 2</i>	PR, <i>percentuale del ritmo</i>
CT, <i>gruppo controllo</i>	RNA, <i>acido ribonucleico</i>
DNA, <i>acido desossiribonucleico</i>	RNase, <i>ribonucleasi</i>
ELISA, <i>saggio immuno-assorbente legato ad un enzima</i>	RORE, <i>related orphan receptor</i>
ES, <i>errore standard</i>	ROREs, <i>retinoic acid-related orphan receptor response elements</i>
FPA, <i>fluorescenza polarizzata</i>	RT-qPCR, <i>quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
GLU, <i>glutammato</i>	SCN, <i>nuclei sovrachiasmatici</i>
HLH, <i>helix-loop-helix</i>	

SIRT, *sirtuine*

TLR9, *recettore toll-like 9*

TPH, *triptofano idrossilasi*

TTFL, *loop di feedback trascrizione-traslazione*

U2OS, *linee cellulari tumorali di osteosarcoma*

τ , *periodo*

Φ , *acrofase*