



## **Dottorato in Psicobiologia e Psicofarmacologia**

# **RUOLO DELLE INTERAZIONI CEREBELLO-CORTICALI NELLA MODULAZIONE DELLE FUNZIONI COGNITIVE.**

## **Studio degli effetti di lesioni cerebellari nell'uomo mediante VBM e tDCS.**

Anno Accademico 2009/2010

Dottoranda  
Silvia Clausi

Relatore: Prof. Maria Leggio

# INDICE

## - PARTE TEORICA -

<b>Introduzione generale</b> .....	2
<b>Capitolo I – Substrato anatomico-funzionale delle interazioni cerebello-corticali</b> ..5	
1.1. Organizzazione anatomica e funzionale del cervelletto.....	5
1.2. Organizzazione citoarchitettónica della corteccia cerebellare.....	8
1.3. I micro-complessi cortico-nucleari.....	12
1.4. I circuiti cerebro-cerebello-corticali.....	16
1.5. Ipotesi sui modelli d'interazione cerebello-corticale: dalla modulazione delle funzioni motorie alla modulazione delle funzioni cognitive.....	20
<b>Capitolo II - Strumenti per l'indagine morfologica e neurofisiologica applicati al cervello umano</b> .....	25
2.1. Studio anatomico delle lesioni cerebrali nell'uomo.....	25
2.1.1. Immagini di risonanza magnetica nucleare tridimensionali e ad alta risoluzione. ....	25
2.1.2. Processo di normalizzazione delle immagini di risonanza magnetica nucleare.....	26
2.1.3. Normalizzazione in presenza di lesioni cerebrali focali.....	28
2.2. Analisi morfovolumetrica della corteccia cerebrale: la voxel based morphometry .....	29
2.3. Metodiche di stimolazione cerebrale non invasive nell'uomo.....	33
2.3.1. Stimolazione transcranica con corrente continua (tDCS).....	33
2.3.2. Parametri biofisici dell'applicazione della tDCS dell'uomo.....	34
2.3.3. Applicazioni della tDCS sul cervello dell'uomo.....	35

- PROGETTO SPERIMENTALE -

<b>Introduzione al progetto sperimentale.....</b>	<b>38</b>
<b>Capitolo III - STUDIO 1: Indagine morfo-volumetrica della corteccia cerebrale in soggetti con lesione cerebellare focale, mediante VBM.....</b>	<b>40</b>
3.1. Razionale.....	40
3.2. Descrizione del campione.....	41
3.3. ESPERIMENTO 1: Studio anatomico delle lesioni cerebellari.....	44
3.3.1. Premessa.....	44
3.3.2. Materiali e Metodi.....	46
3.3.2.1. Acquisizione delle neuroimmagini.....	46
3.3.2.2. Fase post-acquisizione.....	46
3.3.3. Analisi qualitativa e quantitativa dei dati anatomici.....	47
3.3.4. Risultati.....	47
3.3.5. Discussione.....	52
3.4. ESPERIMENTO 2: Analisi morfo-volumetrica della corteccia cerebrale mediante Voxel Based Morphometry.....	53
3.4.1. Premessa.....	53
3.4.2. Materiali e Metodi.....	53
3.4.2.1. Processamento delle immagini di RMN.....	53
3.4.3. Analisi dei dati.....	54
3.4.4. Risultati.....	54
3.4.5. Discussione.....	57
3.5. ESPERIMENTO 3: Correlati comportamentali di lesioni cerebellari focali.....	59
3.5.1. Premessa.....	59
3.5.2. Materiali e metodi.....	60
3.5.2.1. Misurazione delle funzioni motorie.....	60
3.5.2.2. Misurazione delle funzioni cognitive.....	61
3.5.3. Analisi statistica.....	62
3.5.4. Risultati.....	62
3.5.4.1. Funzioni Motorie.....	62
3.5.4.2. Funzioni cognitive.....	63
3.5.4.3. Correlazione tra danno anatomico corticale e funzioni cognitive.....	64

3.5.5. Discussione.....	66
3.6. Conclusioni Studio 1.....	67

**Capitolo IV - Studio 2: Effetti comportamentali della modulazione dell'interazione cerebello-corticale mediante stimolazione transcranica con corrente continua del cervelletto.....70**

4.1. Razionale.....	70
4.1.1. tDCS applicata al cervelletto.....	71
4.1.2. Cervelletto ed apprendimento motorio.....	74
4.2. Descrizione del campione.....	76
4.3. ESPERIMENTO 1: Apprendimento del Test della Spirale di Archimede.....	76
4.3.1 Premessa.....	76
4.3.2. Materiali e Metodi.....	77
4.3.2.1 Soggetti.....	77
4.3.2.2. Il test della spirale di Archimede digitale.....	77
4.3.2.3. Descrizione del protocollo.....	78
4.3.3. Analisi dei dati.....	80
4.3.4. Risultati.....	81
4.3.5. Discussione.....	82
4.4. ESPERIMENTO 2: Effetto della tDCS catodica cerebellare sul comportamento.....	84
4.4.1. Premessa.....	84
4.4.2. Materiali e Metodi.....	84
4.4.2.1. Soggetti.....	84
4.4.2.2. Stimolazione transcranica con corrente continua.....	85
4.4.2.3. Protocollo sperimentale.....	86
4.4.3. Analisi dei dati.....	88
4.4.4. Risultati.....	89
4.5. Conclusioni Studio 2.....	91

**Conclusioni.....92**

<b>Bibliografia.....</b>	<b>95</b>
Appendice 1.....	116
Appendice 2.....	117

## PARTE TEORICA

## **Introduzione Generale.**

A livello clinico, pazienti affetti da lesione cerebellare focale e con patologia cerebellare degenerativa riferiscono non solo disturbi motori, ma anche disfunzioni in diverse abilità cognitive, tra cui ad esempio le funzioni esecutive. Tali alterazioni vanno ad inficiare la qualità della vita di tali soggetti e probabilmente hanno delle conseguenze indirette sul recupero delle funzioni motorie. Mentre sono noti ormai da tempo i meccanismi anatomo-funzionali sottostanti le disfunzioni motorie in presenza di patologia cerebellare, poco chiari rimangono i meccanismi sottostanti le alterazioni riferite alle abilità cognitive.

I primi studi sperimentali riguardanti il cervelletto hanno evidenziato chiaramente il ruolo di tale struttura nel controllo dell'equilibrio, dell'andatura, della postura, e nella coordinazione del movimento (Rolando, 1809; Holmes, 1939; Eccles, 1967; Paulin, 1988, 1993).

Già a partire dal 1970, però, dati clinici e sperimentali hanno evidenziato un coinvolgimento del cervelletto anche nel controllo di funzioni non-motorie, consentendo di rivedere la visione classica secondo cui tale struttura era coinvolta esclusivamente nel controllo delle funzioni motorie (Ito, 1970; Leiner et al., 1986; 1991;1995).

Di fatto, il cervelletto sembra aver aumentato drasticamente la sua massa nel corso dell'evoluzione filogenetica del cervello umano (Passingham, 1975). Inoltre lo sviluppo del neocerebello è avvenuta in parallelo con la corteccia cerebrale, in particolare con le aree associative. Tali osservazioni hanno condotto Dow (1974) all'ipotesi che il neocervelletto e le aree associative corticali siano interconnesse e funzionalmente correlate. Schmahmann e Pandya (1989, 1991, 1995) hanno dimostrato il contributo delle proiezioni delle aree associative e paralimbiche al

circuito cortico-ponto-cerebellare, ed hanno ipotizzato che tale substrato anatomico-funzionale possa essere alla base del coinvolgimento del cervelletto nella modulazione delle funzioni cognitive ed affettive.

Nei primi anni '90, Middleton e Strick, utilizzando la tecnica del trasporto retrogrado transneuroneale del virus herpes simplex di tipo 1, hanno identificato le zone di invio e di ricezione delle informazioni elaborate dal cervelletto inerenti le funzioni cognitive (Middleton e Strick, 1994; 1999).

Nel corso degli anni, studi anatomici effettuati su soggetti con lesioni cerebellari (Molinari et al., 1997, 2004; Schmahmann e Sherman, 1998; Leggio et al., 2000, 2008; Gottwald et al., 2004; Hokkanen et al., 2006), studi funzionali effettuati su soggetti sani (Allen et al., 1997; Bellebaum e Daum, 2007; Gourovitch et al., 2000; Hayter et al., 2007; Booth et al., 2007; Stoodley e Schmahmann, 2009) ed ampie revisioni concettuali sulla funzionalità cerebellare (Leiner et al., 1986, 1991; Ito, 2006; 2008; Molinari et al., 2008; Leggio et al., 2009; Stoodley e Schmahmann, 2010) hanno contribuito ad evidenziare come il cervelletto sia coinvolto anche nel controllo di specifici domini cognitivi.

Le indagini sul ruolo del cervelletto nell'elaborazione dei processi cognitivi sono risultate sempre più numerose ed approfondite, sebbene ancora oggi non permettano di delineare un quadro completo, sia rispetto al ruolo che il cervelletto svolge nel controllo di tali funzioni, sia rispetto alle modalità di interazione tra il cervelletto e le aree di proiezione della corteccia cerebrale deputate al controllo delle funzioni cognitive.

Tali indagini, hanno compiuto passi in avanti, anche grazie alla messa a punto di nuove tecniche di neuroimmagine funzionale e strutturale, che hanno avuto un notevole sviluppo sia applicativo che tecnologico negli ultimi 20 anni. L'uso di tali tecniche ha consentito di studiare ed osservare, non solo il coinvolgimento delle diverse strutture encefaliche durante l'esecuzione di compiti sia motori che cognitivi,

ma anche le interazioni anatomico-funzionali tra queste strutture corticali e specifiche porzioni cerebellari.

Più di recente la messa a punto di protocolli neurofisiologici di stimolazione magnetica transcranica (TMS) e di stimolazione elettrica a corrente continua (tDCS) del cervelletto ha permesso di influenzare il normale funzionamento cerebellare, valutandone gli effetti sulle aree di proiezione (Oliveri et al., 2005; Fierro et al., 2007; Koch et al., 2008; Langguth et al., 2008) ed a livello comportamentale (Theoret et al., 2001; Gironell et al., 2002; Nagel e Zangemeister, 2003; Miall e Christensen, 2004; Ferrucci et al., 2008). Lo sviluppo di tali tecniche, volte a modulare l'eccitabilità cerebellare, appaiono di notevole interesse sia per comprendere i meccanismi alla base delle interazioni cerebello-corticali, sia come potenziale strumento riabilitativo per i pazienti con patologia cerebellare.



# CAPITOLO I

## **Substrato anatomo-funzionale delle interazioni cerebello-corticali**

### **1.1. Organizzazione anatomica e funzionale del cervelletto.**

Il cervelletto è situato in fossa cranica posteriore dorsalmente al tronco dell'encefalo. La corteccia cerebellare è formata da sostanza grigia, la porzione più profonda è costituita da sostanza bianca. Nella profondità della sostanza bianca vi sono localizzati tre paia di nuclei: il nucleo del fastigio, posto a livello mediale, il nucleo interposito (composto dal nucleo globuloso ed emboliforme) posto a livello intermedio, ed il nucleo dentato posto lateralmente. I nuclei profondi proiettano all'esterno del cervelletto attraverso i peduncoli cerebellari inferiore, medio e superiore, nei quali decorrono anche le fibre afferenti che arrivano alla corteccia cerebellare.

Due fessure trasversali dividono il cervelletto in tre lobi che a loro volta sono suddivisi in lobuli (figura 1.1.). Il lobo anteriore (lobuli I, II, III, IV, V) e il lobo posteriore (lobuli VI, VII, VIII, IX) sono separati dalla fessura primaria, mentre la fessura posterolaterale separa il lobo posteriore dal lobo flocculo-nodulare (lobulo X). Inoltre, due scissure longitudinali dividono il cervelletto in tre aree: un'area mediale, detta verme, e due aree laterali, dette emisferi cerebellari, suddivisi a loro volta in un'area intermedia ed una laterale.

Secondo Jansen e Brodal (1954), ciascuna di queste aree ha delle funzioni specifiche e stabilisce connessioni con diverse regioni del sistema nervoso centrale come vedremo nel paragrafo 1.4.

Dal punto di vista funzionale il cervelletto viene diviso in tre diverse strutture, la cui specificità è data dalle connessioni efferenti ed afferenti con differenti aree del

sistema nervoso centrale. L'*archicerebello*, o *vestibolocerebello*, comprende il verme e i due flocculi ed è coinvolto nel controllo dell'equilibrio durante la stazione eretta e la deambulazione, e nel controllo dei movimenti oculari. Il *paleocerebello*, o *spinocerebello*, che comprende la restante parte del verme e la zona paravermiana, controlla l'aggiustamento del movimento in corso, il tono muscolare e la postura. Il *neocerebello*, o *cerebrocerebello*, che comprende la porzione laterale degli emisferi cerebellari, influenza il movimento, la pianificazione e la coordinazione motoria.

VERMIS Lobule I,II	FISSURE	HEMISPHERE Lobule I,II
III	Precentral	III
IV	Preculminate	IV
V	Intraculminate	V
VI	Primary	VI
VIIAf	Superior Posterior	Crus I
VIIAt	Horizontal	Crus II
VIIIB	Ansoparamedian	VIIIB
VIIIA	Prepyramidal/Prebiventer	VIIIA
VIIIB	Intrabiventer	VIIIB
IX	Secondary	IX
X	Posterolateral	X

**Figura 1.1.** Relazione tra le fessure ed i lobuli cerebellari nel verme e negli emisferi definiti dall'Atlante di Schmähmann et al. (2000).

## **1.2. Organizzazione citoarchitettonica della corteccia cerebellare.**

L'organizzazione cellulare del cervelletto è uniforme e regolare, e prevede una stratificazione multipla nella quale sono disposti cinque tipi di cellule (Eccles, 1967; Ito, 1984). In particolare, è possibile identificare tre strati ognuno dei quali è formato da tipi cellulari di dimensioni, forma e specie peculiari (figura 1.2).

Nello strato più interno troviamo i granuli, che rappresentano la «stazione di entrata» per i segnali provenienti dall'esterno del cervelletto. I segnali afferenti a tali cellule vengono trasmesse attraverso le fibre muscoidi, che hanno origine da numerosi siti nei nervi periferici, nel midollo spinale e nel tronco dell'encefalo. Esse terminano a livello dello strato granulare della corteccia cerebellare, dove formano strutture caratteristiche dette glomeruli, all'interno delle quali effettuano sinapsi eccitatorie con i granuli.

Nella parte più esterna di questo strato sono presenti alcune cellule del Golgi, che controllano le sinapsi tra fibre muscoidi e cellule dei granuli. Infatti, tali cellule effettuano sinapsi inibitorie sui granuli ed allo stesso tempo ricevono sinapsi eccitatorie direttamente dalle fibre muscoidi (Pellionisz e Szentàgothai, 1973).

L'assone dei granuli, passando attraverso lo strato intermedio, arriva fino allo strato esterno della corteccia cerebellare, detto strato molecolare. Qui l'assone si biforca in due rami, detti fibre parallele, che decorrono per vari millimetri intersecando l'albero dendritico di numerose cellule di Purkinje.

Le fibre muscoidi, quindi, influenzano indirettamente l'attività delle cellule di Purkinje agendo sui granuli che, attraverso le fibre parallele, inducono in esse potenziali di azione semplici detti "spike semplici" (Braitenberg, 1997).

Lo strato molecolare è costituito, inoltre, dalle cellule stellate e a canestro, interneuroni inibitori che fanno sinapsi sulle cellule di Purkinje. I fasci di fibre parallele hanno contatti sinaptici anche con questi interneuroni inibitori, che possono

agire inducendo un aumento del potenziale post-sinaptico inibitorio (IPSP) delle cellule di Purkinje (Eccles et al., 1967).

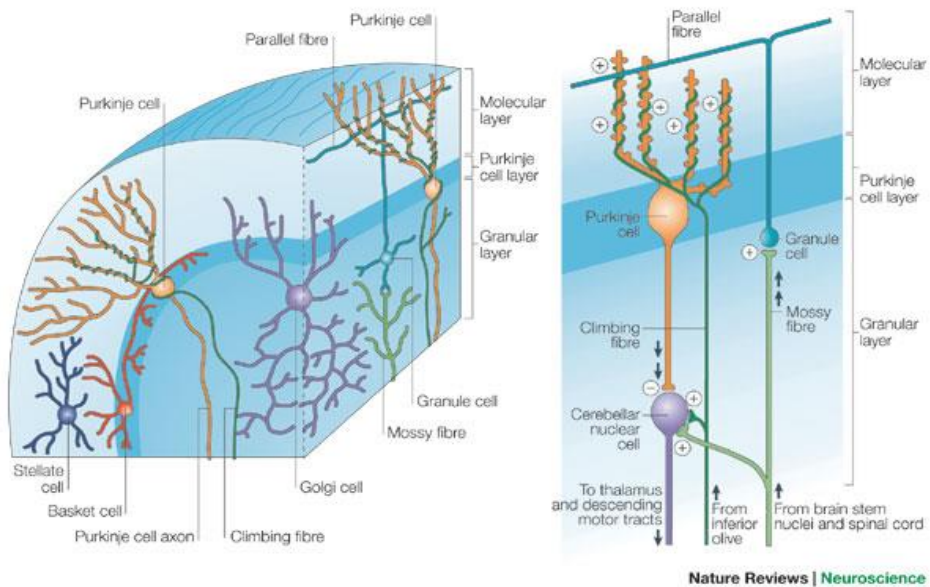
I nuclei delle cellule di Purkinje formano un strato ordinato, interposto tra quello granulare e quello molecolare, ed i loro alberi dendritici si estendono nello strato molecolare sovrastante. I loro assoni stabiliscono connessioni inibitorie GABAergiche (Ito e Yoshida, 1964; Ito et al., 1964; 1970) con i nuclei cerebellari profondi e con i nuclei vestibolari (Brodal, 1981; Eccles et al., 1967). Tali cellule rappresentano le uniche efferenze della corteccia cerebellare e sono centrali per l'elaborazione di informazioni cerebellari, sia per la loro numerosità, che per la complessità delle interazioni con i neuroni con cui entrano in contatto.

Oltre alle fibre muscoidi, un'altro gruppo di fibre afferenti controlla l'attività delle cellule di Purkinje, tramite sinapsi dirette: le fibre rampicanti. Queste hanno origine dall'oliva inferiore, localizzata nella parte ventrale del tronco encefalico caudale, che ha il compito d'integrare gli stimoli provenienti dai propriocettori muscolari (Armstrong, 1974, 1990). Ogni cellula del Purkinje riceve informazioni da una sola fibra rampicante, ma il contatto è molto forte, tanto da generare una esplosione di impulsi altamente caratteristica nota come "spike complesso" (Thach, 1967). Tali fenomeni si differenziano chiaramente dagli "spike semplici" in quanto si verificano con una frequenza molto più bassa, ovvero circa 1 al secondo (Harvey et al., 1977; Thach, 1972).

Una caratteristica fisiologica peculiare delle cellule di Purkinje è la loro alta frequenza di scarica in condizione basale (Thach, 1970; 1972).

Le fibre muscoidi e le fibre rampicanti hanno la funzione di modulare la scarica inibitoria di tali neuroni sui nuclei cerebellari profondi, dai quali dipende l'attivazione di altri distretti nervosi extracerebellari ai quali sono dirette le informazioni in uscita dal cervelletto.

Infine, è importante sottolineare come l'attività delle fibre muscoidi e delle fibre rampicanti venga modulata da stimoli sensoriali o dall'esecuzione di movimenti. I neuroni di origine delle fibre muscoidi ed i granuli scaricano spontaneamente ad alta frequenza, generando 50-100 potenziali d'azione al secondo nei neuroni del Purkinje. Allo stesso tempo, i neuroni del nucleo olivare inferiore, da cui originano le fibre rampicanti, scaricano spontaneamente a bassa frequenza e generano in media uno spike complesso al secondo, a livello delle cellule del Purkinje. Gli stimoli esterni possono provocare l'insorgenza di uno o due spike complessi che influenzano l'attività delle fibre muscoidi sui neuroni del Purkinje. Questi effetti modulatori vengono esercitati in due modi distinti. Le fibre rampicanti possono aumentare in via transitoria gli effetti esercitati dai segnali convogliati dalle fibre muscoidi sulle cellule di Purkinje (Marr, 1969) oppure possono provocare una Depressione a Lunga Durata (LTD) degli effetti esercitati da particolari afferenze di tipo muscoide per il tramite di azioni eterosinaptiche (Albus, 1971).



**Figura 1.2.** Organizzazione citoarchitettica della corteccia cerebellare (da Apps e Garwicz, 2005).

### **1.3. I micro-complessi cortico-nucleari.**

Una delle caratteristiche fondamentali del cervelletto è la sua organizzazione modulare. Infatti, l'organizzazione semplice ed omogenea delle cellule della corteccia cerebellare si ripete in modo regolare per tutta la sua superficie.

Nella corteccia cerebellare è possibile distinguere singole microzone (Oscarsson, 1976). Ogni microzona è connessa con un'insieme di differenti strutture che includono i nuclei cerebellari e vestibolari, l'oliva inferiore e nelle porzioni filogeneticamente più nuove il nucleo rosso parvi cellulare (Figura 1.3).

Ito ha definito tali moduli come microcomplessi cortico-nucleari, ovvero l'unità funzionale principale del cervelletto (Ito, 2001). Questi moduli sono simili nella loro circuitazione interna, ma differiscono per quanto riguarda le aree di connessione (Ito, 1984).

Nel cervelletto adulto è possibile distinguere sette zone parallele longitudinali, date dall'insieme di microzone adiacenti, che si estendono lateralmente in ciascun emisfero cerebellare (A, B, C1, C2, C3, D1, D2) (figura 1.4A) (Voogd et al., 1987). Ciascuna zona riceve afferenze dalle fibre rampicanti provenienti da specifiche porzioni dell'oliva inferiore (figura 1.4C) e proietta attraverso gli assoni delle cellule di Purkinje ad una particolare porzione dei nuclei cerebellari o vestibolari (figura 1.4B). Due zone, A e B, sono localizzate nel verme. La zona A proietta al nucleo del fastigio, la zona B al nucleo vestibolare laterale di Deiters. Negli emisferi sono presenti 5 zone: C1-3, D1 e D2. C1 e C3 proiettano entrambe al nucleo emboliforme, C2 al nucleo globoso, mentre, D1 e D2 proiettano rispettivamente alla porzione caudale e rostrale del nucleo dentato.

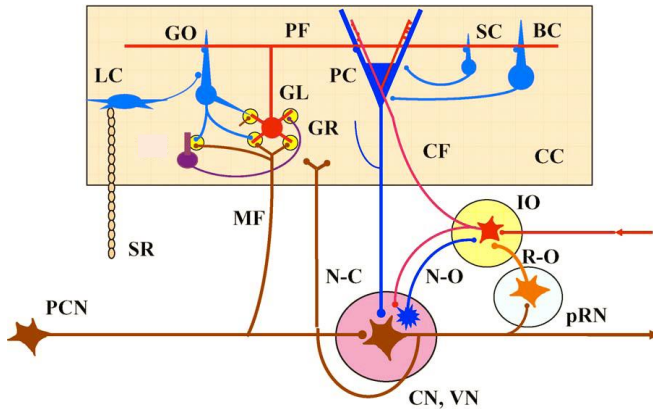
Le porzioni rostrale e caudale dell'oliva inferiore controlaterale sono connesse rispettivamente con la parte laterale (zona paravermiana ed emisfero cerebellare) e mediale (verme) della corteccia cerebellare.



Le cellule dell'oliva inferiore inviano una singola fibra rampicante a ciascuna delle diverse cellule di Purkinje per tutta la lunghezza di una singola zona della corteccia cerebellare (Sugihara et al., 2001) determinando importanti implicazioni funzionali. Infatti è stato dimostrato come una lesione a livello delle fibre rampicanti, provoca disturbi motori simili a quelli che insorgono dopo un danno al cervelletto stesso (Wilson e Magoun, 1945; Murphy e O'Leary, 1971; Llinas et al., 1975).

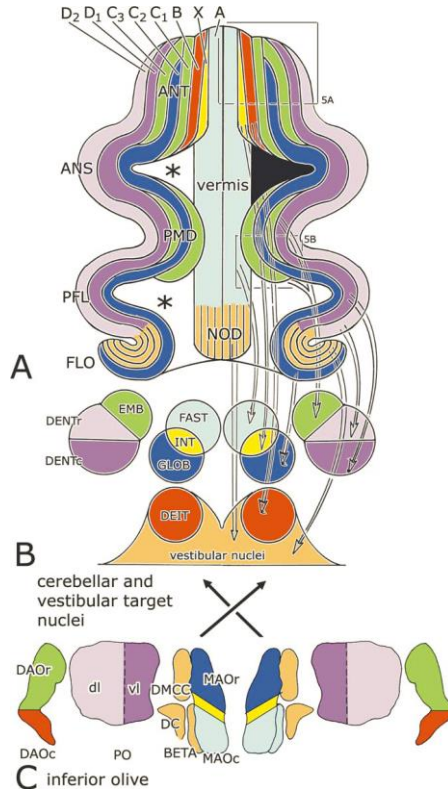
Sulla base di questi dati anatomici è possibile affermare che la specificità funzionale dei singoli moduli cerebellari non è data da differenze nei circuiti intracerebellari, ma dalla specificità delle connessioni afferenti ed efferenti di tali moduli con specifiche aree del sistema nervoso centrale (Ramnani, 2006).

Inoltre, grazie a questa rigida struttura il cervelletto è in grado di elaborare segnali in rapidissima successione, garantendo la messa in atto di movimenti rapidi e perfettamente coordinati e svolgendo un'attività modulatrice sulle strutture cerebrali con cui è in contatto.



**Figura 1.3.** Diagramma del micro-complesso corticonucleare cerebellare.

BC: cellule a canestro; CC: microzone cerebellari corticali; CF: fibre rampicanti; CN,: nucleo cerebellare; GR: granuli; GL: glomeruli; GO: cellule di Golgi; IO: Oliva inferiore; LC: Cellule di Lugaro; MF: fibre rampicanti; N-C: proiezioni nucleo-corticali delle fibre rampicanti; N-O: proiezioni inibitorie nucleo olivari; PC: cellule di Purkinje; PCN: neuroni pre-cerebellari; PF: fibre parallele; pRN: nucleo rosso parvi cellulare; R-O: proiezioni eccitatorie rubro-olivari; SC: cellule stellate; SR: fibre serotoninergiche; VN: nucleo vestibolare.



**Figura 1.4.** Diagramma dell'organizzazione in zone nelle proiezioni corticonucleari e olivocerebellari nel gatto. A) Diagramma della corteccia cerebellare. B) Diagramma dei nuclei cerebellari e vestibolari. C) Diagramma di una proiezione dell'oliva inferiore della scimmia sul piano orizzontale. Le diverse zone sono indicate con la lettera maiuscola (A, X, B, C1-3, D1,D2). Le zone e le aree di proiezione sono rappresentate con lo stesso colore. DAOC: olive dorso-caudale; DAOr: olive dorso- rostrale; DEIT: nucleo vestibolare laterale di Deiters; DENTc: nucleo dentato caudale; DENTr: nucleo dentato rostrale; dl: lamina dorsale dell'oliva; EMB: nucleo emboli forme; FAST: nucleo fastigio; FLO: flocculo; GLOB: nucleo globoso; MAOr: oliva rostro-mediale; MAOc: oliva caudo-mediale; PFL: paraflocculo; PFl: paraflocculo dorsale; PMD: lobo paramediano; PO: nucleo principale dell'oliva inferiore; vl: oliva ventrale (da Voogd et al., 1987).

#### **1.4. I circuiti cerebro-cerebello-corticali.**

Dai nuclei cerebellari profondi hanno origine proiezioni discendenti verso il tronco dell'encefalo ed il midollo spinale e proiezioni ascendenti, che attraverso il talamo, giungono a differenti aree della corteccia cerebrale (Brooks e Thach, 1981; Ito, 1984). La porzione vermiciana del cervelletto proietta, attraverso i nuclei del fastigio, ai nuclei vestibolari (controllando la via vestibolo spinale), alla formazione reticolare del tronco dell'encefalo (Haines e Dietrichs, 1987) e rostralmente, attraverso il talamo, alla corteccia motoria (area 4 di Brodman). Le aree intermedie degli emisferi cerebellari, attraverso il nucleo interposito, proiettano al nucleo rosso (controllando la via rubro-spinale) e rostralmente, attraverso il talamo, all'area 4 e all'area 6 (area motoria supplementare) della corteccia cerebrale.

Le aree laterali degli emisferi cerebellari proiettano al nucleo dentato che, attraverso il talamo, è connesso con le aree motorie e premotorie della corteccia cerebrale, implicate nella pianificazione dei movimenti volontari, e con le aree parietali.

Infine, il lobo flocculonodulare proietta direttamente ai nuclei vestibolari e riceve afferenze da essi. Il cervelletto a sua volta riceve afferenze da diverse aree corticali (Brodal, 1981; Ito, 1984). La corteccia parietale e prefrontale inviano afferenze al nucleo rosso, che invia alcune proiezioni ai nuclei dell'oliva inferiore, che a loro volta proiettano al cervelletto (Leiner et al., 1989; Massion, 1988). Attraverso le vie cortico-ponto-cerebellari il cervelletto riceve informazioni visive, uditive, e somatosensoriali dalle aree posteriori dell'encefalo e informazioni motorie dai lobi frontali. Riceve, inoltre, afferenze dalle cortecce associative che contribuiscono a funzioni complesse (Schmahmann, 1991) e proietta ad esse attraverso il nucleo ventrolaterale del talamo. Questo circuito a feedback permette alle informazioni in arrivo dalle cortecce associative di essere modificate nel cervelletto e rispedito al tronco dell'encefalo, al talamo e alla corteccia.

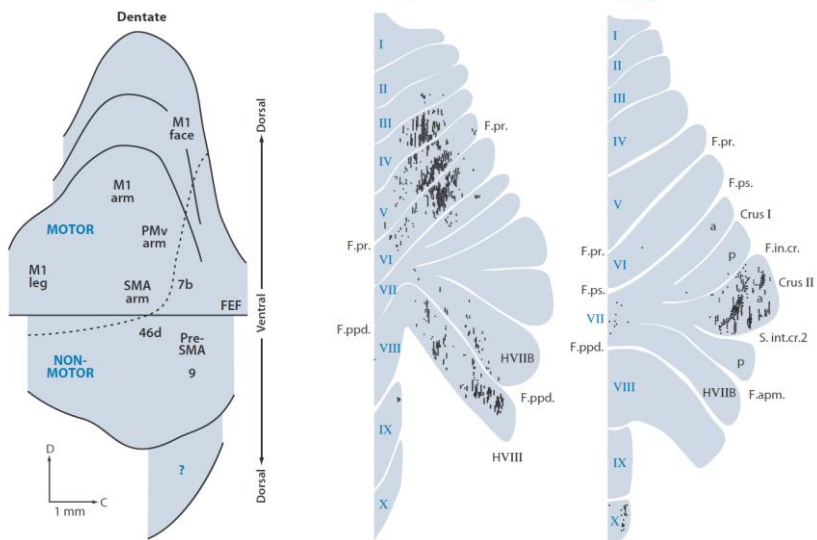
Oltre a queste proiezioni, il cervelletto riceve afferenze dai sistemi noradrenergici del locus coeruleus e dai sistemi serotoninergici dei nuclei del rafe. Queste connessioni potrebbero avere un ruolo nella regolazione dell'attività neuronale in funzione dello stato di sonno o di veglia (Dow et al., 1991).

Infine, il cervelletto possiede connessioni reciproche con le strutture del lobo limbico (Glickstein et al., 1985), con l'ipotalamo e i corpi mammillari (Aas e Brodal, 1988) che si suppone abbiano importanza per quanto riguarda il suo ruolo nella regolazione del comportamento emozionale.

Middleton e Strick (1994, 1996a,b), utilizzando il virus herpes simplex di tipo 1 (HSV1) come tracciante transneurone retrogrado, hanno evidenziato l'esistenza di specifici circuiti segregati e paralleli che connettono specifiche aree della corteccia cerebellare, attraverso specifiche porzioni dei nuclei talamici, non solo con le aree motorie, ma anche con aree coinvolte nel processamento di informazioni non motorie, incluse le aree frontali, prefrontali e parietali posteriori. Tali autori hanno dimostrato (Dum e Strick, 2003; Strick et al., 2009) come, nei primati, le informazioni che arrivano alle aree prefrontali e parietali posteriori della corteccia cerebrale, hanno origine dalle regioni ventrali e caudali del nucleo dentato, mentre le informazioni che afferiscono alle aree motorie della corteccia (M1) hanno origine dalla porzione dorsale del dentato. In tal modo, il nucleo dentato appare essere spazialmente suddiviso in domini motori e non motori che convergono funzionalmente su distinti sistemi corticali (figura 1.5A). La distinzione nei centri di elaborazione delle informazioni motorie e non motorie, identificata a livello del nucleo dentato, si ritrova anche a livello della corteccia cerebellare. Kelly e Strick (2003), infatti, utilizzando il virus HSV1 come tracciante neuronale, hanno identificato i siti di ricezione delle informazioni provenienti da M1 e dall'area 46a a livello dei granuli della corteccia cerebellare, localizzati rispettivamente nei lobuli IV-VI, HVIIB, HVIII e Crus II (Figura 1.5B). Per cui sembra evidente che ogni area della corteccia cerebrale

comunica con regioni distinte della corteccia cerebellare, che a loro volta inviano informazioni alle stesse aree corticali attraverso i nuclei pontini (Kelly e Strick, 2003).

La conoscenza delle connessioni tra la corteccia cerebrale ed il cervelletto assume rilevanza per comprendere il ruolo del cervelletto nel processamento di informazioni appartenenti a diversi domini funzionali (Stoodley e Schmahmann, 2009).



**Figure 1.5.** A) Mappa topografica del nucleo dentato. Le sigle sulla mappa indicano le aree di proiezione a livello corticale nei primati. Nel nucleo dentato è possibile distinguere chiaramente porzioni coinvolte nei domini motori e non motori.

FEF: frontal eye field; M1: area motoria primaria; PMv: area premotoria ventrale; Pre-SMA: area presupplementare motoria; SMA: area supplementare motoria.

B) Regioni della corteccia cerebellare che proiettano alle aree della corteccia cerebrale. I punti neri sulla mappa della corteccia cerebellare indicano la localizzazione delle cellule di Purkinje che proiettano ad M1 (pannello a sinistra) o all'area 46 (pannello a destra) nei primati. La nomenclatura è in accordo con quella di Larsell (1970). (da Strick e Dum, 2009)

### **1.5. Ipotesi sui modelli d'interazione cerebello-corticale: dalla modulazione delle funzioni motorie alla modulazione delle funzioni cognitive.**

E' noto da tempo che il cervelletto ha un ruolo centrale nel processamento delle funzioni motorie (Eccles, 1967; Ito, 1982; 1984; Stein e Glickstein, 1992).

Negli anni, i risultati di studi sperimentali effettuati sugli animali (Rolando, 1809; Flourens, 1824; Luciani, 1891) e sull'uomo (Babinski, 1899, Holmes, 1939) hanno permesso di evidenziare che il cervelletto non genera, né modifica direttamente l'atto motorio volontario, ma ne controlla l'organizzazione globale.

Più in particolare, esso coordina e armonizza le prestazioni delle strutture nervose coinvolte nella pianificazione e nell'esecuzione del movimento, ottimizzandone il prodotto finale. A livello comportamentale, l'azione cerebellare rende possibile l'esecuzione di movimenti fluidi, armonici, precisi ed appropriati alle caratteristiche del contesto in cui vengono eseguiti.

In presenza di un danno cerebellare, quindi, non si avrà la perdita della capacità di compiere i movimenti, ma errori di pianificazione e di esecuzione, che comprometteranno la coordinazione motoria.

Diversi modelli teorici sono stati proposti per spiegare il contributo del cervelletto nel controllo motorio (Miall et al., 1993). Uno dei più noti e accettati è quello che assegna al cervelletto il ruolo di "organo comparatore" (Eccles, 1967; Ito, 1982, 1984, 2008).

Il cervelletto, infatti, confronta le informazioni relative al piano motorio da eseguire (afferenti dal network cortico-pontino) con quelle sensoriali (provenienti dalla periferia) che definiscono le caratteristiche dell'atto motorio in corso di esecuzione (direzione, velocità, traiettoria, forza). Il suo compito è quello di verificare che il piano motorio da eseguire sia compatibile con le informazioni provenienti dalla periferia, così da intervenire qualora insorgano delle discrepanze tra la programmazione e l'esecuzione del movimento. In questo caso il cervelletto effettua un'operazione di correzione degli errori e l'invio di tali modifiche alle strutture



(corteccia motoria o parti del corpo) deputate al corretto svolgimento dell'atto motorio.

Il cervelletto compie questa operazione, sia tramite un sistema di controllo a feedback esterno (Figura 1.6a), basato sugli stimoli sensoriali e propriocettivi provenienti dalla periferia, sia tramite un circuito "feedforward" (Figura 1.6b), basato su un sistema di controllo "anticipatorio".

Il sistema di controllo a feedback ha dei limiti, dati dal fatto che le informazioni provenienti dalla periferia possono essere utilizzate per correggere il movimento solo dopo che questo è stato effettuato e non in corso d'opera.

Il sistema di controllo "feedforward", invece, permette di avere una stima delle conseguenze ideali dell'azione, garantendo la messa in atto di movimenti più accurati e veloci.

Il modo per ottenere questi segnali "predittivi" è basato sulla formazione di "modelli interni" del movimento, che permettono una stima accurata delle conseguenze dei comandi motori che arrivano dalla corteccia (Ito, 1970; 1984).

Attraverso questo sistema di controllo, tali segnali sono stimati in maniera continua e controllano la risposta durante la sua esecuzione.

I modelli interni sono rappresentazioni neurali acquisite durante l'apprendimento che mimano processi naturali come i movimenti del corpo (Wolpert e Miall 1996). Attraverso l'apprendimento esperienziale, questi codificano e rifiniscono continuamente le relazioni tra le informazioni, in entrata ed in uscita, relative ai comandi motori ed alle loro conseguenze.

Tale modello teorico permette di integrare le nostre conoscenze sui micro-circuiti cerebellari (Albus, 1971; Marr, 1969; Ito, 1993), con l'ampia connettività tra cervelletto e corteccia cerebrale (Allen e Tsukahara, 1974), e può essere applicato per spiegare il processamento di differenti tipi di informazione.

E' noto ormai che le operazioni relative al movimento occupano solo una piccola porzione della corteccia cerebellare.

L'omogeneità della citoarchitettura cerebellare suggerisce che molte altre aree della corteccia cerebellare acquisiscono ed immagazzinano alcuni tipi di modelli forward che non sono in relazione con il processamento delle informazioni nelle aree corticali motorie.

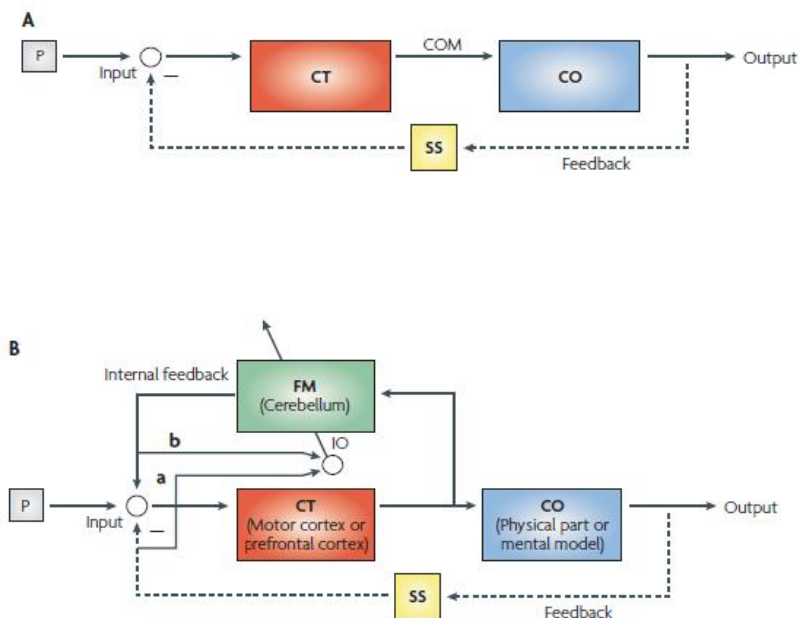
M. Ito (1993) è stato uno dei primi neuroscienziati ad avanzare delle ipotesi sul ruolo svolto dai circuiti cerebellari nella modulazione dei processi cognitivi.

Tale autore ha ipotizzato, sempre facendo riferimento alla teoria dei "Modelli Interni", (Ito, 1990, 1993) che il cervelletto partecipi alla regolazione delle funzioni cognitivo-emozionali mediante un'azione di controllo esercitata sull'attività svolta da aree cerebrali (fronto-temporo-parietali) direttamente implicate nel processamento delle funzioni superiori. L'azione cerebellare sarebbe espletata attraverso la modulazione di rappresentazioni mentali ("modelli interni") degli eventi esterni.

Ito (2008) sostiene che il 'modello mentale', pur essendo un concetto psicologico, trova una controparte oggettiva a livello cerebrale, poiché è il prodotto dell'azione svolta da circuiti neurali cerebrali. Il network implicato nella modulazione dell'attività di pensiero include aree corticali (frontali, temporali e parietali) e sottocorticali (emisferi cerebellari). Alle regioni prefrontali spetta il compito di mettere in relazione le informazioni ricevute da altre aree della corteccia cerebrale, per elaborare i processi decisionali e dar luogo ad un'attività di pensiero cosciente. La corteccia temporo-parietale, invece, integra le informazioni (somato-sensoriali, verbali) ricevute dalle regioni confinanti per creare una rappresentazione mentale (modello mentale) della realtà esterna.

Questo processo è necessario per attribuire un senso logico agli eventi presenti ed anticipare quelli futuri. Eventuali modifiche apportate ai modelli mentali si riflettono in cambiamenti di pensiero riguardanti fatti, persone, cose, luoghi con cui il soggetto

viene a contatto quotidianamente. L'attività delle aree temporo-parietali ha inizio in seguito all'impulso nervoso ricevuto dalla corteccia prefrontale. Gli emisferi cerebellari svolgono un processo di controllo sull'operato svolto dalle regioni fronto-temporo-parietali, per rilevare la presenza di eventuali discrepanze tra la rappresentazione interna della realtà (modelli mentali) e la realtà oggettiva. Questa operazione viene messa in atto dai microcomplessi cerebellari e consiste in un continuo aggiornamento di 'copie' dei modelli mentali immagazzinati nelle regioni temporo-parietali. I cambiamenti vengono poi comunicati alle aree frontali o direttamente a quelle temporo-parietali al fine di modificare il modello mentale relativo ad una data situazione ambientale.



**Figura 1.6. a)** Sistema di controllo a feedback esterno: il circuito consiste di un controllore (CT) che manipola l'oggetto controllato (CO), un istruttore (P) che fornisce le istruzioni al controllore e il sistema sensoriale (SS) che media il feedback (linea tratteggiata) al controllore. **b)** Sistema di controllo a “feedforward”. Il cervelletto riceve informazioni sul piano motorio dalla corteccia motoria (CT) e forma un modello interno (FM) del piano di movimento, attraverso il quale è in grado di rilevare le incongruenze tra il movimento programmato e quello eseguito. I segnali di errore derivano dal confronto tra le informazioni che giungono dalla periferia (SS) e quelle del suo modello interno.

## Capitolo II

### **Strumenti per l'indagine morfologica e neurofisiologica applicati al cervello umano.**

#### **2.1. Studio anatomico delle lesioni cerebrali nell'uomo.**

Gli studi di lesione possono fornire informazioni convergenti utili sulle aree che collaborano alle diverse funzioni cerebrali. Un tradizionale punto debole degli studi di lesione riguarda la possibilità sia di delimitare esattamente in vivo le zone anatomiche interessate dal danno sia la raccolta dei dati in modo da renderli comparabili (Timmann et al., 2009). La possibilità di ottenere immagini di risonanza magnetica ad alta risoluzione e l'implementazione di metodiche di neuroimaging, sempre più sofisticate ed automatizzate, ha permesso di ottenere dati anatomici sempre più dettagliati.

#### **2.1.1. Immagini di risonanza magnetica nucleare tridimensionali e ad alta risoluzione.**

La Risonanza Magnetica per Immagini (MRI), a partire dai primi anni Ottanta, è diventata un indispensabile strumento diagnostico.

Un limite ben conosciuto della MRI è la possibile presenza di artefatti che possono significativamente alterare l'immagine, rendendo difficoltoso o erraneo il processo di identificazione delle diverse strutture. Gli artefatti in MRI sono molto spesso causati da disomogeneità nel campo magnetico e dai movimenti fisiologici del soggetto durante la scansione. Le analisi di "encoding" spaziale nella risonanza magnetica, così come l'esperienza pratica, indicano chiaramente che questi artefatti dovuti al movimento possono essere ridotti da una riduzione del tempo di scansione; non a caso il bisogno di ridurre gli artefatti dovuti al movimento è uno dei principali fattori che

hanno indotto lo sviluppo delle tecniche rapide di risonanza magnetica. Una riduzione del tempo di scansione della MRI è comunemente ottenuta usando diversi approcci. Uno di questi consiste nel ridurre il tempo necessario per riordinare i segnali RMN (Risonanza Magnetica Nucleare) richiesti per la ricostruzione dell'immagine. Ciò può essere ottenuto usando un numero di tecniche sviluppate di recente come il "gradient-echo imaging" con tempi brevi di ripetizione (Haase et al., 1986; Haase et al., 1990), l'"echo-planar imaging" (Mansfield, 1977; Mansfield e Pykett, 1978) e la "fast spin-echo imaging" (Henning et al., 1986).

Tra le tecniche di "gradient-echo imaging" abbiamo la tecnica di "Magnetization Prepared Rapid Acquisition Gradient-Echo" (MP-RAGE), in cui uno o più impulsi vengono applicati prima della sequenza di acquisizione per aumentare il contrasto (Mugler III e Brookeman, 1990). Il protocollo 3D-MPRAGE permette di ottenere immagini assiali con uno spessore di sezione di 1.5 mm, offrendo un'eccellente risoluzione spaziale.

### **2.1.2. Processo di normalizzazione delle immagini di risonanza magnetica nucleare.**

L'accurata localizzazione di una lesione e la possibilità di confrontare lesioni di diversi soggetti sono requisiti fondamentali per poter effettuare delle inferenze anatomo-funzionali sulle aree cerebrali. I protocolli di studio di neuroimaging abitualmente coinvolgono diversi soggetti che avranno tutti la stessa anatomia complessiva, ma mostreranno alcune differenze nella dimensione del cervello, nella topografia delle circonvoluzioni e dei solchi della corteccia cerebrale, e differenze morfologiche in strutture profonde come il corpo calloso.

Per effettuare un confronto tra soggetti, le immagini in 3D di ogni cervello vengono trasformate in modo che le strutture superficiali rimangano allineate, un processo noto come *normalizzazione spaziale*.

Attualmente la presenza di scansioni MRI ad alta risoluzione e l'implementazione di software per il processamento automatizzato di tali immagini, ha permesso di mettere a punto metodiche volte alla normalizzazione spaziale automatizzata delle immagini stesse. Tale processo interattivo permette di riportare l'immagine del cervello di un singolo individuo (source) in uno spazio stereotassico standard, rendendola sovrapponibile ad una immagine standard del cervello (template). Un template ideale è costituito dalla media di un grande numero di immagini di risonanza magnetica che vengono registrati nello stesso spazio stereotassico.

Per indicare la localizzazione nello spazio normalizzato è possibile utilizzare un sistema di coordinate, come ad esempio le coordinate di Talairach-Tournoux (Talairach e Tournoux, 1988). Tali coordinate vengono misurate prendendo come punto di repere la commessura anteriore (AC). Questo sistema di coordinate fa riferimento a tre assi: l'asse X, che va da sinistra a destra di AC; l'asse Y, che si estende postero-anteriormente ad AC; e l'asse Z, che si estende dal basso verso l'alto rispetto ad AC. Tutti gli assi passano attraverso la commessura anteriore che ha coordinate  $X=0$ ,  $Y=0$  e  $Z=0$ . Ciascun punto nel cervello può essere identificato dalle sue coordinate in millimetri relative agli assi X, Y, Z.

Vi sono diversi pacchetti di software per la normalizzazione che usano algoritmi simili basati sull'intensità dell'immagine, come AIR (Wood et al., 1992), MNI\_AutoReg/ANIMAL (Collins et al., 1994) e SPM2 (Ashburner e Friston, 1999; Friston et al., 1995). Quest'ultimo verrà utilizzato nello studio sperimentale.

In SPM2 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) le immagini vengono normalizzate facendo riferimento ad un template sviluppato dal Montreal Neurological Institute e successivamente adottato dal Consortium of Brain Mapping (ICBM) (Evans et al., 1994). Il software effettua delle trasformazioni lineari (traslazione e rotazione) e non lineari (riduzione ad una scala comune e "ripiegatura non-lineare" - "nonlinear warping" - della superficie del

cervello) sulle immagini dell'encefalo di ciascun soggetto, in modo da renderle sovrapponibili al template, pur mantenendo le caratteristiche proprie del cervello originale, ovvero la concentrazione locale o il volume di sostanza grigia e di sostanza bianca (Ashburner e Friston, 1997; 1999).

### **2.1.3. Normalizzazione in presenza di lesioni cerebrali focali.**

Un problema che si presenta quando vengono normalizzate immagini di soggetti con danno cerebrale è che la diversa intensità della lesione può inficiare la normalizzazione (Rorden e Brett, 2000). Ciò è ancora più evidente nel momento in cui si vuole studiare una particolare struttura cerebrale come il cervelletto, date le sue dimensioni ridotte rispetto al resto dell'encefalo.

Brett e collaboratori (2001) hanno sviluppato una particolare procedura che permette un'accurata normalizzazione delle scansioni ottenute su cervelli lesionati. Essi hanno descritto una semplice tecnica per creare una maschera della lesione, in modo che il segnale inusuale proveniente dalla lesione non influenzi il calcolo dei parametri da utilizzare per la trasformazione spaziale.

Per delimitare la lesione e creare la maschera grezza può essere utilizzato un particolare software, MRICro (<http://www.cla.sc.edu/psyc/rorden/micro.html>). Tale software permette di visualizzare le sezioni del cervello e di disegnare pixel-to-pixel la regione d'interesse (ROI), ad esempio una lesione, su ciascuna sezione iniziando dal piano sagittale (un pixel corrisponde ad 1 mm<sup>2</sup>). La ROI così identificata su un piano viene automaticamente disegnata dal programma anche sugli altri due piani.

L'area d'interesse creata può essere salvata in diversi formati (permettendo l'utilizzo in un secondo momento) e può essere utilizzata per creare una maschera della lesione da utilizzare nella normalizzazione con SPM2.



Inoltre, MRIcro permette di calcolare il volume della ROI e confrontare le regioni d'interesse relative alle immagini normalizzate di diversi individui, valutando le aree comuni di danno.

## **2.2. Analisi morfometrica della corteccia cerebrale: la voxel based morphometry.**

Negli ultimi anni sono state sviluppate differenti tecniche per caratterizzare le differenze neuroanatomiche in vivo nell'uomo, utilizzando immagini di risonanza magnetica strutturale. Alcune di queste tecniche permettono di identificare differenze macroscopiche nell'intero cervello, mentre altre permettono di esaminare le differenze a livello della composizione dei tessuti cerebrali. Queste ultime permettono di confrontare i diversi cervelli voxel per voxel dopo che le immagini sono state normalizzate spazialmente (Wright et al., 1995). Una di queste metodiche è nota come Morfometria basata sui voxel (Voxel-based Morphometry - VBM), un approccio molto sensibile alle differenze locali nella sostanza grigia o nella sostanza bianca.

Lo scopo della VBM è di identificare le differenze nella composizione locale del tessuto cerebrale di differenti soggetti, riducendo le differenze su larga scala nell'anatomia macroscopica e nella posizione. Per fare ciò le immagini di risonanza magnetica di ciascun soggetto vengono sottoposte ad una serie di trasformazioni e ad un'analisi statistica. L'output sarà una mappa statistica parametrica, che mostra quelle regioni dove la sostanza grigia o la sostanza bianca differiscono significativamente tra i gruppi.

Vi sono differenti approcci per effettuare il processamento delle immagini (Davatzikos et al., 2001). Qui di seguito descriverò il metodo che solitamente viene utilizzato dal software SPM2 (Ashburner e Friston, 2000).

Prima di poter eseguire qualsiasi confronto statistico, le immagini fornite dallo scanner necessitano di un pre-processamento per rimuovere il "rumore elettronico" o

correggere eventuali errori di campionamento. Per minimizzare l'effetto del movimento della testa tra successive scansioni, le immagini vengono modificate elettronicamente con algoritmi specifici, in modo che i voxel nelle immagini corrispondano alla stessa localizzazione esatta nel cervello. Questo processo viene denominato 'realignment' (ri-allineamento).

Successivamente viene effettuata una normalizzazione spaziale delle immagini strutturali (vedi paragrafo 2.1.2).

Le immagini normalizzate vengono segmentate in sostanza grigia, sostanza bianca e liquido cerebrospinale. Ciò viene fatto combinando una mappa probabilistica a priori o "Bayesian priors", con i dati relativi alla distribuzione spaziale dei differenti tessuti nei soggetti normali, attraverso un modello misto di analisi dei clusters che identifica le distribuzioni d'intensità dei voxel di un particolare tipo di tessuto.

Le immagini segmentate di sostanza grigia e di sostanza bianca vengono sottoposte ad una procedura matematica nota come "smoothing" (ammorbidimento), che consiste nell'eseguire una media ("averaging") dei voxel vicini, utilizzando un filtro a curva gaussiana (in genere 12-mm FWHM kernel), per rendere i dati meno soggetti ad artefatto da variabilità di campionatura ("noise").

Nelle maggior parte dei casi le analisi statistiche devono essere effettuate sulle mappe di sostanza grigia o sostanza bianca separatamente, per tali ragioni si utilizza un protocollo di pre-processamento ottimizzato (Good et al., 2001), in cui i parametri per la normalizzazione vengono calcolati sulle mappe di sostanza grigia e di sostanza bianca e non sul cervello in toto (figura 2.1).

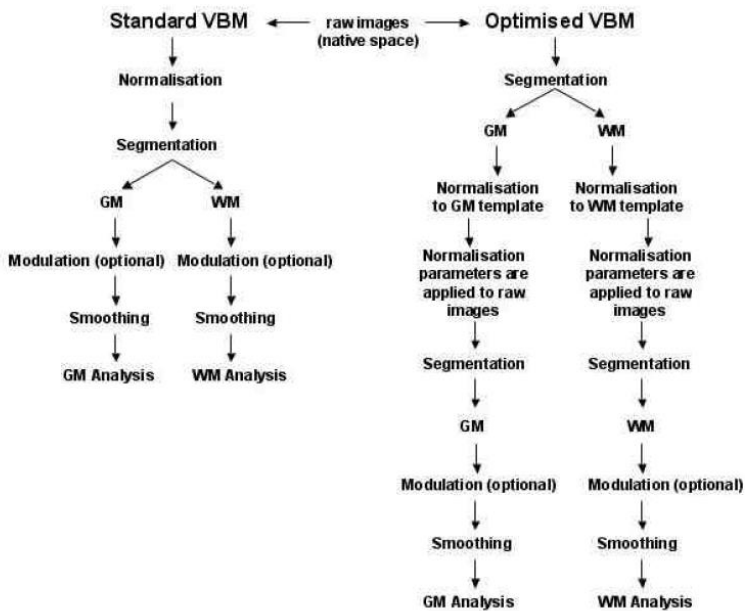
Dopo aver processato le immagini è possibile effettuare l'analisi statistica basata sui voxel. Questa impiega il 'general linear model' (GLM), un modello flessibile che permette di effettuare una varietà di differenti test statistici, come il confronto tra gruppi e le correlazioni con covariate d'interesse.

Il risultati di tali procedure sono delle mappe statistiche parametriche della quantità di sostanza grigia o di sostanza bianca (Friston et al., 1995b).

Dato che una mappa statistica parametrica comprende i risultati di diversi test statistici, è necessario correggere per confronti multipli quando si assegna la significatività ad un effetto in uno qualsiasi dei voxel. Quindi solitamente viene applicata una correzione per confronti multipli dipendenti (Friston et al., 1995c; Worsley et al., 1996).

Questa tecnica è stata già utilizzata con successo per indagare cambiamenti strutturali in disturbi neurologici (Thieben et al., 2002; Karas et al., 2004; Keller et al., 2004; Price et al., 2004; Bozzali et al., 2006; Di Paola et al., 2007) e psichiatrici (Kubicki et al., 2002; Boddaert et al., 2004; Lyoo et al., 2004; Spencer et al., 2007; Yamada et al., 2007). Inoltre, è stata utilizzata nello studio di soggetti sani, in cui è stata evidenziata una modificazione delle strutture cerebrali in seguito a processi di apprendimento ed alla pratica (Maguire et al., 2003; Gaser e Schlaug, 2003; Draganski et al., 2004; Mechelli et al., 2004). Questi studi sono stati motivati dai risultati relativi ai cambiamenti strutturali correlati all'esperienza presenti nei cervelli di piccoli mammiferi (Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002; Lee et al., 1998)

Gli studi di VBM su soggetti sani hanno quindi contribuito a sfidare la concezione tradizionale che l'acquisizione di nuove competenze provoca un cambiamento nella funzionalità cerebrale, mostrando cambiamenti strutturali a livello macroscopico.



**Figura 2.1.** Diagramma di flusso delle fasi di processamento standard (a sinistra) e ottimizzato (a destra) con la VBM. GM = immagini di sostanza grigia; WM = immagini di sostanza bianca.

### **2.3. Metodiche di stimolazione cerebrale non invasive nell'uomo.**

Negli ultimi anni lo studio della funzionalità cerebrale è stato agevolato dall'ampia diffusione di tecniche di stimolazione transcranica elettrica o magnetica, in grado di determinare effetti duraturi sulle funzioni cerebrali mediante l'induzione di fenomeni di neuroplasticità (Wassermann et al. 2008). Lo studio comportamentale di tali effetti permette di comprendere meglio anche le modalità d'interazione di strutture appartenenti a specifici network cerebrali.

#### **2.3.1. Stimolazione transcranica con corrente continua (tDCS).**

La polarizzazione della corteccia cerebrale mediante stimolazione con corrente continua (DCS, direct current stimulation) è stata inizialmente introdotta in studi animali intorno al 1950 (Terzuolo e Bullock, 1956; Creutzfeld et al., 1962; Eccles et al., 1962; Bindman et al., 1964; Purpura e McMurtry, 1965; Artola et al., 1990). In generale, tali studi hanno evidenziato che la polarizzazione positiva (stimolazione anodica) aumenta l'eccitabilità della corteccia cerebrale nel ratto e nel gatto, aumentando la frequenza di scarica neuronale spontanea e l'ampiezza dei potenziali evocati, mentre la polarizzazione negativa (stimolazione catodica) ne riduce l'eccitabilità. Tali effetti condizionanti della DCS sono stati attribuiti alle modificazioni del potenziale di membrana a riposo dei neuroni corticali (Purpura e McMurtry, 1965). Tuttavia, se la DCS viene applicata per un tempo uguale o superiore a 5 minuti può determinare modificazioni durature della frequenza media di scarica neuronale, che permangono fino ad alcune ore dopo l'interruzione dell'erogazione della corrente. Tali effetti a lungo termine non sono semplicemente legati a modificazioni prolungate del potenziale di membrana o ad un'eccitazione ricorrente, poiché non vengono aboliti dall'interruzione intermittente dell'attività elettrica cerebrale mediante ipotermia (Gartside, 1968a,b). Il potenziamento a lungo termine (LTP) e la depressione a lungo termine (LTD) dell'attività sinaptica sono

pertanto stati proposti per spiegare gli effetti della DCS (Hattori et al., 1990; Moriwaki, 1991; Islam et al., 1995; Malenka e Nicoll, 1999). Recentemente la DCS è stata reintrodotta per la stimolazione transcranica (tDCS, transcranial direct current stimulation) non invasiva della corteccia cerebrale nell'uomo (Nitsche e Paulus, 2000).

### **2.3.2. Parametri biofisici dell'applicazione della tDCS nell'uomo.**

La tDCS nell'uomo si basa sull'applicazione di una corrente elettrica di bassa intensità (1-2 mA) attraverso due elettrodi di superficie posizionati sullo scalpo. Tali elettrodi, inseriti all'interno di spugne imbevute di soluzione salina, hanno una dimensione che in genere non è inferiore a 5x5 cm. La tDCS, non sembra indurre direttamente una consistente depolarizzazione neuronale, bensì modulare l'attivazione dei canali del sodio e del calcio voltaggio-dipendenti e dei recettori NMDA.

In prima approssimazione, la densità di corrente nell'area cerebrale situata immediatamente al di sotto dell'elettrodo può essere calcolata attraverso il rapporto tra intensità della corrente erogata ( $I$ ) e area dell'elettrodo ( $A$ ), ovvero  $I/A$ . La carica totale erogata dipende invece dalla durata della stimolazione e la densità di carica può essere espressa mediante il rapporto tra carica totale erogata ( $C$ ) e area dell'elettrodo ( $A$ ), ovvero  $C/A$ . Sulla base di tale assunto, la riduzione dell'area dell'elettrodo rende la tDCS più focale, mentre l'aumento della stessa può renderla funzionalmente inefficace.

I suddetti parametri biofisici possono essere utilizzati per comparare l'efficacia di protocolli con differente intensità e durata di stimolazione (Nitsche et al., 2007). Inoltre è possibile, servendosi anche di informazioni ricavate da studi animali, stabilire dei parametri di stimolazione, in termini di intensità e durata della stessa, che consentano di utilizzare in sicurezza la tDCS nell'uomo: in un recente studio di "safety", Liebetanz e coll., (2009) hanno confermato, analizzando gli effetti lesionali

di differenti intensità di corrente e di carica nel cervello del ratto, che la soglia per la determinazione di un danno cerebrale macroscopico è di due ordini di grandezza maggiore rispetto ai parametri di stimolazione comunemente utilizzati nell'uomo (I = 1-2 mA; durata = 5-20 min; densità massima di carica = 100-1000 C/m<sup>2</sup>).

### **2.3.3. Applicazioni della tDCS sul cervello nell'uomo.**

Gli effetti della tDCS nell'uomo possono essere indagati combinando la tDCS con lo studio dell'eccitabilità corticale mediante TMS, con tecniche di neuroimmagini funzionali, oppure valutandone l'effetto a livello comportamentale.

Si è osservato che la tDCS, erogata mediante i due elettrodi posti rispettivamente sull'area motoria primaria (M1) e sul polo frontale controlaterale, induce modificazioni durature dell'eccitabilità corticospinale, rilevabili con la registrazione dei MEP ottenuti stimolando M1 mediante TMS. La direzione di tali modificazioni dipende dalla polarità della tDCS: l'eccitabilità aumenta se l'anodo viene posizionato su M1 e il catodo sul polo frontale (stimolazione anodica), mentre si riduce se gli elettrodi vengono posizionati in maniera inversa (stimolazione catodica) (Nitsche e Paulus, 2000; Lang et al., 2004a).

Analogamente a quanto osservato negli animali, questi cambiamenti dell'eccitabilità corticale persistono oltre il tempo della stimolazione se la tDCS viene erogata per più di 3 minuti (Nitsche e Paulus, 2000) e per almeno un'ora se la tDCS viene erogata per più di 10 minuti (Nitsche e Paulus, 2001; Nitsche et al., 2003a).

Gli effetti della tDCS sull'eccitabilità corticospinale sono modulati da farmaci che modificano l'eccitabilità della membrana neuronale e sono aboliti dal destrometorfano, antagonista del recettore NMDA (Liebetanz et al., 2002). Tali proprietà sono compatibili con l'ipotesi che gli effetti della tDCS siano mediati da fenomeni di plasticità sinaptica attivata-dipendenti, come la LTP e la LTD.

Vari studi condotti sull'uomo hanno, inoltre, valutato la possibilità di indurre modificazioni di tipo cognitivo mediante tDCS, indagando in particolar modo i processi di apprendimento e la memoria di lavoro. Questi studi si sono avvalsi principalmente della stimolazione della corteccia visiva (Antal et al., 2003; 2004), parietale (Matsunaga et al., 2004; Schweid et al., 2008; Sparing et al., 2009; Stone et al., 2009) e prefrontale (Kincses et al., 2004; Dockery et al., 2009; Merzagora et al., 2009; Fertonani et al., 2009).

Nitsche e collaboratori (2003b) hanno anche evidenziato una facilitazione dell'apprendimento motorio implicito in seguito a stimolazione di M1. Analogamente a quanto avvenuto negli ultimi anni per la stimolazione magnetica ripetitiva, anche la tDCS è oggetto di numerosi studi volti a valutarne le potenzialità terapeutiche in patologie neurologiche e psichiatriche (Fregni e Pascual-Leone, 2007). Sebbene ad oggi sia stato condotto un numero minore di studi clinici sulla tDCS rispetto alla rTMS, un elemento a favore della tDCS è rappresentato dal suo minor costo e maggiore facilità di somministrazione. La tDCS, infine, sembra avere enormi potenzialità, possibilmente in combinazione con le tradizionali tecniche neuroriabilitative, nel recupero dalla disabilità conseguente al danno ischemico cerebrale. Varie evidenze suggeriscono che, dopo un ictus, si instauri uno squilibrio di tipo maladattativo tra i due emisferi cerebrali: l'aumento dell'eccitabilità dell'emisfero sano, privato delle afferenze inibitorie transcallosali provenienti dall'emisfero leso, costituirebbe un ostacolo al recupero funzionale. Il rationale dell'uso della stimolazione cerebrale nell'ictus consiste quindi nell'indurre una facilitazione dell'attività neuronale nell'emisfero leso o un'inibizione nell'emisfero controlaterale (Hummel e Cohen, 2006).



# PROGETTO SPERIMENTALE

## **Introduzione al progetto sperimentale.**

Numerosi studi comportamentali effettuati sull'uomo hanno descritto selettive disfunzioni cognitive in presenza di lesioni cerebellari focali (Molinari et al., 1997, 2004; Schmahmann e Sherman, 1998; Leggio et al., 2000, 2008; Gottwald et al., 2004; Hokkanen et al., 2006). Questi dati hanno trovato supporto in indagini di risonanza magnetica funzionale (fMRI) in cui è stato dimostrato, in soggetti sani, l'attivazione del cervelletto insieme a specifiche aree della corteccia cerebrale durante l'esecuzione di compiti di tipo cognitivo (vedi riveiw Stoodley e Schmahmann, 2009). Come precedentemente accennato, dal punto di vista anatomico il cervelletto contiene più della metà dei neuroni dell'encefalo e presenta diverse connessioni con l'emisfero cerebrale controlaterale (Ramnani et al., 2006). Studi anatomici e comportamentali condotti su animali hanno evidenziato l'esistenza di specifiche connessioni crociate del cervelletto, non solo con le aree corticali motorie e premotorie, ma anche con le aree associative fronto-parieto-temporali, coinvolte nel controllo di funzioni superiori (Ito, 2006; Ramnani, 2006). La struttura regolare del cervelletto induce ad ipotizzare che la specificità funzionale dei diversi "canali cortico-cerebellari" sia data proprio dalla specificità delle connessioni afferenti ed efferenti con le diverse aree corticali (Middleton e Strick, 2001, Voogd, 2003).

E' noto, inoltre, che vi è una grande quantità di afferenze cerebellari rispetto alle efferenze (Carpenter, 1991). Questa osservazione anatomica suggerisce che il cervelletto si interfaccia con la corteccia cerebrale con un importante ruolo di integrazione funzionale (Gottwald et al., 2004).

Nonostante tali evidenze sperimentali, rimane ancora da chiarire come il cervelletto interagisce con le differenti regioni della corteccia cerebrale coinvolte nel controllo delle diverse funzioni cognitive.

L'obiettivo del progetto di ricerca che illustrerò nella sezione che segue è quello di indagare gli aspetti morfologici (Studio 1) e funzionali (Studio 2) delle interazioni cerebello-corticali, cercando di chiarire il ruolo di tali interazioni nella modulazione delle funzioni cognitive.

## Capitolo III

### **STUDIO 1: Indagine morfo-volumetrica della corteccia cerebrale in soggetti con lesione cerebellare focale, mediante Voxel Based Morphometry.**

#### **3.1. Razionale.**

I pazienti con una lesione cerebellare focale rappresentano un interessante modello per indagare il ruolo fisiologico del cervelletto sia nelle funzioni motorie che nelle funzioni di ordine superiore.

Diversi studi hanno evidenziato come lesioni sopratentoriali hanno come conseguenza una disfunzione metabolica a livello dell'emisfero cerebellare controlaterale che è stata definita diaschisi cortico-cerebellare (Tien and Ashdown, 1992; Yamauchi et al., 1999; Chakravarty, 2003). L'effetto opposto, dovuto ad una lesione cerebellare focale, provoca un'alterazione funzionale nella corteccia cerebrale controlaterale (diaschisi cerebello-corticale) (Boni et al., 1992; Sonmezoglu et al., 1993; Gomez Beldarrain et al., 1997; Komaba et al., 2000). In questo caso, i disturbi motori e cognitivi che possono essere osservati sono strettamente conseguenti ad un'alterazione della modulazione cerebellare sulla corteccia cerebrale controlaterale.

Uno studio recente di risonanza magnetica strutturale, condotto in bambini nati pre-termine, ha evidenziato una diretta associazione tra un danno nel tessuto cerebellare e lo sviluppo del volume totale dell'emisfero cerebrale controlaterale e viceversa (Limperopoulos et al., 2005). Questo studio ha dimostrato che lo sviluppo degli emisferi cerebrali e del cervelletto è strettamente interdipendente. Inoltre uno studio recente ha evidenziato che il volume del verme e di lobi frontali sono correlati al declino cognitivo nei soggetti anziani (Paul et al., 2009). Per comprendere meglio il ruolo specifico del cervelletto nelle differenti funzioni cerebrali potrebbe essere

dirimente indagare i cambiamenti strutturali che si presentano nell'adulto, senza una storia pregressa di danno neurologico, in seguito ad una lesione cerebellare focale. In questo caso ci si può aspettare un cambiamento strutturale lieve, che appare in una fase cronica del decorso clinico e che è distribuito nell'emisfero cerebrale controlaterale al danno cerebellare. Modificazioni strutturali con queste caratteristiche possono facilmente essere al di sotto della risoluzione spaziale delle immagini di risonanza magnetica convenzionale e possono essere rilevabili utilizzando tecniche di analisi quantitativa di risonanza magnetica per immagini. A differenza dei tradizionali metodi anatomici ed istologici, la VBM dell'encefalo permette di studiare *in-vivo* i cambiamenti strutturali cerebrali e le correlazioni tra morfologia e funzione, rivelandosi, quindi, un metodo efficace per studiare le interazioni cerebello-corticali. Nel presente studio, abbiamo utilizzato la VBM per indagare la presenza e l'estensione delle anomalie della sostanza grigia cerebrale in soggetti con danno cerebellare focale in fase cronica. L'obiettivo era quello di identificare un pattern specifico di alterazione della densità di sostanza grigia che potesse spiegare le caratteristiche neuropsicologiche dei soggetti studiati, per evidenziare i potenziali meccanismi d'interazione cerebello corticale.

### **3.2. Descrizione del campione.**

Nello studio sono stati inclusi 15 soggetti (12 maschi e 3 femmine) affetti da un evento ischemico, emorragico o chirurgico, con un coinvolgimento selettivo del parenchima cerebellare. Otto soggetti (53%) avevano una lesione ischemica unilaterale e quattro (27%) una lesione emorragica unilaterale. I restanti tre soggetti (20%) avevano subito un intervento per rimuovere un tumore extra assiale (meningioma) risultante in un esteso danno cerebellare. L'età media (DS) dei soggetti era di 53.7 (11.4) anni, in un range da 33 a 71 anni.

I soggetti sono stati inclusi nello studio secondo i seguenti criteri: assenza di segni clinici o dati anamnestici indicativi di altra patologia neurologica o psichiatrica pregressa o in atto; assenza di una storia di abuso di alcool; assenza di idrocefalo o di altre lesioni cerebrali focali o diffuse; assenza di deterioramento cognitivo diffuso.

Le caratteristiche demografiche e cliniche principali (inclusi i fattori di rischio vascolare e l'uso dei relativi farmaci) dei soggetti sperimentali sono state descritte nella tabella 3.1. La presenza di anomalie macroscopiche nella corteccia cerebrale è stata esclusa attraverso la visione delle immagini di risonanza magnetica pesate in T2. Nella fase di arruolamento nello studio tutti i soggetti si trovavano in una fase stabile di recupero dall'evento clinico. Il tempo medio trascorso dall'evento acuto era di 6 mesi.

Nello studio è stato inoltre inserito un gruppo controllo, costituito da 15 soggetti sani (12 maschi e 3 femmine) di età comparabile a quella dei soggetti sperimentali, ovvero 53.3 (12.3) anni.

Lo studio è stato preceduto dall'approvazione del Comitato Etico e ciascun soggetto ha preso visione e firmato un consenso informato per la ricerca.

Caso	Età	Sesso	Fattori vascolari	Farmaci	Lesione cerebellare		
					Eziologia	Volume (ml)	Lato
1	66	M	IA	nifedipine	E	0.7	D
2	48	F	-	levothyroxine sodium	C	17.6	D
3	42	M	-	-	I	16.7	D
4	61	M	IA	-	I	18.5	D
5	60	M	-	-	E	0.6	D
6	71	M	IC	-	E	16.6	D
7	59	M	-	-	I	17.1	D
8	48	F	-	-	C	13.5	D
9	55	M	IA; IC	acetylsalicylic acid; atenolol	I	0.3	S
10	63	F	IA	acetylsalicylic acid; felodipine	I	11.3	S
11	61	M	-	-	I	68.8	S
12	45	M	-	-	E	16.7	S
13	33	M	-	-	C	3.4	S
14	59	M	IA	Nimodipine	I	17.5	S
15	34	M	-	acetylsalicylic acid; nimodipine	I	5.0	S

**Tabella 3.1.** Caratteristiche demografiche e cliniche del gruppo sperimentale.

D = destra; S = sinistra; M = maschio; F = femmina; IA = ipertensione arteriosa; IC = ischemia cardiaca; E = lesione emorragica; C = lesione chirurgica; I = lesione ischemica.

### **3.3. ESPERIMENTO I: Studio anatomico delle lesioni cerebellari.**

#### **3.3.1. Premessa.**

Di recente, Stoodley e Schmahmann (2009) hanno condotto una meta-analisi su diversi studi di risonanza magnetica funzionale presenti in letteratura in cui è stata evidenziata un'attivazione del cervelletto insieme ad altre aree corticali, durante l'esecuzione di compiti volti ad indagare diversi domini motori e cognitivi. L'obiettivo del lavoro era quello di individuare specifiche regioni anatomiche del cervelletto deputate al processamento delle informazioni riguardanti ciascun dominio, partendo dall'ipotesi che, così come esiste una rappresentazione somatotopica delle diverse regioni del corpo all'interno del cervelletto (Bushara et al., 2001; Grodd et al., 2001; Nitschke et al., 1996), possa esistere anche una organizzazione topografica dei diversi domini cognitivi. Sulla base di tale meta-analisi gli autori hanno delineato un quadro dalle sub regioni cerebellari coinvolte in domini cognitivi specifici.

La regione posterolaterale del cervelletto di destra sembrerebbe avere un ruolo nel dominio linguistico, infatti risulta maggiormente attiva durante l'esecuzione di compiti quali: la produzione di verbi (Lurito et al., 2002; Frings et al., 2006), la fluidità fonologica (Schlosser et al., 1998) e il giudizio semantico (Xiang et al., 2003; Tielman et al., 2005).

Il cervelletto sembrerebbe essere coinvolto anche nell'ambito del dominio della memoria di lavoro verbale attraverso due differenti circuiti. Il circuito cerebello-frontale, costituito dalle connessioni tra lobulo VI del cervelletto ed area di Broca, sembrerebbe coinvolto nel ripasso articolatorio; mentre il circuito cerebello-parietale, costituito dalle connessioni tra lobuli VIIA e VIIIA del cervelletto destro e lobi infero parietali, sembrerebbe coinvolto nel mantenimento-immagazzinamento dell'informazione (Chen and Desmond, 2005).



L'emisfero cerebellare di sinistra, in particolare a livello del lobulo VI, appare maggiormente attivo, durante l'esecuzione di compiti relativi al dominio spaziale, come ad esempio la sezione di linee (Fink et al. 2000), compiti di rotazione mentale (Bonda et al., 1995; Parsons et al. 1995) e di navigazione spaziale (Moffat et al. 2006). Il cervelletto di sinistra riceve forti input dal lobo parietale controlaterale (Glickstein et al., 1985; Schmahmann and Pandya, 1989).

E' stata inoltre riscontrata un'attivazione nel cervelletto laterale, controlateralmente all'attivazione della regione corticale prefrontale, durante l'esecuzione di specifici compiti esecutivi, ad esempio, nella memoria di lavoro, in compiti di decision making, nell'inibizione di strategie corrette al variare delle regole. Nel caso delle funzioni esecutive non è stato possibile individuare specifiche aree cerebellari coinvolte in quanto l'attivazione di queste dipende dalla specificità del compito (Stoodley e Schmahmann, 2009).

La regione posteriore del verme, definita "cervelletto limbico", sembra essere principalmente coinvolta nel controllo delle emozioni (Schmahmann, 1991, 1996, 2004), grazie alle sue connessioni con le strutture limbiche.

In generale, nel cervelletto la rappresentazione del linguaggio sembrerebbe essere lateralizzata a destra, mentre quella delle funzioni spaziali è lateralizzata a sinistra (Fiez et al., 1992; Gottwald et al., 2004; Gross-Tsur et al., 2006; Hokkanen et al., 2006; Leggio et al., 2008), in quanto la maggioranza delle efferenze cerebellari alla corteccia proiettano controlateralmente. Durante l'attivazione di questi domini funzionali, però, è stata descritta anche un'attivazione bilaterale del cervelletto, in accordo con precedenti studi sui primati (Brodal, 1979) che suggeriscono che non tutte le proiezioni cerebro-ponto-cerebellari sono crociate (circa il 30%).

Considerata la specificità funzionale dei differenti moduli cerebellari nella modulazione del comportamento motorio e cognitivo-comportamentale, in questo

primo esperimento è stata effettuata un'identificazione accurata e una misura volumetrica dalla subregioni cerebellari coinvolte dalla lesione.

### **3.3.2. Materiali e Metodi.**

#### **3.3.2.1. Acquisizione delle neuroimmagini.**

Per ciascun soggetto sono state acquisite immagini di risonanza magnetica tridimensionale pesate in T1, 3D MPRAGE (vedi paragrafo 2.1.1), utilizzando una macchina di RM Siemens Vision Magnetom (Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) con una potenza di 1.5 Tesla.

I parametri di acquisizione della scansione volumetrica sono i seguenti:

- TR (Repetition Time) = 11 ms;
- TE (Echo Time) = 4.4 ms;
- IT (inversion time) = 300 ms
- FA (flip angle) = 15°;
- FOV (field of view) = 256 cm;
- voxel size: 1x1x1 mm<sup>3</sup>.

#### **3.3.2.2. Fase post-acquisizione.**

Per ciascun soggetto la lesione cerebellare è stata tracciata sulle sezioni assiali dell'immagine 3D MPRAGE non ancora normalizzata, utilizzando MRIcro (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/mricro.html>). Per ogni lesione è stata creata una regione d'interesse (ROI) e la corrispondente maschera della lesione con uno smooth di 8 mm FWHM, ed una soglia dello 0.001%.

Il volume della lesione e l'insieme completo dei dati 3D-MRI sono stati simultaneamente normalizzati in accordo al protocollo di Brett e colleghi (2001) tramite SPM2. In tal modo ciascuna scansione è stata registrata e rimodellata, in voxel di dimensioni 1x1x1 mm<sup>3</sup>, nello spazio stereotassico standard (vedi paragrafo 2.1.2).

La maschera della lesione è stata utilizzata per escludere l'area della lesione dal calcolo dei parametri per la normalizzazione e preservare le immagini da potenziali artefatti.

Portando il cervello di ciascun soggetto nello stesso spazio MNI, è stato possibile effettuare una sovrapposizione della lesione del singolo soggetto con l'atlante del cervelletto di Schmahman e colleghi (2000). Questo atlante fa riferimento alle coordinate dello spazio stereotassico di Talairach e Tournoux. La nomenclatura delle subregioni del cervelletto prese in considerazione è quella utilizzata nel suddetto Atlante (figura 1.1) che modifica leggermente la convenzionale suddivisione in lobi numerati di Larsell (Larsell e Jansen, 1972).

### **3.3.3 Analisi qualitativa e quantitativa dei dati anatomici.**

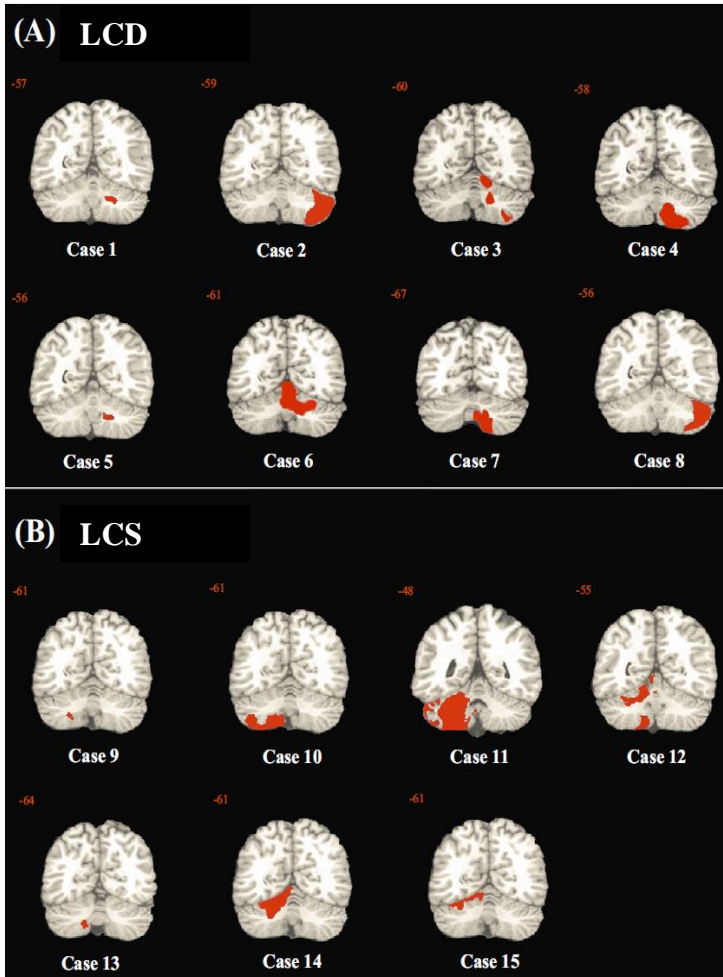
Per ciascun soggetto è stata effettuata una analisi dettagliata del danno macroscopico che includeva il volume e la localizzazione. La quantificazione della lesione è stata effettuata su immagini di risonanza magnetica strutturale 3D-MPRAGEs dopo una normalizzazione delle stesse nello spazio stereotassico. Il volume della lesione è stato calcolato utilizzando MRIcro ed espresso in ml. La localizzazione del danno all'interno delle specifiche strutture cerebellari (lobuli, verme e nuclei) è stata effettuata facendo riferimento all'atlante del cervelletto umano di Schmahmann (Schmahmann et al., 2000) ed all'atlante dei nuclei cerebellari (Dimitrova et al., 2002).

### **3.3.4. Risultati.**

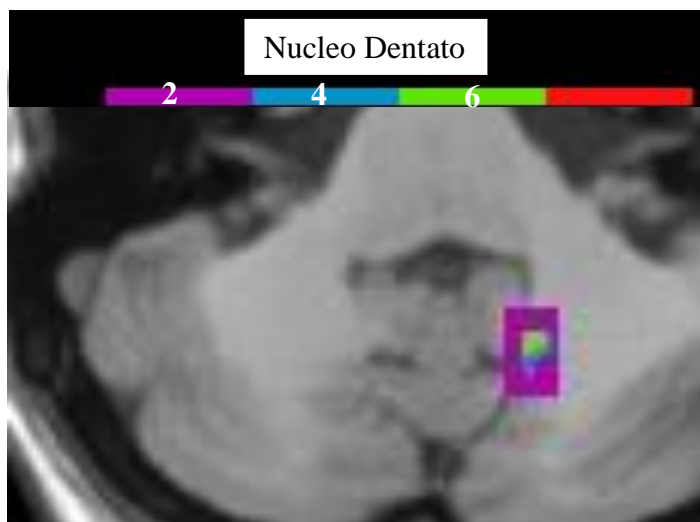
Per ciascun soggetto il volume della lesione è riportato nella tabella 3.1, mentre la distribuzione anatomica della lesione è descritta in tabella 3.2. Le immagini delle lesioni sono state sovrapposte al template standard (pesato in T1) (Figura 3.1). La differenza tra le medie del volume delle lesioni dei soggetti con lesione cerebellare a

destra (LCD) e dei soggetti con lesione cerebellare a sinistra (LCS) (media [DS] = 12.7 [7.5] e 9.5 [23.5] ml, rispettivamente) non si è dimostrata statisticamente significativa ( $P = 0.29$ ). Il danno cerebellare nel gruppo con LCD risulta distribuito in modo più omogeneo nei diversi distretti cerebellari, con un maggiore coinvolgimento dei lobuli localizzati nella porzione posteriore. Il volume e la localizzazione delle lesioni del gruppo con LCS hanno una distribuzione più eterogenea (Figura 3.1, Tabella 3.2).

Infine i due gruppi sperimentali mostrano un differente coinvolgimento del nucleo dentato. Questo appare lesionato in 6 soggetti con LCD (75%) ed in due soggetti con LCS (28%) (Tabella 3.2, Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Localizzazione della lesione cerebellare di ciascun soggetto. Nella sezione A sono riportate le immagini dei soggetti con lesione cerebellare a destra e nella sezione B sono riportate le immagini dei soggetti con lesione cerebellare a sinistra. I soggetti sono riportati nello stesso ordine della tabella.



**Figure 3.2.** Rappresentazione dell'area d'intersezione tra la porzione di nucleo dentato lesionata in ciascun soggetto con LCD ed una ricostruzione della mappa probabilistica (51-60%) tridimensionale del nucleo dentato di Dimitrova e coll. (2006). Il colore indica in quanti individui la lesione coinvolge il nucleo dentato: magenta = 2; blu = 4; verde = 6.

**Tabella 3.2.** Distribuzione anatomica del danno cerebellare per ciascun soggetto. La localizzazione della lesione è stata effettuata sulle immagini volumetriche pesate in T1 riportate nello spazio stereotassico con riferimento all'atlante tridimensionale del cervelletto umano di Schmahmann e collaboratori (2000) e l'atlante dei nuclei cerebellari di Dimitrova e collaboratori (2002).

Casi	Lobuli										Verme				Nuclei		
	I-II	III	IV	V	VI	Crus I	Crus II	VIII B	VIII A	VIII B	IX	X	F	I	D		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	
2	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	X	X
4	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
6	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X
7	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	X	X
8	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	X	-
13	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-
14	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X
15	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LCD = lesione cerebellare destra; LCS = lesione cerebellare sinistra; F = fastigio; I = interposito; D = dentato.  
x: struttura anatomica coinvolta dal danno; - struttura anatomica illesa.

### **3.3.5. Discussione**

L'utilizzo di immagini di risonanza magnetica ad alta risoluzione, unito alla possibilità di effettuare un processo di normalizzazione automatizzato e di delimitare il danno cerebellare in modo puntuale, ha consentito di descrivere in modo accurato per ciascun soggetto sperimentale la lesione cerebellare (tabella 3.2). I due gruppi sperimentali mostrano differenze nella distribuzione e nella localizzazione della lesione, in particolare nel gruppo con LCD vi è una distribuzione omogenea delle lesione ed un maggiore coinvolgimento del nucleo dentato rispetto ai soggetti con LCS.



### **3.4. ESPERIMENTO 2: Analisi morfo-volumetrica della corteccia cerebrale mediante VBM.**

#### **3.4.1. Premessa.**

Come già evidenziato precedentemente, la specificità funzionale dei moduli cerebellari nel controllo delle diverse abilità è data dalle connessioni afferenti ed efferenti con specifiche aree della corteccia cerebellare (Voogd, 2003).

Uno studio recente effettuato da Krienen e Buckner (2009), attraverso l'uso della functional connectivity MRI (fcMR), ha confermato l'esistenza, nel cervello umano, di diverse connessioni tra specifiche aree della corteccia cerebrale e specifiche porzioni cerebellari.

Nonostante diversi studi abbiano evidenziato, in presenza di lesioni cerebellari, alterazioni funzionali nelle aree di proiezione della corteccia cerebrale (Boni et al., 1992; Sonmezoglu et al., 1993; Gomez Beldarrain et al., 1997; Komaba et al., 2000), le modificazioni strutturali della corteccia cerebrale in presenza di danno cerebellare sono state indagate in modo poco dettagliato, valutando solo il volume totale degli emisferi cerebrali (Limperopoulos et al., 2005). In questo secondo esperimento è stata effettuata l'analisi VBM per identificare e quantificare la presenza di cambiamenti nella densità di sostanza grigia di specifiche regioni della corteccia cerebrale.

#### **3.4.2. Materiali e Metodi.**

##### **3.4.2.1 Processamento delle immagini di RMN.**

Per ciascun soggetto le immagini 3D-MPRAGE sono state processate per l'analisi di VBM utilizzando il software SPM2 (Wellcome Department Cogn. Neurol, London; [http:// www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm)). Le immagini normalizzazione (vedi paragrafo 3.3.2.2.) sono state segmentate ottenendo così tre diverse mappe di sostanza grigia, sostanza bianca e liquido cerebrospinale.

#### **4.4.3. Analisi dei dati.**

L'analisi statistica è stata effettuata sulle mappe di sostanza grigia, dopo aver applicato uno smooth di 12 mm<sup>3</sup> FWHM gaussian kernel. L'analisi statistica VBM è stata effettuata usando un modello ANOVA, per confrontare le mappe di sostanza grigia tra i tre gruppi di soggetti: soggetti con lesione cerebellare destra (LCD), soggetti con lesione cerebellare sinistra (LCS) e soggetti di controllo. Un confronto categoriale è stato effettuato tra i due gruppi sperimentali ed il gruppo di controllo.

Le differenze tra regioni sono state considerate significative a livello dei clusters dopo una correzione per confronti multipli ( $p < 0.05$ ).

Il valore della densità di sostanza grigia dei soggetti sperimentali è stato estratto a livello di quei cluster che mostravano un cambiamento significativo nel confronto di gruppo con i soggetti di controllo ed è stata indagata la possibile correlazione tra la densità di sostanza grigia regionale ed il volume della lesione cerebellare.

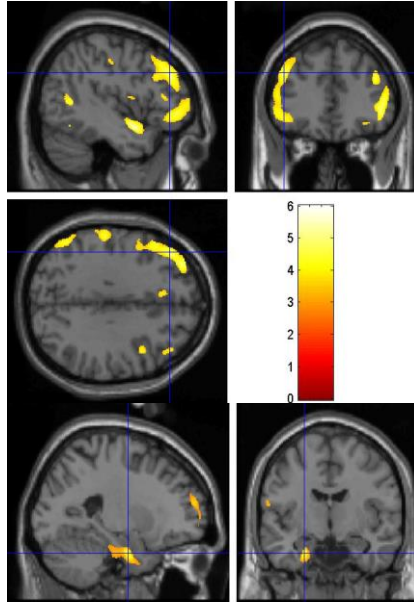
#### **3.4.4. Risultati.**

I soggetti con LCS rispetto ai controlli non mostrano alcun cambiamento significativo nella densità di sostanza grigia. Al contrario i soggetti con LCD rispetto ai controlli mostrano una diffusa riduzione di densità di sostanza grigia in specifiche regioni, che rimane tale anche dopo la correzione per confronti multipli ( $P_{\text{corrected}} < 0.05$ ) (Tabella 3.3).

Il pattern di alterazione include il giro frontale inferiore e medio a livello bilaterale, il giro temporale superiore, il giro paraippocampale, il giro sopramarginale, il giro angolare, il giro fusiforme nell'emisfero di sinistra (Figura 3.3). Non è stata evidenziata una correlazione tra il volume della lesione e la densità di sostanza grigia nel gruppo sperimentale.

Area cerebrale	Lato	BA	Dimensione del cluster	Coordinate (mm)			Peak Z-score
				x	y	z	
<b>Giro temporal Sup</b>	S	38	2322	<b>-42</b>	<b>2</b>	<b>-15</b>	4.53
<b>Giro frontale Inf</b>	D	45, 47	9190	<b>45</b>	<b>44</b>	<b>-10</b>	4.39
<b>Giro frontale Med</b>	D	10		29	56	7	4.19
<b>Giro frontale Med</b>	S	46, 9	19751	<b>-44</b>	<b>36</b>	<b>32</b>	4.13
<b>Giro frontale Inf</b>	S	45, 46, 10		-52	21	15	4.07
<b>Giro Angolare</b>	S	39	3008	<b>-51</b>	<b>-62</b>	<b>37</b>	4.24
<b>Giro sopramarginale</b>	S	40		-54	-42	42	3.89
<b>Giro paraippocampale</b>	S	36	3432	<b>-24</b>	<b>-8</b>	<b>-29</b>	4.02
<b>Giro fusiforme</b>	S	20, 37		-29	-32	-22	3.67

**Tabella 3.3.** Distribuzione delle regioni di ridotta densità di sostanza grigia nella corteccia cerebrale dei soggetti con LCD rispetto ai controlli. L'estensione di ogni regione è espressa in numero di voxels. Nella figura sono rappresentate solo le regioni che sopravvivono alla correzione per confronti multipli ( $p_{corrected} < 0.05$ ). Le coordinate stereotassiche sono riportate nello spazio MNI (Montreal Neurological Institute). LCD = lesione cerebellare destra; sup = superiore; inf = inferiore; med = mediale; D = destra; S = Sinistra; BA = Area di Brodmann.



**Figura 3.3.** Distribuzione delle regioni di ridotta densità di sostanza grigia nella corteccia cerebrale dei soggetti con lesione cerebellare nell'emicervelletto di destra rispetto al gruppo di controllo. Le regioni sono state rappresentate sul template MNI di SPM2 nelle seguenti coordinate  $x = -44$   $y = 36$   $z = 32$ ;  $x = -24$   $y = -8$   $z = -29$ . A scopo illustrativo è stata utilizzata una soglia più bassa di quella utilizzata in tabella 3.3 ( $P_{\text{uncorrected}} < 0.001$ ). Le aree in giallo corrispondono ad un maggiore livello di significatività.

### **3.4.5. Discussione.**

I risultati evidenziano come, nella fase cronica della loro condizione, i soggetti con LCD rispetto ai soggetti di controllo, presentano uno specifico pattern di riduzione della densità di sostanza grigia (Figura 3.3, Tabella 3.3), nonostante l'analisi delle scansioni pesate in T2 avesse escluso la presenza di ogni anomalia macroscopica in regioni diverse dal cervelletto.

Come atteso sulla base delle conoscenze anatomiche, il pattern di riduzione della densità di sostanza grigia era principalmente controlaterale alla lesione cerebellare e localizzato nella corteccia prefrontale, parietale e temporale. Inoltre, sono state evidenziate alcune regioni di ridotta densità di sostanza grigia a livello del lobo frontale ispilaterale al danno cerebellare.

Diversi studi di risonanza magnetica funzionale hanno evidenziato un coinvolgimento bilaterale della corteccia cerebrale in diverse funzioni cognitive (Andreasen et al., 1995; Vohn et al., 2007; Carbon et al., 2008).

E' noto, ad esempio, come aree prefrontali siano estesamente interconnesse attraverso il corpo calloso e si attivino bilateralmente in diversi paradigmi cognitivi (Chen e Desmond, 2005; Halari et al., 2006; Shibuya-Tayoshi et al., 2007). E' possibile quindi ipotizzare che una lesione cerebellare unilaterale possa influenzare non solo le regioni corticali contro laterali ma anche, in modo indiretto, aree ipsilaterali.

Questa ipotesi è avvalorata da evidenze derivate da studi lesionali sui ratti, che mostrano come una lesione cerebellare acuta possa indurre un'alterazione dell'attività anche nella corteccia sensorimotoria ipsilaterale (Oulad Ben Taib e Manto, 2008).

La riduzione della densità di sostanza grigia osservata nei soggetti con LCD, potrebbe riflettere sia una degenerazione neuronale che un rimodellamento sinaptico. Vi è una emergente accettazione del fatto che la plasticità neuronale possa essere direttamente influenzata dai livelli e dalle proprietà di segnale di fattori neurotrofici (Pang et al., 2004). Come conseguenza del danno cerebellare, i neuroni della corteccia cerebrale

contro-laterale subiscono una riduzione dell'input sinaptico, che normalmente ricevono dal cervelletto, attraverso il talamo. Questo potrebbe indurre una riorganizzazione strutturale dei neuroni corticali. Cambiamenti strutturali simili possono anche interessare altre regioni corticali che sono connesse anatomicamente e funzionalmente con le suddette regioni.

Infine, appare utile sottolineare come, nonostante una parte dei soggetti sperimentali fosse affetta da fattori di rischio cerebrovascolare, l'utilizzato delle immagini RM pesate in T2 abbia permesso di escludere la presenza di lesioni lacunari silenti, tipicamente riscontrabili in pazienti con disturbi cerebrovascolari cronici (Shintani et al., 1998).

### **3.5. ESPERIMENTO 3: Correlati comportamentali di lesioni cerebellari focali.**

#### **3.5.1. Premessa.**

Il coinvolgimento del cervelletto nella modulazione delle funzioni cognitive è oramai suffragato da numerose evidenze sperimentali, che vedono tale struttura implicata in una serie di diversi processi non solo motori, ma anche sensoriali, cognitivi ed affettivi. Il cervelletto risulta essere coinvolto non solo nella mediazione dei riflessi condizionati (Logan e Grafton, 1995; Solomon et al., 1989; Topka et al., 1992; Yeo e Hesslow, 1998), ma anche in forme di apprendimento più complesse (Doyon et al., 1997; Jenkins et al., 1994; Seitz e Roland, 1990). Già alla fine degli anni '90 Masao Ito sottolineava come i dati sperimentali e clinici, sino ad allora disponibili, fossero convergenti nell'indicare per il cervelletto un ruolo centrale nell'apprendimento adattivo, definito come capacità di modificare un comportamento in base all'esperienza. Lo stesso Ito (1990) ipotizzava come l'influenza cerebellare sull'apprendimento procedurale potesse non limitarsi agli aspetti di apprendimento motorio, ma interessare tutte quelle funzioni ove fosse presente una componente procedurale.

Un crescente numero di studi di neuroimmagini funzionali ha evidenziato l'attivazione del cervelletto, insieme ad altre aree corticali, durante l'esecuzione di diversi compiti cognitivi, quali compiti di attenzione (Allen et al., 1997), processamento di immagini mentali (Parsons et al., 1995), pianificazione cognitiva (Kim et al., 1994; Bellebaum e Daum, 2007), fluency verbale (Gourovitch et al., 2000), memoria di lavoro (Klingberg et al., 1995; Desmond et al., 1997; Desmond et al., 2003; Hayter et al., 2007), linguaggio (Petersen et al., 1989; Raichle et al., 1994; Klein et al., 1995; ; Fiez and Raichle, 1997; Booth et al., 2007), memoria verbale (Andreasen et al., 1995a-c, 1996b; Grasby et al., 1993) e memoria visiva (Andreasen et al., 1996a). Parallelamente studi effettuati su soggetti con danno cerebellare focale

hanno evidenziato il coinvolgimento del cervelletto in deficit di memoria (Silveri et al., 1998; Chiricozzi et al., 2008), attenzione (Chourchesne et al., 1998), linguaggio (Fiez et al., 1992; Silveri et al., 1994; Leggio et al., 2000); oltre che in compiti riguardanti specifici aspetti cognitivi del movimento, come il timing (Ivry, 1989), l'adattamento al contesto (Thach, 1987), le abilità spaziali (Petrosini e al., 1996; Leggio et al., 1999) e l'apprendimento procedurale (Molinari et al., 1997).

Una disfunzione globale della corteccia cerebellare può causare un ampio spettro di effetti sul comportamento (Schmahmann, 2004). Tuttavia, danni in porzioni localizzate della corteccia cerebellare possono causare deficit più limitati, che possono essere sia di natura motoria che non motoria, in base alla localizzazione della lesione cerebellare (Allen e Courchesne, 2003, Fiez et al., 1992; Gottwald et al., 2004, Schmahmann e Sherman, 1998).

Sulla base di tali premesse l'obiettivo del presente esperimento è stato quello di verificare la presenza di alterazioni cognitive, oltre che motorie nei due gruppi sperimentali.

### **3.5.2. Materiali e metodi.**

#### **3.5.2.1. Misurazione delle funzioni motorie.**

Ciascun soggetto è stato sottoposto ad un esame neurologico completo ed è stato valutato grazie all'ausilio di una versione modificata della scala per la valutazione del deficit cerebellari, proposta da Appollonio e collaboratori (1993). Il punteggio globale di tale scala varia da 0 (assenza di deficit motorio) a 42 (presenza di un deficit motorio grave).



### 3.5.2.2. Misurazione delle funzioni cognitive.

Per ottenere una valutazione completa delle funzioni cognitive, a ciascun soggetto è stata somministrata una estesa batteria di test neuropsicologici. Tutte le prove sono state somministrate nella versione italiana.

Per la misurazione del *livello intellettuale generale* è stata utilizzata la Wechsler Adult Intelligence Scale Revised (WAIS-R) (Wechsler, 1997; Orsini e Laicardi, 2001). Tale Scala fornisce tre diversi punteggi per le capacità verbali (Quoziente Intellettivo verbale – QI-V), per le capacità non verbali (Quoziente Intellettivo di performance – QI-P) ed un punteggio totale (Quoziente Intellettivo totale QI-T). La scala verbale è composta da sei subtests: Informazione, Comprensione, Ragionamento aritmetico, Analogie, Memoria di cifre, Vocabolario. La scala di performance è composta da cinque subtests: Associazione di simboli a numeri, Completamento di figure, Disegno con cubi, Riordinamento di storie figurate, Ricostruzione di figure.

Per la misurazione delle *abilità visuo-spaziali* sono stati utilizzati il test delle Matrici progressive di Raven (Raven, 1947; Carlesimo et al., 1996), e due sub test della Wais-R, ovvero Disegno con Cubi e Ricostruzione di Oggetti.

Le *abilità prassiche* sono state misurate tramite il test di copia libera di disegni ed il test di disegno con elementi di programmazione (Gainotti et al., 1977; Carlesimo et al., 1996).

La misurazione delle *funzione esecutive* è stata effettuata tramite il Test di fluidità fonologica (Borkowsky et al., 1967; Carlesimo et al., 1996), ed il Test d'induzione di regole temporali (Villa et al., 1990).

La misurazione della *memoria verbale* è stata effettuata con l'ausilio del Digit span (WAIS-R) in avanti ed indietro, e con il test delle 15 parole di Rey (memoria immediata e differita) (Rey, 1958; Carlesimo et al., 1996).

Infine la *memoria a breve termine visiva e spaziale* sono state misurate utilizzando rispettivamente il Test di memoria visiva immediata (Carlesimo et al., 1996) ed il Test di Corsi (Corsi, 1972).

### **3.5.3. Analisi statistica.**

Un t-test per campioni indipendenti è stato effettuato tra i due gruppi di soggetti con LCD ( $n^{\circ} = 8$ ) e con LCS ( $n^{\circ} = 7$ ) per tutte le sottoscale della BUSPAR.

I punteggi ottenuti a ciascun test eseguito sono stati corretti per età e scolarità ad eccezione dei punteggi ottenuti con la WAIS-R, che sono stati corretti solo per età (Orsini and Laicardi, 2001).

Per ciascun test è stata effettuata una ANOVA ad una via tra i due gruppi sperimentali ed il gruppo di controllo.

Le differenze tra gruppi sono state analizzate attraverso un'analisi post hoc applicando la correzione di Bonferroni.

Infine, è stata testata la possibile correlazione tra i valori individuali della densità di sostanza grigia, relativi a ciascuna regione (vedi par. 3.4.3), ed i punteggi ottenuti alla scala motoria ed ai test cognitivi.

### **3.5.4. Risultati.**

#### **3.5.4.1. Funzioni Motorie.**

I risultati ottenuti dai soggetti sperimentali ai subtest della scala motoria sono riportati in tabella 3.4. L'analisi statistica evidenzia che non ci sono differenze significative nella compromissione motoria tra i soggetti con LCD e soggetti con LCS (p-values tra 0.3 e 0.7).

	LCD	LCS	
<b><u>Scala Motoria</u></b>	<b>Media ± DS</b>	<b>Media ± DS</b>	<b>Intervallo</b>
Punteggio totale	8.67 ± 6.29	5.25 ± 6.69	0-42
<b><u>Punteggi parziali</u></b>			
Disartria	0.44 ± 0.46	0.33 ± 0.82	0-4
Movimenti oculari	1.61 ± 0.99	1.17 ± 1.47	0-4
Tono muscolare	0.58 ± 0.71	0.25 ± 0.22	0-2
Tremore posturale	0.89 ± 0.78	0.54 ± 0.60	0-8
Atassia degli arti superiori	1.42 ± 1.10	0.88 ± 1.17	0-8
Atassia degli arti inferiori	0.78 ± 1.28	0.50 ± 1.00	0-8
Stazione eretta	1.39 ± 1.43	0.92 ± 1.28	0-4
Atassia della marcia	1.44 ± 1.33	0.67 ± 1.21	0-4

**Tabella 3.4.** Punteggi relativi alla scala motoria. Media ± DS dei punteggi ottenuti dai soggetti LCD e LCS alla versione modificata della scala per la valutazione dei deficit motori cerebellari di Appollonio e colleghi (1993). LCD = soggetti con lesione cerebellare destra; LCS = soggetti con lesione cerebellare sinistra; DS = Deviazione standard.

### 3.5.4.2. Funzioni cognitive

I risultati dei test cognitivi ottenuti dai due gruppi sperimentali e dal gruppo di controllo sono riportati in tabella 3.5. Nessuno dei soggetti di controllo presentava prestazioni deficitarie a tutte le prove cognitive.

L'analisi statistica tra i tre gruppi studiati (soggetti con LCD, soggetti con LCS e soggetti di controllo) non ha evidenziato nessuna differenza significativa nel QI totale, verbale e non verbale.

Differenze significative sono state evidenziate nelle seguenti prove: test di fluidità fonologica (one-way ANOVA:  $F_{2,29} = 5.7$ ;  $P = 0.01$ ), test Induzione di regole temporali ( $F_{2,29} = 5.6$ ;  $P = 0.01$ ), digit span in avanti ( $F_{2,29} = 4.1$ ;  $P = 0.05$ ), test delle 15 Parole di Rey differita ( $F_{2,29} = 3.3$ ;  $P = 0.05$ ), test di Corsi indietro ( $F_{2,29} = 4.4$ ;  $P =$

0.05). Un'analisi post hoc, effettuata utilizzando la correzione di Bonferroni, ha indicato che alcune differenze sono totalmente spiegate dai punteggi significativamente più bassi dei soggetti con LCD rispetto ai controlli. Al contrario i soggetti con LCS rispetto ai controlli non mostravano alcuna differenza significativa. Nel complesso solo i soggetti LCD mostravano una prestazione alterata nei test che misurano le funzioni esecutive, la memoria verbale a breve e lungo termine e la memoria spaziale a breve termine.

#### **3.5.4.3. Correlazione tra danno anatomico corticale e funzioni cognitive.**

E' stata evidenziata una correlazione significativa tra la densità di sostanza grigia nel giro temporale superiore di sinistra (coordinate del picco di attivazione:  $x = 42$ ,  $y = 2$ ;  $z = 15$ ) ed il punteggio ottenuto al test di fluidità fonologica nei soggetti sperimentali con LCD ( $r = 0.8$ ;  $P = 0.001$ ).

Test Cognitivi	LCS	LCD	Controlli
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
<b>Livello intellettivo</b>			
WAIS-R QI Totale	101.2 ± 8.4	102.9 ± 17.4	110.3 ± 14.5
WAIS-R QI Verbale	103.2 ± 9.9	100.1 ± 17.7	108.8 ± 13.5
WAIS-R QI Performance	98.2 ± 8.8	105.9 ± 15.7	111.8 ± 14.8
<b>Abilità Visuo-spaziali</b>			
Matrici Progressive di Raven	30.0 ± 3.7	27.8 ± 3.5	30.4 ± 3.5
Disegno con cubi (WAIS-R)	10 ± 2.2	12.4 ± 3.3	12.3 ± 3.5
Ricostruzione di oggetti (WAIS-R)	8.6 ± 2.1	10.3 ± 3.5	10.6 ± 2.7
Copia libera di disegni	10.2 ± 0.9	9.7 ± 1.7	9.8 ± 0.7
Copia di disegni con elementi	66.3 ± 3.2	68.5 ± 1.7	66.4 ± 3.5
<b>Funzioni-esecutive</b>			
Fluidità fonologica	39.8 ± 7.2	<b>24.4 ± 13.5 *</b>	35.4 ± 7.3
Induzione di Regole Temporal	8.9 ± 3.9	<b>14.3 ± 5.1 *</b>	9.7 ± 2.1
Analogie (WAIS-R)	10.6 ± 0.9	11.1 ± 3.2	11.9 ± 3.3
<b>Memoria verbale</b>			
Span verbale in avanti	6.1 ± 0.7	<b>5 ± 1.2 *</b>	5.9 ± 0.7
Span verbale indietro	4.3 ± 1.2	4 ± 1.5	4.4 ± 0.7
15 Parole di Rey: breve termine	48 ± 6.1	40.1 ± 7.8	44.0 ± 6.5
15 Parole di Rey: lungo termine	10.2 ± 1.7	<b>8 ± 3.3 *</b>	10.6 ± 2.0
<b>Memoria Visuo-spaziale</b>			
Memoria visiva immediata	20.3 ± 1.1	19.3 ± 2.2	19.8 ± 1.1
Span Spaziale in avanti	5.6 ± 0.5	<b>4.7 ± 0.9 *</b>	5.6 ± 0.6
Span Spaziale indietro	5.1 ± 0.7	4.5 ± 1.6	5.6 ± 1.1

**Tabella 3.5.** Punteggi prove cognitive. Nella tabella sono riportati i punteggi medi e la deviazione standard dei soggetti sperimentali, raggruppati in soggetti con LCD e LCS, e dei soggetti di controllo. LCD = lesione cerebellare destra; LCS = lesione cerebellare sinistra; WAIS = Wechsler Adult Intelligence Scale Revised; QI = Quoziente intellettivo; \* =  $p < 0.05$ .

### **3.5.5. Discussione.**

I due gruppi sperimentali mostrano minimi segni di deficit motori all'esame neurologico, come dimostrato dal basso punteggio ottenuto alle sottoscale motorie (tabella 3.4). Nel momento in cui sono stati arruolati nello studio, tutti i soggetti sperimentali erano in una fase cronica dell'evoluzione del quadro clinico, che nella maggior parte dei casi era caratterizzata da un eccellente recupero del deficit motorio in seguito a riabilitazione motoria (Kelly et al., 2001). Alla valutazione neuropsicologica, i soggetti con LCD mostrano punteggi significativamente più bassi dei soggetti di controllo ai test che misurano le abilità esecutive, la memoria verbale e breve e lungo termine e la memoria spaziale a breve termine (tabella 3.5). Mentre i soggetti con LCS non mostrano alcuna differenza significativa nelle prestazioni alle prove cognitive rispetto ai soggetti sani. I soggetti non erano stati sottoposti a riabilitazione cognitiva.

### **3.6. Conclusioni Studio 1.**

Il presente studio evidenzia come, in presenza di uno specifico danno cerebellare, è possibile riscontrare non solo disfunzioni cognitive, ma anche un cambiamento nella densità di sostanza grigia in specifiche aree di proiezione cerebellare a livello della corteccia cerebrale.

Presi nel complesso i dati clinici e radiologici suggeriscono che le alterazioni cognitive osservate nei soggetti con LCD sono la conseguenza un coinvolgimento di specifici network cerebello-corticali.

Questa interpretazione è consistente con i dati di neuroimmagine funzionale ottenuti in soggetti sani, che hanno dimostrato un coinvolgimento del cervelletto in diverse funzioni cognitive incluse l'attenzione (Allen et al., 1997), la memoria verbale (Grasby et al., 1993; Andreasen et al., 1995a), e le abilità visuo-spaziali (Parsons e Fox, 1997). L'ipotesi è che il cervelletto giochi un ruolo rilevante nella modulazione dell'attività della corteccia cerebrale durante lo svolgimento di funzioni cognitive, così come nelle funzioni motorie. Un riscontro di questo effetto funzionale è stato precedentemente evidenziato in soggetti con lesione cerebellare unilaterale, in cui l'indagine effettuata con la SPECT ha mostrato una ipoattivazione dell'emisfero cerebrale contro laterale alla lesione cerebellare (diaschisi cerebello-cerebrale) (Rousseaux e Steinling, 1992; Hausen et al., 1997; Sagiuchi et al., 2001). Rimane comunque da chiarire il meccanismo neurobiologico che sta alla base dell'interazione tra cervelletto e corteccia cerebrale. Ad un livello macroscopico, uno studio recente ha dimostrato che in bambini nati pre-termine con danno cerebellare, vi è una correlazione diretta tra il volume dell'emisfero cerebellare e l'emisfero cerebrale contro laterale durante lo sviluppo (Limperopoulos et al., 2005).

Tali dati indicano che il cervelletto e la corteccia cerebrale interagiscono durante lo sviluppo, non solo a livello funzionale, ma anche nel determinare il loro profilo strutturale. Tale ipotesi è in accordo con la teoria evuzionistica dello sviluppo degli

emisferi cerebellari associato all'espansione delle cortecce associative cerebrali (Leiner et al., 1989).

Nel presente lavoro abbiamo studiato adulti con un normale sviluppo cerebrale e completamente sani prima di essere affetti da una lesione cerebellare focale. Nella fase cronica della loro condizione, i soggetti con LCD rispetto ai soggetti di controllo, presentavano uno specifico pattern di riduzione della densità di sostanza grigia localizzato a livello delle aree associative cerebrali. Le alterazioni di sostanza grigia nella corteccia prefrontale erano coerenti con i lievi deficit neuropsicologici nelle funzioni esecutive che sono state osservate nei soggetti con LCD. Tale coerenza è stata confermata anche dal dato di correlazione tra la densità di sostanza grigia nel giro temporale superiore di sinistra dei soggetti con LCD ed i punteggi ottenuti nel compito di fluidità fonologica. D'altro lato, i cambiamenti di sostanza grigia nel giro angolare e nel giro sopramarginale di sinistra e nel giro paraippocampale di sinistra potrebbero essere messe in relazione con le disfunzioni nella memoria visuo-spaziale e verbale.

In presenza di una lesione cerebellare cronica è possibile riscontrare un'alterazione della densità di sostanza grigia in specifiche aree di proiezione. Nel gruppo con LCD le aree alterate sembrano essere quelle coinvolte nel controllo delle abilità cognitive in cui questi soggetti riportano alterazioni. Tali risultati non sono confermati nel gruppo LCS, dove non troviamo alcuna alterazione strutturale in corteccia e nessun deficit cognitivo. Questi risultati assumono un significato importante se prendiamo in considerazione il dato anatomico del gruppo LCD. In questo gruppo il coinvolgimento del nucleo dentato, potrebbe essere rilevante nel determinare la riduzione di GM nelle aree di proiezione corticale e le alterazioni in specifiche abilità cognitive. Infatti le connessioni tra la porzione ventro-laterale del dentato e le cortecce associative sono da sempre considerate il substrato anatomico dei processi cognitivi (Middleton e



Strick, 2001). Inoltre, le lesioni cerebellari nel gruppo LCD sono molto omogenee e localizzate nel lobo posteriore a livello dei lobuli Crus I-II e VIIb.

## Capitolo IV

### **Studio 2: Effetti comportamentali della modulazione dell'interazione cerebello-corticale mediante stimolazione transcranica con corrente continua del cervelletto.**

#### **4.1. Razionale.**

I dati ottenuti nel primo studio supportano l'ipotesi che specifici circuiti cerebello-corticali siano coinvolti nel controllo delle funzioni cognitive e che una disfunzione in una singola componente di questo circuito possa determinare delle modificazioni strutturali in specifiche aree di proiezione.

Nonostante tali dati, l'esatto meccanismo d'interazione tra il cervelletto e la corteccia cerebrale rimane largamente da esplorare. Lo sviluppo di nuove tecniche in grado di modulare l'eccitabilità cerebellare potrebbe avere un ruolo decisivo per la comprensione di tali interazioni funzionali.

Recenti studi, applicando al cervelletto la stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS), hanno indagato l'effetto neurofisiologico indiretto sulla corteccia motoria primaria (M1) della modulazione dell'eccitabilità cerebellare (Oliveri et al., 2005; Fierro et al., 2007; Koch et al., 2008; Langguth et al., 2008). Le conclusioni di tali studi appaiono però contraddittorie. Infatti, mentre alcuni autori hanno evidenziato un aumento di alcuni circuiti intracorticali in M1 (Oliveri et al., 2005; Koch et al., 2008), altri hanno trovato una diminuzione dell'eccitabilità di tale area (Fierro et al., 2007; Langguth et al., 2008).

Inoltre, alcuni autori hanno studiato l'effetto della modulazione dell'eccitabilità cerebellare mediante rTMS a livello comportamentale (Theoret et al., 2001; Gironell et al., 2002; Nagel e Zangemeister, 2003; Miall e Christensen, 2004).

Ad oggi in letteratura è presente solo uno studio che ha indagato l'effetto della stimolazione transcranica con corrente continua (tDCS) cerebellare sul comportamento (Ferrucci et al., 2008). Tali autori hanno riportato come sia la tDCS anodica che catodica possano alterare la capacità di migliorare le prestazioni in seguito ad esercizio ripetuto in un compito di memoria di lavoro.

Questi studi hanno evidenziato effetti a breve termine della stimolazione sulla prestazione, suggerendo che la rTMS e la tDCS influenzano l'eccitabilità cerebellare e causano un cambiamento di breve durata nella prestazione in compiti motori e di memoria di lavoro.

L'ipotesi più accreditata è che il meccanismo responsabile di tali effetti fisiologici e comportamentali riguardi la modulazione dell'output cerebellare sulle strutture cerebrali. Tale ipotesi è stata esplorata in un recentemente studio di Galea et al. (2009), che ha mostrato come la tDCS catodica provochi una diminuzione dell'inibizione tonica che le cellule del Purkinje esercitano sui nuclei cerebellari, con un effetto secondario sul circuito cerebello-talamo-corticale.

L'obiettivo di questo secondo studio è stato quello di studiare i meccanismi d'interazione cerebello-talamo-corticale, tramite l'osservazione degli effetti comportamentali dell'inibizione dell'attività della corteccia cerebellare.

A tale scopo è stata applicata la tDCS catodica sul cervelletto di soggetti sani, ed è stato indagato l'effetto comportamentale della modulazione dell'attività cerebellare mediante un compito di apprendimento motorio.

#### **4.1.1. Stimolazione transcranica con corrente continua applicata al cervelletto.**

Il cervelletto è una struttura molto sensibile alla corrente elettrica diretta. L'impedenza degli elementi neuronali nella corteccia cerebellare è più bassa di quella degli elementi della corteccia motoria. Per esempio, nel ratto, l'impedenza delle cellule di Purkinje è quasi 1/3 di quella delle cellule piramidali nella corteccia motoria (Zhu et al., 2006;

Jacobson et al., 2005).

Come evidenziato più volte, una delle principali vie d'uscita delle informazioni dal cervelletto è la via dento-talamo-corticale.

Le cellule di Purkinje, i neuroni che trasportano le informazioni dalla corteccia cerebellare ai nuclei profondi, hanno connessioni inibitorie con il nucleo dentato (DCN), che a sua volta ha connessioni eccitatorie disinaptiche con le aree di proiezione nella corteccia cerebrale (Middleton e Strick, 2000; Kelly e Strick, 2003). Quindi, l'attività delle cellule di Purkinje esercita una inibizione tonica sulle aree di proiezione cerebellare, definita inibizione cerebello-cerebrale (cerebellar-brain inhibition - CBI).

Evidenze sulla presenza della CBI derivano da studi elettrofisiologici che hanno valutato l'eccitabilità della corteccia motoria in soggetti sani (Ugawa et al., 1991, 1995) ed in soggetti con ictus cerebellare o patologia cerebellare degenerativa (Liepert et al., 2004; Battaglia et al., 2006). Questi ultimi hanno mostrato un'aumento della inibizione corticomotoria ed una riduzione nella facilitazione motoria secondari a lesioni del DCN (Liepert et al., 2004; Battaglia et al., 2006). Nei soggetti sani la via dento-talamo-corticale è stata studiata attraverso la stimolazione elettrica e magnetica del cervelletto (Ugawa et al., 1991, 1995; Pinto e Chen, 2001; Daskalakis et al., 2004). Recentemente Galea e collaboratori (2009) hanno esplorato gli effetti della stimolazione cerebellare, mediante protocolli eccitatori ed inibitori tDCS, sulla CBI in soggetti sani.

Gli autori hanno ipotizzato che la stimolazione anodica può aumentare la CBI, mentre la stimolazione catodica può diminuire la CBI.

La CBI è stata indagata mediante un protocollo di TMS ad impulsi appaiati (Ugawa et al., 1995; Pinto e Chen, 2001; Daskalakis et al., 2004).

Un impulso condizionante, somministrato sulla corteccia cerebellare 5-7ms prima dell'impulso condizionato su M1, nell'emisfero controlaterale, provoca una

diminuizione dell'ampiezza del potenziale evocato motorio (MEP), rispetto alla TMS ad impulso singolo applicata su M1. La diminuizione dell'ampiezza dei MEP riflette l'inibizione di M1, un effetto attribuito all'attivazione delle cellule di Purkinje, che ha come conseguenza una inibizione del nucleo dentato (Ugawa et al., 1995; Pinto e Chen, 2001; Daskalakis et al., 2004; Reis et al., 2008). Quindi è possibile esplorare il livello di eccitabilità del cervelletto testando il livello di CBI.

Gli autori hanno ipotizzato che la stimolazione anodica può aumentare la CBI, mentre la stimolazione catodica può diminuire la CBI. I risultati dello studio di Galea e colleghi suggeriscono che la tDCS modula l'eccitabilità delle cellule di Purkinje. L'applicazione della tDCS catodica, che è noto inibire l'eccitabilità neuronale (Purpura e McMurtry, 1965; Nitsche e Paulus, 2000), provoca una riduzione della CBI. Questo è probabilmente attribuibile ad una riduzione dell'eccitabilità delle cellule di Purkinje che fa sì che l'impulso di TMS condizionante sia meno efficace nell'attivare queste cellule e di conseguenza non causi l'inibizione delle connessioni eccitatorie tra il nucleo dentato ed M1. Al contrario, l'aumento dell'eccitabilità delle cellule di Purkinje dopo la tDCS anodica, una forma di stimolazione che aumenta l'eccitabilità neuronale (Purpura e McMurtry, 1965; Nitsche e Paulus, 2000), può spiegare la facilitazione della CBI. Ciò è determinato dalla persistente inibizione di M1 anche quando il cervelletto è condizionato con la TMS a bassa intensità.

E' importante sottolineare che la tDCS determina modificazioni della polarizzazione neuronale che non sono di per se sufficienti a generare potenziali d'azione (Purpura e McMurtry, 1965). Attualmente, il meccanismo cellulare attraverso cui la tDCS influenza l'eccitabilità cerebellare non è noto. La modulazione dell'attività delle cellule di Purkinje dipende dai processi sinaptici che coinvolgono i canali sodio e calcio, il GABA e la modulazione dei recettori AMPA (Shepherd, 2004). Ulteriori studi sono necessari per comprendere tali meccanismi.

Si ipotizza che la tDCS possa influenzare il funzionamento cerebellare in due modi.

Primo, potrebbe interferire con i meccanismi di depressione a lungo termine (LTD) dell'attività sinaptica (Paulus, 2004). Infatti, la tDCS, indipendentemente dalla polarità, potrebbe alterare la sintonizzazione dei potenziali di membrana necessari per LTD. La LTD delle cellule di Purkinje può avere un ruolo non solo nelle funzioni motorie ma anche nei compiti cognitivi (Vigot, 2003).

Una ulteriore possibilità è che la tDCS possa alterare direttamente le proprietà di membrane dei neuroni presenti nella corteccia cerebellare. Infatti, nei ratti, i cambiamenti nelle proprietà di membrana e della conduttanza ionica, interferiscono con l'informazione sinaptica delle cellule di Purkinje (Womack e Khodakhah, 2002), perturbando il processamento del segnale a livello della corteccia cerebellare.

#### **4.1.2. Cervelletto ed apprendimento motorio.**

I primi ad avanzare l'ipotesi dell'implicazione del cervelletto nell'apprendimento motorio sono stati Marr (1969) ed Albus (1971), secondo i quali l'apprendimento deriva dall'interazione cellulare nella corteccia cerebellare. Secondo tali autori, le fibre rampicanti modificano la risposta dei neuroni del Purkinje agli input convogliati dalle fibre muscoidi e questo meccanismo sembra essere alla base dell'apprendimento motorio. Studi successivi di Thach (1968) hanno chiarito ulteriormente il ruolo delle fibre rampicanti nell'apprendimento motorio, attraverso la registrazione dell'attività intra-cellulare delle cellule del Purkinje nelle varie fasi di apprendimento di movimenti fini dell'arto superiore nelle scimmie. Secondo questo modello, durante l'esecuzione di un movimento noto e consolidato sono principalmente attive le fibre muscoidi; al contrario, nel corso delle fasi di apprendimento di un compito motorio, il sistema rampicante è fortemente attivato. L'attivazione delle sinapsi delle fibre rampicanti in coincidenza con quelle delle fibre parallele, determina ingresso di  $Ca^{++}$  nel microambiente del tronco dendritico delle cellule del Purkinje. Il  $Ca^{++}$  attiva una catena di reazioni chimiche che portano ad una modificazione plastica dell'efficienza

delle sinapsi delle fibre parallele, consistente in una loro depressione a lungo termine (LTD). Ciò porta ad una riduzione della scarica dei neuroni del Purkinje e quindi a una diminuzione della loro azione inibitoria sui neuroni dei nuclei cerebellari (Ito, 1982; 1991).

Thompson e colleghi (1988; 1990) hanno evidenziato il coinvolgimento del cervelletto nel condizionamento classico della risposta palpebrale. Tali autori hanno osservato come in presenza di lesioni cerebellari tale condizionamento sulla membrana nictante del coniglio venisse abolito. Studi clinici successivi hanno rilevato come il condizionamento palpebrale è gravemente deficitario anche in pazienti con lesioni del cervelletto (Solomon et al., 1989, Topka et al., 1991). Thach e coll. (1992), inoltre, hanno evidenziato come lesioni di questa struttura determinino non solo un deficit nell'apprendimento di comportamenti motori semplici, quali la risposta di ammiccamento, ma anche e soprattutto nell'apprendimento di movimenti complessi. Gli autori hanno suggerito che il ruolo fondamentale del cervelletto è quello di combinare i diversi elementi del movimento utilizzando la modulazione indotta dalle fibre parallele sull'albero dendritico delle cellule del Purkinje. Le fibre rampicanti sembrano rilevare e correggere gli errori nella performance, modulando l'attività delle sinapsi tra le fibre parallele e le cellule del Purkinje, dando origine a una nuova combinazione di risposte. La necessità di apprendere un nuovo movimento o di adattare un vecchio comportamento produce la scarica delle fibre rampicanti dopo che l'errore è subentrato, in modo tale che l'attività sinaptica delle fibre parallele sui neuroni del Purkinje venga ridotta. Le fibre rampicanti ritornano alla loro frequenza di scarica iniziale quando il comportamento è stato sostituito con quello corretto.

L'avvento di nuove tecniche di elaborazione funzionale, come la PET (tomografia ad emissione di positroni) e l'fMRI (risonanza magnetica funzionale), ha consentito di analizzare l'attività del cervelletto durante le varie fasi di apprendimento di comportamenti motori complessi in soggetti sani. Le registrazioni PET durante un

compito di apprendimento di sequenze di movimenti, in cui ai soggetti veniva chiesto di opporre il pollice alle altre dita della mano, hanno mostrato un incremento significativo del flusso sanguigno nel lobo anteriore destro del cervelletto, soprattutto durante le prime fasi di esecuzione del compito, mentre con la pratica e quindi con la ripetizione del compito si riduceva l'attività del cervelletto (Seitz et al., 1990). Un compito simile è stato proposto da Friston e collaboratori (1992), in tale studio i soggetti dovevano stare al passo con la velocità scandita da un metronomo, in modo da differenziare gli effetti dovuti al miglioramento nella prestazione da quelli legati alla velocità del movimento. Dopo un periodo di pratica anche in questo caso i soggetti sono stati esaminati con la PET, e il risultato ha fornito una prova ulteriore della diminuzione progressiva dell'attività cerebellare per effetto della pratica, avvalorando l'ipotesi che il cervelletto sia coinvolto nell'apprendimento motorio.

#### **4.2. Descrizione del campione.**

Nello studio sono stati inseriti 22 soggetti sani (di cui 20 donne) con età media  $30 \pm 6$  (range 22-40). Sono stati inclusi solo i soggetti con una chiara dominanza manuale, ovvero che riportavano punteggi maggiori del 40% (destrimani) e più bassi di -40 % (mancini) alla Edinburgh Handedness Inventory (Oldfield, 1971).

#### **4.3. Esperimento 1: Apprendimento del Test della Spirale di Archimede.**

##### **4.3.1 Premessa.**

Nonostante siano stati sviluppati diversi strumenti per valutare le funzioni motorie in presenza di danno cerebellare (Appollonio et al. 1993; Trouillas et al., 1997; Schmitz-Hübsch 2006a,b; Weyer et al. 2007), nel caso degli studi effettuati con la tDCS o la TMS bisogna tenere presente che i cambiamenti nella prestazione sono più lievi di quelli evidenziabili in presenza di una reale lesione della struttura. Ogni metodo di



valutazione, quindi, deve essere in grado di misurare anche piccole differenze nella prestazione. Per tali ragioni, i test comunemente utilizzati a scopo clinico devono essere modificati, prima di poter essere usati a scopo di ricerca su soggetti sani.

In questo primo esperimento studieremo in un gruppo di soggetti sani (gruppo LEARN) la prestazione ed il processo di apprendimento in un compito che richiede l'uso di movimenti fini.

### **4.3.2. Materiali e Metodi.**

#### **4.3.2.1 Soggetti.**

Dodici soggetti destrimani hanno preso parte all'esperimento, 9 donne e 3 uomini, di età compresa tra i 23 ed i 40 anni (età media = 32; deviazione standard =  $\pm 5$  anni). I soggetti sono stati bilanciati per la mano d'inizio: 7 soggetti hanno iniziato il compito con la mano destra e 5 con la mano sinistra.

#### **4.3.2.2. Il test della spirale di Archimede digitale.**

Per valutare il processo di apprendimento in un compito di movimenti fini, è stato utilizzato il Test della Spirale di Archimede (AST), una versione digitale di un subtest dell'International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS - Trouillas et al., 1997), una scala per la valutazione dei deficit motori nei soggetti con atassia. Tale subtest è comunemente utilizzato in ambito clinico per la valutazione del tremore. Al soggetto viene chiesto di tracciare una linea continua sul modello costituito da una spirale tratteggiata e viene attribuito un punteggio basato sul giudizio dell'esaminatore. Questo giudizio è, per definizione, soggetto alle variazioni inter-operatore. Per utilizzare questo test nell'ambito di tale studio è stato necessario sviluppare un metodo per oggettivare il calcolo degli errori.

Il test della spirale di Archimede è stato uniformato costruendo un modello della spirale con caratteristiche specifiche: passo di 9.76 mm, con una rotazione della spirale

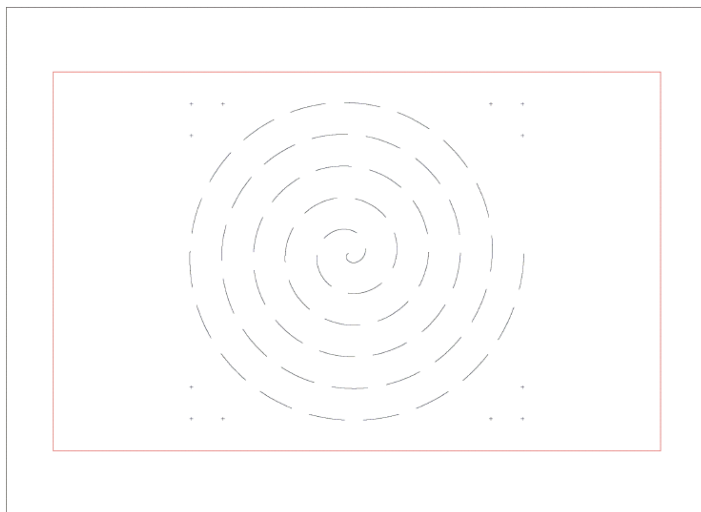
in senso orario ed una linea tratteggiata (vedi appendice 1). Tale modello (figura 4.1) è stato stampato e posizionato su una tavoletta grafica.

L'AST è stato somministrato utilizzando la tavoletta grafica ed i tracciati sono stati acquisiti mediante un software progettato specificatamente per questo scopo (F. Ranieri, Istituto di Neurologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma). Tale software permette di confrontare il disegno effettuato dal soggetto con il modello di riferimento, visualizzabile sul monitor, (figura 4.2, modello A) e di calcolarne la superficie di deviazione in modo automatizzato.

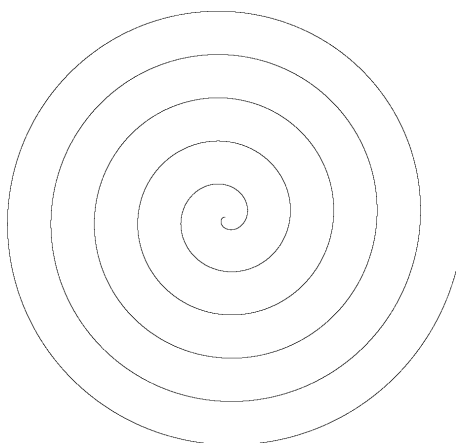
#### **4.3.2.3. Descrizione del protocollo.**

Ai soggetti è stato chiesto di tracciare la spirale sul template con una penna wireless, tenendo la penna perpendicolare alla tavoletta grafica in una posizione non convenzionale e facendo attenzione a non toccare la tavoletta con altre parti del braccio (Figura 4.3). Questa istruzione è stata accompagnata da una dimostrazione dello sperimentatore. La scelta di una posizione specifica è stata dettata dall'esigenza di uniformare il compito tra vari soggetti. Per assicurarsi che tutti i soggetti completassero la spirale in un intervallo di tempo compreso tra 40 e 50 secondi, è stato dato loro un feedback audio, in cui una voce registrata contava da uno a dieci (una unità ogni cinque secondi), tempo massimo in cui il soggetto doveva completare la prova. Al soggetto veniva chiesto di ricalcare la spirale nel modo più accurato possibile, entro il tempo stabilito, senza guardare lo schermo del computer.

Dopo aver completato ciascun trial, i soggetti potevano guardare il disegno della spirale brevemente per avere un feedback della propria performance. Tra due trials consecutivi i soggetti facevano 60 secondi di pausa. Ciascun soggetto doveva eseguire il trial per cinque volte con la mano destra e per cinque volte con la mano sinistra, alternando le mani. La decisione di limitare la sessione a 10 prove è stata presa considerando il tempo di esecuzione e per evitare l'affaticamento del soggetto.



**Figura 4.1.** Modello della spirale da posizionare sulla tavoletta grafica.



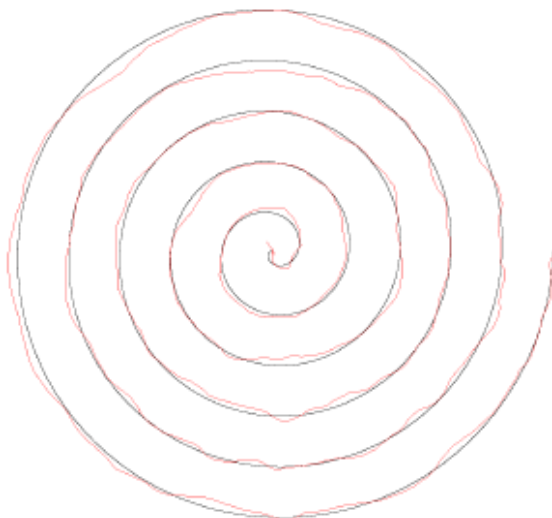
**Figura 4.2.** Modello della spirale A, utilizzato per il calcolo dell'area di scostamento.



**Figura 4.3.** Posizione della penna.

### **4.3.3. Analisi dei dati**

Per ciascun soggetto è stato registrato il tempo di esecuzione ed è stata calcolata l'area di deviazione (numero di pixel tra la linea disegnata dal soggetto e la linea del modello di riferimento – figura 4.4) di ciascun trial, utilizzando il software creato ad hoc nel nostro laboratorio. E' stata effettuata una ANOVA a due vie per misure ripetute, con TRIAL e MANO come fattori principali.



**Figura 4.4.** Esempio di traccia acquisita (in rosso) e della misura dell'area di deviazione.

#### **4.3.4. Risultati.**

Il tempo di esecuzione di ciascun trial per ciascun soggetto rientrava nel range fissato dallo sperimentatore, ovvero 40-50 secondi per trial. Per ciascun trial è stata calcolata l'area di deviazione media sia per la mano destra che per la mano sinistra (tabella 4.1). La curva discendente è evidente sia quando il soggetto svolge il compito con la mano destra che con la mano sinistra (Figura 4.5). Tale curva è stata considerata come un indicatore di apprendimento motorio. L'ANOVA<sub>RM</sub> a due vie ha evidenziato differenze significative nell'area di deviazione per il fattore mano (destra, sinistra,  $F_{(1,11)}=8.011$ ;  $P = 0.0164$ ), e per il fattore Trial (dal Trial 1 al Trial 5,  $F_{(4,10)} = 9.147$ ;  $P < 0.0001$ ) e nessun effetto significativo per l'interazione trial x mano ( $F_{(4,10)} = 0.536$ ;  $P = 0.7100$ ).

Tali risultati evidenziano che i soggetti migliorano la loro prestazione senza un effetto pavimento in entrambe le condizioni (mano destra e mano sinistra).

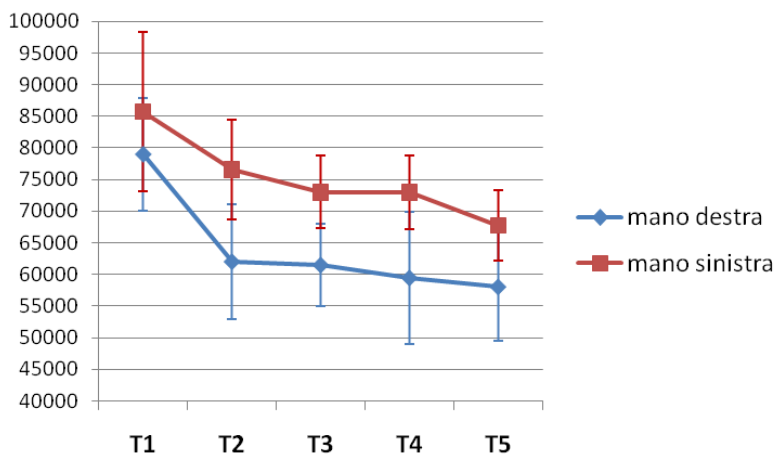
#### **4.3.5. Discussione.**

I risultati di questo primo esperimento evidenziano come nei soggetti sani è possibile evidenziare, con entrambe le mani, un miglioramento della prestazione dovuto alla pratica. Tale miglioramento è stato facilmente identificabile grazie all'utilizzo di uno strumento digitale in grado di rilevare anche piccole modificazioni nella performance al Test della Spirale di Archimede.

Osservando la prestazione dei soggetti alle diverse prove appare evidente un chiaro miglioramento dal primo al secondo trial. Non si può escludere che tale miglioramento sia riconducibile non solo al compito specifico, ma includa anche una componente di apprendimento aspecifico dello strumento di misura. Tale effetto potrebbe essere annullato sottoponendo il soggetto ad una sessione di adattamento alla condizione sperimentale.

Trial	Mano Destra (media $\pm$ Ds)	Mano Sinistra (media $\pm$ Ds)
T1	78971,55 $\pm$ 8964,302	85721,82 $\pm$ 12549,37
T2	62023,27 $\pm$ 9034,691	76577,91 $\pm$ 7872,4
T3	61497,55 $\pm$ 6444,798	73011,18 $\pm$ 5746,015
T4	59468,18 $\pm$ 10451,84	72930,73 $\pm$ 5777,715
T5	58046,64 $\pm$ 8538,138	67736,36 $\pm$ 5612,665

**Tabella 4.1.** Media e deviazione standard dell'area di deviazione nell'AST per ciascun trial. L'area si scostamento è misurata in pixels; ciascun pixel corrisponde ad un'area di 0.28 mm<sup>2</sup> sullo schermo e di circa 0.1 mm<sup>2</sup> sul foglio.



**Figura 4.5:** Medie delle aree di deviazione nella prestazione al AST in pixel per ciascun trial. La linea blu rappresenta le prestazioni con la mano destra, mentre la linea rossa rappresenta le prestazioni con la mano sinistra.

## **4.4. Esperimento 2: Effetto della tDCS catodica cerebellare sul comportamento.**

### **4.4.1. Premessa.**

E' noto che la tDCS, applicata alla corteccia motoria, può modificare in maniera duratura i potenziali evocati motori (MEP) ottenuti mediante stimolazione magnetica transcranica (TMS): l'ampiezza delle risposte muscolari è, infatti, rispettivamente aumentata e ridotta dalla tDCS anodica e catodica. Poco noti sono gli effetti comportamentali di tale stimolazione.

Di recente Galea e coll. (2009) hanno evidenziato che la tDCS catodica ha un effetto inibitorio sulla corteccia cerebellare e quindi sulla CBI, evidenziando come tale effetto abbia una durata di 30 minuti dalla fine della stimolazione. Ciò permette di avere un intervallo di tempo abbastanza lungo in cui la funzionalità cerebellare risulta momentaneamente alterata ed in cui, potenzialmente, è possibile esplorare la prestazione di questi soggetti in diversi compiti.

In questo secondo esperimento la tDCS catodica è stata applicata al cervelletto di soggetti sani utilizzando il protocollo di Galea e coll. 2009 e valutando la prestazione in un compito di apprendimento motorio.

### **4.4.2. Materiali e Metodi.**

#### **4.4.2.1. Soggetti.**

L'esperimento è stato condotto su 10 soggetti sani, di età compresa tra 22 e 40 anni (media =  $30 \pm 6.4$  anni). I soggetti non presentavano alcuna alterazione del sistema nervoso. Ciascun soggetto ha fornito il consenso a partecipare allo studio, che è stato condotto nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki.



#### **4.4.2.2. Stimolazione transcranica con corrente continua.**

La tDCS è stata applicata utilizzando uno stimolatore con corrente costante generata da una batteria (Eldith DC Stimulator, NeuroConn, Germany), per mezzo di elettrodi di gomma conduttrice inseriti in una spugna (5x7 cm) imbevuta di soluzione salina. Un elettrodo è stato posizionato sulla corteccia cerebellare, 3 cm a destra all'inion, l'altro è stato posizionato sull'osso mascellare di destra (figura 4.6). La polarità della stimolazione è riferita all'elettrodo posizionato sull'emisfero cerebellare di destra.

In tutti i soggetti la stimolazione è stata applicata con un'intensità di 2 mA per 25 minuti. Tali parametri di intensità e durata della stimolazione si sono dimostrati efficaci nel modificare l'eccitabilità cerebellare per la durata di 30 minuti (Galea et al. 2009). Durante la stimolazione, il mantenimento di un output di corrente costante è stato verificato mediante un amperometro integrato nello stimolatore.

Come condizione di controllo è stata utilizzata una stimolazione fittizia ("sham") ottenuta applicando la corrente per soli 30 secondi ogni 15 minuti.



**Figure 4.6.** Posizionamento degli elettrodi per la tDCS catodica. Il catodo (spugna blu) è posizionato 3 cm lateralmente a destra all'inion, l'anodo (spugna rosa) è stato posizionato sull'osso mascellare di destra.

#### **4.4.2.3. Protocollo sperimentale.**

Il protocollo per la valutazione degli effetti prodotti dalla tDCS è schematizzato in figura 4.8a.

Prima di effettuare la stimolazione ciascun soggetto è stato sottoposto ad una condizione di adattamento al contesto sperimentale.

Ciò è stato fatto chiedendo ai soggetti di effettuare un trial simile al modello della spirale di Archimede utilizzato per il test, caratterizzato da un passo più grande tra le linee (32 mm) ma con le stesse dimensioni e verso di rotazione (figura 4.7, modello B). Questa spirale è stata anche disegnata con una linea tratteggiata (lunghezza dello spazio bianco = 1/2 del tratto nero), ed è stato creato il modello da utilizzare sulla tavoletta grafica.

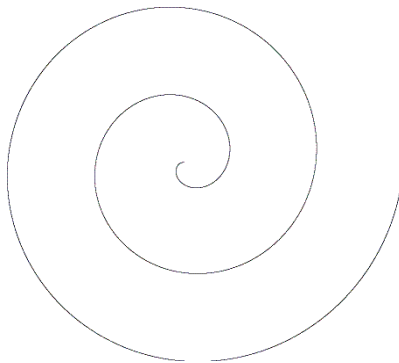
Dopo il trial iniziale, è stata applicata la stimolazione elettrica a corrente continua catodica con modalità “real” ( $n^{\circ} = 5$ ) o “sham” ( $n^{\circ} = 5$ ). I soggetti e lo sperimentatore erano all’oscuro del tipo di stimolazione somministrata.

La tDCS catodica è stata somministrata per 25 minuti ad una corrente di 2 mA.

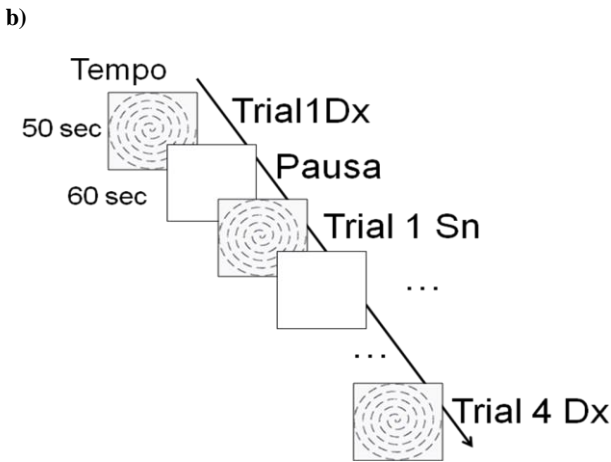
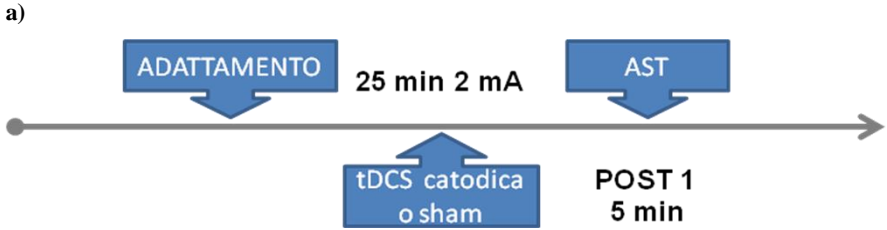
Dopo 5 minuti dalla fine della stimolazione, il Test della Spirale di Archimede è stato somministrato mediante tavoletta grafica, utilizzando il modello A (figura 4.2).

A ciascun soggetto è stato chiesto di eseguire il compito per 4 volte con la mano destra e per 4 volte con la mano sinistra, alternando le mani (figura 4.8b). L’intervallo tra un trial ed il successivo era di 60 secondi. Al soggetto è stato dato un limite di tempo per svolgere il compito (50 secondi per trial). I soggetti ricevono le stesse istruzioni date nell’esperimento 1.

I dati sono stati registrati utilizzando il software precedentemente descritto.



**Figura 4.7.** Modello della spirale B, modello della spirale per il trial di adattamento.



**Figura 4.8.** a) Protocollo generale per la valutazione degli effetti prodotti dalla tDCS cerebellare sul AST. b) Protocollo di somministrazione dell'AST.

#### 4.4.3 Analisi dei dati.

Per ciascun soggetto è stato registrato il tempo di esecuzione ed è stata calcolata l'area di deviazione per tutti i trials. E' stata effettuata una ANOVA a due vie per misure ripetute (GRUPPO x TRIAL). Tale analisi è stata replicata per entrambe le mani.

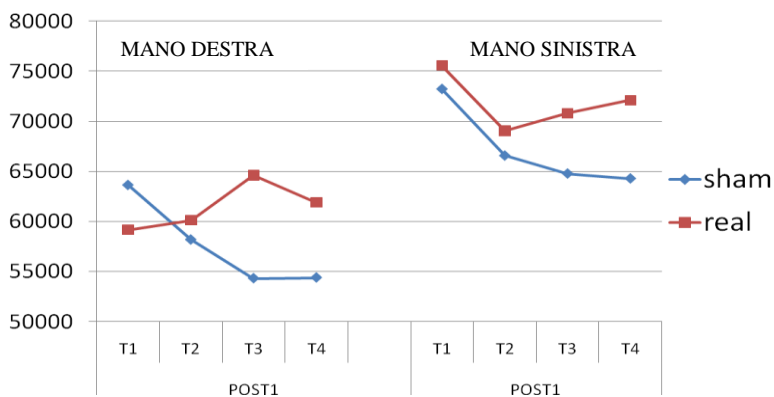
#### **4.4.4. Risultati.**

Nella tabella 4.2 è riportata l'area di deviazione media di ciascun gruppi, relativa a ciascun trial eseguito sia con la mano destra che con la mano sinistra. Il tempo di esecuzione di ciascun trial per ciascun soggetto rientra nel range fissato dallo sperimentatore, ovvero 40-50 secondi per trial.

Appare evidente ad un'analisi qualitativa delle curve relative alla prestazione di ciascun gruppo sperimentale che nel gruppo REAL (in cui è stato stimolato l'emisfero cerebellare di destra) la curva discendente, evidenziata nel gruppo LEARN, è assente sia quando i soggetti eseguono il compito con la mano destra che con la mano sinistra. Mentre, nel gruppo SHAM (in cui il cervelletto non veniva stimolato) la curva discendente è evidente sia quando il soggetto svolge il compito con la mano destra che con la mano sinistra (Figura 4.9). Tale curva è stata considerata come un indicatore di apprendimento motorio. Per entrambe le mani, l'ANOVA<sub>RM</sub> a due vie non ha evidenziato differenze significative nell'area di deviazione, sia per il fattore gruppo che per il fattore Trial; nessun effetto significativo è stato, inoltre, rilevato nell'interazione trial x gruppo. L'assenza di differenze significative a livello statistico è probabilmente dovuta al ridotto numero di soggetti (5 per il gruppo real e 5 per il gruppo sham).

	Mano destra		Mano sinistra	
Trial	Real (media ± Ds)	Sham (media ± Ds)	Real (media ± Ds)	Sham (media ± Ds)
T1	59169 ± 10140	63624 ± 12388	75567 ± 23559	73204 ± 12533
T2	60121 ± 12585	58176 ± 9899	69041 ± 14752	66558 ± 11195
T3	64626 ± 14891	54317 ± 11033	70799 ± 20637	64762 ± 16082
T4	61905 ± 10081	54391 ± 11810	72104 ± 11371	64272 ± 11929

**Tabella 4.2. Esperimento 2.** Media e deviazione standard dell'area di deviazione nell'AST per ciascun trial e per ciascuna mano, nei due gruppi sperimentali. L'area si scostamento è misurata in pixels.



**Figura 4.9. Esperimento 2.** Medie delle aree di deviazione nella prestazione al AST in pixel per ciascun trial, nei due gruppi di soggetti real e sham e per ciascuna mano. La linea blu rappresenta le prestazioni nel gruppo SHAM, mentre la linea rossa rappresenta le prestazione nel gruppo REAL.

#### **4.5. Conclusioni Studio 2.**

I risultati di tale studio evidenziano come l'assenza dell'inibizione tonica cerebellare determini una mancata capacità di apprendimento motorio. Infatti, mentre il gruppo SHAM mostra un miglioramento della prestazione all'AST nel corso delle diverse prove, paragonabile a quello del gruppo LEARN, il gruppo sottoposto alla stimolazione catodica (gruppo REAL) non mostra alcun miglioramento. Questi dati evidenziano come un'alterazione dell'attività modulatoria che il cervelletto esercita sulle aree di proiezione a livello della corteccia cerebrale abbia come correlato comportamentale una compromissione della capacità di apprendimento motorio. Tale compromissione è evidente per entrambe le mani nonostante la stimolazione sia stata applicata ad un singolo emisfero cerebellare.

Nel presente studio per ottenere una modulazione dell'attività cerebellare è stato utilizzato il protocollo di Galea e coll. (2009). Questi autori, sebbene abbiano dimostrato un effetto della tDCS sull'inibizione cerebello-corticale, non hanno trovato nessun cambiamento significativo nell'eccitabilità di M1. Infatti in assenza dell'impulso TMS condizionante a livello cerebellare, non è stata riscontrata alcuna alterazione dell'ampiezza del MEP dopo la tDCS cerebellare.

Sulla base di questi dati è lecito ipotizzare che la compromissione della capacità di un guadagno nella prestazione non sia dovuta alla semplice alterazione dell'eccitabilità di M1, ma ad un'alterazione della CBI, il cui effetto potrebbe estendersi ad un circuito più ampio coinvolto nell'apprendimento e nella programmazione del movimento.

L'assenza della curva di apprendimento in entrambe le mani a seguito della stimolazione di un singolo emisfero cerebellare esclude che l'appiattimento della prestazione all'AST possa essere dovuto ad un'alterazione puramente motoria.

## **Conclusioni.**

Il presente lavoro sperimentale ha permesso di chiarire importanti aspetti morfologici e funzionali relativi alle interazioni cerebello-corticali, con particolare riferimento al ruolo di tali interazioni nella modulazione delle funzioni cognitive (Hokkanen et al., 2006; Ito, 2008; Leggio et al. 2009; Stoodley e Schmahmann, 2009, 2010).

Il coinvolgimento del cervelletto nella regolazione di tali funzioni è ormai suffragato da numerose evidenze sperimentali che vedono tale struttura implicata in una serie di processi non solo motori, ma anche sensoriali, cognitivi ed affettivi .

Dal primo studio risulta evidente come, utilizzando un approccio integrato che prevede l'utilizzo di test neuropsicologici e tecniche avanzate di neuroimaging, l'osservazione di soggetti con danno cerebellare focale può rappresentare un modello interessante per indagare il ruolo anatomo-funzionale dei circuiti cortico-cerebellari nel processamento di informazioni relative, non solo al dominio motorio, ma anche a diversi domini cognitivi.

I dati relativi al primo studio indicano che una danno cerebellare focale può indurre cambiamenti nella densità di sostanza grigia in specifiche aree della corteccia cerebrale, coinvolte nella modulazione di specifiche funzioni cognitive. Infatti, il gruppo di soggetti con LCD presenta una riduzione della densità di sostanza grigia localizzato a livello delle aree associative con cui il cervelletto è connesso. Tale alterazione strutturale è accompagnata da un quadro di alterazione in funzioni correlate a tali aree.

Questa convergenza è rilevante per comprendere il ruolo delle interazioni cerebello-corticali nella modulazione delle funzioni cognitive. In seguito ad una lesione cerebellare, i neuroni della corteccia cerebrale controlaterale saranno, infatti, sottoposti ad una riduzione dell'input sinaptico cerebellare. Ciò può indurre una riorganizzazione strutturale dei neuroni corticali.



I nostri dati dimostrano che nei soggetti con LCD il pattern di riduzione della densità di sostanza grigia è principalmente controlaterale alla lesione cerebellare e localizzato maggiormente nella corteccia prefrontale, parietale e temporale. Tali alterazioni sono coerenti con i deficit nelle funzioni esecutive e nella memoria verbale e spaziale di tali soggetti, ma anche con la localizzazione del danno a livello del lobo cerebellare posteriore e del nucleo dentato in particolare. Tale coerenza è confermata anche dai dati ottenuti nel gruppo con LCS, in cui in assenza di un coinvolgimento omogeneo di specifiche strutture cerebellari, ed in particolare del nucleo dentato, non si evidenzia alcuna alterazione strutturale nelle aree della corteccia cerebrale, né un'alterazione in compiti cognitivi.

L'ipotesi da noi avanzata è che il coinvolgimento del nucleo dentato abbia un ruolo rilevante nel determinare riduzioni di GM nelle aree di proiezione corticale e corrispondenti alterazioni in specifiche abilità cognitive. Questa ipotesi è avvalorata dalle connessioni tra la porzione ventro-laterale del dentato e le aree associative, considerate il substrato anatomico dei processi cognitivi (Middleton and Strick, 2001). Considerata l'esistenza di circuiti cerebello-corticali segregati e paralleli, i dati descritti supportano l'ipotesi che specifici network dento-talamo-corticali siano coinvolti nella modulazione delle funzioni cognitive e che una disfunzione in una singola componente di questo network può determinare modificazioni strutturali in specifiche aree di proiezione, con conseguente alterazione di specifiche funzioni.

Nel secondo studio la possibilità di inibire l'output cerebellare, agendo sul circuito dento-talamo corticale utilizzando la tDCS, ha permesso di verificare tale ipotesi, andando ad indagare gli effetti comportamentali di tale alterazione. Di recente Galea e coll. (2009) hanno dimostrato che una tDCS catodica ha un effetto inibitorio sulla corteccia cerebellare e quindi sulla CBI, che perdura per circa 30 minuti dopo la fine della stimolazione.

La modulazione dell'inibizione tonica che le cellule del Purkinje esercitano sui nuclei cerebellari potrebbe essere alla base delle alterazioni evidenziate nei soggetti in cui è stata applicata la tDCS catodica.

In questi soggetti è evidente una compromissione della capacità di apprendimento motorio. Tale compromissione si manifesta per entrambe le mani nonostante la stimolazione sia effettuata su un singolo emisfero cerebellare, escludendo che si tratti di un deficit specificatamente motorio. Questo dato assume significato anche alla luce dei risultati dello studio di Galea e coll. (2009) in cui non si evidenzia nessun cambiamento significativo nell'eccitabilità di M1 in assenza dell'impulso TMS condizionante a livello cerebellare (vedi par. 4.1.1).

Per cui è lecito ipotizzare che la compromissione della capacità di un guadagno nella prestazione nel nostro gruppo sperimentale sia dovuta ad un'alterazione della CBI, il cui effetto potrebbe estendersi ad un circuito più ampio coinvolto nell'apprendimento e nella programmazione del movimento.

Nel complesso i dati del presente lavoro sperimentale hanno fornito un significativo apporto alla comprensione delle relazioni tra funzione e struttura del cervelletto all'interno del più ampio sistema cerebrale e tra i dati anatomici e le osservazioni cliniche.

Studi futuri dovranno essere effettuati soprattutto per approfondire la conoscenza degli effetti della modulazione cerebellare sui diversi domini cognitivi con l'obiettivo di utilizzare tale metodica anche a scopo riabilitativo.

## **Bibliografia.**

- Aas J-E. and Brodal P. (1988) Demonstration of topographically organized projections from the hypothalamus to the pontine nuclei. An experimental study in the cat. *J. Comp. Neurol.* 268: 313-328.
- Albus J.S. (1971) A theory of cerebellar function. *Math. Biosci.* 10: 25-61.
- Allen G. I. and Tsukahara N. (1974) Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol. Rev.* 54: 957-1006.
- Allen G., Buxton R.B., Wong E.C., Courchesne E. (1997) Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 275:1940-1943.
- Allen G. and Courchesne E. (2003) Differential effects of developmental cerebellar abnormality on cognitive and motor functions in the cerebellum: an fMRI study of autism. *Am J Psychiatry.*160(2): 262-73.
- Andreasen N.C., O'Leary D.S., Arndt S., Cizadlo T., Hurtig R., Rezaei K., Watkins G.L., Ponto L.L.B., Hichwa R.D. (1995a) Short-term and long term verbal memory: a positron emission tomography study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5111-5115.
- Andreasen N.C., O'Leary D.S., Arndt S., Cizadlo T., Hurtig R., Rezaei K., Watkins G.L., Ponto L.L., Hichwa R.D. 1995b. PET studies of memory: novel and practiced free recall of complex narratives. *Neuroimage* 2: 284-295.
- Andreasen N.C., O'Leary D.S., Arndt S., Cizadlo T., Hurtig R., Rezaei K., Watkins G.L. (1995c) PET studies of memory: novel versus practiced free recall of word lists. *Neuroimage* 2: 296-305.
- Andreasen N.C., O'Leary D.S., Arndt S., Cizadlo T., Hurtig R., Rezaei K., Ponto L.L., Hichwa R.D. (1996a) Neural substrates of facial recognition. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 8: 139-146.
- Andreasen N.C., O'Leary D.S., Arndt S. et al. (1996b) Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9985-9990.
- Antal A., Kincses T.Z., Nitsche M.A., Paulus W. (2003) Manipulation of phosphene thresholds by transcranial direct current stimulation in man. *Experimental Brain Research* 150(3):375-378.

- Antal A., Nitsche M.A., Kincses T.Z., Kruse W., Hoffmann K.P., Paulus W. (2004) Facilitation of visuo-motor learning by transcranial direct current stimulation of the motor and extrastriate visual areas in humans. *Eur J. Neurosci.* 19: 2888-2892.
- Appollonio I.M., Grafman J., Schwartz V., Massaquoi S., Hallet M. (1993) Memory in patients with cerebellar degeneration. *Neurology* 43: 1536-1544.
- Apps R. and Martin Garwicz M. (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 297-311.
- Artola A., Brocher S., Singer W. (1990) Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347: 69- 72.
- Ashburner J. and Friston K.J. (1997) Multimodal image coregistration and partitioning – A unified framework. *NeuroImage* 6: 209–217.
- Ashburner J. and Friston K.J. (1999) Nonlinear spatial normalization using basis functions. *Human Brain Mapping* 7: 254-266.
- Ashburner J. and Friston K.J.(2000) Voxel-based morphometry: the Methods. *NeuroImage* 11: 805–821.
- Babinski J. (1899) De l'asynergie cerebelleuse. *Rev Neurol* 7:806-816.
- Battaglia F., Quartarone A., Ghilardi M.F., Dattola R., Bagnato S., Rizzo V., Morgante L., Girlanda P. (2006) Unilateral cerebellar stroke disrupts movement preparation and motor imagery. *Clin Neurophysiol* 117:1009-1016.
- Bellebaum C. and Daum I. (2007) Cerebellar involvement in executive control. *Cerebellum* 6: 184-192.
- Bindman L.J., Lippold O.C.J., Redfearn J.W.T. (1964) The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *Journal of Physiology* 172: 369-382.
- Boddaert N, Chabane N, Gervais H, et al. (2004) Superior temporal sulcus anatomical abnormalities in childhood autism: a voxel-based morphometry MRI study. *NeuroImage* 23: 364-369.
- Bonda E., Petrides M., Frey S., Evans A. (1995) Neural correlates of mental transformations of the body in space. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11180-11184.
- Boni S., Valle G., Ciuffi R.P., Sonetti M.G., Perrone E., Tofani A., Maini C.L. (1992) Crossed cerebello-cerebral diaschisis: a SPECT study. *Nucl Med Commun* 13: 824–831.

- Booth J.R., Wood L., Lu D., Houk J.C., Bitan T. (2007) The role of the basal ganglia and cerebellum in language processing. *Brain Research* 1133: 136-144.
- Borkowsky J.G., Benton A.L., Spreen O. (1967) Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* 5: 135-140.
- Bozzali M., Filippi M., Magnani G., Cercignani M., Franceschi M., Schiatti E., Castiglioni S., Mossini R., Falautano M., Scotti G., Comi G., Falini A. (2006) The contribution of voxel-based morphometry in staging patients with mild cognitive impairment. *Neurology* 67: 453-460.
- Braitenberg V., Heck D., Sultan F. (1997) The detection and generation of sequences as a key to cerebellar function: experiments and theory. *Behav Brain Sci*, 20: 229-277.
- Brett M., Leff A.P., Rorden C., Ashburner J. (2001) Spatial normalization of brain images with focal lesions using cost function masking. *Neuroimage* 14: 486-500.
- Brodal P. (1979) The pontocerebellar projection in the rhesus monkey: an experimental study with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 4: 193-208.
- Brodal A. *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1981.
- Brooks VB, Thach WT (1981). Cerebellar control of posture and movement. In *Handbook of physiology, Section 1. The nervous system*, ed. VB Brooks, Vol. 2, Motor Control, Part II, pp. 877-946. Bethesda: Am. Physiol.Soc.
- Bushara K., Wheat J., Khan A., Mock B., Turski P., Sorenson J., Brooks B.R. (2001) Multiple tactile maps in the human cerebellum. *Neuroreport* 12: 2483-2486.
- Carbon M., Ghilardi M.F., Argyelan M., Dhawan V., Bressman S.B., Eidelberg D. (2008) Increased cerebellar activation during sequence learning in DYTI carriers: an equiperformance study. *Brain* 131: 146-154.
- Carlesimo G.A., Caltagirone C., Gainotti G. (1996) The mental deterioration battery: normative data, diagnostic reliability and qualitative analyses of cognitive impairment. The Group for the Standardization of the Mental Deterioration Battery. *Eur Neurol* 36: 378-384.
- Carpenter M.D. (1991) *Core text of neuroanatomy*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Chakravarty A. (2003) MR evaluation of crossed and uncrossed cerebral-cerebellar diaschisis. *Acta Neurol Scand* 108: 60-65.
- Chen S.H.A. and Desmond J.E. (2005) Cerebro-cerebellar networks during articulatory rehearsal and verbal working memory tasks. *Neuroimage* 24: 332-338.

- Chiricozzi F.R., Clausi S., Molinari M., Leggio M.G. (2008) Phonological short-term store impairment after cerebellar lesion: a single case study. *Neuropsychologia* 46(7): 1940-53.
- Chourchesne E., Yeung:Chourchesne R., Press G.A., Hesselink J.R. (1998) Hypoplasia of cerebellum vermal lobules VI and VII in autism. *The New England J. Medicine* 318: 1349-1354.
- Collins D.L., Neel P., Peters T.M., Evans A.C. (1994) Automatic 3D Intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space. *Journal of Computer Assisted Tomography* 18: 192-205.
- Corsi P.M. (1972) Human memory and medial temporal region of the brain. Dissertation Abstracts International 34: 891B (University Microfilms No. AAI05-77717). McGill University.
- Creutzfeld O.D., Fromm G.H., Kapp H. (1962) Influence of transcortical dc-currents on cortical neuronal activity. *Experimental Neurology* 5: 436-452.
- Daskalakis Z.J., Paradiso G.O., Christensen B.K., Fitzgerald P.B., Gunraj C., Chen R. (2004) Exploring the connectivity between the cerebellum and motor cortex in humans. *J Physiol* 557: 689-700.
- Davatzikos C., Genc A., Xu D., Resnick S.M. (2001) Voxel-based morphometry using the RAVENS maps: methods and validation using simulated longitudinal atrophy. *NeuroImage* 14: 1361-1369.
- Desmond J.E., Gabrieli J.D, Wagner A.D, Ginier B.L, and Glover G.H. (1997) Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tests as revealed by functional MRI. *Journal of Neuroscience* 17: 9675-9685.
- Desmond J.E., Chen S.H.A., DeRosa E., Pryor M.R., Pferffebaum A., Sullivan E.V. (2003) Increased frontocerebellar activation in alcoholics during verbal working memory: an fMRI study. *Neuroimage* 19: 1510-1520.
- Di Paola M., Macaluso E., Carlesimo G.A., Tomaiuolo F., Worsley K.J., Fadda L., Caltagirone C (2007) Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study. *J Neurol* 254: 774-781.
- Dimitrova A., Weber J., Redies C., Kindsvater K., Maschke M., Kolb F.P., Forsting M., Diener H.C., Timmann D. (2002) MRI atlas of the human cerebellar nuclei. *Neuroimage* 17: 240-255.
- Dimitrova A., Zeljko D., Schwarze F., Maschke M., Gerwig M., Frings M., Beck A., Aurich V., Forsting M., Timmann D. (2006) Probabilistic 3D MRI atlas of the human cerebellar dentate/interposed nuclei. *Neuroimage*. 30(1):12-25.

- Dockery C.A., Hueckel-Weng R., Birbaumer N., Plewnia C. (2009) Enhancement of planning ability by transcranial direct current stimulation. *Journal Neuroscience* 29(22): 7271-7277.
- Dow R.S. (1974) Some novel concepts of cerebellar physiology. *Mt. Sinai J. Med. (NY)*, 41:103-119.
- Dow R.S., Kramer R.E., Robertson L.T. Disorders of cerebellum. In: R. Joynt (Ed.) *Clinical Neurology*, cap. 37. New York, Lippencott, 1991.
- Doyon J., Gaudreau D., Laforce Jr., Castonguay M., Bedard P.J., Bedard F., Bouchard J.P. (1997) Role of the striatum, cerebellum and frontal lobes in the learning of a visuomotor sequence. *Brain & Cognition* 34: 218-245.
- Draganski B., Gaser C., Busch V., Schuierer G., Bogdahn U., May A. (2004) Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature* 427: 311-2.
- Dum R.P. and Strick P. L. (2003) An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 89: 634–639.
- Eccles J.C., Kostyuk P.G., Schmidt R.F. (1962) The effect of electric polarization of the spinal cord on central afferent fibres and on their excitatory synaptic action. *Journal of Physiology* 162:138-150.
- Eccles J.C., Ito M., Szentagothai J. *The cerebellum as a neural machine*. Berlin, Springer, 1967.
- Evans A.C., Kamber M., Collins D.L., Macdonald D. An MRI-based probabilistic atlas of neuroanatomy. In: *Magneting Resonance Scanning and Epilepsy*, S.S. Shorvon, D. Fish, F. Andermann and G.M.H. Bydder, eds, 1994.
- Ferrucci R., Marceglia S., Vergari M., Cogiamanian F., Mrakic-Sposta S., Mameli F., Zago S., Barbieri S., Priori A. (2008) Cerebellar transcranial direct current stimulation impairs the practice-dependent proficiency increase in working memory. *J Cogn Neurosci* 20: 1687-1697.
- Fertonani A., Rosini S., Cotelli M., Rossini P.M., Miniussi C. (2009) Naming facilitation induced by transcranial direct current stimulation. *Behavioural Brain Research* (in press).
- Fierro B., Giglia G., Palermo A., Pecoraro C., Scalia S., Brighina F. (2007) Modulatory effects of 1 Hz rTMS over the cerebellum on motor cortex excitability. *Exp Brain Res* 176: 440-447.
- Fiez J.A., Petersen S.E., Cheney M.K. (1992) Impaired non-motor learning and error detection associated with cerebellar damage. *Brain* 115: 155-178.
- Fiez J.A. and Raichle M.E. (1997) Linguistic processing. *Int Rev Neurobiol.* 41: 233-54.

- Fink G.R., Marshall J.C., Shah N.J., Weiss P.h., Hallingan P.W., Grosse-Ruyken M., Ziemons K., Zilles K., Freund H.H. (2000) Line bisection judgments implicate right parietal cortex and cerebellum as assessed by Fmri. *Neurology* 54: 1324-1331.
- Flourens P. (1824) 'Experimental Researches on the properties and functions of the nervous system in the vertebrate animal'. Trans. Wayne Dennis (1948), Readings in the History of Experimental Psychology.
- Fregni F. and Pascual-Leone A. (2007) Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nature Clin Pract Neurol* 3(7): 383-393.
- Frings B., Dimitrova A., Schorn C., Elles H.G., Hein-Kropp C., Gizewski E., Diener H., Timmann D. (2006) Cerebellar involvement in verb generation: an f MRI study. *Neurosci. Lett.* 409: 19-23.
- Friston K.J., Frith C.D., Passingham R.E., Liddle P.F., Frackowiak R.S.J. (1992) Motor practice and neurophysiological adaptation in the cerebellum: a position tomography study. *Proceeding Royal Society London (Biology)* 248: 223-228.
- Friston K.J., Ashburner J., Frith C. D., Poline J.B., Heather J.D., Frackowiak R.S.J. (1995a) Spatial registration and normalization of images. *Human Brain Mapping* 3: 165-189.
- Friston K.J., Holmes A.P., Worsley K.J., Poline J.B., Frith C.D., Frackowiak R.S.J. (1995b) Statistical parametric maps in functional imaging: A general linear approach. *Hum Brain Mapp* 2: 189-210.
- Friston K.J., Holmes A.P., Poline J.B., Price C.J., Frith C.D. (1995c) Detecting activations in PET and fMRI: Levels of inference and power. *NeuroImage* 4: 223-235.
- Gainotti G., Micelli G., Caltagirone C. (1977) Constructional apraxia in left brain-damaged patients: a planning disorder? *Cortex* 13:109-118.
- Galea J.M., Jayaram G., Ajagbe L., Celnik P. (2009) Modulation of cerebellar excitability by polarity-specific noninvasive direct current stimulation. *Journal of Neuroscience* 29(28): 9115-9122.
- Gartside I.B. (1968a) Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: reverberating circuits or modification of synaptic conductance? *Nature* 220:382-383.
- Gartside I.B. (1968b) Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis. *Nature* 220:383-384.



- Gaser C. and Schlaug G. (2003) Brain structures differ between musicians and non-musicians. *J Neurosci* 23: 9240-9245.
- Gironell A., Kulisevsky J., Lorenzo J., Barbanj M., Pascual-Sedano B., Otermin P. (2002) Transcranial magnetic stimulation of the cerebellum in essential tremor: a controlled study. *Arch Neurol* 59: 413– 417.
- Glickstein M., May J.G., Mercier B.E. (1985) Corticopontine projection in the macaque: the distribution of labelled cortical cells after large injections of Horseradish peroxidase in the pontine nuclei. *J. Comp. Neurol.* 235: 343-359.
- Gomez Beldarrain M., Garcia-Monco J.C., Quintana J.M., Llorens V., Rodeno E. (1997) Diaschisis and neuropsychological performance after cerebellar stroke. *Eur Neurol* 37: 82-89.
- Good C.D., Johnsrude I., Ashburner J., Henson R.N.A., Friston K.J., Frackowiak R.S.J. (2001) A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage* 14: 21-36.
- Gottwald B., Wilde B., Mihajlovic Z., Mehdorn H.M. (2004) Evidence for distinct cognitive deficits after focal cerebellar lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1524–1531.
- Gourovitch M.L., Kirkby B.S., Goldberg T.E., Wienberger D.R., Gold J.M., Esposito G., Van Horn J.D., Berman K.F. (2000) A comparison of rCBF patterns during letter and semantic fluency. *Neuropsychology* 14: 353-360.
- Grasby P.M., Frith C.D., Friston K.J., Bench C., Frackowiak R.S., Dolan R.J. (1993) Functional mapping of brain areas implicated in auditory– verbal memory function. *Brain* 116: 1–20.
- Grodd W., Hülsmann E., Ackermann H. (2005) Functional MRI localizing in the cerebellum. *Neurosurg Clin North Am* 16: 77-99.
- Gross-Tsur V., Ben-Bashat D., Shalev R.S., Levav M., Sira L.B. (2006) Evidence of a developmental cerebello-cerebral disorder. *Neuropsychologia* 44: 2569-2572.
- Grutzendler J., Kasthuri N., Gan W.B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420: 812-6.
- Haase A., Frahm J., Matthaei D., Hanicke W., Merboldt K.D. (1986) FLASH imaging. Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses". *J. Magn. Reson.* 67: 258.
- Haase A. (1990) Snapshot Flash MRI. Application to T1, T2 and chemical shift imaging. *Magn. Reson. Med.* 13: 77.

- Haines D. E. and Dietrichs E. (1987) On the organization of interconnection between the cerebellum and hypothalamus". In: J.S. King (Ed.) *New concepts in cerebellar neurobiology* 113-149.
- Halari R., Sharma T., Hines M., Andrew C., Simmons A., Kumari V. (2006) Comparable fMRI activity with differential behavioural performance on mental rotation and overt verbal fluency tasks in healthy men and women. *Exp Brain Res* 169: 1-14.
- Harvey R. J. Porter R., Rawson J. A. (1977) The natural discharge of Purkinje cells in paravermal regions of lobules V and VI of the monkey's cerebellum. *Journal of Physiology* 271: 515-36.
- Hattori Y., Moriwaki A., Hori Y. (1990) Biphasic effects of polarizing current on adenosinesensitive generation of cyclic AMP in rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 116: 320-324.
- Hausen H.S., Lachmann E.A., Nagler W. (1997) Cerebral diaschisis following cerebellar hemorrhage. *Arch Phys Med Rehabil* 78: 546-549.
- Hayter A.L., Langdon D.W., Ramnani N. (2007) Cerebellar contributions to working memory. *Neuroimage* 36: 943-954.
- Henning J., Naureth A., Friedburg H. (1986) Rare imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn. Reson. Med.* 3: 823.
- Hokkanen L.S.K., Kauranen V., Roine O., Salonen O., Kotila M. (2006) Subtle cognitive deficits after cerebellar infarct. *Eur J Neurol* 13: 161-170.
- Holmes G. (1939) The cerebellum of man. *Brain* 62: 1-30.
- Hummel F.C. and Cohen L.G. (2006) Non-invasive brain stimulation: a new strategy to improve neurorehabilitation after stroke? *Lancet Neurology* 5(8):708-712.
- Islam N., Aftabuddin M., Moriwaki A., Hattori Y., Hori, Y. (1995). Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Brain Research* 684: 206-208.
- Ito M. and Yoshida M. (1964). The cerebellar-evoked monosynaptic inhibition of Deiters' neurons. *Experientia* 20: 515-516.
- Ito M., Yoshida M., Obata K. (1964). Monosynaptic inhibition of the intracerebellar nuclei induced from the cerebellar cortex. *Experientia* 20: 575-576.
- Ito M. (1970) Neuropsychological aspects of the cerebellar motor control system. *Int J Neurol.* 7:162-176.

- Ito M. (1982) Experimental verification of Marr-Albus plasticity assumption for the cerebellum. *Acta Biol. Acc. Sci. Hung.* 33: 189-199.
- Ito M. (1984). *The Cerebellum and Neural Control*. Raven Press, New York.
- Ito M. (1990) A new physiological concept on cerebellum. *Rev. Neurolo. (Paris)*, 146: 564-569.
- Ito M. (1991) Long term depression. *Annu. Neurosci.* 12: 85-102.
- Ito, M. (1993) Synaptic plasticity in the cerebellar cortex and its role in motor learning. *Can. J. Neurol. Sci.* 20: S70–S74.
- Ito M. (2001). Cerebellar long-term depression—characterization, signal transduction and functional roles. *Physiol. Rev.* 81: 1143-1195.
- Ito M. (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272-303.
- Ito M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum *Nature Reviews Neuroscience* 9, 304-313.
- Ivry R.B. and Keele S.W. (1989) Timing function of the cerebellum. *J. Cogn. Neurosci.* 1: 136-152.
- Jacobson G.A., Diba K., Yaron-Jakoubovitch A. Oz Y., Koch C., Segev I., Yarom Y. (2005) Subthreshold voltage noise of rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol.* 564(1):145-60.
- Jansens J. and Brodal A. (1954) *Aspects of cerebellar*. Oslo: Grundt Tanum.
- Jenkins I.H., Brooks D.J., Nixon P.D., Frackowiak R.S., Passingham R.E. (1994) Motor sequence learning: a study with positron emission tomography. *Journal of Neuroscience* 14: 3775-3790.
- Karas G.B., Scheltens P., Rombouts S.A.R.B, et al. (2004) Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage* 23: 708-716.
- Keller S.S., Wilke M., Wieshmann U.C., Sluming V.A., Roberts N. (2004) Comparison of standard and optimized voxel-based morphometry for analysis of brain changes associated with temporal lobe epilepsy. *NeuroImage* 23: 860-868.
- Kelly P.J., Stein J., Shafqat S., Eskey C., Doherty D., Chang Y., Kurina A., Furie K.L. (2001) Functional recovery after rehabilitation for cerebellar stroke. *Stroke* 32: 530-534.
- Kelly R.M. and Strick P.L. (2003) Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J Neurosci* 23: 8432– 8444.

- Kim S.G., Ugurbil K., Strick P.L. (1994) Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science* 265: 949–951.
- Kincses T.Z., Antal A., Nitsche M.A., Bártfai O., Paulus W. (2004) Facilitation of probabilistic classification learning by transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex in the human. *Neuropsychologia* 42(1): 113-117.
- Klein D., Milner B., Zatorre R.J., Meyer E., and Evans A.C. (1995) The neural substrates underlying word generation: a bilingual functional-imaging study". *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 92: 2899-2903.
- Klingberg T., Roland P.E., Kawashima R. (1995) The neural correlates of the central executive function during working memory- a PET study. *Human Brain Mapping*, S1: 414.
- Koch G., Mori F., Marconi B., Codeca C., Pecchioli C., Salerno S., Torriero S., Lo Gerfo E., Mir P., Oliveri M., Caltagirone C. (2008) Changes in intracortical circuits of the human motor cortex following theta burst stimulation of the lateral cerebellum. *Clin Neurophysiol* 119: 2559-2569.
- Komaba Y., Osono E., Kitamura S., Katayama Y. (2000) Crossed cerebellocerebral diaschisis in patients with cerebellar stroke. *Acta Neurol Scand* 101: 8-12.
- Krienen F.M. and Buckner R.L. (2009) Segregated fronto-cerebellar circuits revealed by intrinsic functional connectivity. *Cereb Cortex*. 19(10): 2485-97.
- Kubicki M., Shenton M.E., Salisbury D.F., et al. (2002) Voxel-Based Morphometric Analysis of Gray Matter in First Episode Schizophrenia. *NeuroImage* 17: 1711-1719.
- Lang N., Nitsche M.A., Paulus W., Rothwell J.C., Lemon R.N. (2004a) Effects of transcranial direct current stimulation over the human motor cortex on corticospinal and transcallosal excitability. *Experimental Brain Research* 156: 439-443.
- Langguth B., Eichhammer P., Zowe M., Landgrebe M., Binder H., Sand P., Hajak G. (2008) Modulating cerebello-thalamocortical pathways by neuronavigated cerebellar repetitive transcranial stimulation (rTMS). *Neurophysiol Clin* 38: 289-295.
- Larsell O. and Jansen J. (1972) The comparative anatomy and histology of the cerebellum. Human cerebellum, cerebellar connections and cerebellar cortex. Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Lee D.W., Miyasato L.E., Clayton N.S. (1998) Neurobiological bases of spatial learning in the natural environment: neurogenesis and growth in the avian and mammalian hippocampus. *NeuroReport* 9: 15-27.

- Leggio M.G., Neri P., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M., Petrosini L. (1999) Cerebellar contribution to spatial event processing: characterization of procedural learning. *Exp. Brain Res.* 127: 1-11.
- Leggio M.G., Silveri M.C., Petrosini L., Molinari M. (2000) Phonological grouping is specifically affected in cerebellar patients: a verbal fluency study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69: 102–106.
- Leggio M.G., Tedesco A.M., Chiricozzi F.R., Clausi S., Orsini A., Molinari M. (2008) Cognitive sequencing impairment in patients with focal or atrophic cerebellar damage. *Brain* 31: 1332–1343.
- Leggio M.G., Chiricozzi F.R., Clausi S., Tedesco A.M., Molinari M. (2009) The neuropsychological profile of cerebellar damage: the sequencing hypothesis. *Cortex*. (Epub ahead of print).
- Leiner H.C., Leiner A.L., Dow R.S. (1986) Does the cerebellum contribute to mental skills?. *Behavioural Neuroscience*, 100: 443-454.
- Leiner H.C., Leiner A.L., Dow R.S. (1989) Reappraising the Cerebellum: What does the hindbrain contribute to the forebrain?. *Behavioral Neuroscience* 103 (5): 998-1008.
- Leiner H.C., Leiner A.L., Dow R.S. (1991) The human cerebro-cerebellar system: its computing, cognitive and language skills. *Behav. Brain Res.* 44: 113-128.
- Leiner H. C., Leiner A. L., Dow R. S. (1995) The underestimated cerebellum. *Human Brain Mapping* 2: 1-11.
- Liebetanz D., Nitsche M.A., Tergau F., Paulus W. (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain* 125:2238–2247.
- Liebetanz D., Koch R., Mayenfels S., König F., Paulus W., Nitsche M.A. (2009) Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clinical Neurophysiology* 120(6): 1161-1167.
- Liepert J., Kucinski T., Tuschler O., Pawlas F., Baumer T., Weiller C. (2004) Motor cortex excitability after cerebellar infarction. *Stroke* 35: 2484 -2488.
- Limperopoulos C., Soul J.S., Haidar H., Huppi P.S., Bassan H., Warfield S.K., Robertson R.L., Moore M., Akins P., Volpe J.J., du Plessis A.J. (2005) Impaired trophic interactions between the cerebellum and the cerebrum among preterm infants. *Pediatrics* 116: 844-850.
- Llinas R., Walton K., Hillman D.E., Sotelo C. (1975) Inferior olive: its role in motor learning. *Science*. 190: 1230–1231.

- Logan G.C., Grafton S.T. (1995) Functional anatomy of human eyeblink conditioning determined with regional cerebral glucose metabolism and positron-emission tomography. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7500-7504.
- Luciani L. (1891): *Il cervello. Nuovi studi di fisiologia normale e patologica.* Florence: Monnier, pp. 328.
- Lurito J.T., Kareken D.A., Lowe M.J., Chen S.H., Mathews V.P. (2000) Comparison of rhyming and word generation with fMRI. *Hum. Brain Mapp.* 10: 99-106.
- Lyo I.K., Kim M.J., Stoll A.L., et al. (2004) Frontal lobe gray matter density decreases in bipolar I disorder. *Biol Psychiatry* 55: 648-51.
- Maguire E.A., Spiers H.J., Good C.D., Hartley T., Frackowiak R.S., Burgess N. (2003) Navigation expertise and the human hippocampus: a structural brain imaging analysis. *Hippocampus* 13: 250-259.
- Malenka R.C. and Nicoll R.A. (1999) Long-term potentiation - a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Mansfield P. (1977) Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *J. Phys.* 10: 55.
- Mansfield P. and Pykett I.L. (1978) Biological and medical imaging by NMR. *J. Magn. Reson.* 29: 355.
- Marr D. (1969) A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol.* 202: 437-470.
- Massion J. (1988) Red nucleus: past and future. *Behav. Brain Res.* 28: 1-18.
- Matsunaga K., Nitsche M.A., Tsuji S., Rothwell J.C. (2004) Effect of transcranial DC sensorimotor cortex stimulation on somatosensory evoked potentials in humans. *Clinical Neurophysiology* 115(2): 456-460.
- Mechelli A., Crinion J.T., Noppeney U., et al. (2004) Neurolinguistics: structural plasticity in the bilingual brain. *Nature* 431: 757.
- Merzagora A.C., Foffani G., Panyavin I., Mordillo-Mateos L., Aguilar J., Onaral B., Oliviero A. (2009) Prefrontal hemodynamic changes produced by anodal direct current stimulation. *Neuroimage* (in press).
- Miall R. C., Weir D. J., Wolpert D. M., Stein J. F. (1993) Is the cerebellum a smith predictor? *J. Mot. Behav.* 25: 203-216.
- Miall R.C. and Christensen L.O.D. (2004) The effect of rTMS over the cerebellum in normal human volunteers on peg-board movement performance. *Neuroscience Lett.* 371: 185-189.

- Middleton F.A. and Strick P. (1994) Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science* 266:458-61.
- Middleton F.A. and Strick P.L. (1996a) The temporal lobe is a target of output from the basal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8683-87.
- Middleton F.A. and Strick P.L. (1996b) New concepts regarding the organization of basal ganglia and cerebellar output. In: *Integrative and molecular approach to brain function*. Ito M., Miyashita Y., pp. 253–71. Amsterdam: Elsevier Sci.
- Middleton F.A. and Strick P.L. (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31:236 –250.
- Middleton F.A. and Strick P.L. (2001) Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J Neurosci* 21: 700-712.
- Moffat S.D., Elkins W., Resnik S.M. (2006) Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol. Aging* 27: 965-972.
- Molinari M., Leggio M.G., Solida A., Corra R., Misciagna S., Silveri M.C., Petrosini L. (1997) Cerebellum and procedural learning: evidence from focal cerebellar lesions. *Brain* 120:1753–1762.
- Molinari M., Petrosini L., Misciagna S., Leggio M.G. (2004) Visuospatial abilities in cerebellar disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 235-240.
- Molinari M., Chiricozzi F.R., Clausi S., Tedesco A.M., De Lisa M. and Leggio M.G. (2008) Cerebellum and Detection of Sequences, from Perception to Cognition. *Cerebellum* 7(4): 611-615.
- Moriwaki A. (1991) Polarizing currents increase noradrenaline-elicited accumulation of cyclic AMP in rat cerebral cortex. *Brain Research* 544: 248-252.
- Mugler III J.P. and Brookeman J.R. (1990) Three-Dimensional Magnetization- Prepared Rapid Gradient-Echo imaging (3D-MPRAGE). *Magnetic Resonance in Medicine* 15: 152-157.
- Murphy M.G. and O’Leary J.L. (1971) Neurological deficit in cats with lesions of the olivocerebellar system. *Arch. Neurol.* 24: 145-157.
- Nagel M. and Zangemeister W.H. (2003) The effect of transcranial magnetic stimulation over the cerebellum on the synkinesis of coordinated eye and head movements. *Journal of the Neurological Sciences* 213: 35-45.
- Nitsche M.A. and Paulus W. (2000) Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *Journal of Physiology* 527(3): 633-639.

- Nitsche M.A. and Paulus W. (2001) Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology* 57:1899-1901.
- Nitsche M.A., Nitsche M.S., Klein C., Tergau F., Rothwell J.C., Paulus W. (2003a) Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clinical Neurophysiology* 114: 600-604.
- Nitsche M.A., Schauenburg A., Lang N., Liebetanz D., Exner C., Paulus W., Tergau F. (2003b) Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of Cognitive Neuroscience* 15(4):619-626.
- Nitsche M.A., Doemkes S., Karakose T., Antal A., Liebetanz D., Lang N., Tergau F., Paulus W. (2007) Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *Journal of Neurophysiology* 97: 3109-3117.
- Nitschke M., Kkeinschmidt A., Wessel K., Frahm J. (1996) Somatotopic motor representation in the human anterior cerebellum: a high-resolution functional MRI study. *Brain* 119: 1023-1029.
- Oldfield R.C. (1971) The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh Inventory. *Neuropsychologia* 9: 97-113.
- Oliveri M., Koch G., Torriero S., Caltagirone C. (2005) Increased facilitation of the primary motor cortex following 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the contralateral cerebellum in normal humans. *Neurosci Lett* 376: 188 -193.
- Orsini A. and Laicardi C. (2001) WAIS-R. Contributo alla taratura Italiana. Firenze: Organizzazioni Speciali.
- Oscarsson O. (1976) Spatial distribution of climbing and mossy fibre inputs into the cerebellar cortex. In: Creutzfeldt, O. (Ed.), *Afferent and Intrinsic Organization of Laminated Structures in the Brain*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 34-42.
- Oulad Ben Taib N. and Manto M. (2008) Reinstating the ability of the motor cortex to modulate cutaneomuscular reflexes in hemispherectomized rats. *Brain Res* 1204: 59-68.
- Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B. (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Parsons L.M., Fox P.T., Downs J.H., Glass T., Hirsch T.B., Martin C.C., Jerebek P.A., Lancaster J.L. (1995) Use of implicit motor imagery for visual shape discrimination as revealed by PET. *Nature* 375: 54-58.



- Parsons L.M. and Fox P.T. (1997) Sensory and cognitive functions. *Int Rev Neurobiol* 41: 255-271.
- Passingham R.E. (1975) Change in the size and organization of the brain in man and his ancestors. *Brain Behav. Evol.* 11:73-90.
- Paul R., Grieve S.M., Chaudary B., Gordon N., Lawrence J., Cooper N., Clark C.R., Kukla M., Mulligan R., Gordon E. (2009) Relative contributions of the cerebellar vermis and prefrontal lobe volumes on cognitive function across the adult lifespan. *Neurobiol Aging* 30: 457-465.
- Paulin M.G. (1988) A kalman filter theory of the cerebellum. In: *Dynamic Interactions in Neural Networks: Models and data* (M. Arbib and S. Amari, eds.), pp. 239-261. Springer-Verlag, Berlin/New York.
- Paulin M.G. (1993) The role of the cerebellum in motor control and perception. *Brain Behav. Evolut.* 41: 39-50.
- Paulus W. (2004). Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Supplements to Clinical Neurophysiology* 57: 708–714.
- Pellionisz A. and Szentágothai J. (1973) Dynamic single unit stimulation of a realistic cerebellar network model. *Brain Res.* 49: 83-99.
- Petersen S.E., Fox P.T., Poster M.I., Mintum M.A. and Raichle M.E. (1989) Positron emission tomographic studies of the processing of single words. *Journal of Cognitive Neurosciences* 1: 153:170.
- Petrosini L., Molinari M., Dell'Anna M.E. (1996) Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris Water Maze and T-Maze. *The European Journal of Neurosciences.* 8(9): 1882-96.
- Pinto A.D. and Chen R. (2001) Suppression of the motor cortex by magnetic stimulation of the cerebellum. *Exp Brain Res* 140: 505-510.
- Price S., Paviour D., Scahill R., et al. (2004) Voxel-based morphometry detects patterns of atrophy that help differentiate progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease. *NeuroImage* 23: 663-669.
- Purpura D.P. and McMurtry J.G. (1965) Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology* 28: 166-185.
- Raichle M.E., Fiez J. A., Videen T.O., Macleod A.M., Pardo J.V., Fox P.T., Petersen S.E. (1994) Practice-related changes in human brain functional anatomy during nonmotor learning. *Cerebral Cortex* 4: 8-26.

- Ramrani N. (2006) The primate corticocerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 7: 511-522.
- Raven JC (1947) Progressive matrices. Sets A, Ab, B: Board and book forms. London: Lewis.
- Reis J., Swayne O.B., Vandermeeren Y., Camus M. Dimyan M.A., Harris-Love M., Perez M.A., Ragert P., Rothwell J.C., Cohen L.G. (2008) Contribution of transcranial magnetic stimulation to the understanding of cortical mechanisms involved in motor control. *J Physiol* 586: 325–351.
- Rey A. (1958) Memorisation d'une série de 15 mots en 5 répétitions. In: *L'Examen clinique en psychologie* (Rey A, ed), pp 139–193. Paris: Universitaries de France Press.
- Rolando L. (1809) Saggio sopra la vera struttura del cervello dell'uomo e degli animali, e soprare funzioni del sistema nervoso. Sassari.
- Rorden C. and Brett M. (2000) Stereotaxic display of brain lesions. *Behavioural Neurology* 12: 191-200.
- Rousseaux M. and Steinling M. (1992) Crossed hemispheric diaschisis in unilateral cerebellar lesions. *Stroke* 23: 511-514.
- Sagiuchi T., Ishii K., Aoki Y., Kan S., Utsuki S., Tanaka R., Fujii K., Hayakawa K. (2001) Bilateral crossed cerebello-cerebral diaschisis and mutism after surgery for cerebellar medulloblastoma. *Ann Nucl Med* 15: 157-160.
- Schmahmann J.D. (1991) An emerging concept: The cerebellar contribution to higher function". *Arch. Neurol.* 48: 1178-1187.
- Schamahmann J.D. (2004) Disorders of the cerebellum: ataxia, dismetria of thought and cerebellar cognitive affective syndroms. *Journal of Neuropsychiatric & Clinical Neurosciences* 16: 367-378.
- Schamahmann J.D. and Panda D.N. (1989) Anatomical investigation of projection to the basis pontis from posterior parietal association cortices in rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 289: 53-73.
- Schamahmann J.D. and Pandya D.N. (1991) Projection to the basis pontis from the superior temporal sulcus and superior temporal region in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 308: 224-248.
- Schamahmann J.D. and Pandya D.N. (1995) Prefrontal cortex projection to the basilar pons in rhesus monkey: implications for the cerebellar contribution to higher function". *Neuroscience Letters* 199: 175-178.

- Schmahmann J.D. and Pandya D.N. (1997) The cerebrotocerebellar system. *Int Rev Neurobiol* 41: 31-60.
- Schmahmann J.D. and Sherman J.C. (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121: 561-579.
- Schmahmann J.D., Dojon J., Toga A.W., Petrides M., Evans A.C. (2000) MRI atlas of the human cerebellum. San Diego: Academic Press.
- Schmitz-Hübsch T., Tezenas du Montcel S., Baliko L. et al. (2006a) Reliability and validity of the International Cooperative Ataxia Rating Scale: A study in 156 spinocerebellar ataxia patients. *Mov Disord.* 21: 699–704.
- Schmitz-Hübsch T., Montcel S.T. et al. (2006b) Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology.* 66:1717–1720.
- Schweid L., Rushmore R.J., Valero-Cabré A. (2008) Cathodal transcranial direct current stimulation on posterior parietal cortex disrupts visuo-spatial processing in the contralateral visual field. *Experimental Brain Research* 186(3): 409-417.
- Schlosser R., Hutchinson M., Joseffer S., Rusinek H., Saarimaki A., Stevenson J., Dewey S.L., Brodie J.D. (1998) Functional magnetic resonance imaging of human brain activity in a verbal fluency task. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 64: 492-498.
- Seitz R.J. and Roland E., et al. (1990) Motor learning in man: a positron emission tomography study. *NeuroReport* 1: 17-20.
- Shepherd G.M. (2004) The synaptic organization of the brain. New York: Oxford UP.
- Shibuya-Tayoshi S., Sumitani S., Kikuchi K., Tanaka T., Tayoshi S., Ueno S., Ohmori T. (2007) Activation of the prefrontal cortex during the trail-making test detected with multichannel near-infrared spectroscopy. *Psychiatry Clin Neurosci* 61: 616-621.
- Shintani S., Shiigai T., Arinami T. (1998) Silent lacunar infarction on magnetic resonance imaging (MRI): risk factors. *J Neurol Sci* 160: 82-86.
- Silveri M.C., Leggio M.G., Molinari M. (1994) The cerebellum contributes to linguistic production: a case of agrammatic speech following a right cerebellar lesion. *Neurology*, 44:2047-2050.
- Silveri M.C., Di Betta A.M., Filippini V. (1998) Verbal short- memory store- rehearsal, system and the cerebellum. Evidence from a patient with a right cerebellar lesion". *Brain* 121: 2175-2187.

- Solomon P.R., Stowe G.T., Pendlebury W.W. (1989) Disrupted eyelid conditioning in a patient with damage to cerebellar afferents. *Behavioral Neuroscience* 103: 898-902.
- Sonmezoglu K., Sperling B., Henriksen T., Tfelt-Hansen P., Lassen N.A. (1993) Reduced contralateral hemispheric flow measured by SPECT in cerebellar lesions: crossed cerebral diaschisis. *Acta Neurol Scand* 87: 275-280.
- Sparing R., Thimm M., Hesse M.D., Küst J., Karbe H., Fink G.R. (2009) Bidirectional alterations of interhemispheric parietal balance by non-invasive cortical stimulation. *Brain* 132(11): 3011-3020.
- Spencer M.D., Moorhead T.W., McIntosh A.M., Stanfield A.C., Muir W.J., Hoare P., Owens D.G., Lawrie S.M., Johnstone E.C. (2007) Grey matter correlates of early psychotic symptoms in adolescents at enhanced risk of psychosis: a voxel-based study. *Neuroimage* 35: 1181-1191.
- Stein J.F. and Glickstein M. (1992) Role of the cerebellum in visual guidance of movement. *Physiol Rev.* Oct 72(4): 967-1017.
- Stone D.B. and Tesche C.D. (2009) Transcranial direct current stimulation modulates shifts in global/local attention. *Neuroreport* 20(12): 1115-1119.
- Stoodley C.J. and Schmahmann J.D. (2009) Functional topography in the human cerebellum: A meta-analysis of neuroimaging studies. *NeuroImage* 44: 489-501.
- Stoodley C.J. and Schmahmann J.D. (2010) Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* 46(7):831-44.
- Strick P.L., Dum R.P., Fiez J.A. (2009) Cerebellum and Nonmotor Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 32: 413-434.
- Sugihara I., Wu H.S., Shinoda Y. (2001) The entire trajectories of single olivocerebellar axons in the cerebellar cortex and their contribution to cerebellar compartmentalization. *J. Neurosci.* 21: 7715-7723.
- Talairach J. and Tournoux P. (1988) Co-planar stereotaxic atlas of human brain. New York: Thieme.
- Terzuolo C.A. and Bullock T.H. (1956) Measurement of imposed voltage gradient adequate to modulate neuronal firing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 42: 687-694.
- Thach W.T. (1967) Somatosensory receptive fields of single units in cat cerebellar cortex. *Journal of Neurophysiology* 30: 675-96.

- Thach W.T. (1968) Discharge of Purkinje and cerebellar nuclear neurons during rapidly alternating arm movements in the monkey. *Neurophysiol.* 31: 785-797.
- Thach W.T. (1970) Discharge of cerebellar neurons related to two maintained postures and two prompt movements: 2. Purkinje cell output and input. *Journal of Neurophysiology* 33: 537-47.
- Thach W.T. (1972) Cerebellar output: Properties, synthesis and uses. *Brain Research* 40: 89-97.
- Thach W.T. (1987) Cerebellar inputs to motor cortex. *Ciba Found Symp. Department of Anatomy & Neurobiology, Washington University School of Medicine, St Louis*, 132: 201-220.
- Thach W.T., Goodki H.P., Keating J.G. "The cerebellum and adaptive coordination of movement". *Annu. Neurosci.*, 15: 403-442, 1992.
- Theoret H., Haque J., Pascual-Leone A. (2001) Increased variability of paced finger tapping accuracy following repetitive magnetic stimulation of the cerebellum in humans. *Neurosci Lett* 306: 29-32.
- Thieben M.J., Duggins A.J., Good C.D., et al. (2002) The distribution of structural neuropathology in pre-clinical Huntington's disease. *Brain* 125: 1815-28.
- Thompson R.F. (1988) The neural basis of basic associative learning of discrete behavioural responses. *Trends in Neurosci.* 11: 152-155.
- Thompson R.F. (1990) Neural mechanism of classical conditioning in mammals". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 329: 161-170.
- Tielman A., Seurink R., Deblaere K., Vandamaele P., Vingerhoets G., Achten E. (2005) Stimulus pacing affects the activation of the medial temporal lobe during a semantic classification task: an f MRI study. *Neuroimage* 26: 565-572.
- Tien R.D. and Ashdown B.C. (1992) Crossed cerebellar diaschisis and crossed cerebellar atrophy: correlation of MR findings, clinical symptoms, and supratentorial diseases in 26 patients. *Am J Roentgenol* 158: 1155-1159.
- Timmann D., Konczak J., Ilg W., Donchin O., Hermsdorfer J., Gizewski R., Schoch B. (2009) Current advances in lesion-syntom mapping of the human cerebellum. *Neuroscience* 162: 836-851.
- Topka H., Valls-Sole J., Massaquoi S.G. Hallett M.N. (1991) Eyeblink conditioning in patients with cerebelalr deficits. *Movement Disorders* 7 (Suppl.), temporal sulcus (STS) in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 308: 224-248.

- Topka H., Valls-Sole J., Massaquoi S.G., Hallett M. (1992) Eyeblink conditioning in patient with cerebellar deficits. *Movement Disorders (Suppl. 7)*, 40.
- Trachtenberg J.T., Chen B.E., Knott G.W., et al. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420: 788-794.
- Trouillas P., Takayanagi T., Hallett M., et al. (1997) International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. *J. Neurol. Sci.*, 145: 205-211.
- Ugawa Y., Day B.L., Rothwell J.C., Thompson P.D., Merton P.A., Marsden C.D. (1991) Modulation of motor cortical excitability by electrical stimulation over the cerebellum in man. *J Physiol* 441: 57-72.
- Ugawa Y., Uesaka Y., Terao Y., Hanajima R., Kanazawa I. (1995) Magnetic stimulation over the cerebellum in humans. *Ann Neurol* 37: 703-713.
- Vigot R. (2003). Cerebellar long-term depression: A mechanism for learning and memory. *Medical Science (Paris)* 19: 437-441.
- Villa G., Gainotti G., De Bonis C., Marra C. (1990) Double dissociation between temporal and spatial pattern processing in patients with frontal and parietal damage. *Cortex* 26: 399-407.
- Vohn R., Fimm B., Weber J., Schnitker R., Thron A., Spijkers W., Willmes K., Sturm W. (2007) Management of attentional resources in within-modal and cross-modal divided attention tasks: an fMRI study. *Hum Brain Mapp* 28: 1267-1275.
- Voogd J., Hess D.T., Marani E. (1987). The parasagittal zonation of the cerebellar cortex in cat and monkey: topography, distribution of acetylcholinesterase, and development. In: King, J.S. (Ed.), *New Concepts in Cerebellar Neurobiology*. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 183-220.
- Voogd J. (2003) The human cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26: 243-252.
- Wassermann E.C., Epstein C.M., Ziemann U., Walsh V., Paus T., Lisamby S.H. (2008). *The Oxford Handbook of Transcranial Stimulation*. Oxford University Press, New York.
- Wechsler D. (1997) WAIS-R. Wechsler Adult Intelligence Scale Revised. Firenze: Organizzazioni Speciali.
- Weyer A., Abele M., Schmitz-Hübsch T. et al. (2007) Reliability and validity of the scale for the assessment and rating of ataxia: a study in 64 ataxia patients. *Mov Disord.* 22:1633-1637.
- Wilson W.C. and Magoun H.W. (1945) The functional significance of the inferior olive. *J. Comp. Neurol.* 83: 69-77.

- Wolpert D. M. and Miall R. C. (1996) Forward models for physiological motor control. *Neural Netw.* 9:1265–1279.
- Womack M. and Khodakhah K. (2002) Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *Journal of Neuroscience* 22: 10603–10612.
- Wood R.P., Cherry S. R., Mazziotta J.C. (1992) Rapid automated algorithm for aligning and reslicing PET images. *Journal of Computer Assisted Tomography* 16: 620-633.
- Worsley K.J., Marrett S., Neelin P., Vandal A.C., Friston K.J., Evans A.C. (1996) A unified statistical approach for determining significant voxels in images of cerebral activation. *Hum Brain Mapp* 4: 58-73.
- Wright I.C., McGuire P.K., Poline J.B., et al. (1995) A voxel-based method for the statistical analysis of gray and white matter density applied to schizophrenia. *NeuroImage* 2: 244-252.
- Xiang H., Lin C., Ma X., Zhang Z., Bower J.M., Weng X., Gao J-H. (2003) Involvement of the cerebellum in semantic discrimination: an fMRI study. *Hum. Brain Mapp.* 18: 208-214.
- Yamada M., Hirao K., Namiki C., Hanakawa T., Fukuyama H., Hayashi T., Murai T. (2007) Social cognition and frontal lobe pathology in schizophrenia: a voxel-based morphometric study. *Neuroimage* 35: 292-298.
- Yamauchi H., Fukuyama H., Nagahama Y., Okazawa H., Konishi J. (1999) A decrease in regional cerebral blood volume and hematocrit in crossed cerebellar diaschisis. *Stroke* 30: 1429-1431.
- Yeo C.H., Hesslow G. (1998) Cerebellum and conditioned reflexes. *Trend in Cognitive Sciences* 2: 322-330.
- Zhu L., Scelfo B., Tempia F., Sacchetti B., Strata P. (2006) Membrane excitability and fear conditioning in cerebellar Purkinje cell. *Neuroscience.* 140(3): 801-10.

## Appendice 1

### Descrizione del modello della spirale.

Il modello della spirale è stato con l'ausilio di un software utilizzando l'equazione della spirale di Archimede:

$$r = a * t$$

dove  $r$  è il raggio,  $t$  è l'angolo ed  $a$  è il fattore spirale. Dato che vi è una relazione lineare tra il raggio e l'angolo, la distanza tra i giri è costante.

Questa può essere convertita in due equazioni parametriche:

$$x = a * r * \cos(t)$$

$$y = a * r * \sin(t)$$

Il modello utilizzato ha 5.5 giri e un passo di  $16 * 2\pi$  pixel: questi parametri hanno generato una spirale di  $1057 \times 1007$  pixels, corrispondente a circa il 55% della larghezza ed all'84% dell'altezza dello schermo con una risoluzione di  $1920 \times 1200$  pixels.

Questo modello è stato stampato in scala per corrispondere al 55% della larghezza ed all'84% dell'altezza della superficie attiva della tavoletta grafica (modelo:  $L \times H = 102.48 \times 97.6$  mm; passo = 9.76 mm). In questo modo è stato possibile far coincidere il modello stampato con il modello digitale sullo schermo del computer, al fine di poter analizzare lo scostamento dal modello della traccia disegnata dal soggetto. Inoltre, il modello stampato è stato disegnato a linea tratteggiata con 55 spazi bianchi, di lunghezza pari ad  $\frac{1}{2}$  del tratto nero, per riprodurre le caratteristiche della spirale dell'ICARS, una scala motoria comunemente usata in ambito clinico.



**Appendice 2**  
**Pubblicazioni**