



# **Borse di studio**

# Studio dell'omeostasi del calcio e del sodio nei motoneuroni spinali in un modello transgenico murino di sclerosi laterale amiotrofica

Federica Albo

## Razionale e obiettivi

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una elevata perdita dei motoneuroni del midollo spinale, del tronco e della corteccia motoria. La disfunzione e la morte di questi motoneuroni causa una progressiva debolezza muscolare e porta i pazienti ad una completa paralisi e alla morte nei 5 anni successivi alla diagnosi (Tandan R. and Bradley W.G. (1985) *Ann Neurol* 18: 271-280). Di tutti i casi di SLA, 5-10% sono della forma familiare (FSLA) e oltre 60 differenti mutazioni sono state identificate, associate con una malattia clinica fenotipicamente non distinta dalla forma sporadica della SLA. Il 15-20% dei casi FSLA possiede una mutazione nel gene che codifica per la Cu,Zn superossido dismutasi (SOD1) (Shaw C.E. et al. (1998) *Ann Neurol* 43: 390-394). Topi transgenici che esprimono la SOD1 umana mutata presentano sintomi che sono dal punto di vista neuropatologico simili ai pazienti SLA, mentre topi transgenici che esprimono la forma umana wild-type della SOD1 risultano essere sani. Il meccanismo per il quale le mutazioni della SOD1 inducono la degenerazione dei motoneuroni, rimane ancora da definirsi.

Nostri recenti lavori hanno mostrato come l'espressione del gene mutato della SOD1 alteri le proprietà elettriche dei motoneuroni spinali in un modello murino di FSLA associato alla mutazione puntiforme della SOD1 Gly<sup>93</sup>-Ala (G93A). In particolare è stato mostrato nei motoneuroni G93A rispetto a quelli di controllo un aumento dell'eccitabilità (Pieri M. et al. (2003) *Neurosci Letters* 351(3): 153-156) e una mutata permeabilità ed espressione dei recettori non-NMDA del glutammato AMPA (Pieri M. et al. (2003) *Neuroscience* 122(1): 47-58); Spalloni A. et al. (2004) *Neurobiol Dis* 15(2): 340-350).

Un elevato numero di evidenze sperimentali tendono a legare l'ingresso intracellulare di calcio e la neurodegenerazione mediata dai recettori glutammatergici. È noto infatti che brevi periodi di attivazione dei recettori NMDA, altamente permeabili al calcio, determinano un overload di questo ione a livello intracellulare con conseguente danno neuronale. I recettori AMPA/kainato sono invece generalmente impermeabili al calcio, e determinano tossicità solo dopo lunghi periodi di stimolazione recettoriale. Recenti studi hanno dimostrato, in colture primarie di motoneuroni spinali, l'espressione di recettori AMPA/kainato permeabili al calcio: la presenza di questi canali potrebbe contribuire alla loro elevata e selettiva vulnerabilità (Carriedo S.G. et al. (1995) *NeuroReport* 6: 945-948).

Questo progetto ha avuto lo scopo di determinare il ruolo svolto dal calcio nella tossicità indotta dal glutammato, mediante lo studio dell'omeostasi dei

due ioni principalmente coinvolti nell'attivazione dei recettori AMPA, cioè il calcio e il sodio. Il sistema sperimentale utilizzato consiste in colture primarie di motoneuroni spinali ottenuti da topi transgenici G93A (modello sperimentale di FSLA) e da topi di controllo (sia wild-type che transgenici, cioè topi che sovraesprimono la SOD1 umana non mutata).

Le misure di concentrazione intracellulare di questi ioni sono state effettuate utilizzando la tecnica di video-immagine fluorimetrica abbinata alla tecnica del patch-clamp nella configurazione whole-cell, sia in condizioni basali, che dopo attivazione dei recettori AMPA, mediante applicazione di puff di agonista (kainato a concentrazione saturante di 200  $\mu$ M).

## Risultati e conclusioni

I risultati riportati di seguito sono stati ottenuti dall'analisi di 14 cellule di controllo, 11 SOD1 e 9 G93A. I motoneuroni, identificati mediante criteri morfologici, sono stati utilizzati tra l'ottavo e il decimo giorno di sviluppo in coltura primaria (8-10 DIV), in modo tale da minimizzare le differenze dovute all'espressione recettoriale. Dopo aver riempito l'elettrodo con gli indicatori fluorescenti Fura-2 e SBFI, utilizzati rispettivamente per la misura dei livelli di calcio e sodio intracellulari, si è proceduto alle registrazioni elettrofisiologiche e microfluorimetriche delle cellule neuronali.

Clampando i motoneuroni spinali al potenziale di membrana di -60 mV, sono stati inizialmente misurati i livelli basali di  $[Ca^{2+}]_i$ , prima dell'applicazione del kainato. I valori di  $[Ca^{2+}]_i$  basale sono stati calcolati facendo la media dei valori di intensità fluorescente delle immagini acquisite durante i primi minuti di registrazione. I motoneuroni G93A hanno mostrato, in queste condizioni di riposo, dei valori di  $[Ca^{2+}]_i$  basale significativamente minori ( $0,67 \pm 0,04$ ) rispetto a quelli delle cellule di controllo ( $0,81 \pm 0,07$ ;  $p < 0,5$ ) e SOD1 ( $1,023 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ).

L'applicazione per 5 secondi di puff di kainato 200  $\mu$ M (concentrazione saturante per i recettori AMPA, come precedentemente determinato dallo studio di affinità per il kainato delle tre popolazioni cellulari analizzate) ha indotto una corrente inward non desensitizzante con contemporaneo innalzamento dei livelli di  $[Ca^{2+}]_i$ ; in tutti i motoneuroni analizzati, i transienti di calcio sono risultati proporzionali all'ampiezza delle correnti inward indotte dall'agonista. Per rendere confrontabili i valori di innalzamento di  $[Ca^{2+}]_i$  delle popolazioni neuronali, l'incremento massimo di fluorescenza, corrispondente al picco del transiente di  $Ca^{2+}$  di ogni singola cellula, è stato normalizzato per l'integrale della rispettiva corrente inward. La media di questi valori normalizzati non è risultata statisticamente differente nelle tre popolazioni di neuroni studiate (cellule di controllo  $0,03 \pm 0,004$ ; SOD1  $0,041 \pm 0,006$ ; G93A  $0,044 \pm 0,009$ : questi risultati dimostrano la mancanza di differenze significative di permeabilità al calcio dei recettori ionotropici AMPA espressi nei motoneuroni spinali del nostro modello sperimentale.

Per valutare eventuali variazioni nella dinamica dell'omeostasi del calcio, è stata misurata la  $[Ca^{2+}]_i$  al termine dell'applicazione del kainato, e più

precisamente quando il livello di fluorescenza rilevato è ritornato a valori basali, o si è comunque stabilizzato a valori costanti. La  $[Ca^{2+}]_i$  media, misurata al termine del transiente di calcio nei motoneuroni G93A ( $0,97 \pm 0,16$ ), non è risultata statisticamente differente rispetto ai valori medi riscontrati nelle altre due popolazioni cellulari (controlli  $0,88 \pm 0,06$ ; SOD1  $1,07 \pm 0,13$ ). Il confronto, invece, con i valori di  $[Ca^{2+}]_i$  basali, ha permesso di mettere in evidenza una difficoltà da parte dei soli motoneuroni G93A a ritornare ai valori di calcio citosolico originari. Queste cellule, infatti, in seguito ad esposizione al puff di agonista, hanno presentato un incremento del 35% nei valori medi di  $[Ca^{2+}]_i$  (valore basale  $0,63 \pm 0,03$ ; valore al termine del transiente  $0,97 \pm 0,16$ ).

Per quanto riguarda la determinazione dei livelli citosolici di  $[Na^+]_i$ , ottenuti mediante le stesse metodiche prima descritte per lo ione calcio, non sono state osservate differenze significative tra le tre popolazioni cellulari analizzate, né riguardo all'entità dei transienti indotti dall'agonista kainato dei recettori AMPA, né relativi all'omeostasi ed ai livelli basali di tale ione nei motoneuroni analizzati.

Questi risultati concordano con quanto detto in precedenti lavori pubblicati in questo laboratorio, relativi alle alterazioni di permeabilità dei recettori AMPA al calcio, visto che non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nell'ingresso di questo ione in seguito ad attivazione dei recettori con puff di kainato.

Il dato invece molto interessante riguarda lo studio dell'omeostasi del calcio: il confronto delle concentrazioni di calcio misurate all'inizio delle registrazioni elettrofisiologiche, e dopo l'applicazione dell'agonista kainato, ha fatto evidenziare, infatti, una maggiore difficoltà da parte dei motoneuroni G93A nel recuperare i livelli iniziali di calcio basale.

Da questi dati si può ipotizzare l'importante coinvolgimento dei sistemi neuronali di buffer per gli ioni calcio nello sviluppo della patogenesi SLA.

## **Effetto dell'ischemia cellulare nei neuroni striatali registrati intracellularmente**

Ilaria Barone

In questo studio sono state prese in considerazione recenti acquisizioni riguardo i meccanismi ionici attivati dalla deprivazione di ossigeno e glucosio in due diverse popolazioni di neuroni centrali registrati *in vivo*: i neuroni "spinosi" neostriatali ed i neuroni "non-spinosi" neostriatali che dimostrano, rispettivamente, una delle maggiori sensibilità e resistenza all'ischemia ed ad altre condizioni neurologiche morbose quali la corea di Huntington (Calabresi P. et al., 1998).

I neuroni spinosi neostriatali sono cellule GABAergiche di proiezione di media grandezza e rappresentano circa il 95% della popolazione neuronale di questo tipo. I neuroni non spinosi neostriatali, invece, sono grandi interneuroni colinergici e rappresentano solo il 2-3% delle cellule neostriatali (Kawaguchi Y., 1992).

L'ischemia induce la depolarizzazione di membrana nei neuroni striatali spinosi. Periodi di ischemia inferiori ai 6 minuti provocano variazioni di potenziale di membrana reversibili mentre, prolungando l'ischemia, si determina una depolarizzazione irreversibile di queste cellule.

È noto che farmaci che interferiscono con il rilascio di glutammato e con conduttanze voltaggio dipendenti multiple favoriscono il recupero elettrofisiologico dopo prolungate esposizioni all'ischemia nello striato.

I farmaci antiepilettici possono essere presi in considerazione quale strumenti efficaci nel modulare le alterazioni elettrofisiologiche, e anche morfologiche, successive a periodi di ischemia protratti.

Nel presente studio è stato dimostrato che, tra i farmaci antiepilettici (AED), la lamotrigina (LTG) e la remacemide (REMA) esercitano una complessa azione inibitoria sull'attività elettrica dei neuroni spinosi striatali. Questi due AED condividono un comune meccanismo d'azione quale la limitazione della scarica di potenziali d'azione, ma mostrano un diverso effetto sulla trasmissione sinaptica eccitatoria essendo la LTG un modulatore presinaptico del rilascio di glutammato, attraverso l'inibizione dei canali del calcio di tipo N e la REMA un antagonista non competitivo del recettore non NMDA. È stato inoltre dimostrato che sia la LTG che la REMA esercitano un effetto neuroprotettivo dose-correlato sulla perdita irreversibile dell'ampiezza del potenziale di campo così come del rigonfiamento cellulare indotti dall'ischemia *in vitro*. È interessante che basse concentrazioni di LTG e REMA abbiano mostrato un effetto additivo nella neuroprotezione dello striato contro l'ischemia. Queste osservazioni sperimentali hanno un potenziale impatto clinico; è possibile, infatti, speculare che in condizioni cliniche che causino deprivazione di energia (ischemia, anossia, malattie neurodegenerative) basse dosi di LTG e REMA siano in grado di proteggere i neuroni centrali in modo complementare.

In piena linea con tali riscontri e grazie alle recenti acquisizioni molecolari

sull'eterogeneità dei recettori NMDA, proseguendo con questo studio, è stata focalizzata l'attenzione sull'utilizzo di antagonisti sottotipo-specifici in grado di consentire il blocco di un determinato sottotipo recettoriale dell'NMDA, prevenendo l'insorgenza degli effetti collaterali provocati dal loro totale blocco. Sono stati per questo selezionati neuroni spinosi dello striato per analizzare l'effetto dell'inibizione farmacologica delle subunità NR2B sia sulla plasticità sinaptica fisiologica che su quella post-ischemica. Un breve episodio di ischemia *in vitro* provoca una transitoria depolarizzazione nei neuroni registrati con tecniche intracellulari, cui fa seguito un incremento a lungo termine (2-4 ore) dell'ampiezza dei potenziali sinaptici eccitatori indotto dall'attivazione dei recettori NMDA; questa forma patologica di plasticità sinaptica è stata denominata LTP post-ischemico. Antagonisti selettivi della subunità NR2B, quali ifenprodil e suoi derivati si sono mostrati efficaci nell'inibire in modo dose correlato l'LTP post ischemico, lasciando invariata la depolarizzazione della membrana dovuta all'insulto ischemico. È stato poi dimostrato che l'ifenprodil, applicato alla dose di 10 $\mu$ M, non modifica l'LTP fisiologico indotto dalla stimolazione ad alta frequenza (HFS) della via corticostriatale, al contrario di quanto accade con 30 $\mu$ M di D-APV, un antagonista competitivo dell'NMDA. L'effetto neuroprotettivo dell'ifenprodil è stato quindi valutato mediante l'utilizzo del modello sperimentale di ischemia *in vivo* con l'occlusione permanente dell'arteria cerebrale media nel ratto (pMCAO). Negli animali trattati con questo antagonista 3 ore dopo l'insulto ischemico, alla dose di 20mg/Kg, il volume dell'infarto cerebrale, valutato a distanza di 4, 24, 48 ore e 7 giorni dall'occlusione dell'arteria, risultava significativamente ridotto se confrontato con quello degli animali trattati con il veicolo. È stato interessante notare che la stessa dose di ifenprodil che aveva ridotto il volume ischemico e migliorato l'outcome neurologico fosse capace di bloccare l'LTP indotta dall'ischemia *in vitro* in fettine prelevate da animali trattati sistemicamente con ifenprodil 3 ore prima del sacrificio. Ulteriori esperimenti hanno permesso di dimostrare che i due diversi tipi di plasticità sinaptica, post-ischemica e fisiologica, si bloccano in maniera mutuale per cui si può ipotizzare che l'effetto neuroprotettivo degli antagonisti delle subunità NR2B dell'NMDA sia mediato dalla propria selettiva azione sulla plasticità sinaptica patologica. Un meccanismo fisiologico dei neuroni è la capacità di depotenziare la sinapsi, una volta indotto il potenziamento a lungo termine, attraverso una stimolazione a bassa frequenza delle vie corticostriatali (depotenziamento). È interessante notare che solo in presenza di ifenprodil applicato dopo l'induzione dell'LTP post-ischemico si è in grado di indurre un depotenziamento simile a quello indotto nell'LTP fisiologico.

## Confronto di studi funzionali tramite Risonanza Magnetica a densità di corrente a 1.5T e 3T

Marta Bianciardi

### Razionale

L'attività di ricerca svolta nell'anno 2004 riguarda la fattibilità della misura *in vivo* degli effetti magnetici primari indotti da correnti neuronali tramite tecniche di Risonanza Magnetica (RM). La rivelazione di effetti magnetici primari indotti da correnti neuronali, per mezzo di misure a RM, comporterebbe un notevole aumento di specificità nello studio della funzione cerebrale rispetto alla metodologia RM attualmente in uso, la BOLD-fMRI. Quest'ultima infatti misura la risposta emodinamica associata all'attività neuronale, piuttosto che essa stessa. Conseguentemente le risoluzioni temporale e spaziale delle misure BOLD-fMRI sono limitate rispettivamente dalla lenta scala temporale (secondi) della risposta emodinamica e dalla scarsa specificità spaziale (effetto BOLD riscontrato anche nei grandi vasi di drenaggio, a parecchi mm dalla sorgente elettrica). Almeno tre sono le problematiche individuate per rivelare effetti magnetici primari indotti da correnti neuronali, tramite RM.

Si stima che gli effetti magnetici associati al passaggio delle correnti neuronali siano molto deboli (nTesla). Per tale motivo, abbiamo studiato e ottimizzato la sensibilità delle immagini a RM, in particolare delle immagini di fase, per misurare piccole variazioni magnetiche (Bianciardi M. et al. (2004) *Biomedizinische Technik* 48: 290-291; Bianciardi M. et al. (2004) *Neuroimage (Supplement 1): S57, posterTH 258*) (vedere "Ottimizzazione del metodo su fantoccio ed *in vivo*").

La rivelazione di effetti diretti dell'attività elettrica neuronale potrebbe essere mascherata dalla presenza degli effetti emodinamici che la accompagnano e che sono alla base di variazioni BOLD nel segnale RM. In un secondo studio sono state proposte due possibili soluzioni al problema (Bianciardi M. et al. (in press Jan 2005) *Magn Reson Imag*) (vedere "Indagine della fattibilità del metodo *in vivo*").

In ultimo una precisa sincronizzazione spazio-temporale tra l'acquisizione RM e l'evento neuronale è necessaria per ottimizzare il contrasto; se si utilizza per l'acquisizione una sequenza spin-eco, SE, essa è anche fondamentale per evitare la rifocalizzazione del segnale di interesse durante il corso dell'acquisizione. Sempre in un secondo studio è stato proposto un metodo per la sincronizzazione dei due eventi (Bianciardi M. et al. (in press Jan 2005) *Magn Reson Imag*) (vedere "Indagine della fattibilità del metodo *in vivo*").

### *Ottimizzazione del metodo su fantoccio ed in vivo*

In un primo studio (Bianciardi M. et al. (2004) *Biomedizinische Technik* 48: 290-291; Bianciardi M. et al. (2004) *Neuroimage (Supplement 1): S57, posterTH 258*), abbiamo messo a punto metodi per aumentare la stabilità temporale della fase in immagini spin-eco EPI a RM.

Diversi schemi di acquisizione e configurazioni hardware sono stati utilizzati sia su fantoccio che su tessuti cerebrali *in vivo*. In particolare l'approccio a singolo eco è stato paragonato con due metodi di combinazione degli echi multipli. Abbiamo anche valutato la performance di diverse bobine a radio-frequenza e di differenti velocità di acquisizione dei dati (bandwidth, BW). Infine tramite l'utilizzo di un set-up sperimentale ottimizzato abbiamo investigato il limite di rivelazione di effetti magnetici indotti da correnti elettriche ad 1.5T.

In accordo con le predizioni teoriche, miglioramenti significativi nella stabilità temporale (fino a 5mrad/6min nel fantoccio e 8.6mrad *in vivo*) sono stati ottenuti. In particolare, una migliore stabilità è stata conseguita per tecniche a eco multiplo rispetto all'eco singolo; per bobine di superficie ad alta sensibilità in ricezione rispetto a bobine di volume per la testa; per bassi (926) più che per alti (2083) BW (espressi in Hz/pixel). In ultimo, variazioni di fase minime pari a 1.5mrad indotte da correnti intense 8.9mA sono state misurate ad 1.5 Tesla. Esse corrispondono a variazioni nel campo magnetico pari a 0.22nT e sono comparabili a quelle misurate a 3 Tesla in altri studi.

#### *Indagine della fattibilità del metodo in vivo*

In un secondo lavoro (Bianciardi M. et al. (in press Jan 2005) *Magn Reson Imag*) abbiamo studiato la fattibilità della rivelazione degli effetti magnetici primari causati dall'attività neuronale *in vivo* tramite immagini spin-eco RM, sia di fase che di ampiezza.

Per diminuire eventuali contributi BOLD nel segnale RM, abbiamo scelto di acquisire immagini spin-eco rispetto ad immagini gradient-eco, in quanto è noto che gli effetti BOLD per tale sequenza, soprattutto a bassi campi, sono ridotti. Inoltre il controllo di eventuali artefatti dovuti ad effetti BOLD o di movimento è stato ulteriormente migliorato tramite l'ottimizzazione del disegno sperimentale. In particolare, è stato utilizzato un protocollo di stimolazione tale da mandare in stazionarietà la risposta emodinamica, mantenendo al contempo valida la rivelazione di effetti primari delle correnti neuronali. Questi ultimi, infatti, avvengono su una scala temporale molto più rapida.

Per sincronizzare spazio-temporalmente l'acquisizione con l'evento neuronale di interesse abbiamo proposto l'uso combinato di misurazioni EEG di potenziali visivi evocati e di misure BOLD fMRI prima della misurazione degli effetti neuronali tramite immagini SE. La localizzazione, l'orientamento e le tempistiche di risposta della sorgente neuronale ottenute tramite tali tecniche sono state utilizzate come guida per orientare la testa del soggetto all'interno dello scanner a RM, per posizionare le fette di acquisizione e per stabilire le tempistiche degli eventi di sequenza RM.

L'approccio proposto è stato applicato nello studio della risposta neuronale visiva di tre volontari sani. In un soggetto, sono state osservate variazioni significative nelle immagini di fase in un pixel dell'area visiva primaria dovute con buona probabilità alla risposta elettrica allo stimolo visivo. I risultati conseguiti in questo studio pilota sono incoraggianti e suggeriscono la fattibilità del metodo.

## Conclusioni

Il risultato conseguito su fantoccio ha dimostrato che l'ottimizzazione dell'acquisizione e del post-processing, più che l'utilizzo di alti campi magnetici statici, è cruciale per rivelare deboli cambiamenti nelle immagini di fase. Le variazioni minime di campo magnetico osservate sono dell'ordine di grandezza delle variazioni attese nei tessuti cerebrali in seguito al passaggio di correnti neuronali. Il risultato ottenuto, relativamente alla sensibilità della RM ad 1.5 Tesla, è quindi incoraggiante per l'imaging *in vivo* delle correnti biologiche cerebrali.

Anche i risultati conseguiti *in vivo* sono promettenti per la fattibilità dei metodi proposti per la misura *in vivo*. Comunque, la validazione dell'approccio e la rivelazione *in vivo* degli effetti neuronali di interesse deve essere compiuta tramite uno studio sistematico. A tal fine è auspicabile l'estensione a più volontari sani della ricerca pilota svolta in passato.

## **Analisi dei movimenti oculari in un compito di rievocazione libera di posizioni spaziali**

Rita Bonanni

### **Introduzione**

Il programma di ricerca è stato svolto utilizzando una procedura computerizzata che ha permesso di presentare sequenze di stimoli spaziali allo scopo di valutare l'accuratezza di rievocazione di tali informazioni ed un sistema in grado di registrare i movimenti oculari dei soggetti durante lo studio delle diverse posizioni spaziali.

Gli studi presenti in letteratura e riguardanti la rievocazione di sequenze di posizioni spaziali sono per la maggior parte basati su una rievocazione seriale degli stimoli mentre la rievocazione della loro effettiva posizione spaziale è richiesta solo in alcuni studi (Farrand P. et al. (2001) *Acta Psychologica* 106: 285-301; Smyth M.M., Scholey K.A. (1996) *Q J Exp Psychol* 49A(1): 139-177) ma non in altri (Jones D. et al. (1995) *J Exp Psychol Learn* 21(4): 1008-1018).

In base all'ipotesi di una dipendenza dell'effetto primacy da una rievocazione seriale della sequenza (Avon S.E. (1998) *Brit J Psychology* 89: 285-308), tutti gli studi evidenziavano un effetto primacy ed un effetto recency nella rievocazione di sequenze spaziali. Risultati diversi sono stati ottenuti in un recente studio (Bonanni R. et al. Primacy and recency effects in immediate free recall of sequences of spatial positions. *J Exp Psychol, submitted*) nel quale è stato utilizzato un paradigma di rievocazione libera di posizioni spaziali. I dati hanno evidenziato la presenza di marcati effetti primacy e recency attribuibili a diversi processi di memoria.

L'effetto primacy sembra dipendere da un processo di reiterazione seriale cumulativa a livello della memoria a breve termine e da un processo di trasferimento delle informazioni nella memoria a lungo termine.

L'effetto recency sembra dipendere da un buffer visuo-spaziale nel quale verrebbero depositate le informazioni relative alle ultime posizioni seriali. Alla luce di tali risultati appare importante esaminare il tipo di strategia utilizzata dai soggetti per reiterare le diverse posizioni spaziali.

Secondo una prima ipotesi il ripasso della sequenza in corso di presentazione potrebbe realizzarsi mediante fissazioni oculari successive. In base ad una strategia puramente spaziale potrebbe esistere una correlazione significativa tra numero di fissazioni oculari di cui ciascuna posizione spaziale è oggetto ed accuratezza della sua rievocazione. Tale correlazione potrebbe essere riscontrabile anche nel caso di una strategia basata su processi di imagery visiva mediante la rappresentazione di un pattern visivo nel quale tutte le posizioni spaziali sono simultaneamente presenti e che si modifica al presentarsi di nuove posizioni spaziali.

## **Materiali e metodi**

### *Campione*

Sono stati valutati i movimenti oculari di 20 soggetti normali. Il campione è stato selezionato al fine di escludere la presenza di eventuali disturbi di acuità visiva e di campo visivo.

### *Procedura sperimentale*

Durante la fase di studio, ad ogni soggetto sono state presentate 5 sequenze di 10 posizioni spaziali. Le sequenze sono state le stesse per ciascun soggetto. In particolare sullo schermo di un touch screen, ad ogni soggetto è stato presentato ogni due secondi un quadrato della sequenza (1 sec. "on" ed 1 sec. "off"). I quadrati sono stati presentati con un intervallo di ritenzione (RI) di 500 msec. Ai soggetti è stato chiesto di prestare attenzione alle diverse posizioni spaziali. Durante questa fase, sono stati registrati i movimenti oculari messi in atto da ciascun soggetto durante lo studio delle diverse posizioni spaziali. Il sistema utilizzato per la registrazione dei movimenti oculari è costituito da un modulo di controllo, da una telecamera con emettitore ad infrarossi, da un monitor in cui viene presentato il test spaziale e che viene utilizzato dal soggetto e da due monitor mediante i quali è possibile vedere rispettivamente l'occhio del soggetto (quello registrato) ed il test che viene presentato al soggetto (monitor di scena).

Durante la fase di test è stata utilizzata la stessa matrice della fase di studio ed è stata richiesta ai soggetti la rievocazione immediata della localizzazione spaziale dei quadrati presentati, selezionandoli mediante l'utilizzo del touch screen. In tal modo ciascun quadrato selezionato dal soggetto si accenderà per poi spegnersi alla selezione del quadrato successivo.

## **Risultati**

L'analisi dei movimenti oculari messi in atto dai soggetti del campione durante lo studio delle 5 sequenze di posizioni spaziali ha evidenziato un maggior utilizzo della strategia di rievocazione basata sulla rappresentazione di un pattern visivo. Quest'ultimo si modificherebbe al presentarsi di ogni nuova posizione spaziale. Inoltre, i pattern visivi individuati sembrano essere funzione delle diverse posizioni seriali e costituiti in particolare da posizioni spaziali presenti nella porzione primacy e recency della curva di posizione seriale.

## Misurazioni del calcio intracellulare in seguito a deprivazione energetica nelle cellule striatali

Paola Bonsi

### Introduzione

Alla base di disordini neurologici quali la malattia di Parkinson (PD), la corea di Huntington (HD) e l'ischemia cerebrale è stato ipotizzato un comune meccanismo fisiopatologico; si ritiene infatti che la concomitanza di una ridotta funzionalità del metabolismo energetico e di una eccessiva attivazione della trasmissione glutammatergica siano alla base del fenomeno neurodegenerativo (Greene J.G. and Greenamyre J.T. (1996) *Prog Neurobiol* 48: 613-634).

Entrambe le alterazioni possono condurre all'accumulo intracellulare di calcio, con conseguenti effetti citotossici causati dall'attivazione dell'enzima biosintetico dell'ossido nitrico, di proteasi, fosfolipasi ed endonucleasi. Questa ipotesi è stata corroborata dalla identificazione di difetti metabolici a carico dei complessi mitocondriali I e II nei pazienti affetti rispettivamente da HD o PD.

Nelle malattie neurologiche si osserva una degenerazione selettiva di specifici tipi neuronali all'interno di alcune aree cerebrali. Lo striato è tra le aree più sensibili all'insulto ischemico e costituisce il bersaglio selettivo del fenomeno neurodegenerativo nella malattia di Huntington. Nell'ambito della popolazione neuronale dello striato i neuroni di proiezione (MS) sono più vulnerabili, mentre gli interneuroni colinergici (LA) sono più resistenti alla deprivazione energetica.

È di particolare interesse l'osservazione che la deprivazione energetica induce modificazioni del livello intracellulare di calcio molto più importanti nei neuroni MS che negli interneuroni LA (Pisani A. et al. (2002) *Neuroreport* 13: 641-644; Pisani A. et al. (2004) *Cell Calcium* 36: 277-284). È dunque possibile ipotizzare che differenti meccanismi di omeostasi ionica possano contribuire alla selettiva vulnerabilità delle due sottopopolazioni neuronali dello striato. In questo studio sono state utilizzate tecniche di registrazione elettrofisiologica e microfluorimetrica simultanee per valutare l'effetto dell'inibizione del complesso I mitocondriale nella popolazione neuronale degli interneuroni colinergici dello striato.

### Materiali e metodi

#### *Preparazione e mantenimento delle fettine corticostriatali*

Sono stati utilizzati ratti Wistar maschi (20-30 gg.), sacrificati mediante dislocazione cervicale dopo anestesia con alotano. Le fettine coronali corticostriatali (200  $\mu$ m) poste nella camera di registrazione erano continuamente perfuse da soluzione Krebs ossigenata con miscela 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.

### *Registrazioni elettrofisiologiche e microfluorimetriche*

Per le misurazioni ioniche e le simultanee registrazioni elettrofisiologiche intracellulari gli elettrodi sono stati riempiti con gli indicatori per il calcio o per il sodio. Il setup di registrazione comprende un amplificatore Axoclamp2B, una lampada Xenon da 150 W, un monocromatore (TILL Photonics), ed una telecamera CCD (Hamamatsu).

## **Risultati e discussione**

L'applicazione acuta di rotenone, inibitore del complesso I mitocondriale, al preparato di tessuto corticostriatale induce negli interneuroni colinergici dello striato una iperpolarizzazione accompagnata da una riduzione della resistenza della membrana. Questa risposta iniziale è seguita da una depolarizzazione tardiva ed irreversibile. Dalla relazione corrente-voltaggio è stato calcolato un potenziale di inversione di  $-80 \pm 3$  mV, che suggerisce il coinvolgimento di una corrente potassica. La misurazione della variazione dei livelli intracellulari di sodio ( $\text{Na}^+$ ) e di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ha rivelato un rapido aumento della concentrazione di  $\text{Na}^+$ , in stretta relazione con la fase di iperpolarizzazione della membrana. Al contrario, la fase di depolarizzazione era accompagnata da un significativo aumento della concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ . La riduzione della concentrazione extracellulare di  $\text{Na}^+$  riduceva significativamente gli effetti del rotenone sugli interneuroni colinergici. Una successiva analisi farmacologica ha però escluso che l'aumento di  $\text{Na}^+$  coinvolga i canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti; infatti la preincubazione con tetrodotossina non modificava gli effetti del rotenone sulla concentrazione di  $\text{Na}^+$ , né sul potenziale di membrana. Poiché l'attivazione dei recettori ionotropici del glutammato causa l'ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula, sono stati utilizzati antagonisti selettivi per i recettori AMPA ed NMDA. In presenza di questi antagonisti, la risposta degli interneuroni colinergici all'applicazione del rotenone non era significativamente modificata. I bloccanti dei canali del  $\text{K}^+$  sensibili all'ATP si sono al contrario dimostrati efficaci nel ridurre le risposte al rotenone. Infine, l'inibizione della  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPasi ha riprodotto le modificazioni ioniche e del potenziale di membrana indotte dal rotenone. Questi dati suggeriscono che il rotenone sia in grado di indurre un rapido dispendio del contenuto cellulare di ATP, causando una riduzione della funzione della  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPasi, ed un accumulo intracellulare di  $\text{Na}^+$ . La conseguente apertura di canali del  $\text{K}^+$  sensibili all'ATP o attivati dal  $\text{Na}^+$  potrebbe quindi dare luogo all'iperpolarizzazione della membrana. L'aumento del livello di  $\text{Ca}^{2+}$  che si verifica più tardivamente potrebbe poi causare una cascata irreversibile di eventi che conducono alla morte cellulare.

L'identificazione dei fattori coinvolti nella vulnerabilità selettiva dei neuroni striatali all'inibizione metabolica costituisce un passo importante nella comprensione dei meccanismi alla base dei fenomeni neurodegenerativi. I dati presentati evidenziano un ruolo centrale del  $\text{Na}^+$  negli effetti precoci indotti dall'inibizione del metabolismo mitocondriale (Bonsi P. et al. (2004) *Exp Neurol* 18: 169-181).

## Misure di variabili meccaniche per lo studio del cammino

Germana Cappellini

### Introduzione

La domanda di come l'attività muscolare è coordinata per produrre determinati movimenti è centrale al fine di una comprensione del controllo locomotorio. Un concetto oramai accettato dalla comunità scientifica è che il sistema nervoso centrale adotti strategie al fine di ridurre la complessità del problema. Una linea recente di pensiero afferma che ciò è raggiunto impiegando un numero limitato di primitive motorie che, combinate tra loro, producono l'intero repertorio di movimenti. Nel presente studio viene applicata l'analisi fattoriale ai patterns elettromiografici di 16-31 muscoli dell'arto inferiore e del tronco con una particolare enfasi alle caratteristiche invariante del passo umano al fine di identificare i patterns coordinati per l'attivazione dei muscoli dell'intero corpo durante una locomozione con perturbazioni. Per uno stesso insieme coordinato di movimenti l'attività elettromiografica registrata su individui differenti è variabile così come pure lo è per uno stesso individuo che ripete la medesima esperienza. Dimostrare l'esistenza di un insieme ridotto di segnali comuni che sono alla base della variabilità dell'attività registrata si rende necessario e ci fornisce informazioni sulle modalità del controllo locomotorio.

In precedenza altri autori (Davis B.L. & Vaughan C.L. (1993) *J EMG & Kinesiol* 3: 51-60; Ivanenko Y.P. et al. (2003) *J Neurophysiol* 90(5): 3555-3565) hanno mostrato l'esistenza di fattori comuni latenti che combinandosi tra loro possono spiegare il 95% delle variazioni di segnali elettromiografici dei muscoli dell'arto inferiore e del tronco registrati simultaneamente durante il cammino. L'attività muscolare durante la locomozione umana può essere rappresentata attraverso 5 modelli di base di attivazione in una varietà di stati di locomozione; in questo studio abbiamo esaminato come questi modelli di base di attivazione interagiscono con l'attività muscolare richiesta per un determinato movimento volontario durante la locomozione.

### Materiali e metodi

Abbiamo chiesto ai soggetti adulti sani (3 maschi e 5 femmine, 29±6 anni) di produrre un movimento volontario durante la locomozione ed abbiamo esaminato la cinematica, la dinamica e l'attività muscolare durante le varie mansioni attraverso la registrazione della cinematica (VICON system), delle forze di contatto con il terreno (piattaforme di forza KISTLER) e delle attività elettromiografiche (elettrodi di superficie bipolari DELSYS) di 16-31 muscoli dell'arto inferiore e del tronco nelle seguenti condizioni: 1) superamento di un ostacolo nella fase di swing del passo; 2) presa di un piccolo oggetto da terra durante il cammino (supporto del peso sia a destra che a

sinistra); 3) calcio della palla nella fase di swing del passo. In tutti i casi il soggetto cammina prima e dopo le perturbazioni. La cinematica del cammino è stata registrata posizionando sulla pelle dei markers riflettenti gli infrarossi sopra i seguenti riferimenti: trochite dell'omero, spina iliaca anterosuperiore, grande trocantere, epicondilo laterale del femore, malleolo laterale e quinta giunzione metatarso-falangea. È stata registrata l'attività muscolare dei seguenti muscoli: tibiale anteriore, gastrocnemio laterale, peroneo, retto femorale, vasto laterale e mediale, sartorio, adduttore, bicipite femorale, semitendinoso, tensore fascia lata, ileopsoas, gluteo massimo e medio, retto addominale, soleo, esterno e interno obliquo, eretto spinale (L2, T9, T1), larghissimo del dorso, trapezio superiore e inferiore, deltoide anteriore e posteriore, bicipite, tricipite, splenio del capo.

Una completa descrizione del cammino richiede considerazioni di parametri temporali e geometrici del passo quali velocità, cadenza, lunghezza come anche rotazioni, forze, e momenti articolari e dell'attività dei muscoli. Questo comporta un elevato numero di variabili che rendono l'interpretazione dei dati estremamente difficile. Le tecniche di analisi statistica dei dati possono semplificare il problema e possono altresì consentire di individuare alcune delle strategie adottate nel controllo della locomozione.

## **Risultati e discussione**

Al fine di correlare i dati ed i fattori elettromiografici con specifici eventi cinematici e cinetici durante una perturbazione del passo, sia la coordinazione intersegmentale che i momenti di forza articolari sono calcolati durante il cammino usando rispettivamente una rappresentazione 3D degli angoli articolari e un'analisi dinamica inversa. L'analisi fattoriale ha mostrato che 5 fattori comuni possono essere identificati nei dati elettromiografici registrati durante la locomozione. Questi fattori mostrano solo dei piccoli cambiamenti in presenza delle perturbazioni, nel senso che il loro peso reciproco tra i vari muscoli si ripartisce in modo differente; in questa distribuzione dei muscoli tra i fattori a seconda del movimento giocano un ruolo importante gli input propriocettivi e discendenti. Inoltre abbiamo osservato un sesto fattore caratteristico della perturbazione in sincrono con il movimento volontario; questa nuova sinergia, correlata all'atto di moto e al modificarsi della coordinazione intersegmentale e dei momenti di forza articolari durante la locomozione con perturbazioni, sembra sovrapporsi ai pre esistenti patterns di base. Abbiamo, quindi, dimostrato l'esistenza di fattori comuni latenti che combinandosi tra loro giustificano tutte le variazioni dei segnali elettromiografici dei muscoli analizzati.

Concludendo, il presente studio ci suggerisce che i 5 fattori comuni rappresentano dei segnali fondamentali di controllo in uscita dai generatori spinali di schemi motori che governano l'attività di gruppi di muscoli durante la locomozione. La combinazione di questo programma invariabile di locomozione con un movimento volontario ci porta ad affermare che i movimenti complessi sono prodotti dalla sovrapposizione di programmi motori.

## Studio di marcatori molecolari nelle diverse forme precliniche e cliniche di demenza per una precoce definizione della malattia

Antonio Ciaramella

### Introduzione

Moltissimi studi hanno confermato negli ultimi anni che i processi infiammatori svolgono un ruolo determinante nella patogenesi delle malattie a carico del sistema nervoso centrale e, in particolare, nella neurodegenerazione.

La malattia di Alzheimer (AD) è una grave patologia neurodegenerativa cronica ad insorgenza tardiva che provoca demenza ed è caratterizzata, a livello cerebrale, da un accumulo di placche amiloidi accompagnate da iperattivazione della componente microgliale. Molte evidenze suggeriscono che l'infiammazione abbia un ruolo importante nel processo neurodegenerativo in AD (Akiyama H. et al. (2000) *Neurobiol Aging* 21: 383-421). In accordo a quanto detto, la produzione di citochine proinfiammatorie è particolarmente elevata durante l'età avanzata (Maes M. et al. (1999) *J Psychiat Res* 33: 397-405) e la presenza di determinati polimorfismi dei geni che codificano alcune di queste citochine è stato identificato come un fattore di rischio nello sviluppo di AD. Studi più recenti hanno evidenziato che il sistema immune più in generale, e non solo la sua componente infiammatoria, ha una funzione rilevante nella patogenesi di AD (Monsonogo A. et al. (2003) *Science* 302: 834-838). A tale proposito particolarmente interessante sembra la citochina interleuchina-18 (IL-18). Essa riveste un ruolo fondamentale nella regolazione delle risposte immuni sia innate, sia acquisite (Gracie J.A. et al. (2003) *J Leukocyte Biol* 73: 213-224). Prodotta anche dalla microglia (Conti B. et al. (1999) *Brain Res Mol Brain Res* 67: 46-52), l'IL-18 svolge un ruolo centrale nei processi infiammatori poiché rappresenta il maggiore induttore, insieme all'IL-12 con la quale agisce in sinergia, della produzione di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) (Micallef M.J. et al. (1996) *Eur J Immunol* 26: 1647-1651; Okamura H. et al. (1995) *Nature* 378: 88-91).

Nel cervello l'IFN- $\gamma$  contribuisce alla neurodegenerazione, poiché determina la produzione di radicali liberi e, insieme al TNF- $\alpha$  o all'IL-1 $\beta$ , stimola la produzione della amiloide beta da parte dei neuroni e degli astrociti (Blasko I. et al. (2001) *J Neuroimmunol* 116: 1-4). Al momento non sono ancora state descritte delle evidenze dirette che legano l'IL-18 alla patogenesi di AD, tuttavia esistono alcuni fattori che suggeriscono tale associazione. Ad esempio, l'IL-18 è fortemente espressa nel cervello ed è secreta dalla microglia e dagli astrociti (Wheeler R.D. et al. (2003) *J Neurochem* 85: 1412-1420); inoltre è stato osservato che l'IL-18 modula l'attivazione dei recettori NMDA in vitro (Curran B. et al. (2001) *Neuroscience* 108: 83-90) ed è stata trovata essere presente in quantità maggiori nei pazienti depressi (Merendino R.A. et al. (2002) *Mediators Inflamm* 11: 265-267). Le osservazioni appena elencate suggeriscono degli evidenti parallelismi tra l'attività biologica di IL-18 e alcuni meccanismi patogenetici tipici dell'AD.

L'obiettivo di questo studio è quello di identificare una possibile deregolazione delle citochine proinfiammatorie con un'attività immunoregolatoria e particolare attenzione è stata rivolta proprio all'IL-18. A tale scopo sono stati analizzati due polimorfismi del promotore del gene di questa citochina in pazienti AD rispetto a controlli sani selezionati in base all'età.

## Metodi

I criteri di inclusione dei pazienti AD nello studio prevedono sia DSN-IV che NINCDS-ARDADA e un MMSE con punteggio inferiore a 24.

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico di 308 pazienti AD e 138 controlli non dementi. L'analisi del polimorfismo in posizione -137 (G/C) e -607 (C/A) del promotore del gene dell'IL-18 è stata eseguita tramite ARMS-PCR (amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction). Le distribuzioni dei genotipi dei pazienti AD e dei controlli sono state confrontate tramite il test del chi-quadro. L'analisi della regressione logistica è stata utilizzata per verificare se i due polimorfismi analizzati potessero predire il rischio di sviluppare l'AD. La significatività statistica è stata fissata per valori di  $p < 0,05$ .

## Risultati

Sono stati studiati due polimorfismi a singolo nucleotide descritti di recente nelle posizioni -137 e -607 del promotore del gene dell'IL-18 (Giedraitis V. et al. (2001) *J Neuroimmunol* 112: 146-152). La distribuzione dei genotipi osservati differisce significativamente tra pazienti AD e controlli. In particolare, si osserva un incremento del genotipo -607 CC degli AD rispetto ai controlli (36% vs 26%). L'analisi della regressione logistica indica che possedere il genotipo CC in posizione -607 del promotore del gene dell'IL-18 è associato ad un maggior rischio di sviluppare l'AD (OR=2.27; CI=1.24-4.15;  $p=0.007$ ).

## Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che la variante allelica -607CC potrebbe rappresentare un fattore di rischio che determina aumentata suscettibilità allo sviluppo dell'AD. È stato recentemente ipotizzato che i polimorfismi in posizione -137 e -607 nella regione promotore di IL-18 abbiano un ruolo funzionale. In particolare, possedere la A in posizione -607 ridurrebbe la trascrizione del gene dell'IL-18 e quindi la produzione della proteina stessa. La prevalenza della variante allelica con l'efficienza di trascrizione maggiore, osservata nei pazienti AD, lascia supporre che in questi soggetti vi sia una maggiore abilità di produrre l'IL-18 e, di conseguenza, si instauri uno stato infiammatorio più pronunciato. Il naturale proseguimento di questo studio prevede che l'analisi condotta fino ad ora a livello molecolare, sia approfondita ed estesa allo studio delle componenti cellulari coinvolte nell'innescare e nel mantenimento dell'infiammazione nei pazienti AD.

## **Cambiamenti strutturali in animali allevati in ambiente arricchito**

Paola De Bartolo

### **Introduzione**

Con il presente lavoro si sono voluti indagare i cambiamenti morfologici a livello cerebrale in animali allevati in un ambiente arricchito.

Negli anni '60 Rosenzweig ha reso l'arricchimento ambientale un concetto scientifico testabile, consistente in un contesto di vita in grado di consentire fitte relazioni sociali, elevato esercizio fisico e aumentate relazioni con stimoli non sociali. Si determina così una maggiore opportunità di movimento, di interazione tra simili e di esplorazione. Molti lavori hanno messo in luce i meccanismi mediante i quali l'esposizione ad ambienti complessi e l'esperienza influenzano le funzioni cerebrali, dimostrando cambiamenti significativi nell'anatomia del cervello. Studi più recenti hanno stabilito che questi cambiamenti strutturali e comportamentali sono in stretta associazione con cambiamenti nella neurochimica e nella fisiologia cerebrale. È stato dimostrato infatti come alcuni aspetti della funzione ippocampale, come l'LTP, la neurogenesi, la formazione di spine dendritiche, siano incrementati in seguito all'esposizione ad un ambiente arricchito.

Dal momento che tale studio è stato inserito in un progetto più ampio volto ad analizzare le varie sfaccettature della memoria spaziale in animali allevati in un ambiente arricchito a confronto con animali allevati in condizioni standard, è sembrato particolarmente importante valutare, negli stessi gruppi di animali, l'arborizzazione dendritica e la densità di spine in un'area corticale particolarmente coinvolta nelle abilità spaziali, la corteccia parietale. Studi precedenti hanno dimostrato che le alterazioni dendritiche sono un indice molto sensibile delle modificazioni nella struttura cerebrale dipendente dall'esperienza. Poiché la superficie dendritica riceve più del 95% delle sinapsi su un neurone, cambiamenti nell'attività sinaptica possono essere inferiti dall'analisi dell'arborizzazione dendritica e della densità di spine.

### **Materiali e metodi**

Sono stati formati due gruppi di ratti albini Wistar in base alla condizione di allevamento: il gruppo SC (Standard Condition), allevato in condizioni normali; e il gruppo EC (Enriched Condition), allevato in condizioni di arricchimento ambientale secondo il paradigma di Rosenzweig, a partire dal 21° giorno di età. Raggiunta l'età adulta, alcuni animali provenienti da entrambi i gruppi sperimentali sono stati anestetizzati e sottoposti a iniezione corticale parietale di Amine di Destranio Biotinilate (BDA), al fine di evidenziare la morfologia neuronale. Dopo 72 ore dall'iniezione, gli animali sono stati profondamente anestetizzati e perfusi per l'estrazione dei cervelli, successi-

vamente tagliati in sezioni coronali con il microtomo congelatore e sottoposti all'immunoistochimica per la visualizzazione delle spine dendritiche. Dieci neuroni piramidali appartenenti ad animali del gruppo EC e dieci neuroni appartenenti ad animali del gruppo SC sono stati selezionati, in base alla qualità della colorazione, nel III strato della corteccia parietale, e successivamente analizzati mediante il software NeuroLucida. L'arborizzazione dendritica basale e apicale è stata valutata analizzando i seguenti parametri: lunghezza dei dendriti, estensione delle branche dendritiche, numero totale delle branche, numero e densità (numero medio/10  $\mu\text{m}$ ) delle spine dendritiche.

## Risultati

Lo studio morfologico degli alberi dendritici ha messo in evidenza che i dendriti apicali dei neuroni piramidali degli animali stabulati in ambiente arricchito erano più lunghi di quelli degli animali di controllo. Inoltre, i dendriti apicali hanno mostrato un numero significativamente più alto di intersezioni e di nodi rispetto agli animali SC. Anche per quanto riguarda i dendriti basali sono emerse differenze in tutti i parametri tra i due gruppi sperimentali, anche se in maniera minore che negli apicali. Quando sono state analizzate le spine dendritiche, l'effetto della condizione d'allevamento è risultato molto evidente. L'ambiente arricchito ha incrementato significativamente il numero di spine sia nei dendriti basali che apicali. Un risultato sovrapponibile è emerso valutandone la densità.

## Discussione

L'incremento nella densità di spine nei neuroni parietali degli animali arricchiti suggerisce che essi stabiliscono un numero più alto di contatti sinaptici con altri neuroni. È inoltre interessante notare che un'esperienza precoce influenza in modo differente le varie porzioni dei neuroni piramidali parietali. Infatti, è stato visto che l'incremento nell'arborizzazione dendritica degli animali arricchiti è stata riscontrata nei dendriti apicali in maniera più evidente che nei basali, mentre l'incremento nella densità delle spine si è rivelato simile in entrambe le tipologie dendritiche. Questo pattern è molto probabilmente dovuto al fatto che i dendriti basali sono corti e generalmente confinati allo stesso strato corticale del soma, mentre gli apicali attraversano diversi strati corticali prima di raggiungere lo strato I. Questa distinzione, oltre che strutturale, sembra essere anche funzionale, dal momento che è noto che i dendriti apicali ricevono inputs sinaptici differenti dai dendriti basali.

## **Ruolo dell'huntingtina fisiologica nell'encefalo normale e affetto da Corea di Huntington: studi immunoistochimici**

Zena De March

### **Introduzione**

La Corea di Huntington (HD) è una malattia neurodegenerativa ereditaria trasmessa in modo autosomico dominante da un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 4, il quale codifica per la proteina huntingtina (htt). La mutazione genetica consiste nell'espansione della tripletta CAG, che da circa 15-30 ripetizioni nella forma wild-type può arrivare fino a 80-100. La questione della relazione tra contenuto di htt e vulnerabilità neuronale è stata sollevata recentemente. Evidenze recenti hanno dimostrato che solo il 65% circa dei neuroni di proiezione striatali contiene htt (Fusco F.R. et al. (1999) *J Neurosci* 19: 1189-1202). Gli interneuroni striatali colinergici e contenenti parvalbumina, diversamente dai nitroergici, presentano elevate quantità di htt (Kosinski C.M. et al. (1997) *Exp Neurol* 144(2): 239-247).

In questa ricerca è stato studiato nel topo e nel ratto normale la possibile distribuzione preferenziale dell'htt nei due principali circuiti striatali: striatonigrale e striatopallidale. Per ampliare ulteriormente le conoscenze sulla distribuzione dell'htt wild-type, la ricerca è stata rivolta ad analizzare la presenza della proteina nelle sottopopolazioni neuronali dell'encefalo del topo portatore della mutazione (R6/2). È stata studiata la presenza della proteina in neuroni contenenti ossido nitrico sintetasi (NOS), colin acetil transferasi (ChAT), parvalbumina (PV), calretinina (CALR) (interneuroni) e calbindina (CALB) (neuroni di proiezione).

I risultati ottenuti hanno permesso di ampliare le conoscenze sulla distribuzione e funzione dell'htt wild-type nell'encefalo del topo portatore della malattia e nel normale.

### **Materiali e metodi**

Per lo studio sono stati utilizzati tre modelli animali: ratto normale Wistar, adulto di 2 mesi (Stefano Morini, S. Polo D'Enza RE, Italia); topo transgenico R6/2 di 9-12 settimane (Jax mice, Bar Harbor, Maine); topo controllo wild-type di 9-12 settimane. Sono stati utilizzati ratti normali pretrattati con 40µg/ml di colchicina (dopo essere stati anestetizzati con cloruro idrato al 33%). Tutti gli animali (topi e ratti) sono stati perfusi con paraformaldeide al 4%. I cervelli sono stati congelati e sezionati con il microtomo congelatore.

#### *Doppia immunofluorescenza*

Le sezioni di ratto pretrattato con colchicina sono state incubate con anticorpo di topo diretto contro l'htt (mab 2168, Chemicon, Temecula, CA) e rispettivamente con: anticorpo anti-Sostanza P (Chemicon, Temecula, CA);

anticorpo anti meta-encefalina e anticorpo anti-Leucina-Encefalina (Chemicon, Temecula, CA). La concentrazione utilizzata per gli anticorpi è stata di 1:200.

Sezioni di ratto non pretrattate con colchicina, sono state incubate con anticorpo di topo anti-htt (mab 2168, Chemicon, Temecula, CA) e rispettivamente con: anticorpo anti-CB1 (Santa Cruz CA); anticorpo anti-D1A (Chemicon, Temecula CA). La concentrazione utilizzata è stata di 1:200.

Le sezioni di topo sono state invece incubate con anticorpo diretto contro l'htt di topo (mab 2168, Chemicon, Temecula, CA) e con anticorpo anti-CALB; anticorpo anti-NOS; anticorpo anti-ChAT; anticorpo anti-CALR; anticorpo anti-PV. Gli anticorpi diretti verso CALB e CALR sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1:200; quelli diretti contro la NOS sono stati utilizzati 1:500; gli anticorpi diretti contro ChAT e PV sono stati utilizzati 1:100.

Le sezioni sono state successivamente incubate con anticorpo cyanine 2 (Cy2) e tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC) ad una concentrazione di 1:50 in PBTx (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) per due ore a temperatura ambiente. Per l'htt è stato utilizzato, invece, il metodo Tyramide signal Amplification (TSA<sup>tm</sup>) (NEN, Boston MA).

Le sezioni sono state infine montate su vetrino ed esaminate al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioskop 2) e al microscopio confocale (CLSM) Zeiss LSM510.

## Risultati

L'esame di tipo quantitativo ha rivelato che nel ratto normale il 52.6% dei neuroni immunoreattivi per l'encefalina, contiene htt. Dei neuroni CB1+ il 69.3% contiene anche htt. Lo studio dei neuroni immunoreattivi per la sostanza P ha dimostrato che l'htt è presente nella maggior parte (88.9% circa) di tali neuroni di proiezione. I neuroni di proiezione contenenti D1A contiene la proteina con una percentuale pari all'88.1%. L'analisi statistica ha mostrato una maggiore espressione dell'htt nelle sottopopolazioni neuronali che coesprimono SostanzaP/D1A rispetto ai neuroni di proiezione CB1+ ed Enk+ ( $P < 0.005$ ). L'esame di cervelli di topo R6/2 e topo controllo ha rivelato nell'area considerata una differente distribuzione dell'htt nei diversi sottotipi neuronali. Nei neuroni di proiezione l'htt viene espressa in minor quantità nel topo R6/2 (21,4% circa) rispetto al 65% del topo wild-type ( $P < 0.05$ ). Gli interneuroni CALR+ non esprimono htt, così come non si ha presenza della proteina nei topi controllo. Gli interneuroni di tipo NOS+ non presentano htt nel topo R6/2 mentre nel topo wild-type solo circa il 2% di questi contiene la proteina: tale modesta differenza non è significativa ( $P > 0.05$ ). Negli interneuroni PV+ si assiste ad una modesta, ma significativa, diminuzione della quantità di htt: nel topo R6/2 l'htt è presente nel 10% circa dei neuroni PV+, mentre nel topo wild-type la proteina è espressa nel 18% circa di tali neuroni ( $P < 0.05$ ). Gli interneuroni ChAT infine mostrano nel topo R6/2 un'assenza totale di htt rispetto alla bassa percentuale riscontrata nel topo controllo (33%).

## Discussione

Gli esperimenti hanno permesso di studiare in questa prima fase la distribuzione dell'htt nei neuroni striatali di proiezione. È stata indagata, nell'encefalo normale di ratto, la possibile distribuzione preferenziale dell'htt wild-type, nei neuroni contenenti encefalina che costituiscono il circuito striato-pallidale e che muoiono rapidamente nell'HD, ed i neuroni che invece contengono Sostanza P e che costituiscono il circuito striato-nigrale, i quali degenerano lentamente nella malattia (Reiner A. and Anderson K.D. (1990) *Brain Res Brain Res Rev* 15(3): 251-265). È stato osservato che il circuito diretto striato-nigrale contiene htt in maggiore quantità, rispetto al circuito indiretto striato-pallidale. L'evidenza di una maggiore quantità di neuroni contenenti htt nel circuito striato-nigrale, è sostenuta dal parallelo aumento della proteina nei neuroni positivi per il D1A, che coesprimono la Sostanza P.

Lo studio di neuroni CB1 mostra una moderata positività per l'htt, in accordo con l'osservazione che, nei gangli della base, i recettori CB1 sono distribuiti sia nei neuroni del circuito striato-nigrale che in quelli del circuito striato-pallidale. Considerando che i neuroni che risultano essere meno vulnerabili in HD (SP+) contengono htt in maggiore proporzione rispetto a quelli più vulnerabili (ENK+), ciò non avvalorava l'ipotesi di un mancato ruolo protettivo della proteina normale nei neuroni in degenerazione. Non è comunque chiara una relazione di tipo inverso tra l'abbondanza dell'htt e la vulnerabilità neuronale, poiché la sottopopolazione di interneuroni somatostatergici, che sopravvivono in HD, sono privi di htt, e non tutti i neuroni che vanno incontro a degenerazione, cioè i neuroni di proiezione, contengono la proteina.

Per ampliare ulteriormente le conoscenze sulla distribuzione dell'htt wild-type, e quindi su un suo possibile meccanismo sulle cellule in degenerazione, la seconda fase della ricerca è stata rivolta ad analizzare la presenza della proteina normale nelle sottopopolazioni neuronali del topo transgenico R6/2 portatore della malattia. I risultati ottenuti non hanno portato a dati statisticamente rilevanti. Lo studio, se da una parte lascia aperto il dibattito sugli effetti dell'huntingtina nel normale e nel malato, dall'altra contribuisce ad indicare che la funzione primaria dell'htt normale, essenziale per la sopravvivenza dei neuroni, non è direttamente correlata alla sua distribuzione cellulare nell'encefalo.

## **Orientamento implicito dell'attenzione durante stimolazione vestibolare**

Francesca Figliozzi

L'integrazione dei segnali provenienti da diverse modalità sensoriali è un requisito fondamentale per l'orientamento degli effettori motori verso punti di interesse dello spazio corporeo e extracorporeo (Rizzolatti G. et al. (1997) *Curr Opin Neurobiol* 7: 562-567). L'integrazione cross-modale si verifica anche quando l'attenzione è allocata in modo implicito, cioè indipendentemente dalla contemporanea esecuzione di risposte motorie verso le posizioni spaziali di interesse. Stimoli sensoriali (cue) che segnalano l'imminente comparsa di uno stimolo rilevante (target), in uno specifico punto dello spazio, sono in grado di migliorare la velocità e la capacità di detezione di tale stimolo (Driver J., Spence C. (1998) *Trends Cogn Sci* 2(7): 254-262; Tassinari G., Campara D. (1996) *Neuropsychologia* 34: 235-245). Effetti facilitatori ed inibitori sono stati descritti tra visione, tatto ed udito (Driver J., Spence C. (1998) *Trends Cogn Sci* 2(7): 254-262).

Nonostante esistano strette relazioni tra sistema vestibolare e meccanismi di codifica multimodale dello spazio non sono attualmente disponibili informazioni riguardo la possibile influenza esercitata dall'informazione vestibolare sull'orientamento dell'attenzione implicita nelle diverse modalità sensoriali. Le informazioni vestibolari contribuiscono, infatti, allo svolgimento di diverse funzioni "spaziali" come la corretta interpretazione dei cambiamenti di flusso ottico causati da movimenti dello sguardo durante la locomozione (Bremmer F. et al. (2002) *Eur J Neurosci* 16: 1569-1586; Crowell J.A. et al. (1998) *Nat Neurosci* 1(8): 732-737), l'aggiornamento e la codifica della posizione del corpo rispetto a punti di riferimento ambientali dopo rotazioni o traslazioni eseguite in assenza di input visivi (Israel I. et al. (1999) *Neuroreport* 10: 3479-3483; Snyder L.H. et al. (1998) *Nature* 394: 887-891).

L'integrazione centrale delle informazioni vestibolari con segnali provenienti da altre modalità, è probabilmente mediata da aree corticali multimodali che ricevono segnali vestibolari (Bottini G. et al. (1994) *Exp Brain Res* 99: 164-169; Friberg L. et al. (1985) *Brain* 108: 609-613).

L'esistenza di una relazione tra attenzione di tipo spaziale e sistema vestibolare è supportata da studi che provano l'efficacia della stimolazione calorica vestibolare nel ridurre i sintomi della sindrome da eminegligenza spaziale unilaterale (Vallar G. et al. (1997) "Modulation of Neglect Syndrome by Sensory Stimulation". In Thier P. and Karnath H.O. (eds) *Parietal Lobe Contributions to Orientation in 3D Space*, 555-576) attribuibile alla compromissione funzionale dei meccanismi d'integrazione multimodale che sottendono la corretta rappresentazione dello spazio (Vallar G. (1998) *Trends Cogn Sci* 2: 87-96). Inoltre, accelerazioni rotatorie impresse attorno all'asse corporeo verticale causano nei soggetti sani delle modificazioni nella percezione soggettiva della posizione spaziale di stimoli visivi ed uditivi, analoghe a quelle osservate nei pazienti eminegligenti sottoposti a stimolazione

calorica vestibolare. Una accelerazione rotatoria induce, infatti, l'illusione che uno stimolo posizionato in linea con l'asse corporeo mediano sagittale sia spostato in direzione opposta a quella di accelerazione (illusione oculogira e audiogira) (Graybiel A. (1952) *AMA Arch Ophthalmol* 48: 605-615). È possibile ipotizzare che un'accelerazione rotatoria produca allocazione automatica delle risorse attentive in direzione controrotatoria contribuendo alla genesi delle illusioni oculo ed audiogire. L'insieme delle evidenze sopra riportate suggerisce una chiara interazione tra informazioni vestibolari, ed orientamento dell'attenzione di tipo spaziale.

Lo scopo del presente progetto di ricerca era quello di investigare gli effetti prodotti da accelerazioni rotatorie impresse attorno all'asse corporeo verticale sull'orientamento dell'attenzione implicita in modalità visiva e tattile. In particolare, si è indagato se la direzione dell'accelerazione rotatoria fosse in grado di indurre nel soggetto un effetto di facilitazione attentiva per la direzione congruente o incongruente con la rotazione. Questa tesi è stata verificata studiando l'influenza della rotazione sulla percezione temporale di due stimoli simultanei presentati l'uno nell'emispazio congruente con la direzione del movimento, l'altro nell'emispazio opposto. Il fenomeno in esame è noto in letteratura come "legge del Prior-Entry" e prova che, in presenza di stimoli sincroni, lo stimolo al quale si presta attenzione emerge alla coscienza più rapidamente dello stimolo cui non si presta attenzione. È stato inoltre dimostrato che l'effetto di Prior-Entry non è limitato entro una singola modalità ma si verifica anche per stimoli cross-modalità (Spence C. et al. (2001) *J Exp Psychol General* 130(4): 799-832). La stimolazione rotatoria avrebbe dovuto indurre nel soggetto un cambiamento nel giudizio di "Prior-Entry" portandolo a prediligere la risposta congruente o incongruente con la direzione della rotazione producendo un risultato significativo in termini di variazione percentuale sul giudizio di asincronia rispetto alla condizione di baseline, in assenza di movimento.

### **Esperimento 1: Interazione vestibolo-somatosensoriale**

È stata valutata l'influenza esercitata dalla stimolazione vestibolare, indotta da rotazione del soggetto lungo l'asse corporeo longitudinale, sul giudizio di precedenza temporale di stimoli tattili simultanei e asincroni. Ogni soggetto è stato esaminato in due differenti condizioni di stimolazione, in presenza o assenza di inibizione del riflesso oculo-vestibolare (VOR), al fine di distinguere eventuali effetti attribuibili ai normali movimenti oculari da genuine dislocazioni dell'attenzione di tipo implicito. Inoltre, l'adozione di due differenti posture del soggetto, con mani in posizione anatomica (mano destra nell'emispazio destro e viceversa) o crociata (mano destra nell'emispazio sinistro e viceversa), ha permesso di valutare se il tipo di codifica dello spazio adottato dai soggetti fosse basato su coordinate spaziotopiche (lato dello spazio in cui è posizionata la mano) o somatotopiche (lato del corpo a cui la mano è anatomicamente connessa). In totale, ogni soggetto è stato esaminato in quattro differenti condizioni di stimolazione (presenza/assenza di inibizione del VOR, mani in posizione anatomica/crociata).

*Soggetti:* Sono stati esaminati 11 soggetti destrimani (età media=27,4; ds=3,8).

*Stimoli:* Le stimolazioni tattili (elettriche, sopra-soglia, non nocicettive) duravano 5 ms ed erano rilasciate sul dito anulare di ciascuna mano.

## **Esperimento 2: Interazione vestibolo-visive**

In questo esperimento è stata valutata l'influenza esercitata dalla stimolazione vestibolare, indotta da rotazione del soggetto lungo l'asse corporeo longitudinale, sul giudizio di precedenza temporale di stimoli visivi simultanei e asincroni.

Ogni soggetto è stato esaminato in due diverse condizioni sperimentali, in presenza/assenza di inibizione del VOR, analogamente a quanto effettuato nell'esperimento precedente.

*Soggetti:* Sono stati esaminati 11 soggetti destrimani (età media=26,8; ds=3), quattro di essi parteciparono anche all'esperimento precedente.

*Stimoli:* Gli stimoli visivi erano (sopra-soglia; durata di 5 ms) posti l'uno 10° a destra, l'altro 10° a sinistra del punto di fissazione centrale, allineato con il piano mediano sagittale e distante 57 cm dagli occhi.

## **Metodo comune ai due esperimenti**

L'apparato sperimentale consisteva in una sedia in grado di compiere rotazioni lungo l'asse verticale (prodotta da Megaris srl). Il soggetto è stato sottoposto a una sessione sperimentale per ognuna delle condizioni previste dai due esperimenti. Le sessioni erano randomizzate entro gli esperimenti ed effettuate in giorni diversi. Ogni sessione prevedeva tre blocchi entro i quali gli stimoli erano randomizzati: il primo blocco era eseguito in condizione di "baseline", con sedia ferma e i successivi due erano effettuati adottando la condizione di "rotazione" randomizzando la direzione di rotazione, destra o sinistra.

Durante ogni sessione erano rilasciati 18 stimoli sincroni e 18 asincroni per ognuno dei possibili arrangiamenti tra direzione di rotazione della sedia e emispazio in cui lo stimolo è rilasciato. Sono stati adottati nove intervalli di asincronia (15, 45, 90, 180, 270, 400, 600, 800, 1000 msec). Nelle prove con stimoli asincroni, nella metà dei casi l'emispazio sinistro è stato stimolato prima del destro ("asincronia negativa"), nell'altra metà gli stimoli nell'emispazio destro precedevano quelli nell'emispazio sinistro ("asincronia positiva"). In ogni trial era presentata una coppia di stimoli. Nei trial somministrati durante il movimento della sedia gli stimoli erano presentati durante la fase di accelerazione della rotazione passiva.

Durante le sessioni il soggetto era al buio e l'unico oggetto visibile era costituito dal LED centrale di fissazione. Il soggetto era indotto a credere che gli stimoli non erano mai sincroni e il suo compito era quello di rispondere, senza fretta, pigiando un tasto con il dito indice corrispondente alla mano o all'emispazio stimolato per primo.

## Risultati e conclusioni

La stimolazione vestibolare di tipo rotatorio ha prodotto in entrambe le modalità, tattile e visiva, un risultato significativo in termini di variazione percentuale sul giudizio di asincronia rispetto alla condizione di baseline producendo un aumento del numero di risposte percentuali al giudizio “primo stimolo” a favore degli stimoli somministrati sulla mano o nell’emispaio verso il quale la rotazione era diretta. Tale risultato può essere interpretato come la diretta conseguenza di uno spostamento dell’attenzione verso la direzione della rotazione e delle fasi rapide del VOR, indotto dall’accelerazione rotatoria.

Condizioni sperimentali che pongono in conflitto coordinate di riferimento diverse (spaziotopiche vs somatotopiche), come quella adottata in una delle due diverse condizioni dell’esperimento in modalità tattile, la condizione con mani in posizione crociata, hanno mostrato una riduzione degli effetti facilitatori prodotti dalla rotazione e una codifica dello stimolo in base a coordinate spaziotopiche.

Gli effetti attentivi facilitatori innescati dalla stimolazione rotatoria sono risultati essere indipendenti dalla presenza della risposta vestibolo-oculomotoria: tale risultato è in accordo con l’idea che l’orientamento implicito dell’attenzione si verifichi in corrispondenza alla attivazione centrale di un piano motorio ed alla sua più periferica inibizione (Rizzolatti G. et al. (1997) *Curr Opin Neurobiol* 7: 562-567).

## **Studio morfologico e neurochimico delle interazioni fra i sistemi nitrergico e purinergico nei fenomeni plastici del sistema nervoso centrale**

Fulvio Florenzano

Lo studio dei fenomeni plastici e della risposta degenerativa nel sistema nervoso rappresenta uno degli argomenti scientifici di maggiore attualità. Infatti, l'invecchiamento della popolazione e la maggiore raffinatezza dei mezzi diagnostici hanno prodotto un notevole aumento nell'incidenza e nel numero di patologie neurodegenerative identificate. Tale aumento per fortuna è stato corrisposto da un aumento degli sforzi nei settori scientifici coinvolti nello studio della neurodegenerazione e che hanno prodotto una grande mole di informazioni. Attualmente sono stati chiariti molti dei passaggi comuni attraverso i quali i percorsi neurodegenerativi si snodano per arrivare poi alla morte cellulare. Quello che ancora purtroppo rimane oscuro sono le cause che scatenano e che chiaramente diversificano le varie patologie colpendo selettivamente solo alcune classi di cellule.

Il nostro laboratorio è coinvolto in uno studio comparato della risposta plastica e degenerativa in diversi modelli sperimentali di lesione. Al fine di evidenziare i percorsi comuni degenerativi e le risposte differenziali che identificano le varie patologie mimate nei modelli sperimentali. È proprio da un approccio combinato che affronti sia le proprietà comuni che gli aspetti singolari presenti nelle varie modalità neurodegenerative e dei fenomeni plastici che ci si aspetta la produzione di indicazioni utilizzabili per l'elaborazione di protocolli terapeutici.

Nel corso del presente progetto abbiamo verificato le modalità di induzione ed espressione dei recettori purinergici e dell'enzima NOS nella risposta plastica del sistema nervoso utilizzando un modello sperimentale di neurodegenerazione. In questo modello si induce tossicità neurochimica che colpisce prevalentemente l'ippocampo e più in generale il sistema limbico. Il modello prevede la somministrazione per via sistemica di un derivato organico di un metallo pesante, trimethyl tin (TMT), che provoca crisi epilettiche e marcate alterazioni comportamentali. Il correlato istologico ha mostrato una gliosi reattiva ed una marcata morte neuronale che colpisce selettivamente l'area CA3 ed il giro dentato. Questa caratteristica di selettività della morte neuronale e la modalità di somministrazione extracerebrale ne fanno un buon modello di neurodegenerazione. Il meccanismo attraverso il quale provoca neurodegenerazione non è ancora compreso ma l'ipotesi più accreditata è quella di un meccanismo di tossicità glutammato dipendente. In questo modello sperimentale di danno neurochimico abbiamo verificato la possibilità di induzione di enzimi nitrergici e recettori purinergici che risultano strettamente associati nei fenomeni di degenerazione cellulare dopo assotomia (Viscomi M.T. et al. (2004) *Neurosci* 123(2): 393-404).

Successivamente siamo andati a studiare i pattern anatomici di attivazione nitrergica e purinergica in due punti temporali: sette e quindici giorni. Una

prima analisi è stata condotta con metodiche di singola marcatura in immunoperossidasi in microscopia a campo chiaro. Tale analisi ha evidenziato un'induzione dell'enzima NOS neuronale e del recettore P2X<sub>2</sub> in cellule nelle aree del giro dentato e di CA3. Le cellule NOS positive presentavano un aspetto neuronale ed erano localizzate soltanto nelle aree precedentemente menzionate. Mentre le cellule P2X<sub>2</sub> positive avevano un aspetto francamente gliale e presentavano una localizzazione diffusa sia ad aree ippocampali che ad altre aree del circuito limbico. A questo punto abbiamo deciso di procedere con un'analisi di doppia marcatura in immunofluorescenza in microscopia confocale per identificare chiaramente il fenotipo cellulare di queste cellule che esprimono i marcatori nitrgergici e purinergici. Una prima doppia immunofluorescenza tra i marcatori per il NOS e il NeuN (marcatore neuronale) ha confermato la natura neuronale delle cellule che inducevano NOS. Successivamente le doppie immunofluorescenze per i marcatori NOS e quelli gliali (GFAP per gli astrociti e OX-42 per la microglia) hanno evidenziato l'assenza di coespressione. Per quanto riguarda il recettore P2X<sub>2</sub> le doppie immunofluorescenze condotte con gli stessi marcatori utilizzati precedentemente hanno mostrato che le cellule che esprimevano P2X<sub>2</sub> erano degli astrociti. Questi patterns di attivazione nitrgergica e purinergica erano mantenuti da sette a quindici giorni dopo la lesione.

Mettendo in relazione i risultati ottenuti in questo studio con quelli ottenuti precedentemente (Florenzano F. et al. (2002) *Neuroscience* 115: 425-434; Cavaliere F. et al. (2003) *Neuroscience* 120: 85-98; Viscomi M.T. et al. (2004) *Neuroscience* 123(2): 393-404) è possibile dimostrare l'esistenza di un collegamento temporale fra l'induzione dei marcatori nitrgergici e quella dei marcatori purinergici che presenta caratteristiche peculiari di espressione cellulare nei diversi sistemi anatomici e nei diversi modelli di neurodegenerazione. Ulteriori studi potranno fornire indicazioni sulla possibilità di modificare l'espressione di questi marcatori per cercare di modulare la risposta plastica in modelli sperimentali di degenerazione.

## **Ruolo del perossido di idrogeno in un modello di ipossia *in vitro***

Raffaella Geracitano

### **Introduzione**

Con il termine stress ossidativo si intende una situazione di sbilanciamento tra sistemi ossidanti ed antiossidanti che favorisce la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). I mitocondri sono considerati le sorgenti intracellulari di ROS; a livello mitocondriale la parziale riduzione dell'ossigeno molecolare nella catena di trasporto degli elettroni culmina con formazione dell'anione superossido. Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) viene continuamente generato nella cellula e può essere una sorgente di radicali liberi. Esiste inoltre una serie di enzimi che producono  $H_2O_2$ : le monoamino ossidasi e le amino acido ossidasi.

I meccanismi cellulari che proteggono dallo stress ossidativo comprendono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la glutatione perossidasi (GPx). La SOD catalizza la dismutazione del radicale superossido in  $H_2O_2$  la quale può essere convertita in  $H_2O$  ed ossigeno dalla catalasi ed in  $H_2O$  dalla GPx, riducendo il rischio di formazione di radicali idrossilici.

La deprivazione di ossigeno a livello di specifiche aree del Sistema Nervoso Centrale è un modello di stress ossidativo ampiamente studiato. In particolare i neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta, rispondono ad un insulto ipossico con una serie di eventi elettrofisiologici ben caratterizzati che comprendono: una immediata depolarizzazione, una successiva iperpolarizzazione ed una seconda ulteriore iperpolarizzazione in seguito a riossigenazione.

Nonostante la produzione di anione superossido e di  $H_2O_2$  sia associata a stati di sofferenza cellulare che possono culminare con la morte della cellula, è noto che in condizioni fisiologiche queste stesse sostanze sono finemente regolate e vengono impiegate dai sistemi biologici come messaggeri cellulari. Infatti recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che i ROS modulano la trasmissione sinaptica e sono coinvolti anche in fenomeni di plasticità.

L'attività scientifica svolta è stata indirizzata allo studio del ruolo del  $H_2O_2$  come sorgente di ossigeno che potrebbe neutralizzare la risposta fisiologica della cellula all'insulto ipossico.

### **Metodologia**

Le registrazioni elettrofisiologiche venivano condotte su fettine orizzontali di mesencefalo di ratto. Le fettine (240-300  $\mu m$ ) erano mantenute in liquido cefalo rachidiano artificiale (ACSF) termostato a 33-34°C e saturato con una miscela gassosa oxicarb. Per ogni sessione sperimentale una singola fettina veniva posta in una camera di registrazione, montata sul supporto di uno stereomicroscopio e continuamente perfusa con la stessa soluzione ACSF.

Per le registrazioni intracellulari venivano usati elettrodi in vetro ottenuti mediante "puller" orizzontale Flaming-Brown, riempiti con una soluzione di KCl 2M, con una resistenza di 30-80 M $\Omega$ . I neuroni dopaminergici della sostanza nera compatta venivano identificati dalle caratteristiche proprietà elettriche: presenza di una regolare attività spontanea, attivazione in iperpolarizzazione della corrente  $I_h$ .

Sono state inoltre effettuati esperimenti mediante tecnica di registrazione del patch-clamp in configurazione whole-cell studiando le variazioni di corrente (voltage-clamp) ottenute in seguito ad un insulto ipossico. Le cellule venivano mantenute ad un potenziale di  $-60$  mV. La pipetta da patch aveva una resistenza di 3-4 M $\Omega$  e veniva riempita con una soluzione interna standard contenente: K-gluconato, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HEPES, EGTA, Mg-ATP, Na<sub>3</sub>-GTP.

L'ipossia veniva indotta perfondendo le fettine con ACSF saturato con una miscela di N<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%).

## Risultati

L'applicazione di un insulto ipossico per 6-9 minuti produceva una iperpolarizzazione di membrana (current clamp) e/o una outward current (voltage-clamp). Durante l'insulto ipossico, la concomitante applicazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM, 3-4 min) riportava la cellula nelle sue condizioni pre-ipossiche. Inoltre, durante l'applicazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veniva osservata una seconda iperpolarizzazione / outward current simile a ciò che normalmente accade alla fine di un insulto ipossico in seguito a riossigenazione. Durante l'ipossia tutte le cellule si iperpolarizzavano ( $20 \pm 2$  mV, n=11) ed il loro firing spontaneo veniva completamente bloccato entro  $1.1 \pm 0.1$  minuti. Quando l'ipossia veniva applicata in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) il firing spontaneo veniva bloccato entro  $6.2 \pm 1$  minuti. Durante le registrazioni intracellulari condotte in configurazione di voltage clamp, l'ipossia produceva una outward current ( $161.2 \pm 13.9$  pA, n=8) che veniva completamente abolita in 1-2 minuti dalla concomitante applicazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM).

In seguito è stato studiato l'effetto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante ipoglicemia, situazione in cui le condizioni di ossigenazione non vengono alterate. La cellula dopaminergica rispondeva all'ipoglicemia (15 min) con una iperpolarizzazione di membrana di  $8.2 \pm 1.3$  mV. Sorprendentemente l'applicazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) in condizioni di carenza di glucosio non riportava i neuroni dopaminergici nelle condizioni pre-ipoglicemiche che venivano ripristinate solo attraverso la riperfusione con la soluzione standard di registrazione.

Con la tecnica del patch-clamp (configurazione voltage-clamp) è stato analizzato il range di concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> capaci di opporsi alla risposta elettrofisiologica (outward current) indotta dall'ipossia. L'effetto di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era dose dipendente in un intervallo di concentrazioni tra 100  $\mu$ M (effetto minimo) e 3 mM (effetto di massima riduzione della corrente ipossica). La IC<sub>50</sub> era pari a  $0.59 \pm 0.08$  mM.

Al fine di valutare se la riduzione della risposta ipossica era dipendente dalla generazione di ossigeno nella fettina attraverso la via metabolica della

catalasi, le fettine venivano trattate con un inibitore irreversibile della catalasi: il 3-amino-1,2,3-triazolo (3-AT, 30 mM). In queste condizioni il  $H_2O_2$  non solo perdeva completamente la capacità di ridurre la outward current indotta dalla deprivazione di ossigeno, ma amplificava la stessa. Infatti in presenza di 3-AT, l'ipossia produceva una corrente di  $118.3 \pm 10$  pA, lo stesso insulto in presenza di  $H_2O_2$  (3 mM), che in condizioni di controllo produceva una riduzione di circa il 90%, dava origine ad una corrente di ampiezza  $195.9 \pm 22.4$  pA.

Questi risultati supportano l'ipotesi che l'ossigeno rilasciato dal  $H_2O_2$  attraverso l'azione della catalasi veniva usato per compensare la deprivazione di ossigeno durante l'insulto ipossico.

Alla luce di questi risultati il prossimo obiettivo sarà quello di caratterizzare la soglia temporale di "protezione" del neurone dopaminergico da un insulto ipossico confrontando i tempi di morte "elettrofisiologica" e morfologica durante un'ipossia di controllo di 30 minuti (considerata irreversibile) rispetto a quella prodotta dallo stesso insulto ma in presenza di  $H_2O_2$  (3 mM).

## **Regolazione dell'entrata del calcio nelle cellule del sistema nervoso centrale attraverso i canali non selettivi "transient receptor potential channels" (TRPC): studi immunoistochimici**

Carmela Giampà

### **Introduzione**

Sia nelle cellule eccitabili che non, lo ione calcio rappresenta un'importante secondo messaggero implicato nel controllo di diverse funzioni cellulari. Nel sistema nervoso centrale, per esempio, è essenziale nella propagazione del potenziale d'azione, nella trasmissione sinaptica e per la trasduzione del segnale. Nelle cellule non eccitabili interviene in molte funzioni che variano dalla crescita, divisione e differenziazione cellulare, all'apoptosi e morte cellulare (Berridge M.J. et al. (2000) *Science* 287: 1604-1605). Il meccanismo che permette l'entrata del  $\text{Ca}^{2+}$  prevede l'attivazione di canali ionici sia a voltaggio che a recettore dipendenti. In merito a questo meccanismo, negli ultimi anni è stato introdotto il concetto di "store-operated calcium entry" (Putney J.W. et al. (1990) *Cell Calcium* 11(10): 611-624). Questo modello propone un meccanismo per cui la liberazione di calcio dalle riserve intracellulari, mediata dall' $\text{IP}_3$ , scatena una rapida entrata dello stesso ione dallo spazio extracellulare attraverso canali SOC posti sulla membrana (Parekh A.B. et al. (1997) *Physiol Rev* 77: 901-930; Putney J.W.Jr et al. (2001) *J Cell Sci* 114: 2223-2229).

I candidati migliori come SOC sono i transient receptor potential channel (TRP). La famiglia dei TRP comprende proteine di canale non selettive e permeabili al calcio. In base alla sequenza amminoacidica si possono distinguere sei sottofamiglie (Montell C. (2001) *Sci STKE* 2001 (90): RE1; Clapham D.E. et al. (2001) *Nat Rev Neurosci* 2: 387-396). Tali proteine sono espresse sia in cellule nervose, soprattutto neuroni afferenti, che in tessuti non nervosi come cellule epiteliali e fibre muscolari lisce (Minke B. and Cook B. (2002) *Physiol Rev* 82: 429-472). Questi canali sarebbero attivati dallo ione calcio che si libera dalle riserve o da una qualche interazione tra questi canali e i recettori per l' $\text{IP}_3$ . In base al probabile meccanismo d'attivazione i TRP possono essere divisi in: "store-operated channels" e "store independent channels". Entrambi richiedono, per la loro attivazione, la PLC. Quest'ultima porta alla formazione di due secondi messaggeri  $\text{IP}_3$  e DAG, che possono agire indirettamente determinando la liberazione degli ioni calcio dalle riserve o direttamente sui canali TRP (Slyveser J.B. et al. (2001) *Neurosci Lett* 300: 83-86).

Il primo membro di questa famiglia ad essere stato purificato è il TRPC1; a differenza degli altri canali la sua attivazione non dipende dalla deplezione delle riserve di calcio. Il TRPC3, invece, è sia un recettore sia uno "store operated channel" (Zhu et al. (1996) *Cell* 85: 661-671). Questo canale partecipa nei processi di differenziazione che avvengono alla nascita nel sistema nervoso centrale ed è, inoltre, ritenuto coinvolto nei fenomeni di modulazione mediati dalla neurotrofina BDNF (Montell C. (2001) *Sci STKE*

2001: RE1). Un'attività ridotta dei canali TRP e SOC potrebbe essere tra le cause di malattie neurodegenerative. Un esempio di stato patologico che sembra essere associato ad alterazioni nel metabolismo del calcio è l'Alzheimer. Il mancato ripristino delle riserve del calcio porterebbe all'attivazione della cascata apoptotica (Yoo A.S. et al. (2000) *Neuron* 27: 561-572). L'apoptosi è, anche, associata ad altre malattie neurodegenerative come la corea di Huntington. Un aumento dell'attività di questi canali è stata osservata in situazioni di stress ossidativo come risposta a condizioni quali l'ischemia cerebrale. Lo stress ossidativo nell'encefalo attiverrebbe i TRPC che a loro volta determinano morte cellulare dovuta ad un incontrollato flusso di ioni calcio. Se questi sono confermati, farmaci che inibiscono le proteine TRPC potrebbero offrire una nuova strategia terapeutica per ridurre il danno neurodegenerativo indotto dallo stress ossidativo.

In studi precedenti noi abbiamo studiato la localizzazione dei TRPC3 nella sostanza nera e nei nuclei dei gangli della base in cervelli di ratti normali, utilizzando come anticorpi primari il TRPC3 e i diversi markers cellulari specifici. I nostri studi evidenziavano la localizzazione del TRPC3, principalmente, negli oligodendrociti e non nelle cellule nervose. Essendo l'omeostasi del calcio importante negli oligodendrociti per lo sviluppo, mielinizzazione e demielinizzazione (Soliven J.B. et al. (2001) *Neurosci Lett* 300: 83-86), possiamo dire che la distribuzione dei TRPC3 in queste cellule potrebbe giocare un ruolo importante in patologie come la demielinizzazione.

Vista l'implicazione di queste proteine in diverse malattie neurodegenerative, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di continuare lo studio anche con gli altri membri della famiglia dei TRPC determinando, inizialmente nel ratto normale, la loro localizzazione nelle strutture nervose interessate (la sostanza nigra, lo striato e la corteccia cerebrale), allo scopo di capire se tali proteine sono fisiologicamente contenuti in neuroni eccitatori (glutammatergici) o inibitori (GABAergici) e studiarne eventuali modificazioni in patologia.

## Materiali e metodi

### *Chirurgia*

Per portare avanti questo studio sono stati utilizzati ratti Wistars. Gli animali sono stati anestetizzati con cloruro idrato al 33% in soluzione fisiologica iniettato intraperitonealmente, posizionati su un apparecchio stereotassico ed iniettati con fluororuby e destrano fluorosceina per evidenziare rispettivamente le fibre striato-nigrali e nigro-striatali. Successivamente i ratti così pre-trattati sono stati perfusi ed i cervelli rimossi e sezionati al microtomo congelatore.

### *Immunisto chimica*

Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario diretto contro il TRPC1 (Alomone Labs) diluito 1:200 in 0.1M PBTx, per 48h. Trascorso questo periodo sono state incubate con un anticorpo biotinilato (1:100) per 2h e successivamente con l'ABC complex (1:100; Vector Labs) per 1h a T ambiente. La reazione è stata rivelata mediante incubazione con acqua ossigenata in presenza di 3',3'-diamminobenzedine (DAB Sigma).

### *Doppia immunofluorescenza*

Per la doppia immunofluorescenza le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario TRPC1 ed ognuno dei seguenti marcatori cellulari specifici: glutammato e GABA per i neuroni, rispettivamente, eccitatori ed inibitori; calbindina per quelli di proiezione striatale; enkefalina per i neuroni striatali che proiettano al globo pallido esterno e tiroxina idrossilasi per i neuroni dopaminergici della sostanza nigra. Le sezioni sono state poi incubate con gli anticorpi secondari fluorescenti: anti-rabbit cyanine2 (cy2) e anti-mouse cyanine (cy3). Le sezioni sono state montate su vetrino ed osservate al microscopio ad epifluorescenza (Zeiss axioskop) ed al microscopio confocale (CLSM).

## **Risultati**

I nostri studi di immunoistochimica hanno mostrato che il TRPC1 è principalmente espresso nelle fibre afferenti allo striato. Gli studi di doppia immunofluorescenza hanno mostrato che il TRPC1 non colocalizza né con le cellule positive per la calbindina né con quelli GABAergici, questo dimostra che le fibre positive per il TRPC1 non originano dallo striato, come confermato, anche, dalla non colocalizzazione con quelle marcate dal fluororuby. Nella sostanza nigra solo una piccola percentuale di cellule dopaminergiche risultavano positive per il TRPC1 e le fibre da questo marcate non colocalizzavano né con quelle provenienti né con quelle afferenti allo striato ed alla sostanza nera. Nella sostanza nigra (SN) pars reticolata, invece, tutte le fibre TRPC1 positive formavano sinapsi con i neuroni glutammatergici. Solo nel nucleo subtalamico i neuroni positivi al glutammato colocalizzavano anche con il TRPC1; questo dimostra che è da questi neuroni che le fibre positive al TRPC1 originano per raggiungere la SN e il globo pallido.

## **Discussione**

Il calcio è uno ione che gioca un ruolo importante in molti processi fisiologici come proliferazione, differenziazione, apoptosi e morte cellulare (Soliven J.B. et al. (2001) *Neurosci Lett* 300: 83-86). I TRPC sono canali ionici, ubiquitariamente espressi sia in tessuti nervosi che non e permettono l'influsso di calcio all'interno della cellula mediante attivazione della PLC (Putney J.W. Jr (2001) *Mol Intervent* 1: 84-94; *Nature* 410: 648-649). Questo studio ha descritto per la prima volta, nel sistema nervoso centrale, la preferenziale distribuzione del TRPC1 nei neuroni eccitatori del nucleo subtalamico e sulle fibre che da questi originano e raggiungono la sostanza nera e il globo pallido. Tenendo conto che un'alterazione nell'omeostasi del calcio è implicata in molti processi neurodegenerativi, per esempio ischemia e morbo d'Alzheimer; tale specificità suggerisce che questi canali potrebbero essere coinvolti in questi stati patologici. Un aumento dell'attività di questi canali è stata, infatti, osservata in situazioni di stress ossidativo in risposta a condizioni quali l'ischemia cerebrale (Montell C. (2001) *Sci STKE* 2001: RE1). Tali canali potrebbero pertanto rappresentare una potenziale strategia terapeutica in molte patologie legate a disfunzioni dell'attività delle aree esaminate in questo studio.

## **Sviluppo di nuove metodologie per lo studio della coordinazione sensori-motoria e loro potenzialità in ambito teleriabilitativo**

Silvio Gravano

### **Obiettivi**

Il controllo della locomozione è strettamente collegato al controllo delle forze antigravitarie e di contatto al suolo basato su una varietà di recettori più o meno specializzati, inclusi i recettori cutanei del piede, i recettori di forza e i fusi neuromuscolari. Il ruolo del sistema di riferimento esterno (interazioni con la gravità e con il contatto piede-terreno) ha un grande valore nel cammino e i meccanismi fisiologici sono ancora fonte di dibattito. Un aspetto applicativo è nei ricettori di forza che possono giocare un ruolo significativo nella riabilitazione dei pazienti paraplegici i quali recuperano alcune abilità del passo attraverso l'allenamento del cammino con lo sgravio (Barbeau H. et al. (1999) *Arch Phys Med Rehabil* 80(2): 225-235; Harkema S.J. et al. (1997) *J Neurophysiol* 77(2): 797-811; Ivanenko Y.P. et al. (2003) *J Neurophysiol* 90(5): 3555-3565; Wernig A. et al. (1995) *Eur J Neurosci* 7(4): 823-829). Nei pazienti con lesioni spinali la forza residua nei muscoli per poter rimanere in piedi è drasticamente ridotta; quindi per poter aiutare questi pazienti nella riabilitazione motoria è importante sostenerli con lo sgravio del loro peso corporeo. I segnali dai recettori di peso interagiscono con i segnali di comando e i centri di generazione del ritmo. Segnali sensoriali provenienti dal movimento degli arti e dal contatto dei piedi con il terreno entrano nelle reti neurali della locomozione per modulare la velocità del cammino e l'attività muscolare. Per esempio, si è notato (Ivanenko Y.P. et al. (2002) *J Neurophysiol* 87(6): 3070-3089) che nel momento in cui avviene la sospensione totale dal suolo, ovvero quando si perde la sensazione di contatto al suolo, si perde la coordinazione locomotoria. Quindi nella riabilitazione motoria in condizioni di sgravio pressoché totale, è fondamentale ripristinare questo feedback sensoriale con il suolo.

### **Materiali e metodi**

Una nuova e promettente metodologia per lo studio del ruolo della sensazione di contatto piede-suolo nella coordinazione locomotoria consiste nella applicazione controllata di una pressione locale sotto il piede. A tal fine sono state sviluppate delle solette gonfiabili che, poste tra la scarpa ed il piede, hanno il compito di ripristinare la sensazione di contatto con il terreno e prevedere la stimolazione tattile sotto i piedi durante le diverse condizioni del cammino (sul treadmill, con sgravio, movimenti ritmici in posizione orizzontale, etc.), espandendosi e sgonfiandosi in sincronia con le fasi del

passo (gonfie durante la fase di appoggio, sgonfie durante la fase di pendolamento). Ogni soletta è costituita da due parti indipendenti per poter stimolare separatamente il tacco o la punta del piede. Le solette sono gestite per mezzo di un sistema pneumatico (costituito da un compressore e da un decompressore azionati alternativamente) controllato elettronicamente. La cinematica del passo è acquisita tramite il sistema di *Motion Capture 3D VICON*.

## Risultati

Il nuovo sistema di valvole pneumatiche e solette gonfiabili è stato caratterizzato nei suoi parametri funzionali, come la velocità di risposta all'impulso di comando. Per misurare e calibrare la forza applicata e la sua distribuzione sulla superficie del piede sono state utilizzate le solette del sistema PEDAR, costituite da una matrice di 99 sensori capacitivi.

È stato realizzato un software apposito che permette di leggere in tempo reale i dati dal sistema VICON (le coordinate dei marcatori e quindi la cinematica delle gambe) e di azionare le solette gonfiabili per sincronizzare l'azione con le fasi del passo.

I risultati preliminari con i soggetti normali mostrano che lo stimolo può essere applicato durante la fase pendolare con l'accuratezza di 2-3% del passo e i tempi di risposta di circa 50-100 ms e la forza aggiuntiva di circa 20% del peso di soggetto. Nella condizione dello sgravio totale, questo stimolo evoca la sensazione soggettiva di una migliore coordinazione locomotoria.

## Misure meccaniche nei movimenti di intercettazione

Marco Iosa

### Introduzione

La maggior parte degli studi relativi ai modelli interni utilizzati dagli esseri umani per compiere le loro azioni si basano su task quali muovere un manipulandum in un certo campo di forza, o rispondere a stimoli visivi presentati su un monitor: grazie a trial in cui la peculiarità dello stimolo viene rimossa, senza che il soggetto ne sia a conoscenza, si mettono in evidenza gli after effects dovuti alla formazione del nuovo modello interno. Più recentemente si è passati a studiare le difficoltà che si incontrano se i soggetti vengono sottoposti a stimoli differenti (ad esempio diversi campi di forza), ai quali bisognerebbe rispondere con la formazione di diversi modelli interni a monte dei quali vi sia un predittore che scelga quale utilizzare.

Qui si è invece indagato sull'uso di un modello interno già presente, atto ad un compito piuttosto familiare. Ai soggetti è stato chiesto di intercettare un oggetto in movimento (una palla) al fine di studiare l'utilizzo del modello interno di gravità, atto a predire tale moto dell'oggetto (per compensare il delay visuomotorio di circa 100-200ms) ed ad integrare le informazioni derivanti dal sistema visivo relative a posizione e velocità (e deficitarie per quanto riguarda invece l'accelerazione).

### Materiali e metodi

I soggetti erano comodamente seduti davanti ad uno schermo bianco ( $h=2.13\text{m}$ ,  $l=3.94\text{m}$ ), a distanza di circa 0.5m, su cui veniva proiettata l'immagine di una palla (proiettore Barco 808S, 85Hz).

La palla, partendo nascosta in una box virtuale posta sul bordo superiore dello schermo, si muoveva verso il basso lungo la verticale, con un moto random che poteva essere uniforme ( $0g$ ) o accelerato ( $1g = 9.81\text{m/s}^2$ ), con una tra cinque possibili velocità iniziali ( $v_0$ ) comprese tra 0.7 e 4.5 m/s, verso quello che ai soggetti era stato indicato come l'interception point (IP).

Abbiamo testato diversi protocolli, differenti tra loro per la percentuale di trials  $0g$  presenti, e per la natura del task: protocolli di punching in cui i soggetti erano chiamati ad intercettare con un pugno un oggetto reale che cadeva dietro lo schermo (quindi non visibile) e che si veniva a trovare nell'IP (posto sotto lo schermo, davanti alla mano dei soggetti) nello stesso istante in cui vi era anche lo stimolo visivo virtuale, e protocolli puramente virtuali (senza oggetto reale) in cui i soggetti dovevano premere il pulsante di un mouse quando lo stimolo giungeva nell'IP. In questo caso veniva dato loro un feedback visivo (in sostituzione di quello tattile del contatto con la palla reale).

Si è registrata l'attività elettromiografica dell'arto superiore destro (sette

muscoli), la sua cinematica (tramite Optotrack 3020 a 200Hz) e l'accelerazione del polso tramite accelerometro triassiale per i protocolli di punching ed il tempo di pressione del tasto per quelli virtuali.

## Risultati

Nei protocolli di punching i trials 1g venivano tutti intercettati correttamente (impatto con la palla nell'intorno del massimo della velocità del pugno), mentre le risposte a quelli con moto uniforme erano anticipate, in accordo con l'uso di un modello interno 1g, che sfrutta le conoscenze a priori relative a g indipendentemente se essa sia presente o meno nello stimolo.

I soggetti presentavano un adattamento, con miglioramento della prestazione per i trials 0g, ma comunque le loro risposte permanevano anticipate, e la percentuale di intercettamento, seppur passando dal  $20\pm 10\%$  della prima ripetizione al  $59\pm 13\%$  delle ultime cinque (stable state), restava ben inferiore a quella per gli 1g ( $80\pm 16\%$  all'inizio,  $92\pm 10\%$  alla fine).

I risultati mostrano inoltre che tale adattamento era proporzionale al numero di trials 0g incontrati, indipendentemente da quanti 1g fossero interposti fra essi, e quindi anche da quanto tempo vi intercorresse: ciò è stato ben messo in evidenza dalle costanti di apprendimento, molto simili anche tra protocolli in cui la percentuale di trials 0g presenti era molto diversa: 1.82 (9%), 1.73 (50%), 1.40 (90%), 1.01 (100%) e 1.7 (100% dopo una sessione di soli 1g il giorno precedente)

Ben diverse erano le risposte nel caso dei protocolli virtuali: in assenza di oggetto reale da intercettare. Nel protocollo in cui venivano presentati 50% di trials 1g e 50% di 0g le risposte dei soggetti, soprattutto per le velocità iniziali più basse, erano più in accordo con una predizione del primo ordine del moto dell'oggetto (modello  $\tau$ ), che non tiene conto dell'accelerazione (né quella dello stimolo, né quella internalizzata). Per questo protocollo le percentuali di intercettamento su tutte le condizioni ( $v_0$ ), così differenti nei protocolli di punching, erano invece non statisticamente diverse ( $p > 0.05$ ) per trials 1g ( $40\pm 12\%$ ) e 0g ( $39\pm 10\%$ ).

## Discussione

Molti esperimenti condotti sui modelli interni si discostano parecchio dalla realtà, sia perché chiamano i soggetti a compiti improbabili nella vita quotidiana sia perché li sottopongono spesso a stimoli virtuali poco realistici.

Qui è stato trovato che quando il soggetto è immerso in un contesto realistico, con un task che gli è familiare come prendere al volo una palla, egli resta vincolato all'uso del modello interno che sfrutta le sue conoscenze a priori. Egli continua ad usare questo modello anche se sottoposto a lunghe sessioni di soli trials 0g (anche 200 trials al giorno per 2 giorni), perché comunque queste non possono mutare le conoscenze apprese in anni di vita immersi nel campo gravitazionale terrestre (o millenni nel caso della specie).

C'è sì adattamento, ma questo è decisamente incompleto. E questo avviene in modo event-dependent (piuttosto che time-dependent), con l'adattamento di uno o più parametri del modello interno 1g.

Quando invece i soggetti sono chiamati ad un compito puramente virtuale, una sorta di videogioco, essi cambiano decisamente strategia.

Non sono più vincolati ad utilizzare il modello di predizione del tempo al contatto che le conoscenze del mondo sembrano avergli insegnato, perché quello virtuale non è il mondo in cui vivono, in cui invece esiste una sola accelerazione di gravità.

## Coordinazione visuomotoria

Vincenzo Maffei

### Introduzione

Poter afferrare un oggetto in caduta libera dovrebbe essere impresa ardua dato che il nostro sistema visivo è in grado di misurare con accuratezza la posizione e la velocità di un oggetto in movimento ma non la sua accelerazione. In realtà l'esperienza quotidiana ci mostra che non è così.

Diversi lavori hanno ipotizzato l'esistenza di un modello interno della gravità. Questo modello interno, integrando le informazioni visive, permette di ben temporizzare il nostro agire nel mondo esterno.

Restano ancora da capire quali siano i substrati corticali del "modello interno di gravità". Per fare questo si è utilizzata la risonanza magnetica (fMRI).

### Metodi

Sono stati testati 17 soggetti in risonanza. Durante la sessione sperimentale essi vedevano proiettato su di uno schermo uno stimolo realistico composta da una donna in piedi di fronte ad un palazzo. Da un cilindro posto sulla testa della donna veniva proiettata una palla che, rimbalzando sul cornicione del palazzo, ritornava nel cilindro. Dopo un intervallo casuale il punto di fissazione veniva fatto espandere. Il moto della palla poteva essere gravitazionale o non-gravitazionale. Veniva chiesto di eseguire 2 tipi di compiti motori: nel primo bisognava intercettare la palla quando ricadeva nel cilindro (compito *proattivo*), mentre nel secondo task occorreva attendere la fine del moto della palla e rispondere in tempo di reazione all'espansione del punto di fissazione (compito *reattivo*).

In un secondo esperimento con 17 soggetti (di cui 11 in comune con il precedente), sempre durante una sessione in risonanza magnetica, si è operata una stimolazione vestibolare calorica (SVC) introducendo acqua a circa 10° nel meato uditivo per 60 s. Questa tecnica innocua e ampiamente utilizzata in clinica permette di stimolare e definire le aree relative alla corteccia vestibolare.

### Risultati

Dall'analisi dei dati di psicofisica si è visto che la risposta ai moti gravitazionali nel compito *proattivo* erano corrette ed erano compatibili con l'utilizzo di un modello interno della gravità mentre nel caso di moti non-gravitazionali l'errore delle risposte era maggiore e queste erano compatibili con modelli lineari in cui non si utilizzava il modello interno della gravità.

Nel compito *reattivo* la differenza tra moti gravitazionali e non-gravitazionali era minima.

Le immagini di risonanza hanno mostrato che indipendentemente dalla modalità, *proattiva o reattiva*, quando si confrontavano i moti gravitazionali rispetto ai moti non-gravitazionali si attivavano le aree cerebrali relative alla corteccia vestibolare.

Per avere un'ulteriore conferma che si trattasse di aree vestibolari si è operato il secondo esperimento di SCV. Attraverso un'analisi di congiunzione si è potuto quindi confermare che le aree attive durante la stimolazione visiva gravitazionale erano attive anche durante la stimolazione calorica vestibolare: si trattava effettivamente della corteccia vestibolare.

Nel caso, invece, si confrontavano i moti non-gravitazionali rispetto ai moti gravitazionali si notava una maggiore attivazione delle aree visive deputate all'analisi del movimento.

Si è quindi giunti a concludere che la corteccia vestibolare "conserva" una rappresentazione dell'accelerazione di gravità.

## **Studio neurofisiologico della demenza di Alzheimer effettuato con la Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS)**

Barbara Marconi

### **Introduzione**

Studi di neuropatologia hanno dimostrato che la corteccia motoria primaria (M1) è coinvolta nel processo neurodegenerativo della demenza di Alzheimer (AD), indicando come possibile processo la perdita e/o la disfunzione dei neuroni piramidali e degli interneuroni inibitori. Nei pazienti AD è stata inoltre dimostrata una ipereccitabilità della corteccia motoria interpretata come una conseguenza della perdita neuronale nelle aree associative a circuito inibitorio (colinergiche e/o GABAergiche) che interagiscono con la M1. Una ipotesi alternativa, supportata da studi presenti in letteratura, riguarderebbe una anomalia del sistema glutammatergico come meccanismo coinvolto nella ipereccitabilità motoria.

Una metodica neurofisiologica non invasiva utile allo studio della funzionalità dei circuiti della corteccia motoria è la stimolazione magnetica transcranica (TMS) con il paradigma del doppio stimolo magnetico. Uno stimolo magnetico condizionante, che precede ad intervalli diversi un secondo stimolo detto test, è in grado di modulare l'ampiezza della risposta motoria (MEP). A brevi intervalli interstimolo (ISI 1-4 msec) si attivano circuiti inibitori (GABAergici) intracorticali mentre ad intervalli più lunghi vengono attivati circuiti facilitatori (glutammatergici).

In questo studio è stata utilizzata la TMS a doppio stimolo a differenti intervalli temporali che ha consentito di valutare le caratteristiche della curva inibitoria ed eccitatoria espressione della eccitabilità dei circuiti di M1. Questo allo scopo di comprendere quali meccanismi neurofisiologici sono alla base della ipereccitabilità corticale osservata nei pazienti AD.

### **Materiale e metodi**

#### *Pazienti*

Sono stati esaminati 10 pazienti (7 donne, 3 uomini, età media 70.7) con una diagnosi di probabile AD in accordo con i criteri della NINCDS-ADRDA. Tutti i pazienti aderivano ai criteri clinici stabiliti dal National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association. Sono stati inclusi nello studio solo i pazienti che alla Clinical Dementia Rating Scale esibivano un punteggio di 1 e 2 (da bassa a moderata severità). Tutti hanno eseguito un esame neuropsicologico completo, compresa la batteria di valutazione di deterioramento mentale (MMSE). I pazienti selezionati erano in grado di capire ed effettuare i compiti richiesti in questo studio ed hanno dato il loro consenso a partecipare all'esperimento.

### Metodi

Sono stati registrati i potenziali evocati motori (MEPs) dal muscolo opponente del pollice. Lo stimolo magnetico test e quello condizionante sono stati dati attraverso una sonda posizionata sullo scalpo del paziente a livello dell'area di rappresentazione dei movimenti della mano di M1. L'effetto del primo stimolo (condizionante) sul secondo (test) è stato studiato a differenti intervalli temporali (ISI: 1-3-5-7-10 millisecondi), dopo avere identificato per ogni soggetto sperimentale il punto sulla corteccia che elicitava una risposta motoria ottimale ("hot-spot"). In ogni paziente è stata definita, per entrambi gli emisferi, la soglia di eccitabilità motoria a riposo (RMT) e durante contrazione. La quantità di inibizione/facilitazione intracorticale è stata espressa in percentuale attraverso il rapporto tra ampiezza del MEPs condizionato e quello non condizionato. Tutti i valori sono stati confrontati con quelli ottenuti in una popolazione sana di controllo. Per la valutazione quantitativa dei dati è stata eseguita una analisi della varianza fattoriale (3-way ANOVA) seguita dai confronti *post-hoc*.

### Risultati

L'analisi ha dimostrato una riduzione significativa della quantità di inibizione intracorticale nei pazienti con AD ( $p < 0,05$ ) rispetto a quella dei soggetti sani. Questa ridotta inibizione è stata osservata maggiormente dagli intervalli temporali ISI 1 e 3 msec. Nessuna differenza è stata riscontrata tra i due emisferi cerebrali.

*Soglia di eccitabilità:* L'eccitabilità della corteccia motoria non è risultata significativamente diversa nei due gruppi (AD vs sani) e tra i due emisferi (DX vs SN). Il valore medio della soglia motoria era  $61\% \pm 10$  (DX) e  $59\% \pm 10$  (SN) nei pazienti con AD e  $57\% \pm 11$  (DX) e  $58\% \pm 11$  (SN) nei soggetti sani.

*Curve di inibizione/facilitazione intracorticale:* L'analisi statistica ha dimostrato una differenza significativa nella curva inibitoria/facilitatoria intracorticale (ICI/IFC) nei due gruppi AD vs sani [ $F(1,28) = 7,53; p < 0,05$ ] e tra i diversi intervalli temporali presi in esame [ $F(4,112) = 7,28; p < 0,001$ ]. In particolare, nel gruppo di pazienti AD si osservava una perdita della inibizione intracorticale (ICI) agli ISI 1 msec ( $105\% \pm 36$ , RH;  $81\% \pm 15$ , LH) e ISI 3 msec ( $159\% \pm 43$ , RH;  $131\% \pm 37$ ). Per gli altri ISI analizzati (5,7 e 10 msec) l'andamento generale delle curve si manteneva simile a quello del gruppo di controllo.

### Discussione

Il risultato principale dello studio è una quantità ridotta di inibizione intracorticale (ICI) nei pazienti AD. Ciò potrebbe riflettere una alterazione nell'equilibrio dei circuiti intracorticali inibitori ed eccitatori all'interno della M1 rappresentato da una diminuita funzione degli interneuroni inibitori GABAergici, responsabili della parte iniziale della curva al doppio stimolo. Tale alterata funzionalità inibitoria potrebbe essere espressione di un fenomeno utilizzato come compenso al mantenimento di un adeguato repertorio dei movimenti della mano ridotto nei pazienti con AD.

## Valutazioni di alterazioni cognitive e neurobiologiche in modelli murini di malattie neurodegenerative

Silvia Middei

Esistono due principali categorie di sistemi di memoria: la prima, definita memoria dichiarativa, comprende l'insieme degli apprendimenti di tipo esplicito e dipende dall'integrità funzionale dell'ippocampo; la seconda, che è definita memoria non dichiarativa comprende l'insieme degli apprendimenti impliciti o automatici. Quest'ultima categoria include la memoria procedurale, ovvero l'insieme di apprendimenti di abitudini motorie controllate dallo striato, struttura fondamentale all'interno dei gangli della base. I due sistemi di memoria, che abitualmente controllano il comportamento in maniera parallela, possono, in particolari condizioni, essere in competizione. Ne consegue che quando l'attività di uno dei due sistemi viene a mancare, l'altro acquista il controllo assoluto del comportamento e la modalità di apprendimento non è più un normale equilibrio tra dichiarativo e procedurale ma diviene esclusiva per l'uno o l'altro.

Il morbo di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa ad evoluzione progressiva con danno nelle aree cerebrali del lobo temporale mediano. I deficit cognitivi che ne conseguono compromettono selettivamente le prestazioni di memoria dichiarativa lasciando intatte le funzioni procedurali. La perdita di memoria nei pazienti Alzheimer è probabilmente il risultato di una disfunzione sinaptica o di anomalie nella trasmissione del segnale che precedono la massiccia neurodegenerazione. I dati a disposizione permettono di attribuire le cause di tale disfunzione ad assemblamenti oligomerici della proteina A $\beta$ .

Nel presente lavoro abbiamo condotto uno studio volto ad indagare le capacità di memoria procedurale e la funzionalità delle strutture da cui questa memoria dipende, in un modello murino di patologia Alzheimer. Topi adulti appartenenti al genotipo Tg2576 (Hsiao K.K. et al. (1996) *Science* 274: 99-102) e loro consanguinei Wild type sono stati sottoposti ad una batteria di test comportamentali volti ad indagare le funzioni cognitive presumibilmente intatte nel morbo di Alzheimer. A tale scopo sono stati utilizzati test in grado di evidenziare migliori prestazioni di tipo procedurale nei topi transgenici rispetto agli animali di controllo.

Abbiamo inoltre indagato il correlato elettrofisiologico del dato comportamentale registrato nei topi transgenici e di controllo.

### Materiali e metodi

#### Soggetti

Sono stati utilizzati topi maschi Tg2576 (TgHuAPP695swe: Tg2576) e relativi controlli. Gli animali mutanti esprimono il frammento APP695 portatore della mutazione svedese in un ceppo di origine geneticamente

ibrido (87% C57BL/6 x 12.5% SJL) successivamente incrociato con C57BL/6 x SJL F1. Gli animali, acquistati presso Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA), sono stati gentilmente forniti da Sigma Tau S.p.a.

### *Metodi*

Nel test di labirinto a croce, sono stati utilizzati un gruppo di animali di 7 mesi di età (11 wild type e 11 Tg2576) ed un gruppo di 14 mesi di età (10 wild type e 10 Tg2576). Il test di evitamento attivo è stato effettuato esclusivamente su animali di 14 mesi (8 wild type e 8 Tg2576). Su questi e su un ulteriore gruppo di 15 animali (7 wild type e 8 Tg2576) è stata valutata la soglia di sensibilità al dolore. La plasticità sinaptica cortico-striatale è stata registrata su 5 e 9 sezioni prelevate rispettivamente da 4 wild type e 5 Tg2576.

Durante l'intero periodo di stabulazione gli animali sono stati mantenuti con libero accesso a cibo ed acqua in gabbie singole collocate in stanze climatizzate ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) con un ciclo luce-buio 12/12 h. Gli animali sottoposti al compito di labirinto a croce sono stati sottoposti a una dieta volta a mantenere uno stato permanente di motivazione di ricerca del cibo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le regole etiche per il trattamento degli animali fornite in "European Communities Council Directive" 14 Novembre 1986 (86/609/EEC).

## **Apparati sperimentali**

### *Labirinto a croce*

Labirinto in legno bianco costituito da 4 bracci identici (nord, sud, est e ovest) originanti da una piattaforma centrale (dimensioni 6x4 cm). Ogni braccio è lungo 35 cm, largo 6 cm. Dalla piattaforma centrale pareti in plexiglas lunghe 15 cm raggiungono la metà di ogni braccio. Due porte a ghigliottina in plexiglas permettono l'eventuale chiusura dei bracci Nord e Sud. Alla fine dei bracci Est ed Ovest si trovano due contenitori per il cibo. Il braccio di partenza è rappresentato dal braccio Sud durante il periodo di training (giorno -2 / giorno 5) e il braccio Nord durante la fase di test (giorno 6). Il labirinto è sollevato 40 cm dal pavimento. Il suo orientamento è mantenuto costante all'interno di una stanza che presenta vari indizi contestuali appesi alle pareti.

### *Evitamento attivo*

Batteria 8 di shuttle-boxes (dimensioni: 40 x 10 x 15 cm). Ogni shuttle-box è suddivisa in due compartimenti da una parete con una piccola apertura a livello del pavimento. Sul soffitto di ogni shuttle box una copertura trasparente permette il passaggio della luce fornita da lampade (10W) posizionate sopra ogni compartimento; il pavimento è costituito da una griglia elettrificata.

L'apparecchiatura utilizzata per il controllo della soglia dolorifica consiste in una gabbia trasparente (dimensioni: 28x28x10 cm) con un pavimento costituito da una griglia elettrificata.

## Protocolli sperimentali

### *Labirinto a croce*

Prima dell'inizio dell'esperimento gli animali sono stati sottoposti a dieta ristretta allo scopo di raggiungere 85% del peso iniziale. Quotidianamente hanno ricevuto una razione di cibo variabile tra 3.5 e 4.5 g.

Durante la fase di pre-addestramento (giorno -2 e giorno -1) ogni animale è stato posto nel punto di partenza (braccio Sud) libero di muoversi nel labirinto per 4 minuti. L'accesso al braccio Nord era negato. Il braccio Est era rinforzato positivamente con una porzione di cibo.

Nella fase di addestramento (dal giorno 1 al giorno 6): ogni animale è stato fatto partire dal braccio Sud per 4 prove di una durata massima di 3 minuti. L'intervallo tra le prove era di 30 secondi. L'accesso al braccio Nord era negato. Il braccio Est era rinforzato positivamente con una porzione di cibo. In ogni trial l'animale poteva visitare il braccio Est (risposta corretta = C) od Ovest (risposta non corretta = I); al termine della visita era posto nella gabbia dove attendeva la prova successiva. Una procedura di correzione è stata utilizzata solo durante il giorno 1.

Durante il test (giorno 7) ogni animale è stato fatto partire dal braccio Nord, invertito rispetto al training, per una sola prova della durata massima di 3 minuti. L'accesso al braccio Sud era negato. Entrambi i bracci Est e Ovest erano rinforzati positivamente con una porzione di cibo. È stato contato il numero di animali che ha fornito risposte di tipo Pace o Response

### *Evitamento attivo*

Gli animali sono stati posizionati nel compartimento buio della gabbia e sottoposti ad apprendimento di evitamento attivo (durata: 45 min, 90 prove di evitamento) durante tre giorni consecutivi. Ogni prova consisteva in un segnale luminoso (10 W) della durata di 30 secondi (stimolo condizionato, Conditioned Stimulus: CS) presentato in uno dei due compartimenti 5 secondi prima della somministrazione di uno shock elettrico (0.7 mA, 25 secondi) nel compartimento opposto (stimolo incondizionato, Unconditioned Stimulus: US). La variabile dipendente misurata consiste nel numero di risposte condizionate (attraversamenti durante la presentazione di CS).

### *Soglia del dolore*

Misurata al termine dell'addestramento su 15 animali sottoposti al compito (7 wild type e 8 Tg2576) e altrettanti animali naive (7 wild type e 8 Tg2576). La soglia del dolore è stata valutata aumentando gradualmente l'intensità di corrente da 0 ad un massimo di 0.3 mA. È stata misurata l'intensità minima di corrente necessaria per indurre comportamenti di vocalizzazione e fuga (jumping).

### *LTD cortico-striatale*

Al termine degli esperimenti comportamentali, gli animali sono stati anestetizzati con alotano e decapitati. Le sezioni sono state preparate secondo la procedura descritta da Calabresi et al. (Calabresi P. et al. (1992) *J Neurosci*

12: 4224-4233): i cervelli prelevati immediatamente dopo la decapitazione e immersi in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (ACSF; composizione: 126 mM NaCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM KCl, 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM glucosio; temperatura: 20°-25° C) sono stati tagliati al vibratomo in sezioni coronali (300 µm) di area cortico-striatale. Le sezioni raccolte sono state mantenute in una camera di incubazione (1h, 34° C) e successivamente trasferite in una camera di registrazione completamente immerse in ACSF (33-34° C, 2-3mL/min; ossigenate con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>).

Il fenomeno di Depressione a Lungo Termine (LTD) è stato indotto nelle fibre cortico-striatali inserendo un elettrodo stimolante (bipolare Ni/Cr) nel corpo calloso, mentre i potenziali sinaptici di campo sono stati registrati extracellularmente nello striato dorsale utilizzando microelettrodi in vetro riempiti di 2 M NaCl (5-10 MΩ). Il segnale è stato filtrato a 1 kHz, amplificato attraverso un Iso-DAM8 amplifer (WPI Inc.), acquisito ed analizzato attraverso "LTP program" (Anderson W.W. e Collingridge G.L. 2001 *J Neurosci Methods* 108(1): 71-83). Per ottenere una baseline, è stato fornito uno stimolo (durata: 50 ms) ogni 60 secondi. Dopo 10 minuti di risposte stabili, è stata somministrata una stimolazione tetanica consistente di tre treni (100 Hz, 1 secondo, intervallo 6 secondi). Durante la stimolazione tetanica l'intensità dello stimolo è stata settata per produrre una risposta massima. Le risposte sono state registrate per 60 minuti dopo la stimolazione tetanica. L'ampiezza dei potenziali di campo è stata definita come l'ampiezza media misurata dal picco di positività iniziale e finale (Calabresi P. et al. (1992) *J Neurosci* 12: 4224-4233).

Al fine di valutare il ruolo dei recettori glutammatergici AMPA e NMDA nella mediazione delle risposte di fEPSPs nelle sinapsi striatali, sono state effettuate registrazioni anche dopo somministrazione dei rispettivi antagonisti CNQX (10 µM) e AP5 (50 µM).

## Risultati

### *Labirinto a croce*

Nella fase di addestramento su animali di 7 mesi, emerge un effetto significativo del fattore sessione [ $F(5,100)=2.36$   $p<.05$ ] e del fattore genotipo [ $F(1,20)=5.78$ ,  $p<.05$ ] indicante come sebbene la prestazione migliora in entrambi i gruppi con il procedere dell'addestramento, i topi Tg2576 commettono un minor numero di errori rispetto ai relativi controlli. Negli animali di 14 mesi persiste un effetto significativo della sessione [ $F(5,90)=4.04$   $p<.01$ ] e del genotipo per quanto riguarda il numero di risposte corrette effettuate confermando la migliore prestazione dei topi Tg2576 durante l'addestramento. Durante il test, l'apprendimento di tipo configurale (Place) è predominante negli animali di controllo in entrambe le età [per animali di 7 mesi:  $\chi^2= 4.45$ ;  $p<.05$ ; per animali di 14 mesi:  $\chi^2= 6.4$ ;  $p<.05$ ]. Al contrario, gli animali mutanti mostrano un comportamento indeterminato a 7 mesi [ $\chi^2= 0.82$ ; n.s.] per slittare verso un comportamento procedurale (Response) a 14 mesi di età [ $\chi^2= 6.4$ ;  $p<.05$ ].

*Evitamento attivo*

Da un'ANOVA condotta sui dati non emerge un effetto del genotipo [ $p < .01$ ] mentre emerge un effetto significativo del fattore sessione [ $F(2,26)=10.66, p < .001$ ] che indica come la prestazione nel compito migliora durante il corso delle prove. Confronti singoli post hoc hanno rivelato un effetto del genotipo ( $p < .001$ ) durante l'ultima sessione di addestramento.

*Soglia del dolore*

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra animali mutanti e controlli per quanto riguarda l'intensità minima per indurre una risposta di vocalizzazione [per gli animali sottoposti al test:  $t = -1.80, p < .05$ ; per gli animali naive:  $t = -2.02, p > 0.05$ ] o di fuga [per gli animali sottoposti al test:  $t = -1.50, p < .05$ ; per gli animali naive:  $t = 0.14, p > 0.05$ ].

*LTD cortico-striatale*

Gli fEPSPs registrati in entrambi i gruppi non sono stati influenzati dalla somministrazione dell'antagonista dei recettori glutammatergici NMDA AP5 mentre sono stati completamente aboliti dalla somministrazione dell'antagonista dei recettori glutammatergici AMPA/kainato CNQX (dati non mostrati). L'ampiezza half-maximal dei potenziali di campo (per i wild type:  $0.45 \pm 0.031$  mV; per i Tg2576:  $0.48 \pm 0.036$  mV) e l'intensità dello stimolo necessaria per avviare tali risposte (per i wild type:  $50.2 \pm 4.1$  V; per i Tg2576:  $46.12 \pm 5.3$  V) non mostravano differenze statisticamente significative tra i due gruppi (per entrambe le misure:  $p > 1$ ). La stimolazione tetanica ha indotto un depotenziamento a lungo termine (per i wild type:  $-52.5 \pm 5\%$ ; per i Tg2576:  $-55.2 \pm 9\%$ ) non statisticamente differente tra wild type e Tg2576 ( $p > 1$ ). Nell'analisi dell'andamento dell'LTD nei 60 minuti successivi alla stimolazione tetanica non è emersa alcuna differenza significativa relativamente al genotipo ( $p > 1$ ) e all'interazione genotipo x sessione ( $p > 1$ ) mentre è emerso un effetto significativo del fattore sessione [ $F(48,528)=3.71, p < .01$ ] ad indicare come in entrambe i gruppi di animali il depotenziamento diminuisce nel corso del tempo.

**Conclusioni**

I risultati relativi al test del labirinto a croce forniscono un'importante conferma all'idea secondo cui la mutazione di cui sono portatori i topi Tg2576 produce una disfunzione precoce e selettiva dell'ippocampo. Durante la fase di addestramento, i topi mutanti di entrambe le età considerate mostrano un apprendimento più veloce e una prestazione più accurata rispetto ai relativi controlli. Con molta probabilità, l'apprendimento della semplice risposta motoria (girare a destra) è facilitata dal fatto che i topi mutanti mostrano una tendenza ridotta ad effettuare un comportamento di alternanza spontanea (dati non mostrati), che consiste nella tendenza naturale dei roditori ad esplorare bracci diversi di un labirinto durante prove consecutive. Pertanto, la disfunzione ippocampica prodotta dalla mutazione (Hsiao K.K.

et al. (1996) *Science* 274: 99-102; Chapman P.F. et al. (1999) *Nat Neurosci* 2: 271-276; Fitzjhon S.M. et al. (2001) *J Neurosci* 21: 4691-4698) potrebbe essere responsabile della distruzione di un comportamento spontaneo che in animali normali interferisce negativamente con l'apprendimento di una semplice risposta motoria.

Durante la fase di test effettuata su animali di 7 mesi, mentre la maggior parte dei wild type manifesta comportamenti di tipo allocentrico-spaziale per risolvere il compito, i topi mutanti mostrano un comportamento casuale, esattamente come topi e ratti dopo inattivazione temporanea dell'ippocampo (Middei S. et al. (2004a) *Behv Brain Res* 154: 527-534; Packard M.G., McGaugh J.L. (1996) *Neurobiol Learn Mem* 65: 65-72) o topi portatori di una disfunzione genetica della stessa struttura (Passino E. et al. (2002) *Hippocampus* 12: 63-75).

È interessante notare come, durante il test effettuato su animali di 14 mesi, i topi Tg2576 non si limitano a manifestare il comportamento tipico di un roditore con una disfunzionalità ippocampale. Infatti quasi tutti i topi mutanti mantengono lo stratagemma motorio messo in atto durante l'addestramento (girare a destra) anziché manifestare un comportamento casuale. Tale comportamento rigidamente procedurale si manifesta esclusivamente in determinate condizioni, quali un addestramento prolungato, che determina il passaggio automatico verso più semplici procedure motorie (Packard M.G., McGaugh J.L. (1996) *Neurobiol Learn Mem* 65: 65-72), una drastica riduzione di indizi contestuali, che impedisce la messa in atto di comportamenti di orientamento (Restle F. (1957) *Psychol Rev* 6: 217-228), o un aumento della funzionalità striatale, indotto da infusione in situ di glutammato (Packard M.G., McGaugh J.L. (1996) *Neurobiol Learn Mem* 65: 65-72). Inoltre, nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente osservato un comportamento analogo in un differente modello di patologia Alzheimer, costituito da ratti con infusione intracerebroventricolare cronica di A $\beta$ 42 (Ammassari-Teule M. et al. (2002) *Neuroreport* 13: 1679-1682).

In entrambi i modelli di patologia Alzheimer assistiamo quindi ad un'anticipazione di un comportamento procedurale indotto probabilmente da un'aumentata funzionalità striatale. Come previsto, abbiamo mostrato che l'alterazione a lungo termine della funzionalità ippocampale in topi Tg2576 di 14 mesi di età induce un meccanismo di compensazione striatale. Ad ulteriore conferma della nostra ipotesi riportiamo i dati raccolti utilizzando il protocollo di evitamento attivo in cui abbiamo trovato prestazioni migliori dei topi mutanti di 14 mesi di età che apprendono il compito molto più velocemente dei rispettivi controlli. Ancora una volta, l'abolizione a lungo termine della funzionalità ippocampica determina un controllo assoluto del compito da parte delle strutture striatali. Questo facilita un apprendimento più rapido e accurato della procedura motoria richiesta poiché l'ippocampo non interferisce nel compito apportando la codifica di inutili informazioni spaziali.

In sintesi, i risultati ottenuti nella prima parte del nostro studio mostrano, nel modello Tg2576, l'emergere di un deficit cognitivo precoce, evidenziabile già prima della comparsa di altre caratteristiche della malattia, quali la presenza di placche amiloidi. È importante sottolineare come il deficit, limitato alle funzioni di memoria dichiarativa è di lieve entità e può essere

evidenziato esclusivamente attraverso l'uso di protocolli comportamentali estremamente sensibili. Con l'avanzare dell'età ed il procedere della patologia, le capacità cognitive controllate dalla funzionalità ippocampale subiscono un ulteriore peggioramento al punto che funzioni cognitive di tipo procedurale sono aumentate al fine di mantenere un controllo stabile del comportamento.

Al contrario di quanto avviene su sezioni di ippocampo (Chapman P.F. et al. (1999) *Nat Neurosci* 2: 271-276; Fitzjhon S.M. et al. (2001) *J Neurosci* 21: 4691-4698), il depotenziamento a lungo termine indotto nei neuroni stellati dello striato attraverso la stimolazione tetanica delle fibre cortico-striatali evolve normalmente nei topi Tg2576, ad indicare che la mutazione indotta in questi animali risparmia i meccanismi di plasticità nello striato. Evidenze sperimentali mostrano che i cambiamenti a lungo termine nell'efficacia delle sinapsi cortico-striatali svolgono un ruolo importante nella regolazione degli input eccitatori diretti ai gangli della base e responsabili della mediazione di apprendimenti stimolo-risposta di tipo procedurale (Spencer J.P., Murphy K.P. (2000) *Exp Brain Res* 135: 497-503; Partridge J.G. et al. (2002) *J Neurosci* 22: 2541-2549). Pertanto possiamo affermare che le basi neurali per questa forma di apprendimento e memoria sono inalterate nel nostro modello di patologia Alzheimer. Queste osservazioni sono peraltro consistenti con dati recenti che mostrano come l'amiloidosi alteri la plasticità neurale solamente all'interno di determinate strutture cerebrali dal momento che i potenziali di campo *in vitro* ed *in vivo* indotti da stimolazioni cortico-corticali non sono modificati in un differente modello murino di patologia AD (Roder S. et al. (2003) *Neuroscience* 120: 705-720).

In conclusione, abbiamo dimostrato come, al contrario di quanto avviene in ippocampo (Hsiao K.K. et al. *Science* 274: 99-102; Chapman P.F. et al. (1999) *Nat Neurosci* 2: 271-276; Fitzjhon S.M. et al. (2001) *J Neurosci* 21: 4691-4698), la plasticità sinaptica delle strutture striatali, e le correlate forme di memoria procedurale in topi Tg2576 risultano essere non solo risparmiate dalla patologia, ma in alcuni casi addirittura migliorate nella loro funzionalità. Questi risultati sono in linea con l'andamento spazio-temporale delle alterazioni cognitive e neurali descritte nei pazienti AD e caratterizzate da un'iniziale alterazione della funzionalità ippocampale, seguita da una progressiva alterazione delle operazioni dipendenti dalle aree corticali mentre le funzioni striatali sono risparmiate (Eldridge L.L. et al. (2002) *Behav Neurosci* 116(4): 722-726; Hirono N. et al. (1997) *Dement Geriatr Cogn Disord* 8: 210-216). L'importanza di questo risultato risiede nella possibilità di evidenziare una dissociazione delle funzioni cognitive e neuronali nei pazienti AD. Ne consegue che utilizzando adeguati criteri di diagnosi è possibile distinguere la patologia AD dalle altre forme di demenza, che non comportano tale dissociazione.

## **L'uso di tecniche ultrasonografiche nella determinazione dei fattori di rischio dell'ictus giovanile**

Marta Panella

### **Introduzione**

L'ictus ischemico rappresenta una delle cause più frequenti di morbilità e mortalità dei paesi industrializzati con un'incidenza annuale dell'11.3%. Secondo i criteri TOAST modificati (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) rimane inspiegato il 21% dei casi (ictus criptogenico) soprattutto nella casistica dell'ictus giovanile (<55 anni) in cui appare sempre più evidente una stretta correlazione (28%) con la pervietà del forame ovale (PFO). Quest'ultimo, residuo della circolazione fetale, rimane aperto nell'età adulta in 1/4 della popolazione e rappresenta la più comune anomalia di origine fetale. Negli individui portatori il PFO permetterebbe uno shunt intracardiaco destro-sinistro nel momento in cui la pressione dell'atrio destro supera quella dell'atrio sinistro.

Recentemente tra i meccanismi fisiopatologici alla base del danno ischemico indotto dal PFO sono stati presi in considerazione l'embolia paradossa e l'ipossiemia refrattaria in pazienti con infarto ventricolare destro o gravi patologie polmonari, mentre è stata trovata una stretta correlazione tra PFO e cefalea emicranica. In particolare è emerso che l'emicrania è più comune nell'ictus ischemico criptogenico associato a PFO che in quello non associato a PFO: si ipotizza infatti sul piano biologico che microemboli attraversino il PFO e possano determinare vasospasmo cerebrale ed emicrania. Infine è frequente il reperto neuroradiologico relativo alla presenza di lesioni ischemiche multiple di natura indeterminata nei pazienti affetti da cefalea emicranica. Recenti studi hanno proposto l'impiego della dopplersonografia transcranica (TCD) per diagnosticare la presenza di shunt destro-sinistro in alternativa alla metodica invasiva dell'ecocardiogramma transesofageo (TEE): infatti la TCD risulta in grado di visualizzare il passaggio di microbolle di aria o miscele di contrasto attraverso le arterie intracraniche.

In virtù delle suddette premesse l'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare la correlazione tra emicrania e vasculopatia cerebrale ischemica di origine non determinata, documentata mediante accertamenti neuroradiologici (RMN cerebrale) e di determinare la prevalenza del PFO in quei pazienti emicranici con positività per lesioni ischemiche multiple.

### **Soggetti, materiali e metodi**

Sono stati arruolati 16 pazienti (13 donne e 3 uomini) di età compresa tra 20 e 55 anni, di cui 8 affetti da emicrania con aura (ECA) e 8 senza aura (ESA) afferenti all'ambulatorio Cefalee del Policlinico Tor Vergata.

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a esame clinico, test ematici di routine e studio della coagulazione, TC cranio o in caso di negatività RMN encefalo per documentare eventuali lesioni ischemiche multiple cerebrali,

Ecodoppler dei vasi intra ed extracranici per escludere un'eventuale patologia dei grossi vasi. Sono stati inoltre esclusi quei pazienti che presentavano accertati fattori di rischio quali Ipertensione arteriosa, Diabete Mellito e dislipidemia.

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti al TCD secondo le linee guida del Consensus Conference di Venezia (Jauss M. e Zanette E. (2000) *Cerebrovasc Dis* 10(6): 490-496): con il paziente in posizione supina è stata insonorizzata l'arteria cerebrale media (ACM) di ciascun lato ed è stato impiegato uno speciale software per visualizzare gli emboli in grado di registrare e contare i segnali ad alta intensità provenienti da ciascuna ACM. Il mezzo di contrasto (1 ml di aria e 9 ml di soluzione salina) è stato iniettato in bolo in 2-3 sec nella vena anticubitale e l'eventuale passaggio di microbolle di aria nell'ACM è stato automaticamente registrato. L'infusione è stata praticata in condizioni basali, durante cioè una normale respirazione, e poi ripetuta, con un intervallo di 2 minuti tra una prova e l'altra, prima di una manovra di Valsalva (VM), durante la VM, immediatamente dopo la VM. Lo shunt destro-sinistro è stato considerato di grado 0 se non appariva alcun segnale entro 30 secondi dalla fine della VM, di grado 1 (piccolo shunt) se venivano registrate  $\leq 10$  bolle, di grado 2 (grande shunt) in caso di  $> 10$  bolle. I pazienti emicranici con positività per lesioni ischemiche multiple in sede cerebrale e TCD positiva per microembolia sono stati sottoposti a TEE per la ricerca dell'eventuale presenza di pervietà del forame ovale.

## Risultati

La prevalenza del PFO è stata del 65% nei pazienti con ECA e del 35% in quelli con ESA con una differenza statisticamente significativa tra i 2 gruppi. In 2.4 pazienti, tutti con ECA, il test è risultato positivo in condizioni di base; in tutti gli altri casi la pervietà del forame ovale si è dimostrata solo durante VM. Inoltre i pazienti con TSE positivo risultavano per il 99% di sesso femminile. Tutti i pazienti presentavano alla RMN encefalo aree multiple puntiformi, iperintense in T2, nella sostanza bianca in sede cortico-sottocorticale. I risultati del TSE indicativi di PFO sono stati confermati al TTE, tranne un caso falso negativo e 3 pazienti sono stati già sottoposti a intervento chirurgico curativo.

## Discussione

I risultati di questo studio, per quanto preliminari in quanto lo studio risulta ancora in corso, indicano che il PFO è statisticamente associato all'emicrania con aura. Questo dato suggerisce che il meccanismo di innesco dell'aura emicranica potrebbe essere costituito almeno in parte da un processo di embolia paradossa in base al quale il PFO sarebbe in grado di attivare sostanze vasoattive come microemboli piastrinici capaci di bypassare il filtro polmonare e di raggiungere la circolazione sistemica in quantità tale da attivare l'attacco emicranico. Inoltre il risultato di quest'analisi potrebbe giustificare l'accresciuto rischio di ictus riscontrato in alcuni studi epidemiologici nei pazienti portatori di emicrania con aura.

## **Interazioni cross-modali in pazienti con eminegligenza spaziale: studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) a 3 Tesla**

Fabiana Patria

### **Introduzione**

La maggior parte degli studi sull'integrazione cross-modale è stata condotta sugli animali data l'invasività delle tecniche di registrazione intracorticale che hanno portato alla scoperta dei neuroni multisensoriali. Negli ultimi anni, grazie allo sviluppo delle tecniche di neuroimmagine che consentono di studiare l'attività del cervello *in vivo*, i processi di integrazione cross-modale sono stati studiati anche nell'uomo. Studi recenti hanno dimostrato che nelle aree cerebrali multimodali convergono informazioni sensoriali diverse, provenienti da specifiche regioni unimodali (Macaluso E., Driver J. (2001) *Neuropsychology* 39: 1304-1316) che a loro volta sono modulate da effetti cross-modali (Macaluso E. et al. (2000) *Science* 289: 1206-1208). Macaluso e Driver (2001) hanno proposto un modello di integrazione multisensoriale in cui un circuito fronto-parietale, che riceve input da diverse modalità sensoriali, dovrebbe fungere da centro di controllo multimodale dell'attenzione spaziale, modulando l'attività delle aree sensoriali da cui riceve afferenze.

I meccanismi di integrazione multimodale sono stati studiati anche in pazienti con deficit unilaterali delle rappresentazioni spaziali (neglect spaziale unilaterale). Tipicamente, pazienti con neglect hanno difficoltà nel prestare attenzione e nel riferire stimoli presentati nel lato dello spazio controlaterale alla lesione. In uno studio recente, Frassinetti e collaboratori (Frassinetti F. et al. (2002) *J Cogn Neurosci* 14(1): 62-69) hanno dimostrato che la detezione di stimoli visivi in pazienti con neglect migliora quando uno stimolo uditivo viene presentato insieme al visivo secondo precise regole spaziali e temporali.

### **Scopo**

Il presente progetto si propone di studiare, mediante la risonanza magnetica funzionale ad alto campo (3 Tesla), le basi neurali di questo "transiente" miglioramento del neglect durante stimolazioni sensoriali multimodali (visiva e uditiva).

Preliminarmente, è stato realizzato uno studio fMRI evento correlato, ad alto campo, con lo scopo di validare, su soggetti di controllo sani, una variante del paradigma di Posner tipicamente usato per studiare l'attenzione visuo-spaziale, sia in individui sani che in pazienti con deficit attenzionali. Tale paradigma consiste nel presentare una freccia (cue) che indica la posizione del campo visivo (destra/sinistra) in cui sarà presentato, dopo un certo intervallo temporale, lo stimolo che il soggetto dovrà identificare. La posizione indicata dal cue è "valida" quando lo stimolo appare nella posizione attesa, mentre è "invalida" quando appare nella posizione opposta, non attesa (es. il cue indica

il lato destro e lo stimolo viene presentato a sinistra). In quest'ultimo caso è necessario un re-orientamento dell'attenzione dalla posizione spaziale indicata dal cue a quella in cui effettivamente appare lo stimolo. Posner e collaboratori (Posner M. et al. (1984) *J Neurosci* 4: 1863-1874) hanno dimostrato che i pazienti con neglect hanno difficoltà a re-orientare l'attenzione visuo-spaziale quando il cue indica l'emicampo ipsilesionale e lo stimolo da rilevare viene presentato nell'emicampo contralesionale. Rispetto all'asse verticale (alto/basso) i dati sui deficit attenzionali associati al neglect sono contrastanti (Baynes K. et al. (1986) *Brain* 109: 99-114; Arguin M. & Bub D. (1993) *Brain Cognition* 22: 148-160).

Precedenti studi di fMRI hanno dimostrato il coinvolgimento di un circuito fronto-parietale destro, comprendente la giunzione temporo-parietale (TPJ) e il giro frontale inferiore (IFG), in compiti che richiedono un re-orientamento dell'attenzione verso stimoli presentati in posizioni non attese (Corbetta M. et al. (2000) *Nat Neurosci* 3: 292-297). In tali studi, però, gli stimoli venivano presentati solo lungo l'asse orizzontale, mentre la dimensione verticale non è mai stata presa in considerazione.

Lo studio preliminare qui presentato ha lo scopo di testare entrambe le dimensioni, verticale ed orizzontale, per verificare se lo stesso circuito fronto-parietale è coinvolto anche quando l'attenzione visuo-spaziale è modulata lungo l'asse verticale.

Successivamente sarà possibile studiare, nelle aree individuate, le interazioni cross-modali sia su soggetti di controllo che su pazienti con neglect, tenendo conto anche degli assi lungo i quali l'attenzione visiva viene modulata.

## Materiali e metodi

### *Soggetti*

Hanno partecipato allo studio tredici soggetti sani, di età compresa fra i venticinque e i trentacinque anni, che hanno dato il consenso alla partecipazione all'esperimento, le cui procedure sono state approvate dal comitato etico locale.

### *Stimoli*

Il cue consisteva in un rombo grigio i cui angoli, colorandosi di rosso, indicavano la posizione (alto/basso o destra/sinistra) in cui poteva apparire lo stimolo target consistente in un simbolo "x" o "+" presentato ad una distanza di 6.5 gradi di angolo visivo dal cue.

### *Procedura*

Ai soggetti era richiesto di fissare, per tutta la durata dell'esperimento, il cue centrale e di identificare il target presentato in periferia premendo con l'indice o con il medio della mano destra uno dei due tasti di risposta di una pulsantiera a fibra ottica (es. tasto sinistro/dito indice per "x" e tasto destro/dito medio per "+"). Ogni prova consisteva nella presentazione del cue per 500 msec, di un ISI (intervallo inter-stimolo) per 500 msec e infine

del target per 100 msec. Ogni prova aveva dunque la durata di 1100 msec ed era seguita da un periodo di fissazione della durata di 4000-6000 msec in cui il soggetto dava la risposta e veniva acquisito il tempo di reazione. Ogni soggetto è stato sottoposto a quattro sessioni sperimentali: in due veniva testato l'asse orizzontale e in due quello verticale; ogni sessione consisteva di 32 prove. Nell'80% dei casi il target era presentato in posizione "valida" e nel 20% dei casi in posizione "invalida".

In un magnete Siemens Allegra a 3 Tesla sono state acquisite serie di immagini eco-planari, usando una tecnica di acquisizione dipendente dal livello di ossigenazione sanguigna (BOLD: Kwong K.K. et al. (1992) *PNAS USA* 89: 5675-5679), che rileva cambiamenti fisiologici nell'ossigenazione dell'emoglobina e, fornendo un segnale di risonanza magnetica correlato all'attività neurale locale, permette di creare mappe funzionali dell'attivazione cerebrale. I parametri utilizzati sono i seguenti: TR=65msec; TE=30msec; matrice 64x64; 32 fette per volume; dimensione del voxel 3x3x3.75 m; 200 volumi per sessione.

### **Analisi dei dati**

Le medie dei tempi di reazione sono state sottoposte ad un'analisi della varianza (ANOVA) con fattori Lato del target (destra, sinistra, alto, basso) per Tipo (valido, invalido).

Le immagini funzionali sono state preprocessate ed analizzate mediante PM2: sono state corrette per la differenza nel tempo di acquisizione fra le fette, riallineate in modo da ridurre la variabilità dovuta al movimento della testa, riportate in uno spazio anatomico standard, convolute con un filtro gaussiano per ridurre la variabilità anatomica e funzionale fra soggetti e analizzate secondo il modello lineare generale e la teoria dei campi gaussiani (Friston K.J. et al. (1991) *J Cerebr Blood F Met* 11: 690-699; Worsley K.J. et al. (1992) *J Cerebral Blood F Met* 12: 900-918; Friston K.J. et al. (1994) *Hum Brain Mapp* 1: 214-220).

### **Risultati e conclusioni**

Dall'ANOVA sui tempi di reazione è risultato significativo l'effetto del fattore Tipo (valido, invalido) con tempi di risposta significativamente più lunghi per i target presentati in posizione invalida, indipendentemente dalla posizione spaziale del target.

I dati funzionali evidenziano il coinvolgimento di un circuito fronto-parietale bilaterale che include la giunzione temporo-parietale (TPJ) e il giro frontale inferiore (IFG) quando i target sono presentati in posizioni invalide, indipendentemente dalla posizione spaziale.

Dunque, questo circuito non è implicato solo nello spostamento dell'attenzione lungo l'asse orizzontale ma si attiva anche quando la ridistribuzione delle risorse attentive avviene lungo l'asse verticale.

## **L'organizzazione cortico-funzionale nella corteccia somatosensoriale dopo allungamento chirurgico degli arti**

Laura Piccardi

Nell'ambito di tale ricerca è stata studiata la riorganizzazione corticale di due soggetti affetti da acondroplasia sottoposti ad allungamento progressivo degli arti inferiori ottenuto mediante la tecnica chirurgica Ilizarov (Ilizarov G.A., Deviatov A.A. (1971) *Ortop Traumatol Protez* 32: 20-25; Cattaneo R. et al. (1988a) *Int Orthop* 12:173-179). L'allungamento progressivo degli arti che è possibile osservare con questa tecnica è di circa 10-15 cm e avviene in meno di un anno. La nostra ipotesi era che tale cambiamento potesse richiedere un riarrangiamento a livello cerebrale sia delle mappe somatosensoriali che motorie degli arti allungati così come dei cambiamenti psicofisici della percezione del corpo. L'allungamento progressivo di uno specifico e ristretto segmento corporeo e la parziale immobilizzazione del soggetto durante il tempo della durata dell'allungamento (circa 6 mesi) rendono questa procedura chirurgica un modello ideale per studiare la plasticità cerebrale e i cambiamenti psicofisici.

Sono stati osservati due pazienti acondroplasici (un maschio DM di 15 anni e una femmina RZ di 14 anni) e un gruppo di controllo di 7 soggetti senza acondroplasia (3 maschi e 4 femmine età media 14,0 anni  $\pm$  1,02) per valutare il peso della crescita normale sulla modificazione della rappresentazione corporea. I pazienti acondroplasici sono stati valutati in tre diversi momenti: due settimane prima dell'intervento chirurgico, sei mesi dopo l'intervento chirurgico alla fine della procedura di allungamento e a distanza di circa 1 anno dall'intervento. I soggetti di controllo sono stati osservati due volte a distanza di 6 mesi tra la prima e la seconda valutazione. Ad ogni osservazione i soggetti sono stati sottoposti a registrazione dei potenziali evocati somatosensoriali (SEP) e a sessioni di fMRI durante le quali veniva osservata l'attivazione delle aree cerebrali in seguito alla stimolazione sensoriale dell'area corporea sotto (piede) e sopra (ginocchio) il livello della frattura chirurgica. Inoltre, i soggetti sono stati sottoposti anche a uno studio comportamentale volto a misurare i cambiamenti nella rappresentazione dello schema corporeo (un test di schema corporeo e una prova di valutazione soggettiva della posizione del piede). La valutazione comportamentale è stata eseguita anche durante il periodo di allungamento (tre mesi dopo l'intervento). La tecnica combinata dei SEP e della fMRI ha consentito di ricostruire la superficie corticale di ogni paziente e di localizzare precisamente le misure ottenute dalla registrazione elettrofisiologica. I SEP erano registrati in risposta a stimolazioni elettriche non dolorose a livello del piede e della caviglia a sinistra e a destra del nervo tibiale.

Il risultato principale dello studio concerne la riorganizzazione funzionale che avviene in S1. Infatti, l'analisi del confronto tra le osservazioni SEP e fMRI registrate prima e immediatamente dopo la procedura di allungamento

mostra uno spostamento significativo di 4-6 mm ventralmente e posteriormente dell'area sensoriale primaria di localizzazione della stimolazione della gamba. Tale spostamento ritorna nella posizione originale (prima dell'intervento chirurgico) a distanza di circa un anno. Non si rilevano modificazioni per quanto riguarda l'area di localizzazione del ginocchio. Lo stesso fenomeno avviene anche a livello comportamentale, i due pazienti mostravano, infatti una rappresentazione corporea deficitaria durante e immediatamente dopo la procedura di allungamento che rientrava nella prestazione normale nell'ultima osservazione. Inoltre, la loro valutazione soggettiva della posizione del piede si modificava in modo abnorme tra prima dell'intervento e durante l'allungamento per poi tornare in una stima paragonabile a quella prima dell'intervento nelle ultime due osservazioni (immediatamente dopo e a distanza di circa un anno). Il confronto tra la prestazione nella prima e nella seconda valutazione del gruppo di controllo non rileva alcuna modificazione (i soggetti di controllo erano cresciuti in media di  $5 \text{ cm} \pm 1$ ).

## **Progettazione sistemi meccanici per la fisiologia del movimento**

Alessandro Portone

### **Introduzione**

Il lavoro svolto all'interno del laboratorio "Metodi Computazionali e Biomeccanica della Mano" del Dipartimento di Fisiologia Neuromotoria nel corso dell'anno 2004 si è concretizzato attraverso due attività.

La prima è consistita nella partecipazione alla preparazione ed allo svolgimento di una serie di esperimenti nell'ambito della linea di ricerca *Combinazioni di sinergie muscolari nel controllo dei movimenti dell'arto superiore*. Obiettivo della ricerca è la comprensione dei meccanismi fondamentali che il sistema nervoso centrale (SNC) utilizza per il controllo dell'arto superiore ed in particolare nel controllo dei movimenti di puntamento. Si è contribuito a diversi aspetti di questa ricerca: dalla progettazione e realizzazione dell'apparato sperimentale, alla conduzione di sessioni sperimentali, all'analisi dei dati raccolti.

La seconda attività si è focalizzata sullo sviluppo di una nuova linea di ricerca finalizzata allo studio della prensione ed in particolare alla verifica dell'ipotesi che il SNC semplifichi la coordinazione dei molti gradi di libertà della mano combinando poche unità di controllo. In questo ambito, è stata condotta una rassegna della stata caratterizzata dallo studio di parte della letteratura scientifica rilevante sulla prensione ed è stata attrezzata una piccola officina meccanica per la progettazione e la realizzazione mediante una fresa a controllo numerico di oggetti in legno e plastica di forma arbitraria da usare come stimoli sperimentali.

### **Materiale e metodi**

#### *Movimenti di puntamento*

In una prima serie di esperimenti, a soggetti adulti sani è stato chiesto di eseguire movimenti di puntamento veloci (tempo di movimento inferiore a 400 ms) da una stessa posizione di partenza verso 8 bersagli nel piano sagittale ed 8 bersagli nel piano frontale. I soggetti afferrano una maniglia con una sfera di riferimento e devono raggiungere un bersaglio costituito da una seconda sfera posizionata dallo sperimentatore. Il disegno sperimentale prevede di far eseguire i movimenti ad un primo gruppo di soggetti con tre differenti posture dell'avambraccio (neutrale, prona, supina) e ad un secondo gruppo con tre differenti pesi trasportati nella mano. Si è quindi progettata e realizzata una speciale maniglia con due caratteristiche peculiari:

- un disegno ergonomico per garantire una postura naturale durante la pronosupinazione e nel contempo permettere di mantenere la sfera di riferimento allineata con l'asse dell'avambraccio;
- la possibilità di introdurre nel corpo della maniglia una zavorra di massa variabile.

Durante gli esperimenti è stata registrata l'attività elettromiografica di 16 muscoli (mediante il sistema Bagnoli-16 della Delsys), in parte relativi all'arto superiore destro ed in parte al tronco ipsilaterale. Contemporaneamente è stata registrata la posizione (mediante sistema di acquisizione del movimento Fastrak della Polhemus) della sfera di controllo sulla maniglia, del polso e della spalla del soggetto.

In una seconda serie di esperimenti, si è ampliato il protocollo sperimentale introducendo, oltre ai movimenti di puntamento diretti, movimenti nei quali la posizione del bersaglio cambia dopo l'inizio del movimento. A tal fine si è reso necessario costruire un nuovo apparato sperimentale nel quale il bersaglio da raggiungere è indicato dall'accensione di un LED ed è quindi possibile cambiarne la posizione istantaneamente e con una temporizzazione precisa.

### *Prensione*

È stata avviata la realizzazione di alcuni oggetti di "prova" da utilizzare in un esperimento pilota per la definizione di un nuovo protocollo sperimentale per lo studio della prensione. In particolare, si intende studiare la variabilità della postura della mano e dei punti di contatto tra dita e oggetto in funzione della forma geometrica, della distribuzione della massa, e delle caratteristiche della superficie degli oggetti. L'acquisizione dei dati posturali avverrà utilizzando un guanto instrumentato (Cyberglove). Gli oggetti vengono progettati e realizzati con l'ausilio di software che permettono la rappresentazione e la parametrizzazione di superfici tridimensionali (AutoCAD Mechanical e Matlab), di software CAM per la generazione del codice relativo al percorso utensile (DeskProto) ed infine di una fresa a controllo numerico (Isel CPM4030) con movimento del mandrino lungo tre direzioni mutuamente ortogonali.

## **Conclusioni**

L'intento di entrambe le linee di ricerca è quello di individuare delle regolarità nell'attività muscolare e nelle caratteristiche cinematiche osservate durante una varietà di movimenti che possano avvalorare l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo di semplificazione del controllo motorio a cui il sistema nervoso centrale ricorre per selezionare le attività muscolari e coordinare i molti gradi di libertà del complesso sistema meccanico quali sono il braccio e la mano.

I primi risultati ottenuti nell'ambito dello studio dei movimenti di puntamento avvalorano l'ipotesi che il controllo del movimento avvenga tramite la combinazione di attività muscolari elementari. La maggiore comprensione del complesso problema del controllo motorio che questo meccanismo di semplificazione comporta potrebbe dare origine a delle strategie riabilitative mirate al fine di ottimizzare il recupero di soggetti affetti da patologie motorie dell'arto superiore e della mano.

## **Analisi immunohistochimiche delle modificazioni plastiche del sistema nervoso centrale in seguito ad arricchimento ambientale**

Benedetta Ricci

Lo scopo del lavoro svolto durante l'anno 2004 è stato quello di indagare gli effetti dell'arricchimento ambientale sulla struttura cerebrale e sulle sue funzioni, concentrandosi, nello specifico, sulla formazione ippocampale, una delle strutture che meglio risponde ai fenomeni plastici generati dall'arricchimento ambientale. A questo scopo è stato utilizzato il proto-oncogene *c-fos* come strumento elettivo per la valutazione dei fenomeni plastici a seguito di manipolazioni sperimentali, quali l'arricchimento. Inizialmente la valutazione si è concentrata sull'espressione di base del proto-oncogene, controllando così solo la variabile dell'arricchimento, per verificare eventuali differenze sulla dinamica dell'attivazione del gene, dovute alla stabulazione in ambiente arricchito. In seguito è stato introdotto un test comportamentale di natura spaziale.

Tale studio è stato effettuato per verificare, sempre tramite l'espressione dell'attivazione del proto-oncogene, l'eventuale interazione tra arricchimento ambientale e stimolazione comportamentale. Il test scelto per questo studio è stato l'*open field*, sia perché esso è particolarmente indicato per un'analisi comportamentale a largo spettro sia perché è un test rapido da somministrare. Grazie ad esso, è stato possibile dimostrare tanto il ruolo dell'ippocampo nell'esplorazione spaziale quanto la complessità del comportamento del ratto in una situazione di novità. Non a caso, il protocollo utilizzato prevede la somministrazione agli animali di una situazione di esplorazione nuova rispetto a quella appresa in sessioni precedenti in quanto l'induzione di molti geni ad attivazione precoce quali il *c-fos*, avviene nel momento in cui il soggetto viene esposto a situazioni di novità. Ciò che rende utile il test dell'*open field* nella ricerca proposta è proprio il fatto che, all'interno dell'arena, il comportamento esplorativo del ratto è completamente libero e autogenerato, permettendo così una valutazione accurata del comportamento stesso.

L'interazione della procedura di arricchimento ambientale con l'uso di un test comportamentale di esplorazione spaziale è sembrato lo strumento più adatto per evidenziare in modo completo la dinamica di attivazione del *c-fos* nelle regioni della formazione ippocampale, implicate in tale tipo di apprendimento esplorativo. A tal proposito sono stati selezionati due gruppi di animali. Il primo è stato allevato secondo la procedura dell'*arricchimento ambientale* descritta da Rosenzweig dal periodo dello svezzamento fino all'età di 3 mesi; il secondo è stato allevato in *condizioni standard* di laboratorio per lo stesso periodo di tempo.

Il protocollo sperimentale dell'*open field* ha previsto 6 sessioni della durata di 6 minuti ciascuna, con un intervallo tra le sessioni di 3 minuti, durante il quale il ratto veniva riposto nella propria gabbia. Durante la prima sessione il ratto veniva messo nell'arena che non conteneva alcun oggetto e ne veniva

misurata l'attività esplorativa di base. In seguito venivano inseriti nell'arena 5 oggetti con una determinata disposizione spaziale e veniva registrata l'abituazione all'esplorazione dei suddetti oggetti nelle successive 3 sessioni. Nelle ultime due sessioni, veniva cambiata la posizione di due oggetti, passando così da una iniziale disposizione quadrangolare con un oggetto centrale ad una grossolanamente poligonale. In questa fase è stata analizzata la reattività dell'animale al cambiamento spaziale.

I dati ottenuti, per quanto riguarda la condizione basale, intendendo per condizione basale l'assenza di attivazione, hanno evidenziato che gli animali arricchiti presentavano un'attivazione minore del protooncogene *c-fos* a livello della formazione ippocampale rispetto al gruppo di animali di controllo stabulati in condizioni standard. In condizioni basali, quindi, l'attivazione della proteina *c-Fos* è ridotta negli animali allevati in condizioni di arricchimento. Interessanti risultati sono emersi dall'analisi comportamentale ed immunohistochimica degli animali cresciuti in ambiente arricchito e sottoposti al test dell'open field. Dal punto di vista comportamentale, durante la fase di abituazione, in cui gli animali venivano inseriti in un'arena contenente 5 oggetti posti sempre nella stessa disposizione spaziale, non si sono evidenziate differenze tra gli animali arricchiti e gli animali di controllo. Entrambi i gruppi, infatti, presentavano una buona capacità di esplorazione dell'arena ed una normale fase di abituazione agli oggetti presenti.

Effetti inattesi sono emersi dall'osservazione del comportamento degli animali dopo cambiamento della disposizione spaziale degli oggetti. Infatti, mentre gli animali di controllo mostravano una normale reattività al cambiamento spaziale, gli animali arricchiti sembravano non reagire e, quindi, non accorgersi delle variazioni apportate all'interno dell'arena. L'analisi dei livelli di attivazione di *fos* nella formazione ippocampale di entrambi i gruppi ha permesso di chiarire meglio la situazione. La condizione di cambiamento spaziale aveva indotto una notevole espressione della proteina *c-Fos* sia nel gruppo di controllo che nel gruppo degli arricchiti. Il confronto con i livelli di espressione della proteina in condizioni basali ha evidenziato un significativo aumento di cellule *fos*-positive dopo l'esecuzione del test, indipendentemente dall'essere stati allevati in ambiente arricchito o meno. Tuttavia, differenze tra le due popolazioni sono emerse quando è stata considerata la percentuale di incremento dell'attivazione proteica rispetto alla condizione basale. Infatti, l'incremento percentuale del numero di cellule *fos*-positive nella condizione di test rispetto a quella di no-test negli animali arricchiti era circa il doppio (295%) di quella degli animali stabulati in condizioni standard (147%).

Considerando questi dati nel loro complesso, è possibile trarre alcune importanti considerazioni. Gli animali allevati in ambiente arricchito mostrano un comportamento scarsamente reattivo, sembrando non riconoscere la situazione spaziale nuova. Tuttavia, a livello della formazione ippocampale è evidente in questi animali un notevole incremento di espressione della proteina *c-Fos*. L'induzione di *fos*, come di molti geni ad attivazione precoce, avviene nel momento in cui il soggetto viene esposto a situazioni ambientali e stimoli nuovi.

Il quadro anatomo-funzionale presente negli animali arricchiti è indice del fatto che questi animali, nonostante apparentemente sembrino non rendersi conto della novità, l'hanno in realtà riconosciuta ed hanno reagito ad essa. Dunque gli animali arricchiti sembrano non avere necessità di indirizzare la loro attività esploratoria verso la novità in quanto già in grado di identificarla, muovendosi normalmente nell'arena.

È possibile ipotizzare, quindi, che la condizione di arricchimento ambientale in cui questi animali sono cresciuti abbia affinato notevolmente le loro abilità spaziali.

## **Interazioni tra la Rappresentazione Cognitiva dello Spazio e del Linguaggio**

Maria Cristina Rinaldi

Scopo dell'attività di ricerca svolta nel corso dell'anno 2004 è stato il comprendere le modalità con le quali nei pazienti cerebrolesi un deficit di natura spaziale, la negligenza spaziale unilaterale, interagisce con l'elaborazione del linguaggio uditivo, al fine di esplorare l'esistenza di relazioni tra elaborazione spaziale ed elaborazione uditivo-linguistica non ancora chiaramente delineate nelle conoscenze neuroscientifiche attuali.

Gli studi sperimentali compiuti sui rapporti tra spazio e linguaggio sono stati condotti principalmente su individui sani non cerebrolesi (Chatterjee A. et al. (1995a) *Neuropsychologia* 33(5): 643-648; Chatterjee A. et al. (1999) *Neuropsychologia* 37: 395-402), con l'eccezione di alcuni resoconti clinico-neuropsicologici riferenti sia dati di pazienti cerebrolesi presentanti alterazioni delle abilità linguistiche con implicazioni di natura spaziale (Chatterjee A. et al. (1995b) *Brain Lang* 49: 125-139; Coslett H.B. (1999) *Neuropsychologia* 37: 695-706), che dati di pazienti cerebrolesi presentanti alterazioni delle abilità spaziali con implicazioni di natura linguistica (Barbut D. and Gazzaniga M.S. (1987) *Brain* 110 (6): 1487-1496; Caramazza A. and Hillis A.E. (1990) *Cognitive Neuropsych* 7(5/6): 391-445), convergenti in entrambi i casi verso il medesimo punto di interfaccia tra spazio e linguaggio.

Ad ulteriore conferma di una interconnessione tra elaborazione spaziale e linguistica si pone uno studio recente di Rinaldi e colleghi (Rinaldi C., Marangolo P., Pizzamiglio L. (2003) *Neuroreport* 14(10): 1381-1383), nel quale è stata evidenziata nei pazienti con lesione cerebrale destra ed eminattensione una influenza dell'eminattensione su un compito di discriminazione prosodica: i pazienti eminattenti infatti commettevano un maggior numero di errori quando l'accento da discriminare nella frase cadeva sulla parola iniziale (la parola-soggetto), piuttosto che sulla parola centrale (il verbo) o finale (il complemento oggetto). Ciò suggeriva una transcodifica spaziale della stringa uditiva, transcodifica inficiata in modo spazialmente prevedibile dal disturbo eminattentivo, il quale comprometterebbe la rappresentazione spaziale della parola-soggetto in quanto collocantesi questa all'inizio di tale transcodifica (e quindi "a sinistra" di essa).

La ricerca svolta ha cercato di comprendere qual è il livello di elaborazione del linguaggio uditivo coinvolto dal deficit eminattentivo, in quanto lo studio precedente di Rinaldi e colleghi (Rinaldi C. et al. (2003) *Neuroreport* 14(10): 1381-1383) nulla diceva al riguardo. È possibile ipotizzare infatti che l'azione dell'eminattensione si espliciti a livelli diversi: a livello di una qualsiasi sequenza di eventi, non necessariamente linguistici, dispiegantisi nel tempo; a livello di una sequenza di eventi linguistici (parole) non inseriti in una struttura portante di tipo sintattico (una frase con agente/azione/ricevente dell'azione); o, anche, a livello di una frase sintatticamente strutturata, considerando in questo caso il ruolo di strutture sintattiche diverse come ad es. frasi attive vs passive.

La ricerca svolta ha quindi ampliato la metodologia utilizzata nello studio originario di Rinaldi e colleghi (Rinaldi C. et al. (2003) *Neuroreport* 14(10): 1381-1383)-consistente in un compito di confronto dell'accentazione enfatica di una coppia di frasi udite-applicandola ad una tipologia diversificata di stimoli: le coppie di frasi infatti non erano più unicamente frasi attive, bensì delle frasi attive sono state confrontate con frasi passive; ciò al fine di indagare il ruolo della struttura sintattica in rapporto all'eminattenzione e al relativo capovolgimento nella collocazione del soggetto logico della frase (= colui che compie concretamente l'azione) che si ha nel passare da una frase attiva ad una passiva. Inoltre, sono state utilizzate frasi formate, anziché da soggetto/verbo/oggetto, da sequenze di tre parole non semanticamente relate, escludendo la presenza di un verbo, definito dai linguisti come la struttura portante dell'evento narrato nella frase definente i ruoli tematici (agente e ricevente dell'azione) qui contenuti. Sono poi state confrontate frasi formate da sequenze di note musicali anziché da parole, al fine di verificare se l'azione del neglect si manifesta a carico di una qualsiasi sequenza di eventi uditivi dispiegata nel tempo, indipendentemente dalla loro natura linguistica.

I risultati hanno mostrato che l'eminattenzione interferisce con l'elaborazione del linguaggio uditivo solo in corrispondenza di determinate condizioni: innanzitutto, il bias nella elaborazione dell'elemento iniziale della frase udita non si riscontra nelle frasi costituite da suoni musicali, implicando con ciò che il deficit non si riscontra per qualsiasi sequenza di stimoli uditivi dispiegati nel tempo, e anche quindi che il livello di elaborazione linguistica compromesso dall'eminattenzione non è quello delle caratteristiche sovrasegmentali del linguaggio (prosodia). Inoltre, il bias non è stato riscontrato nemmeno nel caso di frasi costituite da una sequenza di tre sostantivi e prive di verbo; gli stimoli uditivi in questo caso erano sì di natura linguistica, ma non inseriti in alcuna struttura 'portante' definita dal verbo.

Il bias è stato invece riscontrato nelle condizioni in cui come stimoli sono state utilizzate delle frasi complete, sia attive che passive, contenenti in entrambi i casi agente, verbo e ricevente dell'azione.

Di notevole interesse è l'inversione del bias osservata in questa ricerca tra frasi attive e frasi passive: se nelle frasi attive ad essere compromesso in caso di eminattenzione è l'elemento iniziale della frase (=la parola-soggetto), nelle frasi passive al contrario ad apparire compromesso è l'elemento finale (=la parola complemento d'agente); ma, indipendentemente dalle sue vesti grammaticali, in entrambi i casi ad essere coinvolto è il soggetto logico della frase, cioè colui che compie concretamente l'azione (e che figura come soggetto nelle frasi attive, e come complemento d'agente nelle frasi passive). Ora, frasi attive e frasi passive condividono una medesima "struttura profonda", nel linguaggio Chomskiano, struttura che è una rappresentazione del "chi fa che cosa a chi". All'interno della struttura profonda il soggetto logico della frase si trova in ogni caso all'inizio, che è come dire "a sinistra" della rappresentazione spaziale dell'evento espresso tramite linguaggio uditivo, spiegando in questo modo la compromissione in direzioni opposte operata dall'eminattenzione per l'emispazio di sinistra nei due tipi di frasi, attive e passive.

Dai dati raccolti è quindi possibile ipotizzare che il neglect agisca a livello della transcodifica spaziale della struttura profonda del linguaggio.

## **Valutazione dei deficit di scrittura in pazienti afasici mediante somministrazione di una batteria per la disgrafia**

Sabrina Ronca

Ciascun compito cognitivo (scrivere una parola, leggere una sillaba, denominare un'immagine, ecc.) è reso possibile grazie al funzionamento di varie componenti indipendenti, che possono essere danneggiate o risparmiate selettivamente in caso di danno cerebrale (Caramazza A. (1986) *Brain and cognition* 5(1): 41-66; Caramazza A., Miceli G. in Von Euler C. et al. (eds) (1989) *Brain and reading. Wenner-Gren international symposium series* 54(19): 257-268, New York: MacMillan; Caramazza A., Miceli G. (1990) *Cognition* 37: 243-297; Cubelli R. (1991) *Nature* 353: 258-260; Hillis A.E. (2004) *Neurocase* 10(2): 89-90; Miceli G. (2001) *Journal of neurology* 248: 658-664; Miceli G. et al. (1995) *Cortex* 31: 161-171; Miceli G. et al. (1997) *Cognitive neuropsychology* 14: 35-70; Miceli G. et al. (1997b) *Cortex* 33: 355-367; Miceli G. et al. (2004) *Neurocase*, 10(2):109-121; Piccirilli M. et al. (1992) *Italian journal of neurological science* 13(2):113-117; Posteraro L. et al. (1988) *Brain and language* 35(2): 274-286; Rapp B. Uncovering the cognitive architecture of spelling. In Hillis A. (ed.) (2002) *Handbook on adult language disorders: integrating cognitive neuropsychology, neurology and rehabilitation*. Philadelphia: psychology press; Shelton J.R., Caramazza A. (1999) *Psychol bull rev.* 6(1): 5-27; Ward J., Romani C. (1998) *Neurocase* 4: 189-206).

Per individuare correttamente il danno, è necessario utilizzare prove specifiche costruite sulla base dell'organizzazione della componente oggetto di studio e capaci di rivelare deficit molto selettivi (Miceli G. et al. (1994). Batteria per l'analisi dei deficit afasici (BADA). Roma: CEPSAG; Capasso R., Miceli G. (2001) *Esame neuropsicologico per l'afasia (ENPA)*. Milano: Springer-Verlag Italia).

Solo dopo aver identificato con precisione la componente danneggiata, è possibile programmare un intervento terapeutico mirato al recupero del deficit funzionale causato dalla lesione cerebrale. L'identificazione quanto più possibile precisa del danno cognitivo è un prerequisito necessario a qualunque intervento riabilitativo motivato, perché sapere quale processo cognitivo è danneggiato, permette di agire selettivamente su di esso, evitando di rivolgere tempo e cure al recupero di processi cognitivi che sono integri (Miceli G. et al. (1996) *Brain and language* 52: 150-174; Rapp B. & Kane A. (2002) *Aphasiology* 16: 439-454).

Da alcuni anni la diffusione della neuropsicologia cognitiva ha creato il bisogno di strumenti di esame che permettessero una corretta applicazione dei metodi di questa disciplina nella pratica clinica. Questi strumenti diagnostici permettono di individuare la componente del sistema danneggiata e consentono di indirizzare il successivo approfondimento diagnostico. In presenza di un deficit selettivo, la valutazione di base non è sufficiente. Per valutare precisamente quale elemento, all'interno della componente danneggiata, è causa di un determinato comportamento patologico, è necessario somministrare prove specifiche costruite sulla base della organizzazione della componente oggetto di studio e in grado di rivelare deficit molto selettivi.

Per individuare i meccanismi cognitivi danneggiati in caso di deficit di scrittura (Lessico Ortografico, Sistema di Conversione Fonema-Grafema, Buffer Grafemico), è stato preparato un test contenente prove di scrittura sotto dettato di parole e di non-parole, di denominazione scritta e di spelling orale. Il test è indicato per quei pazienti che, ad una prima valutazione di base, hanno evidenziato deficit delle conoscenze ortografiche, per meglio individuarne la natura e la causa, così da consentire la preparazione di programmi riabilitativi mirati.

Come stimoli sono state utilizzate parole e non-parole, di diversa lunghezza e complessità ortografica (struttura semplice, con alternanza regolare Consonante-Vocale; struttura complessa, con presenza di gruppi di consonanti e di vocali e di consonanti doppie). Le parole sono inoltre controllate per classe grammaticale (nomi, verbi, aggettivi, funtori), struttura morfologica e frequenza d'uso (alta e bassa). Un tipo particolare di stimolo è costituito da parole che contengono segmenti omofoni/non omografi (es. scemo, scienza; cielo, cena; cuore, quota; ecc.), la cui corretta scrittura dipende dall'attivazione delle conoscenze lessicali.

Il test è stato somministrato a 60 soggetti di controllo (33 donne e 27 uomini) destrimani, per ottenere dati normativi sulla base dei quali valutare se e in quale misura le prestazioni ottenute dai soggetti afasici sono patologiche. La somministrazione ha richiesto in media 45 minuti per ciascun soggetto.

I criteri di scelta dei soggetti, sono stati età e anni di scolarità, per verificare quanto questi due parametri possano influenzare le prestazioni in prove di scrittura. Sono state scelte quattro fasce di età (meno di 40 anni, 40-55 anni, 55-65 anni, più di 65 anni) e 4 fasce di scolarità (5 anni, 8 anni, 13 anni e più di 13 anni).

Le prestazioni dei soggetti di controllo sono state analizzate quantitativamente (numero di risposte corrette) e qualitativamente (tipo di errore). Scrittura sotto dettato, denominazione scritta e spelling orale, sono state valutate separatamente. Dopo una prima analisi che ha riguardato le prestazioni di ciascun soggetto, sono stati analizzati i risultati dei 60 soggetti, a seconda della fascia di età e di scolarità cui appartenevano.

I risultati così ottenuti hanno portato a trarre le prime conclusioni che riportiamo di seguito.

#### *Scrittura sotto dettato di parole*

Le prestazioni appaiono influenzate dal livello culturale dei soggetti, quando questo coincide con pochi anni di frequenza scolastica, e dalla complessità ortografica degli stimoli (prestazioni peggiori su stimoli con struttura complessa rispetto a stimoli con struttura semplice Consonante-Vocale). L'età sembra influire nella misura in cui è associata ad una bassa scolarità.

Dall'analisi qualitativa emerge che gli errori commessi più frequentemente sono errori ortografici, consistenti in sostituzioni (saziare → satiare), inserzioni (saziare → sanziare) delezioni (saziare → sazare) e trasposizioni (saziare → sariaze) di fonemi, ed errori fonologicamente plausibili (scienza → scenza).

Da notare che quasi tutti i soggetti hanno commesso un maggior numero di errori nella scrittura di parole contenenti segmenti omofoni/non omografi (quota, scienza, camicie, cieco), anche se le difficoltà maggiori si ritrovano

nei soggetti con una minore frequenza scolastica. Questo potrebbe far pensare che non solo il livello di scolarità influisce sulla capacità di scrivere correttamente parole che non rispettano i rapporti di trasparenza tra pronuncia e ortografia.

#### *Denominazione scritta*

I dati sono simili a quelli emersi nella scrittura sotto dettato. Anche in questo caso le prestazioni risentono del livello culturale dei soggetti e sono influenzate dalla struttura ortografica dello stimolo.

#### *Scrittura sotto dettato di non-parole*

I dati ottenuti sembrano mettere in evidenza che le variabili che più incidono sulle prestazioni dei controlli sono il livello di scolarità dei soggetti, e la lunghezza e complessità ortografica degli stimoli. L'età non sembra invece influenzare le prestazioni dei soggetti esaminati.

Relativamente al tipo di errore, gli errori ortografici sono più numerosi nelle prestazioni dei soggetti con 5 e 13 anni di scolarità, e tendono a diminuire con l'aumentare del livello culturale.

#### *Spelling orale di parole e non-parole*

Le prestazioni in questa prova sembrano risentire della lunghezza dello stimolo (prestazioni peggiori su stimoli lunghi) e del livello culturale dei soggetti.

Questa prima analisi dei risultati ottenuti dai soggetti di controllo nei diversi test, ha consentito di individuare, e quindi eliminare, gli stimoli che hanno creato difficoltà ad un numero elevato di soggetti, appartenenti a diverse fasce di età e di scolarità.

Dall'analisi finale sono stati poi esclusi alcuni soggetti, le cui prestazioni si discostavano troppo da quelle degli altri controlli. In particolare, sono stati esclusi quei soggetti che hanno commesso numerosi errori su stimoli contenenti suoni fonologicamente correlati (es. stendevi → TENDEVI; bastei → BATTEI) e che durante il test hanno chiesto più volte la ripetizione dello stimolo. Questo comportamento ed il tipo di errore commesso, è compatibile con la presenza di un deficit acustico, anche se non diagnosticato clinicamente per nessuno dei soggetti. L'osservazione è importante ed è bene sottolineare che prima di somministrare il test a soggetti afasici è necessario accertarsi che non siano presenti deficit uditivi periferici.

La batteria così ottenuta, è stata somministrata a 20 soggetti afasici le cui prestazioni nella Batteria per l'Analisi dei Deficit Afasici-B.A.D.A. (Miceli et al., 1994; Miceli et al., versione computerizzata, in stampa) hanno evidenziato deficit di scrittura.

L'analisi dei risultati ha permesso di individuare in maggior dettaglio il danno "funzionale" di tali pazienti e quando è stato possibile inserire alcuni di essi in riabilitazione, le informazioni ottenute sono state utilizzate per preparare programmi riabilitativi "individualizzati", mirati al recupero del meccanismo cognitivo danneggiato (Lessico Ortografico di Output, procedure sublessicali di Conversione Fonema-Grafema, Buffer Grafemico).

## Distribuzione subcellulare e funzione dei recettori purinergici P2 nel sistema nervoso centrale

Fabrizio Vacca

### Introduzione e obiettivi

I nucleotidi extracellulari assolvono molteplici ed importanti funzioni biologiche. In molti casi, la loro azione risulta mediata dall'attivazione di specifici recettori di membrana, denominati "recettori purinergici P2" e suddivisi in due sottoclassi: i recettori ionotropici P2X e recettori metabotropici P2Y, definite, rispettivamente, in base alla proprietà di formare canali ionici, oppure di essere accoppiati alle proteine G. I recettori P2 sono espressi in una grande varietà di cellule e tessuti dove mediano diverse azioni fisiologiche (contrazione della muscolatura liscia, secrezione neuro-endocrina, trasmissione sinaptica) e sono coinvolti in eventi patologici (neurodegenerazione, disordini infiammatori, dolore neuropatico) (Burnstock G. (2002) *Clin Med* 2: 45-53).

È stato recentemente dimostrato che l'ATP extracellulare ha un'azione tossica diretta, nei confronti di colture primarie neuronali dissociate ed organotipiche (Amadio S. et al. (2002) *Neuropharmacology* 42: 489-501), ed è inoltre in grado di aggravare il danno ipoglicemico che si verifica nel SNC (Cavaliere F. et al. (2002) *J Neurochem* 83: 1129-1138).

La localizzazione dei recettori per i neurotrasmettitori, nella corretta area della membrana cellulare, è di critica importanza per l'innescò e l'integrazione dei segnali nei circuiti di cellule eccitabili. I recettori e le proteine regolatorie sono indirizzati, infatti, all'interno di specifici siti sub-cellulari, dove raggiungono concentrazioni elevate. Un meccanismo alla base del raggruppamento dei recettori nell'area di contatto della sinapsi avviene, ad esempio, attraverso interazioni proteina-proteina. In aggiunta, l'associazione di particolari recettori con specifici domini del doppio strato lipidico, chiamati "lipid rafts", può consentirne la corretta localizzazione sulla membrana. Questi domini risultano ricchi di sfingolipidi, glicolipidi e colesterolo, sono resistenti all'estrazione a 4°C con detergenti non ionici e presentano una bassa densità nella centrifugazione in gradiente di saccarosio (Brown D.A., London E. (2000) *J Biol Chem* 275: 17221-17224). I "lipid rafts" sono coinvolti in molte funzioni cruciali anche per i neuroni, tra le quali la trasmissione del segnale da parte di fattori neurotrofici, l'adesione, la crescita assonica, il traffico intracellulare delle vescicole e delle proteine (Tsui-Pierchala B.A. et al. (2002) *Trends Neurosci* 25: 412-417).

Il presente programma di ricerca si proponeva pertanto di investigare la distribuzione sub-cellulare dei recettori P2, con un interesse particolare per i compartimenti sub-membranosi specializzati, quali i 'lipid rafts' che in genere costituiscono un importante meccanismo di dinamica recettoriale (e quindi di reclutamento in siti specializzati, di interazioni recettoriali omologhe ed eterologhe, di attivazione). Ci si proponeva inoltre di studiare la potenziale associazione/interazione dei recettori P2 con altre proteine specificamente localizzate nei "rafts" e che potessero modularne la funzione e la localizzazione.

## Risultati

I risultati di questo studio dimostrano che il recettore purinergico P2X<sub>3</sub> è localizzato in domini di membrana che presentano tutte le caratteristiche biochimiche dei 'lipid rafts'. In colture primarie di granuli di cervelletto, in particolare, questa localizzazione è stata verificata in diversi modi:

- la proteina P2X<sub>3</sub> è resistente all'estrazione con il detergente triton X-100 a 4 °C, una proprietà caratteristica delle proteine associate ai 'lipid rafts';
- l'estrazione del colesterolo dalla membrana rende la proteina solubile nel detergente, rinforzando l'ipotesi che l'insolubilità possa dipendere dai 'lipid rafts';
- la proteina P2X<sub>3</sub> si trova, assieme a caveolina e flotillina-2, nelle frazioni a bassa densità in gradiente di saccarosio, proprietà addizionale che distingue le proteine dei 'rafts';
- lo stesso si verifica quando le frazioni contenenti i 'lipid rafts' vengono preparate seguendo un metodo alternativo che non prevede l'uso di detergenti.

Oltre che nelle colture cellulari, la proteina P2X<sub>3</sub> si trova associata ai 'lipid rafts' anche in estratti totali di cervello, di cervelletto e di gangli delle radici dorsali. Il recettore P2X<sub>3</sub> si trova associato ai 'lipid rafts' anche quando viene espressa transientemente in un sistema cellulare esogeno (la linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y).

Tutti gli altri recettori purinergici analizzati (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>4</sub>) non risultano, a differenza di P2X<sub>3</sub>, essere localizzati nei 'lipid rafts' nei sistemi cellulari da noi presi in considerazione. È stato studiato il ruolo dei 'lipid rafts' nella traslocazione in membrana della proteina P2X<sub>3</sub>, analogamente a quanto riportato in letteratura per proteine analoghe. Nel caso del recettore P2X<sub>3</sub> è stato osservato che bloccando farmacologicamente la formazione dei 'rafts' (con -metil-ciclodestrina e compactina) non si impedisce alla proteina di venire esposta sulla superficie esterna della cellula. Questo dato, ovviamente, non esclude che i 'rafts' siano coinvolti nella corretta localizzazione del recettore in modo più fine. Ulteriori approfondimenti saranno necessari per verificare se la presenza di P2X<sub>3</sub> nei 'lipid rafts' possa contribuire ad una corretta distribuzione di questo recettore, in compartimenti specifici della membrana neuronale.

È stata studiata la localizzazione del recettore P2X<sub>3</sub> in seguito al trattamento con ligandi naturali (ATP) e sintetici ( $\alpha\beta$ -metilene-ATP). Sono riportati in letteratura diversi casi di recettori la cui localizzazione nei 'lipid rafts' varia in seguito allo stimolo con il ligando, questo non sembra tuttavia essere il caso del recettore P2X<sub>3</sub>, in quanto il trattamento con i ligandi non sembra alterarne la localizzazione.

È stata osservata inoltre la co-localizzazione del recettore P2X<sub>3</sub> nelle frazioni contenenti 'lipid rafts' con proteine del comparto pre-sinaptico (SNARE come la sintassina1, SNAP25, VAMP e sinaptotagmina) in sinaptosomi di cervelletto ed in granuli cerebellari in coltura.

In conclusione, in questo lavoro viene presentata, per la prima volta, la

dimostrazione che un membro della famiglia dei recettori purinergici, ed in particolare il P2X<sub>3</sub>, è localizzato nei 'lipid rafts'. Il significato biologico di questa localizzazione rimane ancora da dimostrare per P2X<sub>3</sub>, così come per gli altri recettori per i neurotrasmettitori sinora trovati in questi domini di membrana. Questo risultato può, tuttavia, contribuire a spiegare la fisiologia molecolare di questo recettore ed aprire una nuova prospettiva nella caratterizzazione di fenomeni quali la percezione del dolore periferico, in cui la comunicazione purinergica esercita un ruolo cruciale.