

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XX CICLO

**MAPPATURA DELL'INSULA DI REIL E DELLE REGIONI PERISILVIANE
DEL MACACO MEDIANTE MICROSTIMOLAZIONE INTRACORTICALE:
RISPOSTE COMPORTAMENTALI E MODULAZIONE DEL
SISTEMA NERVOSO AUTONOMO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese

Tutor:

Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese

Tesi di Dottorato del dott. Fausto Caruana

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Ai miei indimenticabili nonni

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
2. L'INSULA DI REIL E LE REGIONI PERISILVIANE	11
2.1. L'Insula di Reil: aspetti filogenetici	11
2.2. Parcellazione anatomica dell'Insula di Reil e delle Regioni Perisilviane	12
2.3. Connessioni cortico-corticali dell'Insula di Reil e delle Regioni Perisilviane	17
2.4. Connessioni cortico-sottocorticali dell'Insula di Reil	22
2.4.1. Connessioni talamiche	22
2.4.2. Principali connessioni sottocorticali	26
2.5. Proprietà funzionali dell'Insula di Reil del Macaco	28
2.5.1. Insula media-anteriore e opercolo frontale	29
2.5.2. Insula posteriore e opercolo parietale	33
2.6. Dati funzionali elettrofisiologici su Uomo	35
2.7. Obiettivi del presente lavoro	40
3. MATERIALI E METODI	43
3.1. Addestramento dei soggetti sperimentali	43
3.2. Impianto del sistema di fissaggio della testa e della camera di registrazione	43
3.3. Localizzazione del sito di impianto della camera	44
3.3.1. Valutazione delle coordinate mediante precedenti casi	45
3.3.2. Valutazione delle coordinate stereotassiche dell'insula da atlante	45
3.3.3. Valutazione delle coordinate stereotassiche dell'insula mediante MRI	46
3.4. Tecniche di localizzazione funzionale del sito corticale di entrata	46
3.5. Tecniche di localizzazione del microelettrodo: la visualizzazione ecografica	47
3.6. Tecniche di microstimolazione intracorticale dell'Insula di Reil e delle regioni perisilviane	49

3.6.1. Strumentazione tecnica per la microstimolazione intracorticale	50
3.6.2. Valutazione dei parametri di stimolazione	51
3.6.3. Short train ICMS (ST-ICMS)	52
3.6.4. Behavioral Time Scale ICMS (BTS-ICMS)	52
3.6.5. Protocollo sperimentale di stimolazione	53
3.7. Procedure di registrazione dell'attività cardiaca durante ICMS	54
3.8. Analisi delle variazioni della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo durante ICMS	56
3.8.1. Analisi HR per singole stimolazioni	56
3.8.2. Analisi HR per popolazione	57
3.8.3. Analisi di popolazione con variabile "emisfero"	60
4. RISULTATI	61
4.1. Short Train ICMS (ST-ICMS)	61
4.1.1. Organizzazione rostro-caudale	61
4.1.2. Distribuzione delle soglie temporali	62
4.2. Behavioral Time Scale ICMS (BTS-ICMS)	64
4.2.1. Risposte Comunicative	64
4.2.2. Risposte Motorie e Sensoriali	66
4.2.3. Risposte Viscerali	68
4.2.4. Risposte Miscellanee	70
4.3. Variazioni della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo durante ICMS	71
4.3.1. Risultati dell'analisi HR per singole stimolazioni	72
4.3.2. Risultati dell'analisi HR per popolazione	75
4.3.3. Analisi di popolazione con variabile "emisfero"	80
5. DISCUSSIONE	81
5.1. Short Train ICMS (ST-ICMS)	81

5.1.1. Confronto con precedenti studi di ICMS	82
5.1.2. Somatotopia dorsoventrale della regione anteriore	84
5.1.3. Stimolabilità e granularizzazione	84
5.2. Behavioral Time Scale ICMS (BST-ICMS)	85
5.2.1. Risposte Comunicative	85
5.2.2. Risposte Sensorimotorie e Visceromotorie	86
5.2.3. Risposte Miscellanee	88
5.3. Variazione della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo	90
5.3.1. Profilo delle risposte ECG	90
5.3.2. Distribuzione delle variazioni della frequenza istantanea lungo l'asse anteroposteriore	91
5.3.3. Lateralizzazione nella modulazione della frequenza cardiaca istantanea	92
6. APPENDICE: L'ICMS COME METODO D'INDAGINE	95
6.1. Breve storia della stimolazione elettrica	95
6.2. ICMS a treni brevi (ST-ICMS) e a scala comportamentale (BTS-ICMS)	98
6.3. Il metodo	100
6.3.1. Impulsi	100
6.3.2. Stimolatore	101
6.3.3. Polarizzazione	101
6.3.4. Resistenza del tessuto	102
6.3.5. Diffusione di corrente	103
6.4. Osservazioni sui parametri adottati nel presente studio	104
7. BIBLIOGRAFIA	107

1. INTRODUZIONE

Buried in the depth of the lateral fissure lies the enigmatic island of Reil, whose functions and affinities are totally unknown.

Von Bonin G. & Bailey P., 1947

La notion d'épilepsie insulaire, restée dans un certain anonymat après les travaux de Penfield, a bénéficié d'un regain d'intérêt au cours des dix dernières (...). Cependant, aucune étude systématique de l'épilepsie insulaire n'a été conduite et la sémiologie clinique des crises insulaires demeure inconnue.

Isnard J. & Mauguière F., 2005

Tra il Gennaio 1996 ed il Dicembre 2001, cinque pazienti soggetti ad epilessie farmacoresistenti vengono studiati al Dipartimento di Neurologia Funzionale ed Epilettologia di Lyon per una valutazione prechirurgica. La sintomatologia riportata dai pazienti verte principalmente, e in prima battuta, sulla percezione di parestesie e sensazioni spiacevoli diffuse lungo un'ampia regione comprendente bocca, gola e laringe, con sensazioni di costrizione e di soffocamento, sensazioni spiacevoli alla laringe, tensione alle ghiandole sublinguali, formicolii del labbro e delle guance, parestesie alle gengive, movimenti oroalimentari, deglutizione e ipersalivazione. In una seconda fase dell'attacco si manifestano deficit linguistici (disartria e mutismo), distonie e contrazioni cloniche degli arti superiori e del volto, fino ad una conclusiva perdita di contatti col mondo esterno (Isnard et al., 2004).

Negli stessi anni, tra il 1999 ed il 2001, un'equipe del Bispebjerg Hospital di Copenhagen (Christensen et al., 2005) studia l'andamento elettrocardiografico di 43 pazienti nelle prime 24 ore immediatamente successive al verificarsi di un ictus, selezionandoli in base al sito corticale. La lesione corticale acquisita provoca nei pazienti osservati una batteria di interessanti conseguenze sull'andamento cardiaco: tachicardia sinusale con una frequenza cardiaca superiore ai 120 bpm, una percentuale maggiore al 10% di battiti ectopici e uno slivellamento del tratto ST. In particolare, viene segnalata la presenza di una lateralizzazione tale per cui le lesioni localizzate nell'emisfero destro risultano caratterizzate da fibrillazione atriale, blocco atrio-ventricolare, battiti ectopici e

onda T invertita. Inoltre, le lesioni localizzate nell'emisfero destro mostrano secondo il gruppo danese un'interessante correlazione con il fenomeno di morte improvvisa a 3 mesi dall'ictus ("sudden death").

Nessuna particolare variazione ECG, ne' alterazione del tratto QT, è invece riportata dal gruppo del Dipartimento di Neurologia di Losanna, in Svizzera, quando tra il 1990 ed il 1999 vengono investigate le conseguenze di ictus localizzati in una regione corticale attigua e immediatamente posteriore a quella studiata dall'equipe danese. I 4 pazienti descritti dal gruppo svizzero (Cereda et al., 2002) riportano invece cinque specifiche classi di manifestazioni cliniche: stereoagnosia e deficit sensoriali della modalità tattile, dolorifica superficiale e termica localizzati al volto, al braccio, al tronco, alla gamba; disordini gustativi (come l'incapacità nel discriminare soluzioni saline o acide); sindrome vestibolare (perdita di equilibrio, instabilità, difficoltà a camminare); episodi ipertensivi e disordini neuropsicologici (afasia, disartria, somatoparafenìa).

Concludendo questa breve panoramica neuropsicologica: nel novembre del 2000 una breve comunicazione apparsa sulla rivista *Nature Neuroscience* (Calder et al., 2000) riporta il caso di N.K., un ragazzo di 25 anni soggetto ad una lesione cerebrale localizzata nello stesso sito corticale dei pazienti descritti precedentemente. N.K. ha normali capacità visive ed uditive, ed è in grado di riconoscere volti noti, come quelli di persone famose, identificandone regolarmente nome e occupazione; tuttavia, quando gli viene domandato di riconoscere l'espressione emotiva rappresentata in immagini standard come quelle della serie di Ekman e Friesen, N.K. riconosce correttamente tutte le espressioni con la sola eccezione del disgusto, il quale viene generalmente confuso con un'espressione di rabbia. Sorprendentemente, allorché N.K. viene sottoposto a suoni non verbali associati ad espressioni emotive, l'errore di riconoscimento dell'espressione di disgusto si ripresenta nuovamente, mentre tutte le altre espressioni vengono correttamente identificate, dimostrando quindi la transmodalità del deficit. Ancora più sorprendente è il fatto che, quando sottoposto a scenari in grado di suscitare disgusto nei soggetti di controllo, N.K. mostra un grado di sensibilità molto basso a tale emozione, rinforzando ulteriormente l'ipotesi di un deficit transmodale comune a compiti percettivo/cognitivi (riconoscimento e discriminazione di espressioni emotive di disgusto) e ad esperienze emotive in prima persona (essere disgustato).

La breve scaletta clinica e neuropsicologica presentata mostra una sequenza di diverse tipologie di deficit conseguenti lesioni corticali, che attraversa i domini cognitivo, emozionale, somatosensoriale, visceromotorio e cardiorespiratorio. Proprio a causa di tale varietà di domini interessati, risulta sorprendente sapere che la diagnostica per immagini, eseguita nei differenti ospedali e centri di ricerca, ha mostrato come in tutti i pazienti sopra descritti una medesima e circoscritta regione corticale risulta essere interessata: l'Insula di Reil.

L'Insula di Reil è un'ampia struttura corticale descritta per la prima volta nel 1796 dall'anatomista e fisico tedesco Johann Christian Reil, dal quale prende il nome; l'intera area è nascosta all'interno del solco del Silvio, coperta dall'opercolo frontoparietale, dorsalmente, e dall'opercolo temporale, ventralmente, e la sua estensione è tale da far sì che essa venga comunemente descritta come il quinto lobo cerebrale: il

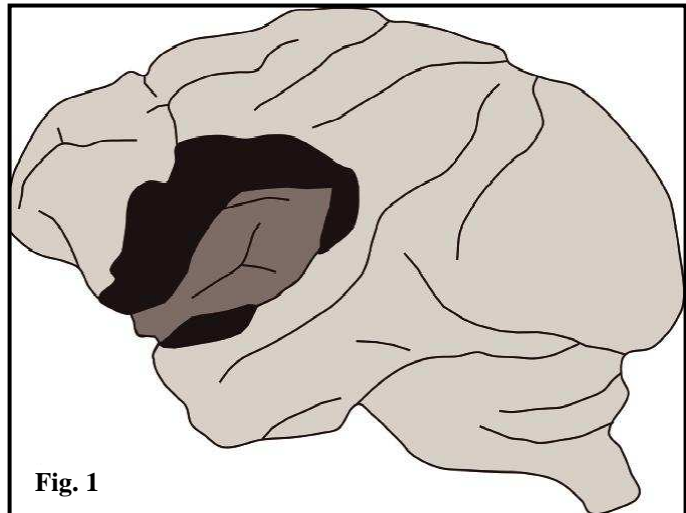


Fig. 1

lobo cerebrale medio. La fig.1 (modificata da Showers & Lauer, 1961) mostra la superficie laterale dell'insula, in grigio, resa visibile a seguito della rimozione degli opercoli frontoparietale e temporale, rappresentati in nero.

In linea generale, e come abbiamo potuto comprendere dalle citazioni in apertura, il numero di studi neurofisiologici dedicati agli aspetti funzionali di quest'area è decisamente ridotto, soprattutto se confrontato con il numero di studi dedicati ai lobi frontali, parietali, occipitali e temporali. Le citazioni sopra riportate, la prima dei neuroanatomisti e neurochirurghi Von Bonin e Bailey e la seconda dei neurofisiologi Isnard e Mauguière, distano l'una dall'altra più di mezzo secolo, ma convergono su un punto sostanziale e fondamentalmente immutato: di questa regione del cervello si conosce poco. In effetti, quanto riportato nel 2005 da Isnard e Mauguière a proposito della scarsità di studi sulle epilessie dell'insula, è in realtà qualcosa di estendibile più in generale alle nostre attuali conoscenze neurofisiologiche e funzionali relative a questa regione. Secondo il fisiologo portoricano José Guillermo Frontera (1956), le ragioni di tale oblio vanno ricercate in primo luogo nelle difficoltà incontrate dall'approccio neurofisiologico classico a causa dell'inaccessibilità alla regione: la posizione profonda, l'opercolarizzazione, l'alta vascolarizzazione (l'insula è attraversata dall'arteria cerebrale media). Di contro, la conoscenza dell'organizzazione funzionale di questa regione si mostra sempre più urgente dato lo sviluppo ed il perfezionamento di metodologie di ricerca per immagini, le quali sempre più spesso individuano attivazioni insulari nel corso di esperimenti votati ad individuare il supporto anatomico di processi cognitivi, emotivi e percettivi, ma anche – come abbiamo peraltro appreso dal report del gruppo di neurologi danese – di un controllo superiore di modulazione del sistema cardiorespiratorio.

2. L'INSULA DI REIL E LE REGIONI PERISILVIANE

As a whole, the picture of the insular region that emerges [...] is that of an extreme heterogeneity, both in terms of histological architecture and neural connections

Clascà F., Llamas A., Reinoso-Suàrez F., 2000

2.1. L'Insula di Reil: aspetti filogenetici

Seguendo la posizione proposta nella prima metà del secolo scorso da Ariëns Kappers (Ariëns Kappers 1920, 1921; Ariëns Kappers et al., 1936), il quale definisce la regione dell'insula come la corteccia cerebrale prossima al claustrum, esistono solo tre ordini di mammiferi che presentano tale formazione: i carnivori, gli ungulati e i primati. In questi tre ordini di mammiferi il grado di opercolarizzazione è minore, fino ad una totale esposizione dell'insula, nelle forme più primitive, mentre diventa via via maggiore nelle forme più evolute; l'opercolarizzazione non è mai totale né nei carnivori, né negli ungulati, mentre una opercolarizzazione totale si ha esclusivamente nell'uomo. Landau (1934) ha evidenziato l'esistenza di una correlazione inversa tra il grado di espansione ed opercolarizzazione dell'insula e la riduzione dell'olfatto che, come vedremo, è modalità sensoriale rappresentata nell'insula. Nei primati superiori come le grandi scimmie, l'opercolarizzazione ha una crescita progressiva, tale da includere la regione insulare del macaco più regioni adiacenti, sia rostralmente che ventrocaudalmente; compare il solco centrale dell'insula, presente anche nell'uomo, ma assente nel macaco (fig.2).

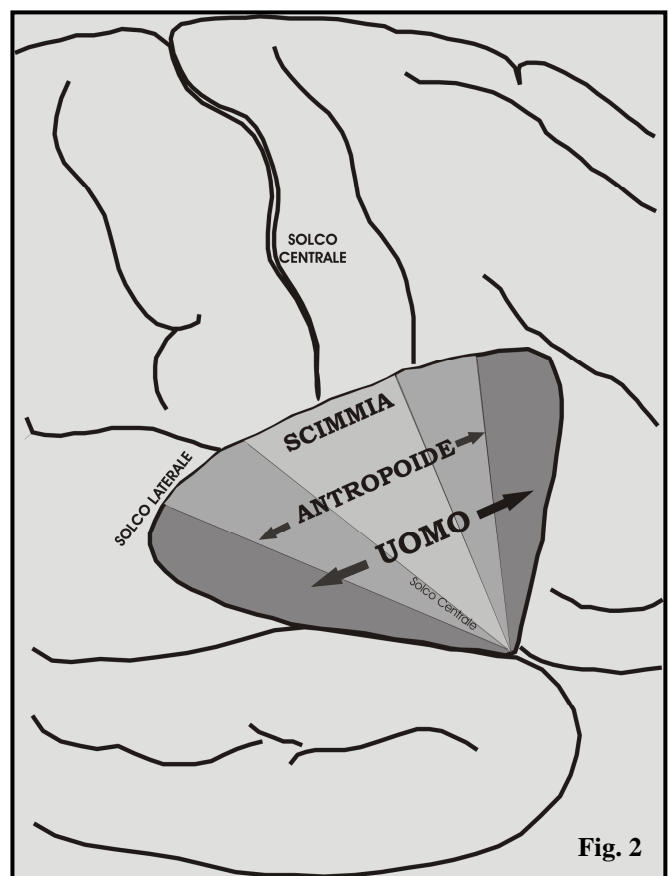


Fig. 2

Tuttavia, indipendentemente dalla definizione anatomica proposta da Ariëns Kappers, la maggioranza degli studi anatomici, odologici ed elettrofisiologici sull'insula provengono oggi da

esperimenti condotti sul ratto, mentre esistono studi sull'architettonica dell'insula del delfino (Jacobs et al., 1984; Manger et al., 1998) che dimostrano la continuità citoarchitettonica con quella dei primati.

L'ipotesi filogenetica di una graduale opercolarizzazione dell'insula trova eco negli studi ontogenetici relativi alla crescita prenatale della regione del solco del Silvio. Nel 1912 Streeter ha sostenuto che la corteccia dell'insula è la prima corteccia ad andare incontro a sviluppo e differenziazione nel feto. Tale osservazione è stata confermata e sviluppata recentemente. Nel 2007 un'equipe dell'Università di Lyon ha mostrato (Afif et al., 2007) l'andamento degli stadi morfologici relativi allo sviluppo di solchi e giri dell'insula umana dalla tredicesima alla ventottesima settimana gestazionale. È stato suddiviso l'iter cronologico in cinque stadi di sviluppo; di particolare interesse è il terzo stadio, posto tra la ventesima e la ventiduesima settimana gestazionale, durante la quale inizia l'opercolarizzazione dell'insula e al contempo il solco centrale dell'insula diventa visibile. Durante questo stadio, lo sviluppo opercolare procede principalmente dal lobo parietale e temporale, mentre tarda l'opercolarizzazione dovuta al lobo frontale. Tale processo risulta essere accelerato nell'emisfero destro. La chiusura dell'insula posteriore si completa nel periodo che va dalla ventiquattresima settimana alla ventiseiesima, mentre è soltanto nel corso della ventisettesima (per l'emisfero destro) e ventottesima (per nell'emisfero sinistro) settimana gestazionale che l'opercolarizzazione dell'insula diviene completa. Dall'iter cronologico presentato sono di particolare interesse due dati: la tarda opercolarizzazione, la quale offrirà una possibile interpretazione dei dati architettonici relativi all'insula e alle regioni perisilviane, e la dissomiglianza tra lo sviluppo dell'emisfero destro e del sinistro, la quale invece apre l'eventualità di una lateralizzazione degli aspetti funzionali, un punto, questo, ancora oggi particolarmente controverso.

2.2. Parcellazione anatomica dell'Insula di Reil e delle Regioni Perisilviane

Il più importante studio sull'architettonica e l'odologia dell'Insula di Reil lo si deve a M.M. Mesulam e E.J. Mufson, i quali nel 1982 pubblicarono un celebre articolo in tre parti su *Journal of Comparative Neurology* in cui descrissero in maniera approfondita l'architettonica, le afferenze e le efferenze corticali dell'insula e delle regioni orbitali e temporopolari immediatamente circostanti. Per quanto occupi un ruolo di primo piano, lo studio di Mesulam e Mufson non è tuttavia uno studio isolato; al contrario, molti studiosi (Robert & Akert, Sanides, Jones & Burton, Krubitzer, per citare i principali) si sono occupati, sia prima che dopo il 1982, di descrivere da un punto di vista neuroanatomico questa regione.

Tutte le architettoniche presenti concordano nel suddividere in tre campi architettonici la regione, sebbene tale parcellazione sia stata raggiunta di volta in volta impiegando diverse metodiche: Robert & Akert 1963, e Jones & Burton 1976 mediante l'analisi della distribuzione di perikarya mentre Sanides 1968, il quale giunge ad una conclusione simile sebbene non del tutto identica alle precedenti, considera la distribuzione di mielina. Mesulam & Mufson 1982 propongono la loro parcellazione basandosi su un'analisi congiunta sulla distribuzione di perikarya, mielina e acetilcolinesterasi (AChE). La tripartizione è la seguente:

- *Campo Agranulare (Iag)*. Occupa la porzione anteriore ventrale dell'insula ed include parte della allocorteccia olfattiva prepiriforme (POC). Sono distinguibili tre strati agranulari, manca il IV strato ed il V ed il VI sono fusi insieme; è presente uno strato di fibre mieliniche e un alto livello di AChE intracorticale. In nessun altro settore dell'insula il livello di AChE raggiunge il livello presente nel settore agranulare.
- *Settore Disgranulare (Idg)*. Occupa la porzione immediatamente dorsocaudale rispetto al campo agranulare, e risulta essere fra i tre il campo più esteso; questo campo vede l'emergere di un IV strato granulare, e l'inizio di una graduale differenziazione del II strato dal III. Il V ed il VI strato sono ancora difficilmente separabili. La mielina è scarsa, e principalmente concentrata negli strati profondi. Il livello di AChE è minore rispetto al campo agranulare.
- *Settore Granulare (Ig)*. Occupa la porzione caudale dell'insula; è una corteccia del tutto granularizzata; il II ed il III non sono cospicui, il III è maggiormente differenziato nella porzione dorsale; il IV strato è ben visibile ma meno differenziato rispetto all'opercolo. Si nota un incremento della mielina ed una scarsa presenza di AChE.

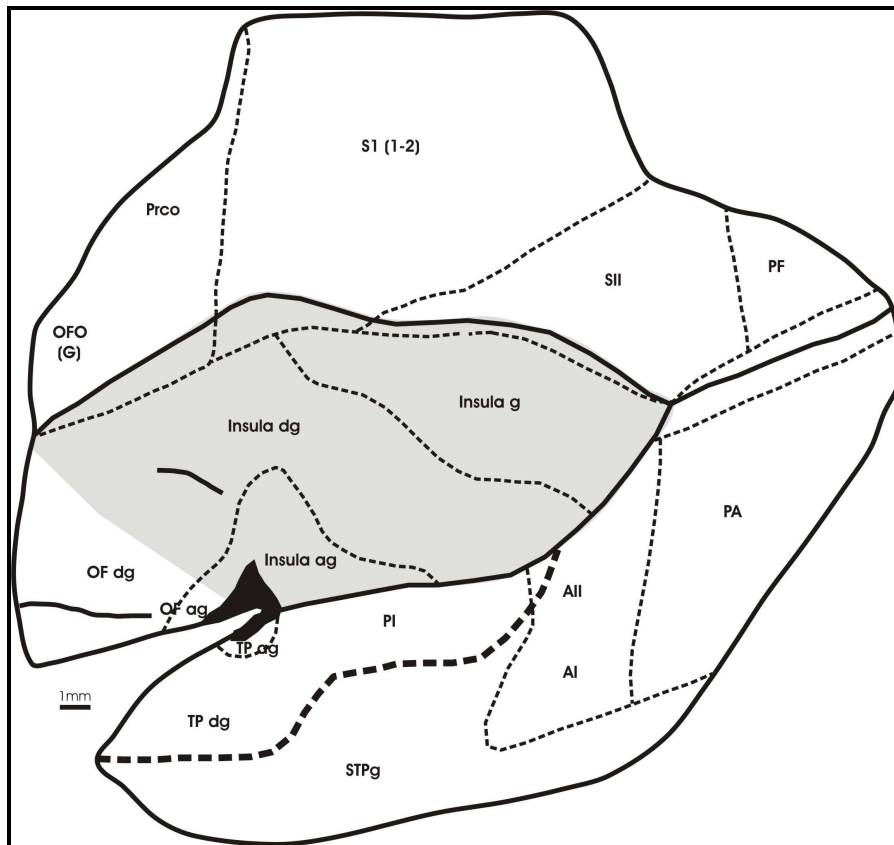


Fig. 3 (modificata da Mesulam & Mufson, '82)

In tutti e tre i campi insulari, si osserva comunque una generale scarsità di stratificazione e colonnizzazione, rispetto ad esempio alle aree temporali o parietali. L'unica architettura che si discosta lievemente da quella appena presentata è quella di Sanides '68, il quale descrive una componente anteriore peripaleocorticale contenente due strati corticali agranulari, seguita da tre componenti proisocorticali che mostrano un progressivo andamento in termini di granularizzazione. Come si vede, dunque, anche Sanides mantiene l'idea di una granularizzazione che si sviluppa gradualmente nella porzione caudale dell'insula. Tra gli anni '60 e gli anni '70 Sanides riprende e sviluppa una teoria secondo la quale la neocorteccia è il risultato di un duplice graduale sviluppo dell'allocorteccia. L'allocorteccia è costituita da due centri gravitazionali distinti: la paleocorteccia, riconducibile al corpo amigdaloidale, e l'archicorteccia, riconducibile alla regione ippocampale. Queste due protocortecce sono filogeneticamente precedenti lo sviluppo della neocorteccia e sono presenti già negli anfibi. Solo dai rettili in poi si ha la formazione di una peri-allocorteccia, cioè un duplice sviluppo delle due forme di allocorteccia: una peri-paleocorteccia (regione insulare anteriore, la quale fu infatti definita da VonBonin & Bailey 1947 "*an unfinished workmanship*") e una peri-archicorteccia (regione della corteccia cingolata). Le due regioni si espandono, rispettivamente, in linea laterale e mediale, fino ad incontrarsi, nella scimmia, nella convessità del lobo frontale a livello del solco principale. La peri-paleocorteccia, in particolare, dovrebbe sorgere

indicativamente presso la porzione anteriore dell'insula, a livello della POC. Essendo la POC parzialmente inglobata dal campo agranulare dell'insula, ne conseguirebbe l'assunto secondo il quale l'insula anteriore corrisponderebbe ad una delle regioni più arcaiche della corteccia. Questo assunto diventerà di particolare interesse quando prenderemo in considerazione gli aspetti funzionali della regione.

Un interessante passo avanti lungo le fila di questo ragionamento lo si deve, ancora una volta, agli studi di Mesulam e Mufson, i quali ipotizzano, sempre su base architettonica, che non solo l'insula bensì tutta la corteccia paralimbica (insula anteriore, polo temporale e corteccia orbitale) sia stata oggetto di uno sviluppo a cerchi concentrici, il cui centro è dato dalla POC, che si sviluppa con un anello agranulare prima (Iag, OFag, TPag), uno disgranulare successivo (Idg, OFdg, TPdg, PI), fino ad uno granulare (Ig, OFO, STP, AI, opercolo parietale) e una koniocortex finale (Retroinsula, AI, BA3). La POC, infatti, è solo in parte inglobata nel campo agranulare dell'insula, mentre la restante parte appartiene ai campi agranulari della corteccia orbitofrontale e temporopolare (fig.3). Essi sostengono (Mesulam & Mufson 1982, pag.2) di aver notato *“very close parallels between the organization of the insula and that of the lateral orbitofrontal and temporopolar regions. These parallels are so striking that it becomes desirable to approach the insulo-orbital-temporopolar region collectively and as a single entity”*. L'espansione della paleocorteccia ipotizzato da Sanides, dunque, potrebbe seguire verosimilmente questo iter architettonico.

In effetti, è possibile osservare in fig.3 quanto sostenuto da Mesulam & Mufson a proposito dello sviluppo a cerchi concentrici dell'intera regione perisilviana: la fig.3 mostra un unfolding del solco del Silvio di un emisfero sinistro di macaco Rhesus. È visibile chiaramente l'organizzazione rostrocaudale dei settori architettonici dell'insula sopra descritta. Il campo dell'insula agranulare condivide la POC, in nero, con i campi agranulari orbitofrontale (OFag) e temporale (TPag). Dorsalmente, il campo dell'insula disgranulare è in continuità con il settore disgranulare orbitofrontale (OFdg) posto rostralmente, con il settore agranulare/disgranulare dell'opercolo frontale (PrCO) posto dorsalmente, e con il settore disgranulare temporale (PI e TPdg) posto ventralmente. L'insula granulare è in continuità con il parietale opercolare (SII) e con le regioni granulari e ipergranularizzate dell'opercolo temporale (AII, AI, PA).

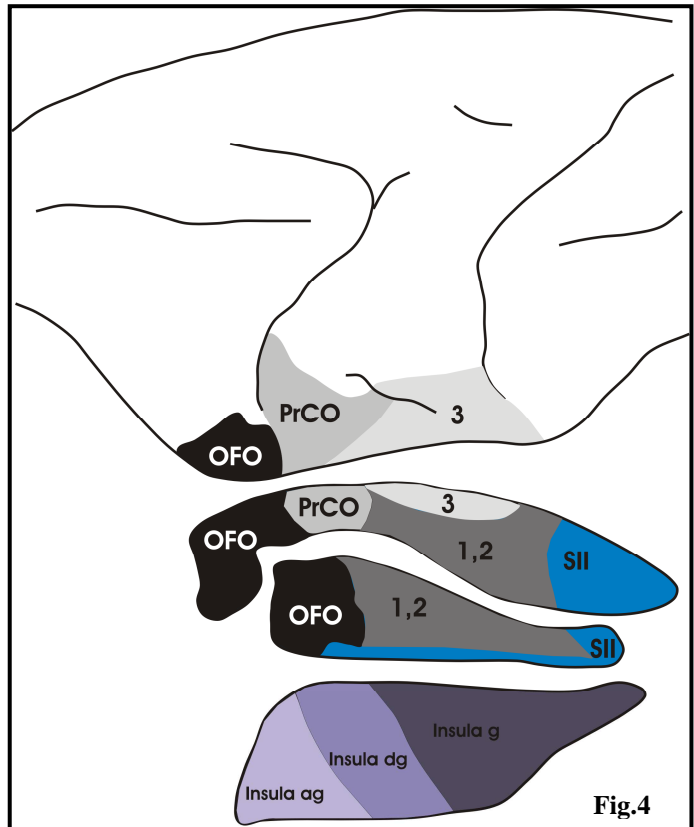
Recentemente un gruppo svizzero di neurochirurgia funzionale e fisiologia guidato dalla Prof.ssa Morel (Morel et al., 2008) ha iniziato uno studio di anatomia comparata sull'architettura dell'insula nella scimmia e nell'uomo. Il criterio impiegato è un criterio multiarchitettone in cui vengono messe a confronto diverse tecniche immuno-istochimiche (proteine leganti il calcio, SMI-32, acetilcolinesterasi), Nissl e mielina. I risultati preliminari aggiornati al 2008 mostrano diverse suddivisioni ritagliabili all'interno dei domini architettonici classici; inoltre, sembra esistere una

stretta corrispondenza tra i domini rinvenuti nel cervello della scimmia e analoghi domini presenti nell'uomo. Tale studio permetterà dunque di estendere all'uomo alcune importanti considerazioni derivate dagli studi su modelli animali. Inoltre, lo studio della Prof.ssa Morel getterà luce anche sull'organizzazione architettonica delle regioni perisilviane, come quelle dell'opercolo frontoparietale.

L'architettura della regione perisilviana dorsale all'insula è stata descritta in maniera approfondita nel 1963 da Robert & Akert (fig.4). La regione dell'opercolo frontoparietale è stata suddivisa da questi autori in due porzioni, l'una più esterna (inferior face) e una più interna (inner face).

La parte più anteriore di entrambe le porzioni opercolari è occupata dall'*opercolo orbitofrontale (OFO)* la cui costituzione architettonica ricalca quella della corteccia frontale granulare. È di interesse l'osservazione degli autori per cui il passaggio tra l'OFO, il quale esce in parte dall'opercolo, e le adiacenti aree 8 e 6, è comunque graduale.

Caudalmente a OFO è posto l'*opercolo precentrale (PrCO)* il quale, pur occupando la regione immediatamente laterale all'area premotoria ventrale, differisce da



quest'ultima in termini di spessore totale e di una maggiore evidenza di un IV strato, ovviamente invisibile nella premotoria ventrale, che è agranulare. Le caratteristiche del III strato rimandano a quelle di un III strato della corteccia frontale granulare. Il VI strato è suddiviso in due zone.

Posteriormente a PrCO troviamo le *aree opercolari postcentrali* (area 3, 1-2, SII). L'area 3, ipergranularizzata, interessa solo parzialmente l'opercolo, poiché occupa prevalentemente la parte esposta lungo il silviano (outer face) e solo in parte raggiunge l'inferior face. Dorsalmente all'area 3, si trova una regione molto estesa, che occupa più di due terzi dell'intero opercolo frontoparietale (inferior e inner face) e che architettonicamente mostra continuità con il pattern del giro postcentrale, ragion per cui è stata denominata da Robert & Akert '63, appunto, Area 1-2; va ricordato tuttavia che la denominazione è basata esclusivamente su caratteristiche architettoniche e

non esistono prove di una analogia con il ruolo funzionale delle somatiche primarie del giro postcentrale.

Il campo posto caudalmente all'area 1-2 è occupato dall'area somatica secondaria opercolare (SII). L'anomalia relativa a questa regione, secondo Robert & Akert 1963, sta nel fatto che sebbene da un punto di vista architettonico SII segue i pattern della corteccia granulare postcentrale, il suo largo spessore, la differenziazione del III strato e la presenza di un distinto gradiente nella dimensione delle cellule, la rende d'altra parte simile ad una corteccia motoria precentrale. Va detto che la regione identificata da Robert & Akert 1963 prima e da Jones & Burton 1976 dopo come SII, è stata recentemente oggetto di una riclassificazione ad opera del gruppo diretto dalla prof.ssa Krubitzer, la quale nel corso degli anni '90 ha proposto una ridefinizione dell'opercolo parietale. In particolare, secondo una metodica incrociata di studi anatomici e funzionali, è stato suggerito che la porzione posteriore dell'opercolo parietale contenga in realtà due campi distinti: il più anteriore denominato PV (Parietale Ventrale) mentre il campo posteriore resta identificato con l'area somatica secondaria SII.

2.3. Connessioni cortico-corticali dell'Insula di Reil e delle Regioni Perisilviane

I primi studi odologici sull'insula sono stati condotti negli anni '50 da Pribram mediante una neuronografia basata sulla stricnina. Sebbene tali studi siano stati in grado di identificare precisi pattern cortico-corticali coinvolgenti le regioni orbitali, temporopolari, opercolari e le regioni supratemporali, poi confermate mediante studi più recenti, la metodologia impiegata non poteva essere considerata attendibile a causa di problemi intrinseci al metodo, primo fra tutti il problema della diffusione transinaptica.

Studi successivi (citati da Mesulam & Mufson 1982b) condotti tra la fine degli anni '60 e l'inizio degli anni '80 hanno indagato la connettività corticale dell'insula mediante la degenerazione anterograda, ovvero la degenerazione di regioni connesse all'insula a seguito della lesione chirurgica della stessa; questa metodica ha permesso di evidenziare importanti connessioni con la convessità prefrontale inferiore, la corteccia orbitofrontale, l'area 6 ed il giro precentrale, la corteccia somatosensoriale primaria, il lobulo parietale inferiore e l'opercolo frontoparietale. All'inizio degli anni '80 Mesulam & Mufson hanno portato avanti uno storico progetto di studio delle afferenze ed efferenze corticali della stessa regione mediante l'iniezione di traccianti neuronali, anterogradi e retrogradi (HRP, TAA). Il vantaggio di questo lavoro va ricercati in primo luogo nell'identificazione delle diverse circuiterie corticali tenendo conto delle diverse sottoregioni identificate architettonicamente dagli stessi autori. Lo studio ha messo in evidenza come seppur tutti

e tre i campi insulari siano connessi con il lobo frontale, il lobo parietale, la corteccia cingolata ed il lobo temporale, l'importanza e il peso di tali connessioni vari a seconda del campo architettonico, e come esista un gradiente di connessioni insulari cortico-corticali in registro con la parcellazione anatomica. Studi odologici con traccianti neuronali nelle regioni insulari del gatto (Clascà et al., 2000) e del ratto (Shi & Cassell, 1998) hanno evidenziato trend di connessioni analoghi a quelli identificati nei primati, rafforzando ulteriormente l'ipotesi di una sua precoce e sostanzialmente inalterata formazione evolutiva

Per quanto riguarda lo studio delle connessioni cortico-corticali dell'opercolo frontoparietale, il numero di studi dedicati alla parte interna dell'opercolo (inferior ed inner face) è senz'altro scarsa, mentre esistono diversi studi concentrati sulla porzione più prossima alla convessità. In un lavoro di Cipolloni & Pandya del 1999 sono state tracciate le connessioni anterograde e retrograde dell'opercolo frontoparietale lungo tutta la sua estensione rostrocaudale, sebbene il sito di iniezione spesso si estenda fino all'outer face immediatamente esterno all'inferior face dell'opercolo. Le connessioni della regione temporopolare sono invece state studiate da Moràn, Mesulam e Mufson nel 1987 per mezzo di traccianti anterogradi.

- *Insula Anteriore (Iag, Idg ant.)* è il campo con più forti connessioni con il lobo frontale. Il prefrontale è marcato soprattutto nella regione laterale e orbitofrontale: orbitale laterale, opercolo orbitofrontale (OFO), OF granulare (11 e 13) e, moderatamente, con la 46, la 12, e l'OF agranulare e disgranulare. Nella corteccia postarcuata, Luppino e collaboratori (1993) hanno descritto una parziale marcatura in premotoria ventrale (PMv) e F6 (pre-SMA). Le connessioni con il lobo parietale sono scarse, principalmente limitate alla regione laterale dell'area somatica primaria (campo di rappresentazione della bocca). Anche le connessioni con la corteccia cingolata sono scarse e prevalentemente nella corteccia cingolata anteriore (ACC), nella 24 e nel solco tra la 24 e la 6 mesiale. Più interessanti sono invece le connessioni con il lobo temporale, che mostrano una marcatura in tutta la regione del polo temporale (agranulare e disgranulare) e una minore, ma pur presente, marcatura nella porzione anteriore del STS. L'insula anteriore non ha alcuna connessione con regioni caudali del lobo temporale, come le aree uditive AI e AII. Sono inoltre identificate forti connessioni interne al campo agranulare con la corteccia olfattiva prepiriforme (POC).

- *Insula Media-anteriore (Idg)* risulta essere una zona di transizione in ambito odologico così come lo è in ambito architettonico; si ha una marcatura frontale complessivamente paragonabile a quella della regione anteriore, ma con l'assenza di connessioni con l'opercolo orbitofrontale (OFO) e in PrCO, mentre si ha un complessivo incremento della marcatura nel lobo parietale che

comprende, oltre alla citata somatica primaria, SII, il lobulo parietale superiore PE, ed il lobulo parietale inferiore rostrale (PF rostrale). L'insula media-anteriore non risulta essere connessa con regioni più caudali del lobulo parietale inferiore, come PF caudale, PFG, PG. Le connessioni con la corteccia cingolata sono moderate, e limitate alle aree 23 e 24. Le connessioni con il lobo temporale si differenziano da quelle della regione anteriore e si avvicinano a quelle dell'insula posteriore: AI, AII, PA, retroinsula (RI) e la porzione anteriore del STS. Assenti le connessioni con la POC.

- *Insula Posteriore (Idg, Ig)* completa il passaggio graduale lungo l'asse rostrocaudale con una complessiva diminuzione di connessioni frontali e un incremento delle connessioni parietali. Sono estese le connessioni con il lobulo parietale inferiore (PF, PFG, PG), con SII ed SI opercolare, e parziali con il lobulo parietale superiore PE. Le connessioni con la corteccia cingolata sono estese ma di moderata intensità, prevalentemente con 23, 24 e con la regione del solco tra 24 e 6 mesiale. Il lobo temporale è connesso con l'insula posteriore relativamente a TPag, PI, TPg, alle aree uditive AI e AII, e al STS. Moderatamente connesse con questa zona sono inoltre PA e la retroinsula RI. Nessuna connessione con la POC è presente in questo campo.

- *Opercolo frontoparietale anteriore* include l'opercolo orbitofrontale (OFO) e l'opercolo precentrale (PrCO). È connesso prevalentemente con il lobo frontale, in particolare con la 46v, 10, 12. Le connessioni postarcuate sono concentrate nella regione laterale della PMv (campo di rappresentazione della bocca) fino a PrCO, e nella regione laterale al ramo inferiore del solco arcuato, tra l'OFO e PrCO. Forti sono le connessioni con l'insula anteriore dorsale e, in misura minore, con l'insula anteriore ventrale, mentre non si registra marcatura nelle porzioni caudali dell'insula.

- *Aree opercolari postcentrali (area 3, 1-2)* hanno limitate connessioni con il prefrontale, esclusivamente a livello della 46v. Maggiori sono le connessioni con la premotoria, in particolare con il banco posteriore del solco arcuato (F5a e F5p) e con la convessità della premotoria ventrale (F5c e F4). L'area motoria primaria F1 è interessata nella sua porzione più laterale, e così anche la regione precentrale laterale dell'area somatica primaria. Nel lobo parietale sono diffuse le connessioni con l'area somatica primaria postcentrale, con il lobulo parietale inferiore e con il banco inferiore del solco intraparietale. Le connessioni con le regioni perisilviane riguardano tutto l'opercolo frontoparietale e la porzione dorsale dell'insula.

- *Opercolo parietale* è costituito da una regione più anteriore, PV, e da una somatica secondaria più caudale. Le connessioni delle due aree riguardano, frontalmente, la convessità laterale della premotoria ventrale (F5c e PrCO), il banco posteriore laterale del solco arcuato (F5a) e l'area somatica primaria precentrale (Belmalih et al., 2007). Una scarsa marcatura è presente nell'opercolo orbitofrontale (OFO) ed estesamente lungo l'opercolo frontoparietale. Nel lobo parietale, le connessioni sono rivolte alla regione ventrale dell'area somatica primaria, all'area somatica primaria opercolare e al lobulo parietale inferiore anteriore (PF). La principale differenza tra la circuiteria di PV e quella di SII sta nelle maggiori connessioni della prima con la corteccia premotoria, con l'area somatica primaria opercolare e con la corteccia parietale posteriore, nonché con l'auditory belt.

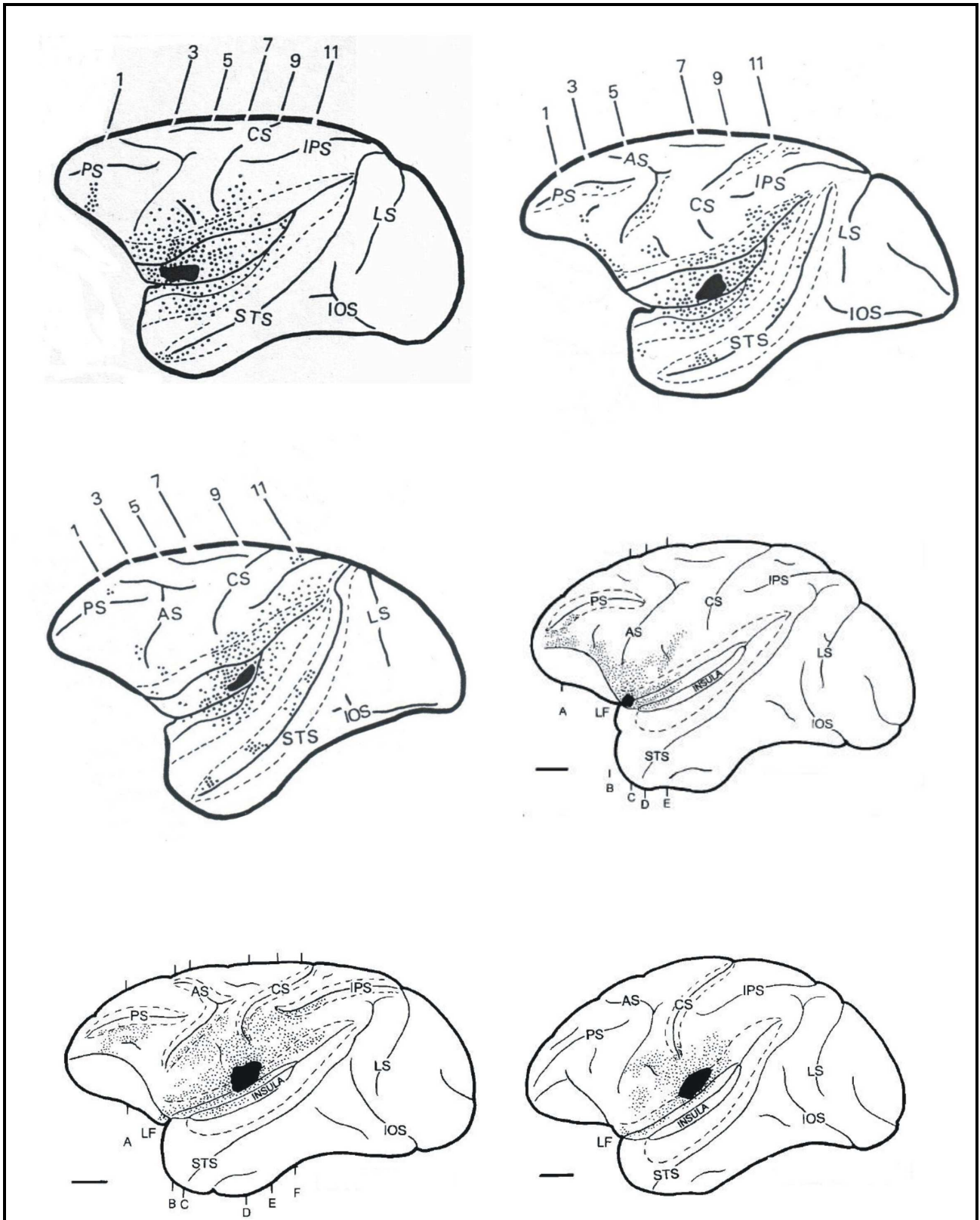


Fig. 5 – Marcature a seguito di iniezioni di traccianti neuronali, rispettivamente, nell'insula anteriore, media e posteriore (Mesulam & Mufson '82) e in tre regioni dell'opercolo frontoparietale (Cipolloni & Pandya '99). Relativamente all'odologia insulare è interessante notare come lo spostamento lungo l'asse rostrocaudale sia accompagnato da un graduale abbandono delle regioni di rappresentazione della bocca (orbitofrontali, premotorie e somatosensoriali), da un graduale incremento di marcatura nelle regioni parietali, e lungo il solco temporale superiore.

- *Opercolo Temporale.* Le connessioni corticali prevalenti della regione temporopolare disgranulare riguardano insula e lobo frontale. L'insula è interessata nel suo campo agranulare e disgranulare, ma non nel campo granulare. Sono descritte inoltre connessioni con la POC. Le connessioni con il lobo frontale interessano prevalentemente la regione orbitofrontale e prefrontale mediale (area 10 mediale, corteccia paraolfattiva e subcallosale) e, in minor misura, l'area 10 laterale ed il giro cingolato anteriore supracallosale. Questa regione, e più in generale tutta la regione del polo temporale, è complessivamente poco nota e abbastanza enigmatica; ricopre il ruolo anatomico di zona di transizione tra l'allocorteccia olfattiva e la corteccia associativa granulare del lobo temporale ed è comunemente considerata un sito di convergenza tra input sensoriali (uditivi, visivi e olfattivi) e limbici.

2.4. Connessioni cortico-sottocorticali dell'Insula di Reil

Come emergerà dai capitoli successivi, al fine di comprendere a pieno la funzione dell'Insula di Reil, ed in particolare il suo ruolo nella modulazione del sistema nervoso autonomo, una particolare attenzione va prestata alle connessioni cortico-sottocorticali.

2.4.1. Connessioni talamiche

Queste connessioni ricoprono un ruolo di particolare interesse in quanto permettono di stabilire una segregazione rostrocaudale relativa alla tipologia di afferenze autonome. Riportiamo qui sotto le connessioni principali intrattenute dai nuclei talamici con l'Insula di Reil e con le regioni perisilviane.

- *Nucleo Ventrale Posteriore Mediale, parvicellulare (VPMpc).* Nel 1963 Robert & Akert scoprono per mezzo di un esperimento di degenerazione retrograda un primo importante pezzo del mosaico delle connessioni insulari sottocorticali: provocando la distruzione della corteccia insulare anteriore e media (Iag e Idg) e considerando la degenerazione che interviene nelle regioni ad essa connesse, scoprono che l'alterazione maggiore non è a carico del nucleo ventro postero mediale (VMP) come si credeva, bensì prevalentemente a carico di una piccola porzione talamica a ridosso dello stesso, ovvero la parte parvicellulare del VPM (VPMpc). Analoghe lesioni a carico della sola superficie opercolare non mostrano degenerazione del VPMpc. I dati di Robert & Akert sono poi stati replicati da Mesulam & Mufson 1984, in un esperimento sulle connessioni talamo-insulari mediante traccianti neuronali. Il VPMpc è connesso con il nucleo del tratto solitario (NTS), il quale riceve informazioni provenienti dai nervi cranici relative a gusto e olfatto, ma inoltre partecipa alla

regolazione di diversi riflessi autonomici. Ne risulta che l'insula anteriore, il VPMpc ed il NTS partecipano ad un circuito implicato nella processazione di informazioni relative al sistema nervoso autonomo, e specificatamente al sistema parasimpatico.

- *Nucleo Ventro Postero Mediale (VPM)*. Nonostante le connessioni della regione dell'insula anteriore e media riguardino prevalentemente il VPMpc, anche il VPM risulta essere coinvolto nella circuiteria opercolare. In particolare, la porzione mediobasale (VPMmb) risulta essere connessa con le regioni dell'opercolo pericentrale (area 1-2 opercolare) e ritrasmette informazioni della modalità sensoriale relative alla lingua e alla cavità orofaringea; la porzione dorsolaterale (VPMdl), implicata nella ritrasmissione delle sensazioni cutanee della regione facciale, non coinvolge le regioni perisilviane direttamente.
- *Complesso Mediale Dorsale (MD)*. La divisione ventrale paralamellare di questo nucleo va incontro ad una massiva degenerazione a seguito dell'ablazione della corteccia opercolare orbitofrontale (OFO) e, in minore misura, dell'insula anteriore. In tutti i casi di lesioni a carico di regioni opercolari e insulari diverse da OFO e insula anteriore, il nucleo MD risulta essere risparmiato. Nel 1963 il significato funzionale di questa connessioni talamo-corticale risultava sconosciuta, seppure già allora era noto il ruolo del MD ventrale nell'inibizione della respirazione e la sua connessione con la vocalizzazione e con la deglutizione fosse sospettata da Robert & Akert. Il nucleo MD ha intense connessioni con il sistema limbico, in particolar modo con ipotalamo ed amigdala, e risulta essere coinvolto in un circuito implicato nella processazione di informazioni motivazionali ed affettive.
- *Nucleo Ventrale Laterale*. Si tratta di una regione talamica implicata nella funzione motoria, ed è connessa con il cervelletto e con settori dei gangli della base. Questo nucleo non è connesso direttamente con l'insula, ma raggiunge porzioni dell'opercolo frontoparietale. In particolare, la degenerazione della regione mediobasale (VLmb) interviene a seguito della lesione di PrCO.
- *Nucleo Ventrale Posteriore Inferiore (VPI)*. Il VPI è connesso con l'insula posteriore e con l'opercolo parietale (PV/SII) e media informazioni relative a sensazioni somestetiche. Sono state descritte afferenze di questo nucleo relative all'attività dei recettori del Pacini, afferenze dal midollo spinale e dalla corteccia somatosensoriale. Craig (2002) descrive questa porzione del talamo come un ritrasmettente di informazioni relative al sistema simpatico provenienti dalla Lamina I del

midollo spinale. Vengono ritrasmesse dal VPI informazioni di natura omeostatica quali temperatura, nocicezione, attività ormonale ed immunologica.

- *Pulvinar*. È connesso con tutta l'insula e con il polo temporale anteriore, e riceve informazioni dall'ipotalamo, dall'amigdala e dalla corteccia orbitofrontale; si tratta di un centro di convergenza degli input di alto livello con input limbici. La stimolazione del Pulvinar provoca l'arresto della respirazione e alterazioni di natura vascolare, mentre studi di registrazione dell'attività neuronale hanno dimostrato una modulazione durante la fase di reward. È implicato nel comportamento autonomico e al contempo motivazionale.
- *Il Gencolato Mediale* è connesso con l'insula posteriore e con il polo temporale anteriore e veicola informazioni di natura uditiva; come abbiamo visto, anche le connessioni cortico-corticali mostrano una rete odologica comprendente le aree uditive. Come vedremo, anche dal punto di vista funzionale esistono prove di un ruolo dell'insula posteriore nella processazione dell'informazione visiva.
- *Il nucleo Supragenicolato* riceve dal collicolo superiore informazioni relative a modalità sensoriali somatosensoriali, uditive e visive. È connesso esclusivamente con la porzione posteriore dell'insula; riceve dal collicolo superiore e veicola informazioni multimodali: somestesiche, uditive e visive. Sono descritte inoltre connessioni con la regione temporopolare disgranulare anteriore.

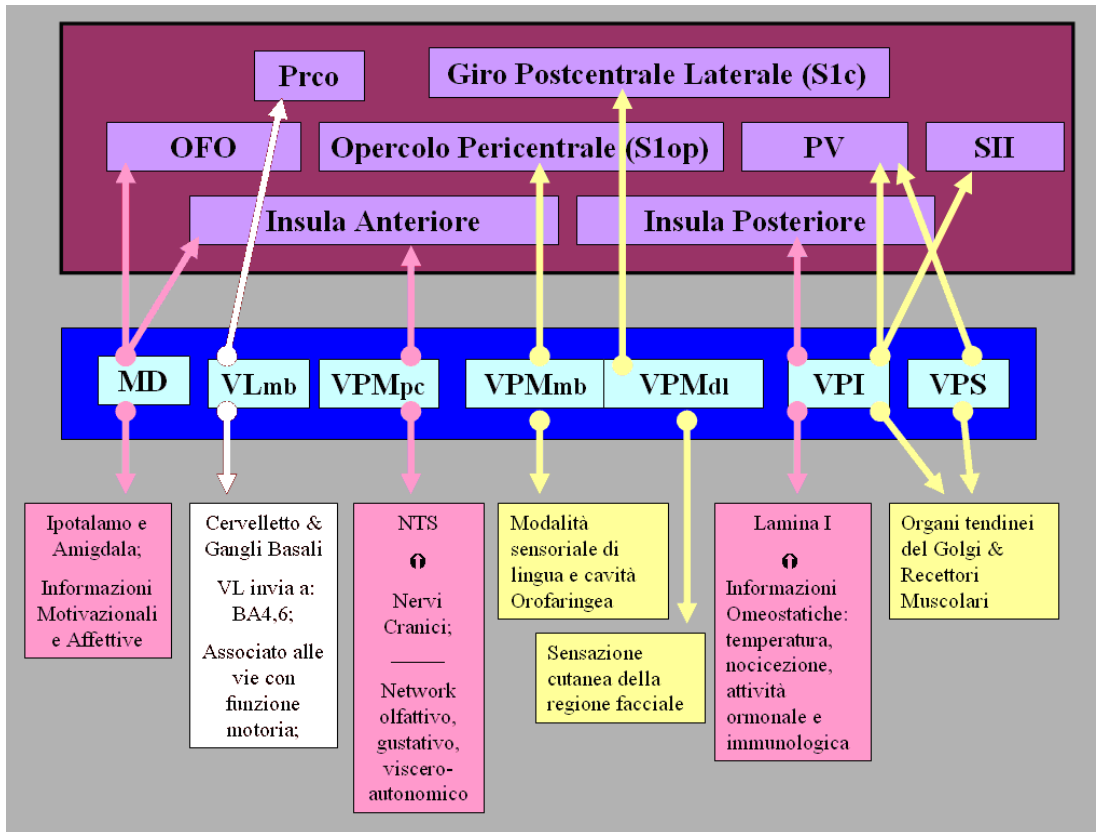


Tabella 1

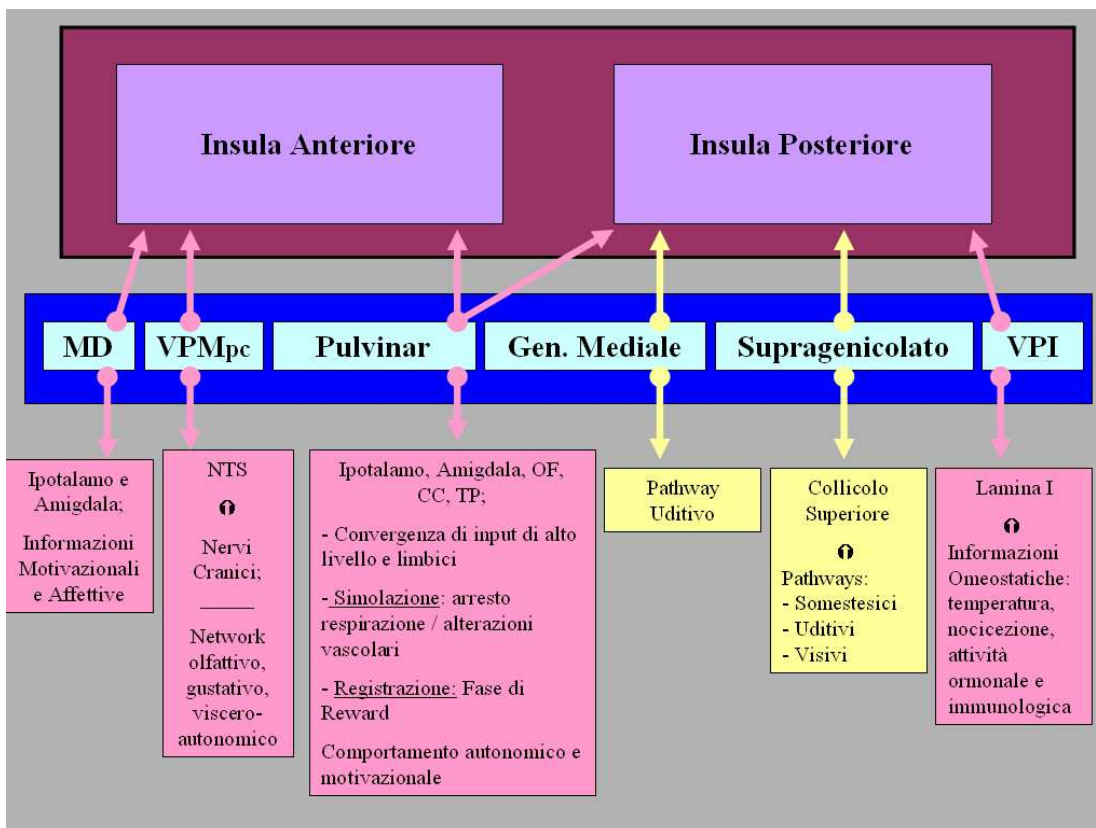


Tabella 2

In tabella 1 sono rappresentate le connessioni talamiche della regione perisilviana. Le regioni del solco laterale sono distribuite secondo la logica di un unfolding virtuale di un emisfero sinistro.

In tabella 2 sono rappresentate più dettagliatamente le connessioni talamiche dell'insula. Complessivamente, il quadro delle connessioni talamo-insulari principali mostra innanzitutto una importante segregazione lungo l'asse rostrocaudale relativamente alle afferenze del sistema nervoso autonomo: la regione anteriore, mediante il circuito Insula-VPMpc-NTS, risulta implicato in un sistema a dominio parasimpatico, mentre la regione posteriore, mediante il circuito Insula-VPI-Lamina I, risulta implicato in un sistema a dominio simpatico. In entrambi i casi, come nota Craig (2002, 2003), le afferenze talamiche mettono in luce un ruolo dell'insula come corteccia interocettiva, cioè implicata nel controllo delle informazioni di natura omeostatica ritrasmesse dal corpo, siano esse di natura parasimpatica o simpatica. La regione insulare e opercolare anteriore, connessa con il complesso MD, sembra essere implicata in funzioni non solo di natura viscerale, ma anche cognitiva/motivazionale ed emozionale. Il nesso tra sistema nervoso autonomo e motivazione è peraltro un tema molto popolare delle neuroscienze odierne, che ha raggiunto anche i non addetti ai lavori a seguito della pubblicazione di libri ad ampio bacino d'utenza.

2.4.2. Principali connessioni sottocorticali

- *Amigdala*. Esperimenti di iniezione di traccianti neuronali hanno mostrato forti connessioni tra l'amigdala e l'insula anteriore; le connessioni sono in particolare con l'area amigdaloidale anteriore e mediale e con i nuclei accessorio basale magnocellulare, basale mediale e amigdaloidale laterale. L'insula anteriore è inoltre connessa con i nuclei centrali dell'amigdala. Il polo temporale disgranulare, studiato da Morán, Mufson e Mesulam (1987), è connesso con i nuclei laterali, accessorio basale, basale laterale e mediale, con i nuclei centrali e mediali, e con la regione amigdaloidale anteriore e l'area di transizione amigdaloidale corticale. Più recentemente anche Höistad & Barbas (2008) hanno studiato le connessioni dell'amigdala con l'insula ed il polo temporale iniettando traccianti neuronali nelle regioni dell'amigdala che risultano connesse con la corteccia prefrontale. I risultati mostrano che tanto il polo temporale mediale quanto l'insula agranulare e disgranulare hanno dense connessioni con l'amigdala, mentre le stesse diminuiscono nella regione del polo temporale laterale e nell'insula granulare.

I nuclei basolaterali risultano essere andati incontro ad una espansione recente rispetto ai nuclei centrali e mostrano connessioni con diverse aree corticali, quali le aree polisensoriali e i lobi frontali. Tra i ruoli dei nuclei basolaterali vi è la modulazione delle risposte dei nuclei centrali a seguito di un processo associativo, ma i nuclei basolaterali sono anche implicati in una circuiteria che comprende i gangli della base – lo striato ventrale, in particolare – e varie regioni prefrontali quali la corteccia orbitofrontale (OFC), la cingolata anteriore (ACC) e la corteccia prefrontale

mediale (mPFC). Al contrario, i nuclei centrali, filogeneticamente più antichi, sembrano essere relegati ad una funzione più primitiva, prevalentemente relativa alla modulazione di risposte troncoencefaliche mediante le connessioni con l'ipotalamo, la formazione reticolare e varie regioni del tronco dell'encefalo, finalizzate a coordinare le risposte comportamentali, autonome e neuroendocrine. È infatti dimostrato il ruolo dei nuclei centrali nel controllo del rilascio di dopamina (tramite l'area tegmentale ventrale e la pars compacta della substantia nigra), di serotonina (tramite i nuclei del raphe), di noradrenalina (tramite il locus ceruleus) e di acetilcolina (tramite i nuclei basali). I nuclei centrali risultano quindi essere in grado di controllare un'intera batteria di risposte del sistema autonomo; al di sotto di questi, la risposta viene spezzata in una varietà di siti basali e troncoencefalici. È interessante notare il fatto che l'insula abbia un accesso diretto ai nuclei centrali e non mediato dai nuclei basali, poiché ciò gioca a vantaggio dell'ipotesi di un accesso immediato dell'insula alle risposte autonome.

- *Ipotalamo.* La relazione tra insula anteriore e sistema nervoso autonomo emerge anche dall'analisi della complessa rete di interazioni tra il prefrontale e l'ipotalamo. Le connessioni prefrontali con l'ipotalamo sono state studiate in maniera approfondita dai neuroanatomisti Ongur & Price alla fine degli anni '90, i quali hanno dimostrato come ampie regioni dell'insula anteriore proiettino ad una ristretta porzione caudolaterale dell'ipotalamo. Le proiezioni della porzione rostrale dell'ipotalamo non riguardano l'insula, ma provengono prevalentemente da un numero ristretto di aree prefrontali mediali denominato da Charnichael & Price (Charnichael & Price 1996, Ongur & Price 1998) "medial prefrontal network". Tuttavia, oltre alle regioni prefrontali mediali, appartiene a questo network l'insula agranulare intermedia, un piccolo campo agranulare dell'insula rostrale posto in una regione orbitofrontale avanzata e anteriore all'apertura del solco laterale. Questo network prefrontale mediale è implicato nella regolazione autonoma ed omeostatica mediante le connessioni con i centri troncoencefalici. Invece il campo anteriore dell'insula agranulare classico, insieme alla regione orbitofrontale posteriore, appartiene al cosiddetto "orbital prefrontal network", il quale invia informazioni al medial prefrontal network. L'orbital prefrontal network, e quindi l'insula anteriore, risulta essere fortemente connesso con l'ipotalamo laterale posteriore.

Secondo l'ipotesi dei neuroanatomisti Ongur & Price (1998), l'orbital prefrontal network potrebbe ricevere informazioni sensoriali, processarle ed inviarle alle aree del medial prefrontal network, il quale le invierebbe ai nuclei basali dell'amigdala e alla sostanza grigia periacqueduttale. Contemporaneamente, lo stesso orbital prefrontal network è connesso anche con l'ipotalamo laterale posteriore, il quale ha ampie connessioni con i centri troncoencefalici che controllano il

sistema nervoso autonomo, in particolare mediante il nervo vago dorsale ed il nucleo ambiguo, dimostrando così un ruolo specifico nella modulazione del sistema parasimpatico. Ne consegue che questo network potrebbe giocare un ruolo nella modulazione del sistema nervoso autonomo da parte dell'ipotalamo sotto l'influenza di pressioni corticali orbitofrontali, insula anteriore inclusa; è stato d'altra parte dimostrato che l'attivazione dell'ipotalamo laterale provoca un decremento della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca (Loewy, 1991). L'ipotalamo mediale, laterale e posteriore, è inoltre connesso con la porzione dorsale del polo temporale. Studi classici hanno dimostrato che la stimolazione dell'ipotalamo laterale aumenta l'assunzione di cibo nell'animale, mentre al contrario la sua lesione porta ad una minore assunzione. La lesione dell'ipotalamo laterale comporta inoltre una variazione della sensibilità del soggetto ai sapori; in particolare, un soggetto che porta lesioni in questa formazione è meno suscettibile ai sapori e agli odori del cibo. Osservando quanto è noto dagli aspetti funzionali dell'insula, vedremo come queste informazioni sull'ipotalamo laterale rinforzino ulteriormente il dato odologico di una rete integrata insula anteriore – ipotalamo laterale.

2.5. Proprietà funzionali dell'Insula di Reil del Macaco

Alle buone conoscenze relative all'anatomia e all'odologia dell'Insula di Reil, fa da contrappeso una generale scarsità di dati funzionali elettrofisiologici, tanto in termini di registrazione di singoli neuroni quanto in termini di stimolazione intracorticale. I motivi di tale oblio possono essere diversi; Frontera (1956) sostiene che le ragioni debbano essere ricercate in primo luogo nelle difficoltà tecniche che si devono affrontare per poter raggiungere l'insula e, in generale, le regioni perisilviane: la posizione profonda e l'opercolarizzazione rendono difficile localizzare con certezza il sito di registrazione o di stimolazione, e l'alta vascolarizzazione rende invece ogni approccio particolarmente delicato. D'altra parte, è probabile che il fatto che già alla fine dell'Ottocento David Ferrier abbia indicato nei suoi studi di stimolazione corticale sul cervello della scimmia l'insula come una regione assolutamente non stimolabile, abbia reso questa regione poco attraente ai fisiologi. Gli studi elettrofisiologici sull'insula e sulle circostanti regioni perisilviane sono spesso datati e, nel caso delle stimolazioni elettriche, condotti con tecniche con le quali risulta oggi difficile rapportarsi. Inoltre, si tratta spesso di studi condotti in anestesia, e il che aumenta la difficoltà di interpretazione tanto delle risposte comportamentali osservabili, quanto delle risposte autonome. Ciononostante, è comunque possibile ricostruire un quadro degli aspetti funzionali della regione perisilviana.

2.5.1. **Insula media-anteriore e opercolo frontale**

L'insula anteriore e l'opercolo orbitofrontale ad essa attiguo sono regioni classicamente considerate regioni gustative ed olfattive. Sappiamo che le connessioni anatomiche con i centri sottocorticali suggeriscono tale ipotesi, e sappiamo inoltre che l'insula agranulare ventrale ospita (insieme a parte dell'orbitofrontale e del polo temporale) una parte della POC, ovvero della corteccia olfattiva prepiriforme. L'elettrofisiologia ci permette di confermare ed approfondire questo dato. Edmund Rolls ha studiato in maniera approfondita le risposte gustative per mezzo di registrazione di singoli neuroni in diverse regioni del sistema nervoso centrale, tra le quali l'insula anteriore e l'opercolo frontale. In un primo studio del 1990 (Yaxley et al., 1990) sono state studiate le risposte gustative dell'insula rostrale dorsale. I gusti somministrati corrispondevano a combinazioni di NaCl, glucosio, HCl e QHCl, fino ad un totale di 33 stimoli, tra i quali venivano inclusi anche succo d'uva e acqua. Poiché gli stessi stimoli sono stati testati dallo stesso gruppo anche durante registrazioni nell'opercolo frontale e nel NTS, si è potuto analizzare il grado di generalizzazione allo stimolo nei tre centri. Considerando una scala metrica in cui 0.0 = responsività ad un solo stimolo, e 1.0 = responsività ai quattro stimoli testati, gli autori sostengono che il punteggio assegnato, rispettivamente, all'insula anteriore dorsale, all'opercolo frontale e al NTS è pari a 0.56, 0.67, 0.87. Il che significa che l'insula anteriore tende, rispetto all'opercolo frontale, a rispondere a stimoli specifici mentre nell'opercolo frontale inizia già un processo integrativo supportato da una maggiore presenza di neuroni la cui scarica è meno dipendente dal singolo gusto. Generalmente, infatti, nelle cortecce primarie l'informazione è maggiormente assoggettata allo stimolo, mentre nelle cortecce secondarie la risposta dei neuroni è meno dipendente alle caratteristiche dello stimolo. Un'ipotesi che può essere formulata dunque è che l'insula anteriore sia una corteccia gustativa primaria, mentre nell'opercolo frontale inizi già una codifica superiore.

Purtroppo, durante lo studio riportato le risposte motorie, visive e somatosensoriali non sono state testate analiticamente, ragion per cui è difficile conoscere quale peso, in percentuale, ha nell'insula la funzione gustativa rispetto ad altre eventuali funzioni. Un dato che tuttavia è noto è che i neuroni responsivi agli stimoli risultano essere 65 su 2.925 unità testate; il che significa che solo il 2,2% dell'insula anteriore dorsale ha risposto agli stimoli gustativi somministrati.

In un secondo studio (Verhagen et al., 2004) si è dimostrato che la regione dell'insula anteriore e dell'opercolo frontale hanno neuroni che rispondono non solo a gusti ma anche alle caratteristiche fisiche dello stimolo intraorale, quale viscosità, texture e temperatura. La metà dei neuroni testati sono unimodali, mentre l'altra metà risponde a stimoli complessi ed è multimodale.

Non è stata trovata alcuna combinazione con stimoli visivi, olfattivi o uditivi. Molto interessante, gli autori notano come la risposta dei neuroni sia generalmente indipendente dal grado di sazietà dell'animale o dalla gradevolezza del gusto proposto. Questo dato può essere pienamente apprezzato se si considera che nella corteccia orbitofrontale l'attività è invece modulata proprio da queste variabili.

Allargando la tipologia di stimoli rispetto allo studio del 1990 (non solo gusti ma anche caratteristiche fisiche dello stimolo) gli autori sono riusciti ad aumentare il numero di neuroni responsivi a 62 unità su 1.122. Si tratta ancora di percentuali molto basse, in questo caso non superiori al 5,5%. Sebbene gli autori suggeriscano giustamente che un problema sia rappresentato dalla ristretta batteria di stimoli e combinazioni, è comunque ragionevole supporre che la regione in oggetto non si limiti ad essere una regione gustativa.

D'altra parte, gli studi di stimolazione elettrica condotti nel passato nell'insula anteriore hanno mostrato una serie di risposte autonome e sensorimotorie. Sebbene, come abbiamo detto, nei suoi esperimenti Ferrier non sia riuscito ad evocare alcuna risposta osservabile nella scimmia, almeno quattro esperimenti successivi (Kaada, Pribram, Epstein 1949; Hoffman & Rasmussen 1952; Frontera 1956; Showers & Lauer 1961) hanno avuto diverso esito e meritano di essere citati.

Frontera (1956) ha eseguito stimolazioni elettriche sul macaco al fine di valutare l'ipotesi dell'insula come area motrice somatica extrapiramidale. Le stimolazioni venivano eseguite su soggetti in anestesia, mediante macroelettrodi di superficie posti sull'insula, esposta a seguito di un intervento chirurgico. L'ipotesi è giudicata inconsistente a causa della mancanza di sistematicità e ripetibilità delle risposte di natura motoria; la conclusione dell'autore, dovuta prevalentemente all'analisi di studi precedenti, è che il ruolo dell'insula sia in primo luogo quello di controllo viscerale e del sistema nervoso autonomo. Ciononostante, Frontera ottiene alcune risposte di natura apparentemente motoria, esclusivamente lungo la porzione ventrale dell'insula (fig.6). Lungo l'asse rostrocaudale, si mostra una mappa corporea caratterizzata, anteriormente, da risposte di ammiccamento ipsilaterale, corrugamento della fronte, retrazione dell'angolo della bocca (fig.6.A), poi di sogghigno controlaterale con contrazione dei muscoli della masticazione e muscoli del volto (fig.6.B), seguita caudalmente da risposte di flessione delle estremità controlaterali superiori: gomito, polso, dita delle mani (fig.6.C) e infine, nella porzione posteriore dell'insula, da risposte di flessione delle estremità controlaterali inferiori: anca, gambe, dita dei piedi (fig.6.D). Quanto emerge dallo studio di Frontera dunque, seppur con le dovute cautele, è il sospetto di una rappresentazione corporea completa, con lo *simiunculus* posto in posizione sdraiata, la testa rostrale e gli arti inferiori caudali.

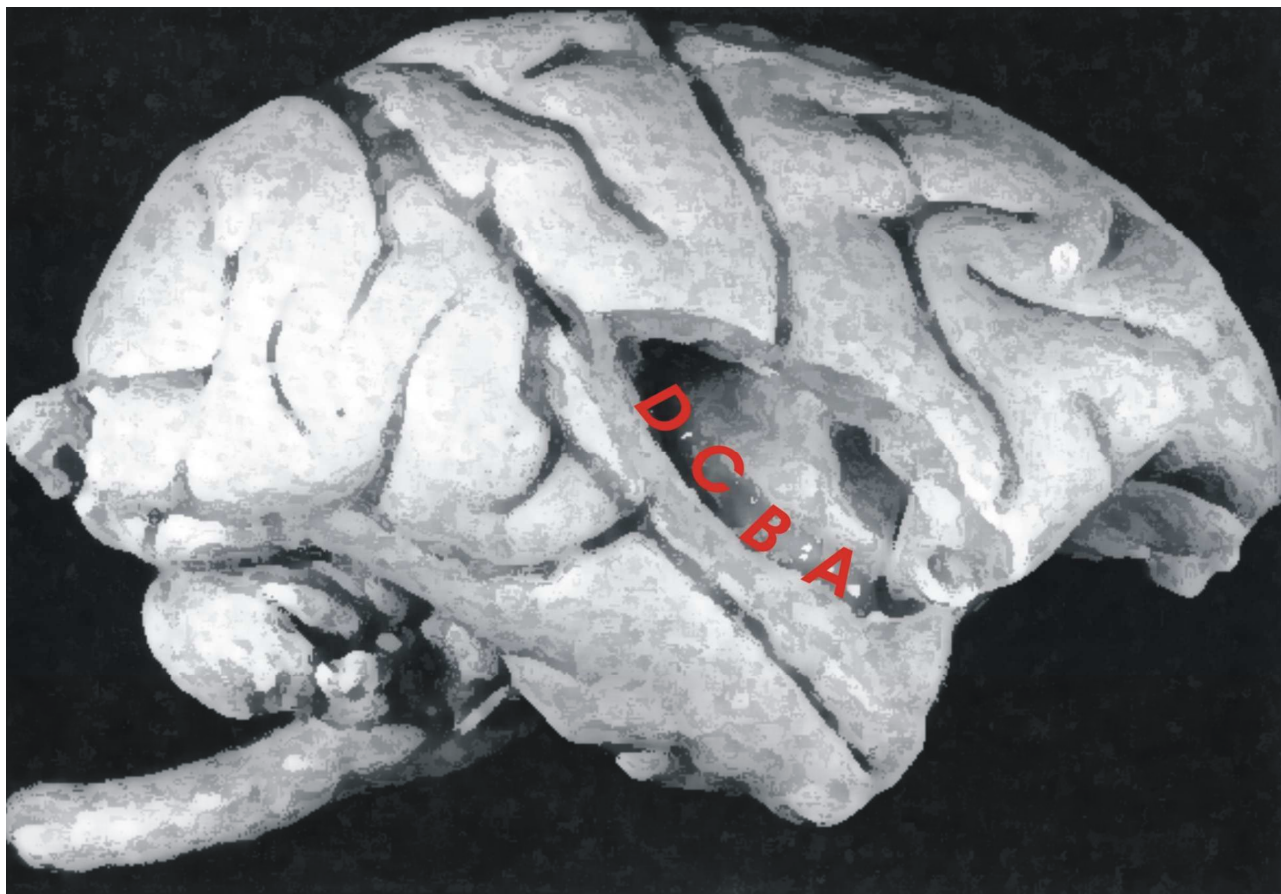


Fig.6 (modificata da Frontera '56)

Per quanto concerne l'insula anteriore, quindi, le risposte gustative e sensoriali intraorali trovate dal gruppo di Rolls devono essere lette alla luce del fatto che la stimolazione della stessa regione provoca una contrazione dei muscoli della masticazione e del volto. Se integriamo questo dato con quello della scarsa percentuale di neuroni sensoriali trovati, ne concludiamo che il controllo corticale dell'insula anteriore probabilmente non si limita alla semplice sensazione gustativa, ma potrebbe invece integrare questa sensazione con una risposta motoria.

Nel 1949 Kaada, Pribram ed Epstein hanno condotto uno studio di stimolazione su macaco in anestesia, lungo la regione perisilviana media-anteriore comprendente l'insula, il polo temporale e la superficie orbitale. Nello studio non si parla di risposte comportamentali. Sono invece state evocate e studiate risposte respiratorie, relative tanto alla diminuzione dell'ampiezza, quanto alla diminuzione della frequenza (fino all'apnea). È stata osservata una variazione della risposta al variare della durata del pulse e della frequenza di stimolazione. Sono state inoltre osservate risposte vascolari, principalmente risultanti in un aumento della pressione arteriosa (sebbene il tipo di variazione possa dipendere in qualche modo dalle condizioni di anestesia). Le risposte sono concentrate esclusivamente nelle regioni anteriori, mentre non sono state osservate variazioni lungo le regioni caudali.

La lesione delle connessioni tra le aree stimulate non altera le risposte ottenute, mentre la lesione delle connessioni tra ognuna delle aree stimulate ed i centri sottocorticali fa cessare immediatamente ogni risposta. Questo garantisce che l'effetto autonomo provocato in ognuna delle regioni non è dovuto ad una mediazione della stessa con le altre regioni perisilviane, con le quali è comunque connessa; al contrario, ognuna di esse ha un'uscita sottocorticale autonoma in grado di generare le risposte osservate a seguito della stimolazione elettrica.

Un altro studio di stimolazione elettrica della regione perisilviana anteriore è stato condotto nel 1952 da Hoffman e Rasmussen. L'esperimento è condotto in condizioni di anestesia e vengono monitorate pressione sanguigna, respirazione e motilità gastrica. Nello studio non si considerano le eventuali risposte motorie evocate dalla stimolazione. La stimolazione dell'insula provoca l'inibizione della peristalsi gastrica, il decremento della pressione intragastrica e del tono dello stomaco anche a basso voltaggio, la caduta della pressione sanguigna e, a voltaggi maggiori, l'inibizione della respirazione nella fase di espirazione. Gli effetti sono stati replicati cambiando diversi tipi di anestesia. Dopo la sezione bilaterale del nervo vago la stimolazione non produce inibizione della peristalsi gastrica né decremento del tono gastrico, ma l'inibizione della respirazione e la caduta della pressione sanguigna persistono immutate. Dopo la sezione del trigemino (neurectomia retrogasseriana) tutti gli effetti della stimolazione dell'insula restano immutati. Essendo la neurectomia retrogasseriana una sezione su un'afferenza, ne risulta che la risposta ottenuta dalla stimolazione dell'insula è una vera risposta corticale e non fenomeno indiretto riflesso. A seguito della stimolazione dell'insula, lo stesso esperimento viene eseguito presso il polo temporale e la superficie orbitale posteriore. Mentre nell'insula si osserva una caduta della pressione sanguigna, nel polo temporale la stimolazione provoca un aumento della pressione; nella superficie orbitale posteriore si osservano invece in pari misura aumento e diminuzione della pressione.

Le stimolazioni di Showers e Lauer del 1961 mostrano una duplice spaccatura degli effetti evocati nell'insula: una distinzione segue l'asse rostrocaudale, basata su una rozza organizzazione somatotopica con il volto posto anteriormente e gli arti inferiori e la coda posteriormente, e una seconda distinzione tra settore dorsale e settore ventrale, con modulazione del sistema nervoso autonomo dorsalmente ma non ventralmente. Per quanto riguarda la porzione più anteriore dell'insula, la stimolazione evoca risposte della faccia (in realtà evocate in maniera diffusa lungo tutta l'insula) e della parte superiore del corpo: laringe, collo, tronco e spalle. Per quanto riguarda la modulazione del sistema vegetativo, si osservano variazioni nella respirazione e nella secrezione. La regione immediatamente caudale (insula media-anteriore) mostra, oltre alle risposte evocate rostralmente, anche il coinvolgimento degli arti superiori. Per quanto riguarda la modulazione del

sistema vegetativo, gli effetti persistono esclusivamente nella porzione dorsale: modulazione respiratoria, cardiovascolare e gastrointestinale.

2.5.2. Insula posteriore e opercolo parietale

La porzione posteriore dell'insula è una corteccia granulare considerata generalmente un'area prevalentemente somatosensoriale. In realtà, come abbiamo visto, gli studi odologici individuano per questa regione, oltre alle afferenze somatosensoriali, anche afferenze visive superiori (tramite l'STS) e uditive (tramite AI e AII). La registrazione su singoli neuroni nella scimmia è stata eseguita con l'intento di mappare risposte a modalità specifica tattile (Robinson & Burton 1980, Schneider et al., 1993) e gli studi interessati ad altre modalità sono rari. Recentemente, tuttavia, sono state documentate risposte uditive nell'insula granulare (Remedios et al., 2008). L'adiacente opercolo parietale è considerato un'area somatosensoriale secondaria; come abbiamo premesso, recenti studi anatomici e funzionali hanno portato ad una suddivisione del complesso dell'opercolo parietale in una porzione anteriore, denominata parietale ventrale (PV), e una posteriore, denominata SII.

Gli studi classici di Robinson & Burton condotti alla fine degli anni '70 sull'opercolo parietale dimostrano l'esistenza di campi recettivi controlaterali di grandi dimensioni disposti con una organizzazione somatotopica lungo l'asse anterolaterale-posteromediale: i campi recettivi trigeminali si trovano nella porzione anteriore dell'opercolo parietale (gli unici con campi recettivi bilaterali) mentre posteriormente, i neuroni rispondono principalmente a stimoli tattili somministrati sulla superficie della mano o sulle dita, e rappresentano la porzione predominante della mappa; la regione di mano è seguita da un campo di rappresentazione di braccio, poi del tronco superiore e inferiore e degli arti posteriori. La mappa non è rigidamente somatotopica come si osserva nelle aree primarie. Gli stimoli somatici attivano il 93% dei neuroni lungo l'opercolo parietale e gli autori non registrano attivazioni dovute ad altre modalità, mentre nell'insulare granulare il numero di neuroni che rispondono agli stessi stimoli diminuisce al 76%. A differenza dell'opercolo parietale, i neuroni dell'insula granulare rispondono, oltre che a stimoli tattili superficiali, anche a stimoli nocicettivi somministrati di ampie parti del corpo, e senza una organizzazione somatotopica definita.

Nel 1993 Schneider, Friedman e Mishkin pubblicano i risultati di un lavoro di elettrofisiologia sull'insula posteriore (presumibilmente all'interno del campo granulare) in cui sono descritte le proprietà somatiche del 68% dei neuroni testati. La metà di questa popolazione risponde alla stimolazione della superficie corporea, mentre la restante parte risponde a stimolazioni tattili intraorali. Su un totale di 159 neuroni, solo 7 mostrano una bimodalità visivo-tattile e 1 mostra una

bimodalità uditivo-tattile. Nessun neurone risponde a stimoli gustativi. L'interpretazione del gruppo è che l'insula granulare corrisponda ad un'area sensoriale a modalità specifica, avente il ruolo di collegare le aree sensoriali con il sistema limbico; la risposta dei neuroni dell'insula posteriore, seppur legata alla modalità tattile, dovrebbe essere modulata dalla valenza emotiva dello stimolo stesso.

Sebbene l'ipotesi per cui l'insula funga da legame tra il sensoriale ed il limbico sia sensata e interessante (ad esempio associando una modulazione dei parametri vegetativi e influenzando una risposta motivazionale specifica allo stimolo cutaneo), l'ipotesi della modalità specifica lo è senz'altro meno, per motivi tecnici. Non è infatti chiaro quali tipi di stimoli visivi e uditivi sono stati testati dal gruppo di Schneider e non si può escludere la presenza di risposte visive o uditive complesse; in un'area non tipicamente visiva o uditiva possono essere presenti risposte bimodali (come suggerito dall'odologia) molto specifiche: per fare un esempio, stimoli emotivi legati a espressioni facciali o richiami specie specifici potrebbero essere efficaci, ma la loro individuazione richiederebbe un esperimento completamente ad essi dedicato. Ad avallare quanto detto, Remedios e collaboratori (2008) hanno recentemente descritto risposte uditive complesse nell'insula posteriore modulate da suoni specie specifici. Sono stati testati suoni semplici e suoni naturalistici, e la risposta è stata confrontata con quella ottenuta nella corteccia uditiva. Nell'insula posteriore le latenze alla risposta sono maggiori, e non è rappresentato lo sviluppo temporale del suono. Inoltre i neuroni dell'insula posteriore sono più selettivi di quelli della corteccia uditiva per suoni naturalistici, e in particolare per i richiami di conspecifici; inoltre i neuroni sono modulati diversamente a seconda della vocalizzazione. Ne conseguono due considerazioni: l'ipotesi dell'insula granulare come regione di convergenza tra risposta sensoriale e risposta emotiva sembra avvalorata (gli stimoli naturalistici, e in particolare i richiami specie specifici, hanno una particolare valenza emotiva), mentre l'ipotesi della modalità specifica tattile sembra cadere.

Un ulteriore elemento a favore dell'ipotesi del nesso tra stimolazione sensoriale e modulazione vegetativa (e quindi per estensione, emozionale) deriva dallo studio di Zhang e collaboratori (1998), in cui si descrivono nell'insula media-posteriore risposte a stimoli nocicettivi ma anche alla stimolazione chimica dei barorecettori. I campi recettivi nocicettivi sono ampi come descritto sopra. Più della metà dei neuroni registrati risponde a variazioni della pressione sanguigna, e la maggioranza di essi risponde in maniera convergente anche alla stimolazione nocicettiva. È interessante notare che la risposta barorecettoriale sembra predominante nell'emisfero destro rispetto al sinistro (62% contro 14%). L'ipotesi degli autori ricalca quella già vista precedentemente: l'insula posteriore integra risposte sensoriali (in questo caso nocicettive) con la corrispondente modulazione autonoma.

2.6. Dati funzionali elettrofisiologici sull'Isola di Reil dell'Uomo

Nonostante lo studio oggetto della presente dissertazione sia stato condotto sulla scimmia, non va dimenticato che è la comprensione del funzionamento del cervello dell'uomo, e non di quello della scimmia, il fine ultimo della ricerca neuroscientifica di base. Le indagini elettrofisiologiche nelle regioni perisilviane sull'uomo sono abbastanza frequenti. L'elettrofisiologia ricopre infatti un ruolo importante in sede di valutazione prechirurgica e questo permette, seppur con notevoli limitazioni, di confrontare i dati ottenuti sulla scimmia con quelli sull'uomo. Poiché le indagini sull'uomo hanno scopi diversi da quello della ricerca di base, questi studi non hanno la sistematicità degli studi su modelli animali, e i siti indagati sono generalmente limitati e non omogenei. D'altra parte, esistono alcuni indubbi vantaggi: la stimolazione intracorticale, infatti, può beneficiare del punto di vista in prima persona dell'effetto della stimolazione tramite il racconto del soggetto; il che permette di ottenere informazioni sicure sia relativamente alla modalità evocata (ad esempio, una sensazione tattile anziché termica) che relativamente alla localizzazione (ad esempio, una sensazione sulla mano anziché sul braccio). Lo studio sull'uomo permette inoltre di approfondire tematiche non affrontabili su modelli animali, primo fra tutti ovviamente il linguaggio.

L'isola è stata oggetto di importanti report da parte di Wilder Penfield, il neurochirurgo canadese che sin dagli anni '30 ha eseguito stimolazioni corticali su pazienti svegli. Il lavoro di Penfield è noto prevalentemente per l'elaborazione delle mappe motorie e sensoriali che hanno portato alla definizione del concetto di *Homunculus* (Penfield & Rasmussen, 1957), nonché per gli aspetti metodologici impiegati nel campo della neurochirurgia (Penfield, 1947, 1952, 1955); tuttavia, il risultato delle stimolazioni delle regioni del lobo temporale e dell'isola non è meno interessante. Durante la stimolazione elettrica di varie porzioni dell'isola, i pazienti hanno riportato risposte sensoriali e motorie viscerali, quali nausea, rumori del tratto gastrointestinale, desiderio di defecare e desiderio di vomitare. Viene riportata la frequente mancanza di risposte e, cosa più interessante, la saltuaria presenza di risposte di natura emotiva.

Risposte analoghe sono state evocate in tempi recenti. Nel 2003 Krolak-Salmon e collaboratori ottengono a seguito della stimolazione della regione anteriore ventrale dell'isola risposte emotive di disgusto; vengono riportate dai pazienti sensazioni spiacevoli alla gola, che arrivano a raggiungere la bocca, le labbra ed il naso. Cosa interessante, mediante gli stessi elettrodi registranti si scopre la presenza di potenziali correlati all'evento (ERPs) quando ai pazienti vengono mostrate espressioni facciali di disgusto, ma non quando vengono mostrate altre espressioni emotive.

La connessione tra Insula di Reil e risposte viscerali è ulteriormente rinforzata dagli studi stereo-elettroencefalografici su pazienti epilettici farmacoresistenti. Generalmente la prassi in questi casi prevede la sospensione del trattamento farmacologico e l'agevolazione dell'evento epilettico al fine di localizzare il sito d'origine del focus epilettogeno. Durante il periodo immediatamente seguente la sospensione del trattamento farmacologico l'attività corticale viene monitorata tramite EEG, grid subdurali o elettrodi intraparenchimali. In questo modo è stato dimostrato (Catenoux et al., 2008) che manifestazioni di vomito ictale si associano all'epilessia insulare: indipendentemente dalla zona di origine del focus epilettico, la manifestazione di vomito ictale si presenta una volta che l'epilessia raggiunge l'insula anteriore. Inoltre è noto (Isnard et al., 2004) che la sintomatologia classicamente riportata dai pazienti insulari gravita intorno alla percezione di parestesie e sensazioni spiacevoli localizzate lungo una regione comprendente bocca, gola e laringe: senso di costrizione e di soffocamento, sensazioni spiacevoli alla laringe, tensione alle ghiandole sublinguali, formicolii del labbro e delle guance, parestesie alle gengive, movimenti oroalimentari, deglutizione e ipersalivazione, sono sensazioni tipicamente associate all'epilessia del lobo dell'insula. I deficit di tipo linguistico, quali la disartria, e le distonie e contrazioni cloniche degli arti superiori e del volto sono manifestazioni che solitamente intervengono in una seconda fase della crisi, e sono probabilmente causati dal movimento della crisi verso regioni attigue, in una sorta di marcia jacksoniana perisilviana.

Spostando l'attenzione verso la porzione posteriore dell'insula, come nella scimmia, anche nell'uomo vediamo una predominanza della modulazione somatosensoriale e nocicettiva. Ostrowsky e collaboratori (2002) hanno studiato le sensazioni dolorose e non dolorose evocate mediante la microstimolazione intracorticale dell'insula. Le sensazioni dolorose sono evocate nella parte posteriore dorsale dell'insula, prevalentemente a seguito di stimolazioni dell'emisfero destro; le sensazioni non dolorose sono evocate nella parte posteriore di entrambi gli emisferi. Al di là della possibile parziale lateralizzazione dovuta alla concentrazione di risposte nocicettive a destra (a questo proposito, si confronti il dato con quello di Zhang e collaboratori, sopra citato), le due mappe si sovrappongono, poiché non viene rilevata alcuna segregazione delle risposte nocicettive rispetto a quelle non nocicettive. Alla luce di quanto detto, risulta piuttosto curioso il caso descritto da Cattaneo e collaboratori (2007) di un paziente che, a seguito di un ictus ristretto all'insula dorsale posteriore, ha riportato una perdita della sensibilità termica, sia al caldo che al freddo, nella porzione controlaterale del corpo, ma non una perdita della sensibilità dolorifica, né deficit sensoriali relativi ad altre modalità.

Mazzola e collaboratori (2006) descrivono le risposte somatosensoriali e dolorifiche provocate dalla stimolazione elettrica in SII, rapportandole con risposte analoghe provocate da stimolazioni in

SI e nell'insula. Parestesie, sensazioni tattili, dolorifiche e termiche sono ottenibili infatti a seguito di stimolazioni con elettrodi intraparenchimali. Le risposte non somatosensoriali (uditive, vegetative, vestibolari, gustative) sono evocabili quasi esclusivamente mediante stimolazione dell'insula. Sono riportate differenze tra le tre aree indagate, nell'estensione e nella lateralizzazione dei campi recettivi tattili, tali per cui i campi recettivi sembrano essere ristretti in SI, maggiori in SII, e più grandi nell'insula. Le risposte nocicettive sono state evocate in egual misura nell'insula posteriore superiore e in SII, mentre non sono mai state evocate in SI. In questo caso il dato sull'uomo conferma quindi quanto già osservato nel modello animale.

Uno studio eseguito dallo stesso gruppo dei due precedenti (Isnard et al., 2004), più approfondito e di grande interesse per i nostri scopi, descrive invece dettagliatamente le risposte rilevate a seguito di stimolazioni insulari: risposte somatosensoriali, risposte viscerosensitive, risposte uditive, deficit linguistici, e una gamma di altre risposte di tipo vario.

- Le risposte di tipo somatosensoriali sono state rilevate nei tre quarti posteriori della regione esplorata, e rappresentano il 43% delle risposte evocate. Si tratta di parestesie (cerchi gialli in fig.7.a), talvolta innocue, talvolta spiacevoli (come punture di aghi o leggere correnti elettriche), sensazioni termiche (cerchi arancioni in fig.7.a), o violente sensazioni dolorifiche, come di scarica elettrica (cerchi rossi in fig.7.a). Le risposte sono prevalentemente controlaterali, e distribuite su regioni corporee di diverse dimensioni (ristrette quali labbra, o lingua, o laringe, ma anche ampie come arti superiori, mano e volto).
- Le risposte viscerosensitive (cerchi azzurri in fig.7.b) sono evocate nella porzione anteriore e rappresentano il 22% delle risposte complessive. Si tratta di sensazioni localizzate nella regione faringolaringeale: sensazioni spiacevoli di costrizione di vario grado, dalla leggera sensazione di fastidio (cerchi verdi in fig.7.c) alla sensazione dolorifica di essere strangolati (cerchi rossi in fig.7.c). Altre risposte viscerosensitive riguardano il senso di pesantezza addominale, costrizione toracica, sensazioni epigastriche ascendenti, nausea. In alcuni casi, si hanno sensazioni dolorifiche di dolore addominale (cerchi rossi in fig.7.b).
- Le risposte uditive (fig.7.d) rappresentano il 10% delle risposte, e sono rilevate nella parte posteriore inferiore, sotto l'opercolo temporale. In un solo caso, si riporta una allucinazione uditiva complessa, mentre nella gran parte dei casi si tratta di ronzii o fischi diffusi nello spazio o provenienti dalla metà controlaterale.
- I deficit linguistici (fig.7.e) rappresentano il 6% delle risposte evocate e riguardano disartria e perdita di parole durante il parlato spontaneo. Viene riportato dai pazienti un arresto del parlato dovuto alla sensazione che la mandibola venisse bloccata.

- Le altre risposte (fig.7.f) ottenute dalla stimolazione riguardano sensazioni olfattogustative (cerchi arancioni in fig.7.f), risposte vegetative (cerchi blu in fig.7.f), sensazioni di irrealtà riportate in piena coscienza dai pazienti (cerchi azzurri in fig.7.f), e sensazioni vestibolari (cerchi rosa in fig.7.f) di movimento nello spazio di tutto il corpo, che si manifesta come una rapida proiezione in avanti del corpo, una rotazione verticale o orizzontale del corpo, una sensazione di levitazione.

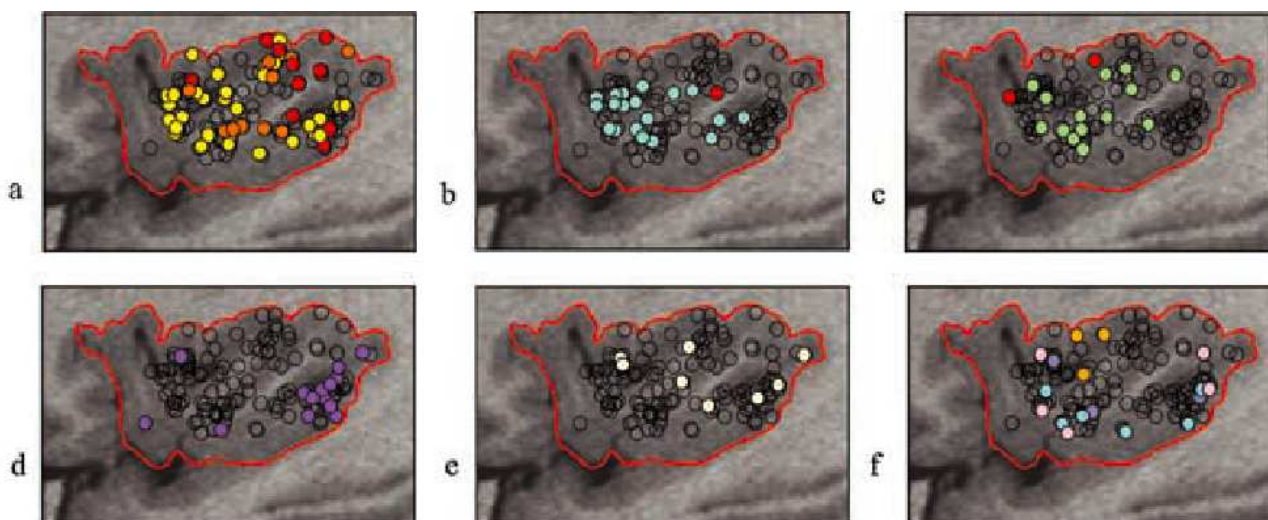


Fig.7 (da Isnard et al., '04)

La pubblicazione di Isnard e collaboratori ora descritta è particolarmente importante per i fini del nostro lavoro perché mostra gli aspetti funzionali prevalenti dell'insula che vengono esibiti ora durante l'attacco epilettico vero e proprio, ora durante le stimolazioni intracorticali; al contempo, ci offre una particolare chiave interpretativa dei ritrovati del nostro studio offrendo il resoconto in prima persona del paziente durante sensazioni che non danno luogo ad un univoco comportamento esibito. Conseguentemente, nonostante le lacune relative alla sistematicità dell'indagine, la stimolazione sull'uomo presentata dal gruppo francese risulta offrire un'importante bussola interpretativa alla mappatura sul modello animale, quantomeno in merito ad alcune specifiche risposte evocate. Gli effetti della stimolazione sopra citati richiamano d'altra parte le conseguenze di ictus dell'insula posteriore descritti su quattro pazienti da Cereda e collaboratori (2002). Le presentazioni cliniche comprendono stereoagnosia e deficit sensoriali della modalità tattile, dolorifica superficiale e termica localizzati al volto, al braccio, al tronco, alla gamba; disordini gustativi quali l'incapacità nel discriminare soluzioni saline o acide; sindrome vestibolare (perdita di equilibrio, instabilità, difficoltà a camminare); disturbi cardiovascolari (episodi ipertensivi) e disordini neuropsicologici quali afasia, disartria, somatoparafrenia. Gli ictus descritti coinvolgono principalmente l'insula posteriore, e infatti in un solo caso sono stati osservati disordini gustativi (in

effetti, in base a quanto detto sopra le risposte gustative dovrebbero riguardare la porzione anteriore più che la posteriore).

La stimolazione elettrica su uomo ha portato inoltre ad approfondire un altro aspetto funzionale dell'insula. Nel 1992 Oppenheimer e collaboratori hanno pubblicato un esperimento di stimolazione nell'insula di cinque pazienti epilettici prima di un intervento di lobectomia temporale. Viene osservato che la stimolazione provoca attivazioni cardiovascolari di diverso tipo a seconda che l'insula stimolata sia la destra o la sinistra. In particolare, si osserva che la stimolazione dell'insula sinistra provoca generalmente bradicardia e risposte di caduta pressoria mentre la stimolazione dell'insula destra provoca generalmente tachicardia e aumento pressorio. Un secondo argomento a favore dell'ipotesi di lateralizzazione è data dall'intensità delle risposte, che indipendentemente dal segno risultano essere infatti mediamente più forti dopo stimolazione dell'insula destra. Sebbene l'ipotesi sollevata da questo studio sia, per così dire, rimasta sospesa, dato che non sono state descritte definitive conferme o smentite relativamente ad una lateralizzazione della modulazione del sistema autonomo a livello dell'insula, va tuttavia ricordato come il tema della lateralizzazione di un controllo autonomo è stato sollevato anche dallo studio di elettrofisiologia sul modello animale, presentato da Zhang e precedentemente discusso. Il nesso tra modulazione del sistema autonomo e attivazione dell'insula e delle regioni perisilviane è confermato inoltre da altri studi clinici. In uno di essi (Christensen et al., 2005) vengono discusse alcune importanti conseguenze cardiovascolari di ictus dell'insula. In particolare, viene descritto l'andamento elettrocardiografico di 43 pazienti nelle prime 24 ore immediatamente successive al verificarsi di un ictus. La lesione dell'insula provoca nei pazienti tachicardia sinusale, con una frequenza cardiaca superiore ai 120 bpm, una percentuale maggiore al 10% di battiti ectopici e uno slivellamento del tratto ST. Anche in questo caso, viene segnalata la presenza di una possibile lateralizzazione dovuta alla prevalenza di fibrillazione atriale, blocco atrio-ventricolare, battiti ectopici e onda T invertita a seguito di lesioni localizzate nell'emisfero destro. Inoltre, le lesioni localizzate nell'emisfero destro mostrano secondo gli autori un'interessante correlazione con il fenomeno di morte improvvisa a 3 mesi dall'ictus. Blanke, Seeck e Zaim hanno descritto (Seeck et al., 2001; 2002) casi di epilessie temporali che conducono a disordini comportamentali e palpitazioni accompagnate da uno stato di ansia. Tale stato è dovuto alla presenza di una tachicardia sinusale secondaria ad una concomitante sindrome di tachicardia ortostatica posturale (POTS, una condizione di disautonomia nella quale uno spostamento dalla posizione supina a alla posizione verticale causa un anormale incremento della frequenza cardiaca), e può essere trattato con la somministrazione di farmaci beta-bloccanti. La larga maggioranza di epilessie che conducono ad

aritmie cardiache hanno origine nel lobo temporale, adiacente all'insula. Tuttavia, la maggior parte degli studi non descrive significative lateralizzazioni.

2.7. Obiettivi del presente lavoro

Complessivamente, le evidenze ottenute dagli studi sull'uomo mostrano una forte convergenza verso i dati funzionali e odologici dei modelli animali. La porzione anteriore dell'Insula di Reil è fortemente implicata con il comportamento oroalimentare e visceromotorio; questo dato emerge tanto dalla registrazione dei singoli neuroni, quanto dall'osservazione stereoelettroencefalografica su pazienti epilettici, quanto dalla stimolazione intracorticale eseguita sugli stessi. Le connessioni sottocorticali della regione anteriore dell'insula rafforzano l'ipotesi di una componente oroalimentare e viscerale, mediante connessioni con l'ipotalamo laterale ed il VPMpc che ritrasmette informazioni vagali provenienti dai nervi cranici. La regione posteriore è una regione prevalentemente polimodale; sono rappresentate le modalità somatosensoriali, termocettive e nocicettive in una regione dorsale caudale che presumibilmente coincide con il campo granulare dell'insula, raggiunto, tra le altre cose, da connessioni sottocorticali che trasmettono informazioni omeostatiche di origine spinale. Anche in questo caso, esiste una certa convergenza tra gli studi sull'uomo e quelli sulla scimmia. Anche la presenza di risposte uditive lungo la porzione ventrale caudale è testimoniata sia nella scimmia che nell'uomo, e trova giustificazione nelle connessioni cortico-corticali dell'insula posteriore con le aree uditive. Lo scopo del presente studio è quello di mappare mediante microstimolazione intracorticale (ICMS) le risposte evocabili dalle regioni perisilviane; sono state studiate in maniera congiunta l'uscita comportamentale osservabile e la modulazione del sistema nervoso autonomo (SNA).

Risposta comportamentale osservabile. L'interesse nei confronti della risposta comportamentale evocata da ICMS è duplice:

- (a) Il primo obiettivo è quello di determinare l'esistenza, la localizzazione, e la disposizione di una mappa corporea somatotopicamente organizzata; a tal fine sono state utilizzate microstimolazioni di breve durata finalizzate alla produzione di brevi twitch di singole parti del corpo. Sono inoltre state valutate le soglie di stimolabilità della regione indagata.
- (b) Il secondo obiettivo è quello di determinare le risposte comportamentali complesse dipendenti da circuiti corticali comprendenti le regioni perisilviane; a tal fine sono state utilizzate

microstimolazioni di lunga durata (BTS-ICMS, ovvero a scala comportamentale; si veda l'appendice per maggiori informazioni). Come verrà dimostrato nel presente lavoro, l'utilizzo di BTS-ICMS permette di evocare risposte comportamentali complesse o dipendenti dal contesto, reclutando specifici network neuronali di una regione non motoria, in condizioni altamente naturalistiche.

Modulazione del sistema nervoso autonomo (SNA). L'esistenza di una relazione tra l'anormale funzionamento dell'insula – sia essa dovuto ad una ipoattivazione come nel caso dello stroke, o ad una iperattivazione come nel caso della stimolazione elettrica o dell'epilessia insulare – e la variazione dei tracciati elettrocardiografici, pone l'urgenza di un approfondito studio sulla modulazione del SNA a livello centrale. In particolare in questo studio sono stati perseguiti i seguenti obiettivi:

(a) Verificare l'eventualità di un effetto della stimolazione sulla frequenza cardiaca istantanea, il segno (aumento o diminuzione), la portata (percentuale di variazione rispetto alla condizione di riposo), e la tempistica della variazione e del recupero.

(b) Verificare l'ipotesi di una segregazione rostrocaudale delle risposte simpatiche-parasimpatiche; tale segregazione è suggerita dagli studi odologici relativi alle connessioni talamiche, ma non ha ad oggi alcuna controparte neurofisiologica o, più in generale, di tipo funzionale.

(c) Verificare l'ipotesi di una lateralizzazione delle risposte simpatiche-parasimpatiche; tale lateralizzazione è suggerita dagli studi di stimolazione sull'uomo e da osservazioni cliniche. Non esistono invece nella scimmia chiari indizi pro o contro una tale lateralizzazione.

(d) Verificare l'ipotesi di una lateralizzazione dell'intensità delle risposte; tale lateralizzazione è suggerita da studi di stimolazione sull'uomo e da osservazioni cliniche (maggiori complicanze cardiovascolari derivano infatti da ictus che colpiscono l'insula destra anziché l'insula sinistra), ma nulla è mai stato indagato nella scimmia.

(e) Indagare l'esistenza di una possibile correlazione tra il comportamento esibito con stimolazioni e scala temporale e l'andamento elettrocardiografico. Un approccio integrato tra comportamento e SNA è finalizzato a potenziare l'euristica di un normale esperimento di ICMS.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Addestramento del soggetto sperimentale

L'elettrofisiologia eseguita nel presente studio è stata condotta su scimmia appartenente alla specie *Macaca Mulatta* (*Macaco Rhesus*) stabulata all'interno del Dipartimento di Neuroscienze di Parma in gabbie individuali delle dimensioni di 100cm x 160cm x 100cm posizionate in maniera tale da rendere possibile un'interazione sociale. La prima fase dell'addestramento è dedicata ad un'abituazione all'interazione tra scimmia e sperimentatore, principalmente svolta dando personalmente da mangiare all'animale nella sua gabbia pezzi di cibo che l'animale deve afferrare. La seconda fase dell'addestramento viene svolta al di fuori della gabbia, dove l'animale viene condotto mediante un guinzaglio alla sedia per primati nella quale l'animale viene posto durante l'esperimento. Ogni progresso ottenuto durante tale processo di abituazione alla sedia viene ricompensato con cibo gradito all'animale, fino ad ottenere una spontanea e immediata collaborazione da parte dello stesso. Una volta ottenuta una buona collaborazione da parte dell'animale, viene nutrito quotidianamente sulla sedia per primati, abituandosi inoltre a ricevere stimoli tattili e propriocettivi ed eseguendo vari movimenti di braccio, mano, bocca e prestando attenzione alle azioni eseguite dagli sperimentatori. Tale abituazione gioca un ruolo importante durante la registrazione intracorticale finalizzata alla valutazione delle proprietà funzionali del sito di indagine.

3.2. Impianto del sistema di fissaggio della testa e della camera di registrazione

Una volta ultimata la fase di abituazione all'ambiente sperimentale, l'animale viene sottoposto ad intervento chirurgico per il posizionamento del sistema di fissaggio della testa e, in un successivo intervento, dell'apertura della breccia ossea posta al di sopra dell'area corticale di interesse. L'intervento viene eseguito in condizioni di asepsi e di anestesia generale mediante ripetute iniezioni i.m. di Ketamina (6,4 mg/kg) e Medetomidina (0,08 mg/kg). Il sistema di fissaggio della testa è costituito da quattro cilindri cavi in acciaio situati bilateralmente nelle fosse frontali e sull'osso parietale e ancorati alla parete ossea per mezzo di cemento acrilico (Antibiotic Simplex[®]) che li unisce a viti "Evarts" in titanio fissate al cranio in prossimità dei cilindri. La funzione dei cilindri cavi è quella di ospitare, durante le sedute sperimentali, quattro barrette metalliche fissate al reggitesta ancorato alla sedia; in questo modo durante la registrazione la testa dell'animale è rigidamente fissata e solidale alla sedia e al sistema di registrazione. Nel mese successivo il primo

intervento il sistema di fissaggio non viene impiegato, al fine di favorire la stabilizzazione dell'impianto. La fase successiva dell'addestramento consiste nel blocco della testa dell'animale nel sistema di fissazione ancorato alla sedia. Durante questa fase, particolarmente rischiosa in quanto repentini movimenti della testa della scimmia potrebbero danneggiare irrimediabilmente il sistema di ancoraggio a cilindri, alla scimmia viene richiesta un'assenza di resistenza mentre lo sperimentatore muove il capo dell'animale fino al completamento del bloccaggio della testa. Una volta raggiunto questo traguardo e abituato il soggetto sperimentale alla permanenza in laboratorio mangiando a testa fissa, si procede con il secondo intervento chirurgico di posizionamento della camera in titanio.

Due camere di registrazione sono state impiantate, sulla regione di interesse di entrambi gli emisferi. Una camera di registrazione è adibita allo scopo di permettere l'accesso dell'elettrodo alla corteccia, mentre la seconda camera è funzionale alla visualizzazione dell'elettrodo in profondità mediante ecografia (per la descrizione delle modalità di visualizzazione mediante ecografo si veda oltre). Durante questo intervento, viene praticata una breccia ossea esponendo la dura madre sovrastante la regione corticale di interesse. Attorno alla breccia viene fissata la camera di titanio precedentemente costruita sulla base di un calco della porzione di calotta cranica da rimuovere; la camera è ancorata all'osso per mezzo di viti autofilettanti in titanio ricoperte di idrossiapatite (per facilitare l'osteointegrazione) e di cemento acrilico antibioticato (Antibiotic Simplex[®]) e chiusa con un coperchio in titanio avvitato alla camera. Vengono infine misurate le coordinate stereotassiche di un angolo di ognuna delle due camere come punto di repere per la griglia di penetrazioni.

3.3. Localizzazione del sito di impianto della camera

Poiché l'oggetto del presente studio è una regione corticale mai studiata funzionalmente nel nostro istituto in precedenza, non si è potuto beneficiare delle conoscenze circa la localizzazione delle coordinate stereotassiche del sito per la rimozione del tassello osseo del cranio. Tale localizzazione è stata quindi valutata mediante una triplice strategia. Parte della localizzazione è avvenuta mediante l'analisi dell'estensione dell'insula nel macaco ottenuta da quattro casi precedenti disponibili presso l'archivio del laboratorio di Neuroanatomia del Dipartimento di Neuroscienze di Parma, mentre le dimensioni rostro-caudali e medio-laterali standard nella *Macaca Mulatta* sono state ottenute mediante la consultazione di un atlante del cervello della suddetta specie (Cerebral Cortex, 1996, University of Washington). Un terzo e definitivo riscontro è stato ottenuto mediante la consultazione di una MRI morfologica.

3.3.1. Valutazione delle coordinate mediante precedenti casi

Al fine di identificare la posizione in AP dell'insula nel macaco sono stati considerati n° 4 casi disponibili presso l'archivio del laboratorio di Neuroanatomia del Dipartimento di Neuroscienze di Parma. I cervelli sono stati ottenuti a seguito del procedimento di perfusione e taglio in sezioni coronali di spessore di 60 μm in modo sequenziale in 5 serie in modo da avere per ogni serie un campionamento di una fetta ogni 300 μm . Le misure in AP sono riportate nella tabella sotto.

CASO	ZERO STEREOTASSICO	INSULA ANTERIORE	INSULA POSTERIORE
Misure AP caso 10	0	28,5	7,2
Misure AP caso 14	0	22,8	5,1
Misure AP caso 20	0	24,0	7,2
Misure AP caso 21	0	26,1	5,1
MISURA CONSERVATIVA		28,5 max anteriore	5,1 max posteriore

3.3.2. Valutazione delle coordinate stereotassiche dell'insula mediante atlante

Le coordinate AP dell'atlante impiegato (University of Washington, 1996) fanno riferimento ad uno 0 stereotassico posto a livello della commissura anteriore. Da atlante si può derivare l'estensione rostro-caudale della regione di interesse; in particolare la porzione rostrale dell'insula raggiunge una posizione di 4mm anteriore alla commissura anteriore, ovvero 3mm anteriore all'incontro tra il ramo superiore ed il ramo inferiore del solco arcuato, al livello della punta caudale del solco principale. Caudalmente l'insula raggiunge un AP -20mm rispetto alla commissura anteriore; come riferimento anatomico si consideri che la punta rostrale del IPS da atlante ha un AP -13mm. I riferimenti anatomici relativi al solco arcuato e al solco intraparietale sono di rilevante interesse data l'esperienza nella localizzazione in AP delle regioni circostanti, tarata con lo stereotassico presente presso la Sala Chirurgica del Dipartimento di Neuroscienze di Parma. A seguito di quanto detto, l'estensione rostro-caudale complessiva dell'insula della Macaca Mulatta risulta essere di 24mm. Le coordinate ML sono state derivate in maniera analoga.

3.3.3. Valutazione delle coordinate stereotassiche dell'insula mediante MRI

La localizzazione precisa del sito di apertura della breccia ossea è stata ottenuta mediante l'analisi di MRI del cranio del soggetto sperimentale. Sono state impiantate due viti autofilettanti (Synthes® Ø1,5mm, L.4mm) come repere sulla cresta ossea dell'animale, finalizzate ad interfacciare mediante MRI l'osso del cranio con il cervello. Le viti sono state poste in condizioni stereotassiche ad un AP e ML noti. L'MRI è stata eseguita presso la clinica "Poggio Piccolo" del Prof. Marco Bernardini, a Castel Guelfo, Bologna in data 17.V.2006, con sezioni sagittali, orizzontali e coronali. I file sono letti dal software DicomWorks® al fine di separare le varie sezioni acquisite; è quindi possibile recuperare le diverse sezioni coronali, orizzontali e parasagittali, che sono state poi visualizzate con il programma MRIcro® il quale permette una serie di operazioni sulle immagini. Mediante MRIcro® viene individuato il valore rostrocaudale e quello mediolaterale del sito di interesse in riferimento alle viti, le cui coordinate stereotassiche sono note. Le coordinate del sito di interesse sono quindi desunte con riferimento all'effettiva posizione calcolata con lo stereotassico della Sala Chirurgica del Dipartimento di Neuroscienze di Parma.

3.4. Tecniche di localizzazione funzionale del sito corticale di entrata

Prima di ogni sessione sperimentale, la testa dell'animale viene ancorata alla sedia, la camera di registrazione viene aperta rimuovendone il coperchio; gli strati di tessuto connettivo che quotidianamente si formano al di sopra della dura madre vengono rimossi al fine di ridurre la resistenza dei tessuti che il microelettrodo incontra durante la penetrazione in corteccia. Il microelettrodo (FHC microelectrode® in tungsteno di lunghezza pari a 14cm, isolato con vernice epossidica) è fissato ad un micromanipolatore ad avanzamento idraulico che permette l'avanzamento dell'elettrodo di pochi µm, ancorato ad un braccio meccanico posto sul reggitesta della sedia. Il braccio meccanico permette di spostare l'elettrodo in senso antero-posteriore e medio-laterale fino a raggiungere le coordinate stereotassiche previste per ogni penetrazione, calcolate in base al repere fisso della camera, e riportate su una mappa topografica in grado di individuare la posizione di ogni penetrazione in relazione alle altre; il braccio permette inoltre il movimento dell'elettrodo lungo l'asse verticale, e quindi il movimento verso la corteccia. Ancorato al braccio meccanico è posto un reggicannula, all'interno del quale è posta una cannula in acciaio inossidabile della lunghezza di 7,5cm. La punta dell'elettrodo viene dunque fatta passare attraverso la cannula. Il complesso costituito dalla cannula ed elettrodo può dunque muoversi nelle tre dimensioni con i movimenti del braccio meccanico, mentre l'elettrodo può essere mosso autonomamente lungo l'asse verticale. Mediante il micromanipolatore la cannula contenente l'elettrodo viene portata a livello del

tessuto connettivo seguendo un angolo di 90°. Una volta raggiunto il tessuto connettivo, il microelettrodo viene spinto all'interno della corteccia con l'ausilio del micromanipolatore idraulico fino al rilevamento dell'attività. Tale livello viene considerato il punto zero di profondità, a partire dal quale vengono testate le proprietà funzionali dell'area indagata, mediante passaggi in profondità di 500 µm.

L'attività registrata dal microelettrodo viene inviata ad un sistema di preamplificazione (Bak Electronics®, Germantown, MD, USA) la cui uscita, filtrata, è collegata a due oscilloscopi, l'uno per visualizzare l'attività di fondo registrata, l'altro per visualizzare l'attività di singole cellule selezionate con spike sorting on-line mediante il window discriminator dello stesso impianto e ad un amplificatore acustico, per permettere allo sperimentatore un monitoraggio uditivo costante delle risposte neuronali provocate. L'analisi condotta sull'attività neuronale amplificata dal sistema di registrazione verte sulla discriminazione delle proprietà funzionali ritrovate all'inizio di ogni sessione sperimentale e, conseguentemente, della localizzazione sulla base di queste dell'area nella quale si sta registrando, secondo i precedenti protocolli e lavori svolti dal dipartimento. L'analisi della regione di entrata è funzionale alla localizzazione della regione della corteccia profonda nella quale avvengono le microstimolazioni. Entrando in corteccia con un angolo di 90°, infatti, la corteccia d'entrata permette una prima tentativo localizzazione rostrocaudale e mediolaterale in quanto l'avanzamento verticale dell'elettrodo porterà al raggiungimento della regione immediatamente sottostante a quella d'entrata. Una consultazione con le sezioni coronali mostrate in un qualsiasi atlante del cervello di Macaca Rhesus permette dunque una localizzazione indicativa del sito di stimolazione, della distanza dell'opercolo fronto-parietale dalla corteccia d'entrata e del numero e posizione di cortecce da attraversare con l'elettrodo prima di raggiungere l'opercolo frontoparietale – una strategia particolarmente di aiuto durante le penetrazioni da regioni prossime ai solchi. Ogni osservazione in merito alle proprietà funzionali viene annotata sul protocollo dell'esperimento.

3.5. Tecniche di localizzazione del microelettrodo: la visualizzazione ecografica

Durante la discesa dell'elettrodo, l'attività viene monitorata per mezzo audio, mediante l'amplificazione dell'attività come sopra descritto, e per mezzo video, mediante oscilloscopio, fino al silenzio dovuto al raggiungimento delle fibre sottostanti la corteccia d'entrata. L'elettrodo viene ulteriormente spinto in profondità fino al raggiungimento di una nuova attività dovuta al banco dorsale del solco centrale. Generalmente tale attività compare dopo c.ca 9/10mm di profondità, sebbene questo valore sia soggetto a variazioni dipendenti dai valori delle coordinate AP e ML della

penetrazione. Dopo il 10°mm di profondità, la discesa dell'elettrodo viene monitorata per mezzo di un ecografo.

Un ecografo Logiq 400 CL ProSeries, General Electric Medical System® è stato impiegato al fine di localizzare i solchi cerebrali e l'elettrodo di stimolazione. L'ecografo rende possibile la visualizzazione intracorticale per mezzo di una sonda endocavitaria E721® che ha accesso alla corteccia per mezzo della camera posta nell'emisfero controlaterale la stimolazione. Al fine di tutelare la corteccia esposta nella camera di registrazione adibita alla sonda alcune misure cautelari sono state prese; in primo luogo, l'operazione di rimozione del tessuto connettivo non viene eseguita in maniera radicale, al fine di impedire un accesso diretto della sonda alla dura madre, e quindi al fine di evitare che la frizione con la sonda possa creare lesioni o danneggiamenti. In secondo luogo, viene evitato un diretto contatto della sonda con il tessuto connettivo ponendo al di sopra della camera di registrazione uno strato di lattice precedentemente lavato con soluzione fisiologica. Tra lo strato di lattice e la sonda viene posto un gel conduttore per ultrasuoni e trasmissioni elettriche (Moretti, Ultrasound Gel®) al fine di ottimizzare la qualità della visualizzazione.

Dopo aver settato la profondità adatta per una corretta visualizzazione dell'intera regione ottimale per la visualizzazione delle strutture corticali, la sonda viene rotata in modo da ottenere su monitor una visione simil-coronale della corteccia. In ciascuna immagine simil-coronale sono facilmente individuabili i solchi bilaterali del cervello (in particolare, il cingolo, il laterale ed il temporale); una volta individuata la posizione dell'elettrodo in termini di profondità e di posizione medio-laterale, l'immagine viene acquisita. Successivamente, l'immagine viene immagazzinata in un archivio removibile, che permetterà il trasferimento della stessa su PC per mezzo di un apposito lettore portatile (Fujitsu Dynamo 460 U1®). La visualizzazione mediante ecografo risulta essere imprescindibile per una corretta localizzazione dell'elettrodo. Infatti, le proprietà funzionali della corteccia profonda non possono aiutare lo sperimentatore per almeno due ragioni: in primo luogo, per le regioni profonde indagate non esistono bordi funzionali abbastanza fini da permettere una localizzazione ottimale; in secondo luogo, per motivi tecnici dovuti ai parametri di stimolazione (che verranno illustrati in seguito) l'impedenza dell'elettrodo di stimolazione è tale da non permettere una buona qualità d'ascolto. La qualità dell'attività in convessità è qualitativamente migliore rispetto a quella delle regioni profonde; conseguentemente, mentre un'analisi qualitativa del tipo descritto è facilmente eseguibile in convessità nonostante la bassa impedenza, la stessa operazione non è altrettanto affidabile in profondità.

Sebbene la localizzazione della materia grigia delle regioni profonde sia solo derivabile dalla rifrazione ottenuta dal solco, e quindi ammetta un seppur minimo margine d'errore in termini di

profondità, la visualizzazione ecografica rappresenta tuttavia un mezzo decisivo nella localizzazione del medio-laterale dell'elettrodo rispetto alle strutture stimulate.

La fig.8 mostra una tipica immagine simil-coronale ottenuta durante la sessione sperimentale; l'emisfero sinistro è visibile nella porzione sinistra dell'immagine, mentre il destro è visibile nella porzione destra. Al di sotto della sonda sovrastante l'emisfero destro (fig.8.1) sono facilmente visibili il solco del cingolo (fig.8.2), il solco del Silvio ipsilaterale e controlaterale (rispettivamente, fig.8.3 e 8.4) alla sonda e il solco temporale ipsilaterale e controlaterale alla sonda (rispettivamente, fig.8.5 e 8.6). Inoltre, la fig.8.7 mostra il microelettrodo di profondità in prossimità della porzione dorsale dell'insula.

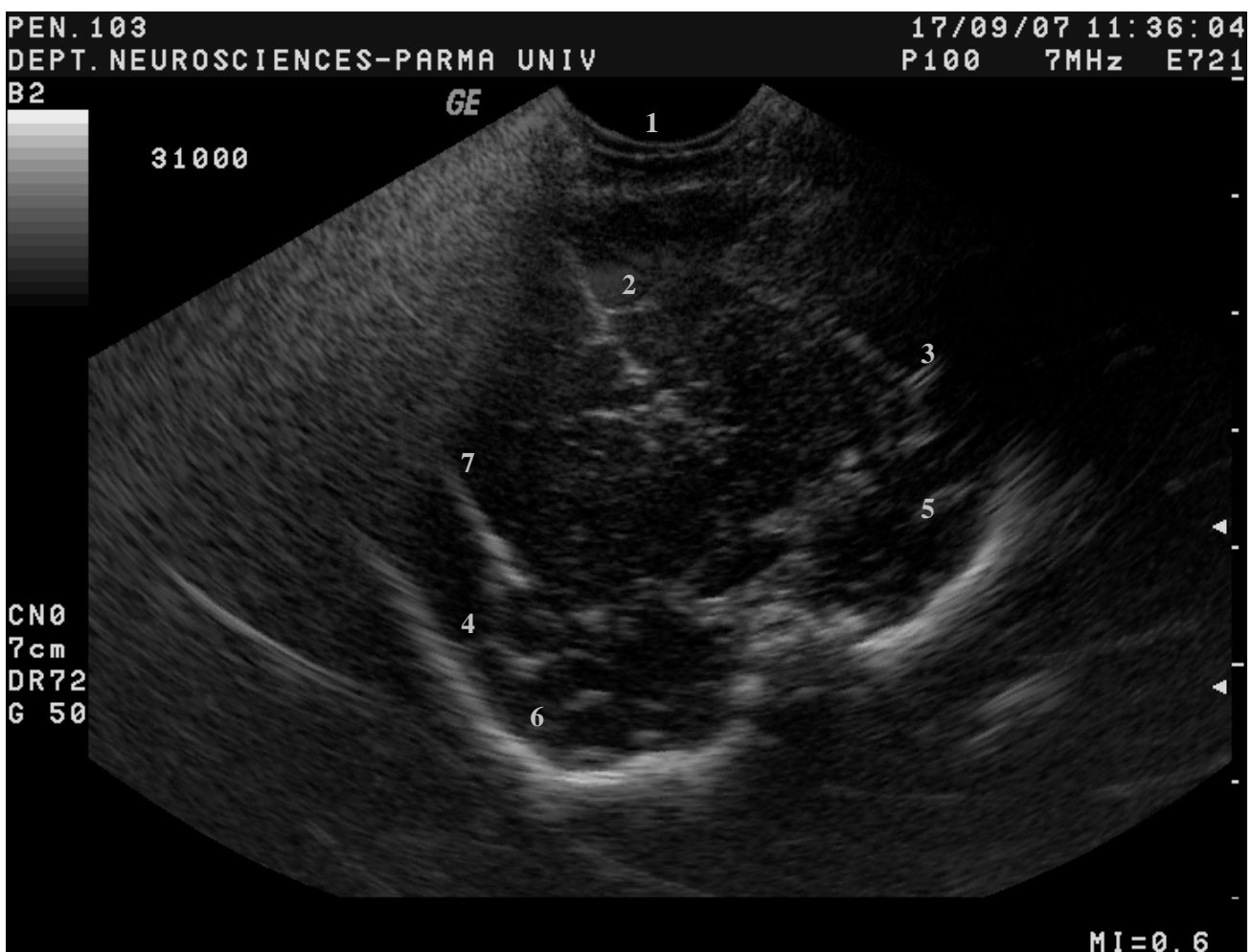


Fig. 8

3.6. Tecniche di ICMS dell'Insula di Reil e delle regioni perisilviane

Una volta raggiunta la prima attività in prossimità dell'opercolo fronto-parietale, viene sospeso l'ascolto della stessa e si procede con la preparazione della sessione di stimolazione. Sul protocollo della clinica viene annotato l'inizio della sessione e con esso la posizione dell'elettrodo

derivata dalla visualizzazione ottenuta dall'ecografo; la stessa dicitura, accompagnata dalle descrizioni cliniche derivate dalla stimolazione e da ogni altra descrizione rilevante all'esperimento, verrà consecutivamente riportata sullo stesso protocollo per ogni successiva profondità.

3.6.1. Strumentazione tecnica per la microstimolazione intracorticale

La strumentazione impiegata nella stimolazione consta di due stimolatori ("stimolatore 1": LACE elettronica[®], e "stimolatore 2": Biphasic Pulse Generator, BAK Instruments, Inc.[®]) in cui sono stati settati i parametri relativi alla frequenza, tempo e caratteristiche dell'onda di stimolazione, e un'Isolation Unit (Stimulus Isolator, WPI[®]) sulla quale è stata tarata l'intensità di stimolazione. Infatti lo "stimolatore 1" non è in grado di emettere onde bifasiche, necessarie all'attuale esperimento. Conseguentemente, è stato affiancato uno "stimolatore 2", al fine di poter tarare in quest'ultimo le caratteristiche dell'onda e usare il primo stimolatore come trigger temporale (il secondo stimolatore non è dotato di un timer e conseguentemente può emettere esclusivamente single pulses o stimolazioni continue il cui termine viene posto manualmente). Conseguentemente nello "stimolatore 1" vengono tarati i parametri temporali, ovvero il treno di stimolazione e la frequenza di stimolazione (generalmente 20ms, pari a 50Hz). Nello "stimolatore 2" vengono settate le caratteristiche dell'onda, ovvero la modalità bifase, la polarità +/-, la durata del pulse e del pulse interval tra le due onde della bifase.

La stimolazione ha inizio per mezzo di un trigger a interruttore esterno collegato con il primo stimolatore la cui uscita è connessa con il secondo stimolatore; quest'ultimo, invia un segnale di 4v a tre componenti: una componente corrisponde all'Isolation Unit, sulla quale è tarata l'intensità di stimolazione e la modalità bifasica di emissione di corrente; una seconda componente è costituita da una luce che viene posta sul reggitesta e resta accesa durante tutto il tempo della stimolazione per segnalare visivamente la stimolazione nelle riprese video che accompagnano la stimolazione; una terza componente è costituita dal CED Power 1401[®], un convertitore analogico/digitale a 8 canali per l'acquisizione dei dati, che vengono inviati al PC di acquisizione mediante una scheda PCI DIO 24[®]. Il segnale della stimolazione viene dunque acquisito dal PC e visualizzato on-line per mezzo del programma Spike 2[®], in registro con la visualizzazione ECG della quale si dirà sotto. È inoltre possibile mandare una quarta derivazione all'amplificatore audio per una segnalazione acustica della stimolazione. Le due uscite di corrente dell'Isolation Unit vengono poste l'una al microelettrodo e l'altra, la terra, sulla camera di registrazione.

3.6.2. Valutazione dei parametri di stimolazione

I parametri di stimolazione seguiti nella prima parte dell'esperimento sono stati i parametri motori utilizzati in Premotoria Ventrale e in Motrice Primaria durante le stimolazioni di controllo effettuate in precedenti esperimenti: stimolazioni con onde monofasiche a 333Hz, di durata 50/100/150ms, con un'intensità massima di 40 μ A. Tali parametri non evocano alcuna risposta nelle regioni profonde. Successivamente, una seconda serie di stimolazioni è stata eseguita impiegando i parametri descritti in Graziano M. et al., 2005, per esperimenti in premotoria: stimolazioni con onde bifasiche a 200Hz, di durata fino a 500ms, con un'intensità di 60/100 μ A. Anche in questo caso, nessuna risposta è evocata nelle regioni profonde.

Si premette che gli esperimenti di stimolazione su insula del macaco descritti in letteratura sono eseguiti con una strumentazione tecnica tale per cui è impossibile rapportarsi oggi ad essa: innanzitutto, gli esperimenti sono eseguiti in acuto, con soggetti in anestesia – il che implica inoltre che una serie di misure cautelari relative al rischio di lesione elettrolitica non vengano neppure sollevate. In secondo luogo le stimolazioni sono eseguite con elettrodi bipolari la cui impedenza non viene riportata; conseguentemente il valore di stimolazione viene dato in Volt e non in Ampere. In alcuni casi, gli elettrodi sono macroelettrodi di superficie, dunque appoggiati sulla superficie corticale insulare esposta a seguito dell'apertura del solco laterale. A seguito dell'impossibilità di confrontarsi con tale letteratura, ulteriori parametri di stimolazione sono stati ricavati a seguito della consultazione della letteratura relativa alle stimolazioni dell'insula su uomo in sede neurochirurgica e alla consultazione con il dott. Lorenzo Bello, chirurgo presso la sezione di Neurochirurgia del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università di Milano, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena. I parametri impiegati in sede neurochirurgica sull'uomo sono caratterizzati da frequenze basse che permettono un aumento di intensità e di lunghezza del treno. Il gruppo dell'ospedale neurologico di Lyon, esperto in stimolazioni insulari, riporta due batterie di parametri: (a) parametri a bassa frequenza: 1Hz, 1-3ms, 1-5mA, 5-10sec; (b) parametri ad alta frequenza: 50Hz, 0,1-0,5ms, 0,8-6mA, 5sec (Ostrowsky et al., 2002). Poiché la stessa equipe francese afferma che i parametri a bassa frequenza non danno risposta nella maggior parte dei casi, si è optato per test di stimolazione con parametri a 50Hz.

Un primo accorgimento preliminare ad un innalzamento del tempo e dell'intensità di stimolazione – il primo passa infatti dall'ordine dei millisecondi all'ordine dei secondi, mentre il secondo passa dall'ordine dei μ A all'ordine dei mA – è relativo all'impedenza del microelettrodo. Gli elettrodi impiegati nelle prime stimolazioni sono elettrodi ad alta impedenza: FHC microelectrodes[®] in tungsteno di lunghezza pari a 14cm, isolati con vernice epossidica con un'impedenza variabile da 4M Ω a 10M Ω . Una tale impedenza sottoposta ad un passaggio di

corrente dell'ordine dei mA offre tuttavia un alto rischio di lesionare il tessuto corticale circostante la punta dell'elettrodo; conseguentemente l'impedenza della punta degli elettrodi da stimolazione è stata abbassata mediante elettrolisi fino a raggiungere un valore minore di 150K Ω .

La possibilità di allungare la durata temporale della stimolazione ha aperto la possibilità di mappare la corteccia dell'insula e delle regioni circostanti mettendo a confronto le risposte di due diversi approcci all'ICMS: quello delle classiche stimolazioni a treni brevi – “ST-ICMS”, di durata pari a 50/100/150ms – e quello delle stimolazioni su scala comportamentale – “BTS-ICMS”, di durata superiore ai 500ms. Al di là della durata del treno, che ovviamente differisce nelle due condizioni, i parametri di stimolazione adottati sono i seguenti:

- Frequenza: 50Hz; stimolazioni a minore frequenza hanno portato saltuariamente a risposte comportamentali fino a 12Hz, ma una soglia della frequenza non è stata indagata sistematicamente. Durante le stimolazioni a 4mA 3sec (si veda sotto) la frequenza non è mai stata superiore a 50Hz per motivi precauzionali.

- Intensità: l'intensità massima adottata nel protocollo sperimentale è pari a 4mA. Stimolazioni a maggiore intensità non sono state testate per motivi precauzionali, se non nella prima fase di sperimentazione dei nuovi parametri. In ogni caso, una risposta presente a 5mA ma non a 4mA non è stata considerata affidabile a causa dell'eventualità che la stessa sia stata generata a seguito di una diffusione di corrente, e comunque per uniformità con tutte le stimolazioni.

- Pulse width: Essendo la stimolazione bifasica, lo stimolatore rilascia coppie di pulse a distanza ravvicinata, in cui il primo pulse è negativo e il secondo è positivo. La durata di un singolo pulse è pari a 0,2ms, mentre l'intervallo interno alla coppia di pulses è pari a 0,1ms.

3.6.3. Short Train ICMS (ST-ICMS)

Le stimolazioni a treno breve (ST-ICMS) sono stimolazioni classicamente impiegate al fine di ottenere brevi twitch con singoli effettori (generalmente bocca o effettori distali). Queste stimolazioni hanno una durata di partenza pari a 50ms; qualora non risulti alcuna risposta comportamentale alla stimolazione, il treno viene aumentato.

3.6.4. Behavioral Time Scale ICMS (BTS-ICMS)

Le stimolazioni a scala comportamentale, o behavioral time scale stimulations (BTS-ICMS), sono particolari ICMS la cui durata viene protratta per un periodo di tempo maggiore rispetto alle

stimolazioni classiche, al fine di osservare nel mentre della stimolazione un'intera manifestazione comportamentale evocata. Un esperimento a lunghi treni di stimolazione permette di valutare il ruolo comportamentale della risposta evocata dalla stimolazione; inoltre la BTS-ICMS permette di studiare il ruolo che il contesto gioca nel mentre della stimolazione. La BTS-ICMS è stata eseguita nelle regioni perisilviane adottando treni di stimolazione pari a 3 secondi; occasionalmente la stimolazione è stata mantenuta per un tempo totale di 4 secondi a scopo esplorativo per maggiore chiarezza nella risposta comportamentale. Il tetto temporale dei 4 secondi non è mai stato superato per motivi cautelari e una risposta a tale treno non è stata comunque considerata ai fini della valutazione della stimolabilità della regione a meno che non fosse accompagnata anche da stimolabilità a treni di massimo 3sec. A seguire la stimolazione standard, sono state eseguite stimolazioni di intensità decrescente finalizzate al ritrovamento del valore di soglia d'intensità per l'ottenimento di una risposta comportamentale. Le soglie di intensità sono state testate mantenendo un treno di stimolazione di 3 secondi e una frequenza di stimolazione di 50Hz.

3.6.5. Protocollo sperimentale di stimolazione

Una volta raggiunta e identificata la regione di stimolazione, si esplora la regione con stimolazioni a partire dai parametri sopra descritti. La risposta comportamentale osservabile viene descritta sul protocollo di stimolazione dopo aver eseguito un numero minimo di 3 stimolazioni. La risposta è considerata affidabile se viene ripetuta sistematicamente con un numero minimo di 2 risposte su 3 stimolazioni. Tali procedure sono state impiegate in entrambi gli esperimenti a ST e a BTSS. Tra una stimolazione e la successiva un lasso di tempo di almeno 30 secondi viene mantenuto e, in caso di risposte sensori-motorie localizzate somatotopicamente su un arto, lo stesso viene massaggiato in modo da permettere il recupero di una situazione standard per la stimolazione successiva.

Ogni qualvolta la stimolazione dà luogo ad un effetto comportamentale di tipo motorio, la stimolazione viene ripetuta impiegando i parametri da corteccia motoria sopra descritti (sia quelli classici che quelli impiegati dal gruppo di Michael Graziano). Ad oggi si è osservato che il 100% delle stimolazioni nelle regioni del solco laterale eseguite con parametri motori non ha generato alcuna risposta comportamentale osservabile. Le risposte comportamentali significative vengono filmate per mezzo di una videocamera; all'inizio di ogni filmato vengono riportati i dati della stimolazione (data, numero della penetrazione, profondità, regione di stimolazione e parametri di stimolazione). Successivamente ogni filmato viene scaricato su PC e tagliato in modo da garantire un rapido reperimento video delle risposte comportamentali.

3.7. Procedure di registrazione dell'attività cardiaca durante ICMS

Prima di ogni sessione di stimolazione due elettrodi adesivi di superficie (Medtronic[®]) vengono posti sul soggetto sperimentale. La posizione particolarmente ottimale per la registrazione ECG è la schiena (un elettrodo in corrispondenza del cuore, l'altro in corrispondenza della scapola destra); tale posizione permette infatti di lasciare l'animale libero di muovere gli arti superiori e inferiori senza che ciò interferisca in alcun modo con la registrazione dell'ECG. La schiena del soggetto sperimentale viene dunque rasata per permettere una maggiore aderenza con gli elettrodi; prima di posizionare gli elettrodi, su di essi viene posto un gel conduttore per ultrasuoni e trasmissioni elettriche (Moretti, Ultrasound Gel[®]) al fine di migliorare la qualità dell'acquisizione.

Il terminale degli elettrodi viene inserito all'interno di un amplificatore CED 1902[®] il quale invia un segnale amplificato al convertitore analogico/digitale CED Power 1401[®] impiegato per inviare il segnale al PC, al fine di permettere una visualizzazione on-line del tracciato ECG mediante il programma Spike2[®]. Insieme all'uscita del segnale ECG, viene inviato al CED Power 1401[®] l'uscita dello "stimolatore 2" sopra descritta; il programma Spike2[®] permette dunque di visualizzare on line il tracciato ECG nella sua evoluzione temporale, e su un secondo canale, sullo stesso asse temporale, l'evento stimolazione, rappresentato come treno di onde quadre, ciascuno della durata sopra descritta. In fig. 9 sono visibili due esempi di registrazione ECG; nelle porzioni alte, in rosso, sono visibili i tracciati, mentre nelle porzioni basse sono visibili i treni di stimolazione. Sulle ascisse è presente l'asse del tempo. In fig.9b, ingrandita rispetto alla precedente, sono visibili le componenti del tracciato P, QRS, e T; la visualizzazione delle deflessioni permette di valutare l'eventualità di un rallentamento dovuto ad un blocco atrio ventricolare, piuttosto che a carico del nodo seno atriale.

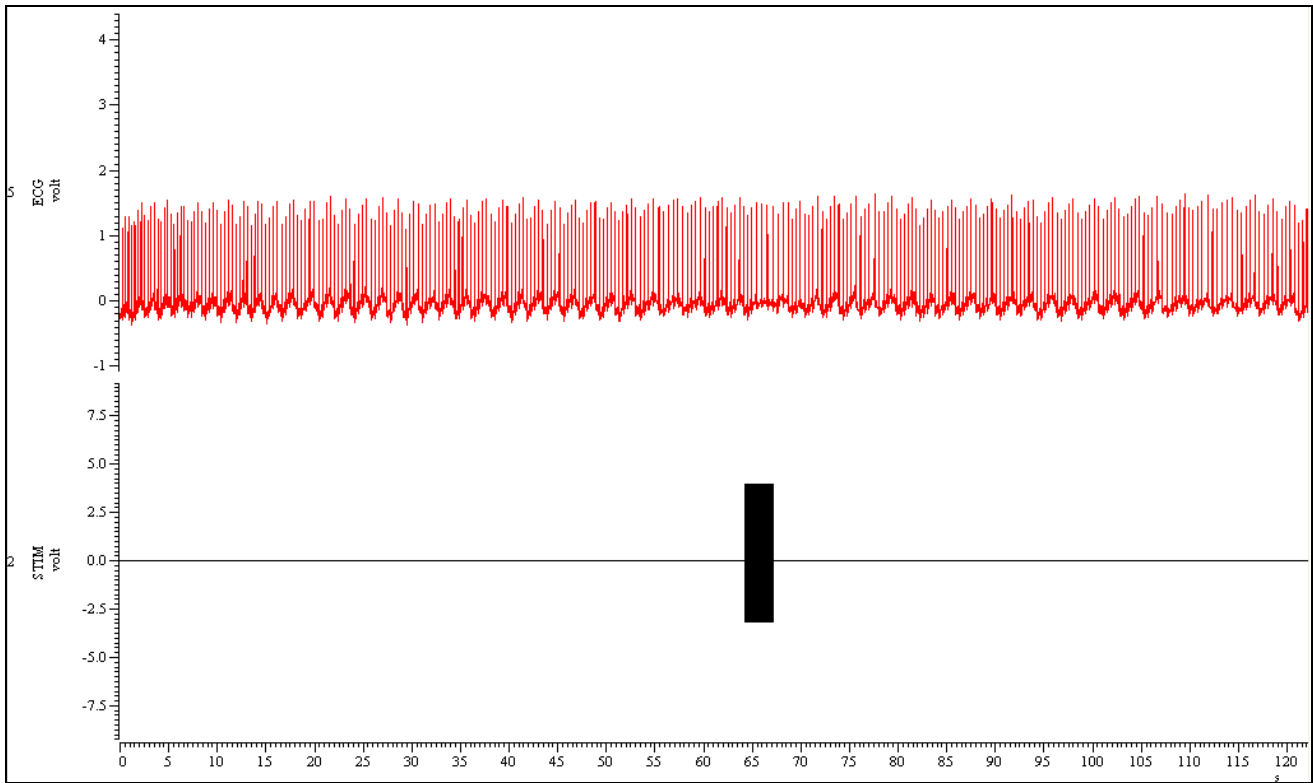


Fig. 9a

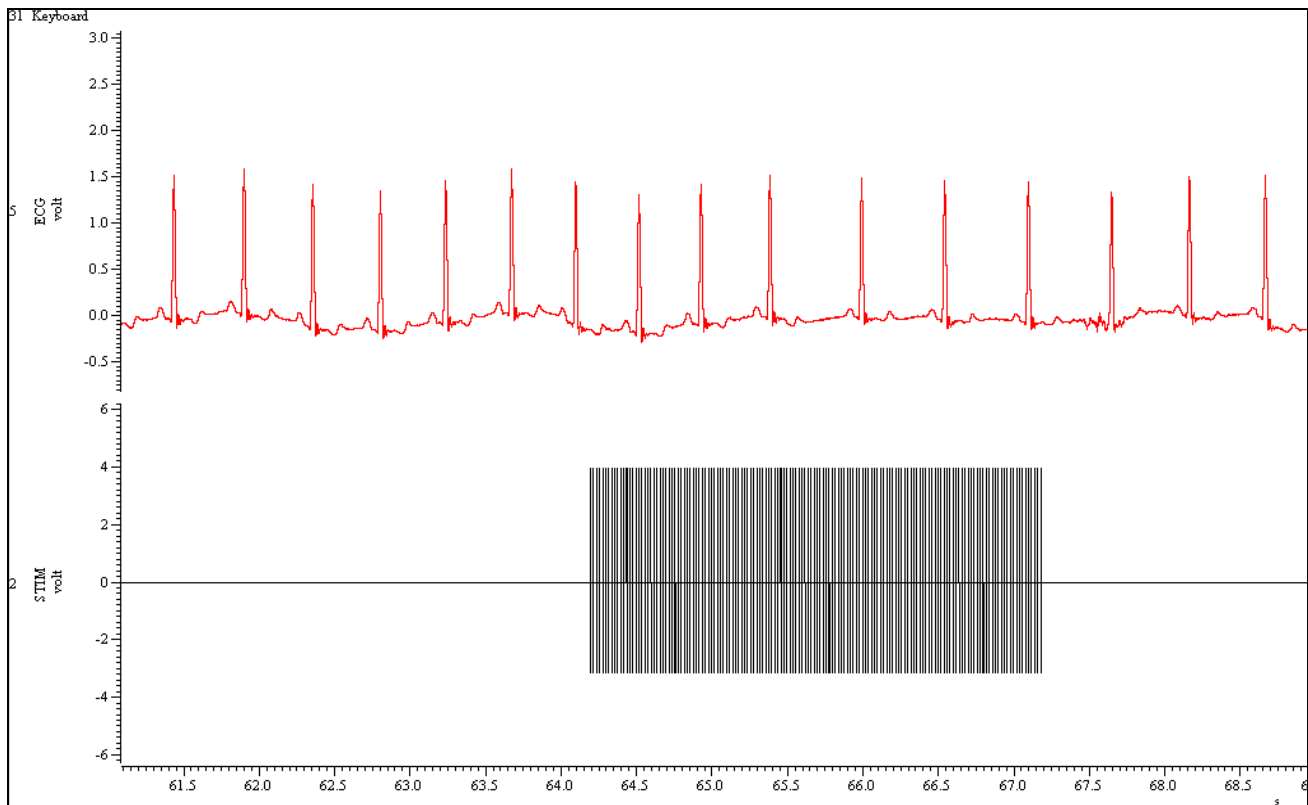


Fig. 9b

3.8. Analisi delle variazioni della frequenza cardiaca istantanea durante ICMS

Prima di ogni singola stimolazione, l'ECG viene registrato in condizioni di tranquillità per un periodo di baseline pari a 60sec; dopo la stimolazione, un periodo di circa 60sec viene registrato per un'analisi dell'andamento post-stimolazione. A seguito della registrazione, ogni singola stimolazione viene archiviata con un nome che ne indica il numero progressivo di stimolazione, il numero di penetrazione, la frequenza, il tempo e l'intensità. Dopo aver trovato le soglie di intensità per il sito di stimolazione in grado di dare una risposta comportamentale apprezzabile secondo i criteri sopra descritti, la stessa procedura di acquisizione dell'ECG viene eseguita per il valore di soglia di intensità e per l'esperimento a treni brevi.

3.8.1. Analisi HR per singole stimolazioni

In un primo momento le stimolazioni vengono analizzate singolarmente per verificare la presenza di una variazione HR durante o immediatamente a seguito della stimolazione. Prima di essere impiegato per il calcolo della frequenza istantanea, ogni tracciato ECG deve essere filtrato dagli artefatti da stimolazione e da movimento mediante un filtro digitale presente nel programma Spike2[®]. Una volta filtrato e ripulito, un programma ricerca automaticamente i complessi QRS, i quali vengono controllati successivamente. Il segnale viene quindi digitalizzato con una corrispondenza tra ogni evento digitale e ogni onda R. Sul segnale digitalizzato viene poi fatto partire uno script scritto basato sul conteggio della frequenza istantanea tra ogni onda R e l'onda R precedente: $QRS: HR[t] = 1/(QRS[t] - QRS[t-1])$. Il risultato dello script viene infine importato su Excel[®] dove vengono visualizzati i tempi di ogni onda R e la frequenza istantanea individuata per ogni intervallo R-R. Da questi dati è possibile ottenere un grafico che mostra l'andamento temporale della frequenza istantanea, allineato con l'evento stimolazione. Ogni grafico permette dunque di visualizzare la frequenza cardiaca del soggetto durante il periodo di baseline, durante la stimolazione, e nel periodo di post-stimolazione.

La baseline delle singole stimolazioni è stato calcolato con riferimento alla media della frequenza cardiaca (HR) nei 60 secondi precedente la stimolazione. L'effetto della stimolazione sull'HR è stato cercato in un periodo di 10 secondi a partire dall'inizio della stimolazione (HR_{10s}). Gli effetti bradicardici (BC) e tachicardici (TC) sono stati calcolati come il minimo ed il massimo HR in questo periodo, sottratto e normalizzato rispetto all'HR della baseline:

- $BC = (\min(HR_{10s}) - HR_{baseline}) / HR_{baseline}$
- $TC = (\max(HR_{10s}) - HR_{baseline}) / HR_{baseline}$

Le dinamiche dell'effetto della stimolazione sull'HR è stato investigato per mezzo del ricampionamento HR_{10s} a 0,5 sec.

3.8.2. Analisi HR per popolazione

Successivamente sono state condotte due analisi di popolazione. Queste analisi permettono di osservare la media delle variazioni della frequenza istantanea rintracciabili all'interno di gruppi di stimolazioni. I gruppi di stimolazioni sono stati costituiti differenziando sempre la localizzazione anatomica delle quattro regioni stimolate, assegnata di volta in volta a tutti i siti stimolati mediante la visualizzazione ecografica:

- Opercolo frontoparietale
- Insula dorsale
- Insula ventrale
- Opercolo temporale

L'analisi di popolazione per le quattro regioni di interesse è stata condotta con un criterio di accorpamento delle stimolazioni sensibile alla sola variabile AP, in un caso, e con un criterio di accorpamento delle stimolazioni sensibile alle variabili AP e ML, in un secondo caso.

(a) *Analisi di popolazione con variabile AP*

L'analisi di popolazione con variabile AP è stata condotta stabilendo 3 epoche temporali:

- EPOCA 1: baseline calcolata sui 60sec precedenti alla stimolazione. Una volta calcolato, il valore di baseline viene portato a 0 e a partire da esso vengono valutate le variazioni successive;
- EPOCA 2: periodo di stimolazione.
- EPOCA 3: periodo post-stimolazione di 10sec, sul quale viene calcolato l'andamento HR con un'analisi della frequenza istantanea;

Sono stati analizzati i profili delle stimolazioni e investigata statisticamente la consistenza dell'effetto della stimolazione in ogni campione di tempo. A tal fine è stata determinata la media HR per ogni campione di tempo significativamente diverso da zero. La fig.10 illustra:

- la percentuale di variazione della frequenza media rispetto alla baseline, pari a 0 (asse y);
- l'asse temporale (asse x; il periodo di stimolazione precede la linea verticale tratteggiata ed è dilatato rispetto al periodo post-stimolazione);
- la risposta relativa ad ognuna delle regioni di interesse è illustrata separatamente mediante codice colore: opercolo fronto-parietale (blu), insula dorsale (viola), insula ventrale (rosso), opercolo temporale (verde);
- la significatività statistica è indicata dalla dimensione dei punti: piccoli: $p < 0,05$, medi: $p < 0,01$, grandi: $p < 0,001$.

In una versione dell'analisi l'allineamento è stato fatto in base all'inizio della stimolazione, mentre in una seconda versione l'allineamento è stato fatto a partire dalla posizione del massimo effetto (bradicardico o tachicardico). La funzione di tale analisi è di investigare il trend temporale effettivo della variazione indipendentemente dalla velocità della variazione.

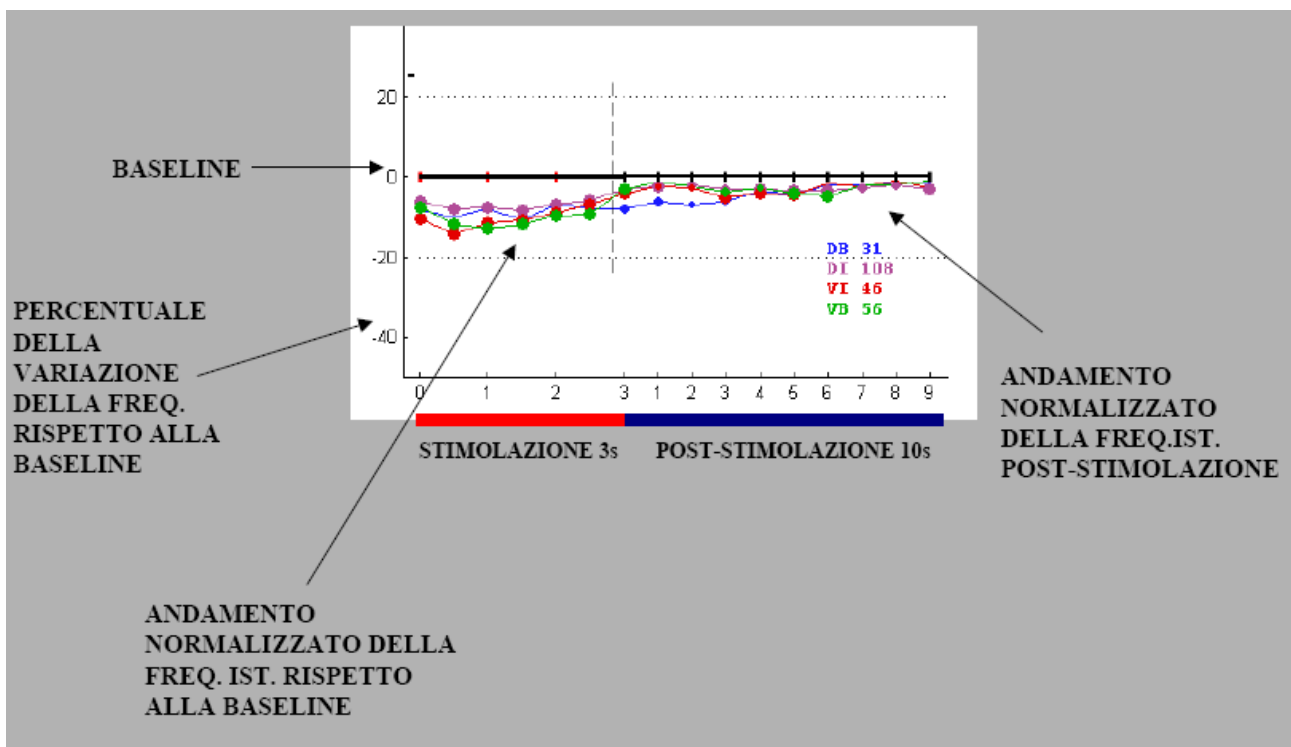


Fig. 10

L'analisi di popolazione con variabile AP è finalizzata all'osservazione delle variazioni della modulazione del SNA con riferimento alla posizione rostrocaudale, accorpando in ogni classe le stimolazioni condotte nella stessa posizione AP ma a differenti posizioni ML. Il vantaggio di tale analisi è duplice, in quanto permette di osservare sia l'*andamento temporale* che l'*intensità media*

di risposta su un dato AP. Permette di vedere in maniera chiara l'andamento temporale delle stimolazioni eseguite in una data posizione rostrocaudale mostrando nei 13 secondi rappresentati graficamente il decorso delle variazioni di frequenza. Ciò consente di vedere i tempi di caduta/accelerazione della frequenza istantanea ed il recupero. In secondo luogo, permette di vedere l'intensità media di risposta mostrando la percentuale esatta di variazione della frequenza istantanea rispetto alla baseline, e consentendo dunque di confrontare l'importanza dell'effetto tra diverse posizioni lungo l'asse rostrocaudale.

(b) Analisi di popolazione con variabili AP e ML

Le stimolazioni sono state raggruppate secondo la posizione stereotassica di AP ed ML; sono state inoltre mantenute le quattro suddivisioni per localizzazione anatomica sopra descritte. È stata stimata la consistenza dell'effetto bradicardico, tachicardico, bifasico o nullo in ogni gruppo applicando un t-test e una soglia variabile del 15%, 20%, 25% sull'effetto medio: il che significa che un dato gruppo di stimolazioni è stato considerato produrre bradicardia qualora la media BC risultasse inferiore (es) allo 0,20 e se BC risultasse significativamente diverso da zero ($p < 0,05$, doppia coda, uncorrected), e produrre una tachicardia qualora la media TC risultasse superiore (es) allo 0,20 e se TC risultasse significativamente diverso da zero ($p < 0,05$, doppia coda, uncorrected). Un gruppo è stato considerato produrre un effetto bifasico qualora dimostrasse al contempo un effetto bradicardico ed un effetto tachicardico.

L'analisi con variabili AP ed ML ha la funzione di localizzare il coinvolgimento dei singoli siti in grado di produrre una modulazione del SNA, ed il segno di tale modulazione. È così possibile considerare se all'interno di singole posizioni AP, per ciascuna regione, esistono differenze dovute alla posizione ML, e quindi ad uno spostamento lungo l'asse dorsoventrale. Inoltre, è possibile evitare in questo modo l'eventuale accavallamento di effetti opposti presenti ad un'unica posizione AP, a differenti posizioni dorsoventrali. Quest'ultima rappresenta un'eventualità non considerata nell'analisi con sola variabile AP, la quale ha tuttavia il vantaggio di mostrare il decorso temporale dell'effetto, che non è invece desumibile dall'analisi a variabili AP ed ML.

3.8.3. Analisi di popolazione con variabile “emisfero”

Al fine di verificare l'esistenza di una lateralizzazione della modulazione della risposta cardiaca a seguito di ICMS nelle regioni perisilviane, è stata condotta un'analisi di popolazione in cui sono state messi a confronto gli effetti delle seguenti stimolazioni:

- a) ICMS della regione anteriore sinistra (AP 27-21) delle regioni perisilviane;
- b) ICMS della regione anteriore destra (AP 27-21) delle regioni perisilviane;

Lo stesso numero di stimolazioni per ogni emisfero è stato considerato. Le quattro regioni di interesse sono state raggruppate in un unico gruppo. Due ANOVA sulle risposte tachicardiche e bradicardiche sono state eseguite lungo le stessa regione anteroposteriore. La regione di interesse (AP 27-21) è stata selezionata sulla base della concentrazione, nella stessa, di siti la cui stimolazione genera le maggiori variazioni della frequenza cardiaca.

4. RISULTATI

4.1. Short Train ICMS (ST-ICMS)

La stimolazione ST, eseguita con la consegna di treni di lunghezza minima pari a 50ms, ha fatto emergere l'esistenza di una rozza organizzazione somatotopica distribuita lungo una porzione ben definita della regione studiata: la rappresentazione somatotopica del corpo è infatti presente nelle regioni dell'opercolo frontoparietale e dell'insula dorsale, mentre è assente nella porzione più ventrale dell'insula e nel banco ventrale del silviano (opercolo temporale). Si evidenziano in particolare i seguenti risultati.

4.1.1. Organizzazione rostro-caudale

La ST-ICMS evidenzia una predominanza di rapide risposte che coinvolgono in varia misura la bocca (twitch della lingua, delle labbra, del mento) nella porzione anteriore dell'insula e dell'opercolo orbitofrontale (OFO). Ventralmente, la ST-ICMS evoca brevi riflessi manifestati con sussulti della regione sternale; poiché negli stessi siti la BTS-ICMS evoca risposte comportamentali di natura viscerale e attivazioni vagali che si traducono in cadute della frequenza cardiaca (si veda sotto) si è classificato l'insieme di tali risposte sotto la dicitura di potenziali riflessi viscerali. La regione immediatamente posteriore è in larga parte una regione di rappresentazione della mano, la cui stimolazione evoca twitch delle dita, del pollice o del polso. In una regione di transizione, l'ICMS evoca risposte congiunte di mano e di bocca. In una ristretta porzione dell'opercolo parietale sono presenti nuovamente risposte di bocca (twitch della lingua, delle labbra, del mento). Va sottolineato che il sito, quando stimolato con BTS-ICMS, produce movimenti della bocca molto diversi da quelli presenti nella regione anteriore, evidenziando dunque la funzione fondamentalmente differente della rappresentazione corticale in questione (si veda sotto per la descrizione di BTS-ICMS). Non esiste una localizzazione precisa delle singole dita, né una segregazione del pollice rispetto alle altre dita, come è invece presente nelle mappe corporee della convessità del cervello. Nella porzione mediale dell'opercolo frontoparietale centrale la stimolazione evoca twitch della mano congiuntamente ad un blinking dell'occhio controlaterale. La regione immediatamente ventrale risponde saltuariamente alla ICMS, con twitch della mano o del piede. Caudalmente, stimolazioni a treno breve producono twitch sincroni degli effettori distali mano e piede controlaterali. La regione più caudale, invece, mostra una risposta alla stimolazione con twitch sincroni degli arti superiori ed inferiori.

Complessivamente, la ST-ICMS mostra l'esistenza di una mappa corporea presente lungo l'opercolo frontoparietale e l'insula dorsale, con la bocca posta rostralmente e gli arti superiori e inferiori caudalmente. Viceversa l'insula ventrale e l'intero opercolo temporale non mostrano alcuna rappresentazione somatotopica e sono in larga misura non stimolabili mediante ST-ICMS.

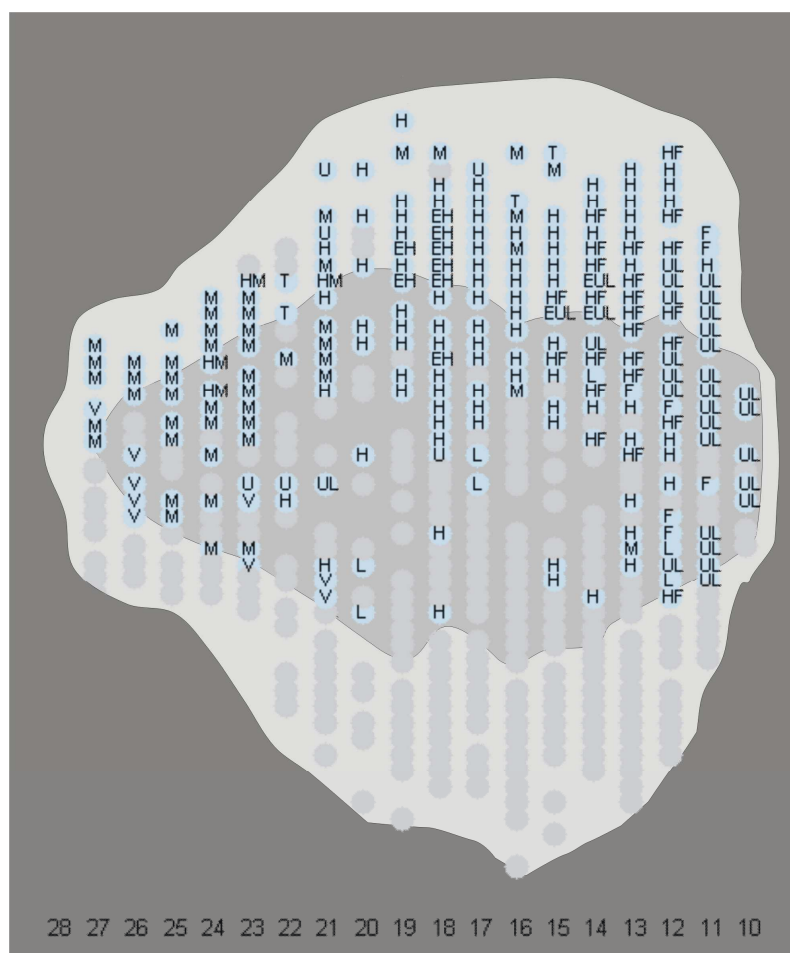


Fig. 11

La fig.11 mostra la mappatura dell'organizzazione somatotopica su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. Sono visibili l'opercolo frontoparietale e l'opercolo temporale (grigio chiaro) e l'insula (più scuro). Si osservano i siti con presenza di risposte di bocca (siti M), mano (siti H), lingua (siti T), arti superiori (siti U), arti inferiori (siti L), piedi (siti F), occhi (siti E), viscerale (siti V), e combinazioni delle stesse.

4.1.2. Distribuzione delle soglie temporali

L'analisi delle soglie temporali per evocare una risposta apprezzabile mostra una significativa distinzione tra il complesso anteriore, il complesso centrale, ed il complesso posteriore (fig.12). L'analisi condotta sulle soglie temporali delle regioni anteriore, centrale e posteriore in cui l'ICMS

ha evocato una risposta, ha mostrato una soglia di stimolabilità alta per il complesso anteriore (640ms; +/- 27ms), media per il complesso centrale (240ms; +/-19ms), e bassa per il complesso posteriore (80ms; +/-5ms).

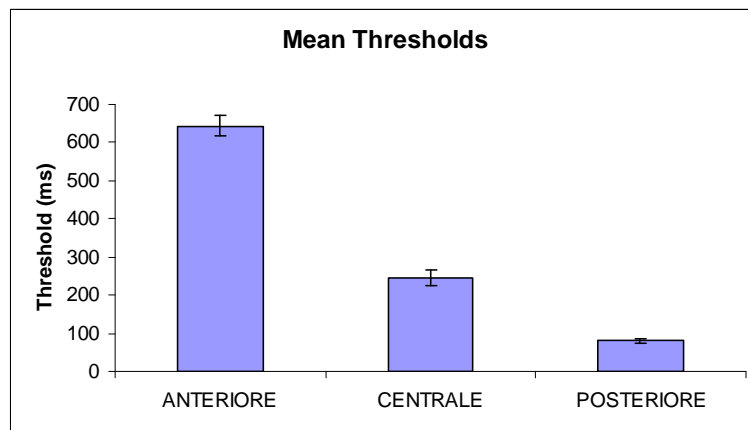


Fig.12

La fig.13 mostra la localizzazione dei valori di soglia su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. La scala a destra illustra il codice colore con indicato il valore di soglia temporale in secondi.

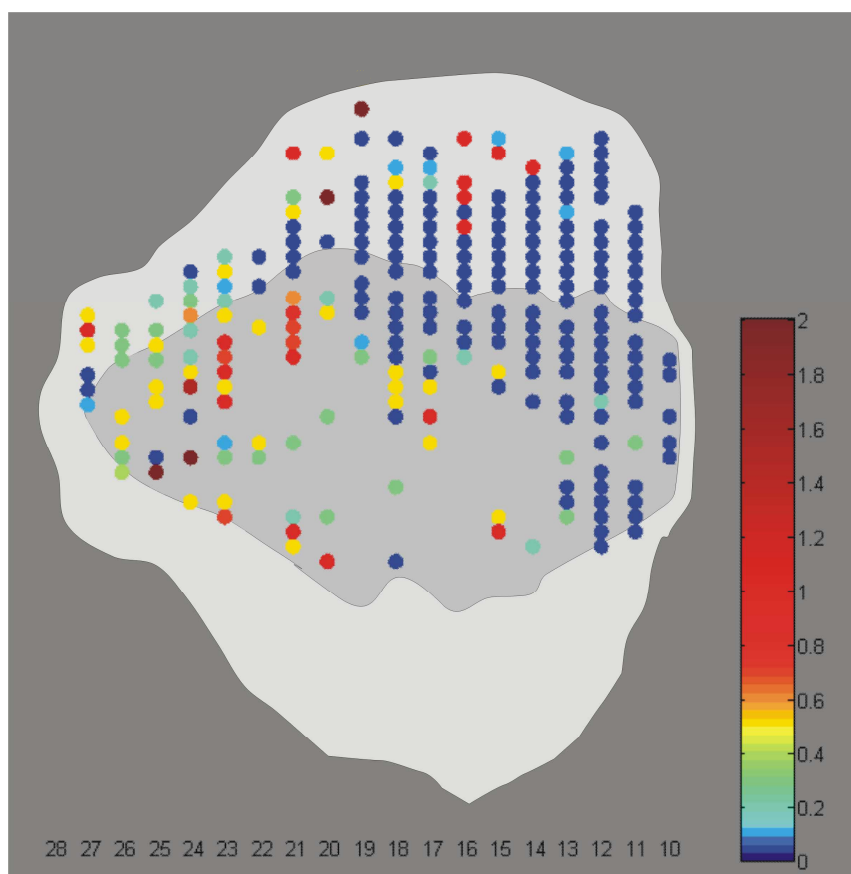


Fig.13

4.2. Behavioral Time Scale ICMS (BTS-ICMS)

La stimolazione a scala comportamentale ha fatto emergere la presenza di una varietà di risposte comportamentali complesse evocabili elettricamente da gran parte della regione perisilviana. In dettaglio, sono state evocate risposte appartenenti ai seguenti domini: (a) risposte comunicative; (b) risposte motorie, sensoriali o miste; (c) risposte viscerali; (d) risposte miscelanee. Indipendentemente dalle risposte ottenute, è stato osservato che una variazione del tempo di stimolazione porta ad una variazione nella complessità della risposta e ad una maggiore durata della stessa. In alcuni casi specifici, ad esempio durante risposte motorie complesse che coinvolgono movimenti del braccio, una maggiore durata nella stimolazione offre l'opportunità di studiare in maniera più approfondita variabili quali la direzionalità del movimento, permettendo ad esempio di distinguere un semplice sollevamento del braccio da un movimento di raggiungimento della bocca con il braccio e una conseguente apertura della bocca. Tuttavia, le risposte presentate in coda sono state ottenute con BTS-ICMS a treno fisso pari a 3sec.

4.2.1. Risposte Comunicative

Risposte comunicative complesse possono essere evocate dalla stimolazione elettrica dell'insula ventrale. La fig.14 mostra la mappatura delle risposte a carattere comunicativo su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. Le risposte a carattere comunicativo sono evocate prevalentemente da ICMS eseguite lungo la porzione centrale dell'insula ventrale.

La prevalente risposta comunicativa evocata è il *lip smacking*, un gesto affiliativo consistente in una rapida apertura e chiusura delle labbra. In alcune occasioni il lip smacking può essere intervallato dal sollevamento delle labbra al fine di mostrare i denti a bocca chiusa; questa espressione, denominata *silent bared teeth*, è considerata un mezzo per segnalare le proprie intenzioni pacifiche. Secondo i primatologi, nel Rhesus l'alternanza di lip smacking e silent bared teeth compone un'espressione facciale a sé stante, denominata *teeth chattering*, impiegata dai subordinati verso i membri dominanti. In molti casi la fine dell'espressione facciale evocata dalla stimolazione viene seguita da movimenti masticatori.

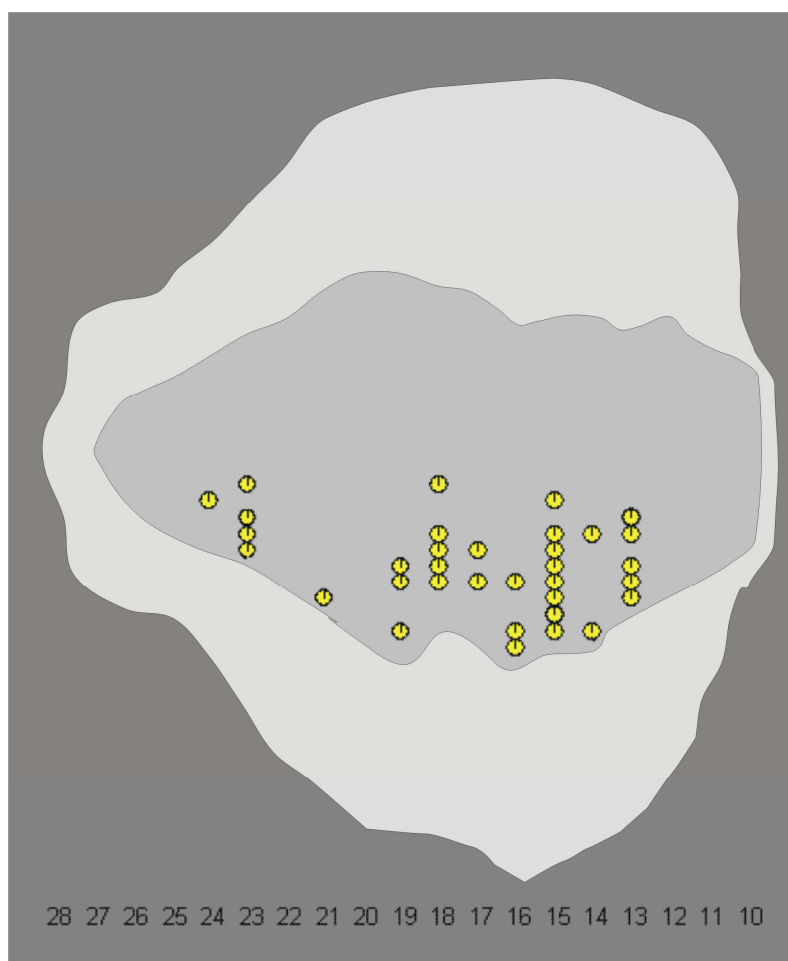


Fig.14

Per valutare la potenza della risposta comunicativa evocata, la stessa è stata testata in condizioni di interferenza con altre risposte comunicative a diverso carattere emozionale: sono state eseguite ICMS mentre il soggetto sperimentale era intento a minacciare lo sperimentatore aprendo la bocca; con l'inizio della stimolazione il soggetto interrompe la minaccia spontaneamente prodotta e inizia la risposta evocata elettricamente, la quale viene interrotta a fine stimolazione per riprendere la minaccia spontanea.

Tra le ipotesi interpretative di tale fenomeno, vi è la possibilità che tale risposta sia dovuta ad una mera attivazione del programma motorio relativo all'espressione facciale corrispondente. In realtà, dato particolarmente interessante, le risposte comunicative vengono evocate solamente a condizione che il soggetto sperimentale stia fissando negli occhi un altro soggetto (ad esempio, lo sperimentatore); viceversa, la stimolazione dello stesso sito non dà alcuna conseguenza se nessuno sperimentatore è presente o comunque in assenza di contatto visivo. Qualora il soggetto diverga volontariamente lo sguardo dallo sperimentatore, la risposta diminuisce o sparisce del tutto. Conseguentemente, l'idea per cui la stimolazione attivi un programma motorio *tout court* non regge, in quanto fattori contestuali (il contatto visivo) sono necessari per l'attivazione della risposta.

È stato notato un forte effetto di adattamento della risposta comunicativa, senz'altro maggiore rispetto a tutte le altre risposte evocate nel corso dell'esperimento. Questo adattamento ha precluso conseguentemente un'indagine approfondita dell'effetto in merito ad alcune variabili di interesse, quali il ruolo della vicinanza dello sperimentatore dal soggetto, o l'identità dello sperimentatore posto di fronte al soggetto.

4.2.2. Risposte Motorie e Sensoriali

Tutte le risposte di natura motoria e sensoriale sono state evocate nella regione dorsale dell'insula e lungo l'opercolo frontoparietale. Le risposte motorie e sensoriali si presentano come risposte in gran parte sovrapposte per quanto riguarda la modalità (motoria o sensoriale), ma chiaramente segregate per quanto concerne l'aspetto funzionale dell'output. In diverse occasioni la stimolazione elettrica della regione perisilviana dà luogo a risposte di natura prettamente motoria, in cui il soggetto sperimentale esegue movimenti semplici o atti motori a valenza ecologica. Durante la stimolazione il soggetto è sorpreso della propria esecuzione motoria o è indifferente, ma generalmente tale risposta non suscita comunque sensazioni disturbanti. Le risposte motorie sono definite tali poiché vengono eseguite in maniera indipendente dalla volontà del soggetto, in maniera immediata e obbligata, vale a dire che è impossibile al soggetto opporsi al movimento evocato. Tale genere di risultato è tradizionalmente considerato effetto dell'eccitazione elettrica di una rete motoria prossima all'output muscolare; casi tipici sono gli effetti della stimolazione del lobo frontale, e delle aree motorie e premotorie in particolare. Altre risposte incluse nella presente classe si presentano come risposte parzialmente diverse dalle prime per quanto concerne la loro manifestazione comportamentale. Si tratta infatti di risposte motorie volontarie conseguenti stimolazioni di natura sensoriale (ad esempio, parestesie) localizzate in specifiche parti del corpo; in questi casi il soggetto mostra stupore o fastidio a seguito della stimolazione, con un susseguente comportamento esplorativo della parte corporea interessata, nel caso di stimolazioni non fastidiose, o con manifestazioni stereotipate di fastidio, nel caso in cui la stimolazione dia luogo ad una sensazione spiacevole. Tuttavia, è stato osservato che generalmente il comportamento volontario descritto consegue un primo comportamento motorio puro. Alternativamente, le risposte possono avere inizio con un breve twitch dell'effettore interessato (chiaramente visibile nella stimolazione ST). Poiché le risposte tipicamente motorie e quelle miste sono co-localizzate, si è deciso di considerare un'unica classe di risposte motorie e sensoriali. La fig.15 mostra la mappatura delle risposte motorie e sensoriali su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. I colori dei siti stimolati rappresentano le tipologie di risposta: risposte oroalimentari (cerchi oca e rosso);

movimenti della mano e del polso, atonia della mano, rotazione del polso e movimenti di afferramento (cerchi blu); movimenti stereotipati sincroni degli effettori distali mano e piede (cerchi verdi); movimenti dell'arto inferiore e del piede (cerchi gialli); movimenti sincroni degli arti superiore e inferiore controlaterale (cerchi bianchi).

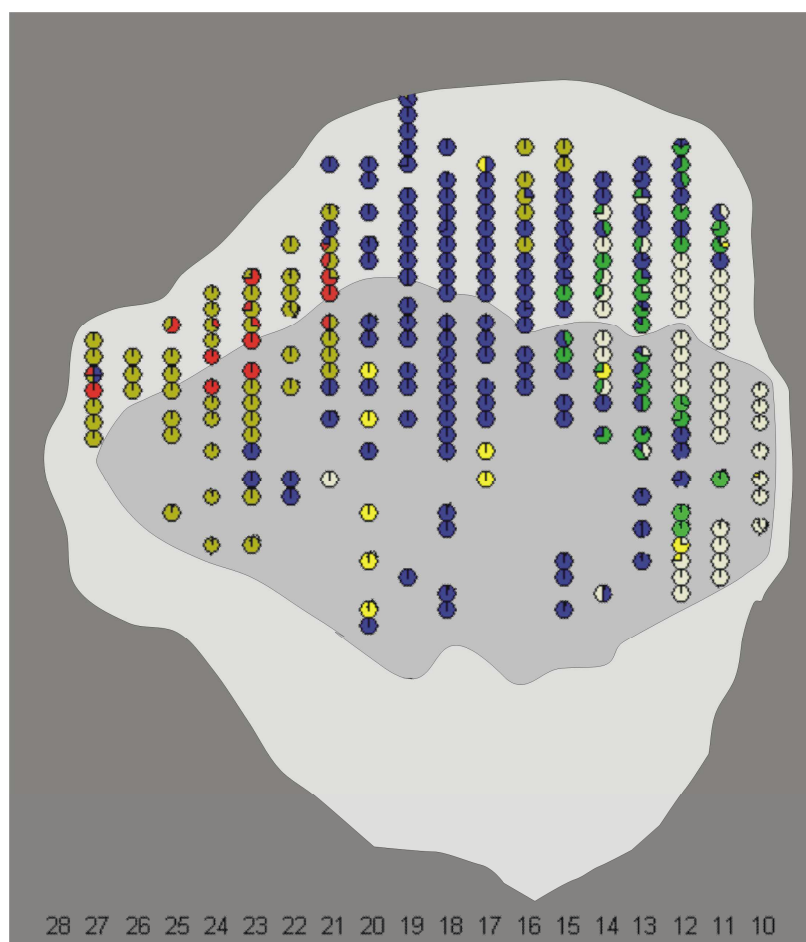


Fig.15

Le risposte oroalimentari consistono in movimenti di masticazione e di mouthing (movimenti finalizzati alla manipolazione intraorale del cibo), generalmente seguiti dalla deglutizione, senza che alcun cibo sia presente in bocca. Tali risposte sono spesso accompagnate dall'inibizione di ogni altro movimento: in particolare, stimolando durante il raggiungimento del cibo con la mano, o mentre il soggetto porta alla bocca il cibo, il movimento si arresta per poi riprendere a fine stimolazione. L'inibizione del movimento è bilaterale, ma per motivi tecnici non si è riuscito a stabilire se coinvolga anche i movimenti degli arti inferiori. La diminuzione dell'intensità di corrente diminuisce l'intensità della risposta, dimostrandone la natura prevalentemente motoria. Inoltre, stimolando quando il cibo è realmente presente in bocca, ovvero mentre una masticazione naturale è già in corso, si ottiene un rallentamento del ritmo masticatorio.

4.2.3. Risposte Viscerali

La stimolazione dei settori anteriori dell'insula e dell'opercolo frontale danno luogo a risposte viscerali. Le stimolazioni più dorsali (insula anteriore dorsale e OFO) evocano una forte smorfia di disgusto caratterizzata dal sollevamento lateralizzato del labbro fino a scoprire i denti (fig.16, sinistra). La smorfia di disgusto evocata dalla stimolazione non diverge dalla smorfia evocata naturalmente dal soggetto in seguito all'avvicinamento di cibo non gradito verso la bocca, da parte dello sperimentatore.

**Fig.16**

Stimolazioni più ventrali sono frequentemente accompagnate dalla stessa smorfia, ma si associano all'espressione facciale sopra descritta comportamenti complessi correlati al disgusto, o conati di vomito. Qualora la stimolazione inizi mentre l'animale sta già masticando il cibo afferrato, con l'inizio della stimolazione il cibo viene espulso dalla bocca; se invece la stimolazione inizia dopo che il cibo è stato afferrato, ma prima che esso raggiunga la bocca, vale a dire durante il movimento del braccio verso la bocca, il soggetto arresta il movimento, esplora attentamente il cibo e infine lo rigetta mentre la stimolazione è ancora in corso (fig.16, destra). È interessante il fatto che tale comportamento è immutato indipendentemente dal tipo di cibo impiegato, e che tanto l'espulsione del cibo quanto il rifiuto di portarlo alla bocca sono risposte ottenibili anche con cibi particolarmente favoriti dall'animale. Riproponendo lo stesso cibo immediatamente dopo la stimolazione il soggetto mangia normalmente. Altra risposta viscerale ottenibile è l'evocazione di conati di vomito (fig.16, al centro); tale risposta è prevalentemente localizzata nella porzione ventrale dell'insula anteriore. La fig.17 mostra una mappatura delle risposte viscerali su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. Sono rappresentati i siti la cui stimolazione produce smorfie di disgusto (cerchi viola), e siti la cui stimolazione produce rifiuto del cibo dalla bocca, rifiuto di portare cibo alla bocca, o conati di vomito (cerchi rossi).

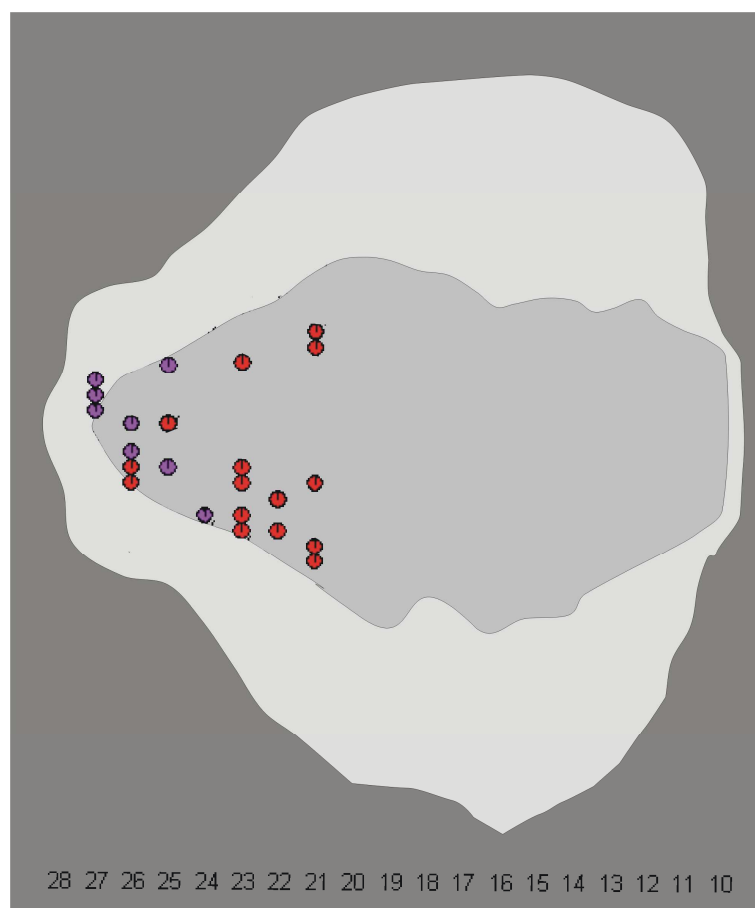


Fig.17

4.2.4. Risposte Miscellanee

La stimolazione elettrica della regione perisilviana ha dato luogo in numerose occasioni a risposte ripetibili e sistematiche ma al contempo non chiare o non classificabili all'interno delle classi di risposte precedentemente descritte. La mancata identificazione di alcune risposte comportamentali evocate elettricamente fa parte dei limiti tecnici dell'ICMS, poiché in diversi casi due o più sensazioni o stati interni indotti al soggetto possono dare luogo ad una unica manifestazione comportamentale. Le risposte non chiaramente interpretabili sono in larga parte localizzate nella regione dell'insula ventrale e diffuse ampiamente nell'opercolo temporale; questo dato dimostra la natura essenzialmente non motoria di questi siti. La fig.19 mostra la mappatura delle diverse risposte miscellanee su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. Le risposte evocate comprendono le seguenti reazioni. Le reazioni stereotipate di fastidio (cerchi rossi) sono stimolazioni nocicettive riconoscibili dall'espressione facciale dell'animale (chiusura con forza degli occhi e corrugamento del volto), nonché dal complessivo comportamento di agitazione (le mani ripetutamente colpiscono la sedia per primati, o la afferrano saldamente fino alla fine della stimolazione). Tali risposte sono diffuse nella regione ventrale, ma prevalentemente evocate da ICMS dell'insula ventrale centrale. Piccoli movimenti e aggiustamenti posturali (cerchi gialli) sono

evocati da stimolazioni dell'insula ventrale; durante queste stimolazioni si osservano brevi movimenti degli arti inferiori in cui il soggetto aggiusta la propria posizione sulla sedia per poi fermarsi. Tali stimolazioni non sono avvertite dal soggetto come fastidiose. Contrazioni del tronco (cerchi blu) possono essere evocate da ICMS dell'insula ventrale centrale, mentre spostamenti assiali verso l'emicampo controlaterale, accompagnati da spostamento dello sguardo nella stessa direzione (cerchi verdi), e tremori dell'intero corpo o di grandi porzioni dello stesso (cerchi neri), sono evocabili prevalentemente lungo l'opercolo temporale del silvano.

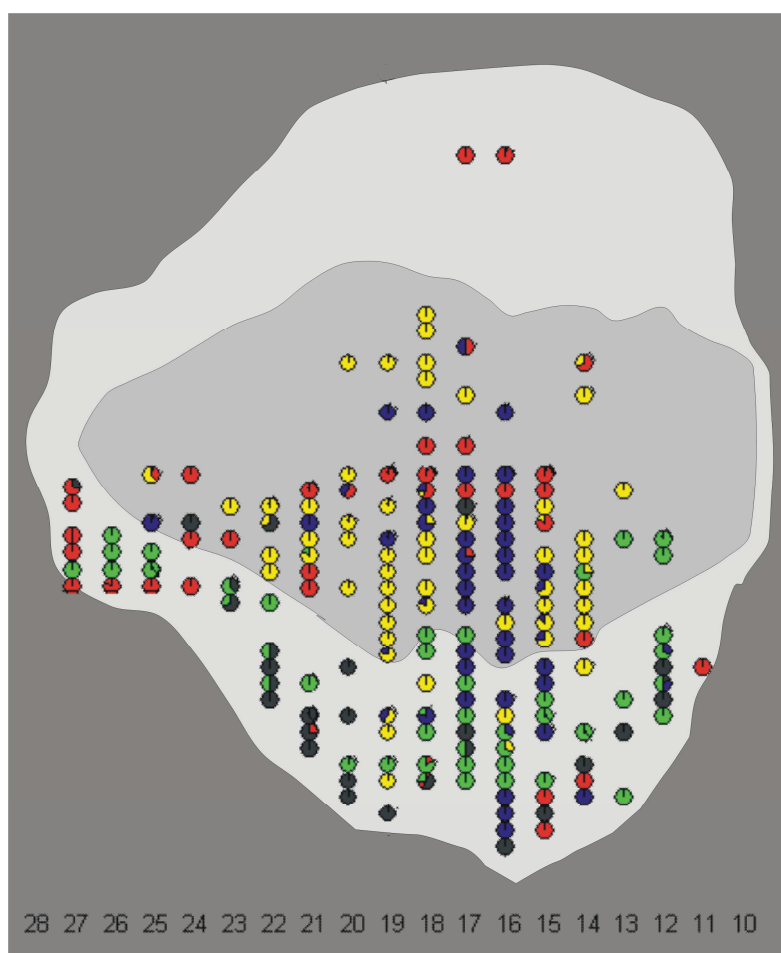


Fig.19

4.3. Variazioni della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo durante ICMS

Complessivamente l'analisi delle variazioni della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo ha mostrato che la stimolazione intracorticale dell'insula e delle regioni perisilviane è in grado di produrre diverse tipologie di modulazione del SNA. Le tipologie di risposte evocate sono state identificate per mezzo di analisi su singole stimolazioni; i risultati di analisi di popolazione

hanno invece mostrato la distribuzione delle risposte sulla superficie studiata, l'intensità media della variazione rispetto alla baseline, i trend temporali medi della variazione ed i pattern di variazione correlati a specifiche risposte comportamentali. Inoltre, il confronto tra due analisi di popolazione condotte sui diversi emisferi illustra i risultati relativi all'ipotesi di un controllo lateralizzato del SNA.

4.3.1. Risultati dell'analisi HR per singole stimolazioni

L'analisi su singole stimolazioni ha mostrato tre tipologie di risposta: risposte bradicardiche, risposte tachicardiche, risposte bifasiche. Inoltre, in diversi siti non è stata riscontrata alcuna variazione di frequenza cardiaca durante o a seguito di ICMS.

(a) Bradicardia

Le risposte bradicardiche (fig.20, in alto) si presentano con una caduta della frequenza cardiaca molto rapida, che ha inizio con una latenza importante già dalla prima o dalla seconda coppia di complessi QRS successivi l'inizio della stimolazione. Durante le risposte bradicardiche, la frequenza istantanea subisce diminuzioni che raggiungono il 30% di caduta rispetto alla baseline. Non è mai stata osservata alcuna risposta bradicardica dovuta ad un blocco atrio-ventricolare; al contrario, tutte le risposte bradicardiche evocate hanno manifestato latenze a carico dei complessi QRS, mantenendo pressoché invariata la latenza del tratto P-Q (bradicardia sinusale). In alcuni casi la risposta bradicardica ha prodotto battiti di fusione (fig.20, in basso). I battiti di fusione si verificano se uno stimolo atriale viene condotto ai ventricoli nello stesso tempo in cui si scarica il focus ventricolare. L'aspetto del QRS che ne deriva è intermedio tra quello normocondotto e quello in corso di tachicardia ventricolare e in alcuni casi è visibile l'onda P che precede il battito (in questo caso, l'onda P è comunque ravvicinata al complesso QRS rispetto al normale). La comparsa di battiti di fusione durante ICMS è riconducibile al ritardo indotto dalla stimolazione sullo stimolo atriale, e conseguentemente rappresenta una conferma indiretta del fatto che la bradicardia indotta dallo stimolo elettrico è di origine sinusale, e non invece dovuta a blocchi AV.

Le risposte bradicardiche sono caratterizzate da un rapido recupero della frequenza cardiaca originaria, o da un seguente aumento di frequenza cardiaca al di sopra del livello di baseline (in questo caso si parla tuttavia non più di bradicardia bensì di risposta bifasica).

DIMINUZIONE DI FREQUENZA ISTANTANEA INDOTTA DA ICMS

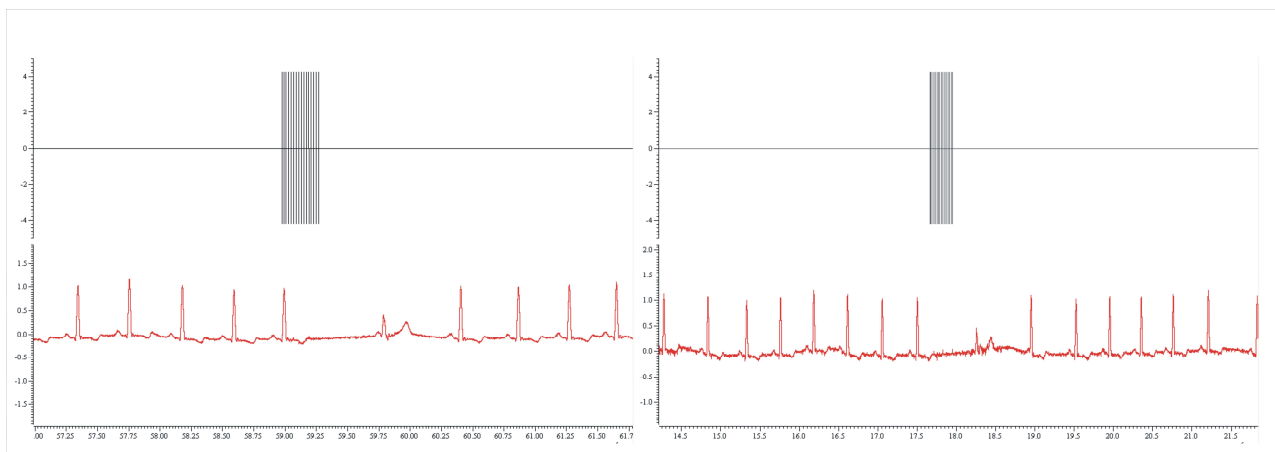
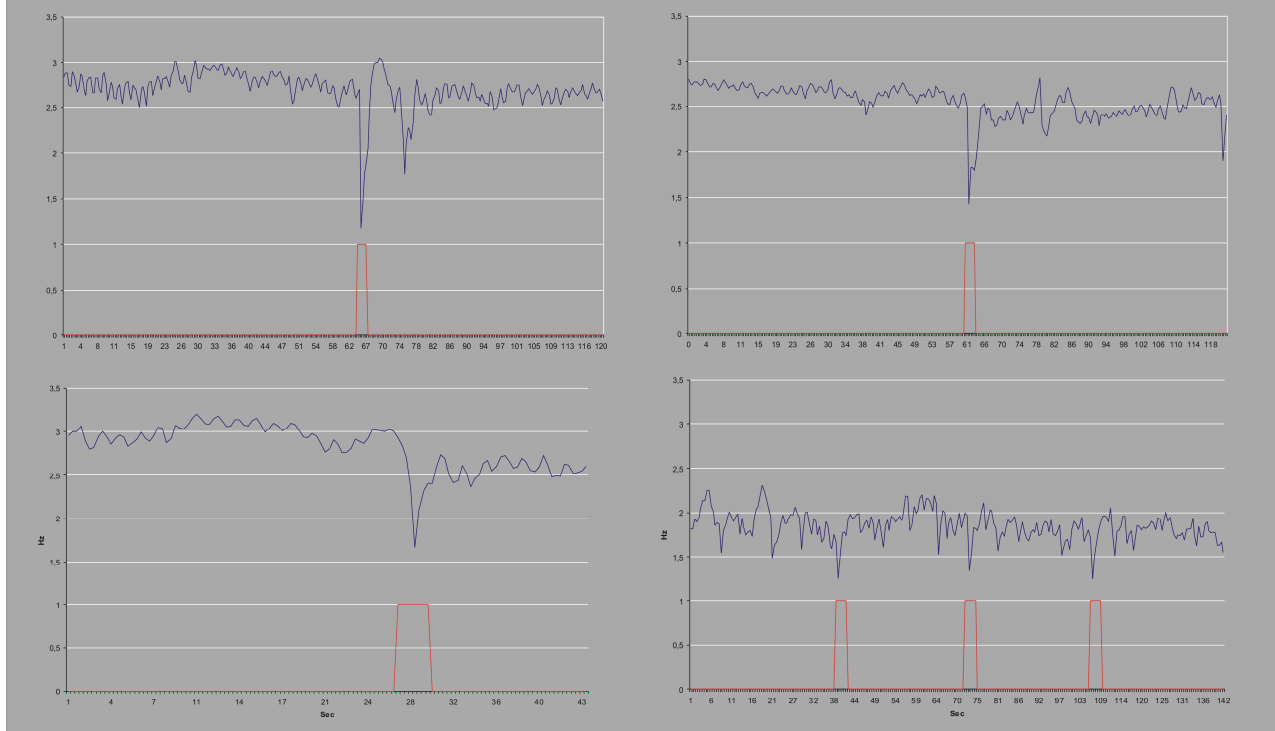


Fig.20, in alto – Bradicardie indotte da ICMS

Fig.20, in basso – Battito di fusione

(b) Tachicardia

Durante le risposte tachicardiche (fig.21) la frequenza istantanea aumenta fino a superare il 20% di variazione rispetto alla baseline; la risposta inizia un ritardo di circa 1sec dall'inizio della stimolazione e raggiunge il picco tra i 3sec e i 5sec, perdurando quindi diversi secondi oltre il periodo di stimolazione.

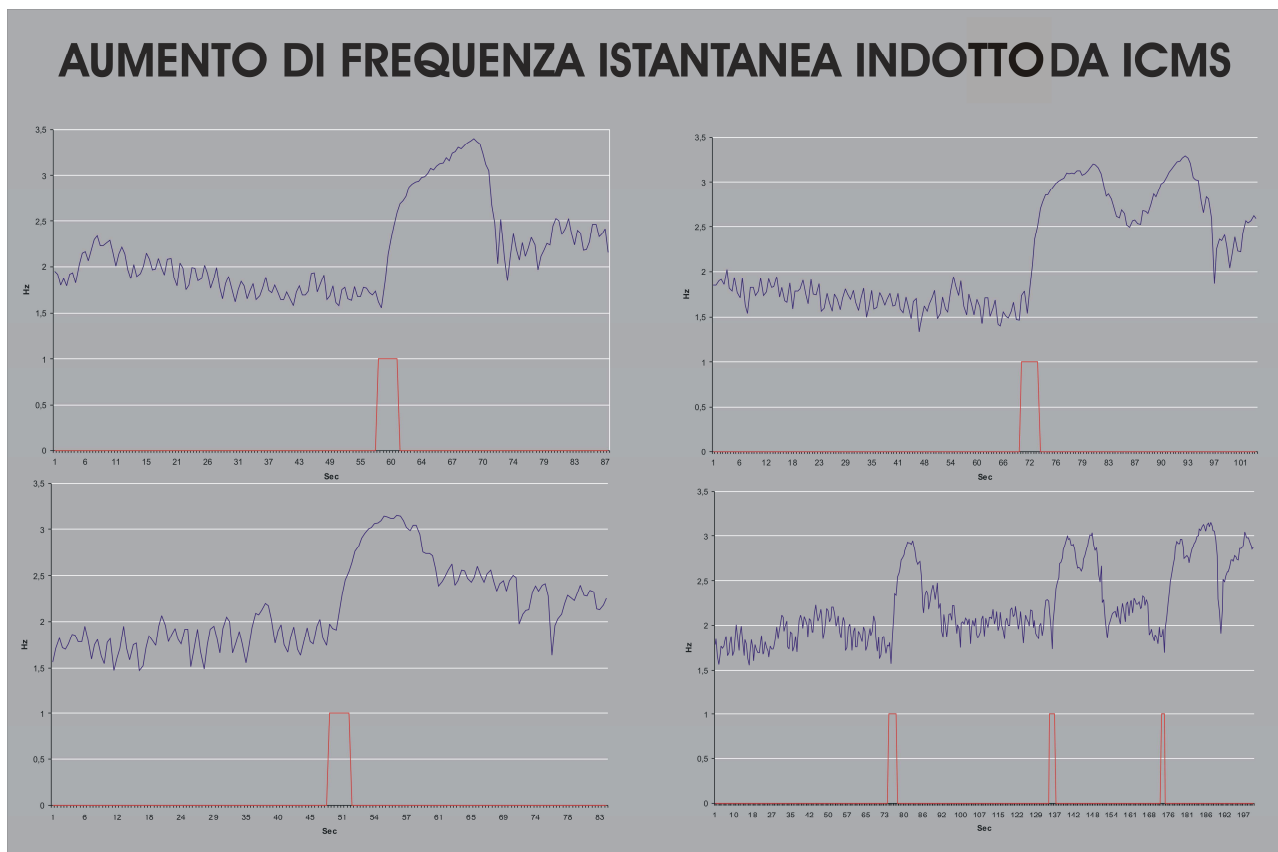


Fig.21 – Tachicardie indotte da ICMS

(c) *Risposta Bifasica (bradicardia – tachicardia)*

In diverse occasioni la stimolazione evoca risposte bifasiche (Fig.22), ovvero risposte caratterizzate da una iniziale modulazione bradicardica (con tutte le caratteristiche sopra descritte) e seguita da una modulazione tachicardica (con tutte le caratteristiche sopra descritte). L'ipotesi per cui la tachicardia della risposta bifasica sia dovuta ad un compenso fisiologico conseguente la forte caduta bradicardica è da scartare a causa della presenza di risposte bradicardiche pure, di maggiori ampiezza rispetto alle bradicardie presenti nelle risposte bifasiche. Le risposte bifasiche debbono pertanto essere ricondotte a una risposta genuina dovuta ad una sincrona attivazione simpatico-parasimpatica. L'esistenza di una duplice attivazione simpatico-parasimpatico come tipologia di risposta genuina è descritta in letteratura (si veda il Cap.5).

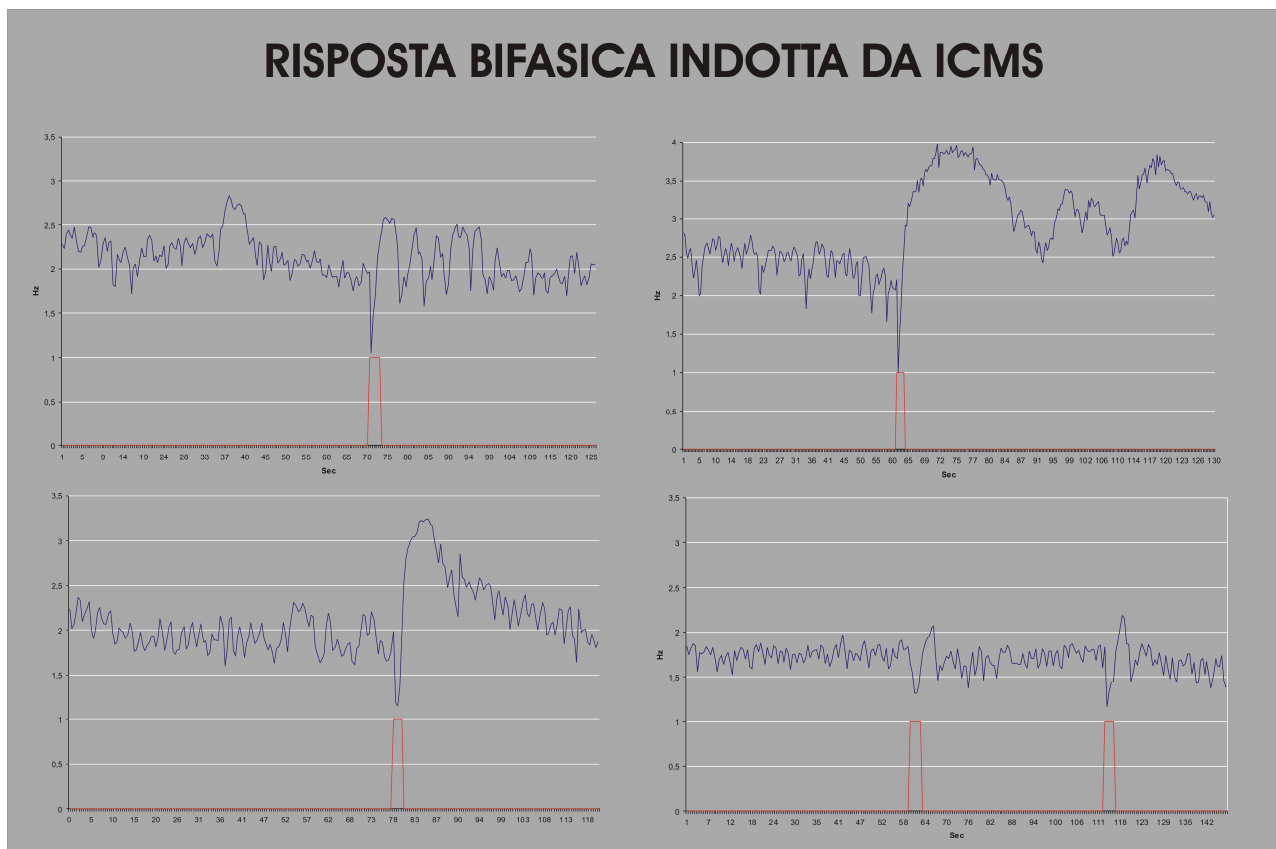


Fig.22 – Risposte bifasiche indotte da ICMS

4.3.2. Risultati dell'analisi HR per popolazione

(a) Analisi di popolazione con variabile AP

L'analisi di popolazione con variabile AP condotta sulle 3 epoche temporali (baseline, periodo di stimolazione, periodo post-stimolazione) mostra l'andamento temporale e l'intensità media della risposta, con riferimento alla posizione rostrocaudale. La fig.23 illustra i risultati dell'analisi per ogni singola posizione rostrocaudale (opercolo frontoparietale in blu, insula dorsale in viola, insula ventrale in rosso e opercolo temporale in verde; il valore di anteroposteriore è presente per ciascuna figura).

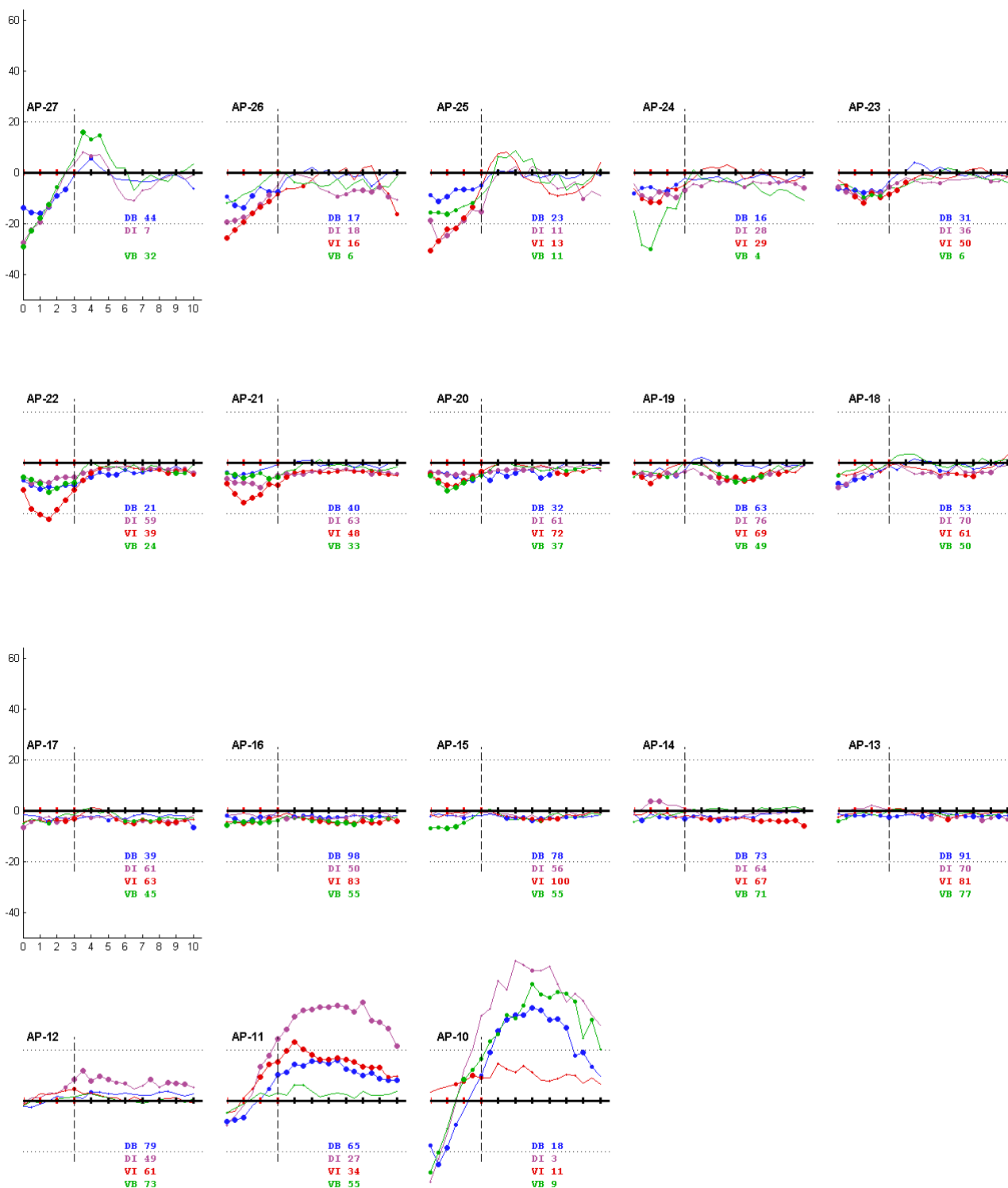


Fig.23

L'analisi mostra una netta prevalenza di effetti bradicardici nella regione anteriore, compresa tra le posizioni AP 27 ed AP 21; tale effetto indica che la stimolazione elettrica del complesso anteriore provoca una risposta media di tipo vagale classico, dotata delle caratteristiche sopra descritte. Una diminuzione degli effetti della stimolazione sulla frequenza istantanea, fino ad una completa scomparsa della modulazione indotta, è osservabile nella regione centrale compresa tra le posizioni AP 20 ed AP 13; tale effetto indica una generale inefficacia dell'ICMS sulla risposta del SNA, e conseguentemente un'assenza di relazioni funzionali tra la regione centrale ed il SNA. Un'inversione di tendenza, con risposte tachicardiche e bifasiche, è invece osservato nella regione posteriore compresa tra le posizioni AP 12 ed AP 10; tale effetto suggerisce una connessione funzionale tra la regione perisilviana posteriore ed il sistema nervoso simpatico.

Complessivamente, l'analisi di popolazione con variabile AP mostra una conferma del decorso temporale rinvenuto su singoli casi, tale per cui le risposte bradicardiche hanno breve latenza e un rapido recupero, suggerendo la presenza di una via pressoché diretta alla modulazione del SNA e non invece piuttosto di essere un effetto secondario della stimolazione, mentre le risposte tachicardiche hanno una latenza maggiore e un recupero lento; in questo caso la latenza è un fenomeno comunque fisiologico e quindi non è possibile discriminare in base ad essa se l'effetto è genuinamente indotto dall'ICMS o se è conseguenza dell'effetto indotto dalla stimolazione. Le risposte con maggiore modulazione, indipendentemente dal segno, sono localizzate lungo e estremità della regione indagata. In tali siti l'ampiezza supera una variazione del 20% rispetto alla baseline, suggerendo una forte connessione con il SNA e conseguentemente enfatizzandone il ruolo in merito agli aspetti funzionali dei siti stessi.

(b) Analisi di popolazione con variabili AP e ML

La fig.24 mostra la mappatura delle variazioni HR evocate dalla stimolazione elettrica, su un unfolding della regione perisilviana dell'emisfero sinistro del macaco. Lungo la linea in basso sono illustrati i valori dell'asse anteroposteriore. Sono illustrati i siti in cui la stimolazione evoca risposte bradicardiche (cerchi blu), tachicardiche (cerchi rossi) e bifasiche (cerchi neri), con una variazione rispetto alla baseline maggiore al 20%. L'analisi con variabili AP ed ML illustrata in figura mostra la distribuzione spaziale della variazione di risposta evocate dalla stimolazione. Le risposte bradicardiche sono concentrate nella regione dell'insula ventrale. Si osserva una predominanza di risposte bifasiche nei siti caudali, miste a risposte tachicardiche; si conferma inoltre il dato relativo alla distribuzione rostrocaudale osservato con l'analisi precedente (bradicardie evocate anteriormente e tachicardie evocate posteriormente).

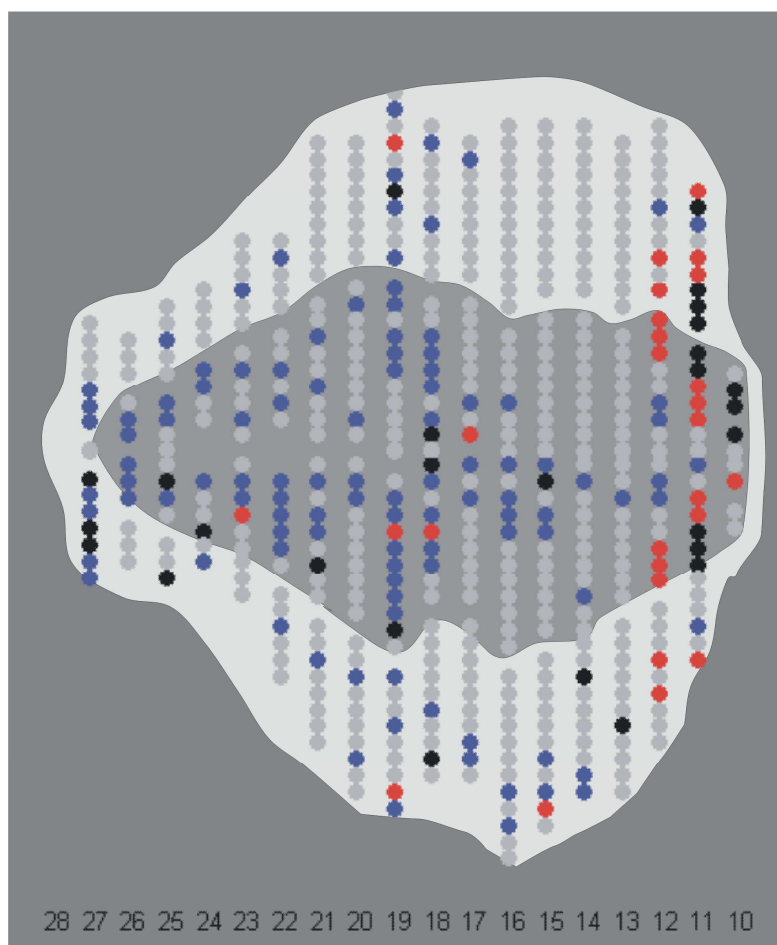


Fig.24

(c) Correlazione tra modulazione HR e comportamento evocato a BTS-ICMS

L'idea di registrare in maniera sincrona le risposte comportamentali a BTS-ICMS e la modulazione del SNA mediante analisi della frequenza istantanea da ECG ha come fine l'integrazione dei due dati al fine di una migliore comprensione degli aspetti funzionali dei siti registrati. Una ipotesi è quella di impiegare la modulazione del SNA al fine di chiarificare le risposte comportamentali individuate. È stata condotta una analisi di correlazione tra il comportamento evocato e la modulazione del SNA; in Fig.25 sono rappresentati i risultati dell'analisi relativi alle risposte evocate nelle quattro regioni di interesse (opercolo frontoparietale in blu, insula dorsale in viola, insula ventrale in rosso e opercolo temporale in verde).

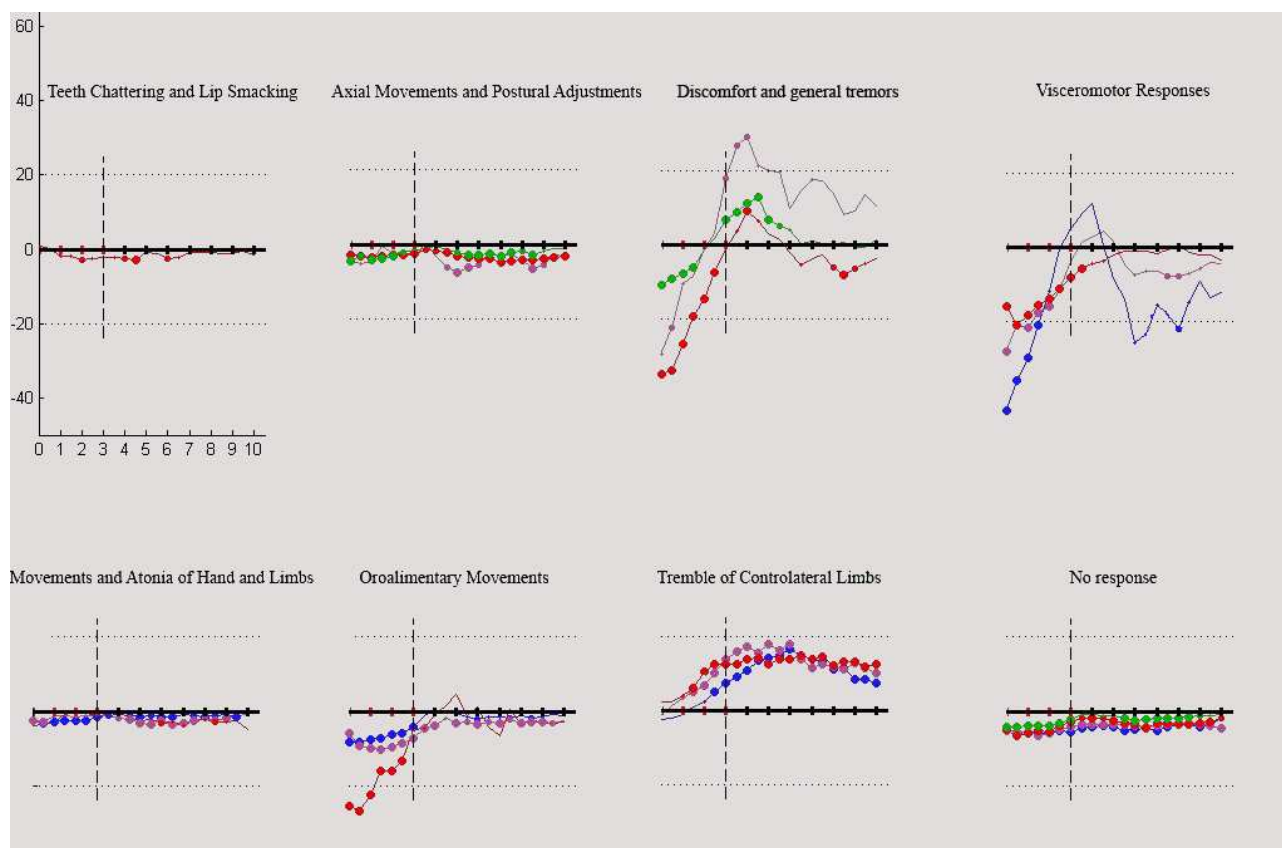


Fig.25

L'analisi di correlazione mostra una forte connessione tra il comportamento evocato e la variazione della frequenza cardiaca istantanea. La risposta bradicardica è presente in maniera chiara nelle stimolazioni che danno luogo a risposte oroalimentari e viscerali; in particolare, le risposte visceromotorie, presenti nell'opercolo frontale anteriore e nell'insula, sono accompagnate da una forte risposte vagale, mentre nel caso delle risposte oroalimentari la modulazione maggiore segue la stimolazione dell'insula ventrale, indicando la marcata valenza viscerale, in questa regione, della stessa risposta osservabile anche dorsalmente. La risposta tachicardica è presente nelle stimolazioni che danno luogo ad un forte tremore degli arti superiore e inferiore controlaterale, evocate prevalentemente da stimolazioni della regione posteriore. La risposta bifasica è presente durante stimolazioni di natura spiacevole e dolorifica. Le risposte di tipo motorio e sensoriali, nonché le risposte di tipo comunicativo, non presentano alcuna significativa modulazione del SNA. Stimolazioni che non provocano alcuna risposta comportamentale non producono modulazioni significative della frequenza cardiaca istantanea.

4.3.3. Analisi di popolazione con variabile “emisfero”

I risultati dell’analisi condotta sulle risposte tachicardiche e bradicardiche della regione perisilviana anteriore di entrambi gli emisferi (AP 27-21) dimostrano l’assenza di una lateralizzazione del segno della risposta (bradicardia VS tachicardia) e l’esistenza di una lateralizzazione dell’intensità della risposta (maggiore nell’emisfero destro).

Aumenti di frequenza cardiaca (risposte tachicardiche) e diminuzioni di frequenza cardiaca (risposte bradicardiche) durante la stimolazione o nel periodo post-stimolo significativamente maggiori alla baseline ($p < 0,001$) sono presenti in entrambi gli emisferi (fig.26). Questo dato dimostra l’assenza di una lateralizzazione del segno della risposta. Gli aumenti di frequenza cardiaca (risposte tachicardiche) e le diminuzioni di frequenza cardiaca (risposte bradicardiche) indotte dalla stimolazione dell’emisfero destro risultano essere significativamente maggiore ($p < 0,001$) ai corrispettivi effetti ottenuti con stimolazioni dell’emisfero sinistro (fig.26).

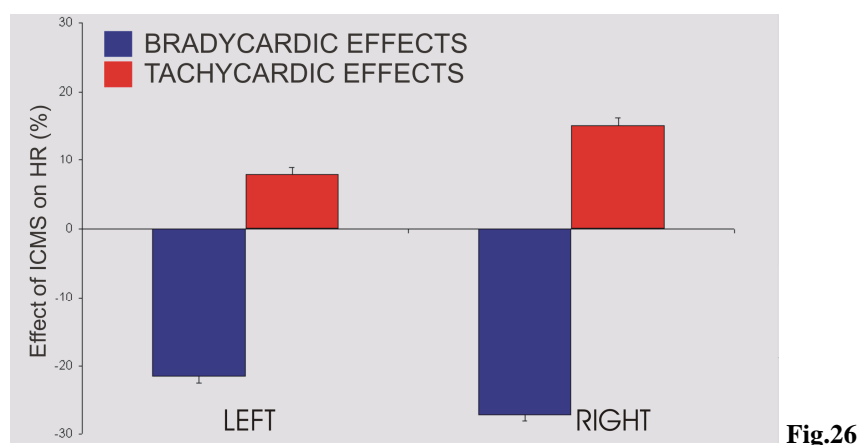


Fig.26

I risultati permettono dunque di affermare (a) l’assenza di una lateralizzazione del segno, poiché entrambe le risposte sono evocabili in entrambi gli emisferi – sebbene in entrambi vi sia una predominanza di risposte bradicardiche; (b) la presenza di una lateralizzazione dell’intensità, e in particolare la presenza di un maggiore effetto sul SNA a seguito di stimolazioni della regione perisilviana anteriore destra rispetto all’effetto sullo stesso a seguito di stimolazioni della regione perisilviana anteriore sinistra.

5. DISCUSSIONE

Electrisation of the island of Reil gave no results. [...] The electrodes, insulated up to the point, were again applied to the island of Reil. No result was observed.

Ferrier D., 1874-1875.

There is no reason to suppose that a part of the brain is excitable and another not. The question is, how the stimulation manifests itself.

Ferrier D., 1886

Come si è illustrato in Introduzione, l'Insula di Reil e le regioni perisilviane si sono mostrate essere implicate in una grande varietà di funzioni: le epilessie che coinvolgono l'insula producono nella fase iniziale dell'attacco movimenti oroalimentari e risposte di tipo viscerale, unitamente all'evocazione di movimenti complessi conseguenti (Insard et al., 2004). Viceversa, ictus che coinvolgono questa regione mostrano conseguenze contrastanti che di volta in volta possono interessare il normale funzionamento del sistema cardiovascolare (Christensen et al., 2005), il comportamento emozionale e la percezione di emozioni (Calder et al., 2000), deficit sensoriali delle modalità tattile e dolorifica (Cereda et al., 2002). Sorprendentemente, solo uno esiguo numero di studi, in gran parte datati, ha cercato di rispondere alla domanda relativa alle putative funzioni che emergono dalla clinica. Nel presente studio si affronta tale questione mediante un approccio integrato di microstimolazione intracorticale che fa uso di stimolazioni a treni brevi e stimolazioni a scala comportamentale, durante il monitoraggio congiunto delle risposte comportamentali e cardiovascolari.

5.1. Short train ICMS (ST-ICMS)

Esiste una rappresentazione somatotopica del corpo nell'Insula di Reil? In caso affermativo, come è disposta la distribuzione degli effettori? E da questo punto di vista l'insula e le regioni perisilviane rappresentano un continuum funzionale? Queste domande hanno trovato qui risposta per mezzo di un esperimento di microstimolazione intracorticale a treni brevi condotto

preliminarmente all'esperimento di stimolazione a scala comportamentale. La microstimolazione intracorticale a treni brevi (a partire da 50ms) è una tecnica usualmente impiegata negli esperimenti di mappatura corticale ed è particolarmente efficace nello studio delle aree motorie; questa tecnica permette infatti di studiare l'organizzazione somatotopica delle aree mappate mediante l'osservazione di brevi twitch dei vari effettori corporei, permettendo di ricostruire una rappresentazione corporea corticale (si rimanda all'Appendice per un approfondimento). Per queste ragioni si è scelto di mappare la regione di interesse mediante ST-ICMS e di discuterne i risultati separatamente.

5.1.1. Confronto con precedenti studi di ICMS

Le prime stimolazioni dell'Insula di Reil sono state condotte da Ferrier alla fine del XIX secolo senza mostrare risultati osservabili. L'ipotesi di una organizzazione somatotopica dell'Insula di Reil e delle regioni perisilviane è stata tuttavia sollevata successivamente da altri autori a seguito di esperimenti di stimolazione elettrica. Frontera (1956) descrive una rozza distribuzione somatotopica esclusivamente nella porzione ventrale dell'insula. Secondo questo studio, il volto e le parti superiori del corpo sono rappresentati nei settori rostrali, mentre le parti inferiori del corpo sono rappresentate nei settori caudali; tuttavia l'autore sottolinea la mancanza di sistematicità delle risposte, tant'è che l'ipotesi di lavoro secondo la quale l'insula rappresenta un'area motrice somatica extrapiramidale viene lasciata cadere. Showers & Lauer (1961) descrivono una rappresentazione grossolana in cui movimenti del volto possono essere evocati da pressoché tutta l'insula, mentre la restante parte del corpo è rappresentata secondo una somatotopia simile a quella di Frontera (arti superiori anteriormente, arti inferiori posteriormente). A differenza dello studio di Frontera, tuttavia, la rappresentazione corporea è distribuita tanto nella regione dorsale quanto nella regione ventrale.

L'esperimento di ST-ICMS qui presentato fa emergere una sostanziale differenza funzionale tra la regione perisilviana dorsale (opercolo frontoparietale e insula dorsale) e la regione perisilviana ventrale (insula ventrale e opercolo temporale). Ciò conferma la differenziazione funzionale tra insula dorsale ed insula ventrale descritta dagli autori precedentemente citati. Tale segregazione dorsoventrale è inoltre confermata da recenti studi multiarchitettionici in cui si rileva una continuità anatomica tra l'opercolo frontoparietale e l'insula dorsale (Morel et al., 2008), ed una maggiore differenziazione tra insula dorsale ed insula ventrale. L'esperimento di ST-ICMS dimostra che un campo di rappresentazione della bocca è presente rostralmente, seguito da un campo di rappresentazione della mano e da un campo caudale di rappresentazione degli arti superiori e inferiori. A differenza degli studi citati, tuttavia, nel lavoro qui presentato la

distribuzione somatotopica degli effettori corporei è presente nell'insula ventrale solo in maniera molto limitata, mentre è totalmente assente nell'opercolo temporale. L'assenza di una organizzazione somatotopica in questa regione dimostra la distanza funzionale di questa regione con il sistema sensori-motorio. Gli studi odologici sostengono il dato presentato in tesi mettendo in luce la prevalenza di connessioni con regioni di natura motoria e sensoriale nella regione perisilviana dorsale, ma non nella regione perisilviana ventrale. Tutta la regione dorsale risulta essere fortemente connessa con diversi siti della superficie frontale, prefrontale e parietale, i cui aspetti funzionali sono fortemente implicati con il controllo sensori-motorio. L'opercolo frontale (OFO e PrCO) è connesso con l'area prefrontale 46v e con la regione laterale della PMv; è inoltre fortemente connesso con l'insula dorsale, mentre l'insula ventrale risulta essere meno marcata (Cipolloni & Pandya, 1999). In particolare, è noto che la regione laterale della PMv è implicata nel controllo dei movimenti della bocca. L'individuazione di un campo di rappresentazione della bocca nella porzione rostrale della regione mappata dimostra una continuità con gli studi odologici. Caudalmente, l'opercolo parietale (aree 2, 1-2, SII/PV) mantiene connessioni con l'area 46v e ha connessioni con regioni premotorie e motorie quali il banco posteriore del solco arcuato (F5a e F5p), la convessità dell'area premotoria ventrale (F5c e F4) e l'area motoria primaria laterale (Cipolloni & Pandya, 1999; Belmalih et al., 2007). L'opercolo parietale ha inoltre diffuse connessioni con l'area somatica primaria postcentrale, con il lobulo parietale inferiore e con il banco inferiore del solco intraparietale. Questa regione è per di più fortemente connessa con l'insula dorsale. Complessivamente, dunque, lo studio di connessioni sembra confermare la vicinanza funzionale riscontrata tra regione perisilviana dorsale e cortecce sensoriali e motorie. Viceversa, studi odologici sulla regione perisilviana ventrale non mostrano particolari connessioni con le regioni sensoriali e motorie. Come si è visto nel Capitolo 2, infatti, le connessioni dell'opercolo temporale interessano la regione orbitofrontale e prefrontale mediale e, in minor misura, l'area 10 laterale ed il giro cingolato anteriore supracallosale. Non sono presenti importanti connessioni con le regioni premotorie o motorie. La connettività della regione perisilviana ventrale è pertanto coerente con la scarsa presenza di campi di rappresentazione somatotopica rinvenuta mediante ST-ICMS.

Nelle regioni perisilviane dorsali vengono presentati due campi di rappresentazione della bocca: il primo, più ampio, è posto nella regione rostrale dorsale (opercolo frontale anteriore ed insula dorsale anteriore) mentre il secondo, di dimensioni minori, è presente in una regione più caudale, lungo l'opercolo parietale. È stato sottolineato che la stimolazione del sito eseguita a treni lunghi produce movimenti della bocca più semplici di quelli presenti nella regione anteriore, di semplice apertura e chiusura della bocca anziché di complessi movimenti oroalimentari,

suggerendone dunque un differente ruolo funzionale. Questa seconda regione di rappresentazione della bocca corrisponde verosimilmente alla regione di bocca identificata mediante la registrazione di singole unità da Robinson & Burton alla fine degli anni '70. Secondo questo studio, i campi recettivi trigeminali si trovano nella porzione anteriore dell'opercolo parietale, mentre posteriormente i neuroni rispondono principalmente a stimoli tattili somministrati sulla superficie della mano o sulle dita, e rappresentano la porzione predominante della mappa; la regione di mano è seguita da un campo di rappresentazione di braccio, poi del tronco superiore e inferiore, e degli arti posteriori. Quanto descritto da Robinson & Burton trova una certa conferma nella presente mappatura, sebbene sorprendentemente le risposte siano in questo caso rinvenute mediante ICMS di una regione descritta in letteratura avente modalità prevalentemente somatosensoriale.

5.1.2. Somatotopia dorsoventrale della regione anteriore

L'insula anteriore ventrale è, come tutte le regioni perisilviane ventrali, non chiaramente interpretabile in termini di rappresentazione somatotopica. Tuttavia, la ST-ICMS dell'insula anteriore ventrale evoca nel soggetto brevi riflessi manifestati con sussulti della regione sternale. Negli stessi siti, il prolungamento del treno a scala comportamentale evoca risposte di natura viscerale come conati di vomito e smorfie di disgusto, nonché forti cadute della frequenza cardiaca. Per questi motivi, è verosimile che i sussulti della regione sternale osservati rappresentino la controparte osservabile di potenziali riflessi viscerali. Secondo tale ipotesi, dunque, una regione di rappresentazione viscerale sarebbe localizzata in un sito immediatamente ventrale ad un campo di rappresentazione della bocca. Questo suggerisce una continuità in termini di organizzazione somatotopica. In particolare, si può ipotizzare che l'organizzazione topografica della superficie precentrale (*à la* Woolsey '58) di uno *Simiunculus* i cui arti inferiori sono in posizione dorsale, seguiti ventralmente dagli arti superiori e dalla bocca, prosegua all'interno del solco del Silvio con una rappresentazione della bocca ora implicata con un'interfaccia viscerale (infatti la BTS-ICMS di questo campo evoca, oltre alle risposte oroalimentari, anche una simultanea forte attivazione vagale), la quale prosegue ventralmente con una rappresentazione viscerale, la cui ST-ICMS evoca appunto i riflessi viscerali descritti. È interessante notare come la formulazione di una tale ipotesi possa essere sostenuta in virtù di una convergenza di metodologie (ST-ICMS, BTS-ICMS, analisi del tracciato ECG).

5.1.3. Stimolabilità e granularizzazione

La regione dell'opercolo parietale e l'insula dorsale posteriore hanno una soglia di stimolabilità molto bassa, mediamente 80ms. Al contrario, la soglia minima per ottenere brevi

risposte aumenta nella regione anteriore dell'insula dorsale e nell'opercolo frontale fino ad una media di 640ms. Questo dato è interessante se si considera che una stimolazione di tale durata è considerata nelle aree motorie una stimolazione scala comportamentale, e quindi di lunga durata e in grado di evocare risposte complesse. Oltre all'analisi funzionale delle ST-ICMS, anche l'analisi della stimolabilità mostra una profonda continuità tra la regione opercolare frontale e l'insula dorsale anteriore, e tra la regione opercolare parietale e l'insula dorsale posteriore. Al contrario, l'analisi della stimolabilità mostra come il blocco anteriore dorsale (opercolo frontale e insula dorsale anteriore) ed il blocco posteriore (opercolo parietale e insula dorsale posteriore) risultino essere molto diversi tra loro. Questo dato non è del tutto sorprendente. Infatti procedendo in direzione rostrocaudale tanto l'insula quanto l'opercolo frontoparietale vanno incontro ad un processo di graduale granularizzazione. Come si è detto nel Capitolo 2, l'insula anteriore ventrale corrisponde architettonicamente ad un campo agranulare, ed un processo di granularizzazione si sviluppa a partire da tale campo disegnando cerchi ad esso concentrici. Conseguentemente, la regione immediatamente posteriore e quella immediatamente dorsale all'insula anteriore ventrale risultano essere disgranulari, mentre un terzo anello architettonico, pienamente granularizzato, comprende l'insula posteriore (dorsale e ventrale) e l'opercolo parietale (si veda la fig.3, Cap.2). Sebbene al momento non sia disponibile l'architettura del soggetto sperimentale, è comunque evidente che il dato di natura architettonica sembra convergere verso quello dell'analisi delle soglie. Anche se non è chiaro perché la regione granularizzata debba avere, in particolare, soglie più basse, è interessante notare tale covarianza di architettura neurale e stimolabilità.

5.2. Behavioral Time Scale ICMS (BTS Stimulation)

5.2.1. Risposte Comunicative

Nella vita sociale del macaco la comunicazione tra membri del gruppo avviene prevalentemente mediante espressioni facciali: con esse, infatti, si stabiliscono gerarchie e relazioni sociali fra i diversi membri della comunità. Esistono specifiche espressioni facciali di minaccia, di sottomissione (teeth chattering), ed espressioni affiliative generiche (lip smacking); tali espressioni hanno al contempo una valenza comunicativa ed una valenza emozionale. Alcune caratteristiche del volto durante la produzione di espressioni a sfondo emotivo sono molto specifiche, e per questo motivo sono oggetto di particolare attenzione durante l'osservazione delle espressioni emotive prodotte dai conspecifici. Un elemento di particolare importanza è dato dall'osservazione degli occhi; nel 2004, un gruppo di ricercatori guidato dalla Prof.ssa Gothard ha dimostrato che quando la scimmia osserva espressioni aggressive di minaccia, in cui l'apertura della bocca è un elemento

primario, il tempo dedicato all'analisi visiva viene equamente distribuito tra l'osservazione degli occhi e della bocca, mentre viene portata poca attenzione alle altre parti del corpo. L'osservazione di smorfie di paura è caratterizzata da un'analisi visiva significativamente maggiore della bocca, ma anche in questo caso gli occhi sono osservati più che le orecchie o altre parti del corpo. Cosa ancor più interessante, l'osservazione di espressioni affiliative quali il lip smacking è caratterizzata da un'analisi visiva basata prevalentemente sugli occhi del soggetto, ovvero il tempo speso nell'osservazione degli occhi del soggetto posto di fronte è significativamente maggiore rispetto al tempo speso nell'osservazione della bocca, delle orecchie, o di altre parti del corpo (Gothard et al., 2004). D'altra parte il contatto visivo è una condizione necessaria per la produzione di diverse espressioni comunicative quali il lip smacking o le espressioni di minaccia e di paura. È noto che anche nell'uomo la decodifica dell'espressione di un volto è affidata ad un'esplorazione estensiva dello sguardo della persona di fronte (Yarbus, 1967).

In accordo con questi dati, la microstimolazione intracorticale di alcuni siti dell'insula ventrale induce il soggetto a produrre espressioni affiliative solo se viene stabilito un contatto visivo tra con lo sperimentatore. Nel momento in cui tale contatto viene a mancare, l'effetto della stimolazione sparisce. Questo dettaglio dimostra come la stimolazione abbassi un livello di soglia di una risposta comportamentale, ma non sia sufficiente di per sé per provocare la risposta; al contrario, un elemento contestuale indipendente dalla stimolazione, il contatto visivo, è condizione necessaria alla risposta. L'assenza di risposta durante il mancato contatto visivo è particolarmente utile nell'interpretazione del dato poiché permette di escludere l'ipotesi che la risposta evocata dalla BTS-ICMS corrisponda all'attivazione di un programma motorio di basso livello gerarchico; tale ipotesi, resa già improbabile dalla localizzazione dei siti in questione (i quali non corrispondono a regioni vicine al controllo motorio), è inoltre incapace di spiegare l'assenza di attivazione in assenza dell'elemento contestuale. L'attivazione di un programma motorio di basso livello gerarchico deve infatti essere indipendente da fattori esterni alla sola induzione di corrente. Viceversa, la caratteristica principale risulta essere l'aspetto socio-emotivo, ovvero la facilitazione di un manifesto comportamento di tipo affiliativo e di sottomissione a seguito dell'attivazione dell'insula ventrale. Tale dato è per di più anatomicamente convergente con gli aspetti funzionali della regione immediatamente adiacente, il polo temporale, il quale è considerato largamente implicato nella modulazione delle funzioni emotive e viscerali in risposta a stimoli a valenza emotiva, siano essi percepiti, immaginati o ricordati (Olson et al., 2007).

5.2.2. Risposte Sensorimotorie e Visceromotorie

Il ritrovamento di risposte di natura motoria nella regione perisilviana è di particolare interesse, in quanto tale regione non è classicamente considerata “motoria” o vicina all’output motorio. Tuttavia, ciò non è del tutto inspiegabile, in quanto studi odologici mostrano l’esistenza di connessioni tra sottoregioni dell’opercolo frontoparietale e dell’insula dorsale con la corteccia premotoria ventrale laterale, e con le aree motrici supplementari (Luppino et al., 1993; Belmalih et al., 2007). Studi di PET mostrano che movimenti ripetuti del braccio e della mano aumentano il flusso ematico cerebrale della regione posteriore dell’insula (disgranulare e granulare), ovvero di quella parte della regione mappata la cui stimolazione evoca movimenti prossimali e distali (Colebatch et al., 1991). Inoltre, diversi studi condotti su pazienti ricoverati in seguito a stroke che coinvolgono le aree motorie, hanno dimostrato che la fase di recupero funzionale è accompagnata da un aumento dell’attività di specifiche regioni cerebrali tra le quali l’insula (Augustine, 1996).

Tra le risposte di natura sensori-motoria evocate da BTS-ICMS della regione perisilviana dorsale, le risposte oroalimentari evocate nella regione anteriore risultano essere senz’altro le più interessanti. Classicamente, le regioni dell’insula dorsale anteriore e dell’opercolo frontale sono state considerate aree a dominio gustativo (Yaxley et al., 1990) o somatico intraorale (Ogawa et al., 1989, Verhagen et al., 2004). Ciononostante, quantitativamente il numero di neuroni responsivo a tali test è sempre stato molto ridotto: generalmente una percentuale minore del 10% dei neuroni risulta avere chiare proprietà gustative, mentre circa il 20% dei neuroni sono modulati da risposte motorie o sensoriali (Augustine, 1996). La maggior parte dei neuroni dell’insula e dell’opercolo frontale ha proprietà non caratterizzate, ma l’etichetta di area sensoriale gustativa resta ampiamente utilizzata con riferimento alla regione perisilviana dorsale. Esiste il forte sospetto che la processazione gustativa potrebbe non essere l’attività predominante di questo complesso, ma che esso possa partecipare ad una varietà di funzioni associate al nutrimento; secondo Augustine (1996) tale comportamento potrebbe implicare una integrazione di risposte viscerali e di sensazioni somatiche, dimostrando la presenza di una codifica multisensoriale. Nell’esperimento presentato viene mostrato come durante la stimolazione di questa regione il soggetto mastichi, esegua movimenti di ricerca del cibo all’interno della bocca e, alla fine, deglutisca, nonostante la bocca sia vuota. Poiché la diminuzione dell’intensità evoca una diminuzione dell’intensità della risposta, e poiché la ST-ICMS evoca brevi twitch del labbro o della lingua, è evidente che la risposta evocata non è riconducibile ad una sorta di allucinazione gustativa indotta dalla stimolazione. Inoltre, se la stimolazione viene effettuata quando il cibo è realmente presente in bocca, il ritmo masticatorio viene alterato, e ciò non è compatibile con l’ipotesi dell’allucinazione gustativa. Conseguentemente, la microstimolazione di quest’area apre la possibilità che processi di integrazione motoria, sensoriale e visceromotoria facciano parte degli aspetti funzionali della regione perisilviana dorsale.

Questo dato è supportato inoltre da due argomenti. Il primo proviene dall'analisi della variazione della frequenza cardiaca: nello studio si dimostra infatti come la stimolazione di questi siti evochi una caduta della frequenza cardiaca indicante una forte attivazione vagale, quindi una risposta visceromotoria. L'eventualità che tale risposta possa essere effetto di una attivazione sensoriale è smentita dal fatto che il ritardo osservato risulta essere a carico del primo/secondo intervallo tra complessi QRS dall'inizio della stimolazione, ovvero troppo rapidamente per essere conseguenza mediata di una allucinazione gustativa. Il secondo argomento a favore dell'interpretazione di una genuina e diretta risposta indotta dalla microstimolazione proviene dalla clinica, in quanto la produzione di movimenti oroalimentari è stata osservata durante epilessie insulari (Isnard et al., 2004).

Le risposte viscerali sono ottenibili alle stesse posizioni anteroposteriori delle risposte di tipo oroalimentare, sebbene le prime siano prevalentemente ventrali (insula ventrale) e le seconde prevalentemente dorsali (insula dorsale e opercolo frontale). Questa osservazione suggerisce la presenza di una organizzazione somatotopica in cui l'effettore bocca è rappresentato nelle porzioni dorsali, mentre regioni viscerali interne sono rappresentate nelle porzioni ventrali. La BTS-ICMS della regione anteriore ventrale mostra infatti risposte viscerali dirette quali conati di vomito, o risposte viscerali più complesse quali il rifiuto del cibo preferito o l'espulsione di cibo dalla bocca. Il primo caso è peraltro convergente con recenti osservazioni condotte sui pazienti con epilessia insulare (Catenoux et al., 2008). Un dato di grande interesse è la presenza di violente attivazioni bradicardiche che accompagnano la produzione di risposte viscerali, mentre il secondo caso solleva l'ipotesi dell'innalzamento della soglia di disgusto nel soggetto sperimentale: infatti, lo stesso cibo rifiutato o espulso durante la stimolazione, è viceversa ingerito sia prima che dopo la stimolazione.

Come nel caso delle risposte comunicative, dunque, la BTS-ICMS sembra influire sulla soglia delle risposte emotive, e quindi facilitando la manifestazione di un certo comportamento emotivo (in questo caso del disgusto, nell'altro caso della sottomissione).

5.2.3. Risposte Miscellanee

Le regioni perisilviane ventrali sono state storicamente considerate aree associative o implicate in codifiche sensoriali. Ne consegue che non tutte le risposte evocate da ICMS possano risultare in un comportamento osservabile chiaramente interpretabile. La ragione dell'inserimento delle risposte miscellanee nella mappatura è prevalentemente quello di descrivere alcune risposte sistematiche e regolari, sebbene in diversi casi il ruolo funzionale delle stesse non sia decodificabile.

Le risposte stereotipate di fastidio sono molto chiare, ma non è altrettanto chiaro il tipo di fastidio provocato dalla stimolazione. Gli studi di stimolazione nell'uomo riportano l'evocazione di sensazioni nocicettive o termocettive nella porzione posteriore dorsale dell'insula, sebbene la grande parte delle risposte di fastidio evocate nel nostro caso siano concentrate nella regione centrale dell'insula ventrale. Conseguentemente, non è chiaro se si possa ragionevolmente pensare ad un nesso tra le due. È probabile tuttavia che le risposte di fastidio abbiano diversa origine a seconda della posizione anteroposteriore in cui sono state evocate. Le risposte evocate da stimolazioni più anteriori, infatti, potrebbero essere correlate a risposte viscerali evocate nella stessa regione (es. dolore addominale), mentre le risposte più posteriori, evocate in una regione ventrale a risposte motorie e sensoriali di mano, potrebbero corrispondere a parestesie dolorose degli arti o della mano.

Le risposte stereotipate di fastidio sono accompagnate da un andamento elettrocardiografico bifasico, ovvero l'analisi della variazione della frequenza cardiaca durante e immediatamente dopo la ICMS mostra una rapida caduta della frequenza, velocemente recuperata e seguita da tachicardia. Questo indica che le risposte di fastidio sono accompagnate da una duplice attivazione dei sistemi simpatico-parasimpatico. In letteratura è testimoniata l'esistenza di una duplice attivazione simpatico-parasimpatico come tipologia di risposta genuina. È stato sostenuto (Paton et al., 2005) che in concomitanza con una varietà di risposte, comportamentali e non (diving response, risposta del riflesso chemocettoriale periferico, riflesso oculocardiaco, risposta difensiva a modulazione centrale, nocicezione somatica), il SNA risponde con una duplice attivazione, mentre l'ipotesi del funzionamento per attivazione reciproca (eccitazione simpatica & inibizione parasimpatica, o viceversa) è fondamentalmente erronea in quanto indebita estensione di un fenomeno osservato a livello del riflesso barocettoriale, ad altri domini di attività del SNA. In linea generale, la concomitante attivazione dei due sistemi sembra particolarmente tipica di riflessi di tipo protettivo (riflessi nocicettivi, di orientamento, difensivi, etc) ma non di riflessi regolatori o omeostatici. È di particolare interesse per i nostri fini il fatto che l'ipotesi di una duplice attivazione simpatico-parasimpatica durante nocicezione somatica sia stata sollevata in letteratura, sebbene ad oggi il fenomeno resti poco chiaro. Nel ratto la risposta tachicardica è concomitante con un simultaneo aumento nella scarica del nervo cardiaco inferiore e del vago; la somministrazione di atropina attenua la tachicardia, la quale viene definitivamente bloccata con la somministrazione di atenololo, farmaco beta bloccante con selettività per i recettori beta 1 cardiaci (Paton et al., 2005). In merito all'analisi qui presentata, dunque, la convergenza tra il comportamento bifasico e una risposta comportamentale di origine nocicettivo convergono verso l'ipotesi in letteratura.

Gli spostamenti assiali verso l'emicampo controlaterale evocati da stimolazioni dell'opercolo temporale, accompagnati dallo spostamento dello sguardo nella stessa direzione, non sono di origine motoria. È interessante notare che la stimolazione della porzione più esterna dell'opercolo temporale è stata descritta in passato (già negli studi pionieristici di Ferrier alla fine del XIXsec) avente come conseguenza una torsione di occhi e del collo in direzione controlaterale; questo effetto potrebbe potenzialmente rappresentare un movimento stereotipato di origine attenzionale, vista la natura non motoria della regione. Poiché la torsione del collo rappresenta un movimento impossibile per il soggetto sperimentale, il quale è vincolato per quello che riguarda ogni movimento della testa, è possibile che lo spostamento assiale sia una conseguenza di tale tentativo mancato.

5.3. Variazione della frequenza cardiaca istantanea nel dominio del tempo

L'analisi nel dominio del tempo è un'analisi che indaga le variazioni della frequenza istantanea di un qualsivoglia tracciato, calcolate in termini di distanza temporale tra un evento t ed il precedente $t-1$. Questa analisi permette la rappresentazione dinamica dei segnali allineando su un asse temporale la frequenza istantanea di un tracciato con un evento esterno, consentendo di visualizzare il decorso temporale delle variazioni istantanee. Applicata alla nostra registrazione elettrocardiografica permette di stabilire l'andamento temporale della frequenza cardiaca istantanea lungo l'asse del tempo, e quindi in ultima analisi rende possibile la visualizzazione di una variazione della frequenza istantanea durante e immediatamente a seguito della stimolazione, permettendo di verificare quale contributo dà la stimolazione del sito alla modulazione del SNA. Tale contributo può essere espresso in termini di accelerazione della frequenza istantanea (tachicardia), di rallentamento della frequenza istantanea (bradicardia), o di andamento bifasico (bradicardia seguita da tachicardia).

5.3.1. Profilo delle risposte ECG

Il rapido recupero registrato con le risposte bradicardiche, o addirittura l'inversione di tendenza rispetto alla baseline delle risposte bifasiche, sono ampiamente convergenti con quanto è noto sull'attivazione del sistema parasimpatico. Un primo motivo a favore del rapido effetto della stimolazione vagale, rispetto a quella simpatica, è legato alla natura delle fibre sulle quali corre l'informazione che dal SNC raggiunge il cuore. Le fibre pregangliari del SNA (simpatico e parasimpatico) sono mieliniche, mentre le fibre postgangliari del SNA (simpatico e parasimpatico) sono amieliniche. Le fibre amieliniche trasmettono l'informazione con maggiore lentezza. Una

differenza tra il sistema simpatico ed il sistema parasimpatico sta nel fatto che i gangli del simpatico sono posti lontano dagli organi bersaglio, mentre viceversa i gangli del parasimpatico sono vicini agli organi bersaglio. Ne consegue che nel sistema parasimpatico, l'informazione che dal SNC raggiunge il cuore è maggiormente a carico di fibre mieliniche, e quindi più rapida, mentre viceversa nel sistema simpatico l'informazione è maggiormente distribuita su fibre mieliniche e amieliniche, aumentando dunque il tempo di trasmissione del segnale dal SNC al cuore. Ma gli effetti della stimolazione vagale compaiono e scompaiono molto rapidamente rispetto alla lenta comparsa e scomparsa della stimolazione simpatica anche a causa delle proprietà chimiche dell'innervazione nervosa del cuore. L'ACh impiegata come neurotrasmettitore dal sistema parasimpatico attiva nelle cellule cardiache canali K^+ che non richiedono l'impiego di secondi messaggeri, consentendo dunque un rapido effetto dell'attivazione vagale. Inoltre, i nodi SA e AV sono ricchi di colinesterasi, l'enzima che scinde l'ACh; conseguentemente, l'ACh viene rapidamente idrolizzata e quindi l'effetto dell'attivazione vagale decade rapidamente. Al contrario, il tardo effetto della risposta tachicardica ha due ragioni: la noradrenalina viene liberata dai terminali assonici con velocità molto basse e gli effetti della noradrenalina dipendono da secondi messaggeri. Anche il recupero della stimolazione simpatica è più lento, poiché parte della noradrenalina liberata dalle fibre simpatiche viene ricaptata dai terminali assonici, generando uno smaltimento dell'effetto più lento rispetto a quello vagale. Nell'immagine in fig.27, tratta da Warner & Cox 1962, viene mostrata la diversa tempistica di effetto e smaltimento dei sistemi simpatico e parasimpatico durante la stimolazione elettrica eseguita a livello periferico sul cane in condizioni di anestesia.

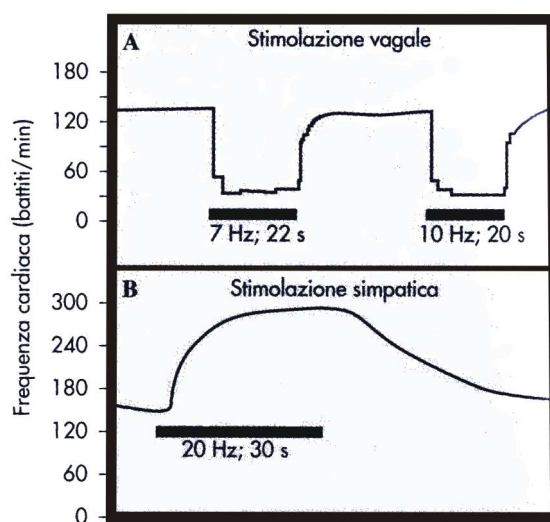


Fig.27

5.3.2. Distribuzione delle variazioni della frequenza istantanea lungo l'asse anteroposteriore

L'analisi della variazione della frequenza istantanea condotta lungo la posizione anteroposteriore dei siti stimolati mostra una tendenza alla bradicardia come effetto prevalente della regione perisilviana anteriore, un livellamento fino alla sospensione degli effetti nella regione centrale, ed infine una tendenza alla tachicardia e alla risposta bifasica come effetti prevalenti della regione perisilviana posteriore. Abbiamo descritto sopra come questo tipo di effetto sia sostanzialmente convergente con le risposte comportamentali rintracciate negli stessi siti, ovvero risposte comportamentali a carattere viscerale concomitanti con attivazioni vagali, e risposte comportamentali a carattere nocicettivo (o di fastidio in generale) in concomitanza con risposte bifasiche. Le risposte tachicardiche sono per lo più concomitanti con i tremori degli arti superiori ed inferiori evocati dalla regione perisilviana posteriore dorsale. La distribuzione lungo l'asse anteroposteriore delle variazioni della frequenza cardiaca convergono tuttavia non solo con le risposte comportamentali, bensì anche con quanto è noto circa le connessioni afferenti dal SNA. L'insula anteriore, infatti, ha forti connessioni con il talamo VPMpc, il quale riceve informazioni viscerali dal NTS. Il NTS riceve a sua volta afferenze parasimpatiche provenienti dai nervi cranici relative a gusto e olfatto, e partecipa inoltre alla regolazione di diversi riflessi autonomici (Par.2.4.1). Viceversa, l'insula posteriore mostra afferenze talamiche preferenziali con il VPI, il quale riceve a sua volta afferenze simpatiche di natura omeostatica quali temperatura, nocicezione, attività ormonale ed immunologica, dalla Lamina I del midollo spinale (Par.2.4.1). Lo studio qui presentato dimostra dunque l'esistenza di una convergenza tra l'analisi funzionale della risposta ECG a seguito di ICMS e i risultati di studi odologici relativi alle connessioni con le afferenze centrali del SNA.

5.3.3. Lateralizzazione nella modulazione della frequenza cardiaca istantanea

Il problema di una possibile lateralizzazione del controllo del SNA nella regione perisilviana, e nell'insula in particolare, è stato sollevato in letteratura da Oppenheimer e collaboratori nel 1992, in un lavoro di ICMS dell'insula di pazienti epilettici prima di un intervento di lobectomia temporale. L'ipotesi della lateralizzazione ha preso due forme: da un punto di vista, è stata sollevata la possibilità di una lateralizzazione del *segno* della risposta del SNA (cioè bradicardia VS tachicardia), mentre da un altro punto di vista è stata sollevata la possibilità di una lateralizzazione dell'*intensità* della risposta del SNA. Per quanto riguarda la prima ipotesi, della lateralizzazione del segno, il sospetto che sorge dal lavoro del 1992 riguarda la possibilità che la stimolazione dell'insula sinistra abbia effetti di matrice parasimpatica (bradicardia) mentre la stimolazione dell'insula destra abbia effetti di matrice simpatica (tachicardia). Al contrario, la seconda ipotesi,

della lateralizzazione dell'intensità della risposta, riguarda il sospetto che la stimolazione dell'insula sinistra abbia effetti mediamente più attenuati rispetto alla stimolazione dell'insula destra.

Nonostante l'ovvio valore clinico della questione dovuto alle misure cautelari necessarie nella pratica neurochirurgica e neurologica, nonché all'ipotesi di una relazione tra stroke insulare e morte cardiaca a tre mesi, l'ipotesi sollevata da Oppenheimer e collaboratori più di quindici anni fa è rimasta senza risposta in quanto ad oggi non sono state portate definitive conferme o smentite di una qualsivoglia lateralizzazione della modulazione del SNA nell'insula. Nel presente studio si dimostra che l'ICMS dell'Insula di Reil e in generale delle regioni perisilviane anteriori, ovvero delle regioni la cui stimolazione evoca variazioni maggiori, porta ad aumenti e diminuzioni significative della frequenza cardiaca istantanea in entrambi gli emisferi. L'ipotesi di una specificità dell'emisfero sinistro per le risposte vagali, e del destro per le risposte simpatiche, è smentita dalla significativa presenza di entrambe le risposte in entrambi gli emisferi. Conseguentemente, lo studio smentisce l'esistenza di una lateralizzazione del segno della risposta. L'ipotesi della lateralizzazione del segno, e conseguentemente di una modulazione simpatica dell'emisfero destro, non sarebbe d'altra parte congruente con il dato già noto in letteratura per cui le regioni perisilviane anteriori sono implicate in una processazione delle risposte gustative e olfattive; essendo tali risposte vincolate al sistema parasimpatico, ne conseguirebbe una tra due implausibili conseguenze: o l'emisfero destro dovrebbe essere connesso funzionalmente a risposte diverse da quelle gustative e olfattive, o l'evocazione di risposte gustative ed olfattive dopo ICMS dovrebbe essere accompagnata da attivazioni simpatiche anziché vagotoniche. Appunto, entrambe le eventualità sono altamente improbabili. Viceversa il presente studio mostra un effetto significativamente maggiore delle conseguenze ECG a seguito di ICMS dell'emisfero destro rispetto a ICMS dell'emisfero sinistro. Si conferma quindi la seconda ipotesi di lateralizzazione, ovvero la presenza di una lateralizzazione dell'intensità dell'effetto. Le complicazioni elettrocardiografiche riportate dalla clinica neurologica generalmente prevedono conseguenze cardiovascolari più critiche a seguito di stroke dell'insula destra; tali conseguenze cardiovascolari sono generalmente associate ad una iperattività del sistema simpatico (Christensen et al., 2005). Quanto dimostrato nel presente studio solleva un'ipotesi interpretativa alternativa, ovvero che le conseguenze cardiovascolari da iperattività del sistema simpatico possano conseguire stroke dell'insula destra così come stroke dell'insula sinistra, ma che nel primo caso l'intensità dell'effetto sia tale da condurre con maggiore probabilità a disfunzioni più gravi; il che significa dunque che a parità di danno cerebrale le lesioni dell'insula destra sono maggiormente candidate a più gravi conseguenze cardiovascolari.

6. APPENDICE: L'ICMS COME METODO D'INDAGINE

It is presumably this recruitment of physiological circuits that allows stimulation to roughly mimic the function of the directly stimulated tissue.

Graziano M., 2006

6.1. Breve storia della stimolazione elettrica

La stimolazione elettrica della corteccia cerebrale è uno dei metodi neurofisiologici più antichi impiegati nello studio degli aspetti funzionali del cervello. Mentre infatti la registrazione dei singoli neuroni su animali svegli e liberi di muoversi viene introdotta solo negli anni '60 del secolo passato, tutte le grandi scoperte fatte dalla neurofisiologia nel secolo precedente (l'eccitabilità del cervello, il controllo controlaterale, la localizzazione della funzione motoria, le mappe corticali) sono state ottenute per mezzo della stimolazione elettrica. Il primo passo verso la nascita di questa metodologia è tuttavia più antico. Sul finire del XVIII secolo Luigi Galvani scopre che, accanto all'elettricità naturale, ad esempio dei fulmini, e all'elettricità artificiale riproducibile in laboratorio, esiste un terzo tipo di elettricità: l'elettricità animale. Lavorando alla dissezione di rane in prossimità di macchine elettrostatiche, un assistente di Galvani toccò accidentalmente con un bisturi elettricamente carico il nervo sciatico, che fece scattare la zampa come se fosse viva, e a partire da questa osservazione ha inizio lo studio delle relazioni tra elettricità e vita animale. Nel periodo compreso tra il 1830 ed il 1850, in Germania, contro il "vitalismo" imperante, alcuni studenti di Johannes Müller sviluppano i concetti alla base del lavoro di Galvani studiando le proprietà elettriche del segnale nervoso. Nel 1850 Hermann von Helmholtz misura per la prima volta la velocità di conduzione del potenziale d'azione lungo il nervo.

L'atto di nascita della stimolazione elettrica del cervello risale invece al 1870, anno di pubblicazione dello studio di Fritsch e Hitzig "*On the Electrical Excitability of the Cerebrum*", dove per la prima volta vengono eseguite stimolazioni sulla superficie corticale del cervello del cane con corrente galvanica, ottenendo risposte motorie degli arti controlaterali a seguito della stimolazione delle regioni frontali. Per mezzo della stimolazione elettrica, Hitzig e Fritsch sconfessano quantomeno tre pilastri della psicologia allora in voga: il cervello è eccitabile, non è implicato esclusivamente in alti processi cognitivi, ha un controllo controlaterale. Inoltre, il fatto che sia solo a seguito di una specifica porzione della corteccia che si possono evocare movimenti,

risolleva l'antica sfida frenologica (riveduta e corretta) della localizzazione delle funzioni nel cervello. Pochi anni dopo, il neurologo scozzese David Ferrier (1875a,1875b, 1886) prosegue e sviluppa il lavoro di Fritsch e Hitzig applicando perfezionamenti metodologici quali l'abbandono della corrente galvanica in favore della corrente faradica. Il passaggio dalla prima alla seconda è legato all'intuizione del neurofisiologo che oltre all'intensità, anche la durata della stimolazione è importante per produrre l'effetto specifico della regione. Infatti, sostiene Ferrier, lo shock della corrente galvanica applicata al cervello genera un'improvvisa contrazione in un certo gruppo di muscoli, ma non riesce a generare una contrazione coordinata e finalizzata dei gruppi muscolari, che corrisponde a ciò che invece si vuole realmente evocare nello studio. Qualora si stimolasse invece per un lasso di tempo prolungato, invece di ottenere un movimento coordinato, la corrente galvanica provocherebbe piuttosto una decomposizione elettrolitica della materia cerebrale. Tutto ciò non avviene con l'impiego di correnti faradiche (Morabito 1996). Utilizzando correnti faradiche, Ferrier riesce quindi a stimolare per più lunghi periodi di tempo, producendo per primo movimenti finalizzati come risposte coordinate di mano e bocca. Ferrier è l'autore delle prime mappe corticali, che vengono individuate in diverse specie animali, dimostrando così una continuità funzionale tra l'organizzazione corticale dello sciacallo, del gatto, del coniglio, del porcellino d'India, del topo, del piccione, della rana, del pesce e, infine, del macaco. In tutte queste specie esiste una rappresentazione corporea comune – la bocca è rappresentata nelle porzioni ventrali, gli arti superiori e inferiori sono rappresentati nelle porzioni dorsali e mesiali – sebbene l'estensione delle stesse sia variabile di specie in specie; secondo Ferrier, tale variabilità inter-specie dell'estensione delle rappresentazioni degli effettori corporei deve dipendere dal grado di impiego dell'effettore in condizioni ecologiche. Con gli studi di Ferrier si parla generalmente di “frenologia scientifica”: il programma del medico tedesco Franz Joseph Gall, fondatore della frenologia, può essere in effetti ripreso e riveduto pur mantenendo l'idea di una localizzazione delle facoltà mentali. La stimolazione elettrica offre quindi in questo caso una solida base di incoraggiamento per la rivalutazione di un fondamentale paradigma scientifico.

Negli anni '50 del XX la stimolazione elettrica permette di raffinare la conoscenza dell'organizzazione del sistema motorio offrendo, tra l'altro, le prove di un'organizzazione somatotopica del cervello dell'uomo (l'*Homunculus* di Penfield, 1957) e del macaco (lo *Simiunculus* di Woolsey, 1958). Gli studi di elettrostimolazione sull'uomo, oggi come ieri, riguardano rari casi di neurochirurgia su pazienti epilettici farmaco-resistenti o su pazienti oncologici, e sono dovuti all'impiego clinico della metodica elettrofisiologica come guida per il neurochirurgo che deve rimuovere circoscritte regioni cerebrali. Sebbene tali studi manchino ovviamente della sistematicità degli studi condotti sui modelli animali, hanno tuttavia un duplice

valore. Il primo è quello di offrire un'occasione di convalida del modello animale, essendo quest'ultimo non fine a se stesso, ma sempre diretto verso la comprensione del cervello umano. Il secondo è quello di offrire una finestra interpretativa sulla funzione dei siti corticali la cui stimolazione non produce effetti comportamentali apprezzabili sui modelli animali. La stimolazione elettrica della corteccia visiva evoca la percezione di luci e di fosfeni, mentre la stimolazione della corteccia uditiva primaria evoca la sensazione uditiva di toni semplici. Altre regioni, la cui stimolazione non produce effetto sui modelli animali, evocano sentimenti complessi, ricordi, urgenze fisiche ("la necessità di muovere un arto"); la stimolazione di alcuni siti del lobo temporale produce "flash-back" (come nei casi classici descritti da Penfield), mentre la stimolazione di alcuni siti del sistema limbico evoca sensazioni dolorifiche, di malessere, di ansia, o viceversa di rilassatezza, di piacere e di inibizione del dolore. La stimolazione delle aree del linguaggio produce deficit verbali specifici, mancanza di parole, arresto del parlato (Yoemans, 1990). È ovvio che tali risultati non sarebbero stati ottenuti facendo affidamento sul modello animale.

Tra gli anni '20 e gli anni '30 Rudolf Hess sviluppa un metodo che consente di fissare i microelettrodi di stimolazione al cranio di un animale mediante l'impiego di viti autofilettanti e cemento da odontoiatra (Hess, 1957). Questo metodo permette dunque di impiantare microelettrodi da stimolazione in regioni profonde del cervello e di stimolare cronicamente per lunghi periodi di tempo, dimostrando così il ruolo di strutture quali il diencefalo ed il mesencefalo nella regolazione delle risposte autonome. Il discendente odierno di tale metodologia è la stimolazione corticale profonda (DBS, ovvero appunto "deep brain stimulation") impiegata nell'uomo per alleviare disturbi neurologici e, più recentemente, disturbi psichiatrici non trattabili farmacologicamente. La DBS è una pratica sperimentata verso la fine degli anni '70 e sviluppatasi negli ultimi dieci anni a seguito dei progressi fatti dalla neurochirurgia, dalle conoscenze sull'organizzazione del sistema motorio e sulle basi neurobiologiche di disturbi neurologici quali il Parkinson. Con questa tecnica, è possibile impiantare cronicamente in alcune strutture responsabili dei disturbi neurologici (nel Parkinson tipicamente il nucleo subtalamico, il segmento interno del globo pallido, il nucleo peduncolopontino) microelettrodi stimolanti dotati di quattro contatti diretti da un generatore di impulsi programmabile, posto sotto la clavicola come un pacemaker cardiaco. Il generatore di impulsi stimola le strutture bersaglio con frequenze, ampiezze e durate specifiche, ed è del tutto reversibile. Sebbene il più tipico caso di DBS resti ad oggi il trattamento dei tremori parkinsoniani, la DBS è attualmente studiata per essere impiegata in altri casi di disturbi motori (diverse forme di distonia) e in disturbi neuropsichiatrici (disturbi ossessivo-compulsivi, sindrome di Tourette, depressione farmaco-resistente). (DeLang & Wichmann, 2008).

6.2. ICMS a treni brevi (ST-ICMS) e a scala comportamentale (BTS-ICMS)

È noto che l'ipotesi per cui la microstimolazione intracorticale possa attivare in maniera selettiva un singolo gruppo muscolare è un'ipotesi errata; l'accoppiamento di registrazione EMG e ICMS ha dimostrato che anche stimolando a soglia di intensità in vari siti del sistema motorio, la risposta motoria evocabile non giunge mai a coinvolgere un solo gruppo muscolare. L'effetto della stimolazione viene infatti rielaborato in diversi centri di ritrasmissione interposti tra il sito di stimolazione e l'uscita dalle radici ventrali del midollo spinale: le connessioni orizzontali in corteccia, la biforcazione dell'informazione a livello del tratto spinale e la microcircuiteria locale interna allo stesso, coordinano infatti il pattern di attivazione nelle popolazioni di cellule delle radici ventrali, che generano il movimento osservabile. Stimolare una corteccia, quand'anche si tratti di una motoria primaria, non "assomiglia" a stimolare un muscolo. Ciononostante, stimolando a treni molto brevi, e spostando l'elettrodo stimolante di poche centinaia di micrometri da un sito ad un altro, è possibile passare dal reclutamento di un effettore ad un altro; ad esempio, spostando l'elettrodo lungo l'asse medio-laterale in motoria primaria è possibile passare da un twitch del pollice ad un twitch della bocca. Per questa ragione la ST-ICMS, tipicamente della durata di 50ms, è generalmente impiegata negli esperimenti di mappatura corticale. Questo tipo di stimolazione è particolarmente efficace nello studio delle aree motorie poiché permette di studiare l'organizzazione somatotopica delle stesse mediante l'osservazione di brevi twitch dei vari effettori corporei, e quindi in ultima analisi permette di individuare la presenza di rappresentazioni corticali del corpo. La ST-ICMS viene normalmente eseguita con una finestra temporale di 50-150ms, adottando frequenze di stimolazione intorno ai 300Hz e intensità piuttosto basse, generalmente non superiori ai 60 μ A; le stimolazioni sono monofasiche, catodiche, e gli impulsi hanno una durata di 0,2ms. Tali parametri permettono di stimolare la corteccia mediante microelettrodi in tungsteno ad impedenza medio alta, e quindi in ultima analisi permettono di registrare singoli neuroni e di stimolare nella medesima sessione sperimentale. Non permettono invece di allungare al durata del tempo di stimolazione, ne' di aumentarne l'intensità, per motivi cautelari: come si dirà, infatti, l'alta frequenza di stimolazione eseguita con onde monofasiche ha lo svantaggio di surriscaldare l'elettrodo; conseguentemente, un'intensità maggiore, o un treno di stimolazione maggiore, possono risolversi in una lesione elettrolitica della corteccia a causa della temperatura dell'elettrodo. Nel presente studio la ST-ICMS (a partire da 50ms) è stata impiegata al fine di individuare la presenza di una rappresentazione corporea somatotopica nelle regioni perisilviane in quanto l'eventualità di una tale rappresentazione corporea è stata sollevata in passato ma mai dimostrata definitivamente.

Modificando i parametri relativi ad intensità e frequenza di stimolazione, è possibile aumentare di molto il tempo complessivo di stimolazione. Generalmente una stimolazione a treni lunghi risponde a domande diverse da quelle alle quali risponde una stimolazione a treni brevi. Infatti, mentre la stimolazione a treni brevi è stata largamente impiegata nelle mappature della corteccia motoria, la stimolazione a treni lunghi è stata invece impiegata al fine di studiare comportamenti o modulazioni complesse e articolate nel tempo. La stimolazione di centri sottocorticali quali l'ipotalamo, ad esempio, influenza comportamenti complessi quali la ricerca di cibo, acqua e sesso, e modifica disposizioni comportamentali quali l'aggressività (Caggiula & Hoebel 1966, Hoebel 1969). Allungare la durata complessiva della stimolazione è un procedimento necessario in questi casi in quanto la cessazione della stimolazione ha come conseguenza l'arresto del comportamento evocato. Graziano (2006) recensisce una serie di studi ottenuti con l'impiego di treni lunghi, in cui è stato possibile studiare movimenti coordinati di occhio e mano a 500ms dal collicolo superiore e dalla SMA (Chen & Walton, 2005; Freedman et al., 1996; Martinez-Trujillo et al., 2003), movimenti di accompagnamento degli occhi a 1000ms dal solco arcuato (Gottlieb et al., 1993), l'alterazione di giudizi percettivi a 1000ms della corteccia visiva e somatosensoriale (Romo et al., 1998; Salzman et al., 1990). Lo stesso Graziano ha rilanciato il metodo di stimolazione a treni lunghi (500ms) in una serie di studi condotti sulle aree motorie (Cooke & Graziano 2004, Graziano et al., 2002, 2004, 2005), offrendone al contempo un'interessante giustificazione epistemologica. Secondo Graziano l'impiego di un treno di stimolazione di 500ms nella corteccia motoria è giustificato dal fatto che i neuroni della corteccia motoria rispondono durante l'esecuzione di un intero movimento finalizzato, la cui durata si dispiega generalmente nell'arco di 500ms. Conseguentemente, mantenendo la stimolazione per tale finestra temporale è possibile stimolare impiegando una scala temporale comportamentale (BTS), e liberando in questo modo l'atto motorio finalizzato che è controllato dal sito. Le BTS-ICMS in motoria evocano in effetti movimenti complessi e apparentemente dotati di un valore ecologico preciso: raggiungimento nello spazio indipendentemente dalla posizione iniziale del braccio, manipolazione nello spazio centrale del corpo, movimenti di arrampicamento, movimenti difensivi, movimenti di accompagnamento di cibo alla bocca (pur in assenza di cibo in mano). Stimolazioni a scala comportamentale nel lobo parietale hanno evocato analoghe risposte (Stepniewska et al., 2005).

Nella misura in cui la BTS-ICMS è in grado di liberare un comportamento complesso, o di influenzare in maniera controllata il comportamento del soggetto, l'impiego di tale tecnica nell'Insula di Reil e nelle regioni perisilviane di scimmie sveglie e libere di muoversi, offre la possibilità di studiare per la prima volta le risposte funzionali conseguenti l'attivazione artificiale di queste aree. Infatti nel passato la stimolazione elettrica è stata eseguita in queste regioni

esclusivamente in condizioni di anestesia generale o a treni di stimolazione brevi, ragion per cui nulla è noto circa gli effetti comportamentali del loro reclutamento. In particolare, gli studi passati possono essere ritenuti validi qualora il fine fosse esclusivamente quello di sondare la pura risposta del SNA (pressione sanguigna, respirazione, attività cardiaca), o viceversa qualora ci si aspettasse risposte puramente motorie (in tal caso, infatti, un atto motorio – in caso di BTS-ICMS – o un twitch – in caso di ST-ICMS – indotto dalla stimolazione non sarebbe stato influenzato particolarmente dallo stato di veglia dell'animale). Come dimostrato in questo studio, tuttavia, la BTS-ICMS condotta su una regione non strettamente motoria della corteccia si mostra invece altrettanto, se non addirittura maggiormente interessante di una stimolazione BTS in aree motorie, e offre l'opportunità di studiare il ruolo funzionale della regione all'interno di paradigmi altamente naturalistici, quali il portare il cibo alla bocca, il masticare, o l'osservare l'individuo posto di fronte al soggetto sperimentale.

6.3. Il metodo

6.3.1. Impulsi

Le cellule cerebrali a riposo hanno una carica interna negativa rispetto alla carica presente nello spazio extracellulare, che raggiunge un potenziale a riposo compreso tra i -40mV e i -90mV. La stimolazione elettrica eccita le cellule riducendo il potenziale a riposo e depolarizzando la cellula, generando quindi un potenziale d'azione; ciò avviene quando uno stimolo negativo (catodico) viene rilasciato nel liquido extracellulare, o viceversa quando uno stimolo positivo (anodico) viene rilasciato all'interno della cellula. I canali responsabili dell'eccitazione sono i canali Na⁺ voltaggio dipendenti, che si aprono a seguito della stimolazione elettrica. Gli assoni amielinici contengono circa 100 canali Na⁺ voltaggio dipendenti per μm^2 di membrana. Questi canali sono uniformemente densi lungo tutta la lunghezza dei neuroni amielinici, ma sono particolarmente concentrati nel segmento iniziale (400 canali / μm^2). I neuroni mielinici mostrano una alta concentrazione di canali Na⁺ nei nodi di Ranvier, con una densità pari a 2000/12000 canali / μm^2 , mentre i canali Na⁺ tra i nodi sono scarsi. I canali Na⁺ presenti sul corpo cellulare hanno una densità pari a 60 canali / μm^2 (Hille, 1981). Conseguentemente, si stima che la regione di maggiore eccitabilità dei neuroni corticali sia il segmento iniziale o il nodo di Ranvier (Catterall 1981; Nowak & Bullier 1998a,b; Waxman and Quick 1978). Per le ragioni sopra esposte, l'ICMS su animali svegli (condotte con stimolazione nel liquido extracellulare) viene praticata con la cessione di onde quadre monofasiche con corrente negativa (o con stimolazioni bifasiche, come nell'esperimento presentato). È possibile ottenere tuttavia risultati apprezzabili anche con l'eccitazione monofasica

anodica, cioè con correnti positive. Durante una stimolazione anodica la corrente positiva concentrata intorno all'elettrodo induce la genesi di potenziali d'azione a partire dal/i successivo/i nodo/i di Ranvier; in questo caso si parla infatti di *next node stimulation* (Yoemans, 1990). La stimolazione catodica è comunque preferita non solo per la maggiore efficacia, ma anche per ragioni di sicurezza, poiché la stimolazione anodica può danneggiare il tessuto a causa della emissione di ioni metallici dall'elettrodo (Yoemans, 1990). La durata di un singolo pulse è variabile, ma la maggior parte degli studi, compreso il nostro, utilizza impulsi di 0,2ms (ad eccezione degli studi di stimolazione a coppie di impulsi, dove l'impulso è generalmente di un decimo di millisecondo). Gli impulsi di breve durata, come appunto gli impulsi a 0,2ms, hanno diversi vantaggi rispetto a impulsi di lunga durata: un impulso minore del periodo refrattario assoluto non può stimolare un assone più di una volta. Il punto di eccitazione è più definito ed il rischio di danneggiamento del tessuto è minore. Stimoli maggiori di 0,4ms dovrebbero essere comunque evitati per motivi cautelari.

6.3.2. Stimolatore

Sebbene molti studi del passato riportano i valori di voltaggio della stimolazione, l'utilizzo di stimolatori a corrente costante sono preferibili agli stimolatori a voltaggio costante. Sebbene la membrana dei neuroni è eccitata da variazioni di voltaggio, negli elettrodi di stimolazione è la corrente piuttosto che il voltaggio a determinare l'ampiezza del cambio di voltaggio attraverso la membrana. Questo perché gli stimolatori a voltaggio costante mantengono il voltaggio (V) costante tra gli elettrodi, quindi la corrente di stimolazione (I) varia con la resistenza (R), stando alla legge di Ohm $V = I R$. La resistenza del tessuto cerebrale può tuttavia variare a seconda di variabili quali crescita gliale, edema, sanguinamento, infezioni. Utilizzando stimolatori a corrente costante, la forma dell'impulso di corrente resta costante evitando che l'impulso vari con la resistenza del tessuto.

6.3.3. Polarizzazione

Un metodo per prevenire la polarizzazione dell'elettrodo è quello di inserire una stimolazione anodica immediatamente dopo una stimolazione catodica, provvista delle stesse caratteristiche (stimolazione bifasica). Questa procedura ha la funzione di impedire l'idrolisi ed il surriscaldamento del microelettrodo, fenomeni che possono portare ad un danneggiamento del tessuto cerebrale. Esistono fondamentalmente due scuole di pensiero in merito all'impiego di stimolazioni mono/bifasiche. La scuola che sostiene che una stimolazione catodica dovrebbe sempre essere seguita da una stimolazione anodica uguale ma di segno opposto (stimolazione

bifasica) è la scuola dominante nel campo della stimolazione corticale sull'uomo, un campo in cui la sicurezza del paziente è l'istanza predominante. L'altra scuola di pensiero sostiene che la stimolazione anodica potrebbe comunque essere pericolosa (come abbiamo detto, principalmente a causa della presenza di ioni metallici depositati all'estremità dell'elettrodo anodico) e inoltre che gli effetti inibitori della stimolazione anodica possano alterare gli effetti della stimolazione catodica, ragion per cui nel modello animale, dove l'istanza predominante è la precisione, è generalmente preferibile l'impiego di stimolazioni monofasiche catodiche. Sebbene caso di stimolazione a treni brevi la scelta tra i due metodi sia sostanzialmente a discrezione degli sperimentatori, quando la stimolazione viene mantenuta per lunghi periodi di tempo – come nell'esperimento descritto in questa Tesi di Dottorato – l'impiego di impulsi bifasici è sostanzialmente obbligato a causa dell'aumento del rischio di lesioni tissutali da surriscaldamento dell'elettrodo.

6.3.4. Resistenza del tessuto

Quando la resistenza ad un flusso di corrente è uniforme in tutte le direzioni, il medium è definito isotropico; in un medium isotropico, il campo che definisce la resistenza al flusso di corrente è sostanzialmente una sfera disegnata intorno alla punta dell'elettrodo. Poiché la superficie di una sfera è pari a $4\pi r^2$, il flusso di corrente è quindi pari a $I / 4\pi r^2$. Sebbene un medium isotropico rappresenti una situazione ideale di stimolazione elettrica, in cui la corrente si diffonde in maniera uniforme intorno all'elettrodo, il tessuto biologico non è sempre simile ad un medium isotropico: la corrente attraversa facilmente il fluido cerebrospinale, la salina o il plasma; una qualsiasi membrana aumenta invece la resistenza. Nel sangue, la resistenza aumenta da 50 Ohm/cm a 300Ohm/cm, a seconda del numero di globuli rossi, con un valore medio di 160Ohm/cm con un ematocrito normale (40%). La resistenza maggiore in un tessuto biologico è data dal grasso, la cui resistenza è comunque ampiamente variabile. Per quello che riguarda da vicino i nostri interessi, la sostanza grigia ha una resistenza inferiore alla sostanza bianca dovuta all'alta concentrazione di citoplasma e alla bassa concentrazione di mielina, la quale naturalmente ha una resistenza maggiore del primo. Sebbene come abbiamo detto il tessuto biologico non è mai esattamente isotropico, consegue da quanto detto che nel tessuto corticale la direzione di un flusso di corrente di stimolazione è facilitata lungo i dendriti, piuttosto che attraverso i dendriti; in quest'ultimo caso, infatti, aumenta il numero di membrane, e quindi di resistenze, che la corrente deve attraversare. Questo dato favorisce l'ipotesi, che come si dirà a breve è oggi confermata con metodi di neuroimmagini, che anche durante stimolazioni ad alta intensità di corrente la diffusione della stessa sia favorita lungo le connessioni neuroanatomiche piuttosto che sparsa intorno al tessuto adiacente l'elettrodo. Conseguentemente, è ipotizzabile che una stimolazione dotata di sufficiente intensità indotta per un

tempo sufficiente possa reclutare un pattern neuroanatomico coinvolgente diverse aree funzionalmente e anatomicamente connesse. Nella sostanza grigia, inoltre, la distribuzione delle membrane è arrangiata in maniera piuttosto casuale, ragion per cui l'assunzione di isotropia è approssimativamente vera quando non si stimola vicino a ventricoli o a crossi vasi sanguigni.

6.3.5. Diffusione di corrente

Poiché nell'esperimento discusso in Tesi di Dottorato si è fatto uso di correnti molto alte rilasciate per treni prolungati, è opportuno chiarire il problema della diffusione di corrente durante stimolazione. In letteratura (Tehovnik 1996; Tehovnik et al., 2006) si stabilisce che il raggio dell'area stimolata sia calcolabile mediante la seguente formula: $r^2 = I/K$, dove I indica l'intensità di stimolazione in μA e K definisce la costante di eccitabilità di una regione, ovvero l'intensità di corrente in μA necessaria per stimolare a una distanza di 1mm dalla punta dell'elettrodo. Il valore K è inversamente proporzionale alla grandezza dei neuroni stimolati e al grado di mielinizzazione della corteccia stimolata. Inoltre, come abbiamo detto sopra, l'eccitabilità di un sito dipende inoltre dalle resistenze specifiche del tessuto biologico (membrane, mielinizzazione, presenza di ventricoli e vasi). Conseguentemente, il valore K varia ampiamente da regione a regione.

Lo studio dell'eccitabilità di singole regioni può essere stimato con diverse metodologie di tipo comportamentale o impiegando fMRI. Nel primo caso, le proprietà di diffusione e di eccitabilità possono essere indagate impiegando come metro il comportamento evocato dal soggetto. I due gruppi principali che hanno condotto tali studi si sono occupati tuttavia di aree diverse da quelle di nostro interesse: l'area extra striata MT (Murasugi et al., 1993) e l'area striata V1 (Tehovnik et al., 2004, 2005). Il valore K per MT sembra gravitare intorno ai 2000 $\mu A/mm^2$, mentre in V1 il valore K sembra gravitare intorno ai 675 $\mu A/mm^2$. Si valuta che già il valore K in motoria sia soggetto a variazioni che occupano una finestra $K = 272 / 3460$. La costante di eccitabilità massima registrata per piccoli neuroni corticali amielinici è di 27000 $\mu A/mm^2$ (Tehovnik et al., 2006). Purtroppo non esistono studi comportamentali sul valore K delle regioni del solco laterale; le differenze architetturiche delle regioni in questione e la presenza di solchi e vasi portano con ogni probabilità ad una grande variabilità del valore K .

Come è stato detto, l'altro metodo per valutare la diffusione di corrente in corteccia è mediante l'impiego di fMRI. Nel 2005 Tolia e collaboratori hanno impiegato questo metodo per studiare il segnale BOLD, con fMRI a 4,7 Tesla, nello studio della diffusione di corrente a seguito di ICMS in V1 sulla scimmia in anestesia. Il treno di stimolazione è stato portato a 4s al fine di ottimizzare l'acquisizione (e corrisponde al treno temporale necessario per evocare risposte visive da V1, secondo quanto descritto da Logothetis et al., 1999, 2001. Tuttavia, risposte apprezzabili

sono state ottenute anche con treni di 200ms), e la stimolazione è stata eseguita con impulsi bifasici di 0,2ms a 100Hz, con correnti da 10 μ A a 1800 μ A. Due sono stati i risultati dell'esperimento. In primo luogo si è osservato che la diffusione di corrente intorno all'elettrodo è maggiore di quello che era previsto dai calcoli sulla diffusione passiva di corrente. ICMS dell'opercolo di V1 evocano un segnale BOLD diffuso per un raggio di 5,8mm. Questa attivazione mostra una diffusione di attivazione di una parte di sostanza grigia molto più ampia di quella prevista dai calcoli riportati da Stoney e collaboratori (1968) e sopra descritti, pari sostanzialmente ad un incremento del raggio di 2,65mm. Questa maggiore diffusione intorno all'elettrodo è spiegata dagli autori in termini di diffusione effetto di connessioni orizzontali, e quindi in ultima analisi riconducibile ad una diffusione fisiologica che rispetta i criteri della connettività neuroanatomica del tessuto stimolato. Il secondo dato, più sorprendente ed in grado di supportare con forza questa interpretazione, riguarda la diffusione transinaptica di corrente verso le aree visive extrastriate. ICMS di V1 induce infatti una risposta BOLD nelle aree V2, V3, V4 ed MT/V5, risparmiando le regioni limitrofe e le regioni interposte tra le aree citate. L'assenza di attivazione tra regioni interposte ai siti reclutati da ICMS, ad esempio tra V2/V3 e MT/V5, suggerisce un'attivazione dovuta agli effetti transinaptici della stimolazione. Inoltre, l'aumento di intensità di stimolazione incrementa significativamente l'attivazione del tessuto corticale di siti quali MT/V5, mentre correnti contenute non mostrano attivazioni al di fuori del sito di stimolazione, suggerendo che l'aumento di intensità conduce con più forza il segnale elettrico lungo le connessioni neuroanatomiche del sito d'origine.

6.4. Osservazioni sui parametri adottati nel presente studio

Nello studio descritto nella presente Tesi di Dottorato si è fatto utilizzo di intensità e treni di stimolazioni non standard, se confrontati con i parametri di stimolazione tipicamente impiegati ad esempio negli studi delle cortecce motorie. Ciò ha sollevato il dubbio che gli effetti comportamentali osservati con BTS-ICMS potessero essere dovuti a diffusioni di corrente intorno al sito di stimolazione. Confrontando la letteratura scientifica sopra riportata, tuttavia, alcuni dati suggeriscono che le cose non stanno così. In primo luogo, si è detto che nel tessuto corticale la direzione di un flusso di corrente di stimolazione è facilitata lungo i dendriti, e non attraverso i dendriti, poiché in tal caso, aumentando le membrane cellulari da attraversare, aumenta la resistenza complessiva al flusso di corrente. Questo dato suggerisce che un aumento di intensità di stimolazione si risolva prevalentemente in termini di diffusione lungo i canali neuroanatomici studiati dall'odologia. Lo studio di Tolia e collaboratori (2005) conferma questa idea per mezzo di una osservazione diretta dei segnali BOLD a seguito di ICMS ad alta intensità di stimolazione e

aggiunge il dato di un passaggio di corrente transinaptico. Come abbiamo detto, infatti, questo studio dimostra che l'aumento di intensità di stimolazione si risolve prevalentemente in una maggiore attivazione di siti non adiacenti al sito di stimolazione, bensì connessi anatomicamente come dimostrato dagli studi odologici. La nostra osservazione di forti variazioni comportamentali nell'arco di 500 μ m di profondità dimostrano ulteriormente che gli effetti comportamentali osservati e descritti nel presente studio non possono essere dovuti ad una distribuzione anarchica di corrente intorno all'elettrodo. Complessivamente, quindi, lo studio della fisica della stimolazione, nonché l'osservazione sperimentale per mezzo di fMRI e l'osservazione clinica della variazione degli effetti comportamentali indotti da ICMS, convergono verso l'interpretazione secondo la quale gli effetti da BTS-ICMS descritti nel presente studio vadano ricondotti al reclutamento di specifici network neuronali. Il neurofisiologo Michael Graziano ha sostenuto (2006) che è proprio la possibilità di reclutare un circuito fisiologico per mezzo di stimolazioni a parametri non standard, a darci la possibilità di fare mimare al sito stimolato la sua funzione naturale. Concludendo, da un punto di vista metodologico il presente studio può essere letto come una dimostrazione dell'efficacia della strategia di reclutamento di specifici network neuronali durante la mappatura funzionale di una regione non motoria mediante BTS-ICMS in condizioni naturalistiche.

7. BIBLIOGRAFIA

- Afif A., Bouvier R., Buenerd A., Trouillas J., Mertens P., 2007: *Development of the human fetal insular cortex : study of the gyration from 13 to 28 gestational weeks*, Brain. Struct. Funct., 212 (3-4):335-346.
- Ariëns Kappers C.U., 1920-1921: *Die vergleichende Anatomie des Nervensystem der Wirbeltiere und des Menschen*, Bohn, Haarlem, 2 vols.
- Ariëns Kappers C.U., Huber G.C., Crosby E.C., 1936: *The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man*. The Macmillan Company, New York, 2 vols.
- Augustine JR., 1996: *Circuitry and Functional Aspects of the Insular Lobe of Primates including Humans*, Brain Res. Reviews, 22, 229-244.
- Belmalih A., Borra E., Gerbella M., Rozzi S., Luppino G., 2007: *Connections of architectonically distinct subdivisions of the ventral premotor area F5 of the macaque*, SfN abstr., 636.5/DDD22.
- Caggiula AR., Hoebel BG., 1966: "Copulation-reward site" in the posterior hypothalamus, Science 153:1284-85
- Calder A., Keane J., Manes F., Antoun N., Young A., 2000: *Impaired recognition and experience of disgust following brain injury*, Nature Neuroscience, 3, n.11.
- Cardinal et al., 2002 : *Emotion and Motivation : the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex*, Neuroscience and Biobehavioral Reviews 26, 321-352.
- Carmichael, S.T., J.L. Price, 1996: *Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys*, J. Comp. Neurol. 371:179-207.
- Catenoix H., Isnard J., Guénot M., Petit J., Remy C., Mauguière F., 2008: *The role of the anterior insular cortex in ictal vomiting. A stereotactic electroencephalography study*, Epilepsy & Behavior 13:560-563.
- Cattaneo L., Chierici E., Cucurachi L., Cobelli R., Pavesi G., 2007: *Posterior insular stroke causing selective loss of contralateral nonpainful thermal sensation*, Neurology, 68:237.
- Catterall WA. 1981: *Localization of sodium channels in cultured neural cells*. J Neurosci 1: 777-783.
- Cereda C., Ghika J., Maeder P., Bogousslavsky J., 2002: *Strokes restricted to the insular cortex*, Neurology, 59:1950-1955.
- Chen LL., Walton MM., 2005: *Head movement evoked by electrical stimulation in the supplementary eye field of the rhesus monkey*, J. Neurophysiol. 94:4502-19.

-
- Chikama et al., 1997: *Insular Cortical Projections to Functional Regions of the Striatum Correlate with Cortical Cytoarchitectonic Organization in the Primate*, J.Neurol., 17(24): 9686-9705.
 - Christensen H., Boysen G., Christensen A.F., Johanesen H.H., 2005: *Insular lesions, ECG abnormalities, and outcome in acute stroke*, J.Neurol.Neurolurg. Psychiatry, 76:269-271.
 - Cipolloni & Pandya 1999: *Cortical Connections of the Frontoparietal Opercular Areas in the Rhesus Monkey*, J.Comp.Neurol., 403: 431-458.
 - Clascà F., Llamas A., Reinoso-Suàrez F., 2000: *Cortical connections of the insular and adjacent parieto-temporal fields in the Cat*, Cerebral Cortex, 10:371-399.
 - Colebatch JG., Deiber MP., Passingham RE., Friston KJ., Frackowiak RSJ., 1991: *Regional cerebral blood flow during voluntary arm and hand movements in human subjects*, Neurophysiol. 1991 Jun;65(6):1392-401
 - Cooke DF., Graziano MSA., 2004: *Sensorimotor integration in the precentral gyrus: polysensory neurons and defensive movements*, J. Neurophysiol. 91:1648-60.
 - Craig A.D., 2002: *How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body*, Nat.Neurosc.Rev., 3, 655-666.
 - Craig A.D., 2003: *Interoception: the sense of the physiological condition of the body*. Curr.Opin.Neurobiol., 13:500-505.
 - DeLong M., Wichmann T., 2008: *La stimolazione cerebrale profonda: nuovi sviluppi*, in Progressi della scienza che studia il cervello, The European Dana Alliance for the Brain.
 - Disbrow et al., 2003 : *Cortical Connections of the Second Somatosensory Area and the Parietal Ventral in the Macaque Monkeys*, J.Comp.Neurol., 462: 382-399.
 - Ferrier D., 1875a: *Experiments on the Brain of the Monkeys. First series*. Proceeding of the Royal Society, 23, 409-430.
 - Ferrier D., 1875b: *Experiments on the Brain of the Monkeys. Second series*. The Philosophical Transactions of the Royal Society, 185, 438-488.
 - Ferrier D., 1886: *The Functions of the Brain*, London, Smith Edler (Ed).
 - Freedman EG., Stanford TR., Sparks DL., 1996: *Combined eye-head gaze shifts produced by electrical stimulation of the superior colliculus in rhesus monkeys*, J. Neurophysiol. 76:927-52.
 - Friedman D.P., Jones E.G., Burton H., 1980: *Representation Pattern in the Second Somatic Sensory Area of the Monkey Cerebral Cortex*, J.Comp.Neurol., 192:021-041.
 - Fritsch G., Hitzig E., 1870: *Ueber die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns*, Archiv fuer Anatomie und Physiologie, 37, 300-332.

-
- Frontera J.G., 1956: *Some results obtained by electrical stimulation of the cortex of the Island of Reil in the brain of the Monkey (Macaca Mulatta)*, J. Comp. Neurol., 105, 3, 365-394.
 - Fudge et al., 2005: *Insular and Gustatory Inputs to the Caudal Ventral Striatum in the Primates*, J.Comp.Neurol., 490:101-118.
 - Gothard KM., Erickson CA., Amaral DG., 2004: *How do rhesus monkeys (Macaca mulatta) scan faces in a visual paired comparison task?*, Anim Cogn. Jan;7(1):25-36.
 - Gottlieb JP., Bruce CJ., MacAvoy MG., 1993: *Smooth eye movements elicited by microstimulation in the primate frontal eye field*, J. Neurophysiol. 69:786–99.
 - Graziano MSA., 1996: *The organization of behavioral repertoire in Motor Cortex*, Annu Rev Neurosci. 29:105-134.
 - Graziano MSA., Taylor CSR., Moore T., 2002: *Complex movements evoked by microstimulation of precentral cortex*, Neuron 34:841–51.
 - Graziano MSA., Patel KT., Taylor CSR., 2004: *Mapping from motor cortex to biceps and triceps altered by elbow angle*, J. Neurophysiol. 92:395–407.
 - Graziano MSA., Aflalo T., Cooke DF., 2005: *Arm movements evoked by electrical stimulation in the motor cortex of monkeys*, J. Neurophysiol. 94:4209–23.
 - Hess WR., 1957: *The functional organization of the Diencephalon*, New York, Greene & Stratton.
 - Hille B., 1981: *Excitability and ionic channels*, In Basic Neurochemistry, G.J.Siegel, R.W.Albers, B.W.Agranoff, R.Katzman (Eds). Boston: Little Brown, 1981.
 - Hoebel BG., 1969: *Feeding and self-stimulation*, Ann. NY Acad. Sci..157:758–78.
 - Hoffman B.L., Rasmussen T., 1952: *Stimulation studies of Insular Cortex of Macaca Mulatta*, J.Neurophysiol., 16(4): 343-351.
 - Höistad M., Barbas H., 2008: *Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with amygdala*, Neuroimage 40, 1016-1033.
 - Isnard J., Guénot M., Sindou M., Mauguière F., 2004: *Clinical Manifestation of Insular Lobe Seizures: A Stereo-electroencephalographic Study*, Epilepsia, 45(9):1079-1090.
 - Isnard J., Mauguière F., 2005: *Le lobe de l'insula et les épilepsies partielles*, Rev. Neurol. (Paris), 161:1, 17-26.
 - Jacobs M.S., Galaburda A.M., McFarland W.L., Morgane P.J., 1984: *The insular formations of the dolphin brain: quantitative cytoarchitectonic studies of the insular component of the limbic lobe*, J.Comp.Neurol., 225(3):396-432.
 - Jones E.G., Burton H., 1976: *Areal differences in the laminar distribution of thalamic afferents in cortical fields of the insular, parietal and temporal regions of primates*, J. Comp. Neurol., 168, 2, 197-247.

-
- Kaada et al., 1949: *Respiratory and Vascular responses in Monkey from Temporal Pole, Insula, Orbital Surface and Cingulate Gyrus*, J.Neurophysiol., 12:347-356.
 - Krolak-Salmon P., Hènaff M., Isnard J., Tallon-Baudry C., Guénot M., Vighetto A., Bertrand O., Mauguière F., 2003: *An Attention Modulated Response to Disgust in Human Ventral Anterior Insula*, Ann.Neurol., 53:446-453.
 - Krubitzer et al., 1995: *A Redefinition of Somatosensory Areas in the Lateral Sulcus of Macaque Monkeys*, Journal of Neuroscience, May 15(5): 3821-3839.
 - Landau E., 1934: *Quelque considerations sur l'Ile de Reil*, Arch.anat., Strassburg, 18 :373-382.
 - Loewy, A.D., 1991: *Forebrain nuclei involved in autonomic control*, Prog. Brain Res. 87:253–268.
 - Logothetis NK., Guggenberger H., Peled S., Pauls J., 1999: *Functional imaging of the monkey brain*. Nat Neurosci 2: 555–562.
 - Logothetis NK., Pauls J., Augath M., Trinath T., and Oeltermann A., 2001: *Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal*. Nature 412: 150–157.
 - Luppino G., Matelli M, Camarda R, Rizzolatti G., 1993: *Corticocortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey*, J. Comp. Neurol., 338, 114-40.
 - Manger P., Sum M., Szymanski M., Ridgway S.H., Krubtizer L., 1998: *Modular subdivisions of dolphin insular cortex: does evolutionary history repeat itself?* J.Cogn.Neurosc. Vol. 10, n. 2.
 - Martinez-Trujillo JC., Wang H., Crawford JD., 2003: *Electrical stimulation of the supplementary eye fields in the head-free macaque evokes kinematically normal gaze shifts*, J. Neurophysiol. 89:2961–74.
 - Mazzola L., Isnard J., Mauguière F., 2006: *Somatosensory and Pain Responses to Stimulation of the Second Somatosensory Area (SII) in Humans. A comparison with SI and Insular Responses*, Cerebral Cortex, 16:960-968.
 - Mesulam M.M., Mufson E.J., 1982a: *Insula of the Old World Monkey. I: Architectonics in the Insulo-orbital-temporal Component of the Paralimbic Brain*, J.Comp.Neurol., 212, 1-22.
 - Mesulam M.M., Mufson E.J., 1982b: *Insula of the Old World Monkey. II: Afferent cortical input and comments on the claustrum.*, J. Comp. Neurol., 212, 23-37.
 - Mesulam M.M., Mufson E.J., 1982c: *Insula of the Old World Monkey. III: Efferent cortical output and comments on function*, J.Comp.Neurol., 212, 38-52.
 - Mesulam M.M., Mufson E.J., 1984: *Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus*, J. Comp. Neurol., 227, 109-120.

-
- Morabito C., 1996: *La cartografia del cervello. Il problema delle localizzazioni cerebrali nell'opera di David Ferrier, fra fisiologia, psicologica e filosofia*, FrancoAngeli.
 - Morán M.A., Mufson E.J., Mesulam M.M., 1987: *Neural inputs into the temporopolar cortex of the rhesus monkey*, J.Comp.Neurol., 1;256(1):88-103.
 - Morel A., Rouller E.M., Poveda A., Jeanmonod D., 2008: *The Insula Revisited: multiarchtectonic organization in human and non-human primates*, FENS abstr., vol.4, 223.8.
 - Mufson E.J., Mesulam M.M., Pandya D.N., 1981: *Insular interconnections with the amygdala in the rhesus monkey*, Neuroscience, 6(7): 1231-1248.
 - Murasugi C., Salzman CD., Newsome WT., 1993: *Microstimulation of visual area MT: effects of varying pulse amplitude and frequency.*, J Neurosci 13: 1719–1729.
 - Nowak LG., Bullier J. 1998a: *Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. I. Evidence from chronaxie measurements.* Exp Brain Res 118: 477–488.
 - Nowak LG., Bullier J. 1998b: *Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. II. Evidence from selective inactivation of cell bodies and axon initial segments.* Exp Brain Res 118: 489–500.
 - Ogawa H, Ito S, Nomura T., 1989: *Oral cavity representation at the frontal operculum of macaque monkeys*, Neurosci Res. Apr;6(4):283-98.
 - Ongur D., An X., Price J.L., 1998: *Prefrontal Cortical Projections to the Hypothalamus in Macaque Monkeys*, J.Comp.Neurol., 401:480-505.
 - Oppenheimer S., Gelb A., Girvin J., Hachinski V., 1992: *Cardiovascular effects of Human Insular Cortex Stimulation*, Neurology, 42:1727-1732.
 - Ostrowsky K., Magnin M., Ryvlin P., Isnard J., Guénot M., Mauguière F., 2002: *Representation of Pain and Somatic Sensation in the Human Insula: a Study of Responses to Direct Electrical Cortical Stimulation*, Cerebral Cortex, 12:376-385.
 - Penfield W., Steelman H., 1947: *The Treatment of Focal Epilepsy by Cortical Excision*, Annals of Surgery, Vol.126, 5:740-761.
 - Penfield W., Baldwin M., 1955: *Temporal Lobe Seizures and the Technic of Subtotal Temporal Lobectomy*, Annals of Surgery, Vol.136, 4:625-634.
 - Penfield W., Paine K., 1955: *Results of Surgical Therapy for Focal Epileptic Seizures*, Canadian Medical Association Journal, 73, 7:515-531.
 - Penfield W., Rasmussen T., 1957: *The Cerebral Cortex of Man. A clinical study of localization of functions*, New York, MacMillan.
 - Pribram K.H., Lennox M.A., Dunsmore R.H., 1950: *Some connection of the orbito-fronto-temporal, limbic and hippocampal areas of Macaca Mulatta*, J.Neurophy., 13:127-135.

-
- Pribram K.H., McLean P.D., 1952: *Neuronographic analysis of medial and basal cerebral cortex. II. Monkey*, J.Neurophy., 16:324-340.
 - Remedios R., Logothesis N., Kayser C., 2008: *Auditory Representations in the Insula Cortex*, FENS abstr., vol.4, 188.21
 - Risold P.Y., Thompson R.H., Swanson L.W., 1997: *The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex*, Brain Res. Rev., 24, 197-254.
 - Roberts T., Akert K., 1963: *Insular and opercular cortex and its thalamic projection in Macaca Mulatta*, Arch. Neurol. Neurochi. Psych., 92, 1-43. .
 - Robinson C.J., Burton H., 1980: *Somatotopic Organization in the Second Somatosensory Area of M.Fascicularis*, J.Comp.Neurol., 192:043-067.
 - Robinson C.J., Burton H., 1980: *Organization of Somatosensory Receptive Fields in Cortical Area 7b, Retroinsula, Postauditory and Granular Insula of M.Fascicularis*, , J.Comp.Neurol., 192:069-192.
 - Robinson C.J., Burton H., 1980: *Somatic Submodality Distribution Within the Second Somatosensory (SII), 7b, Retroinsular, Postauditory, and Granular Insular Cortical Areas of M.Fascicularis*, J.Comp.Neurol., 192:093-108.
 - Romo R., Hernandez A., Zainos A., Salinas E., 1998: *Somatosensory discrimination based on cortical microstimulation*, Nature 392:387–90.
 - Salzman CD., Britten KH., Newsome WT., 1990: *Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction*, Nature 346:174–77.
 - Sanides F., 1968: *The architecture of the cortical taste nerve areas in squirrel monkey (Saimiri sciureus) and their relationships to insular, sensorimotor and prefrontal regions*, Brain Res., 1:97-124.
 - Sanides F., 1970: *Functional Architecture of Motor and Sensory Cortices in Primates in the Light of a New Concept of Neocortex Evolution*, The Primate Brain, ed. C.R. Nobak, W. Montagna, 137-208, N.Y.
 - Sanides F., 1972: *Representation in the cerebral cortex and its areal lamination patterns*, G.H. Bourne (ed), The structure and functions of nervous tissue, Vol.5, NY: Academic Press.
 - Saper CB., 2002: *Conscious Visceral Perception and Autonomic Pattern Generation*, Ann Rev Neurosci., 25, 433-469.
 - Schneider R.J., Friedman D.P., Mishkin M., 1993: *A modality-specific somatosensory area within the insula of the rhesus monkey*, Brain Res., 621, 116-120.
 - Shi C.J., Cassell M.D., 1998: *Cortical, thalamic, and amigdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices*, J.Comp.Neurol., 399:440-468.

-
- Showers M.J.C., Lauer E.W., 1961: *Somato-visceral Motor Patterns in the Insula*, J.Comp.Neurol., 117, 107-115.
 - Seeck M., Blanke O., Jallon P., Picard F., Zaim S., 2001: *Symptomatic postictal cardiac asystole in a young patient with partial seizures*, Europace, 3:247-252.
 - Seeck M., Blanke O., Zaim S., 2002: *Temporal lobe epilepsy and postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS)*, Epilepsy & Behavior, 3:285-288.
 - Stoney SD Jr., Thompson WD., Asanuma H., 1968: *Excitation of pyramidal tract cells by intracortical microstimulation: effective extent of stimulating current.*, J Neurophysiol 31: 659–669.
 - Stepniewska I., Fang PC., Kaas JH., 2005: *Microstimulation reveals specialized subregions for different complex movements in posterior parietal cortex of prosimian galagos*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:4878–83.
 - Streeter G.L., 1912: *The development of the nervous system*. In: Keibel F., Mall F.P., (eds) Manual of human embryology, vol.II, chapter XIV, Lippincott, Philadelphia.
 - Tehovnik EJ., 1996: *Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses*. J.Neuroscience Methods, 65:1-17.
 - Tehovnik EJ., Slocum WM., Schiller PH., 2004: *Microstimulation of VI delays the execution of visually guided saccades.*, Eur J Neurosci 20: 264–272.
 - Tehovnik EJ., Slocum WM., Carvey CE., Schiller PH., 2005: *Phosphene induction and the generation of saccadic eye movements by striate cortex*. J Neurophysiol 93: 1–19.
 - Tehovnik EJ, Tolias AS, Sultan F, Slocum WM, Logothetis NK., 2006: *Direct and Indirect Activation of Cortical Neurons by Electrical Microstimulation.*, J Neurophysiol 96(2):512-21.
 - Tolias AS., Sultan F., Augath M., Oeltermann A., Tehovnik EJ., Schiller PH., and Logothetis NK., 2005: *Mapping cortical activity elicited by electrical microstimulation using fMRI in the macaque*, Neuron 48: 901–911.
 - Verhagen J.V., Kadohisa M., Rolls E.T., 2004: *Primate insular/opercular taste cortex: neuronal representations of the viscosity, fat texture, grittiness, temperature and taste of foods*, J.Neurophysiol., 92, 1685-1699.
 - Von Bonin G., Bailey P., 1947: *The Neocortex of Macaca Mulatta*, Illinois: The University of Illinois Press.
 - Warner HR., Cox A., 1962: *A mathematical model of heart rate control by sympathetic and vagus efferent information*, J Appl Physiol., 17: 349-355.
 - Waxman SG., Quick DC. 1978: *Functional architecture of the initial segment*. In: Physiology and Pathobiology of Axons, edited by Waxman SG. New York: Raven Press.

-
- Woolsey CN., 1958: *Organization of somatic sensory and motor areas of the cerebral cortex*, in Biological and Biochemical Bases of Behavior, HF Harlow and CN Woolsey (Eds) Madison, Wisc.: University of Wisconsin Press.
 - Yaxley S., Rolls E.T., Sienkiewicz Z.J., 1990: *Gustatory responses of single neurons in the insula of the Macaque Moneky*, J. Neurophysiol., 63, 4, 689-700.
 - Yarbus AL., 1967: *Eye movements and vision*, Plenum, New York.
 - Yoemans J., 1990: *Principles of Brain Stimulation*, New York, Oxford University Press.
 - Verhagen J.V., Kadohisa M., Rolls E.T., 2004: *Primate insular/opercular taste cortex: neuronal representations of the viscosity, fat texture, grittiness, temperature and taste of foods*, J. Neurophysiol., 92, 1685-1699.
 - Zhang Z., Dougherty P.M., Oppenheimer S.M., 1998: *Characterization of baroreceptor-related neurons in the monkey insular cortex*, Brain Res., 796, 303-306.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare i professori Vittorio Gallese e Giacomo Rizzolatti per la fiducia concessami e per la grande esperienza e professionalità messe a disposizione. Ringrazio inoltre il dott. Ahmad Jezzini, con il quale ho condiviso questo studio sin dagli esordi, il dott. Stefano Rozzi per avermi formato alla pratica chirurgica, ed il dott. Ivilin Stoianov per l'inalutabile supporto informatico.

