

Reazioni emozionali associate alla valenza edonistica della percezione gustativa:

-Analisi delle variazioni del ritmo sinusale e del bilancio simpatico-vagale
in maschi e femmine adulte.

Tesi di dottorato di
Giuseppe Cansella

Tutor:

Prof. ssa. Iole Tomassini Barbarossa

Dottorato di Ricerca Scienze Morfologiche (XIX Ciclo)

Curriculum in Fisiologia dei Sistemi Sensoriali

Università degli Studi di Cagliari

Settore Scientifico Disciplinare:

BIO/09 FISILOGIA



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

INDICE

Introduzione	pag. 1
Scopo della ricerca	pag. 10

PRIMA SERIE DI ESPERIMENTI

• Materiali e metodi	pag. 13
• Registrazioni elettrocardiografiche	pag. 14
• Stimoli gustativi	pag. 14
• Procedura sperimentale	pag. 16
• Analisi dei dati	pag. 17
• Risultati	pag. 19
• Conclusioni	pag. 27

SECONDA SERIE DI ESPERIMENTI

• Materiali e metodi	pag. 32
• Registrazioni elettrocardiografiche	pag. 38
• Stimoli gustativi	pag. 38
• Analisi dei dati	pag. 38
• Risultati	pag. 39
• Conclusioni	pag. 41

Bibliografia	pag. 43
Figure	pag. 46

Introduzione

La più importante funzione dei tre sistemi chimici, gusto, olfatto e sistema del trigemino è quella di permettere agli animali di usare indizi chimici per selezionare sostanze appropriate da ingerire tra la moltitudine di sostanze nutritive, non nutritive e tossiche presenti nel loro habitat naturale (Galef, 1981) su cui basare le loro scelte alimentari.

Il sistema olfattorio fornisce informazioni sulle sostanze chimiche volatili presenti nei cibi che possono influenzare le scelte alimentari. Il sistema gustativo riconosce molecole, soprattutto idrosolubili, presenti negli alimenti, fornendo informazioni relative alla qualità, quantità, gradevolezza ed eventuale pericolosità del cibo da ingerire. Il sistema chemosensoriale del trigemino fornisce informazioni su sostanze chimiche irritanti o nocive che vengono a contatto con le mucose del naso e della bocca.

Questi tre sistemi chemosensoriali dipendono da recettori sensoriali presenti nelle cavità nasale e oro-faringea che interagiscono con le rispettive molecole e generano potenziali di recettore e potenziali d'azione, trasmettendo pertanto gli effetti degli stimoli chimici alle specifiche regioni del sistema nervoso centrale (Fig. 1). Queste informazioni preparano anche l'apparato gastrointestinale a ricevere il cibo, attivando la salivazione e la deglutizione o la costrizione riflessa della faringe e il vomito se le sostanze percepite sono nocive.

Uno stimolo gustativo e/o olfattorio possono evocare due tipi di risposte (Norgren, 1985): la prima discriminativa a livello corticale, permette di avere sensazione cosciente delle caratteristiche qualitative e quantitative dello stimolo percepito. Secondo questa risposta, il senso del gusto può differenziare quattro qualità sensoriali principali (dolce, salato, acido, e amaro) (Fig. 2) oppure cinque, includendo il gusto di umami. Attualmente sembra che sulla lingua ci siano recettori specifici per gli acidi grassi essenziali, quelli nutrizionalmente importanti. Le grosse molecole lipidiche sono scisse dalla lipasi linguale in molecole di minor

peso molecolare (Lohse et al.1997), capaci di stimolare i recettori gustativi. Inoltre, le membrane apicali dei bottoni gustativi contengono trasportatori degli acidi grassi, molecole che permettono l'entrata degli acidi grassi nelle cellule (Fukuwatari et al. 1997). Gilbertson et al. (1997) hanno rilevato che la presenza degli acidi grassi chiude il canale del potassio, normalmente aperto, depolarizzando la membrana.

Il secondo tipo di risposta alla stimolazione gustativa e/o olfattoria si verifica a livello del sistema limbico - ipotalamico dove genera risposte della sfera edonistica emozionale.

La dimensione edonistica delle sensazioni che definisce il sapore di una sostanza gioca un ruolo cruciale nel controllo di molte risposte correlate con l'ingestione o la reiezione del cibo (Smith and Vogt, 1997). E' noto che il senso del gusto e dell'olfatto sono i discriminanti sensoriali primari su cui sono basate le scelte alimentari effettuate dall'organismo umano (Drewnowski, et al., 1987; Glanz, et al., 1998).

Stimoli gradevoli evocano approcci di accettazione, mentre stimoli sgradevoli evocano reazioni di rifiuto e reiezione, determinando così preferenze e avversioni gustative (Smith and Vogt, 1997).

Le vie gustative e quelle olfattorie hanno diretti ed inequivocabili legami con le strutture del Sistema Nervoso Centrale implicate nella modulazione delle emozioni (Van Toller, 1998), che testimoniano a favore di una connessione tra i sensi del gusto e dell'olfatto e l'insorgere delle emozioni (Fig. 1). Complesse e numerose proiezioni gustative e olfattive si connettono con strutture del sistema limbico, in particolare con l'amigdala e l'ippocampo (Fig. 1) (Aggelton and Mishkin, 1986; Price, 1987).

Sono stati sviluppati parecchi metodi soggettivi volti a stimare la dimensione edonistica della stimolazione gustativa e di quella olfattoria. Secondo queste metodologie, ai soggetti veniva chiesto di classificare ciascuno stimolo con un particolare attributo, usando questionari o scale edonistiche.

Tuttavia, anche quando l'analisi cognitiva da parte dei soggetti risulti precisa, una corretta e attendibile valutazione deve essere corredata dal rilievo dell'attivazione edonistico-emozionale. Quest'ultima non è traducibile fedelmente sulla base della sola integrazione corticale, che peraltro è temporalmente ad essa conseguente.

Tali considerazioni, unitamente alla talora carente corrispondenza lessicale per una fedele descrizione dell'esperienza gustativa e/o olfattoria, limitano la validità dei metodi di indagine basati esclusivamente sul richiedere ai soggetti di descrivere le loro esperienze emozionali (Köster, 1990; Ledoux, 1994).

All'approccio metodologico su menzionato andrebbe perciò più correttamente associata una precisa valutazione degli eventi emozionali indotti per via gustativa e/o olfattoria. Al proposito, vanno considerate l'estrema rapidità e ampiezza con cui il Sistema Nervoso Autonomo evoca una serie di risposte vegetative (Fig. 3), "indicatori" altamente sensibili di reattività alle stimolazioni sensoriali e preziosi strumenti per differenziare stati emozionali diversi tra loro (Ekman et al., 1983; Collet et al., 1997).

L'analisi di risposte autonome registrate in tempo reale potrebbe perciò essere di grande interesse, dal momento che la percezione dello stimolo sensoriale può evocare cambiamenti fisiologici di funzioni viscerali, come la secrezione ghiandolare e/o l'attività del sistema cardio - circolatorio.

Recenti risultati hanno dimostrato che alcuni sapori possono indurre risposte del SNA di differente ampiezza e durata, in accordo con la valenza edonistica e con la carica emozionale evocata da ciascun gusto primario salato, dolce, (Rousmans et al., 2000; Horio 2000; Ohara et al. 1979, 1988). Ciò è stato peraltro confermato anche valutando le risposte associate alla percezione di vari odori (Alaoui-Ismaïli et al., 1997a; 1997b; Robin et al., 1998; 1999).

L'insieme di questi risultati mette perciò in evidenza sia la validità metodologica che l'opportunità che scaturisce da procedure di analisi funzionali

neurovegetative al fine di valutare livelli emozionali associabili a stimolazioni chemosensoriali gustative e/o olfattorie.

Un parametro funzionale soggetto alla regolazione da parte del SNA che può essere facilmente studiato in tempo reale è la frequenza cardiaca.

Nei soggetti adulti normali la frequenza cardiaca media a riposo è circa di 70 battiti al minuto, mentre nei bambini è più elevata. Durante il sonno la frequenza cardiaca si riduce di 10 – 20 battiti per minuto, ma nel corso di particolari stati emotivi o nell'attività muscolare può aumentare a frequenze superiori a 100 battiti per minuto.

Anche se alcuni fattori locali, come la temperatura e lo stiramento tissutale, possono modificare la frequenza cardiaca, il Sistema Nervoso Autonomo rappresenta il principale mezzo mediante il quale può essere controllata (Akselrod et al. 1985; Sayer 1973) In gran parte delle situazioni infatti, il nodo seno-atriale è sottoposto all'influenza tonica di entrambe le suddivisioni del Sistema Nervoso Autonomo (Fig. 3).

Il sistema simpatico esercita un effetto facilitatorio sulla ritmicità del pacemaker, mentre il parasimpatico ha effetti inibitori.

Le fibre cardiache parasimpatiche originano nel bulbo, da una colonna di cellule situate nel nucleo motorio dorsale del vago o nella regione del nucleo ambiguo. Nell'uomo, le fibre vagali efferenti decorrono nel collo in prossimità delle arterie carotidi comuni e quindi entrano nel mediastino, ove formano sinapsi con le cellule post gangliari. Queste cellule sono situate nello stesso cuore sia sulla superficie epicardica o nello spessore delle pareti cardiache. Gran parte delle cellule gangliari cardiache sono localizzate vicino al nodo seno-atriale (SA) e al tessuto di conduzione atrioventricolare (AV). Il vago destro e sinistro di norma sono distribuiti in modo diverso nelle varie strutture cardiache. Il vago destro influenza principalmente il nodo SA. La sua stimolazione produce bradicardia sinusale o anche completa soppressione dell'attività nodale per diversi secondi. Il vago sinistro esercita il suo maggior effetto sul tessuto di conduzione AV e può

produrre diversi gradi di blocco AV. Comunque sussiste una notevole sovrapposizione di distribuzione, tanto che la stimolazione del vago sinistro deprime anche il nodo SA e la stimolazione del vago destro provoca una certa alterazione della conduzione AV.

I nodi SA e AV sono ricchi di colinesterasi, un enzima che scinde il neurotrasmettitore acetilcolina. Di conseguenza, gli effetti provocati dagli impulsi vagali sono, dopo la fine della stimolazione vagale, di breve durata, poiché l'acetilcolina liberata a livello dei terminali nervosi viene rapidamente idrolizzata. Inoltre, gli effetti dell'attività vagale sulla funzione del nodo SA e AV hanno latenza molto breve, perché l'acetilcolina liberata dai terminali attiva speciali canali K^+ delle cellule cardiache. L'apertura di questi canali è molto rapida in quanto non richiede l'intervento di un secondo messaggero, come il sistema dell'adenilato ciclasi. La combinazione di una breve latenza e di un rapido esaurimento della risposta conferisce al nervo vago la capacità di controllare battito per battito la funzione del nodo SA e AV.

A livello del nodo SA, le influenze parasimpatiche prevalgono su quelle simpatiche.

Le fibre simpatiche cardiache originano dalla colonna intermedio-laterale per i primi 5 o 6 segmenti toracici e dell'ultimo e penultimo segmento cervicale del midollo spinale. Le fibre escono dal midollo spinale attraverso i rami comunicanti bianchi ed entrano nella catena dei gangli paravertebrali. Le sinapsi tra i neuroni pre-gangliari e post-gangliari hanno luogo soprattutto nel ganglio stellato o nel ganglio cervicale medio. Questi gangli sono situati nelle porzioni superiori del mediastino, in prossimità dei nervi vaghi. Le fibre simpatiche e parasimpatiche si uniscono quindi per formare una complessa rete di nervi efferenti misti destinati al cuore. Le fibre simpatiche post-gangliari di questa rete raggiungono la base del cuore decorrendo lungo la superficie avventizia dei grandi vasi. Raggiunta la base del cuore, queste fibre si distribuiscono alle varie camere, formando un esteso plesso epicardio. Esse penetrano poi nel miocardio, seguendo di norma le varie

branche dei vasi coronarici. Come nel caso dell'innervazione vagale, sussiste una certa distribuzione differenziale delle fibre simpatiche cardiache di destra e di sinistra.

Gli effetti della stimolazione simpatica scompaiono molto gradualmente dopo la fine della stimolazione, contrariamente all'improvvisa scomparsa della risposta dopo l'attivazione vagale. Gran parte della noradrenalina liberata durante la stimolazione simpatica è ricaptata dai terminali assonici mentre una parte minore viene prelevata dalla circolazione. Questi processi sono relativamente lenti. Inoltre, all'inizio della stimolazione simpatica, gli effetti facilitatori sul cuore raggiungono valori stazionari molto più lentamente di quanto non avvenga per gli effetti inibitori della stimolazione vagale. L'inizio della risposta cardiaca alla stimolazione simpatica è lento per due principali motivi. Primo, la noradrenalina viene liberata dai terminali nervosi delle fibre simpatiche cardiache a velocità relativamente bassa. Secondo, gli effetti della noradrenalina liberata dai terminali nervosi sono mediati dalla via relativamente lenta dei secondi messaggeri, specie dal sistema dell'adenilato ciclasi. L'attività simpatica modifica quindi la frequenza cardiaca e la conduzione AV molto più lentamente di quanto non faccia l'attività vagale. Pertanto, l'attività vagale, ma non quella simpatica, può esercitare un controllo battito per battito della funzione cardiaca.

La frequenza cardiaca, che rappresenta l'andamento temporale di insorgenza del ritmo sinusale, non assume un valore costante nel tempo, ma subisce continue fluttuazioni attorno ad un valore medio come conseguenza di continue modificazioni dell'equilibrio simpatico-vagale. Tali fluttuazioni della frequenza cardiaca sono la naturale variabilità (HRV) in risposta a fattori quali il ritmo del respiro, gli stati emozionali, lo stato d'ansia, stress, rabbia, rilassamento, pensieri, etc. In un cuore sano, la frequenza cardiaca risponde velocemente a tutti questi fattori, modificandosi a seconda delle situazioni, per meglio far adattare l'organismo alle diverse esigenze che l'ambiente continuamente ci sottopone. In generale, un individuo sano mostra un buon grado di variabilità della frequenza

cardiaca, cioè un buon grado di adattabilità psicofisica alle diverse situazioni. La variabilità della frequenza cardiaca (HRV) esprime l'interazione fra il Sistema Nervoso Simpatico e Parasimpatico.

In particolare, il Sistema Nervoso Simpatico, quando viene attivato, produce una serie di effetti quali: accelerazione del battito cardiaco, dilatazione dei bronchi, aumento della pressione arteriosa, vasocostrizione periferica, dilatazione pupillare, aumento della sudorazione, inibizione delle funzioni gastro-intestinali. Il Sistema Simpatico è la normale risposta dell'organismo ad una situazione di allarme, lotta, stress.

Al contrario, il Sistema Nervoso Parasimpatico, quando viene attivato, produce un rallentamento del ritmo cardiaco, un aumento del tono muscolare bronchiale, dilatazione dei vasi, diminuzione della pressione, rallentamento della respirazione, aumento del rilassamento muscolare, aumento di tutte le risposte correlate con la preparazione all'ingestione di cibo (secrezione salivare, deglutizione, aumento della motilità gastrica e intestinale, secrezione dei succhi digestivi e incremento del flusso sanguigno al sistema gastrointestinale), il respiro diventa più calmo e profondo, i genitali, mani e piedi diventano più caldi. Il Sistema Parasimpatico rappresenta la normale risposta dell'organismo ad una situazione di calma, riposo, tranquillità ed assenza di pericoli e stress.

Il nostro corpo, in ogni momento, si trova in una situazione determinata dall'equilibrio o dalla predominanza di uno di questi due sistemi nervosi.

La capacità dell'organismo di modificare il proprio bilanciamento verso l'uno o verso l'altro sistema, è molto importante ed è un meccanismo fondamentale che tende all'equilibrio dinamico dell'organismo sia dal punto di vista fisiologico che psicologico.

Da ciò la grande importanza di avere oggi uno strumento scientifico come l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV) in grado di valutare lo stato relativo del Sistema Nervoso Simpatico e Parasimpatico. Attualmente l'analisi della HRV è spesso usata come metodo non invasivo per lo studio della

funzione integrata neuro-cardiaca, perché può essere di grande aiuto per distinguere tra la regolazione simpatica e quella parasimpatica del nodo senoatriale sfruttando la differenza di velocità dei loro meccanismi d'azione (Ori et al., 1992). Inoltre, recenti lavori hanno suggerito che l'analisi dell'HRV può essere anche usata per caratterizzare un gran numero di malattie psicologiche, incluse la maggior parte delle depressioni e degli attacchi di panico, dimostrando legami tra gli stati emozionali e l'HRV (Yeragani et al., 1991; 1993).

L'analisi della HRV può essere fatta con diverse procedure che operano nel dominio dei tempi e delle frequenze a partire da tracciati elettrocardiografici registrati per brevi o lunghi periodi di tempo nei quali sia affidabile la misura della durata dell'intervallo RR di battiti cardiaci successivi.

L'analisi nel dominio dei tempi si basa sulla determinazione di indici ottenuti mediante operazioni statistiche semplici eseguite sui valori degli intervalli RR di battiti successivi. Gli indici vengono calcolati a partire dai valori degli intervalli RR misurati in una data finestra temporale. Gli indici di variabilità nel dominio dei tempi più frequentemente usati possono essere suddivisi in due classi. Alla prima classe appartengono indici espressi in msec e si basano sulla misura dell'effettiva durata dell'intervallo RR, il loro valore è influenzato sia dalle oscillazioni rapide che da quelle lente. Tra questi indici il più semplice è la deviazione standard di tutti i normali intervalli RR (SDNN) il cui valore quantifica complessivamente la modulazione di entrambi i sistemi orto- e parasimpatico, ed esprime lo stato di equilibrio tra la componente simpatica e quella parasimpatica (Stein, 2002; Sgoifo et al. 2002; Stein and Kleiger, 1999). Alla seconda classe appartengono indici indipendenti dalle oscillazioni a lungo termine (tono ortosimpatico) e invece influenzati dalle oscillazioni a breve termine, di origine vagale. Tra questi, troviamo la radice quadrata della somma delle differenze elevate al quadrato tra intervalli R-R adiacenti (rMSSD) (Stein, 2002; Stein and Kleiger, 1999).

L'analisi della HRV nel dominio delle frequenze, matematicamente più complessa della precedente, fornisce informazioni sulla quantità totale di HRV

legata alla presenza di oscillazioni periodiche della FC a diversa frequenza (Sayer 1973). L'analisi della HRV nel dominio delle frequenze, utilizzando l'analisi spettrale, dà la possibilità di analizzare separatamente l'influenza sulla HRV delle due componenti del sistema nervoso autonomo, le quali inducono oscillazioni della FC di diversa frequenza (Rimordi et al., 1990; Luczak and Luring, 1973). Anche l'analisi spettrale viene effettuata a partire da un tracciato elettrocardiografico nel quale si riesce a misurare fedelmente la durata delle distanze RR tra un battito e quello successivo escludendo eventuali extrasistoli. A questo punto si può costruire un diagramma (tacogramma) che esprime il valore della distanza RR fra un battito e l'altro in funzione del numero di battiti cardiaci. Dal tacogramma, tramite la trasformata di Fourier, viene calcolato lo spettro di potenza del tacogramma in cui sono riconoscibili diverse componenti a diverse frequenze, e che contiene le informazioni essenziali per arrivare alla stima del bilanciamento fra simpatico e parasimpatico.

Generalmente in individui normali si riconoscono nello spettro di potenza 3 componenti (picchi di potenza) che rappresentano le principali fluttuazioni periodiche della FC. La componente a bassissima frequenza "*Very low frequency (VLF)*" (0.01-0.04 Hz) viene considerata in parte indicativa di attività simpatica ed è anche correlata con i meccanismi della termoregolazione. La componente a bassa frequenza "*Low frequency (LF)*" (0.04-0.15 Hz) è principalmente modulata dall'attività ortosimpatica. Infine, la componente ad alta frequenza "*High frequency (HF)*" (0.15-0.4 Hz) viene considerata espressione di attività parasimpatica. Tale componente è influenzata dal ritmo e dalla profondità della respirazione.

Scopo della ricerca

Il presente lavoro è finalizzato a analizzare gli stati emozionali associati alla valenza edonistica della stimolazione gustativa.

Allo scopo, in qualità di indicatore altamente sensibile di reattività a stimolazioni sensoriali, in un primo gruppo di esperimenti, abbiamo analizzato, in tempo reale, le variazioni del ritmo sinusale e il corrispondente bilancio simpatico-vagale associati a stimolazioni gustative effettuate con stimoli gradevoli che evocano approcci di accettazione, e stimoli sgradevoli che evocano reazioni di rifiuto o reiezione. Dato che la componente simpatica e quella vagale del controllo della funzione cardiaca è diversa nei due sessi (Evans et al. 2001; Dart et al. 2002) abbiamo voluto verificare le possibili variazioni del ritmo sinusale e del bilancio simpatico-vagale sia in femmine che in maschi di età adulta.

Il bilancio simpatico-vagale è stato valutato mediante analisi della HRV nel dominio dei tempi e delle frequenze. Quali indici di variabilità nel dominio dei tempi sono state calcolate la deviazione standard di tutti i normali intervalli RR (SDNN) e la radice quadrata della somma delle differenze elevate al quadrato tra intervalli R-R adiacenti (rMSSD).

Recenti risultati hanno dimostrato che ciascun gusto primario (salato, dolce, amaro e acido) induce aumenti del ritmo sinusale anche se di differente entità e durata, in accordo con la valenza edonistica e con la carica emozionale evocata, anche quando gli stimoli siano stati classificati come stimoli con opposta valenza edonistica, come per esempio il dolce e l'acido (Rousmans et al., 2000; Horio et al. 2000).

Dato che nel primo gruppo di esperimenti, in qualità di stimolo piacevole è stato utilizzato uno stimolo con un'alta percentuale di grassi, l'effetto dei quali sulla frequenza cardiaca non era stato ancora verificato, si è voluto procedere con un secondo gruppo di esperimenti volti a verificare che le variazioni della frequenza cardiaca trovate fossero effettivamente dovute alla valenza edonistica

evocata dalla stimolazione gustativa e non dalla natura chimica lipidica dello stimolo utilizzato. Allo scopo, nel secondo gruppo di esperimenti sono state confrontate le variazioni del ritmo sinusale e il corrispondente bilancio simpatico-vagale associate alla stimolazione gustativa effettuata con lo stimolo gradevole usato nel primo gruppo di esperimenti, con quelle indotte da un altro stimolo con lo stesso contenuto di grassi, che però non evocasse una valenza edonistica positiva né una negativa.

Per essere sicuri di scegliere un panel di assaggiatori adatto per un'analisi così delicata come è quella sensoriale dove lo "strumento" è l'uomo e la sua capacità di distinguere e valutare i diversi stimoli gustativi, in questo secondo gruppo di esperimenti si è voluto precedere ad una selezione estremamente attenta e scrupolosa dei candidati che volessero entrare a far parte del panel di assaggiatori valutando preventivamente le loro attitudini e le loro capacità percettive.

PRIMA SERIE DI ESPERIMENTI

Valutazione degli stati emozionali e del bilancio simpatico-vagale associati alla valenza edonistica della stimolazione gustativa .

Materiali e Metodi

Gli esperimenti sono stati effettuati su due panels composti uno da 12 persone di sesso femminile e l'altro da 12 volontari di sesso maschile. In tutti e due i casi le persone avevano un'età compresa tra i 21 e 28 anni. I membri dei panels sono stati selezionati tra gli studenti frequentanti la Cittadella Universitaria di Monserrato che si erano resi disponibili, che fossero motivati a completare il proprio lavoro coscientemente e che avessero disponibilità almeno per due sessioni di misura complete.

Per ottenere un campione rappresentativo della popolazione, ai “panel members” veniva effettuato un test per assicurarsi che nessuno avesse evidenti disfunzioni gustative od olfattorie, che non soffrisse di raffreddore o di qualsiasi indisposizione che potesse sovrapporsi con le capacità percettive. Inoltre, a ciascuno veniva chiesto di avere estrema attenzione a non interferire con la percezione propria o degli altri a causa di scarsa igiene personale, o al contrario con l'uso eccessivo di profumi o deodoranti ecc.

Tutti avevano il divieto assoluto di fumare (le ragazze erano tutte non fumatrici), mangiare, bere (eccetto acqua), masticare chewing-gum e di svolgere attività fisica o fare sforzi eccessivi nell'ora antecedente l'esperimento.

Gli esperimenti sono stati effettuati in uno dei laboratori della Sezione di Fisiologia Generale del Dipartimento di Biologia Sperimentale, dove venivano mantenute costanti la temperatura (23 - 24° C), l'umidità relativa (40 – 50%) e l'illuminazione (luce standard solare bianca, 15.000 lux).

Registrazioni elettrocardiografiche

Le registrazioni elettrocardiografiche (ECGs) venivano effettuate in continuo per tutta la durata dell'esperimento secondo la I derivazione di Einthoven. In questo tipo di derivazione, i due elettrodi derivanti venivano collegati nel seguente modo: al braccio destro il polo negativo, al braccio sinistro il polo positivo, un elettrodo di massa veniva applicato alla gamba sinistra.

Il contatto elettrico degli elettrodi con la cute veniva migliorato tramite l'interposizione di un gel conduttivo comunemente usato nella pratica elettrocardiografia (Comedical, Cogel).

Secondo Einthoven i tre punti di derivazione (braccio destro, braccio sinistro e gamba sinistra), oltre a godere del fatto che sono facilmente localizzabili, possono considerarsi come i vertici di un triangolo (triangolo di Einthoven) in cui il cuore occupa una posizione approssimativamente centrale (Fig.4 A). Il cuore, come generatore elettrico, può quindi essere assimilato ad un dipolo, che durante l'attività miocardica cambia di intensità e direzione producendo le differenze di potenziale che si osservano effettivamente tra i punti di derivazione.

L'attività bioelettrica del cuore così prelevata veniva amplificata e visualizzata sullo schermo di un oscilloscopio (Tektronix 5111) e registrata su nastro magnetico (Vetter 200T). Successivamente gli ECGs venivano trasferiti in un sistema integrato di hardware e software per essere immagazzinati, visualizzati e analizzati (ADInstruments - MacLab S System) (Fig. 4 B).

Stimoli gustativi

Lo stimolo proposto come gradevole e quello proposto come sgradevole sono stati scelti sulla base di un'indagine verbale effettuata sugli studenti che frequentavano il corso di Fisiologia Generale del 3° anno di Biologia Sperimentale l'Anno Accademico precedente.

- Una crema di cioccolato (CC) è stata scelta in qualità di stimolo in grado di evocare una sensazione gradevole.

- Un omogenato di polpa di limone (LH) è stato scelto in qualità di stimolo in grado di evocare una sensazione sgradevole.
- Una gelatina edibile incolore, insapore e inodore (Cameo) è stata utilizzata come stimolo di controllo.

Per ogni esperimento ciascuno stimolo veniva preparato il giorno prima e conservato in un contenitore di vetro in frigorifero a 4° C. Mezz'ora prima di iniziare l'esperimento, 10 ml di ciascuno stimolo venivano prelevati dai contenitori e trasferiti in beakers, che erano stati precedentemente oscurati per impedire al volontario sotto esperimento di vedere il colore dello stimolo. I beakers venivano posizionati su di un tavolo del laboratorio vicino alla strumentazione. Prima di iniziare l'esperimento, ci si assicurava che la consistenza degli stimoli fosse la stessa e che fosse sempre uguale in ogni esperimento.

La stimolazione veniva effettuata applicando, mediante una siringa privata dell'ago, 1 ml di stimolo sulla lingua dell'assaggiatore al quale era stato chiesto, immediatamente prima, di aprire la bocca. Alla fine di ogni stimolazione, che durava circa 1 s, veniva detto al volontario di chiudere la bocca.

Gli stimoli sono stati somministrati nel seguente ordine: controllo, LH, CC. Quest'ultimo stimolo veniva presentato per ultimo per la lunga durata del suo retro – gusto e per il suo effetto mascherante. Tra uno stimolo e l'altro, la cavità orale veniva sempre risciacquata con acqua minerale, per evitare il mescolarsi dei sapori. Le stimolazioni venivano sempre effettuate da uno sperimentatore dello stesso sesso del volontario in modo da evitare che si potessero sentire imbarazzati emotivamente.

Procedura sperimentale

Ciascun volontario doveva presentarsi nel laboratorio almeno 15 min prima dell'inizio delle misure per abituarsi alle condizioni ambientali del laboratorio che venivano mantenute costanti per tutta la sessione sperimentale. Durante questo periodo di tempo, i volontari venivano informati verbalmente della procedura. Ciascuno veniva fatto sedere su una poltrona con braccioli e veniva invitato a stare tranquillo e rilassato, quindi gli venivano applicati gli elettrodi.

Dopo essersi assicurati che l'elettrocardiogramma registrato fosse ben leggibile si aspettava un periodo necessario (30 minuti circa) per il ripristino dell'attività cardiaca di base dopo l'attività fisica compiuta per raggiungere il laboratorio, l'attenzione tenuta durante la spiegazione della procedura e la posizionatura degli elettrodi.

Una volta essersi assicurati, osservando l'oscilloscopio che l'attività cardiaca fosse regolare, questa veniva registrata in continuo per 3 minuti. Quindi, continuando la registrazione elettrocardiografica, si iniziava con la serie di stimolazioni gustative. Tra una stimolazione e l'altra si lasciava passare un periodo di 10 minuti.

Alla fine di ciascuna sessione sperimentale il volontario veniva sottoposto a un questionario di valutazione per la classificazione verbale del tono edonistico evocato da ciascuno stimolo. Mediante tale test, ciascuno stimolo veniva collocato in una scala edonistica a 5 valori:

+2, estremamente gradevole;

+1 lievemente gradevole;

0, né gradevole né sgradevole;

-1, lievemente sgradevole;

-2 estremamente sgradevole.

Dopo una settimana di pausa, gli esperimenti sono stati ripetuti sugli stessi due "panel members" nelle stesse condizioni sperimentali.

Analisi dei dati

Le differenze tra i valori medi \pm ES dei punteggi assegnati al tono edonistico evocato da ciascuno stimolo sono state analizzate con ANOVA a una via (Statistica, StatSoft). Il confronto a due a due è stato effettuato mediante il test post-hoc di Tukey.

Le variazioni del ritmo sinusale associate alle stimolazioni gustative sono state valutate in intervalli temporali corrispondenti a 100 battiti successivi (\cong 80 s), prima di iniziare con le stimolazioni gustative (attività di base) e nei 100 battiti successivi (\cong 80 s) a ciascuna stimolazione. Le differenze tra i valori medi \pm ES della distanza R-R durante l'attività di base e dopo la stimolazione gustativa di controllo ed inoltre, le differenze tra questi ultimi e quelli misurati dopo le stimolazioni gustative gradevole e sgradevole sono stati confrontati con ANOVA a una via (Statistica, StatSoft). Un test post-hoc di Tukey è stato effettuato per confrontare l'efficacia degli stimoli nell'evocare variazioni del ritmo sinusale.

I risultati trovati nella prima serie di esperimenti e in quelli ripetuti sono stati confrontati con ANOVA a una via per misure ripetute (Statistica, StatSoft).

Analisi nel dominio dei tempi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV).

La deviazione standard di tutti i normali intervalli RR (SDNN) e la radice quadrata della somma delle differenze elevate al quadrato tra intervalli R-R adiacenti (rMSSD) sono state calcolate per i 100 battiti che seguono ciascuna stimolazione gustativa. Le differenze sono state confrontate con il test di Student per dati appaiati.

Analisi nel dominio delle frequenze della variabilità della frequenza cardiaca (HRV).

A partire da ogni elettrocardiogramma registrato, usando il Modulo HRV del software Chart 5 Beta 0.1– ADInstruments, sono stati calcolati la trasformata di Fourier e lo spettro di potenza di ciascun tacogramma in segmenti temporali

corrispondenti a 100 battiti precedenti e successivi ad ogni stimolazione gustativa. Ciascuno spettro di potenza è stato diviso in 3 grossi ranges di frequenza , bassissime (VLF; 0.01-0.04 Hz), basse (LF; 0.04-0.15 Hz) e alte frequenze (HF; 0.15-0.4 Hz), e per ciascun range (VLF, LF e HF) è stata determinata l'area calcolando l'integrale dello spettro di potenza. Successivamente sono state calcolate le variazioni percentuali delle aree di ciascuna regione (VLF, LF e HF) calcolate nei 100 battiti successivi ad ogni stimolazione, rispetto a quelle calcolate nello stesso individuo prima delle stimolazioni (livello di base). Le differenze sono state confrontate con il test di Student per dati appaiati.

Risultati

Esperimenti effettuati sulle femmine

I punteggi assegnati alla dimensione edonistica (valori medi \pm ES) evocata dalla stimolazione gustativa effettuata con la crema di cioccolato (CC), con l'omogenato di polpa di limone (LH), e con la gelatina alimentare (controllo, C) sono mostrati in Fig 5. Dall'analisi di tali punteggi di entrambe le sessioni sperimentali è risultato che il valore attribuito a ciascuno stimolo dipende dal tipo di stimolazione effettuata ($F = 82.92$; $p < 0,00001$; ANOVA Statistica, StatSoft), che il CC è estremamente gradevole ed il punteggio assegnato alla dimensione edonistica evocata è maggiore di quello attribuito al tono edonistico evocato sia dal controllo, risultato né gradevole né sgradevole, sia dal LH, risultato estremamente sgradevole ($p = 0.000126$; test post-hoc di Tukey, Statistica, StatSoft). Diversamente il punteggio assegnato alla dimensione edonistica evocata dal LH è risultato inferiore anche al tono edonistico evocato dal controllo ($p = 0.000126$; test post-hoc di Tukey, Statistica, StatSoft).

In tutte e due le sessioni sperimentali, il valore medio \pm ES della distanza R-R dei 100 battiti ($\cong 80$ s) precedenti l'inizio delle stimolazioni (prima serie di esperimenti: 0.78 ± 0.0044 s; esperimenti ripetuti: 0.75 ± 0.0037 s) non era variato ($p > 0.05$; test post-hoc di Tukey, Statistica, StatSoft) rispetto a quello misurato nei 100 battiti successivi alla stimolazione di controllo (prima serie di esperimenti: 0.78 ± 0.0037 ; esperimenti ripetuti: 0.764 ± 0.0030 s).

Sia nella prima sessione sperimentale che negli esperimenti ripetuti, i risultati di ANOVA evidenziano un significativo effetto della stimolazione gustativa sull'intervallo R-R medio dei 100 battiti successivi a ciascuna stimolazione (prima serie di esperimenti: $F_{(2, 4500)} = 100.07$, $p < 0,00001$; esperimenti ripetuti: $F_{(2, 3000)} = 59.422$; $p < 0,00001$; ANOVA Statistica, StatSoft) (Fig 6) e il test post hoc di Tukey indica un aumento (prima serie di esperimenti: $p = 0.000022$; esperimenti ripetuti:

$p = 0.0046$; Statistica, StatSoft) e una diminuzione ($p = 0.000022$ in tutte e due le sessioni sperimentali, Statistica, StatSoft) dell'intervallo R-R medio rispettivamente dopo la stimolazione gradevole effettuata con il CC (prima serie di esperimenti: 0.804 ± 0.0034 s; esperimenti ripetuti: 0.779 ± 0.0035 s negli) e dopo quella sgradevole effettuata con il LH (prima serie di esperimenti: 0.75 ± 0.0037 s; esperimenti ripetuti: 0.727 ± 0.0033 s) rispetto al valore medio misurato dopo la stimolazione di controllo (prima serie di esperimenti: 0.78 ± 0.0047 s; esperimenti ripetuti: 0.764 ± 0.0030 s).

ANOVA a una via per misure ripetute indica che non ci sono differenze tra i risultati della prima serie di esperimenti e quelli degli esperimenti ripetuti ($F_{(2, 3000)} = 1.2323$; $p = 0.291$; Statistica, StatSoft) (Fig. 6).

Il ritmo sinusale non assume mai, sia nei soggetti normali che in quelli cardiopatici, un valore costante nel tempo, ma subisce continue fluttuazioni attorno a un valore medio che, come già visto nella figura precedente, è diverso quando è misurato nei 100 battiti successivi alle tre diverse stimolazioni gustative. Osservando i tacogrammi medi dei 100 battiti successivi alle tre stimolazioni, appare evidente che l'aumento dell'intervallo R-R misurato dopo la stimolazione con il CC inizia già dopo un brevissimo periodo di tempo (circa 4 s) e si estingue dopo circa 1 min. Diversamente la riduzione misurata dopo la stimolazione con il LH inizia solo dopo circa 20 s e si mantiene fino al centesimo battito (Fig. 7).

L'analisi nel dominio dei tempi effettuata calcolando la SDNN (Fig. 8) e la rMSSD (Fig. 9) nel range temporale corrispondente a 100 battiti successivi alle tre stimolazioni gustative indica che, rispetto ai valori misurati dopo la stimolazione di controllo, sia la SDNN, indice dello stato di attivazione dei due sistemi simpatico e parasimpatico, che rMSSD, indice dell'attivazione parasimpatica, sono significativamente maggiori ($p \leq 0.02$; $p \leq 0.017$, test di Student per dati appaiati) quando misurate nei 100 battiti successivi alla stimolazione effettuata con il CC che evoca una sensazione gradevole. Mentre, la stimolazione sgradevole effettuata

con LH evoca una riduzione che risulta significativa della sola rMSSD ($p \leq 0.017$, test di Student per dati appaiati) (Fig. 8 e 9).

Tra i valori medi \pm ES della SDNN e della rMSSD calcolati nel range temporale corrispondente a 100 battiti successivi alle tre stimolazioni gustative nella prima serie di esperimenti e in quelli ripetuti non sono risultate differenze significative ($F_{(2, 339)} = 0.3069$, $p = 0.7358$; $F_{(2, 339)} = 0.2499$, $p = 0.7789$; ANOVA a una via per misure ripetute; Statistica, StatSoft).

Esempi dell'analisi dell'HRV nel dominio delle frequenze effettuate nell'intervallo temporale di 100 battiti successivi durante l'attività di base, dopo stimolazione gradevole e dopo stimolazione sgradevole sono mostrati nelle Figg. 10, 11, e 12. In particolare nelle tre figure sono mostrati in alto il tacogramma cioè in diagramma che rappresenta la distanza RR fra un battito cardiaco e quello successivo in funzione dei battiti cardiaci, in basso lo spettro di potenza calcolato sul corrispondente tacogramma tramite la trasformata di Fourier. Nella Fig 10 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza calcolati durante l'attività di base. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 621.01 ms^2 , 249.48 ms^2 e 446.15 ms^2 . Nella Fig 11 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione sgradevole con il LH, in questo caso, i valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono rispettivamente 891.24 ms^2 , 777.19 ms^2 e 1013.73 ms^2 . In ultimo nella Fig 12 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione gradevole con il CC. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 227.10 ms^2 , 1399.48 ms^2 e 1342.48 ms^2 .

Nella Fig 13 sono mostrate le variazioni percentuali medie \pm ES delle aree di ciascuna regione (VLF, LF e HF) calcolate nei 100 battiti successivi alla stimolazione sgradevole (LH) e a quella gradevole (CC), rispetto a quelle calcolate nei 100 battiti successivi prima di iniziare le stimolazioni (valore pre-stimolo). Da

tale figura appare evidente che la sola stimolazione gradevole evoca un aumento ($p \leq 0.001$; test di Student per dati appaiati) delle potenze delle LF ($+ 170.78 \pm 43.79$ %) e delle HF ($+ 292.43 \pm 102.66$ %) rispetto ai valori pre-stimolo..

Esperimenti effettuati nei maschi

In Fig 14 sono mostrati i punteggi assegnati alla dimensione edonistica (valori medi \pm ES) evocata dalla stimolazione gustativa effettuata con il CC, con il LH, e con il controllo. Anche nel caso dei maschi, dall'analisi di tali punteggi di entrambe le sessioni sperimentali è risultato che il valore attribuito a ciascuno stimolo dipende dal tipo di stimolazione effettuata ($F \leq 91.12$; $p < 0,00001$; ANOVA Statistica, Stat soft), che il CC è estremamente gradevole ed il punteggio assegnato alla dimensione edonistica evocata è maggiore di quello attribuito al tono edonistico evocato sia dal controllo, risultato né gradevole né sgradevole, sia dal LH, risultato estremamente sgradevole ($p \leq 0.000119$; test post-hoc di Tukey, Statistica, Statsoft). Diversamente il punteggio assegnato alla dimensione edonistica evocata dal LH è risultato inferiore anche al tono edonistico evocato dal controllo ($p \leq 0.000119$; test post-hoc di Tukey, Statistica, Statsoft).

Nella prima sessione sperimentale il valore medio \pm ES della distanza R-R misurata nei 100 battiti ($\cong 80$ s) precedenti l'inizio delle stimolazioni era di 0.871 ± 0.0039 s (attività di base) e nei 100 battiti successivi alla stimolazione di controllo risulta lievemente aumentato (0.893 ± 0.0046 s; $p < 0.001$; test post-hoc di Tukey, Statistica, Statsoft). Mentre negli esperimenti ripetuti la distanza R-R media misurata prima dell'inizio delle stimolazioni era di 0.813 ± 0.00314 s e non risultava variata dopo la stimolazione di controllo (0.819 ± 0.00313 s; $p > 0.05$; test post-hoc di Tukey, Statistica, Statsoft).

Anche nel caso dei maschi, sia nella prima sessione sperimentale che negli esperimenti ripetuti, i risultati di ANOVA evidenziano un significativo effetto della stimolazione gustativa sull'intervallo R-R medio dei 100 battiti successivi a ciascuna stimolazione (prima serie di esperimenti: $F_{(2, 4200)} = 62.071$, $p < 0.00001$; esperimenti ripetuti: $F_{(2, 1800)} = 35.079$; $p < 0,00001$; ANOVA Statistica, Stat soft) (Fig 15) e il test post hoc di Tukey indica, rispetto al valore medio misurato dopo la

stimolazione di controllo (prima serie di esperimenti: 0.89 ± 0.0046 s; esperimenti ripetuti: 0.819 ± 0.00313 s), un aumento (prima serie di esperimenti: $p = 0.0017$ e esperimenti ripetuti: $p = 0.00044$; Statistica, Statsoft) e una diminuzione (prima serie di esperimenti: $p = 0.000022$; esperimenti ripetuti: $p = 0.000035$, Statistica, Statsoft) dell'intervallo R-R medio rispettivamente dopo la stimolazione gradevole effettuata con il CC (prima serie di esperimenti: 0.910 ± 0.0042 s; esperimenti ripetuti: 0.843 ± 0.0049 s) e dopo quella sgradevole effettuata con il LH (prima serie di esperimenti: 0.858 ± 0.0044 s; esperimenti ripetuti: 0.791 ± 0.0041 s).

Anche in questo caso, ANOVA a una via per misure ripetute indica che non ci sono differenze tra i risultati della prima serie di esperimenti e quelli degli esperimenti ripetuti ($F_{(2, 2097)} = 3.9517$; $p = 0.059$; Statistica, Stat soft) (Fig. 15).

Osservando i tacogrammi medi dei 100 battiti successivi alle tre stimolazioni, appare evidente che, anche nel caso dei maschi, l'aumento dell'intervallo RR medio misurato dopo la stimolazione con il CC si manifesta precocemente (già dopo il primo battito) e ha una durata inferiore (40 s) rispetto alla diminuzione che si verifica dopo la stimolazione con il LH che si verifica, nel caso dei maschi, dopo 8 s circa e si mantiene per tutto il periodo analizzato (Fig 16).

L'analisi nel dominio dei tempi effettuata calcolando la SDNN (Fig. 17) e la rMSSD (Fig. 18) nel range temporale corrispondente a 100 battiti successivi alle tre stimolazioni gustative indica che, come nelle femmine, anche nel caso dei maschi, sia la SDNN che rMSSD sono significativamente maggiori ($p \leq 0.023$ e ; $p \leq 0.016$, test di Student per dati appaiati) quando misurate nei 100 battiti successivi alla stimolazione effettuata con il CC che evocava una sensazione gradevole. Mentre quando misurate dopo la stimolazione sgradevole effettuata con il LH, la rMSSD mostra una tendenza a diminuire e la SDNN ad aumentare (Fig. 17 e 18).

Tra i valori medi \pm ES della SDNN e rMSSD calcolati nel range temporale corrispondente a 100 battiti successivi alle tre stimolazioni gustative nella prima

serie di esperimenti e in quelli ripetuti non sono risultate differenze significative ($F_{(2, 354)} = 0.1868$, $p = 0.8296$; $F_{(2, 354)} = 0.5593$, $p = 0.5781$; ANOVA a una via per misure ripetute; Statistica, StatSoft) (Fig. 17 e 18).

Esempi dell'analisi dell'HRV nel dominio delle frequenze effettuate nell'intervallo temporale di 100 battiti successivi durante l'attività di base, dopo stimolazioni gradevole e dopo stimolazione sgradevole nei maschi sono mostrati nelle Figg. 19, 20, e 21. In particolare nelle tre figure sono mostrati in alto il tacogramma e in basso lo spettro di potenza calcolato sul corrispondente tacogramma tramite la trasformata di Fourier. Nella Fig 19 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza calcolati durante l'attività di base. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 56.02 ms^2 , 673.45 ms^2 e 136.38 ms^2 . Nella Fig 20 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione sgradevole con il LH, in questo caso, i valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono rispettivamente 242.54 ms^2 , 2129.81 ms^2 e $166,48 \text{ ms}^2$. In ultimo nella Fig 21 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione gradevole con il CC. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 335.92 ms^2 , 3987.51 ms^2 e 6930.09 ms^2 .

Nella Fig 22 sono mostrate le variazioni percentuali medie \pm ES delle aree di ciascuna regione (VLF, LF e HF) calcolate nei 100 battiti successivi alla stimolazione sgradevole (LH) e a quella gradevole (CC), rispetto a quelle calcolate nei 100 battiti successivi prima di iniziare le stimolazioni (valore pre-stimolo). Nei maschi, oltre che l' aumento ($p \leq 0.001$; test di Student per dati appaiati) rispetto ai valori pre-stimolo delle potenze delle LF ($+ 124.05 \pm 30.33 \%$) e delle HF ($+ 98.51 \pm 33.70 \%$) associato alla stimolazione gradevole con il CC, già visto nelle femmine, si misura un aumento ($p \leq 0.001$; test di Student per dati appaiati) delle

potenze delle VLF ($+ 93.31 \pm 51.43 \%$) e LF ($+ 85.20 \pm 24.59 \%$) associato alla stimolazione sgradevole con l'LH.

Conclusioni

L'analisi del ritmo sinusale e della sua regolazione ci ha permesso di evidenziare differenze tra le reazioni emozionali e variazioni del bilancio simpatico-vagale associate alla percezione di stimoli gustativi che evocano opposta valenza edonistica in femmine e in maschi di età adulta.

Nelle femmine la stimolazione effettuata con la gelatina alimentare, classificata come “stimolo neutro” nel test per la valutazione del tono edonistico, è risultata totalmente inefficace nell'indurre variazioni del ritmo sinusale. Infatti, la distanza R-R misurata nei 100 battiti successivi alla stimolazione con gelatina alimentare non ha determinato variazioni del ritmo rispetto all'attività di base. Diversamente, gli stimoli gustativi che erano stati classificati nel test per la valutazione edonistica come “stimolo gradevole”, la crema di cioccolato, e come “stimolo sgradevole”, l'omogenato di polpa di limone, hanno determinato bradicardia e tachicardia rispettivamente. Questo suggerisce l'idea che le stimolazioni gustative inducano variazioni del ritmo sinusale che dipendono dal tono edonistico evocato dalla stimolazione effettuata. Tali effetti inoltre, si verificano e durano per tempi diversi: la crema di cioccolato ha determinato un effetto bradicardico che si realizza in tempi più veloci, ma si estingue dopo circa 70 battiti. Il limone contrariamente ha indotto un effetto tachicardico che si realizza dopo un tempo più lungo ma che si mantiene per tutto il tempo analizzato.

Tra l'altro, il fatto che la stimolazione di controllo non abbia evocato variazioni significative nel ritmo sinusale rispetto all'attività di base avvalorata la tesi che le variazioni misurate in seguito alla stimolazione con la crema di cioccolato e con l'omogenato di limone, siano effettivamente associate al tipo di stimolo gustativo presentato e non alla procedura sperimentale alla quale gli individui erano sottoposti.

L'analisi dell'HRV nel dominio dei tempi e delle frequenze ha evidenziato che l'effetto bradicardico evocato dalla stimolazione con il cioccolato, “stimolo

gradevole”, dovrebbe essere dovuto ad un aumento del tono vagale evidenziato sia dall’aumento dell’SD, indice dello stato di attivazione dei due sistemi simpatico e parasimpatico, ma soprattutto dall’aumento dell’rMSSD e delle potenze delle HF, indici dell’attivazione parasimpatica. L’effetto tachicardico indotto dalla stimolazione con il limone, “stimolo sgradevole”, dovrebbe essere dovuto soprattutto ad una riduzione del tono vagale evidenziato da un valore più basso sia di SDNN che di rMSSD.

Nel caso dei maschi, la stimolazione effettuata con la gelatina alimentare, classificata come “stimolo neutro”, è risultata totalmente inefficace nell’indurre variazioni del ritmo sinusale solo nella 2° sessione sperimentale. Nella prima sessione infatti, nella quale i ragazzi non avevano ancora mai provato questo tipo di procedura, la gelatina è risultata debolmente efficace nell’indurre un leggero effetto tachicardico. Probabilmente in questo caso, la sola procedura di stimolazione alla quale i volontari erano sottoposti, li poneva, già di per se, in una parziale condizione di allerta a prescindere dallo stimolo usato. E’ per questo motivo infatti che abbiamo voluto paragonare gli effetti sul ritmo sinusale degli stimoli gradevole e sgradevole, a quello della stimolazione di controllo e non al ritmo sinusale misurato durante l’attività di base.

Anche nel caso dei maschi, gli stimoli, cioccolato e limone, classificati nel test per la valutazione del tono edonistico come “stimolo gradevole” e “stimolo sgradevole”, hanno determinato bradicardia e tachicardia rispettivamente.

L’analisi dell’HRV nel dominio dei tempi e delle frequenze ha messo in evidenza che, anche nel caso dei maschi, l’effetto bradicardico evocato dalla stimolazione con il cioccolato dovrebbe essere dovuto ad un aumento del tono vagale. Questo, risulta evidenziato sia dall’aumento dell’SDNN, indice dello stato di attivazione di entrambe le componenti vegetative, ma soprattutto dall’aumento dell’rMSSD e delle potenze delle HF, indici dell’attivazione parasimpatica.

Diversamente da quanto trovato nelle femmine, l'effetto tachicardico indotto dalla stimolazione con lo "stimolo sgradevole", il limone, nei maschi, dovrebbe essere dovuto ad un aumento del tono ortosimpatico evidenziato da un aumento delle potenze delle LF e da un valore di SDNN che tende ad essere maggiore rispetto a quello misurato dopo il controllo anche se l' rMSSD tende ad assumere un valore inferiore.

In conclusione, i nostri risultati indicano che la percezione di stimoli gradevoli e sgradevoli induce diminuzioni e aumenti del ritmo sinusale che sembrano essere correlati con il loro grado edonistico.

Queste opposte risposte autonome della frequenza cardiaca sono dovute a variazioni del bilancio simpatico-vagale che sembrano essere selettivamente associate alla stimolazione gradevole e sgradevole e che sono dipendenti dal sesso. Infatti l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca nel dominio dei tempi e delle frequenze ha dimostrato che, sia nelle femmine che nei maschi, la bradicardia indotta dalla stimolazione con il cioccolato è attribuibile ad un aumento del tono vagale conseguente alla percezione di uno "stimolo gradevole" la cui percezione determinerebbe nell'individuo anche tutta la serie di risposte correlate con la preparazione all'ingestione di cibo: la secrezione salivare, la deglutizione, l'aumento della motilità gastrica e intestinale, la secrezione dei succhi digestivi e l'incremento del flusso sanguigno al sistema gastrointestinale.

Diversamente la tachicardia evocata dal limone è attribuibile nelle femmine una riduzione del tono vagale conseguente alla percezione di uno stimolo sgradevole che non deve essere ingerito, la cui percezione determinerebbe anche l'inibizione di tutte le risposte correlate con l'ingestione di cibo. Mentre nei maschi è attribuibile a un aumento del tono simpatico conseguente alla percezione di uno stimolo "sgradevole" che l'individuo non deve ingerire, che rifiuta, uno stimolo che addirittura lo mette in allarme.

Questi risultati aggiungono evidenze ai consistenti dati a sostegno che nei maschi il controllo simpatico della funzione cardiaca è preponderante rispetto al controllo vagale, comparato con quello delle femmine dove è preponderante l'attività vagale rispetto a quella simpatica (Evans et al. 2001; Dart et al. 2002).

In conclusione, l'analisi del ritmo sinusale può perciò fornire un indice più affidabile rispetto alla semplice indagine verbale del tono edonistico di complesse sensazioni associate a cibi e/o bevande.

Tale caratterizzazione neurovegetativa di stimolazioni gustative potrebbe avere importanti implicazioni per lo sviluppo e il marketing di industrie alimentari.

SECONDA SERIE DI ESPERIMENTI

Valutazione dei livelli emozionali e del bilancio simpatico-vagale associati alla stimolazione gustativa effettuata con stimoli con uno stesso contenuto in grassi, ma con diversa valenza edonistica.

Materiali e Metodi

Valutazione delle attitudini e capacità percettive dei candidati che vogliono entrare a far parte del panel.

In questa fase della ricerca è stata misurata in ciascuna candidata che volesse entrare a far parte del panel, per i quattro gusti primari, la soglia individuale di percezione dello stimolo (soglia protopatica) e quella di riconoscimento del sapore (soglia epicritica). Successivamente sono state misurate le soglie protopatica ed epicritica del gruppo.

La ricerca delle volontarie è stata fatta tra un gruppo di studentesse frequentanti la Cittadella Universitaria di Monserrato che, dopo essere state informate sugli obiettivi delle prove sensoriali, il tempo richiesto e le procedure sperimentali, si erano rese disponibili a completare il proprio lavoro coscientemente per portare a termine tutte le prove.

12 ragazze di età compresa tra i 21 e 28 anni hanno aderito all'iniziativa di costituire un panel.

Le ragazze sono state scelte in funzione di alcune informazioni raccolte tramite questionari o interviste per assicurarsi che nessuna avesse evidenti disfunzioni gustative od olfattorie, che non soffrisse di raffreddore o di qualsiasi indisposizione che potesse interferire con le capacità percettive. A ciascuna volontaria veniva chiesto di avere estrema attenzione a non interferire con la percezione propria o delle altre a causa di scarsa igiene personale, o al contrario con l'uso eccessivo di profumi o deodoranti ecc.

Tutte le volontarie erano non fumatrici ed avevano il divieto assoluto di mangiare, bere (eccetto acqua), masticare chewing-gum e di svolgere attività fisica o fare sforzi eccessivi nell'ora antecedente l'esperimento.

Gli esperimenti per la selezione del panel sono stati effettuati in uno dei laboratori della Sezione di Fisiologia Generale del Dipartimento di Biologia Sperimentale, dove venivano mantenute costanti la temperatura (21 - 23° C), l'umidità relativa ad un valore ritenuto confortevole dai giudici (40%) e l'illuminazione, con luce standard solare bianca (15.000 lux).

Per il calcolo delle soglie individuali sono stati presentati ai singoli giudici 5 step di concentrazioni con un fattore di incremento del doppio. Il range operativo è stato scelto in modo che la concentrazione intermedia per ciascuno dei 4 gusti primari fosse la concentrazione comunemente considerata come la soglia per quel determinato gusto.

Per il salato sono stati utilizzati 2,5 mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM di NaCl (Carlo Erba); per l'acido sono stati utilizzati 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM, 8mM di acido citrico (Esseco); per il dolce sono stati utilizzati 5mM, 10mM, 20mM, 40mM, 80mM di saccarosio (Carlo Erba); per l'amaro sono stati utilizzati 0.002mM, 0.004mM, 0.008mM, 0.016mM, 0.032mM di solfato di chinino (Sigma).

Gli stimoli sono stati somministrati nel seguente ordine: saccarosio, NaCl, acido citrico e solfato di chinino. Quest'ultimo veniva presentato per ultimo per la lunga durata del suo retro-gusto (Leach and Noble, 1986) e per il suo effetto mascherante (Dallenbach and Dallenbach, 1943).

Tutte le soluzioni sono state effettuate usando acqua minerale Pura (pH 6,84) come solvente. Le soluzioni preparate il giorno prima dell'esperimento e conservate in frigo venivano poste a temperatura ambiente 30 min. prima di iniziare le misure di soglia.

Ciascuna volontaria veniva fatta sedere su una poltrona con braccioli e veniva invitata a stare tranquilla e rilassata.

Per determinare la soglia individuale per ciascun gusto primario e per il calcolo delle soglie di gruppo quando è appropriato è stato utilizzato il metodo "Standard practice for defining and calculating individual and group sensory threshold from

forced-choice data set of intermediate size” (ASTM E 1432 – 91, Reapproved 1997, American Society for Testing and Materials. *Annual Book of ASTM Standards*). Tale metodo si basa sulla procedura del test triangolare a scelta forzata (Dravnieks et al., 1986 ; German, 1986 ; Powers and Shinholser, 1988).

La soglia di uno stimolo è definita come l’intensità dello stimolo che ha una probabilità pari a 0.5 di essere rilevato, nelle condizioni del test. La soglia individuale è la soglia basata su una serie di giudizi di un singolo giudice. La soglia di gruppo può essere determinata nel caso in cui le soglie individuali hanno un distribuzione a “Campana” o a “Campana scodata”; mentre andamenti “modali” o “bimodali” indicano l’esistenza di sub popolazioni con differenti soglie all’interno del panel.

1 ml di ciascuna soluzione veniva applicata sull’intera area orale mediante una pipetta. Ogni concentrazione è stata testata 4 volte da tutti i giudici mediante test triangolari, secondo l’opzione della “scelta forzata”.

Per ogni concentrazione venivano presentate alla persona tre pipette uguali codificate, due delle quali rappresentavano il bianco (contenevano solo acqua, il solvente), mentre una solo conteneva il campione da testare. Dopo aver assaggiato tutte e tre le soluzioni il giudice doveva esprimere il suo giudizio, contrassegnando su una scheda il numero della pipetta che, a suo parere, conteneva il campione di gusto differente dagli altri due e doveva indicare quando gli era possibile di che gusto si trattasse. Secondo l’opzione della scelta forzata il giudice doveva dare un giudizio anche quando non percepiva nessuna differenza tra le tre soluzioni.

I risultati ottenuti sono riportati in una tabella che riportava per ogni giudice il numero di risposte esatte per ogni soluzione testata; quindi si calcolano le percentuali di esatta percezione e di esatto riconoscimento e si costruiscono, per ciascun giudice, due rette di regressione riportando in ordinata rispettivamente le percentuali di esatta percezione e di esatto riconoscimento e in ascissa la concentrazione dello stimolo.

Le soglie individuali di percezione (protopatica) e di riconoscimento (epicritica) sono rappresentate dalle concentrazioni che corrispondono al 50 % di esatta percezione e al 50% di esatto riconoscimento sulle due rette individuali.

Le soglie di gruppo corrispondono alla media geometrica delle soglie individuali nel caso in cui le soglie individuali abbiano una distribuzione a “Campana” o a “Campana scodata”; mentre nel caso di andamenti “modali” o “bimodali” si calcolano come media geometrica le soglie delle sub popolazioni, e poi come media aritmetica quella del panel completo.

Nella Fig. 23 sono riportate, per ciascun giudice, le rette di regressione individuali che esprimono l’andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione del Saccaroso. Come si vede dalla Fig. 23, le percentuali di esatta percezione sono risultate maggiori delle percentuali di esatto riconoscimento.

Dalle funzioni delle rette individuali si possono calcolare le concentrazioni che corrispondono al 50 % di esatta percezione e di esatto riconoscimento cioè alle soglie protopatica ed epicritica individuali che sono mostrate in Tab. 1.

Nella Fig. 24 è mostrata la distribuzione delle soglie individuali epicritiche, cioè il numero dei panelisti in funzione dei corrispondenti valori di soglia individuale, tale distribuzione risulta essere a campana. La distribuzione delle soglie individuali protopatiche non è stata fatta dato il basso numero di casi nei quali è stato possibile fare il calcolo del 50 % di esatto riconoscimento.

La distribuzione delle soglie individuali a campana indica la presenza di un unico gruppo predominante del quale si può calcolare la soglia di riconoscimento del gruppo. Tale soglia risulta essere 17.84 mM.

Nella Fig. 25 sono riportate, per ciascun giudice, le rette di regressione individuali che esprimono l’andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione del Chinino. Anche nel caso del chinino, per ogni concentrazione dello stimolo, le

percentuali di esatta percezione sono maggiori delle percentuali di esatto riconoscimento.

Dalle funzioni delle rette individuali si possono calcolare le soglie protopatiche ed epicritiche individuali. Solo in un caso la soglia protopatica e quella epicritica sono risultate inferiori alla concentrazione più bassa testata (0.002 mM), tutti gli altri valori delle soglie individuali sono mostrati in Tab. 2.

Nella Fig. 26 sono mostrate le distribuzioni delle soglie individuali protopatiche (A) ed epicritiche (B). In entrambi i casi si nota una distribuzione bimodale che indica la presenza di due sotto-popolazioni all'interno del campione ognuno dei quali esprime un proprio valore di soglia riportato nella Tab. 3. In tale tabella è riportato anche il valore delle soglie del gruppo totale, calcolate come medie aritmetiche delle soglie dei due sotto gruppi.

Nella Fig. 27 sono riportate, per ciascun giudice, le rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione dell' NaCl.

Anche in questo caso, le percentuali di esatta percezione sono maggiori delle percentuali di esatto riconoscimento.

Dalle funzioni delle rette individuali si possono calcolare le concentrazioni che corrispondono al 50 % di esatta percezione e di esatto riconoscimento (soglie protopatica ed epicritica individuali) (Tab. 4).

Nella Fig. 28 A, B sono mostrati i grafici di distribuzione delle soglie individuali protopatiche (A) ed epicritiche (B). In entrambi i casi si nota una distribuzione delle soglie a campana che indica la presenza di un unico gruppo del quale si possono calcolare le soglie di percezione e di riconoscimento del gruppo che risultano essere 13.67 mM e 20.71 mM rispettivamente.

Nella Fig. 29 sono riportate, per ciascun giudice, le rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione

dell'acido citrico. Risulta evidente che la soglia protopatica è inferiore alla concentrazione più bassa testata per tutti i giudici tranne che per uno nel quale risulta 17.8 mM; anche quella epicritica è risultata inferiore alla più bassa concentrazione testata tranne per quattro casi nei quali la soglia individuale corrispondeva a 17.8 mM, 23.2 mM, 23.2 mM, 23.2 mM.

In conclusione, tutte le ragazze candidate, data la loro ottima capacità di distinguere e valutare i quattro gusti primari sono risultate essere adatte a far parte del panel di assaggiatori da utilizzare nella valutazione dei livelli emozionali e del bilancio simpatico-vagale associati alla stimolazione gustativa. Infatti, le loro soglie di riconoscimento per i quattro gusti primari (17.87 mM per il saccarosio, 0.0087 per il chinino, 19 mM per l'NaCl e <0.5 mM per l'acido citrico) sono risultate dell'ordine di grandezza di quelle comunemente accettate (20 mM per il saccarosio, 0.008 per il chinino, 10 mM per l'NaCl e 2 mM per l'acido citrico).

Registrazioni elettrocardiografiche

Le registrazioni elettrocardiografiche (ECGs) venivano effettuate in continuo per tutta la durata dell'esperimento come descritto nella prima fase sperimentale

Stimoli gustativi

In qualità di stimolo che poteva evocare una sensazione gradevole è stata utilizzata la stessa crema di cioccolato (CC) utilizzata nella prima fase sperimentale. Tale crema ha un contenuto in grassi del 31%.

Dato che la caratteristica organolettica tipica dei grassi è dovuta alla presenza dei loro prodotti di ossidazione, in qualità di stimolo neutro dal punto di vista della sensazione gustativa che poteva evocare è stato scelto un trigliceride saturo, il gliceril tripalmitato (Sigma) in una soluzione al 31 % in paraffina liquida (Sella). Questo stimolo verrà d'ora in poi chiamato GT.

La paraffina liquida veniva utilizzata come controllo.

Gli stimoli sono stati somministrati nel seguente ordine: controllo, CC, e GT.

La preparazione degli stimoli, il laboratorio dove venivano effettuate le prove, la procedura sperimentale, la classificazione edonistica delle sensazioni evocate da ciascuno stimolo sono state le stesse già descritte per la prima fase sperimentale.

Analisi dei dati

Come descritto per la prima fase sperimentale:

- sono stati analizzati gli effetti delle stimolazioni gustative sul punteggio edonistico assegnato a ciascuno stimolo e sul ritmo sinusale con ANOVA a una via (Statistica, StatSoft) e il confronto a due a due è stato effettuato mediante il test post-hoc di Tukey.
- sono state effettuate l'analisi nel dominio dei tempi e delle frequenze della variabilità della frequenza cardiaca (HRV).

Risultati

I valori medi \pm ES della dimensione edonistica evocata dalla stimolazione gustativa effettuata con il controllo, il CC e il GT, sono mostrati in Fig 30. Dall'analisi di tali valori è risultato che il punteggio edonistico assegnato allo stimolo gustativo dipende dalla stimolazione effettuata ($F = 57.92$; $p < 0,00001$; ANOVA Statistica, Stat soft), che il CC è estremamente gradevole ed il suo punteggio è risultato diverso ($p = 0.00012$; Tukey HSD test, Statistica, Statsoft) da quello assegnato al GT che invece era risultato né gradevole né sgradevole come la stimolazione di controllo ($p = 0.79$; Tukey HSD test, Statistica, Statsoft).

Il ritmo sinusale non assume mai, sia nei soggetti normali che in quelli cardiopatici, un valore costante nel tempo, ma subisce continue fluttuazioni attorno a un valore medio. Il valore medio \pm ES della distanza R-R misurata per i 100 battiti successivi dipende dalla stimolazione effettuata ($F = 10.462$; $p = 0,00003$; ANOVA Statistica, Stat soft) (Fig 31). In particolare, i valori medi \pm ES della distanza R-R misurata per i 100 battiti successivi alla stimolazione con il GT (0.823 ± 0.00394) e quelli misurati dopo stimolazione con il CC (0.820 ± 0.00395) non sono risultati diversi tra loro ($p = 0.1799$; Tukey HSD test, Statistica, Statsoft) e tutti e due questi valori sono risultati maggiori ($p = 0.000023$ e $p = 0.0169$; Tukey HSD test, Statistica, Statsoft) del valore misurato dopo stimolazione con il controllo (0.794 ± 0.0040) (Fig.31). Tale valore non è risultato diverso ($p = 0.47$; Tukey HSD test, Statistica, Statsoft) da quello misurato prima di iniziare le stimolazioni (0.775 ± 0.0029)

Nella Fig. 32 sono mostrati i valori medi \pm ES della SD (in alto) e della rMSSD (in basso) calcolati per i 100 battiti successivi alle stimolazioni effettuate con il controllo, con il CC e con il GT. In particolare, risulta che SD, indice dello stato di attivazione dei due sistemi simpatico e parasimpatico, è più alta quando misurata dopo la stimolazione con il GT rispetto a quella misurata dopo la stimolazione con il CC ($p = 0.044$; test di Student per dati appaiati). Tale valore

non è variato significativamente rispetto a quello calcolato dopo stimolazione di controllo anche se esiste una lieve tendenza ad essere più basso ($P > 0.05$; test di Student per dati appaiati) (Fig. 32 in alto). Anche l'rMSSD, indice dell'attivazione parasimpatica, è risultata maggiore ($p = 0.040$; test di Student per dati appaiati) quando misurata dopo la stimolazione con il GT rispetto a quando misurata stimolazione con il CC e controllo. Tali due valori risultano praticamente identici. Esempi dell'analisi dell'HRV nel dominio delle frequenze effettuate nell'intervallo temporale di 100 battiti successivi alle tre stimolazioni sono mostrati nelle Figg. 33, 34, e 35. In particolare nelle tre figure sono mostrati in alto il tacogramma, in basso lo spettro di potenza calcolato sul corrispondente tacogramma tramite la trasformata di Fourier. Nella Fig 33 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione di controllo. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 496.773 ms^2 , 1433.37 ms^2 e 1485.83 ms^2 . Nella Fig 34 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione con il GT, in questo caso, i valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono rispettivamente 3410.23 ms^2 , 4992.41 ms^2 e 5362.9 ms^2 . In ultimo nella Fig 35 sono rappresentati tacogramma e spettro di potenza dopo stimolazione con il CN. I valori di potenza calcolati per le bassissime (VLF), per le basse (LF) e per le alte (HF) frequenze sono in questo caso rispettivamente 276.1 ms^2 , 1349.02 ms^2 e 2536.92 ms^2 .

Nella Fig 36 sono mostrate le variazioni percentuali medie \pm ES delle aree di ciascuna regione (VLF, LF e HF) calcolate nei 100 battiti successivi a stimolazione con il CN e il GT, rispetto a quelle calcolate in 100 battiti successivi durante l'attività di base. Da tale figura appare evidente che la stimolazione con il GT determina un aumento di tutta l'attività autonoma ed in modo particolare delle potenze delle HF che risultano aumentate del $135 \pm 30.02 \%$. Tale valore è risultato significativamente maggiore di quello corrispondente misurato dopo stimolazione con il CC ($p = 0.049$; test di Student per dati appaiati).

Conclusioni

In questo secondo gruppo di esperimenti, l'analisi in tempo reale della risposta autonoma di regolazione del ritmo sinusale ci ha permesso di evidenziare le reazioni emozionali associate alla percezione di stimoli gustativi con lo stesso contenuto di grassi, ma con diversa valenza edonistica. In particolare, tutti e due gli stimoli gustativi con lo stesso contenuto di grassi, il GT ed il CC che erano stati classificati nel test per la valutazione edonistica come stimolo neutro e come stimolo estremamente gradevole rispettivamente, hanno determinato tutti e due bradicardia.

Diversamente, la stimolazione effettuata con il controllo, classificato come stimolo neutro dall'analisi dei dati estrapolati dal questionario verbale, è risultata totalmente inefficace nell'indurre variazioni del ritmo sinusale. Infatti, la distanza R-R misurata nei 100 battiti successivi alla sua stimolazione non ha determinato variazioni del ritmo rispetto all'attività di base.

L'analisi della HRV nel dominio dei tempi ha evidenziato una maggiore attivazione vagale associata alla stimolazione con lo stimolo (GT) considerato neutro dal punto di vista della sensazione gustativa evocata, rispetto a quella evocata dalla stimolazione con il CC (stimolo estremamente gradevole). La maggiore attivazione vagale associata al GT è evidenziata sia da un valore maggiore di SD, indice dello stato di attivazione dei due sistemi simpatico e parasimpatico, ma soprattutto da un valore maggiore di rMSSD indice dell'attivazione parasimpatica.

La maggior attivazione vagale associata alla stimolazione con il GT è evidenziata anche dall'analisi nel dominio delle frequenze infatti da questa analisi è risultato che tale stimolo determina una quantità maggiore di oscillazioni ad alta frequenza della frequenza cardiaca rispetto a quelle evocate dal CC.

La maggiore attività vagale misurata dopo la stimolazione con il GT rispetto a quella misurata dopo stimolazione con il CC non è però seguita da un aumento di bradicardia, infatti i valori di intervallo RR misurati dopo la stimolazione con GT

non sono risultati diversi da quelli misurati dopo stimolazione con il CC. Evidentemente la stimolazione con il CC deve aver determinato anche una riduzione del tono simpatico.

In conclusione, in questa seconda serie di esperimenti, le variazioni del ritmo sinusale e del bilancio simpatico-vagale come l'aumentata attivazione parasimpatica e/o la ridotta attivazione ortosimpatica da noi misurate, sarebbero indicative della percezione di uno stimolo energetico e/o stimolo gradevole in grado di attivare nell'individuo anche una serie di risposte autonome correlate con la preparazione all'ingestione di cibo.

Bibliografia

- Aggelton, J.P. and Mishkin, M.** (1986) *The amygdala sensory gateway to the emotion: theory, research and experience*. Biological Foundations of Emotion, Vol.3, Academic Press, Orlando, FL, pp. 281 – 299.
- Akselrod, S., Gordon D., Madwed J.B., Snidman N.C., Shannon D.C., and Cohen R.J.** (1985) *Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis*. Am. J. Physiol., 249: H867 – H875.
- Alaoui-Ismaili, O., Vernet-Maury, E., Dittmar, A., Delhomme, G. and Chanel, J.** (1997a) *Odor hedonics: connection with emotional response estimated by autonomic parameters*. Chem. Senses, 22, 237 – 248.
- Alaoui-Ismaili, O., Robin, O., Rada, H., Dittmar, A., and Vernet – Maury, E.** (1997b) *Basic emotions evoked by odorants: comparison between autonomic responses and self – evaluation*. Physiol. Behav., 62, 713 – 720.
- Collet, C., Vernet – Maury, E., Delhomme, G. and Dittmar, A.** (1997) *Autonomic nervous system response patterns specificity to basic emotions*. J. Auton. Nerv. Syst., 62, 45 – 57.
- Dallenbach, J.W. and Dallenbach, K.M.** (1943) *The effect of bitter adaptation on sensitivity to the other taste qualities*. Am. J. Psychol., 56, 21 – 31.
- Dart, A.M., Du X.J. and Kingwell, B.A.** (2002) *Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system*. Science Direct, 53, 678 – 687.
- Dravnieks, A., Schmidtsdorff, W., and Meilgaard, M.**, “Odor Thresholds by Forced-Choice Dynamic Triangle Olfactometry: Reproducibility and Methods of Calculation,” *Journal of the Air Pollution Control Association*, Vol 36, 1986, pp. 900–905.
- Drewnowski, A., Halmi, K.A., Pierce, B., Gibbs, J., and Smith, G.P.** (1987). *Taste and eating disorders*. Am. J. Clin. Nut., 46, 442 – 450.
- Ekman, P., Levenson, R.W. and Friesen, W.W.** (1983) *Autonomic nervous system activity distinguishes among emotions*. Science, 221, 1208 – 1210.
- Evans, J.M., Ziegler, M.G., Patwardhan, A.R., Ott, J.B., Kim, C.S., Leonelli, F.M. and Knapp C.F.** (2001) *Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal and emodynamic indexes*. J. Appl. Physiol., 91 (6), pp. 2611 – 2618.
- Fukuwatari T., Kawada T., Tsuruta M., Hiaroka T., Sugimoto E., Fushiki T.**, (1997) Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of circumvallate papillae in rats. *FEBS Letters*, 414, 461-464.
- Galef, B.G.** (1981) *Development of flavor preference in man and animals : the role of social and nonsocial factors*. In Aslin, R.N., Alberts, J.R. and Petersen, H.R. (eds), *Development of Perception, Psychological Perspectives*, Academic Press, New York, Vol.1, pp. 411 – 431.

- German Standard VDI 3881, Part 1, Olfactometry. Odour Threshold Determination. Fundamentals**, Verein Deutscher Ingenieure, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf. 1986, pp. 25–27.
- Gilbertson T. A., Fontenot D.T., Loiu L., Zhang H., Monroe M. T.**(1997) *Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptors cell: Gustatory cues for dietary fat* . *Am.J. Physiol.* 272, C1203- C1210.
- Glanz, K., Basil, M., Maibach, E., Goldberg, J., and Snyder, D.** (1998). *Why Americans eat what they do: taste, nutrition, costs, convenience, and weight control concerns as influences on food consumption*. *J. Am. Diet. Ass.*, 98, 1118 – 1126.
- Horio, T.** (2000) *Effects of various taste stimuli on heart rate in humans*. *Chem. Senses*, 25, 149 – 153.
- Köster, E.P.** (1990) *Recent development in the study of perception: taste and smell*. *Perfum. Flav.*, 15, 1 – 12.
- Leach, E.J. and Noble, A.C.** (1986) *Comparison of bitterness of caffeine and quinine by a time – intensity procedure*. *Chem. Senses*, 11, 339 – 345.
- Ledoux, J.** (1994) *Emotions, mémoire et cerveau*. *Pour la Science*, 202, 50 – 57.
- Lohse P., Lohse P., Chahrokh-Zadeh S., and Seidel D.** (1997) *The acid lipase family: Three enzymes, one highly conserved gene swstructure*. *J. Lipid Res.* 38, 880-891.
- Luczack H. and Lauring W.** (1973). *An analysis of heart rate variability*. *Ergonomics*. 16: 85-97.
- Mattes, R.D.** (1997) *The taste for salt in humans*. *Am. J. Clin. Nut.*, 65 (suppl.), 692S – 697S.
- Mennella, J.A. and Beauchamp, G.K.** (1997) *The ontogeny of human flavor perception*. In Beauchamp, G.K. and Bartoshuk, L. (eds), *Tasting and Smelling, Handbook of Perception and Cognition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 199 – 221.
- Norgren, R.** (1985) *Taste and the autonomic nervous system*. *Chem. Senses*, 10, 143 – 161.
- Ohara, I., Otsuka, S. and Yugari, Y.** (1979) *The influence of carrier of gustatory stimulation on the cephalic phase of canine pancreatic secretion*. *J. Nutr.*, 109, 2098 – 2105.
- Ohara, I., Otsuka, S. and Yugari, Y.** (1988) *Cephalic phase response of pancreatic exocrine secretion in conscious dogs*. *Am. J. Physiol.*, 254, G424 – G428.
- Ori, Z., Monir, G., Weiss, J., Sayhouni, X., Singer, D.H.**, (1992) *Heart rate variability frequency domain anilysis*. *Amb. Electrocardiol.*, 10, 499 – 537.
- Powers, J. J., and Shinholser, K.**, “Flavor Thresholds for Vanillin and Predictions of Higher or Lower Thresholds,” *Journal of Sensor Studies*, Vol. 3, 1988, pp. 49–61.

- Price, J.L.** (1987) *The central and accessory olfactory systems*. In Finger, T.E. and Silver, W.L. (eds), *Neurobiology of Taste and Smell*. John Wiley and Sons, New York, p. 65.
- Rimordi O., Pierini S., Ferrari A., Cerreti S., Pagani M., Malliani A.** (1990) *Analysis of short-term oscillation of RR and arterial pressure in conscious dogs*. *A. J Physiol.* 258: H967-76.
- Robin, O., Alaoui – Ismaili, O., Dittmar, A. and Vernet – Maury, E.** (1998) *Emotional responses evoked by dental odors: an evaluation from autonomic parameters*. *J. Dent. Res.*, 77, 1638 – 1646.
- Robin, O., Alaoui – Ismaili, O., Dittmar, A. and Vernet – Maury, E.** (1999) *Basic emotions evoked by eugenol odor differ according to the dental experience: a neurovegetative analysis*. *Chem. Senses*, 24, 327 – 335.
- Rousmans, S., Robin, O., Dittmar, A. and Vernet – Mauri, E.** (2000) *Autonomic nervous system responses associated with primary tastes*. *Chem. Senses*, 25, 709 – 718.
- Sayers, B.M.** (1973) *Analysis of heart rate variability*. *Ergonomics*, 16, 17 – 32.
- Sgoifo A., Pozzato C., Meerlo P., Castali T., Manghi M., Stilli D., Olivetti G., Musso E.,** (2002) *Intermittent Exposure to Social Defeat and Openfield Test in Rats: Acute and Long-term Effects on ECG, Body temperature and Physical Activity*. *Stress*, 5: 23-35.
- Smith, D.V. and Vogt, M.B.** (1997) *The neural code and integrative processes of taste*. In Beauchamp, G.K. and Bartoshuk, L. (eds), *Tasting and Smelling, Handbook of Perception and Cognition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 25 – 76.
- Stein P.K.,** Assessing heart rate variability from real-world Holter records, *Cardiac Electrophysiology Review* 6: 239-244, 2002
- Stein P.K., Kleiger R.E.** (1999). *Insights from the study of heart rate variability*. *Ann Rev Med* 50: 249-261.
- Van Toller, S.** (1998) *Emotion and the brain*. In Van Toller, S. and Dodd, G.H. (eds), *Perfumery: The Psychology and Biology of Fragrance*. Chapman & Hall, London, p. 121.
- Yeragani, V.K., Pohl, R., Balon, R., Ramesh, C., Glitz, D., Jung, I., Sherwood, P.,** (1991) *Heart rate variability in patients with major depression*. *Psychiatry Res*, 37, 35- 46.
- Yeragani, V.K., Pohl, R., Berger, R., Balon, R., Ramesh, C., Glitz, D., Srinivasan, K., Weinberg, P.,** (1993) *Decreased HRV in panic disorder patients: a study of power – spectral analysis of heart rate*. *Psychiatry Res*, 46, 89- 93.

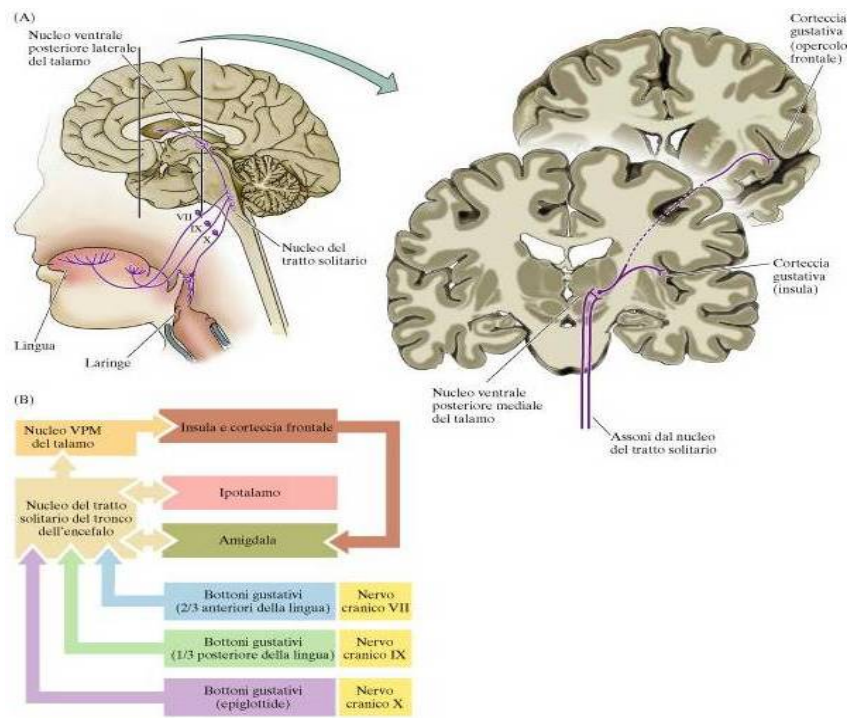


Fig. 1

Organizzazione del sistema gustativo umano (A).
 Schema delle vie fondamentali deputate all'elaborazione delle informazioni gustative (B).

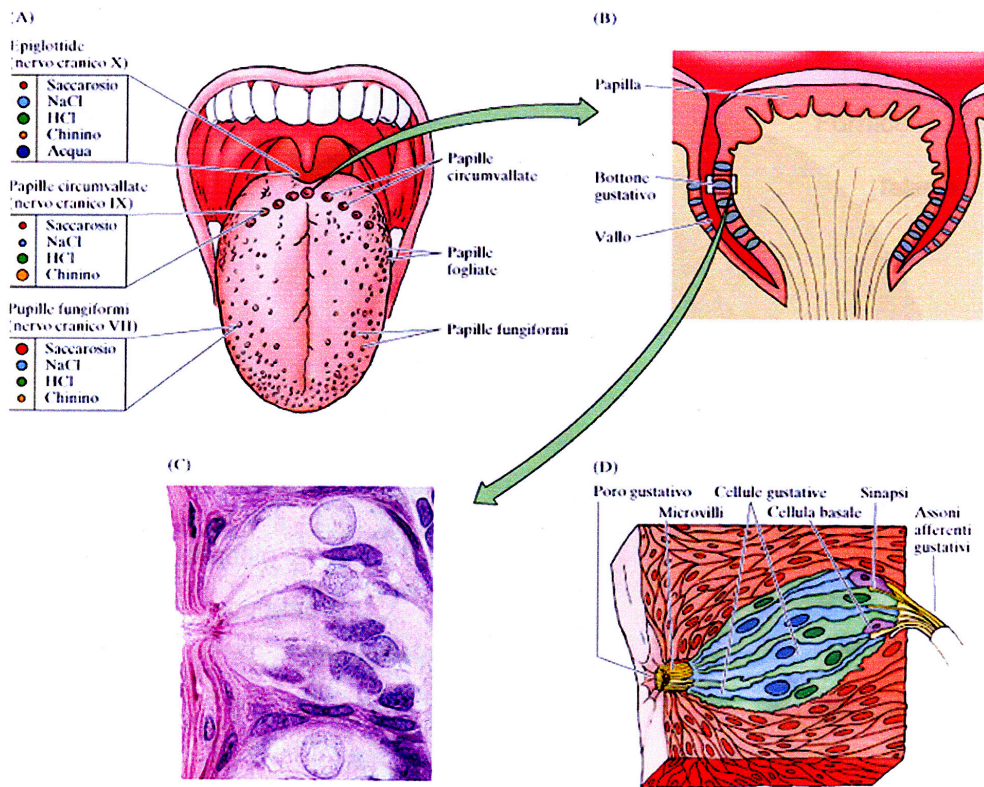


Fig. 2

Distribuzione delle papille gustative sulla superficie dorsale della lingua con identificazione delle zone con maggior specificità per le varie modalità gustative (A). Schema di papilla circumvallata (B). Fotografia al microscopio ottico di bottone gustativo (C). Schema di bottone gustativo (D).

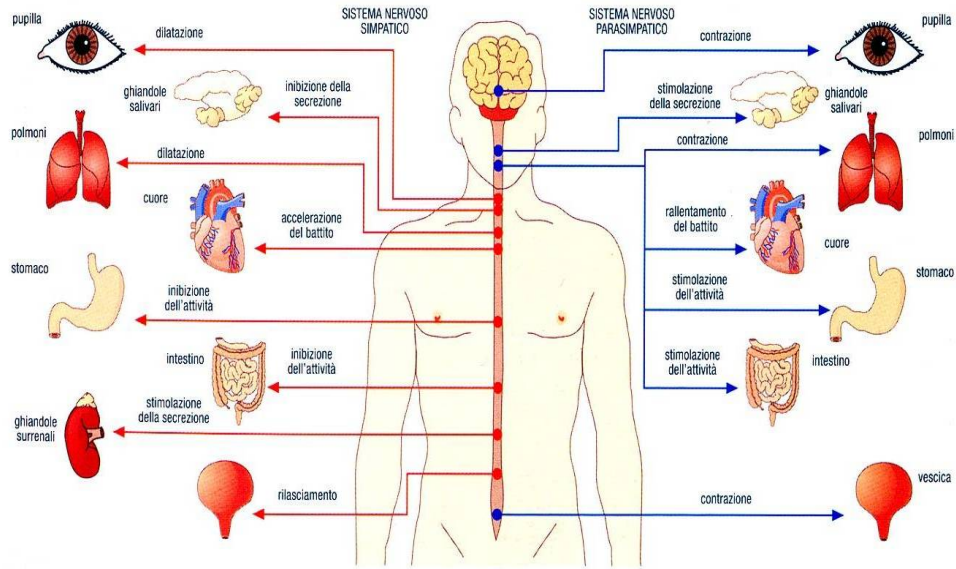


Fig. 3

Rappresentazione schematica delle risposte vegetative degli organi viscerali evocate dal Sistema Nervoso Autonomo.

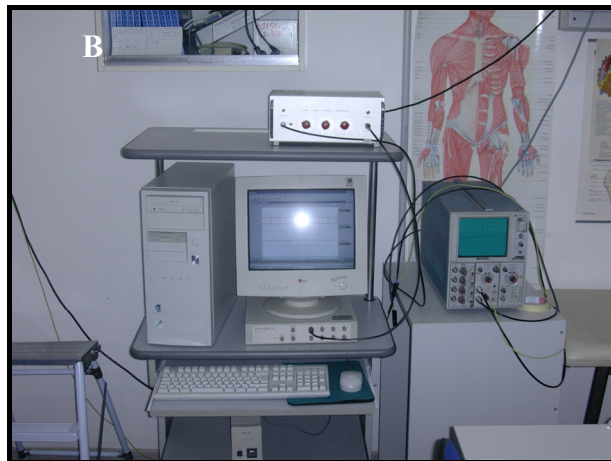
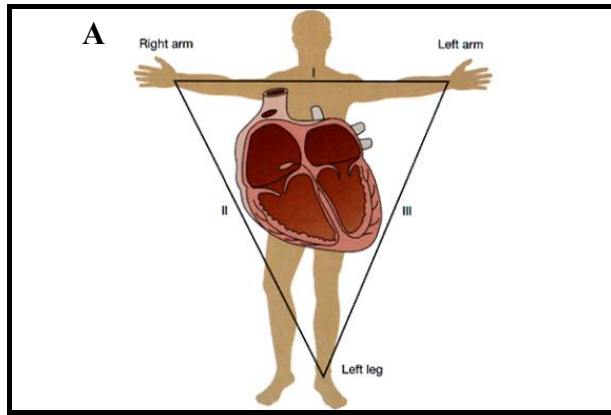


Fig. 4

- a) Triangolo di Einthoven.
- b) Set-up sperimentale

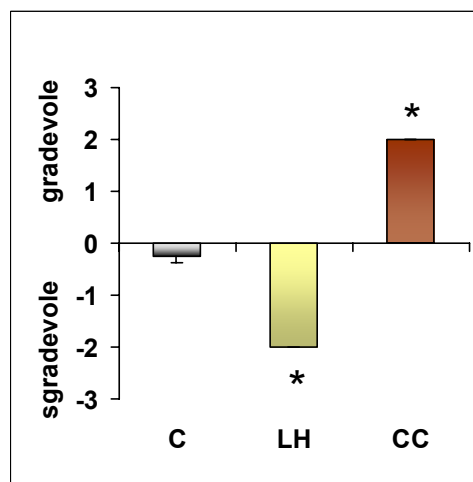
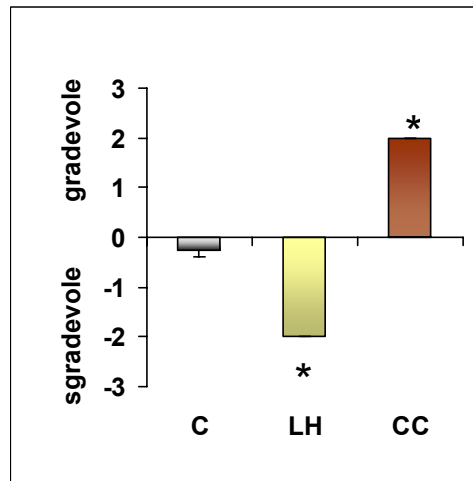


Fig. 5

Punteggio edonistico (valori medi \pm E.S.) associato a ogni stimolazione nelle femmine nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo (test post-hoc di Tukey; $p = 0.000126$ nella 1° e 2° sessione sperimentale)

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

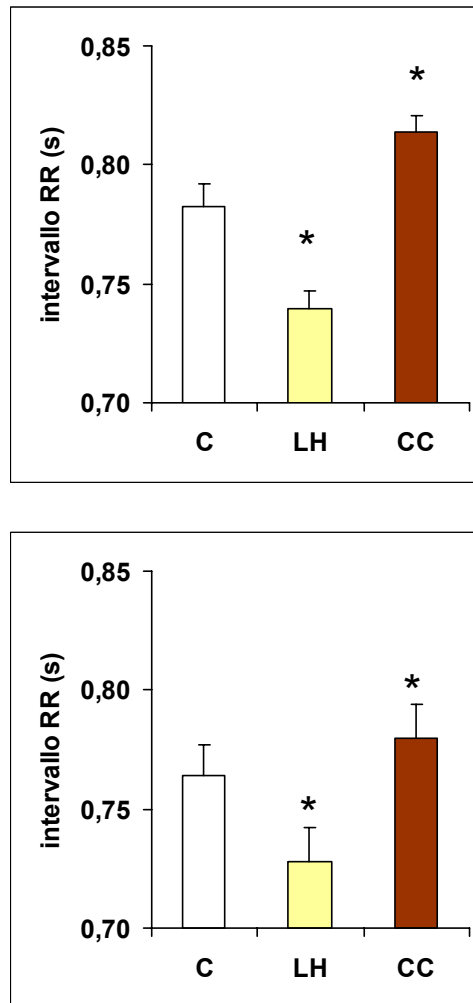


Fig. 6

Valori medi \pm E.S. dell' intervallo RR dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nelle femmine nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo (test post-hoc di Tukey; $p \leq 0.00002$ e $p \leq 0.0046$ nella 1° e 2° sessione sperimentale)

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

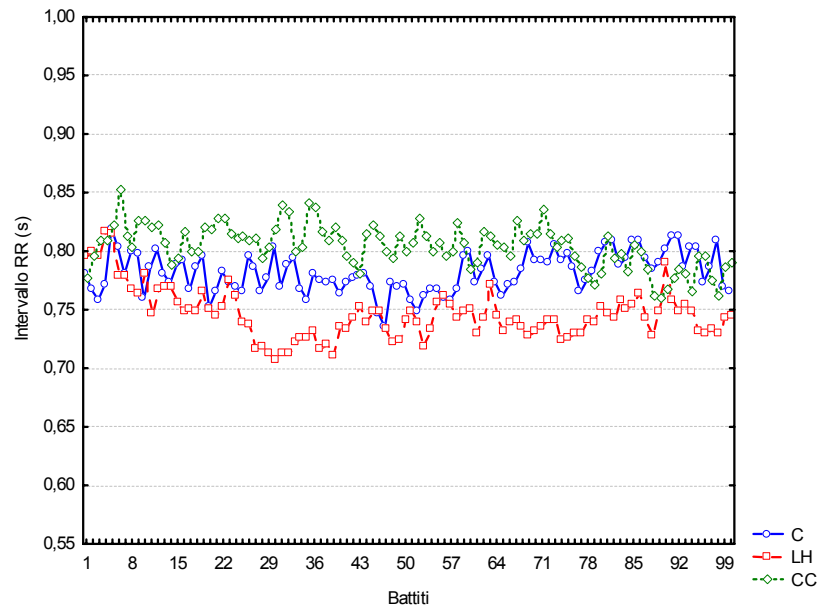


Fig. 7

Tacogramma medio dei 100 battiti successivi a ogni stimolazione gustativa nelle femmine.

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

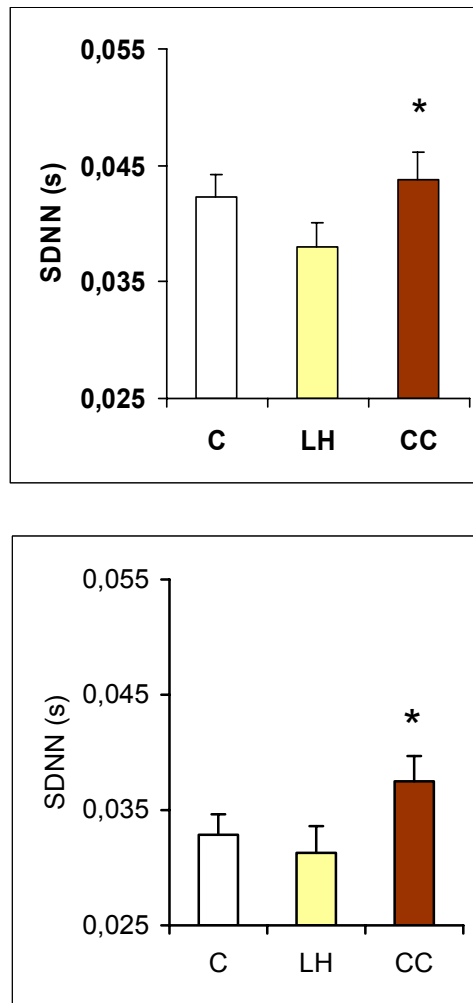


Fig. 8

Valori medi \pm E.S. della SDNN dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nelle femmine nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa ($p \leq 0.02$ nella 1° e la 2° sessione sperimentale; test di Student per dati appaiati)

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

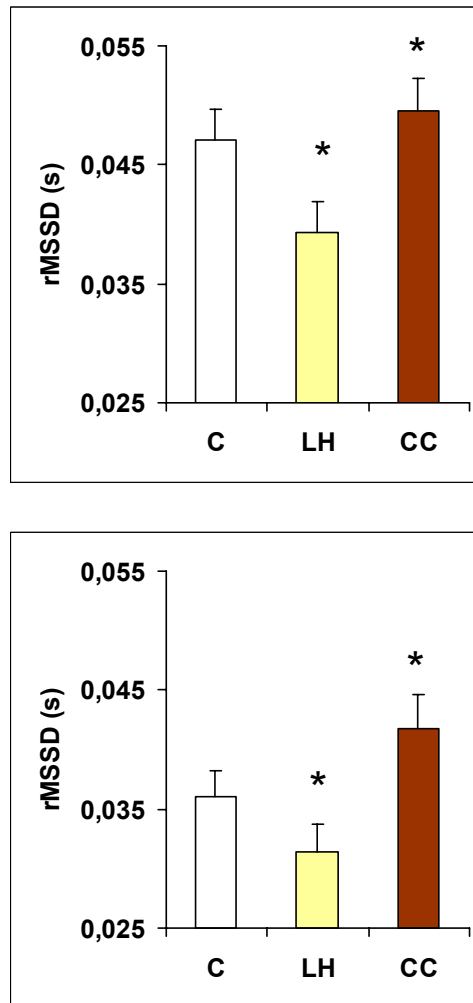


Fig. 9

Valori medi \pm E.S. della rMSSD dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nelle femmine nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo ($p \leq 0.047$ e $p \leq 0.017$ nella 1° e 2° sessione sperimentale; test di Student per dati appaiati)

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

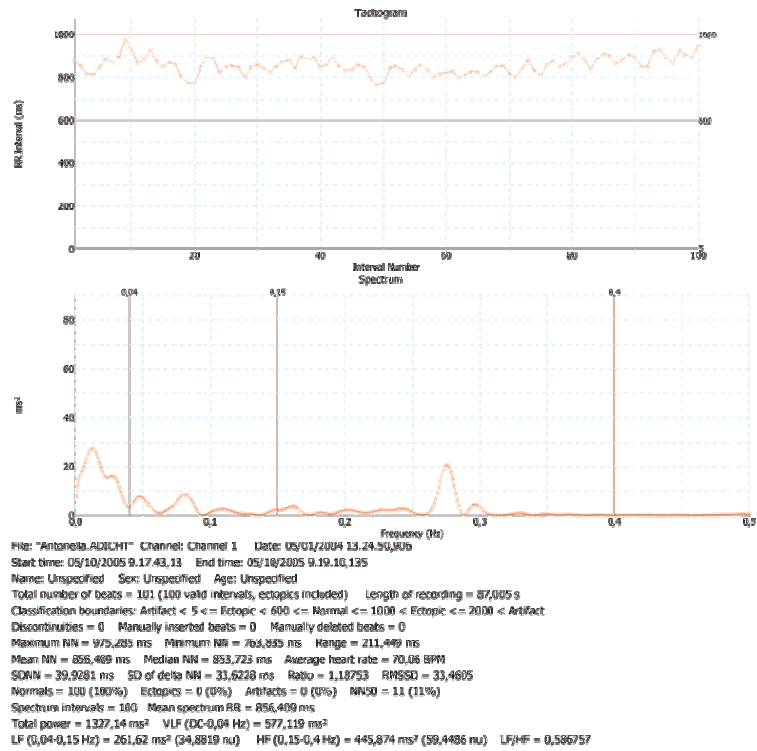


Fig. 10

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dell'attività di base in una ragazza del panel.

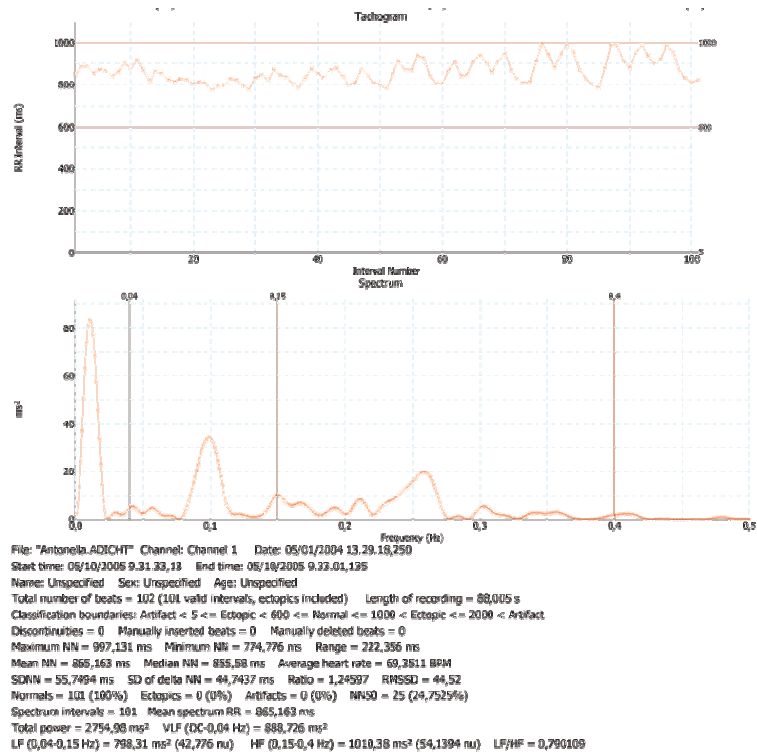


Fig. 11

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 cicli cardiaci successivi alla stimolazione sgradevole con il LH nella stessa ragazza della Fig. 10.

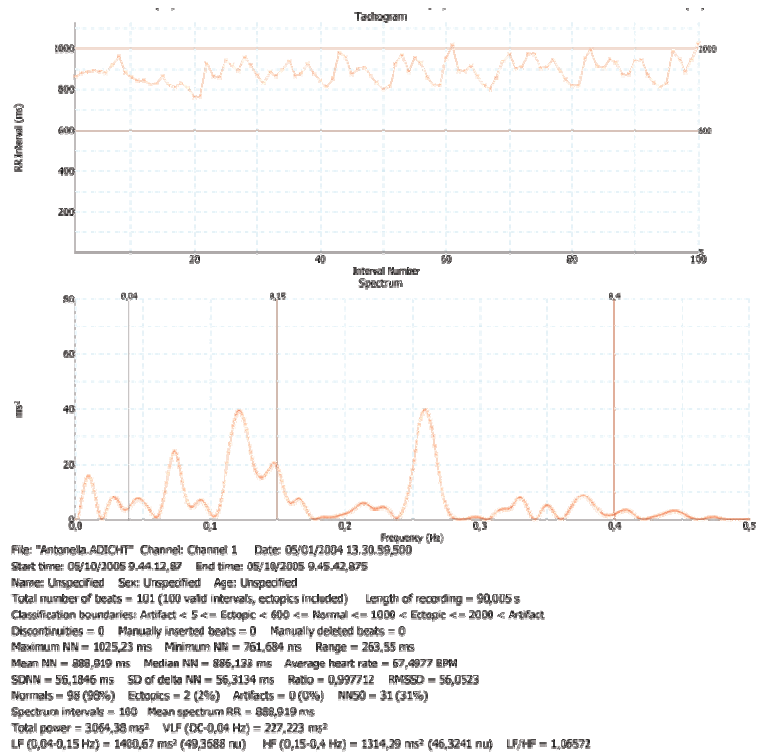


Fig. 12

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione gradevole con il CC nella stessa ragazza della Fig. 10 e 11.

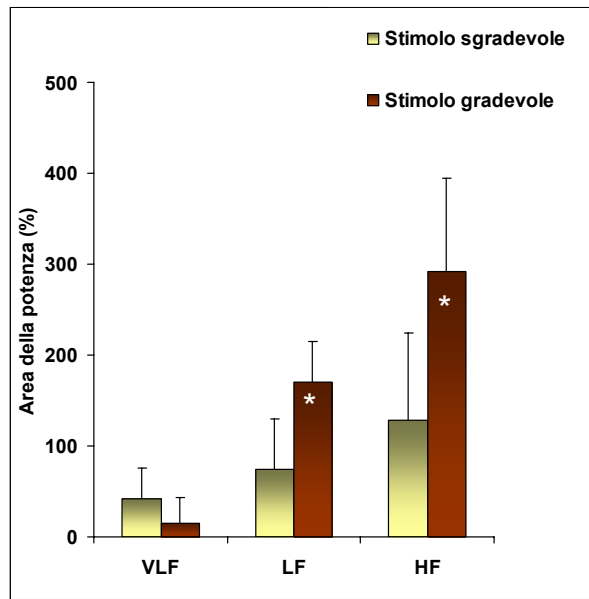


Fig. 13

Variazioni percentuali medie \pm ES della potenza delle VLF, LF e HF rispetto ai valori del livello di base calcolati in finestre temporali di 100 battiti successivi alla stimolazione gradevole e a quella sgradevole rispetto al valore pre-stimolo nelle femmine.

* = differenza significativa rispetto al corrispondente valore pre-stimolo (test di Student per dati appaiati; $p \leq 0.001$)

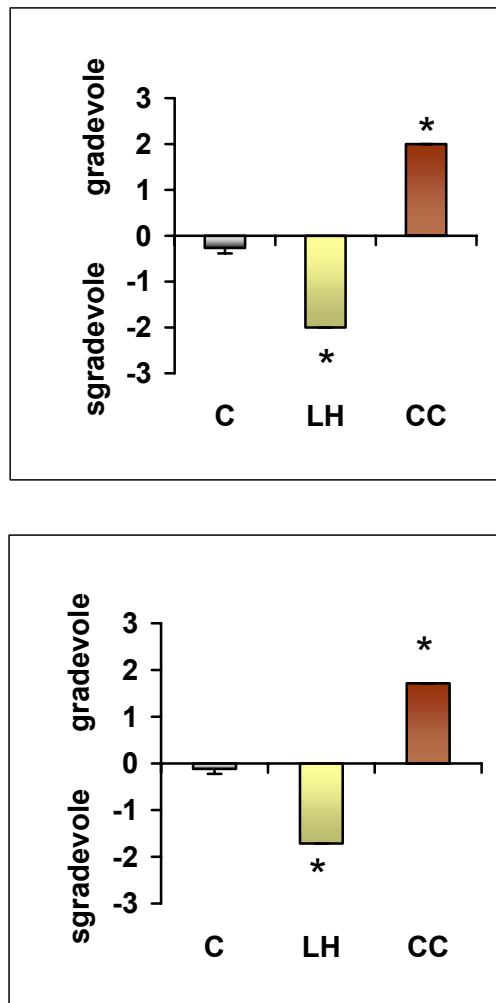


Fig. 14

Punteggio edonistico (valori medi \pm E.S.) associato a ogni stimolazione nei maschi nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo (test post-hoc di Tukey; $p = 0.000129$ e $p = 0.000129$ nella 1° e 2° sessione sperimentale).

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

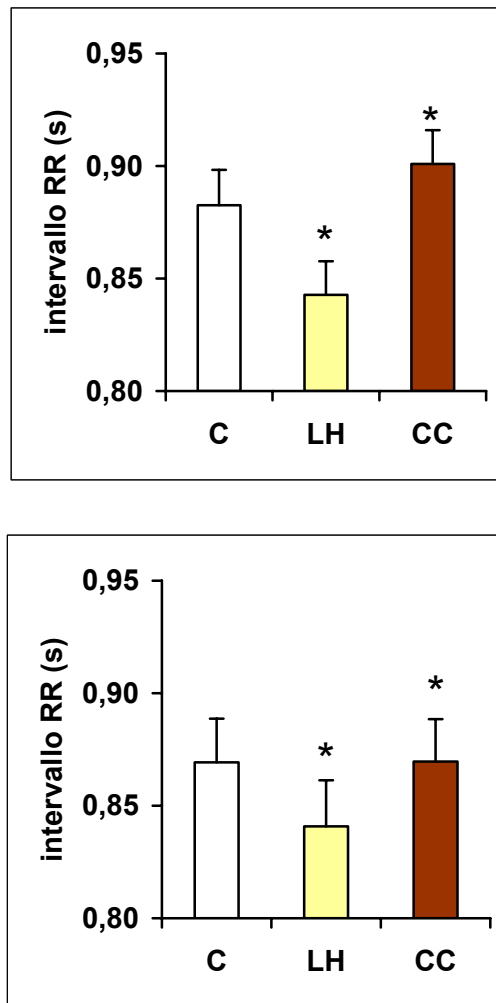


Fig. 15

Valori medi \pm E.S. dell' intervallo RR dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nei maschi nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo (test post-hoc di Tukey; $p \leq 0,0017$ e $p \leq 0,0044$ nella 1° e 2° sessione sperimentale).

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

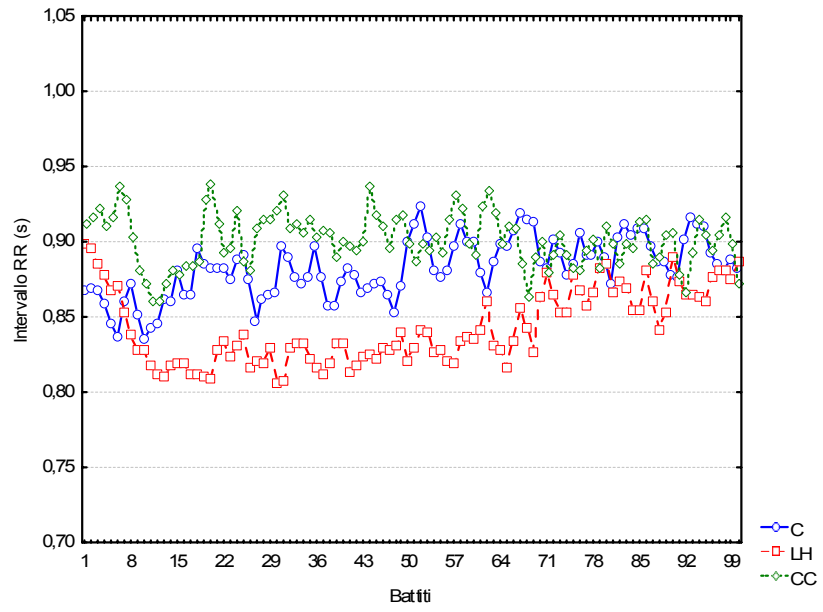


Fig. 16

Tacogramma medio dei 100 cicli successivi a ogni stimolazione gustativa nei maschi.

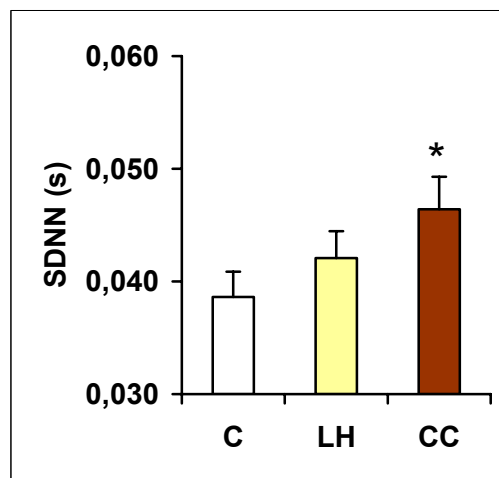
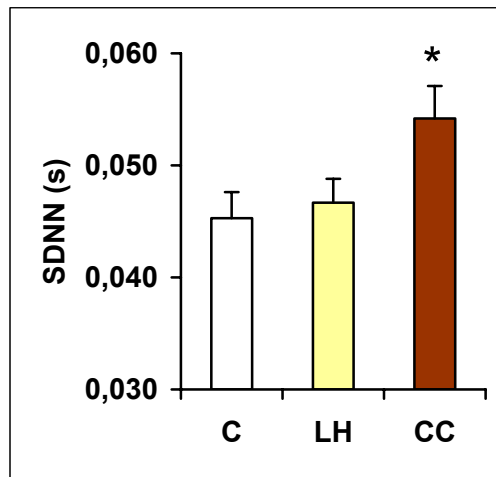


Fig. 17

Valori medi \pm E.S. della SDNN dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nei maschi nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa rispetto al controllo ($p = 0.0135$ e $p = 0.023$ nella 1° e 2° sessione sperimentale; test di Student per dati appaiati).

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

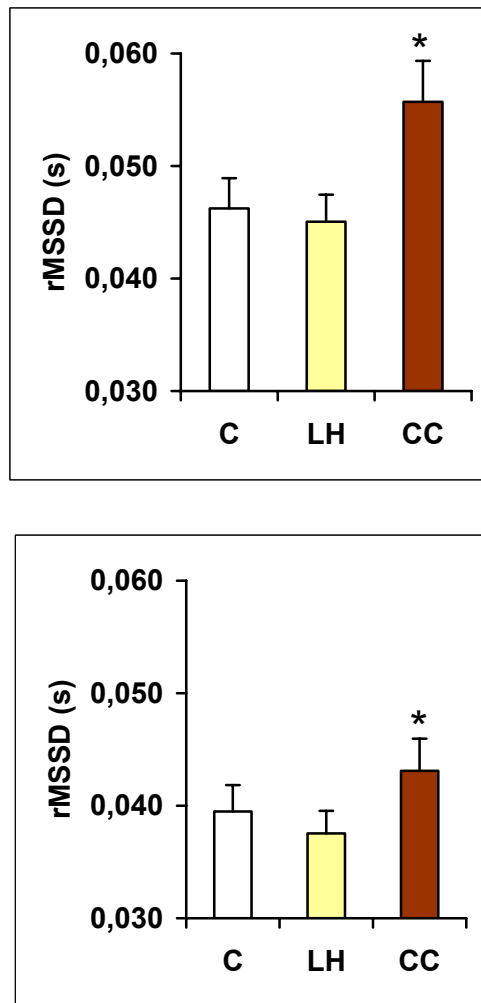


Fig. 18

Valori medi \pm E.S. della rMSSD dei 100 cicli successivi ad ogni stimolazione nei maschi nella 1° sessione sperimentale (in alto), negli esperimenti ripetuti (in basso).

* = differenza significativa ($p = 0.016$ e $p = 0.016$ nella 1° e la 2° sessione sperimentale; test di Student per dati appaiati).

CC = crema di cioccolato

LH = omogenato di limone

C = controllo

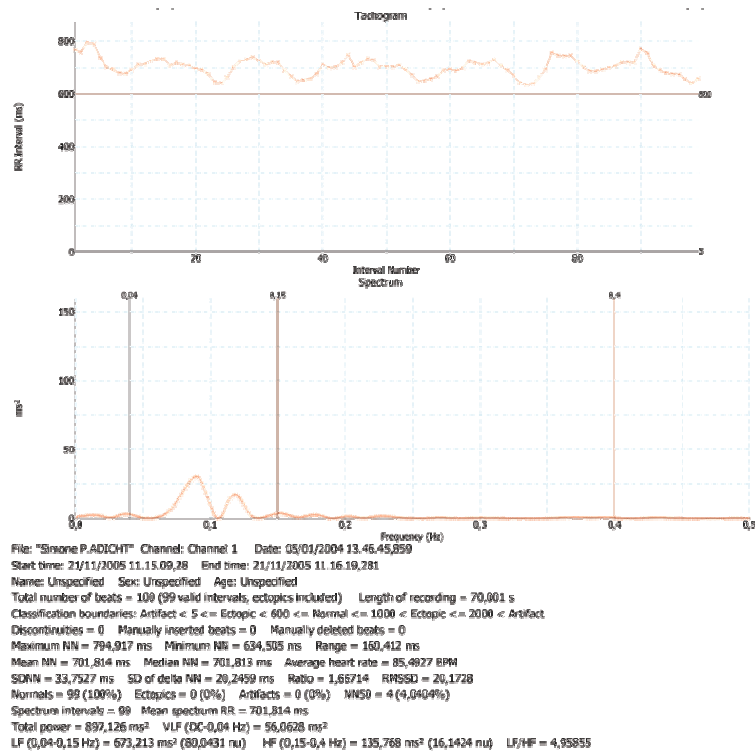


Fig. 19

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dell'attività di base in una ragazza del panel.

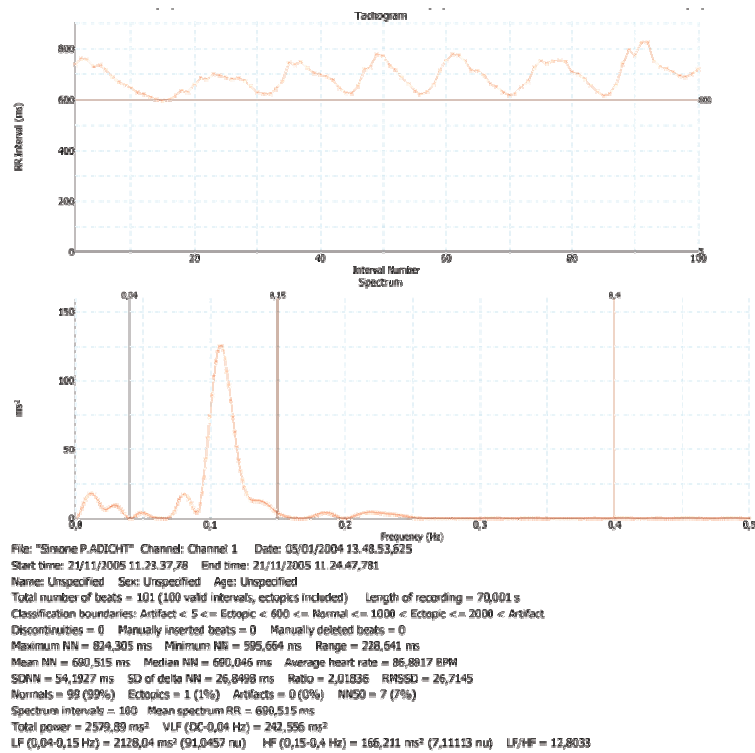


Fig. 20

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione sgradevole con il LH nello stesso ragazzo del panel della Fig. 19

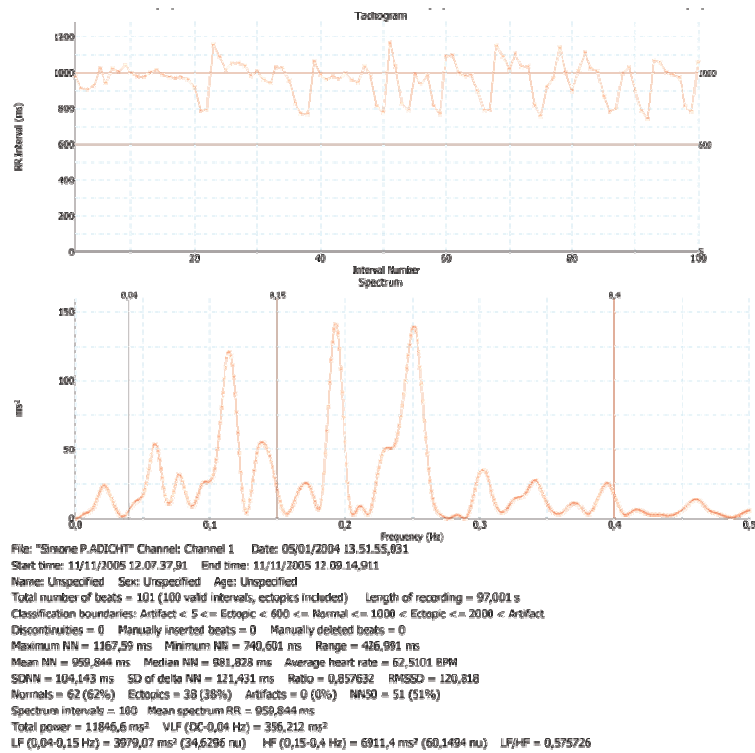


Fig. 21

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione gradevole con il CC nello stesso ragazzo del panel della Fig. 19 e 20

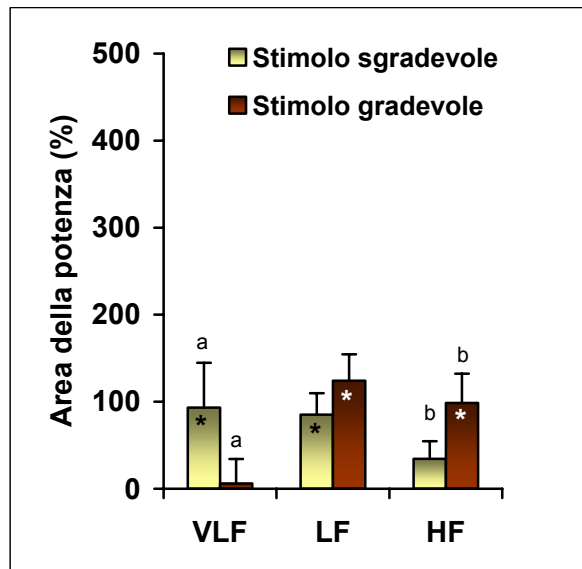


Fig. 22

Variazioni percentuali medie \pm ES della potenza delle VLF, LF e HF rispetto ai valori del livello di base calcolati in finestre temporali di 100 cicli successivi alla stimolazione gradevole e a quella sgradevole rispetto al valore pre-stimolo nei maschi.

* = differenza significativa rispetto al corrispondente valore pre-stimolo (test di Student per dati appaiati; $p \leq 0.001$).

a, b = differenza significativa (test di Student per dati appaiati; $p \leq 0.001$).

Saccarosio

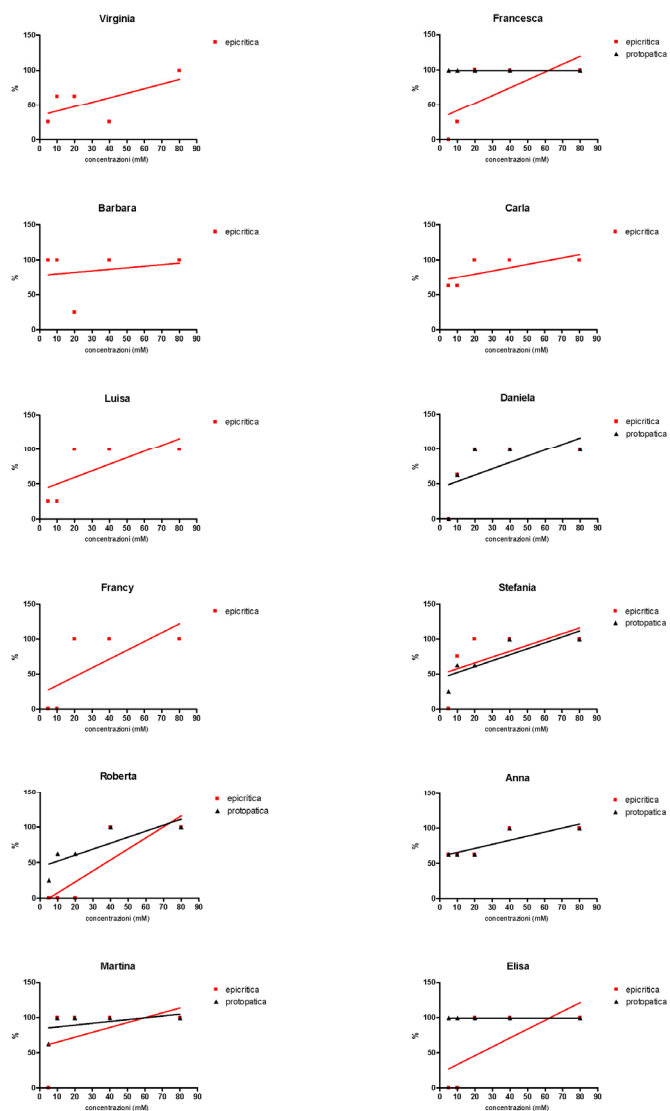


Fig. 23

Rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione del saccarosio

Giudici	Protopatica (mM)	Epicritica (mM)
1		23.56
2	< 5	17.69
3		10.09
4	6.43	6.43
5		23.08
6	7.38	1.13
7	7.39	37.54
8	< 5	23.24
9		< 5
10		< 5
11	< 5	< 5
12	< 5	< 5

Tab. 1

Soglie individuali per il saccarosio.

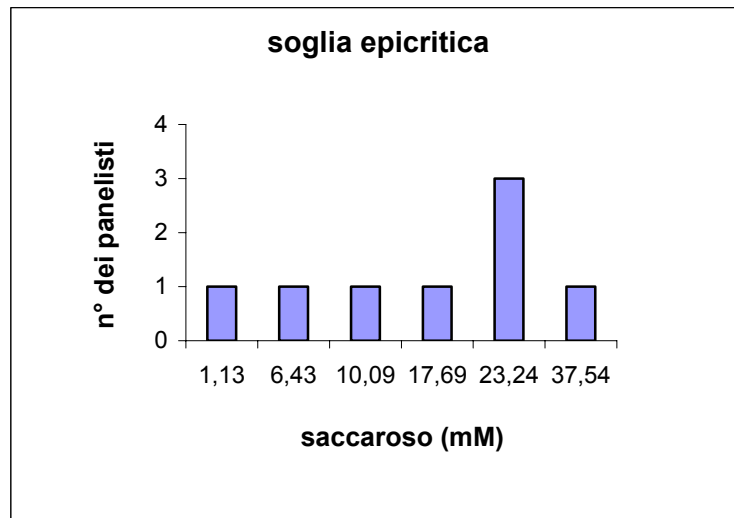


Fig. 24

Distribuzione della soglia epicritica individuale per il saccaroso.

Chinino

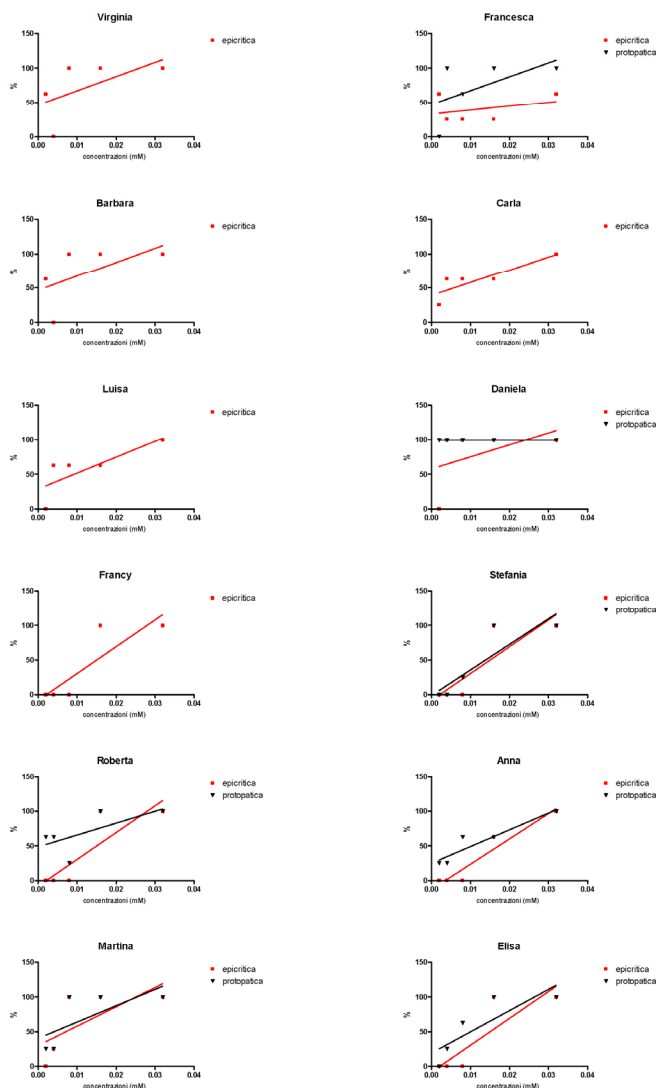


Fig. 25

Rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione del chinino.

Giudici	Protopatica (mM)	Epicritica (mM)
1		0.002
2	0.001	0.030
3		0.002
4		0.006
5		0.009
6	< 0.002	< 0.002
7		0.015
8	0.014	0.015
9	0.001	0.015
10	0.010	0.017
11	0.004	0.007
12	0.010	0.015

Tab. 2

Soglie individuali per il chinino

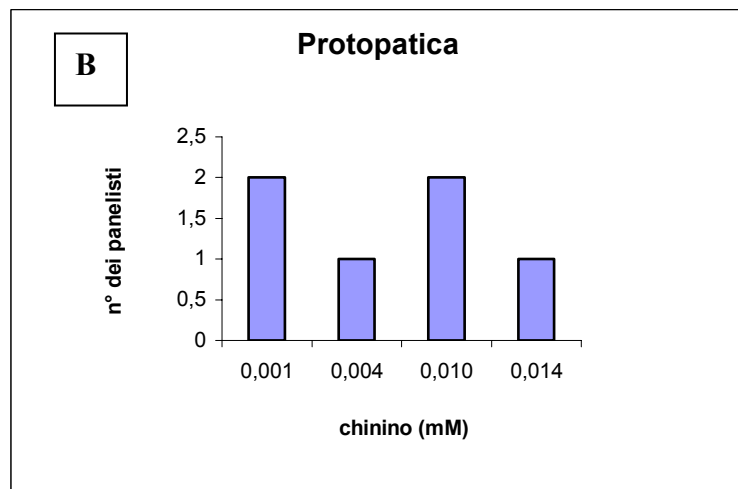
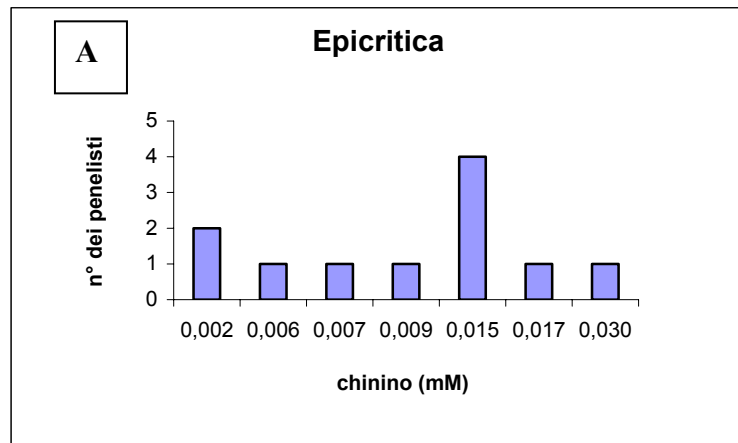


Fig. 26

Distribuzione delle soglie protopatiche ed epicritiche individuali per il chinino.

	Protopatica (mM)	Epicritica (mM)
I sotto-gruppo	0.0021	0.0040
II sotto-gruppo	0.0114	0.0166
Media Geometrica	0,0067	0.0087

Tab. 3

Soglie gustative di gruppo per il chinino

NaCl

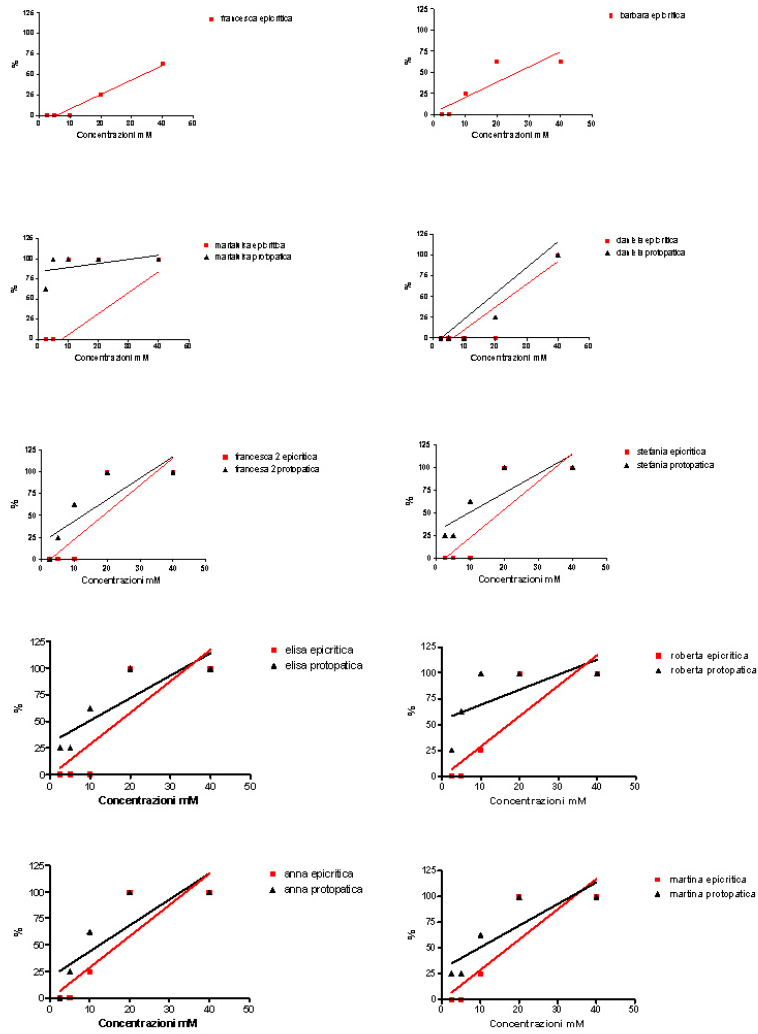


Fig. 27

Rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione dell'NaCl.

Giudici	Protopatica (mM)	Epicritica (mM)
1		26.59
2		29.59
3	2.5	11.62
4	24.64	26.96
5	12.51	18.76
6	9.59	18.76
7	9.64	18.76
8	2.5	17.24
9	12.51	17.24
10	9.64	17.24

Tab. 4

Soglie individuali per l'NaCl

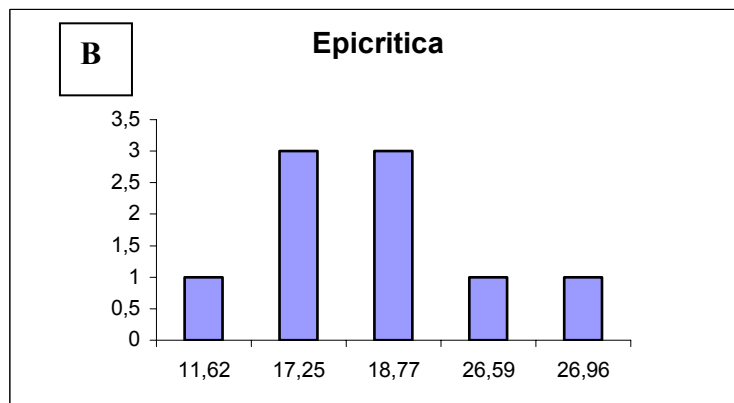
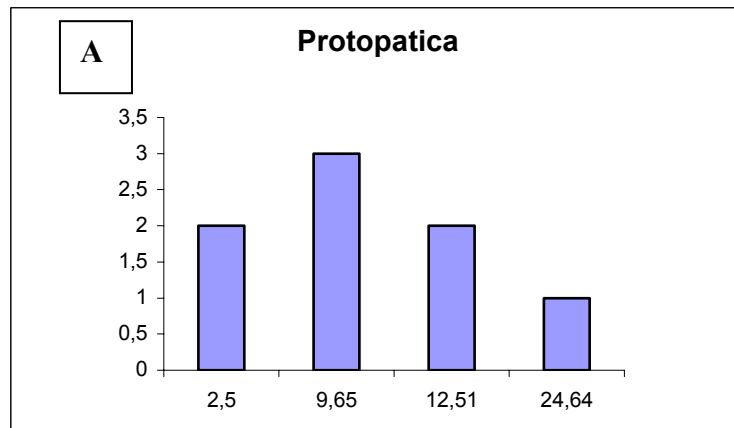


Fig. 28

Distribuzione delle soglie protopatiche (A) ed epicritiche (B) individuali per NaCl.

Acido Citrico

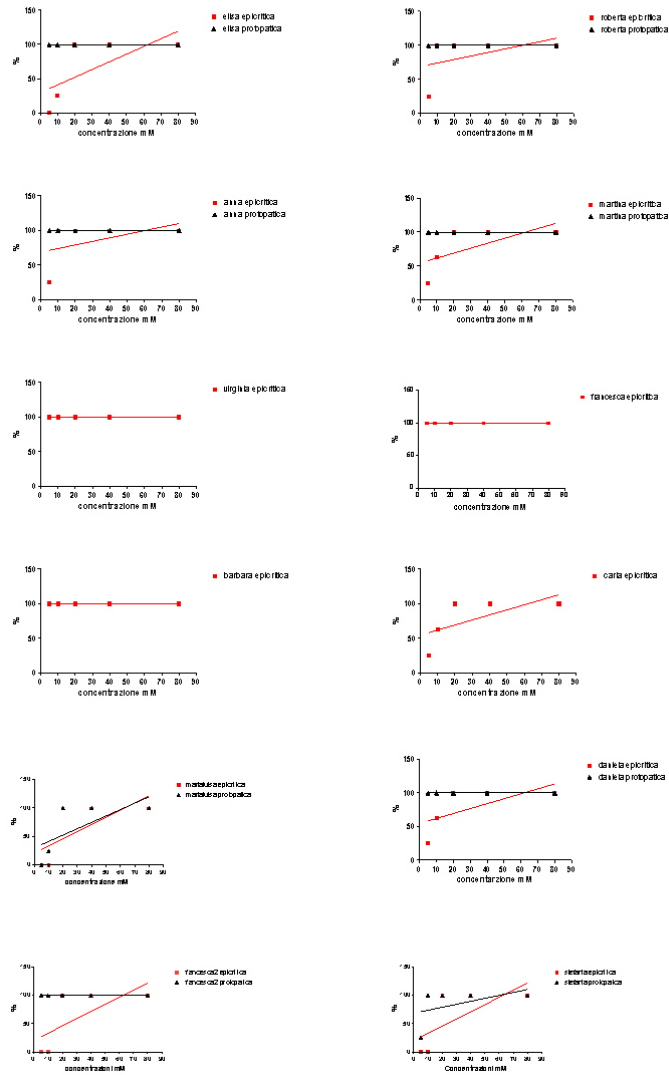


Fig. 29

Rette di regressione individuali che esprimono l'andamento della percentuale di esatta percezione (nero) e di esatto riconoscimento (rosso) in funzione della concentrazione dell'acido citrico.

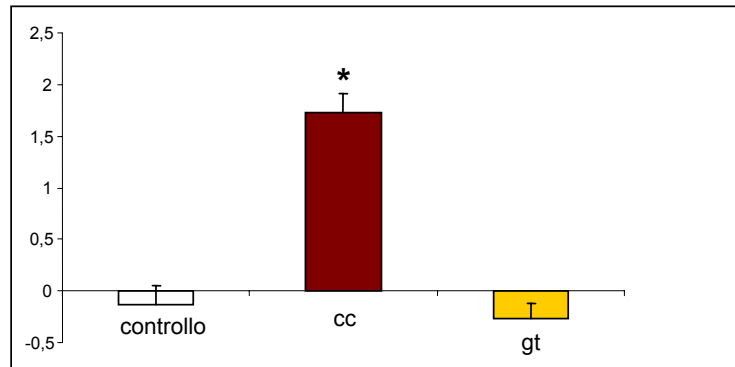


Fig. 30

Punteggi edonistici (valori medi \pm ES) associati a ciascuna stimolazione gustativa.

CC= crema di cioccolato

GT= gliceril tripalmitato

* indica variazione significativa (test post-hoc di Tukey; $p=0.00012$)

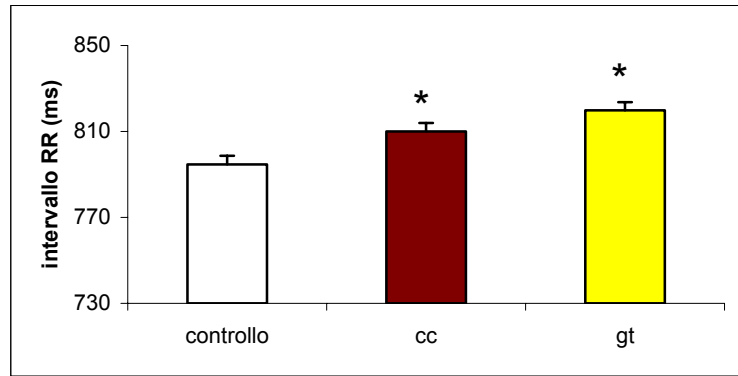


Fig. 31

Valori medi \pm ES delle distanze R-R misurate dei 100 cicli cardiaci successivi a ciascuna delle tre stimolazioni gustative.

CC= crema di cioccolato

GT= gliceril tripalmitato

* indica variazione significativa rispetto al valore misurato in risposta al controllo (test post-hoc di Tukey; $p < 0.016$)

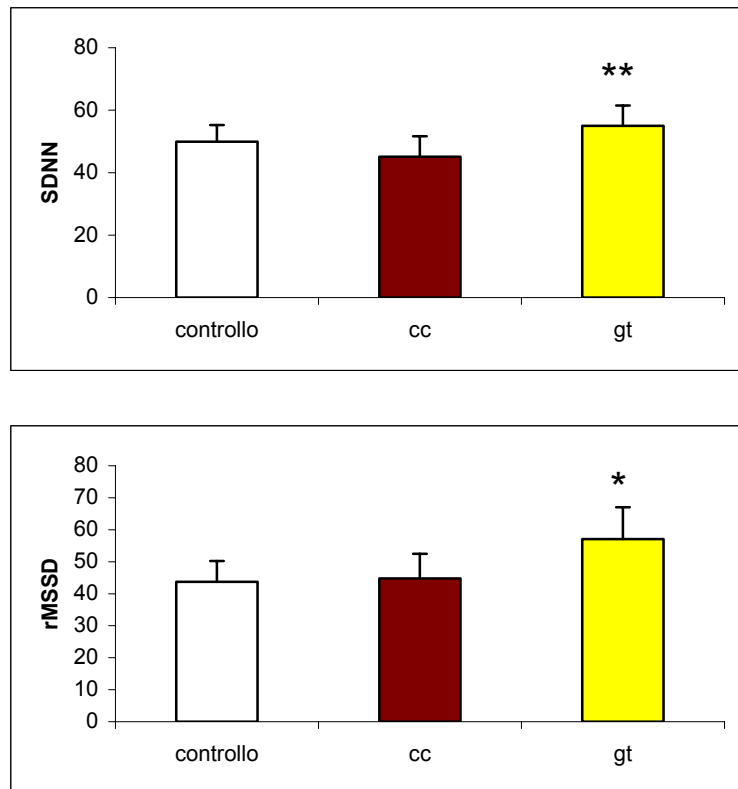


Fig. 32

Valori medi \pm ES delle SDNN (in alto) e delle rMSSD (in basso) calcolati dei 100 cicli cardiaci successivi a ciascuna stimolazione gustativa.

CC= crema di cioccolato

GT= gliceril tripalmitato

* indica variazione significativa (test di Student per dati appaiati)

** indica variazione significativa rispetto al valore misurato dopo la stimolazione con il CC (test di Student per dati appaiati)

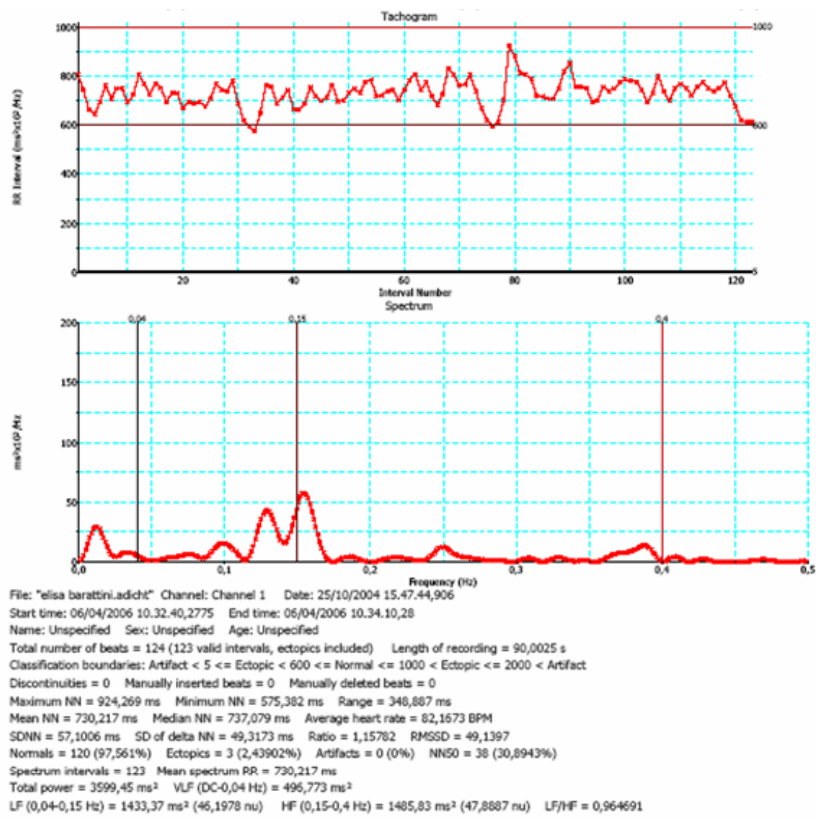


Fig. 33

Esempio di tachogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione di controllo in una ragazza del panel.

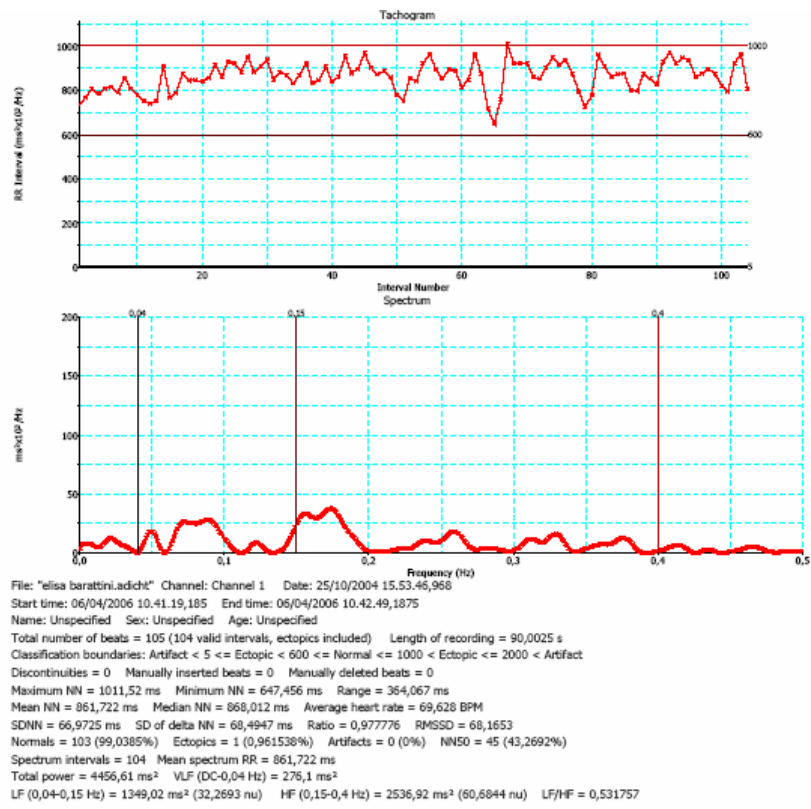


Fig. 34

Esempio di tachogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione con il CC nella stessa ragazza della Fig.33.

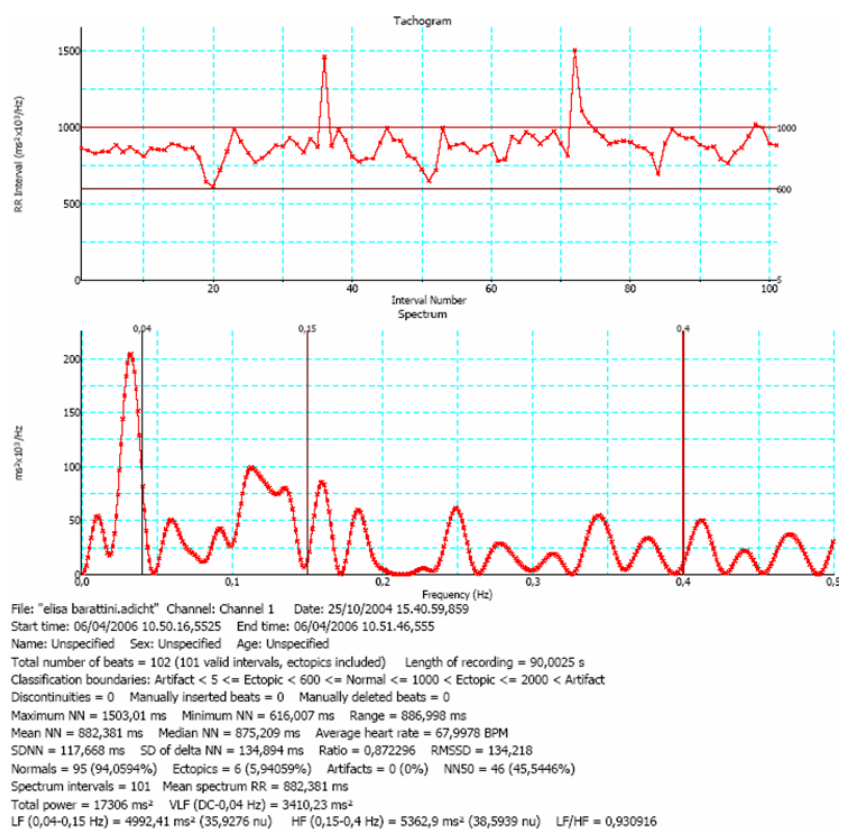


Fig. 35

Esempio di tacogramma (in alto) e di spettro di potenza (in basso) dei 100 battiti cardiaci successivi alla stimolazione con il GT nella stessa ragazza delle Figg. 33 e 34.

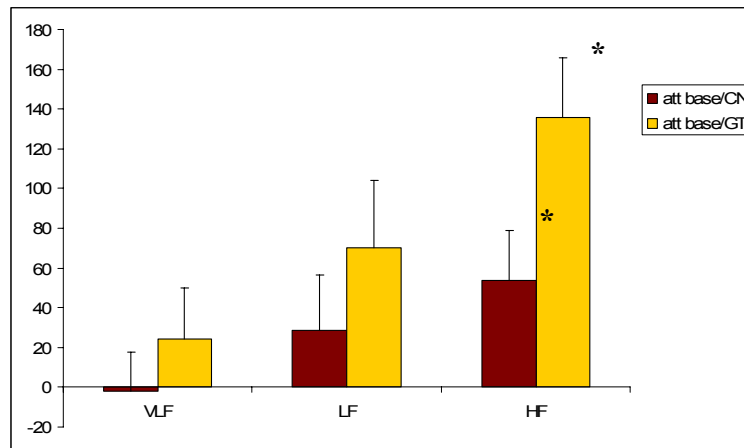


Fig. 36

Variazioni percentuali medie \pm ES della potenza delle VLF, LF e HF rispetto ai valori del livello di base calcolati in finestre temporali di 100 battiti successivi a ciascuna stimolazione gustativa

* indica la variazione significativa ($p = 0.049$; test di Student per dati appaiati).

CC= crema di cioccolato

GT= gliceril tripalmitato